



**DOHÁNY EREDETŰ NYERSANYAGOK MINŐSÉGÉNEK
ÉS FELHASZNÁLHATÓSÁGÁNAK BIOKÉMIAI ÉS
MIKROBIOLÓGIAI JELLEMZÉSE**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

SZEDLJAK ILDIKÓ

Budapest, 2011

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: **Dr. Fodor Péter**
Egyetemi tanár, az MTA doktora
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
Alkalmazott Kémia Tanszék

Témavezető: **Dr. Kosáry Judit**
Egyetemi tanár, az MTA doktora
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar
Alkalmazott Kémia Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2011. október 4-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Biacs Péter DSc, BCE/ Magyar Élelmiszerbiztonsági Hivatal

Tagjai

Stefanovitsné Bányai Éva, DSc, BCE Alkalmazott Kémia Tanszék

Salgó András, DSc, BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Lugasi Andrea CSc, OÉTI

Lelik László, CSc, BCE Élelmiszerkémiai és Táplálkozástudományi Tanszék

Opponensek

Nyeste László, DSc, BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

Hegedűs Attila, PhD, BCE Kertészettudományi Kar, Genetika és Növénynevelési Tanszék

Titkár

Kóczán Györgyné Manninger Katalin, PhD, BCE Gabona és Iparinövény Technológia Tanszék

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS	7
1.1	Doktori értekezésem előzményei	8
1.2	Célkitűzések	9
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
2.1	Hazánkban termesztett dohányok	11
2.1.1	A dohány típusai	12
2.2	A dohánylevelek elsődleges feldolgozása	13
2.2.1	A dohány szárítása	13
2.2.2	A természetes szárítás	14
2.2.3	A mesterséges szárítás	16
2.2.4	A szárítás során végbemenő változások	22
2.2.5	A dohány fermentálása, a fermentálás során lejátszódó változások	29
2.3	Mikrobiológiai változások a dohány elsődleges feldolgozása alatt	33
2.3.1	A dohányok minőségromlását befolyásoló környezeti tényezők	37
2.4	Oxidoreduktáz enzimek szerepe a növények életfolyamataiban és feldolgozásuk során	39
2.4.1	Peroxidázok (POX) (E.C. 1.11.1.7.)	40
2.4.2	Polifenol-oxidázok (PPO) (E.C. 1.14.18.1.)	41
2.4.3	Lipoxigenázok (LOX) (EC 1.13.11.12)	44
2.5	A dohánynövény fehérje összetételének jelentősége	44
2.5.1	A dohányfehérje alkalmazásának lehetőségei a takarmányozásban és a táplálkozásban	47
3	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	49
3.1	Kísérletek helye, alkalmazott műszerek és berendezések, valamint vegyszerek	49
3.2	Az eredmények statisztikai értékelése	50
3.3	Saját termesztésű dohánynövényeim vizsgálata	50
3.3.1	Vegetációs időszak	51
3.3.2	Természetes szárítási periódus	52
3.3.3	Kombinált szárítási periódus	52
3.3.4	Fermentációs periódus	52
3.3.5	Fermentáló üzem dohánymintái	53
3.4	Biokémiai módszerek	53
3.4.1	Mintaelőkészítés, kivonatok készítése	53
3.4.2	Peroxidáz enzimaktivitás meghatározása	53
3.4.3	Polifenol-oxidáz enzimaktivitás meghatározása	54
3.4.4	Lipoxigenáz enzimaktivitás meghatározása	54
3.4.5	Vízben oldható polifenol tartalom meghatározása	54
3.4.6	Vízben oldható fehérjetartalom meghatározása	55
3.5	Mikrobiológiai vizsgálatok	55
3.5.1	Alap szuszpenzió, „törzsoldat” készítése	55
3.5.2	Hígítási sor készítése	56
3.5.3	Mezofil aerob mikroorganizmusok élősejt számának meghatározása	56
3.5.4	Mezofil aerob spórás baktériumok vizsgálata	56
3.5.5	Penész-élesztőszám meghatározása	57
3.5.6	Anaerob mikroorganizmusok mennyiségi meghatározása	57
3.5.7	Penészgombák izolálása	58
3.5.8	Mikroszkópos preparátumok készítése a penészgombák faj szerinti meghatározáshoz	58
4	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS	59
4.1	A mintavétel fontossága	59
4.2	Saját termesztésű dohánynövények	60

4.2.1	Vegetációs időszak.....	60
4.2.1.1	A saját termesztésű dohánylevél peroxidáz aktivitása.....	60
4.2.1.2	A saját termesztésű dohánylevél polifenol-oxidáz aktivitása.....	63
4.2.1.3	A saját termesztésű dohánylevél lipoxigenáz aktivitása.....	65
4.2.1.4	A saját termesztésű dohánylevél vízben oldható polifenol tartalma.....	66
4.2.1.5	A saját termesztésű dohánylevél vízben oldható fehérjetartalma.....	68
4.2.2	Szárítási periódus.....	71
4.2.2.1	A saját termesztésű dohánynövény szárítása.....	71
4.2.2.2	A kombinált szárítási módszer biokémiai értékelése.....	72
4.2.2.3	A természetes szárítási módszer biokémiai értékelése.....	81
4.2.3	Fermentációs periódus.....	82
4.2.3.1	Fermentáció a kombinált szárítás után.....	83
4.2.3.2	Fermentáció a természetes szárítás után.....	86
4.2.3.3	A saját termesztésű dohány anyalevek kémiai analízise a fermentációs periódus során	88
4.2.4	A saját termesztésű dohánynövény feldolgozásának összefoglalása.....	89
4.2.4.1	Vegetációs periódus.....	89
4.2.4.2	Szárítási periódus.....	90
4.2.4.3	Fermentációs periódus.....	92
4.2.5	A saját termesztésű dohány anyalevek mikrobiológiai vizsgálata a fermentációs periódus során.....	92
4.2.5.1	Mezofil aerob mikrobaszám.....	92
4.2.5.2	Mezofil anaerob mikrobaszám.....	94
4.2.5.3	A saját termesztésű dohánynövény mikrobiológiai vizsgálatának összefoglalása	95
4.3	Az üzemi termesztésű dohány anyalevek vizsgálata az üzemi gépi fermentálás során..	95
4.3.1	A dohány anyalevek kémiai analízise üzemi gépi fermentálás előtt.....	99
4.3.2	Az üzemi termesztésű dohány anyalevek mikrobiológiai vizsgálata üzemi gépi fermentálás alatt.....	99
4.3.2.1	Az üzemi termesztésű Burley dohány anyalevek mikrobiológiai vizsgálata üzemi gépi fermentálás alatt.....	100
4.3.2.2	Az üzemi termesztésű Virginia dohány anyalevek mikrobiológiai vizsgálata üzemi gépi fermentálás alatt.....	103
4.3.2.3	Az üzemi termesztésű Burley és Virginia dohány anyalevek üzemi gépi fermentációja során nyert mikrobiológiai vizsgálatok összehasonlítása.....	106
5	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	107
6	ÖSSZEFOGLALÁS.....	109
7	SUMMARY.....	111
8	MELLÉKLET.....	113
8.1	I. Melléklet: Irodalomjegyzék.....	113
8.2	II. Melléklet: A felhasznált tápközegek összetétele.....	125
8.3	III. Melléklet: A dohánymintákról izolált és azonosított mikroorganizmusok.....	127

RÖVÍDÍTÉSEK

a_w	vízaktivitás
GSE	galluszsav ekvivalens
LOX	lipoxigenáz enzim (EC 1.13.11.12)
MPN	Most Probable Number (Határhígítási eljárás)
POX	peroxidáz enzim (hidrogénperoxid-oxidoreduktáz (E.C. 1.11.1.7.))
PPO	polifenol-oxidáz enzim (o-difenol: O ₂ -oxidoreduktáz, (E.C. 1.14.18.1.))
RBC	Rose Bengal Chloramphenicol Agar (Bengálrózsa – Klóramfenikol)
RCM	Reinforced Clostridial Medium (Clostridiumok felélesztésére alkalmas táptalaj)
TGE	Trypton-glükóz-élesztőkivonat (TGE agar)
PF	vízben oldható polifenol tartalom
TP	a vízben oldható és nem oldható polifenolok összessége (total phenol)
V/1	Virginia 1-es jelölésű dohányfajta
V/2	Virginia 2-es jelölésű dohányfajta
V/3	Virginia 3-as jelölésű dohányfajta
B/1	Burley 1-es jelölésű dohányfajta
B/2	Burley 2-as jelölésű dohányfajta
B/3	Burley 3-as jelölésű dohányfajta
B/4	Burley 4-es jelölésű dohányfajta
B/5	Burley 5-ös jelölésű dohányfajta
RDE	a redrying alagút előtt vett minta jelölése
RDU	a redrying alagút után vett minta jelölése
FU	a fermentációt követően vett minta jelölése

1 BEVEZETÉS

A dohány (*Nicotiana tabacum* L.) ősrégi élvezeti cikk. Nevét Linnétől kapta, termesztése és feldolgozása 1867 óta állami monopólium. A dohány származását tekintve meleg éghajlati növény. Nagyfokú alkalmazkodó képessége folytán eltérő éghajlati és talajadottságok mellett több mint száz országban termesztik. A környezeti tényezők függvényében természetesen változik a szöveti minőség, az aromatikus jelleg, a beltartalom és a termés hozam is.

A dohány alkaloidjainak, és főleg a nikotinnak köszönheti sikerét, kettős nyugtató és izgató hatása miatt speciális jó érzést biztosít. A dohány összetevői veszélyes szerepet játszanak a fogyasztók egészségének alakulásában, ugyanis a pillanatnyi, kellemes közérzetet nyújtó hatása mellett magas kockázatot jelentenek a rák, illetve a szív- és érrendszeri betegségek kialakulásában. Napjainkig a cigarettafüstben több mint 5-6000-féle anyagot azonosítottak.

A füst komponensei elsősorban az elégett dohányvágatból származnak, elhanyagolható része keletkezik a cigaretta papír, illetve a vágatra felvitt segédanyagok elégetéséből. A dohánylevelek kémiai összetételéből elég pontosan előre lehet jelezni a füst összetételét. Az iparági laboratóriumokban elsősorban dohányipari alapanyagok összes nitrogén-, fehérje nitrogén-, összes cukor-, redukáló cukor-, alkaloid-, nitrát- és klorid-tartalmát mérik. Nagyon sok az olyan vegyület, amelynek sem mennyiségét, sem minőségét rutinszerűen nem ellenőrzik a dohányipari nyersanyagokban, ilyenek például a fenolos komponensek is. Fontos, hogy minél több összetevő mennyiségét ismerjük a dohánylevelekben, hiszen annál pontosabban tudjuk előre jelezni a végtermékek minőségét, összetételét, esetleg egészségkárosító hatását.

Amíg a dohánymag elvetésétől eljutunk a kész dohánytermékig, nagyon hosszú, több lépésből álló feldolgozási folyamaton kell a dohányleveleknek keresztül menni. A technológiailag érett dohánylevelek közvetlenül nem alkalmasak dohánytermékek gyártására. A dohányfeldolgozás első fázisa a szárítás és ez egyben a termesztés befejező lépése is. A szárítás nem egy egyszerű nedvességtartalom csökkentési eljárás, több fizikai, kémiai, biokémiai átalakítási folyamat együttese. A szárítást követően a levelek feldolgozása a fermentáló üzemekben folytatódik. A szárítási mód jelentősen befolyásolja, hogy a fermentálásra előkészített, bálázott dohányban melyek lesznek azok az átalakítási folyamatok, amelyek döntő jelentőséggel bírnak a fermentált levelek minőségének formálásában. A magasabb hőfokon végzett mesterséges szárítás inaktiválhatja a hőérzékeny enzimeket. Másfelől a dohánylevelek dehidratált állapota szintén korlátozhatja a jelenlévő enzimek működését. Egyes dohányszénzimeket később részletesebben is tárgyaljuk. A fermentáció ideje alatt, ha módosulva is, de folytatódnak az enzimatikus folyamatok. A dohány növény levelei a talaj közelében helyezkednek el, így a betakarított levelek jelentős számú talaj eredetű mikroorganizmust hordoznak, melyeknek száma a feldolgozás során jelentősen

megváltozhat. Az enzimek eredetüket tekintve, lehetnek a dohánylevél szöveti enzimeit, de származhatnak a dohány felületén megtapadt mikroorganizmusokból is.

A fermentáció időben elhúzódó folyamat, amely egyes alapanyagok esetében hónapokig, szivardohányoknál egy-másfél évig is eltarthat. A fermentáció során megvalósuló kémiai, biokémiai, mikrobiológiai változások biztosítják azt, hogy a dohány színe, illata, íze, aromája, éghetősége egyaránt megfelel a gyártói és fogyasztói elvárásoknak. Az igényeknek való megfelelést a szakemberek sokszor csak érzékszervi minősítéssel ellenőrzik.

A fokozott gépesítés, műszerezettség következtében a dohány fermentálás folyamatának időtartama lerövidült, valamint a környezeti feltételek szabályozottabbá és könnyebben ellenőrizhetőbbé váltak. Ezzel párhuzamosan a növénynevelők egyre újabb fajtákat szolgáltatnak a köztermesztés számára, ami azt teszi szükségessé, hogy nyomon kövessük és ellenőrizzük az új fajták minőségének és összetételének formálódását azon feldolgozási fázisokban, (szárítás, fermentálás), amelyek legmarkánsabban módosítják és teszik alkalmassá a zöld levél dohányipari végtermékké való alakulását. Ennek következtében dohányipari szempontból ismételtén időszerűvé vált annak tisztázása, hogy a megváltozott körülmények között milyen mikrobiológiai és biokémiai változásokhoz adóttak ezek a feltételek.

Ugyanakkor ezek a vizsgálatok azt is lehetővé tehetik, hogy a dohánynövény egyéb irányú felhasználásának lehetőségei is megfontolhatóak legyenek. Ez azért is előnyös lehet, mert a dohányzás okozta egészségártalmak miatt visszaszorulóban lévő dohányipar kisebb volumenű felhasználó kapacitása miatt lehetőség lenne ennek a gazdaságosan termeszthető növénynek más, kedvező felhasználásaira. Az egyéb irányú felhasználási lehetőségek közül korábban a nikotin kinyerése és mezőgazdasági, valamint gyógyszeripari alkalmazása tűnt a legfontosabbnak.

Napjainkban egyre kevésbé látszik kizártnak, hogy a dohánynövény kedvező termesztési tulajdonságai, valamint az emberi felhasználás szempontjából megfelelő összetételű és aránylag könnyen izolálható fehérjetartalma miatt fehérjealapú élelmiszer kiegészítésre, illetve takarmányozásra is felhasználhatóvá válhat. Még az sincs kizárva, hogy a fehérjetartalom elkülönítése után a dohánylevél dohányipari célokra is felhasználható lehet.

1.1 Doktori értekezésem előzményei

Doktori értekezésemben dohányeredetű nyersanyagokat jellemeztem biokémiai és mikrobiológiai módszerekkel. Munkahelyemen, a BCE ÉTK Gabona- és Iparinövény Technológia Tanszéken a különböző típusú dohánylevelek vizsgálatának nagy hagyománya van, és szoros kapcsolatot

ápolnak a dohányiparral. A növényi eredetű élelmiszeripari alapanyagok biokémiai jellemzésével doktori értekezésem témavezetője Dr. Kosáry Judit egyetemi tanár több, mint egy évtizede foglalkozik a BCE ÉTK Alkalmazott Kémia Tanszéken. Ugyanis a vegetációs időszakban, majd a tárolás során az enzimek egy részének (például: peroxidáz, polifenol-oxidáz, lipoxigenáz enzimeknek) fontos szerepe van az abiotikus és biotikus stressz hatások kivédésében, illetve más, az élelmiszeripari és egyéb növényi eredetű alapanyagok minőségének befolyásolásában. Az említett alatt az idő alatt „A lipoxigenázok izoenzim összetételének változásai a növényekben” címmel immár tízrészes sorozatot jelentetett meg az Olaj, Szappan, Kozmetika című folyóiratban, valamint ebben a témakörben más folyóiratokban körülbelül ugyanannyi közleménye jelent meg. „A növényi eredetű élelmiszeripari nyersanyagok minőségének enzimes jellemzése” című az OTKA K63162 sz. kutatási projektnek témavezetője volt (2006-2009).

A vegetációs időszakban az enzimek egy részének (például: peroxidáz, polifenol-oxidáz, lipoxigenáz enzimeknek) fontos szerepe van az abiotikus és biotikus stressz hatások kivédésében. Fontos, hogy ezek az enzimek aktívak maradjanak a dohánynövény elsődleges feldolgozása (szárítás, fermentálás) során is, hogy a sejtekbe betárolt anyagokat átalakíthassák és ezáltal a kívánt alapanyagminőséget biztosítani lehessen.

1.2 Célkitűzések

A dohánytípusok közül három Virginia és öt Burley fajta termesztését és elsődleges feldolgozását, valamint mind a saját, mind pedig üzemi termesztésű dohánylevelek biokémiai és mikrobiológiai vizsgálatát terveztem.

Az Alkalmazott Kémia Tanszék és a Gabona- és Iparinövény Technológia Tanszék korábbi eredményeire támaszkodva az alábbi célokat tűztem ki:

1. A dohányiparban mostanában termesztett, összesen nyolc Virginia és Burley dohányfajta saját termesztése során az irodalomban eddig nem igen ismert módon biokémiai módszerekkel nyomon kívántam követni az oxidatív stresszre jellemző enzimek (peroxidáz, polifenol-oxidáz, lipoxigenáz) aktivitását, illetve a dohányminőség kialakulásában fontos szerepet játszó vízben oldható polifenol tartalmat, valamint a dohánynövény esetleges élelmiszeripari felhasználása szempontjából döntő fontosságú vízben oldható fehérjetartalmat.
2. Nyomon kívántam követni a különböző szárpozícióban elhelyezkedő dohánylevelek biokémiai jellemzőinek változásait a termesztés során.
3. Vizsgálni kívántam, hogy egyes növényekhez hasonlóan a dohánynövényfajták megkülönböztethetőek-e a lipoxigenáz izoenzim összetételük alapján.

4. A saját termesztésű dohánylevelek szárítása során a magas cukortartalmú Virginia fajtára az általánosan alkalmazott, drága, mesterséges szárítás kiváltására egy, a természetes és mesterséges szárítás paramétereinek felhasználásával egy kombinált módszer kidolgozását tűztem ki célul, hogy ezt a módszert valamennyi saját termesztésű dohányfajtámon kipróbáljam. Célul tűztem ki az általam kombinált módszernek elnevezett eljárás és a természetes szárítás eredményeinek összehasonlítását.
5. A fent említett vizsgálatok során az esetleges élelmiszeripari felhasználás szempontjából fontos vízben oldható fehérjetartalom alakulásából következtetéseket kívántam levonni a termesztés, illetve a szárítás körülményeinek megválasztása szempontjából.
6. Célul tűztem ki a kétféle szárítási módszer utáni fermentációs periódusban a biokémiai vizsgálatok, valamint a mikrobiológiai vizsgálatok eredményeinek összehasonlítását. Ez utóbbiban a Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék segítségére számítottam.
7. A saját termesztésű dohánynövényekkel kapcsolatos vizsgálataim előkísérleteként célul tűztem ki üzemi termesztésű dohány anyalevek biokémiai és mikrobiológiai vizsgálatát az üzemi gépi fermentálás során.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

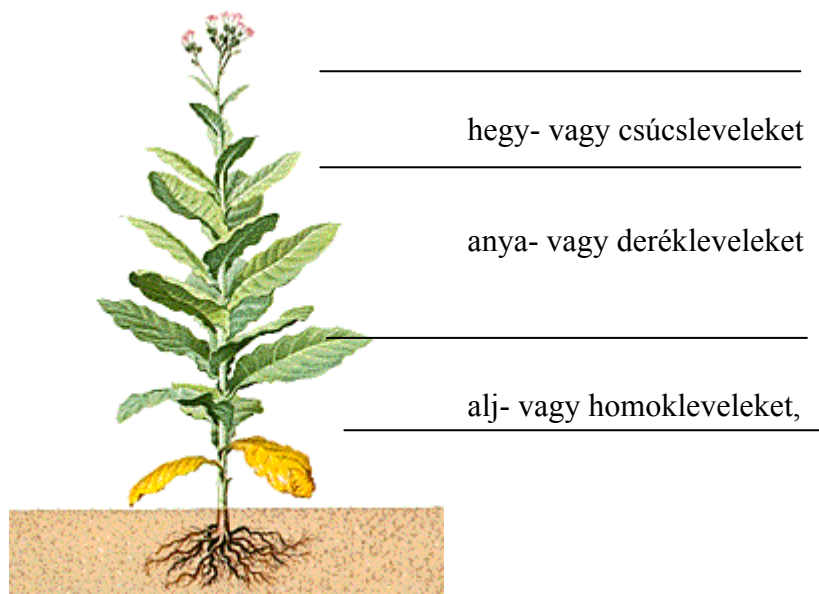
2.1 Hazánkban termesztett dohányok

A dohány (*Nicotiana*) nemzetség rendszertanilag a magvas virágos növények (*Spermatophyta*) csoportjába, a zárvatermők (*Angiospermae*) rendjébe, a kétszikűek (*Dicotyledones*) osztályába, ezen belül pedig a burgonyafélék (*Solanaceae*) családjába tartozik (TERPÓ, 1987).

A dohánynemzetséghez tartozó fajok száma ismeretlen. A fajok egy része lágyszárú, egyéves növény, de vannak közöttük több éves fás növények is. Csaknem valamennyi faj alkaloidokat szintetizál. A dohánynemzetség fajai közül csak kevés került köztermesztésbe, legtöbbjük még ma is vadon él az őshazában, Közép- és Dél-Amerikában. A *Nicotiana tabacum* és a *Nicotiana rustica* fajokhoz tartozó változatoknak kiemelkedő gazdasági jelentősége van. A *Nicotiana tabacum* (közönséges dohány) a feltevések szerint természetes hibridizáció eredménye. A *Nicotiana rustica* (kapadodohány) számos változatát több országban termesztik – Magyarországon az 1960-as évekig kizárólag nikotinyártási célból termesztették.

A hazánkban termesztett *Nicotiana tabacum* két vadfajnak a természetes kereszteződése nyomán jött létre, melyet aztán folyamatosan nemesítettek (BORSOS, 2002).

A dohány eredetileg mélyen gyökerező növény, amelynek főgyökere és a 7-8 erőteljes oldalgyökere fejlődik. A dohány a szabad földbe palántázva kerül, a gyökérzet bojtos gyökérhez lesz hasonló, ezek legnagyobb része a talaj felső rétegében helyezkedik el, ezért a hagyományos palántáról nevelt dohány sekély gyökérzetű. A dohánylevél a növény legértékesebb része, számuk 20-30 között van. A levél mirigyszőrökkel borított. A leveleknek tövön való elhelyezkedése alapján elkülöníthetők (1. ábra), azok kémiai összetétele és szöveti szerkezete eltérő.



1. ábra A dohánylevelek szárpozíció szerinti megkülönböztetése és elnevezése

A levél erezete hálózatos, fő- és oldal erek rendszeréből áll, a levél tömegének 20-35%-át teszi ki, amely szintén alkotója a dohánytermékeknek.

2.1.1 A dohány típusai

A dohánynövény morfológiája és minősége szerint a következő típusok különböztethetők meg (BORSOS, 2002; LAYTEN & NIELSEN, 2002):

- virginia dohány,
- burley dohány,
- világos cigaretta dohány,
- kentucky dohány,
- szivardohány,
- keleti dohány,
- egyéb dohányváltozatok,
- egyéb *Nicotiana* fajok.

Munkám során a Virginia és a Burley dohánytípusba tartozó fajtákat vizsgáltam.

A **Virginia típusú dohányok** a nagylevelű cigarettadohányok legjelentősebb képviselői. A világ dohánytermő területének mintegy 50%-án termesztik. A jelenleg termesztett Virginia típusú dohányok a *Nicotiana tabacum* faj Virginia varietasából származnak. Őshazája Dél-Amerika, innen vitték át Virginia államba, ahol meghonosodott, majd világszerte elterjedt, neve is innen származik. Világosabb és sötétebb változatai alakultak ki. Mesterséges szárítással többnyire sárgára színeződik. A Virginia típusú dohány a többi nagylevelű cigarettadohánytól mind biológiai, mind beltartalmi tulajdonságait tekintve lényegesen különbözik. Termesztésben sok típusa alakult ki, de ezek genetikailag, morfológiailag és kémiai tulajdonságaiban közel állnak egymáshoz.

„Világos dohánynak” is nevezik a szárítás során szerzett sárgás, narancssárgás színe miatt. Különösen jól termesztendő szubtropikus területeken, ahol kevés a csapadékmennyiség.

Azonban a többi nagylevelű cigarettadohánytól mind biológiai, mind beltartalmi tulajdonságait tekintve lényegesen különbözik. Magyarországon a Virginia típusú dohányok termesztésével először 1930-ban kísérleteztek, de a köztermesztésben csak a II. világháború után terjedt el és Hevesi megnevezéssel vált ismerté (BORSOS, 2002).

Jellemző tulajdonsága, hogy a növény levele, szára zöld, sötétzöld színű, nagy klorofill tartalmú. A növényt 100-130 cm magasan tetejezik. Levelei nagyméretűek, hosszuk 70-80 cm. A hasznosítható levelek száma 15-20 db. A levelek alakja jellegzetes, hegyes csúcs és befűzött alap jellemzi.

Jellemző a közepes nikotin (1-3%), csekély fehérje (>1,5%) és nagy cukortartalom(10-20%). A fermentált dohány kellemes sütőtök illatú, a belőle származó főfüst pH-ja savas. Összes nitrogén

tartalma alacsony (2-3 %). Fenolos vegyületek nagyobb mennyiségben fordulnak elő benne, mint a többi dohány típusban.

A legnagyobb mennyiségben a cigarettagyártási célokra szolgáló fajokat termesztik, mely esetben a szárítási mód közvetett hőátadással történő (flue-curing), úgynevezett mesterséges szárítás.

Burley típusú dohányok őse a múlt század első felében az Ohio államban Little Burley néven volt ismeretes. Ettől a kiinduló fajtától azonban a ma termesztett típusok jelentősen eltérnek. Az ősi fajta viszonylag alacsony növekedésű, széles és lehajló levélállású volt. A Burley színe világosabb zöld, mint a Virginia, és jobb minőségű termőföldre, illetve több trágyára van szüksége. A Burley dohányfajta legjobb termőhelyei az Egyesült Államok tagállamaiban – mint például Maryland és Kentucky államokban – valamint Közép-Amerikában, Malawiban, Ugandában és Indonéziában találhatóak. A levegőn való szárítás után színe barna lesz, és tulajdonképpen alig tartalmaz cukrot, ami szinte szivar ízűvé teszi. A levegőn szárított dohányt jellemzően cukorral – melasszal vagy édesgyökérrel – kezelik, valamint a keverék is tartalmazhat hozzáadott ízesítőanyagokat.

A Burley dohányok levelei világoszöld, zöld színűk, fölfelé állóak, alacsony klorofill tartalmúak. Éréskor az erek és a növény szára teljesen kifehéredik. Szárított levelei őzbarna, barna színűek. Közepes nikotin (2,0-4,5 %) alacsony cukortartalom (>1%) jellemzi. A fermentált dohány csokoládé illatú, a főfüst pH-ja lúgos (**POPOVA et al., 2003**) Magyarországon a 60-as években kezdődött a Burley típusú dohányok honosítása és termesztése. A Burley típusú dohányok jó minőségű nyersanyagot csak természetes úton szárítva adnak. A hazánkban termesztett Burley fajták Pallagi néven váltak ismertté.

2.2 A dohánylevelek elsődleges feldolgozása

2.2.1 A dohány szárítása

A dohányfeldolgozás technológiájának egyik fontos periódusa a dohánylevelek szárítása. Természetesen felsorolhatatlan mennyiségű körülményt kellene megemlíteni, ami befolyásolja a szárítás eredményességét. Már az agrotechnikai műveletek minősége, a fajtacsoport fajtájához leginkább megfelelő termesztéstechnológia megválasztása is jelentős hatást gyakorol a megfelelő eredmény eléréséhez a szárítás során. Nagyon fontos, hogy a technológiai elemek időben, jó minőségben legyenek végrehajtva, hiszen a megelőző fázisok hibái csak kis mértékben korrigálhatóak a szárításkor.

VEPRASKAS (1986) szerint a szárítás folyamata egy olyan technika, mely a rögzített tapasztalatok segítségével alakult ki. Más szerzők véleménye radikálisan eltér a fent említettektől, miszerint a szárítási technológia segítségével meghatározott kémiai összetételű dohánylevél állítható elő, sőt számos kémiai komponens a szárítás paramétereinek változtatásával irányíthatóan szelektálható (**CHAPLIN & MINER, 1981**).

Összességében elmondható, hogy a dohány szárítás célja a dohányfajta jellegének és a felhasználó igényeinek megfelelő minőség elérése. Másrészt fontos szempont az is, hogy a szárított dohány biztonságos, romlás nélküli eltarthatósága is biztosított legyen.

A dohány szárítható különböző módszerekkel, **természetes úton** (air-curing) és **mesterségesen** (flue-curing). A kétféle szárítási mód között alapvető eltérés van az alkalmazott hőmérséklet, légnedvesség-tartalom és a szárítás időtartama tekintetében.

Természetes úton szárítják a nagylevelű barna dohányokat, míg a Virginia típusú dohányok szárítási módja a mesterséges szárítás.

2.2.2 A természetes szárítás

A dohány szárítás egyik legősibb típusa a természetes szárítás, melynek két fő tényezője a pajta belső hőmérséklete, valamint a relatív nedvességtartalma. A munkám során vizsgált dohány típusok közül a Burley dohányt hazánkban is természetes szárítással szárítják. Természetesen a szárítási paraméterek ebben az esetben nem olyan nagymértékben irányítottak, mint a Virginia típusú dohány mesterséges szárítása alatt, hiszen a természetes szárítás paramétereit az időjárás nagymértékben befolyásolja (**BORSOS, 2002**).

Hazánkban az időjárási viszonyok a dohány szárítás időszakában megfelelőek. A szárítás hőmérséklete 15-35 °C között optimális, azonban nagyon fontos a légsebesség és a légnedvesség a dohány megfelelő száradási sebessége, valamint a szárított levél minősége miatt (**1. táblázat**). A leginkább elfogadható légsebesség 15-30 m/min.

1. táblázat A szárítási hőmérséklet és a nedvességtartalom összefüggései. (Forrás: BORSOS, 2002)

Hőmérséklet (°C)	Relatív páratartalom (%)	Szárítás minőségi jellemzői
Alacsony	alacsony	Üres, szényszerű dohánylevelek keletkeznek.
Magas	alacsony	Gyors szárítási folyamat, zölde színárnyalatú dohánylevelek keletkeznek.
Magas	magas	Gyors száradás, sötét levélszíneződés, minőségi romlás jellemző.
Alacsony	magas	Szárítás gátolt, minőségi romlás jellemző.

A természetes szárítás folyamán végbemenő legszembetűnőbb változások a következők: a levelek turgor állapota megszűnik, színük először sárga, majd barna lesz, valamint a főér kiszárad.

SHEEN & CALVERT (1968) három különböző típusú dohány mintában vizsgálta a polifenoltartalom, a PPO és POX aktivitás változását természetes szárítás alatt. Megállapították, hogy a legnagyobb mennyiségben előforduló polifenolos komponens a dohány szöveiteiben a klorogénsav, melynek mennyisége a szárítás első hetében jelentős mértékben lecsökken. A rutin tartalom alacsonynak bizonyult a szárítás alatt, változása nem volt szignifikáns, különösen, amikor a klorogénsav koncentráció magasnak bizonyult.

A PPO aktivitás mindhárom dohány mintában közel azonosnak volt mondható a szárítás folyamán. A PPO aktivitás a szárítás első napjaiban hirtelen növekedést mutatott, majd a szárítás végéig jelentős csökkenő tendencia volt jellemző.

A POX aktivitás értékek mindhárom minta esetén a szárítás kezdeti fázisában közel azonos volt. A szárítás első 24 órájában a POX értékek hirtelen megnövekedtek. A három minta esetén a mesterséges szárítású dohány minta POX értéke bizonyult a legmagasabbnak, a török dohány követte ezt egy alacsonyabb értékkel, míg a Burley dohány POX értéke volt a legalacsonyabb. Ezek után a POX aktivitás csökkenését figyelhetjük meg mindhárom dohány minta esetén (**SHEEN & CALVERT, 1968**).

Mind a mesterséges, mind a természetes szárítás folyamán a dohány legfontosabb polifenolos komponenseinek mennyisége erőteljes csökkenést mutatott, kivételt képez a scopolin és scopoletin (**WEAVING, 1958**). Ezen polifenolos komponensek jelen vannak mind a mesterséges, mind a természetes szárítású dohányok leveleiben is. A mesterséges szárítás alatt a scopoletin fokozatos növekedését vélték tapasztalni (**PENN & WEYBREW, 1958**).

A természetes szárítás alá vetett dohánylevelek megfelelő színparamétereinek kialakítása körülbelül két hetet vesz igénybe, a főborda kiszáradásához még három-öt hét szükséges. **ANDERSEN** és munkatársai természetes szárítású Burley dohány levelei színének, és kémiai összetételének alakulását vizsgálta az árnyékolás mértéke (0%; 45%; 65%) függvényében (**ANDERSEN et al., 1985**).

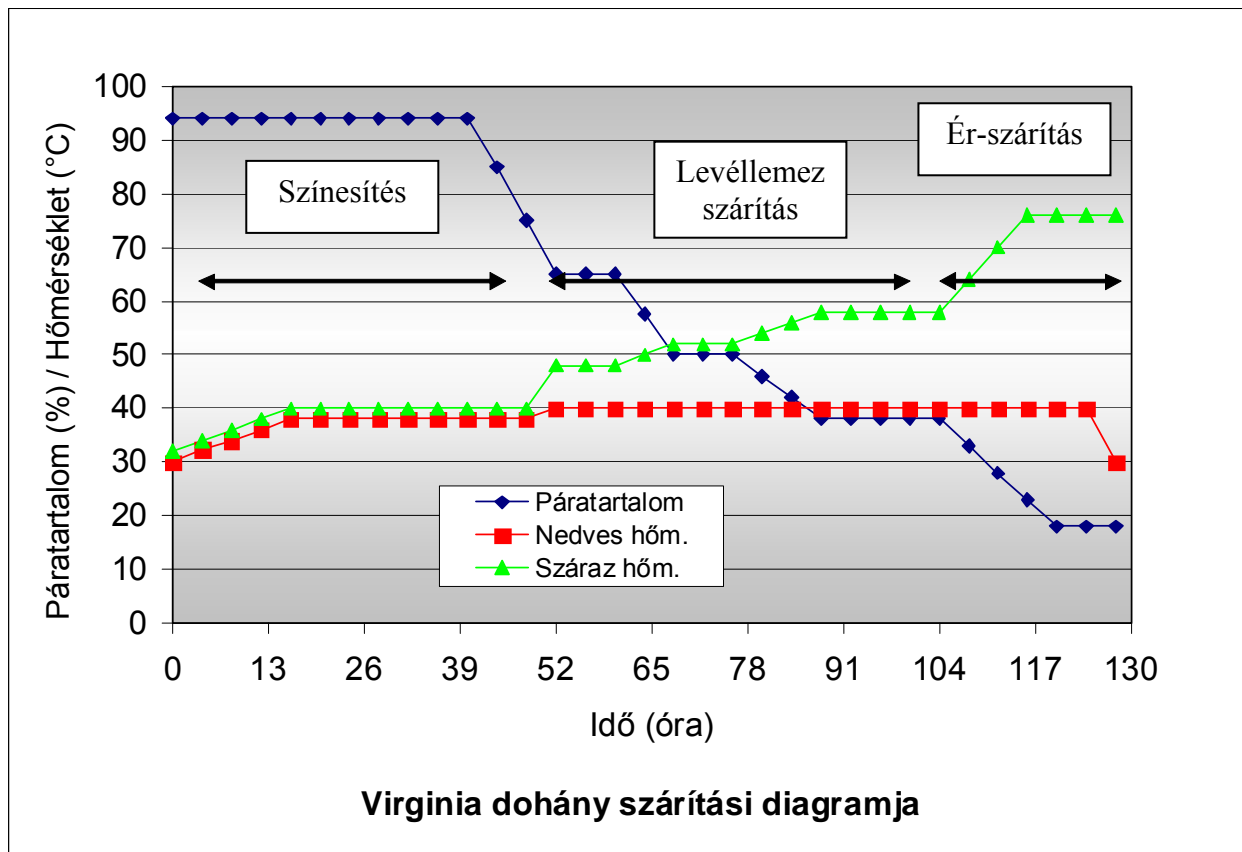
Meghatározták a klorofill izomereket, karotinoidokat, barna pigmenteket, a polifenol tartalmat, az összes- alkaloid tartalmat és a nitrát-nitrogén tartalmat a levelekben. Növelve az árnyékolás mértékét, vegetációs időszakban mind a klorofill „a”, mind a klorofill „b” mennyisége megnövekedett, szárításkor pedig mélyült a levelek színe, vöröses, barnás árnyalatot nyertek.

Az eredmények azt támasztják alá, hogy a polifenol tartalom egyértelműen függ a levelek száron való elhelyezkedésétől, a felső levelektől az alsó levelek felé haladva fokozatos csökkenést mutattak. A felső állású levelek körülbelül kétszer több fenolos komponenst tartalmaztak, mint az alsó állásúak. Az árnyékolás szintén befolyásolta a fenol tartalom alakulását, de közel sem olyan erőteljesen, mint a szárpozíció.

A barna pigment tartalom szintén szárpozíció függő, a felső levelek tartalmaztak legtöbbit, 38%-kal kevesebbet a középpállásúak, és 47 %-kal kevesebbet az alsó állásúak (**ANDERSEN et al., 1985**).

2.2.3 A mesterséges szárítás

Míg a természetes szárítást nagyrészt az időjárás körülményei határozzák meg, addig a mesterséges szárítás jól szabályozott folyamat (**WYNDER & HOFFMANN, 1967**). Hazai dohányfajtáink közül a Virginia dohányt vetik alá mesterséges szárításnak. A mesterséges szárítás szakaszait a **2. ábra** szemlélteti.



2. ábra Virginia dohány mesterséges szárítási diagramja és a szárítás szakaszai (Forrás: BORSOS; 2002)

A színesítési fázis szorosan kapcsolódik a színrögzítés szakaszához, alig különíthetők el egymástól. A szárításnak ez a szakasza kíván a legnagyobb szakmai odafigyelést, nyomon követést. Ennek az oka az, hogy ebben a fázisban mennek végbe azok a kémiai folyamatok, melyek nagymértékben meghatározzák a dohánylevelek minőségét. A szárítás színesítési szakaszában alakul ki a dohánylevelek sárga színe, melynek időtartama nagyban függ a szárításnak alávetett zölddohány minőségétől. A szárítás paramétereit tekintve nagyon fontos a pontos hőmérsékleti, valamint a megfelelő relatív páratartalom értékek betartása. A száraz hőmérő értéke mindössze 32 °C lehet, a hőmérséklet növelése fokozatosan történik, 0,5 °C, vagy maximum 1 °C-kal emelhető óránként, egészen addig, amíg a hőmérséklet el nem éri a 38 °C-ot (**2. ábra**). A nedves hőmérő értéke a szárazénál 1 °C-kal lehet alacsonyabb. Nagyon fontos, hogy a szárítás színesítés szakaszában a száraz hőmérő értéke nem emelkedhet 40 °C fölé, különben komoly biológiai károsodás érheti a száradó dohányleveleket, mely jelentős minőségi károkat okozhat. Ez a folyamat átlagosan 30-60 órát is igénybe vehet.

A színrögzítés elkezdése nagyon fontos, éppen akkor, amikor már a levelek megfelelő sárga árnyalata kialakult. A folyamatos vízelvonás következtében megakadályozhatóak a barnulási és bomlási folyamatok. A száraz hőmérő értékét 47 °C-ra emeljük a hőmérséklet 0,5-1 °C-os, fokozatos emelésével. Ezzel párhuzamosan a nedves hőmérő értékeit is szabályozni kell, tartani kell a 38-39 °C-os hőmérsékleti értékeket. Amikor a száraz hőmérő elérte a 47 °C-os hőmérsékletet,

akkor ezen a hőfokon tartják a dohánylevelek szárítótérét 8-12 órán át. Amint eltelik a 8-12 órás időintervallum, akkor a száraz hőmérő értékét 51 °C-ra kell emelni a nedves hőfok 38-39 °C-on tartása mellett. A színrögztítés időtartamát természetesen jelentős mértékben befolyásolja a szárítás intenzitása. Átlagosan 14-26 órát vesz igénybe ez a folyamat.

A színrögztítést a levéllemez szárítása követi, mely átlagosan 16-20 órát vesz igénybe. A szárítás ebben a szakaszában is fontos a paraméterek pontos szabályozása. A száraz hőmérő értékét 51 °C-ról 57 °C-ra kell emelni fokozatosan, miközben a nedves hőmérő értékeit 38-39 °C-on kell tartani. A dohánylevelek szárítótérében tartanunk kell az 57 °C hőmérsékletet mindaddig, amíg a levéllemez teljesen ki nem szárad.

A főér szárítás során a száraz hőmérő értékét 57 °C-ról óránként 1,5-2 °C emeléssel 68 °C-ra növeljük. Ezzel a folyamattal párhuzamosan a nedves hőmérő értékeit is módosítanunk kell, 38-39 °C-ról fokozatosan 34 °C-ra kell csökkenteni. A főér szárítás időtartama átlagosan 24-30 óra között mozog. A szárításnak ebben a fázisában különös figyelemmel kell kísérni a száraz hőmérő értékeit, hiszen ha a hőfok 68 °C fölé emelkedik, akkor a cukrok karamellizálódása fordulhat elő, mely jelentős irreverzibilis minőségi problémákat okozhat, ugyanis a dohányleveleken nemkívánatos vöröses színárnyalatok jelenhetnek meg.

A puhítás fázisa a szárítás befejezése után következhet. Első lépésben a szárítótér hőmérsékletének csökkentése történik 32-34 °C-ra, valamint finom porlasztású vizet kell bejuttatni a szárítótérbe. Ez a folyamat addig folyik, amíg a dohánylevelek „gyűrhető” állapotba nem kerülnek.

Számos kutató követi és követte nyomon a dohánylevelekben végbemenő változásokat mesterséges szárítás során.

GONG (2006) és munkatársai a polifenolok változásait vizsgálták dohánylevelekben mesterséges szárítás során és vizsgálták a kapcsolatot a mért kémiai komponensek között. A levélminták Kína, Henan tartományának különböző termesztési területeiről származtak.

Az eredmények azt mutatták, hogy a polifenol tartalom a szárítás első 24 órájában növekedett, azután pedig csökkenő tendenciát mutatott.

A klorogénsav tartalom a szárítás első 24 órájában szintén növekedést mutatott. Azonban a legalacsonyabb érték a szárítás 60. valamint 72. órájában volt látható, de ezek után a szárítás végéig folyamatos volt a növekedés.

A rutin tartalom általában növekedett a szárítás alatt és kicsiny mértékű ingadozást mutatott.

A PPO és POX enzim aktivitás értékek esetén határozott csökkenés volt tapasztalható.

A rutin tartalom szoros összefüggést mutatott (pozitív korreláció) az összes cukortartalommal, valamint szoros összefüggést mutatott (negatív korreláció) a keményítő-, nikotin- és fehérjetartalommal is.

A polifenolok és a csoportba tartozó vegyületek, melyek megtalálhatóak a dohánylevelekben, mint például: tannin, kumarin, flavonid, egyszerű fenolok származékai. A klorogénsav és a rutin a legfontosabb vegyületek a fenolos komponensek közül a dohányban.

A polifenolok jelentős szerepet játszanak a dohánylevelek minőségét tekintve, mint a dohány fejlődése, szárítása, színárnyalat és a füst aroma kialakulása, minősége szempontjából (YAN & HAN, 1987; ZHU, 1993;; XU & SUN, 2003).

Számos kutatást végeztek a dohányban található fő fenolos komponensek, a velük kapcsolatba hozható enzimek és a barnulási folyamatok összefüggése tekintetében. A mesterséges szárítás során, nyomon követték az enzimek aktivitásának, és a folyamattal kapcsolatba hozható kémiai komponensek mennyiségi változását. Másfelől azért végezték el a végrehajtott vizsgálatokat, hogy elméleti alapokat szolgáltatassanak a szárítás alatt átesett dohánylevelek minőségének javításához.

Különböző termesztési területről származó dohánylevelek összes fenol tartalmának változásait vizsgálták azonos mesterséges szárítási körülmények között.

A mesterséges szárítás első 24 órájában a fenolos vegyületek lassú növekedése jellemző, kissé csökken 72 h-ig, aztán a szárítás végéig erőteljesen növekedik.

A zöld, friss dohánylevelek összes fenol tartalma a levelek mesterséges szárítása alatt a következőképpen alakult: a legmagasabb értékeket a Mianchi tartományból származó minták képviselték, majd ezt követték a Zhongmou tartományból származó minták, végül a legalacsonyabb polifenol tartalmat a Xiangcheng tartomány mintái mutatták.

A mesterséges szárítás alatti polifenol tartalom változását nem lehetett összefüggésbe hozni a származási hellyel.

A klorogénsav tartalom növekedése figyelhető meg a szárítás első 24 órájában, ezután csökkenés következik, majd a szárítás 72. órájában van a mélypont, ezek után kisebb mértékű növekedés történik a szárítás végéig, hasonlóan, mint amit a polifenol tartalom esetén is tapasztaltunk.

De a különböző termesztési területről való variációk klorogénsav tartalma között határozott különbség volt.

A teljes mesterséges szárítás folyamatában a legmagasabb klorogénsav tartalmat Mianchi tartományban termesztett változat mutatta, de nem volt jelentős különbség a másik két termesztési területről származó fajta klorogénsav tartalma között.

A rutin tartalom növekedett, kicsiny fluktuáció mellett. A rutin tartalom a következőképpen alakult az eltérő termesztési helyről származó dohányfajták esetén: Mianchi tartomány mintáiban mérték a legmagasabb rutin tartalmat, ezt követték Zhongmou tartomány mintái, majd a legkevesebb rutin tartalom lett meghatározva Xiangchen tartományból származó mintákban.

A PPO enzim jelentősége meghatározó a dohánylevelek megfelelő színparamétereinek kialakításában a szárítás során. A szárítás folyamata alatt a PPO enzim oxidálja a polifenolokat

kinonokká, melyek majd melaninná polimerizálódnak. Ezek a vegyületek felelősek az úgynevezett barnulási folyamatokért.

A szárítás folyamatában, ahogyan csökken a levelek nedvességtartalma, mind a PPO és mind a POX aktivitás is csökken a szárítás végéig. A szárítás 72. órájában a PPO aktivitás eltűnik, de még kicsiny POX aktivitás érzékelhető. A Mianchi tartományból származó dohánylevelek PPO aktivitása lassan csökken, hasonlóan, mint a Zhongmou tartományból származó mintáké a szárítás első 48 órájában. Ezek után a Zhongmou tartományból származó minták PPO csökkenése a határozottabb. A harmadik származási helyről való minta PPO aktivitása fokozatosabban csökken. A színesítési szakasz végéig a POX aktivitás alig csökken, hiszen itt még csekély a vízvesztés mértéke, a színrögzítéstől (40-48 órától) kezdve azonban meredeken csökken. Az összes zöld levél és a szárítási folyamatban vizsgált minták PPO aktivitás értékei az egyes időpontokban, a következő sorrendben követik egymást: a legmagasabb értékeket képviselik a Xiangcheng tartományból származó minták, ezt követték a Zhongmou tartomány mintái, valamint a legalacsonyabb értékeket Mianchi tartományból származó mintákban rögzítették. Az eredmények azt mutatták, hogy a PPO aktivitás értékek alakulását a szárítás alatt egyértelműen a friss levelek kiinduló enzim aktivitás értékei határozzák meg. A POX enzim a PPO enzimhez hasonlóan viselkedett. A mérésekből megállapítható volt, hogy a polifenol tartalom és klorogénsav tartalom pozitív korrelációt mutat az összes cukortartalommal, de negatív korrelációban van a keményítőtartalommal, az összes nitrogén tartalommal, fehérjetartalommal, de a többi alkotóval nem találtak szignifikáns kapcsolatot. Pozitív szignifikáns korreláció van a polifenol tartalom és a klorogénsav tartalom, valamint a rutin és az összes cukor tartalom között. Azonban negatív szignifikáns kapcsolat látható a rutin és a nikotin tartalom között és a rutin valamint a fehérjetartalom között. A többi komponens között nem találtak összefüggést (GONG et al., 2006).

A **2. táblázatban** látható két termesztési évből származó Virginia és Burley dohány minták polifenoltartalma. Az adatokból egyértelműen kitűnik, hogy a Virginia dohány minták polifenoltartalma magasabb, mint a Burley mintáké mindkét termesztési év eredményeit tekintve (SMEETON, 1987; LAYTEN & NIELSEN, 2002).

2. táblázat Virginia és Burley dohányok polifenoltartalma (Forrás: SMEETON, 1987)

Dohány fajták	1980 (%)	1981 (%)
Virginia	3,13	3,75
Burley	1,78	2,05

3. táblázat Tipikus polifenolok a dohányokban (Forrás: SHEEN, et al., 1979)

	Virginia (mg/g)	Burley (mg/g)
Klorogénsav	34,71	12,83
Rutin	7,95	4,00
Scopoletin	0,13	0,06
Scopolin	0,94	0,35

Az **3. táblázatban** összefoglalóan szerepelnek a Virginia és Burley dohányok legjelentősebb polifenol vegyületeit. A dohányokban előforduló, legfontosabb polifenolok a klorogénsav, a rutin, a scopoletin, valamint a scopolin (SHEEN, et al., 1979). A Virginia típusú dohányok magasabb klorogénsav és rutin tartalommal rendelkeztek, mint a Burley dohányok. A scopoletin és scopolin tartalom között jelentős eltérést nem tapasztaltak.

Számos fenolos vegyület fordul elő a dohánylevelekben és a dohány füstben, de a leginkább kutatott a dohánylevelekben előforduló fenolos vegyületek jelenléte (WILSON, et al., 1982). A klorogénsav és rutin tartalom igen magas a dohánylevelekben, akár a polifenolos molekulacsoport 75-95%-át is jelenthetik (CHEN et al., 2005; KAO, 2005; YANG et al., 2005).

Valószínű, hogy a dohánylevelekből izolált számtalan összetételű fenolos komponens a lignin hidrolízisének következtében keletkeznek, valójában a lignin bomlásának változatos összetételű termékei. A fenolos vegyületek erőteljes aromavegyületek, melyek jelenléte szükséges a jó minőségű füst kialakításához (GREEN, et al., 1980).

ANDERSEN és KASPERBAUER dohány palánták fejlődését követték nyomon 8 héten át, UV és látható fényel megvilágítva. Több kémiai összetevők változását vizsgálták, köztük a polifenol tartalmat is. Megállapították, hogy mind a szárpozíció, mind a tövek elhelyezkedése a parcellákon belül, valamint a megvilágítás erőssége és hossza hatással van a polifenol tartalomra. Mivel a szerzők nem különböztették meg a vízben oldható és nem oldható polifenolokat, ezeket az értékeket teljes polifenol tartalomnak (TP) nevezem. A felső levelek PF tartalma magasabb volt (40 mg/g), mint az alsóbb állásúaké (37 mg/g). A parcellák szélső és középső soraiban lévő tövek leveleinek a polifenol tartalma között is jelentős volt a különbség. Mind az UV, mind a látható fény, hatással volt a minták polifenol tartalom értékeire (ANDERSEN & KASPERBAUER, 1973).

A Hubei Egyetem kutatói mesterséges szárítású Virginia típusú dohány termesztett változatának (K326) leveleiben átlagosan 37,63 mg/g polifenol tartalmat mértek.

Meglepő eredményeket publikáltak, ők azt tapasztalták, hogy a polifenol tartalom a felső levelekben a legkevesebb, és az alsó levelek fele haladva nő annak mennyisége. A termőhely tengerszint feletti magassága is befolyásoló hatással volt a levelek polifenol tartalmára. Minél magasabban helyezkedett el a dohány parcella a tengerszint felett, annál több polifenolos komponens szintetizálódott (LI YAN YAN, 2009).

Egy spanyol kutató csoport a kalcium tápoldatban való adagolásának a fenolos komponensek szintézisére, valamint a fenolos komponensek metabolizmusában részt vevő enzimek működésére gyakorolt hatását vizsgálta. A kalcium koncentrációt növelve visszaszorult a fenolos komponensek képződése. A tápoldatban a $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ koncentrációját 1,25 mM-ról 5 mM-ra növelve az összes-fenol tartalom 2467 μg kávésav/mg- ról 1715 μg kávésav/mg-ra csökkent. A PPO és POX aktivitás értékek a kalcium fokozott hozzáadásával egyértelműen növekedtek (JUAN et al., 2003).

2.2.4 A szárítás során végbemenő változások

A dohányszárítás nem egy egyszerű vízelvonást jelent azok számára, akik az aktuális piaci igények kielégítéséhez kívánnak eladható terméket előállítani. A szárítási technológia feladata nagyon sokrétű, hiszen a folyamat során bonyolult fizikai, kémiai, mikrobiológiai folyamatok mennek végbe. Ezen változások megfelelő összehangolása, sok esetben irányítása folyik a szárítás során. A felsorolt folyamatok egyensúlyban tartása és megfelelő irányítása azért is fontos, hiszen a szárítás végére ki kell alakítani a dohány minőségét meghatározó tulajdonságokat (YAN & HAN, 1987; ZHU, 1993; XU & SUN, 2003).

FRANKENBURG (1949) már az 1940-es években publikálta, hogy a dohányszárítás folyamán végbemenő kémiai, biokémiai folyamatok az élő levélben végbemenő folyamatok folytatása. Mivel a szárítási technológia során radikális nedvességcsökkenés lép fel, sőt a mesterséges szárítás folyamán alkalmazott magas hőmérséklet hatására a levelek biokémiai egyensúlya felborul, a folyamatok az oxidációs átalakulások irányában haladnak tovább. Az is világossá vált, hogy a magasabb rendű növények enzimescsoportjai között sincsen jelentős eltérés, kivételt képeznek a dohányban található azon specifikus enzimek, melyek az alkaloidok átalakításában játszanak szerepet.

A szárítás folyamatának a következő fázisait különíthetjük el: színesítés, színrögztetés, levéllemez és főér-szárítás, valamint puhítás.

A zölldohány levele, amikor a szárítóba bekerül, igen magas nedvességtartalma, mintegy 80-85 %. A szárítás végére ez az érték jelentős mértékben lecsökken (3-10 %). Természetesen a jelentős nedvességvesztés szárazanyag-tartalomváltozást is előidézik, mintegy 12-13 % veszteség mérhető.

A jelentős nedvességcsökkenés befolyásolja a levelekben lejátszódó biokémiai, kémiai, mikrobiológiai folyamatokat is. A biokémiai folyamatok fokozatosan lassulnak a levelek nedvességvesztésével párhuzamosan, majd megszűnnek egy kritikus nedvességvesztés alkalmával.

A szárítást minden esetben úgy célszerű irányítani, hogy a vízleadás üteme és mértéke egyensúlyban legyen a levelekben végbemenő kémiai-biokémiai folyamatokkal. A levelekben végbemenő anyagcsere folyamatokat úgy kell irányítani, hogy a klorofill lebomlása fokozatosan a nedvesség csökkenésével párhuzamosan történjen. Ellenkező esetben ugyanis, ha a klorofill anyagok lebomlását, valamint a fenolos vegyületek átalakulását megelőzi a hirtelen vízvesztés, akkor zöldre száradnak a levelek, nem alakul ki a fajtára jellemző, megfelelő színárnyalat a levelekben.

A szárítás kezdetén egy biológiai, vagy élő szárítás történik, majd a nedvesség nagymértékű elvesztése után egyszerű fizikai szárításról beszélhetünk.

A technológiai érettséget elért levelekben, melyek a szárítóba kerülnek, az anyagcsere folyamatok irányát tekintve a felépítő folyamatokkal szemben a leépítő folyamatok kerülnek előtérbe. Ennek megfelelően megindul a nagyobb mértékű oxigén felvétel és ezzel párhuzamosan a szén-dioxid leadás. A lebontó folyamatok során a makromolekulák (szénhidrátok, lipidek, fehérjék. stb) kisebb molekulákra hasadnak.

Szénhidrátok változása a szárítás folyamata alatt

A mesterséges szárítás során talán az egyik legfontosabb folyamat a szénhidrátok különböző típusainak mennyiségi és minőségi változása. A szénhidrátok össz mennyisége a mesterséges szárítás folyamán 35 %-kal csökken (**DRWIEGA, 1980**). A keményítő kb. 90 %-a mono –di- és oligoszacharidokká alakul át.

DRWIEGA (1980) kutatásai alapján elmondható, hogy a változások nagy része a színesítés fázisában megy végbe. Mérései alapján az egyszerű cukrok mennyisége az eredetinek több mint 100%- ával nőtt, míg a szénhidrátokon belül a keményítő mennyisége körülbelül 90%-kal csökkent. A glükóz mennyiségének növekedése mintegy 80%, a fruktózé 140%, a szacharózé 75%. Ha a szárítás folyamatának kezdeti fázisát vizsgáljuk meg, akkor a glükóz-fruktóz mennyisége azonosnak mondható, majd a színesítés előrehaladásával a fruktóz mennyisége növekedik. A glükóz-fruktóz mennyiségének különbsége a szárítás folyamatának 45-50. órájára állandósul.

Számos kutató követte nyomon a szénhidrátok változását a dohánylevelek szárítási folyamata során. **MOHAPATRA és JOHNSON (1980)** a lebomlási folyamatokat vizsgálták. Méréseikkel bizonyították, hogy a cukor-keményítő arány gyorsabban változik a szárítási szakaszban, mint a színesítés folyamata alatt. Ennek okát abban látták, hogy a száradás alatt jelentős a légzés csökkenés a keményítő lebomlás folyamatos fennmaradása mellett.

Bizonyos kutatók szerint a keményítőt a hidrolízis a kezdeti 18%-ról 2%-ra csökkenti. A színesítés elején a glükóz mennyisége nő, majd ennek a folyamatnak a második fázisában és a lemezszerítés elején csökkenő tendenciát mutat. A szárítási folyamat végén ismét növekedik (**AMIN, 1979; LONG & WEYBREW, 1981**).

A szárítás első fázisában elindul a keményítő lebomlása egyszerű és összetett cukrokká. Ez a folyamat nyomon követhető, hiszen a keményítő mennyiségének csökkenésével párhuzamosan növekedik a dohánylevél cukortartalma, főképpen az egyszerű cukrok mennyisége növekedik.

A keményítő lebomlásának folyamatával számos kutató foglalkozott. **LEFFINGWELL (1976)** vizsgálatai szerint a szárítás során a keményítő az eredeti mennyiség ötödére csökken, míg a szabad redukáló cukrok mennyisége közel a háromszorosára nő (**4. táblázat**).

4. táblázat Keményítő lebomlása a mesterséges szárítás eltérő fázisaiban (Forrás: LEFFINGWELL, 1976)

Komponens (%)	Anyagállapot		
	zöld	színesített	száraz
Keményítő	29,3	12,4	5,52
Szabad redukáló cukor	6,68	15,92	16,47
Levulóz	2,87	7,06	7,06
Szacharóz	1,73	5,22	7,30

Ha a törés időpontjában vizsgáljuk meg a dohánylevelek átlagos cukortartalmát, akkor mennyisége 6-10 %-ra tehető. A mesterséges szárítás színesítés szakaszában a levelek cukortartalma jelentős mértékben növekedik. A levelek cukortartalmának változása leginkább a Virginia típusú dohányok esetén minőségi kérdés. A Virginia dohányok mesterséges szárítása során éppen a cukortartalom megfelelő szinten tartása a cél, míg a természetes szárítású Burley dohányokban a cukor mennyisége kevésbé lényeges.

Ha kifejezetten a szénhidrátok jelenlétének minőségre gyakorolt hatását vizsgáljuk, akkor igen komplex kérdésre kell megadnunk a választ, ugyanis ennek pontos meghatározása nem könnyű. Általában véve a szénhidrátok pozitív hatással vannak az illat és aromaképződés folyamatára (**PYRIKI, 1959; PYRIKI & HOFMANN, 1959; ENZELL, 1976; MENDEL, 1984;**). Nem egyértelmű azonban a szénhidrátok mennyiségi növekedésének minőségre gyakorolt hatása,

ugyanis ebben a megközelítésben figyelembe kell vennünk egyéb komponensek szénhidrátokkal kialakított arányát is. A cukrok mennyiségének növelése csak akkor okoz pozitív minőségi jellemzőket az íz tekintetében, ha vannak megfelelő mennyiségben gyanták és viaszok. A cukrok jelentősége óriási a dohány savasságának, lúgosságának megfelelő értéken tartásában, az optimális egyensúly kialakításában. Ha azonban hirtelen megnő a dohány cukortartalma, akkor csípős, kaparós füstre kell számítanunk. Az oldható szénhidrátok túlzott jelenléte kifejezetten ront az érzékszervi paramétereken, növeli a füst savasságát, valamint csökkentik az égést.

A klorofill felhalmozódásával növekedik a levelekben a keményítő és cukor tartalom. A szénhidrátok felhalmozódása következtében a szárítás során kedvezőbb színárnyalatú levelek keletkeznek, jobb minőségű szárított dohányt kapunk (**BELJAKOVA, 1966**).

A cellulóz szerepe kettős, hiszen az égőképességre pozitív hatást gyakorol, azonban az általános minőséget negatívan befolyásolja (**PYRIKI, 1959; ABDALLAH, 1974**).

A pektinek szerepének megítélése minőség szempontjából meglehetősen negatív, több szerző is alátámasztja munkájában (**SHMUK, 1953; ABDALLAH, 1970**). Kiemelik a metil-alkoholt, mint pektin összetevőt, mely igen káros a minőségre.

Nitrogénvegyületek változása a szárítás folyamata alatt

A nitrogénvegyületek a fehérjéket, aminosavakat, alkaloidokat, nitrátokat, amidokat és az ammóniát magába foglaló vegyületcsoport. Bár ez az a molekulacsoport, melyről a legtöbb információt tudjuk, hiszen a dohánykutatásban dolgozó szakemberek vizsgálatainak középpontjában szerepelnek, most csak a fehérjék sorsával foglalkozom részletesen, bár megemlítem, hogy a nitrogéntartalmú vegyületek mennyiségének változása a szárítás folyamán kismértékű. Természetesen az alkaloidok szárítás során végbemenő változásaival számos kutató foglalkozott, ebből itt csak egyet említek meg (**ENZELL & WAHLBERG, 1980**).

A nitrogéntartalmú vegyületek fele-kétharmada fehérje formájában van jelen a dohánylevél technológiai érettség állapotában. Ha a fehérjelebomlás mértékét vizsgáljuk a mesterséges szárítás alatt, akkor a színesítés és levéllemezzel szárítás közben ez a folyamat gyorsabb, mint a további szárítási szakaszokban. Az aminosav tartalom változása szintén ezt a tendenciát követi (**MAHAPATRA & JOHNSON, 1980**).

Összességében elmondható, hogy a nitrogéntartalmú vegyületek mennyiségi változásáért felelős átalakulási folyamatok meglehetősen bonyolultak, hiszen nem csak a lebomlási folyamatokra, hanem számos belső átalakulási folyamatra vezethetők vissza (**WINDER & HOFFMANN, 1967; TSO, 1990**).

LEFFINGWELL (1976) is foglalkozott a nitrogéntartalmú vegyületek változásával mesterséges szárítás során. Ő is arra a megállapításra jutott, hogy az összes nitrogéntartalom csökken a szárítás folyamán, melynek fő oka a fehérjék aminosavakká való bomlása elsősorban. Természetesen ezen irányú változások nem fejeződnek be a szárítás végén, hanem a tárolás során is folytatódnak.

Az aminosavak mennyiségének változását **LONG & WEYBREW (1981)** is vizsgálta. Megállapították, hogy a szárítás során az aminosavak mennyisége jelentős mértékben nő, azonban ez a megállapítás csupán az aminosavak együttes mennyiségére igaz. Bizonyos aminosavak mennyisége kicsiny csökkenést mutat a szárítás során, ezek a következők: valin, alanin, tirozin, leucin, lizin, arginin, izoleucin. Míg egyéb aminosavak mennyiségének növekedését tapasztalták, melyek a következők: aszparaginsav, fenilalanin, glicin, glutaminsav, hidroxiprolin, hisztidin, prolin.

Az aminosavak közül a prolin viselkedése egyedi, hiszen többszörös növekedéséről is beszámolnak a mesterséges szárítás folyamán (**LEFFINGWELL, 1976**), akár 25-szörös emelkedést is publikáltak. Ennek oka nem lehet csupán csak a proteolízis, a növekedés sokkal jelentősebb annál. Valószínűnek tartják, hogy ennek a nagymértékű növekedésnek a háttérében a klorofill molekulák pirollgyűrűjének metabolizmusa áll.

Ha a dohánylevelek fehérjetartalmát a dohány minősége szempontjából vizsgáljuk meg, akkor elmondható, hogy a proteinek minőségre gyakorolt hatása meglehetősen összetett. Az albumin fehérje frakció elsősorban az ízre van negatív hatással. Az sem mondható el azonban, hogy a fehérje frakciók összessége haszontalan, például az oldható fehérjefrakciók egy részének jelentős szerepe van a minőség kialakításában. Az már bizonyított, hogy az égés során a fehérjéknek kellemetlen szaguk lesz, azonban kis mennyiségük kifejezetten pozitív hatást gyakorol az aromára (**GROB, 1961**). Az aminosavak szerepét sem feledhetjük el, hiszen az aminosavak, mint aroma prekursorok szerepelhetnek ebben a komplex rendszerben, ezzel befolyásolva pozitív irányban a füst illatának minőségét. A Virginia dohányok esetén bizonyos aminosavak (alanin, glutamin) jelenléte minőség meghatározó, sőt a jó minőségű dohánylevelekben igen magasnak bizonyult a prolin mennyisége (**LEFFINGWELL, 1976**).

A lipidek változása a szárítás folyamata alatt

A lipidek mennyiségi, minőségi átalakulását is nyomon követték mesterséges szárítás alatt. **FRANKENBURG (1946)** még csak egy szerves oldószerben oldódó molekulacsoportról beszél, nagyrészt azonosítatlan komponensekről. A kémiai analitika fejlődésével párhuzamosan egyre több lipid molekula vizsgálata, azonosítása került a kutatások középpontjába. Kiderült, hogy a zsírsavak oxidációja még a szárítás kezdeti fázisában megtörténik. Számos intermedier molekula lett

azonosítva, mint például a benzaldehid, a fenil-acetaldehid, melyek benzoesavon illetve fenil-ecetsavon keresztül benzilalkohollá, illetve fenil-etil-propil-alkohollá bomlanak.

A dohány minősége szempontjából nagyon fontos az illóolajok mennyiségi változásainak nyomon követése. Komponensenként lebontva mennyiségük változatosan alakult ugyan, de az összes illóolaj tartalom egyértelmű növekedést mutatott a szárítás alatt (**LONG & WEYBREW, 1981**). Továbbá megállapításra került, hogy az összes zsírsav metilésztere fokozatosan csökken, a zsírsavak mennyisége pedig 2-6%-ban csökken a szárítás során, bár a mesterséges szárítás alatt kisebb mértékben, mint a természetes szárítás folyamán. A dohánylevelek felületén található paraffin szénhidrogének mennyisége a szárítás alatt gyakorlatilag nem mutattak változást (**DAVIS, 1976; LAYTEN & NIELSEN, 2002**).

Hazánkban az 1970-es évek második felében folytak dohánylipidekkel kapcsolatos vizsgálatok. **BIACS és munkatársai (1975)** megállapították, hogy a lipidtartalom vizsgálata lehetőséget nyújt a dohánylevél technológiai érettségének beltartalmi, kémiai módszerrel végzett meghatározására. **GRUIZ és munkatársai (1977)** az érésyorsító szereknek a dohánylevél lipidjeire gyakorolt hatását kutatták.

Fenolos komponensek változása a szárítás folyamata alatt

A fenolok, polifenolok jelentősége a dohány minősége szempontjából kulcsfontosságúak, azok hozzájárulnak az érzékszervi tulajdonságokhoz, úgy, mint a szín, az aroma és a keserűség és az antioxidáns hatás formálódásához. Annak tekintetében, hogy hatásukra mely paraméterek alakulása pozitív, számos kutató eltérő eredményekre jutott. Az összes fenol tartalom mennyisége különböző típusú dohányok leveleiben széles határok között, 0,52-2,61% között változhat (**SNOOK et al., 1986**).

A szakirodalom beszámol a fenolos vegyületek pozitív hatásairól a dohány füst és aroma komponenseire, hiszen a fenolos vegyületeket aromaanyag prekursoroknak tekintik (**ABDALLAH, 1970; KALIANOS, 1976**). Azonban akad olyan feltételezés is, miszerint nincsen kapcsolat a fenolos komponensek jelenléte és a dohány minősége között (**PYRIKI, 1959**). Mások szerint szoros az összefüggés a dohány minősége és a fenolos komponensek jelenléte között, de csak abban az esetben, ha a fenolos vegyületek mennyisége kisebb, mint az oldható szénhidrátoké. Ha a fenolos komponensek mennyisége nagyobb, mint az oldható szénhidrátoké, abban az esetben jelentős minőségromlás figyelhető meg. Kutatók sora ír arról, hogy a polifenoltartalom és a minőség párhuzamosan jelentkezik. Kiemelt szerepet szánnak a klorogénsav és rutin tartalomnak (**KALIANOS, 1976; MENDEL, 1984**).

A fenolos komponensek már a zöld dohánylevélben benne vannak, azonban a szakirodalom szerint a szárítás és a tárolás alatt válnak a füstminőség szempontjából kedvező anyaggá (**ENZELL & WAHLBERG, 1980**). A polifenoltartalom mesterséges szárítás folyamán történő változása tekintetében eltérőek a vélemények. **FRANKENBURG (1946)** állítása szerint a fenolos komponensek összes mennyiségét tekintve a szárítás során nem történik változás. Időben jóval később jelennek meg ennek ellentmondó publikációk, miszerint a szárítás alatt a fenolos komponensek mennyisége fokozatosan nő (**AMIN, 1979; MOHAPATRA & JOHNSON, 1980**).

GANG és munkatársai (**2010**) vizsgálataik során összefüggést kerestek a szárított dohányok polifenolos komponenseinek és szerves savainak koncentrációja, valamint a dohányok földrajzi eredete, minőségi osztálya, és fajtái között. Az adatok feldolgozása főkomponens analízissel (PCA, Principal Component Analysis) és lineáris diszkriminancia analízissel (LDA, Linear Discriminant Analysis) történt. Az eredmények azt mutatták, hogy a dohányfajták a polifenol és szerves sav tartalmuk alapján egyértelműen (100 %-os biztonsággal) elkülöníthetők, azaz külön osztályba sorolhatók. Véleményük szerint a polifenolos komponensek és szerves savak mennyisége egyértelműen alkalmas a fajták jellemzésére.

A főkomponens és lineáris diszkriminancia analízissel nem tudták teljes mértékben elkülöníteni a különböző földrajzi eredetű és minőségi osztályú dohányleveleket.

AMIN (1979) részletes vizsgálatoknak vetette alá a mesterségesen száradó dohánylevelekben végbemenő klorofill bomlás folyamatát. Megállapítása szerint a klorofill bomlásából származó fitolból neofitadién keletkezik. Ennek az átalakulásnak köszönhetően a neofitadién mennyisége akár 30%-kal is növekedhet a szárítás alatt.

Számos kutató (**COURT et al., 1983; COURT & HENDEL, 1984; COURT et al., 1993**) követte nyomon a scopolin, klorogénsav és izomerei, valamint a scopoletin mennyiségének változásait mesterséges szárításnak alávetett dohánylevelekben. Megállapításaik egyértelműen mutatják, hogy az említett komponensek mennyisége növekedik a szárítás folyamán. A szárpozíció szerint is eltérés tapasztalható klorogénsav, rutin és scopoletin tartalom tekintetében. Az aljlevelekben a legalacsonyabb, a hegylevelekben a legmagasabb mennyiségük, a szárpozíció emelkedésével mennyiségük növekedik (**WILLIAMSON & GWYNN, 1982; COURT et al., 1983; COURT & HENDEL, 1985**). A fenolos komponensek mennyiségét sok minden befolyásolja, mint például a fajta, a táptalaj összetétele (**OKAZAKI et al., 1982**), a termesztés körülményei (**WESTON, 1969**), a fény, a hőmérséklet, a szárítás körülményei (**PENN et al., 1958; WALKER & LEE, 1968; KOEPPE et al., 1970**).

A lignin tartalom növekedése a dohánylevelek túlérétségét jelzi, mely nagymértékben befolyásolja a dohány minőségét is. Általánosságban elmondható, hogy a lignin mennyiség és a dohány

minősége között fordított arányosságot véltek felfedezni (**PHILLIPS & BACOT, 1953; PYRIKI, 1959; GOHEEN & HOYT, 1985**).

A száraz dohány minőségét meghatározó egyik legfontosabb paraméter a levelek színárnyalata. A jó minőségű Virginia típusú dohánylevelek élénksárga színe arról tanúskodik, hogy magas cukortartalommal, kedvező íz és aromakomponensekkel, optimális égőképességgel rendelkezik. Szerzők sora támasztja alá kísérleti eredményeivel azt a tényt, miszerint a polifenolok jelentős szerepet töltenek be a dohány színének kialakításában. Kiemelt szerepet adnak a vegyületsoponton belül a klorogénsavnak és a rutinnak (**CHOUTEAU, 1966; SHEEN, 1969; JOHNSON, 1970; KANDRA, 1971; GWYNN & McCLURE, 1974; GWYNN, 1978**).

Az amerikai mesterséges szárítású dohányok minősége és a jelenlévő klorogénsav mennyisége között szoros összefüggést tapasztaltak, valamint a magasabb klorogénsav és rutin tartalommal jobb minőség párosult (**WILKINSON et al., 1954; KANDRA, 1971**).

PAWLOVSKA (1973) szerint nem csak a polifenol magasabb mennyisége van szoros kapcsolatban a jó dohányminőséggel, hanem nagyon fontos a jelenlévő klorogénsav-rutin arány is. **SHEEN (1973)** kiemelt jelentőséget tulajdonított a dohánylevelek klorofill és klorogénsav tartalmának, sőt pozitív korrelációt talált a két komponens között. **SHEEN (1973)** tapasztalatai szerint minél fokozottabban jellemző a levelekben a klorofill szintézis, annál magasabb a klorogénsav tartalom.

2.2.5 A dohány fermentálása, a fermentálás során lejátszódó változások

A dohány fermentálásával kapcsolatos kutatások az ötvenes és hatvanas években folytak nagyon intenzíven. Közelmúltban és napjainkban a fermentálás szinte elfelejtett kutatási témának számít. A feldolgozás technológiájának jelentős mértékű megváltozása azt indokolná, hogy a fermentálás ismételten a vizsgálódások középpontjába kerüljön.

A szárított dohány nem ég jól, füstjének illata, íze, összhatása nyers, csípős, kaparós, kiegyenlítetlen. Ahhoz, hogy élvezeti célra alkalmas legyen, át kell esnie egy fermentációs folyamaton.

A szárított dohány fermentálásának célja, hogy a feldolgozott anyag, károsodás nélkül tárolható legyen, ízében, színében, zamatában olyan változások menjenek végbe, hogy a további feldolgozás szempontjait alapul véve megfelelő minőségű alapanyagot adjon.

A fermentáció folyamatában végbemenő bonyolult, összetett fizikai, kémiai, mikrobiológiai változások kutatása igen sok megválaszolatlan kérdést indukált az elmúlt években. A vizsgált rendszer kétségtelenül komplex, nehezen nyomon követhető (**FRANKENBURG, 1950**).

A dohány növény levelein található mikroorganizmusok bejutnak a fermentációs rendszerbe, ezzel mindenképpen részt vállalnak a végbemenő kémiai, enzimológiai folyamatokban. A szárítás folyamán végbemenő változások nem állnak le teljes mértékben a szárítás végén, hanem folytatódnak a fermentáció során is (**AKEHOURST, 1973; DÉVAINÉ & McINTOSH, 1986; TSO, 1990**)

Feltételezhető, hogy a fermentáció során elsősorban az enzimológiai, biokémiai folyamatok a dominánsak. Voltak azonban olyan időszakok, amikor csupán egyszerű kémiai változások halmazaként értelmezték a fermentációt (**FOLKMAYER, 1970a, FOLKMAYER, 1970b**)

Az eltérő elméleteket modellezéssel próbálták alátámasztani. Például annak igazolása, miszerint a fermentáció csupán kémiai változások összessége, úgy történt, hogy huzamosabb ideig 100 °C-on tartott szárított dohányok steril körülmények (kizárva az esetleges mikrobiológiai és enzimológiai hatást) közötti további változását vizsgálták. Ezzel a kísérlettel bebizonyosodott, hogy a fermentáció során kémiai változások a mikroorganizmusok kizárása ellenére is végbemennek, hiszen ilyen magas hőmérsékleten már a mikrobás hatásokra nem számíthatunk, valamint kizárhatjuk az enzimológiai hatásokat is (**GYŐRIVÁNYI, 1982**).

Jelentősen meghatározta a dohányok fermentációs folyamatainak kutatási irányát az a tény, hogy a kémiai változások mellett nem zárható ki a dohánylevelekről a fermentáció rendszerébe bekerülő mikroorganizmusok hatása sem. Az biztos, hogy mikroorganizmusok jelen vannak a fermentációs rendszerben, azonban nehéz megjósolni, milyen mértékű hatást gyakorolnak a dohánylevelek érési folyamatában. Az biztos, hogy bizonyos szerepet betöltenek, de jelenlétük nem feltétlenül szükséges ahhoz, hogy a dohány fermentáció végbe menjen, ugyanis bebizonyosodott, hogy steril körülmények között is fermentálódnak a dohányok (**GYŐRIVÁNYI, 1982**). A kérdés csak az, hogy mely mikroorganizmus csoport a domináns a fermentációs rendszerben, valamint az, vajon milyen irányú folyamatokat befolyásolnak a jelen lévő mikrobák.

SZMIRNOV és munkatársai (1945) szerint a fermentáció során fellépő felmelegedés, nincsen szoros kapcsolatban a jelenlévő mikroorganizmusok működésével. Véleményük szerint a melegedés oka inkább a fermentáció során végbemenő oxidációs folyamatok következtében alakul ki. Ezen oxidációs folyamatokat természetesen enzimek katalizálnak, azonban nehéz megjósolni, vajon az enzimek a jelenlévő mikroorganizmusok által termelt enzimek, avagy a dohány növény szöveti enzimeit. Szmirnov és munkatársai nyomon követve a természetes fermentáció folyamatát, kidolgozták az ún. Szmirnov módszert, mely a fermentált dohány fermentáltsági fokának meghatározására szolgált. A módszer alapját jelentette a polifenol-oxidáz enzim aktivitásának fokozatos csökkenése a fermentáció során, amiből következtetni lehetett a kérdéses dohányhalmaz fermentáltsági fokára (**KRETOVICH, 1945**).

Mai ismereteink szerint a fermentáció egy olyan komplex folyamat, melynek során bonyolult fizikai, kémiai, enzimológiai, mikrobiológiai változások mennek végbe.

A fermentáció során végbemenő fizikai változásoknak nemcsak technológiai, hanem gazdasági jelentősége is van. Az egyik ilyen fontos fizikai változás a dohánylevelek rugalmasságának javulása a fermentáció során. Ennek a változásnak a hátterében a vízben oldható pektin anyagok fermentáció során való tovább bomlása áll, ennek következtében a vízoldhatatlan pektin frakció mennyisége az összes pektin anyag mennyiségét tekintve nő. Gyakorlati tapasztalat, hogy a magasabb hőfokon fermentált dohánylevelek rugalmassága gyengébb minőségű, hiszen ebben az esetben a vízoldhatatlan pektin anyagok nagyobb arányban bomlanak le, mint az alacsonyabb hőfokon fermentálódott dohányok esetén.

A fermentáció folyamán a dohányok szárazanyag tartalma csökken, melynek mértéke nem csak a dohány fajtájától, hanem a fermentáció módjától is függ. A kolloidok csökkenésének kisebb higroszkóposág lesz az eredménye, ennek a következménye az egyensúlyi nedvességtartalom csökkenése is. Ennek ellenére a dohánylevelek rugalmassága optimális marad (**AKEHOURST, 1973; TÓTH, 1973**).

A dohányhalmaz színének változása leginkább a szárítás folyamán szembeűnő, azonban a fermentáció folyamatában is folytatódnak azon kémiai, biokémiai változások, melyek hatására a levélrészek színárnyalata kiegyensúlyozottabbá válik, valamint a megfelelően irányított szárítást követő fermentációs változások következtében eltűnnek az esetleges zöldes árnyalatú levélrészek. A dohány színének változása számtalan kémiai, biokémiai változás eredménye. Szerepet játszanak a redukáló cukrok és aminosavak kondenzációjából származó melanoid típusú vegyületek. Ezzel párhuzamosan nem zárhatjuk ki a polifenolok bonyolult oxidatív átalakulásából származó számtalan intermedier vegyület hatását, melyek a fermentált dohányok színének mélyülését, barnulását és egyben kiegyenlített jellegét okozzák (**TÓTH, 1975; TSO, 1990**). Ebben a folyamatban jelentős részt vállalnak az oxidációs enzimek, mint például a peroxidázok és polifenol-oxidázok. Természetesen a vízben oldható polifenol tartalom (PF) mennyiségének változása is kapcsolatba hozható a dohánylevelek megfelelő színárnyalatának kialakításával (**YAN & HAN, 1987; ZHU, 1993; XU & SUN, 2003**).

Tény, hogy a fermentált dohány eltarthatósága sokkal jobb, mint a szárítotté. Ennek számos oka van, mint például az, hogy a szárított dohány nedvességtartalma nem kiegyensúlyozott, bizonyos biokémiai folyamatok nem játszódhatnak le benne teljes mértékben. Továbbá az oxidációs folyamatok hőt termelhetnek, ennek következtében nedvesedés alakulhat ki a halmaz bizonyos pontjain, melynek következtében megindulhat a penészesedés folyamata. A penészgombák felszaporodása és a toxintermelésnek kedvező környezeti paraméterek jelenléte komoly minőség

romlást idézhetnek elő a dohány halmazban (**FRANKENBURG, 1950; NÉMETHI & HALÁSZ 1971; TÓTH, 1975**).

Korábban komoly veszélyt jelentett a fermentáció alá vetett dohánylevelek penészesedése szempontjából a nedvesebb főér bekerülése a halmazba. Jelenleg a fermentációt megelőzi a kocsányozás folyamata, melynek során a levéllemezből eltávolítják a főerezetet, ezzel jelentős mértékben lecsökkentve a penészgombák elszaporodásának lehetőségét. A nedvesebb, vastagabb főerek eltávolítása nagyon fontos, hiszen jelenlétük nedves penészesedési gócot alakíthatnak ki.

A dohányok ásványi anyag tartalma a fermentáció során gyakorlatilag nem változik, kisebb mértékű relatív emelkedés rögzíthető ugyan, de ennek oka a szárazanyag tartalom csökkenésének köszönhető (**TÓTH, 1975**).

A fermentáció során végbemenő kémiai változások közül a leginkább szembeűnő a szénhidrátok átalakulása. A keményítő lebomlása igen intenzív már a szárítás során, a természetes szárítás alatt gyakorlatilag teljesen lebomlik, a mesterséges szárításnak alávetett dohánylevelekben még találunk kis mennyiségben keményítő molekulákat. Azonban a fermentálás végére a keményítő teljes mértékben lebomlik (**FRANKENBURG, 1950**). Az egyszerű cukrok számos kémiai folyamatban részt vesznek, az egyik legfontosabb átalakulási irány a fermentáció során az oxidáció. A cellulóz és lignin molekulák nem változnak, azonban a hemicellulózok közül a pektinanyagok lebomlása számottevő.

A dohányok nitrogéntartalma a fermentáció során csökken. Ennek háttérében az oldható nitrogénvegyületek bomlása állhat, valamint a fehérjék oldható nitrogénvegyületekké alakulása. Jelentős mértékű nitrogén tartalom csökkenést okoz a nikotin és ammónia veszteség. A fehérjék lebomlása, átalakulása kulcsprobléma, hiszen nagymértékben befolyásolja a dohány minőségét, mert a fehérjék égéstermékei -főképp alacsony cukortartalom mellett- a füst ízét és illatát jelentős mértékben lerontják. A nikotin mennyiségét különböző technológiai paraméterek befolyásolhatják. Tapasztalat szerint, míg a szárítás folyamán az idő, addig a fermentáció során a folyamatot megelőző magasabb hőkezelés mértéke határozza meg a nikotin tartalom változását (**WYNDER & HOFFMANN, 1967**).

A dohány minőségét számtalan komponens jelenléte és átalakulása befolyásolja. Röviden áttekintve a szerves savak mennyiségi változását szárítás és fermentáció során, igen eltérő irányú változásokról számoltak be. Míg a mesterséges szárítású dohányok savtartalma a fermentálás során csökken, addig a természetes szárításnak alávetett dohányfélék fermentációja után növekedést tapasztaltak (**GANG, 2010**).

A polifenolok mennyisége nagyon meghatározó a dohányok minősége tekintetében, kiemelt jelentőséggel bírnak a dohányok szívási tulajdonságainak kialakulása szempontjából. A polifenolok

mennyiségének változása fermentáció során csökkenő tendenciát mutatnak, azonban számos olyan eredmény is napvilágot látott, melyek szerint a csökkenő tendencia nem általánosítható.

A fermentáció alatt a vizsgált mikroorganizmusok száma a kontroll mintákhoz képest csökkent. A domináns mikroorganizmus csoportot a baktériumok képviselték, a fermentáció 8. napján vett mintákban az összes mikrobaszám 92%-át, a 18. napon pedig a 93,4 %-át tették ki. A nem fermentált leveleken a vizsgált időpontokban körülbelül 86%-os volt a baktériumok részaránya. A baktériumok, penészek és actinomycetesek száma már a fermentáció első szakaszában erőteljesen lecsökkent, az összes mikrobaszám pedig felére csökkent. A fermentáció végére az actinomycetesek nem voltak kimutathatóak (QUIU, 2003-2004).

A feldolgozás különböző fázisaiból (kontroll, 8 napos és 18 napos fermentálás) vett minták mikroorganizmusai ugyanabba a három nemzetségbe tartoztak (*Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*), a domináns nemzetség a *Bacillus* volt. A fermentálás lecsökkentette az *Actinomycetes* nemzetségek számát, a kontroll mintán identifikált fonalas baktériumok 5 nemzetséghez tartoztak, a fermentáció 8. napján már csak 3 nemzetségbe tartozó fonalas baktériumok jelentek meg, amelyek a fermentáció végén már nem voltak kimutathatók (QUIU, 2003-2004).

A frissen letört dohánylevelek sokféle enzimet tartalmaznak, ezek nagyon fontos szerepet játszanak a technológiailag érett levél sejtjeibe betárolt anyagoknak szárítás alatti kémiai átalakításában, ezzel a levél elvárt minőségének kifejlesztésében. A mesterséges szárítás végére mind az oxidoreduktáz, mind a hidrolitikus enzimek aktivitása erőteljesen lecsökkent. A fermentálás alatt a hidrolitikus enzimek aktivitása közel kétszerese volt a kontroll mintákban rögzített értékekhez képest. A PPO és POX aktivitás értékek is növekedtek, azonban a kontroll mintákhoz képest ez a változás nem volt olyan látványos.

A szerzők állítása szerint az enzimaktivitás szignifikáns növekedése összefüggésbe hozható a leveleken élő mikroorganizmusokkal. Nem tartják valószínűnek, hogy a mesterséges szárítás után, a dohány sejtek, szövetek szintetizálni tudnának újabb enzimeket (QUIU, 2003-2004)

2.3 Mikrobiológiai változások a dohány elsődleges feldolgozása alatt

A növényi anyagok, mint a dohány is, mikroorganizmusokkal szinte mindig szennyezett. A mikroorganizmusok szerepét semmiképpen sem zárhatjuk ki a dohány elsődleges feldolgozása alatt. Természetesen nagyon fontos tudnunk, hogy a feldolgozás kezdetekor milyen mikrobiológiai állapotban kerül be a dohány az üzembe, valamint milyen változásoknak van kitéve a feldolgozás során. Nagyon fontos nyomon követni a dohány anyag mikrobiológiai változásait a szárítás alatt, hiszen a fermentáció során szerepük jelentőssé válhat.

Megfelelő környezeti tényezők mellett a talajból hozott mikroorganizmusok felszaporodhatnak, a dohány anyagban anyagcserét folytathatnak, a szubsztrátumok egy részét lebonthatják, átalakíthatják, melynek következtében jelentős beltartalmi és érzékszervi változásokat okozhatnak. Óriási szerepet kapnak a minőségromlást okozó gombák, melyek a feldolgozás minden fázisában okozhatnak problémát, míg a baktériumok és élesztők jelentősége a fermentáció alatt csúcsosodik ki.

Általában véve a mezőgazdasági termények kárformáit **CHRISTENSEN és KAUFMANN (1969)** a következő csoportokba sorolja:

1. dohosság, fülledtség.
2. káros biokémiai változások.
3. a növényi részek elszíneződése.
4. mikotoxinok keletkezése.
5. beltartalmi- és érzékszervi problémák.

A dohány és a dohánygyártmányok szintén ki vannak téve a felsorolt veszélyeknek, ezért is fontos a feldolgozás és tárolás folyamatában nyomon követni a dohánylevél halmaz mikrobiológiai állapotát (**GHBRIAL, 1976; RUBINSTEIN, 2002**)

A dohánylevelekről izolált mikrobacsoportok elsősorban a szántóföldről kerülnek a levelek felszínére, mint például: *Alternaria*-, *Cladosporium*-, *Fusarium*-nemzetség fajtái. A raktározás során a legnagyobb problémát az *Aspergillus*-, *Penicillium* és *Mucor*-féle penészgombák okozzák.

A betárolt dohány halmaz 14-18 % nedvességtartalma lehetőséget adhat a xerophil mikroorganizmusok elszaporodásához (**5. táblázat**), elsősorban az *Aspergillus* fajok szerepe lehet számottevő. A jelenlévő mikroorganizmusok anyagcsere tevékenysége helyi nedvesedéssel járhat, melynek következtében a nedvességtartalom emelkedése kedvezhet a *Penicillium*- és *Mucor*-félék, valamint a szántóföldi mikrobák, mint *Cladosporium*- és *Alternaria*-fajok, esetleg az élesztők és baktériumok szaporodásának is.

A szántóföldi gombák fejlődésükhöz magas nedvességtartalmú szubsztrátumot igényelnek (20-30%). A raktári gombák közül a legalacsonyabb nedvességtartalmú szubsztrátumot az *Aspergillus* (14-20%), majd a *Penicillium*-fajok (18-25%), míg a *Mucor*-félék 25% feletti nedvességigénnyel rendelkeznek.

5. Táblázat Mikroorganizmusok fejlődéséhez szükséges vízaktivitás (a_w) értékek (Forrás: BATA et al., 1990)

Mikroorganizmusok megnevezése	Vízaktivitás értékek
Gram negatív baktériumok	1,00-0,95
Bacillaceae- család	0,95-0,91
Élesztőgombák	0,91-0,88
Penészgombák	0,88-0,80
Staph. aureus, halofil baktériumok	0,80-0,75
Xerophil penészek	0,75-0,65
Ozmofil gombák	0,65-0,60

A minőségromlásnak különböző fokozatai vannak. A minőségromlás akkor nevezhető enyhébb fokúnak, ha a jelenlévő gombák és anyagcseretermékeik nem mérgezőek. A gombák élettevékenységének hatására jelentős kémiai változások következnek be megfelelő szubsztrátum jelenlétében. Ilyen esetben a gombák a rendszerben jelenlévő makromolekulákat hasznosítják anyagcseréjük során, könnyen metabolizálható szénforrásokat, fehérjéket, zsírokat bontanak le. A dohány minősége szempontjából a szénhidrátok lebomlása okozhat jelentős problémát. A mikroorganizmusok anyagcseréje következtében a dohánylevél halmazban íz- és szaghibák jelentkehetnek. A kémiai változások jelentős beltartalmi értékcsökkenéshez is vezethetnek, mint például jelentős vitamin, esetleg karotinoid tartalom csökkenés jellemző egy penészes anyaghalmazban.

Súlyosabbnak akkor nevezhető a minőségromlás, amikor a feltételek adottak mikotoxinok keletkezéséhez (MASSEY, 2000). A toxikus anyagok nem csak a dohány végtermék „elfogyasztásával” okozhatnak jelentős egészségügyi problémákat, hanem a dohány feldolgozása során a dolgozók közvetlen kapcsolatba kerülve a dohány halmazzal, esetleg csak az üzemi légtérrel, belélegezve a veszélyes komponenseket, komoly megbetegedéseket okozhatnak. A penészes dohányban humán patogén gomba is jelen lehet, mint például az *Aspergillus fumigatus*, ami tüdő-mikózist okozhat (BATA et al., 1990).

A dohánylevél halmazon előfordulnak atoxikus és toxikus penészfajok is. A legjelentősebbek közülük az *Aspergillus*- *Penicillium*- és *Fusarium* nemzetségekből származnak. A toxikus fajok nem mindegyike termel toxinokat (NYIREN et al., 1976; SZIGETI, 1976a-d).

Számos vizsgálatot végeztek mesterséges dohány szárító pajtákban, ahol több penészfajt és baktérium törzset sikerült azonosítani. A penészgombák és baktériumok a levélre a talajról, vagy az előző években, a dohánypajtákban visszamaradt tenyészetekről kerülnek (GARAGULY, 1964).

WELTY és munkatársai (1968) megállapították, hogy a szárítás hatására csökken a dohányleveleken található mikrobák száma, de a szárítás körülményei következtében sem sikerült a mikroorganizmusok teljes elpusztítása.

A fermentálás kezdetén a dohányok magas cukortartalma miatt az élesztők szerepét emeli ki több szerző. Valószínű, hogy a fermentáció folyamatát az élesztők indítják be, szerepük lehet a pH tartomány semleges irányba való alakításában, ezzel lehetőséget adva más mikrobacsoportok elszaporodásának. Egyes hazai vizsgálatok szerint a fermentáció során a jelenlévő penészek közül a legnagyobb jelentőséget az *Aspergillus niger* kapta.

GIOVANNONZI (1961) a fermentálás kezdeti csíraszámát $1,0-5,5 \times 10^4-10^6$ db/g, csúcsát $3,0-5,0 \times 10^8-10^9$ db/g, végét $1,0-2,0 \times 10^4-10^5$ db/g adatokkal jellemezte.

A fermentált dohányt raktározás alá vetik, melynek időtartama igen változatos, néhány hónaptól több éven át is tarthat. A dohányhalmaz nedvességtartalma ekkor 12-15% között mozoghat, mely lehetővé teszi az utófermentáció lehetőségét (**KOVÁCS, 1970**).

Számos fermentációs modellkísérletet elvégeztek annak érdekében, hogy nyomon kövessék a levegő relatív páratartalma, nedvességtartalma, hőmérséklete és a dohányhalmazból izolált penészfajok közötti összefüggéseket (**WELTY & VICKROY, 1975; WELTY & WEEKS, 1976**). Hat héten keresztül (75-78-80-85% relatív nedvességtartalom, 20-25-30°C hőmérséklet) követték nyomon az élő mikrobiota változását. A penészek közül az *Aspergillus* törzsek szerepe kiemelt volt, a fermentáció során a nedvességtartalom 22-32%-ra emelkedett, a penészszám hirtelen felfutott, a cukortartalom 3% alá csökkent, a szárazanyag veszteség elérte a 31,2 %-ot.

Számos próbálkozás volt a tárolt dohányhalmaz penész elleni védelmére. Alkalmaztak antibiotikus kezelést (**GARAGULY, 1963**), propion- és ecetsav (**LUCAS et al., 1973**) adagolást, valamint glikolok, szorbin-és benzoésav K és Na sójának (**PIERRE et al., 1973**) adagolásával is próbálkoztak, de sikertelenül (**LUCAS & POUNDS, 1973**).

A penészek jelenléte a dohányleveleken elfogadhatatlan aromát kölcsönözhet a fermentált dohányoknak. Számos kísérlet folyt annak vizsgálata kapcsán, hogy vajon minden, dohányleveleken szaporodó mikroorganizmus hatása negatív lehet-e a dohány aromajellemzőire. **IZQUIERDO** és munkatársai (**1958**) szerint *Micrococcus aurantiacus*-szal beoltott spanyol dohányok aromajellemzői javultak. Hasonló eredményekre jutottak *Bacillus subtilis* és *Bacillus circulans* hatásának vizsgálata során is (**MORIN et al., 2000; BLANC et al., 2002**). **LUCAS** és munkatársai (**1973**) fermentációs modellkísérleteik során felszaporították azon mikroorganizmusokat, melyek szerepe döntő ebben a folyamatban. Arra a megállapításra jutottak, hogy jelentős aromaváltozások észlelhetők a mikrobacsoportok felszaporodása hatására.

2.3.1 A dohányok minőségromlását befolyásoló környezeti tényezők

A nedvességviszonyok

A mikroorganizmusok növekedése a szubsztrát vízáktivásával, illetve a szubsztrátumot körülvevő légtér relatív légnedvességével mutat szoros összefüggést. A legkevésbé nedvességigényes mikroorganizmusok a gombák között találhatóak, azonban 0,6-0,65-nél kisebb vízáktivitás értékű szubsztrátumokon már ezek a szervezetek sem képesek életjelenséget mutatni. Éppen ezzel magyarázható, hogy hosszú távú tárolás csak ennél alacsonyabb vízáktivitású anyagalmaz esetén lehetséges jelentős mértékű romlás kizárásával.

Azonban a tárolásnál nem elegendő az alacsony nedvességtartalom biztosítása, hiszen ha a rendszer inhomogén, azaz nem egyenletes a nedvességtartalom eloszlása, azaz a halmazban előfordulnak magasabb nedvességtartalmú helyek, akkor ott a mikroorganizmusok felszaporodása megindulhat, majd anyagcsere tevékenységük következtében a mikrobák hőt, párat és szén-dioxidot termelhetnek. Ilyen módon még a megfelelő nedvességtartalmú tárolt halmazokban is kialakulhatnak nedves gócok, melyekben a toxikus anyagokat termelő gombák szaporodásához szükséges feltételek kialakulhatnak.

Különösen veszélyes lehet a magas egyensúlyi nedvességtartalom a természetes szárítás és a dohány természetes fermentációja, asztag fermentáció esetén. Ebben a folyamatban a legnagyobb problémát a bemelegedés és a kondenzvíz keletkezése okozza. Az asztag külső- és belső rétegei között jelentős hőmérséklet különbség lép fel, ennek következtében a meleg levegő felfele száll, ahol gyorsan lehűl, és kondenzvíz formájában lecsapódik. Ilyen módon kialakulhatnak olyan gócok, melyekben a mikroorganizmusok élettevékenysége lehetővé válik, majd elindulhatnak minőségromlást okozó folyamatok.

Hőmérséklet

A legtöbb mikroorganizmus a pszichrofil és mezofil fajok közé tartozik, melyek 0-40 °C-os hőmérsékleti tartományban képesek szaporodni.

A hőmérséklet változása hatással van a légtér relatív nedvességtartalmára, mely visszahat a szubsztrátum nedvességtartalmára. A kondenzvíz kicsapódásának hátterében is a hőmérséklet különbség áll. Magasabb hőmérsékleten már alacsonyabb nedvességtartalom mellett is elindulhat a gombák szaporodása. Ennek oka az, hogy a szubsztrátum vízáktivitása magasabb az alacsonyabb nedvességtartalomnál, magasabb hőmérsékleten. A hőmérséklet mindenképpen befolyásolja a minőségromlás folyamatát. A toxinogén gombák esetén a mikotoxin termelés és a növekedés

hőmérséklet optimuma nem esik egybe. A legtöbb faj esetén a toxintermelés optimális hőmérséklete 20-30 °C közé eshet.

A magasabb hőmérsékletre az élesztő-és penészgombák kifejezetten érzékenyek. Az enzim fehérjék károsodása miatt már 40-60 °C-on a gombasejtek erőteljes pusztulása figyelhető meg. A szaporító spórák életképessége sokkal erőteljesebb, azonban 70-80 °C-on ezek pusztulása is megindul (BATA et al., 1990).

A levegő oxigén és szén-dioxid tartalma

A penészgombák szaporodását nagymértékben befolyásolja a légtér oxigén tartalma. Oxigén jelenléte nélkül ennek a mikroba csoportnak a szaporodása leáll, mikotoxinok sem képződnek. Mindez nem azt jelenti, hogy a levegő oxigén tartalmának csökkenése minden esetben pozitív változással járna, mert bizonyos toxinogén gombák toxintermelése éppen ilyen körülmények között fokozódik.

A raktári penészek jól tűrik a magas szén-dioxid és az alacsony oxigén koncentrációt. Ha oxigénmentes közegben tartjuk a raktári penészeket, abban az esetben elvesztik élettevékenységüket.

Az asztag fermentáció esetén a bálák utóérlelésekor csökken az oxigén és felszaporodik a szén-dioxid mennyisége. Az emelkedett szén-dioxid koncentrációra a penészek eltérő módon reagálnak. Például az *Aspergillus flavus* toxintermelését mérsékelte ugyan a légtér emelkedő szén-dioxid koncentrációja (max.. 20%), azonban szaporodására, fejlődésére nem volt hatással. Azonban a szén-dioxid mennyiségét 20% fölé emelve a penészgomba szaporodása, fejlődése korlátozottá vált, tisztán szén-dioxidos közegben toxintermelés nem volt rögzíthető (BATA et al., 1990).

pH és redox viszonyok

A mikroorganizmusok szaporodásának, fejlődésének a megfelelő kémhatás az egyik legfontosabb feltétele. Az optimális pH tartomány penészek esetén (4-6 pH) kissé eltér a baktériumoknál (pH= 7) tapasztaltaktól.

Megfigyelték, hogy a dohánylevelek préslevének savassága összefüggést mutat a levél korával, valamint a szárítás és fermentálás folyamatával. A fiatal és idősebb dohánylevelek pH-ja eltérést mutatott, a fiatal leveleké 5-6 pH értékek között mozogtak, míg az idősebb levelek pH értékei kissé magasabbnak adódtak (5,3-5,7). Mind a szárítás, mind a fermentálás folyamatában az idő előrehaladásával párhuzamosan a levelek pH értékei fokozatos emelkedést mutattak (DEMECZKY et al., 1952).

A mikotoxinok stabilitásukat általában alacsonyabb pH tartományban érik el, hiszen gyakran tartalmazznak fenolos hidroxil- csoportokat, epoxi-és savanhidrid-csoportokat. Magasabb pH tartományokban bizonyos mikotoxinok hatástalanná válhatnak, hiszen olyan szerkezeti változások mennek végbe bennük, melyek megakadályozzák biológiai aktivitásukat. Szigorúan meghatározott körülmények között a mikotoxinok nagy része lúgokkal irreverzibilis folyamatokban vehetnek részt, ennek következtében a mikotoxinok elveszthetik toxikus hatásukat (BATA et al., 1990).

A dohánylevél, mint a mikroorganizmusok táptalaja

A dohánylevél megfelelő táptalaja lehet számos mikroorganizmus számára. Például dohánytartalmú agar táptalajok alkalmasak *Candida* nemzetséghez tartozó fajok elkülönítésére (ZIA et al., 2004).

A változatos összetételű dohányleveleken számos mikrobacsoport telepedhet meg, melyek hatással vannak egymás anyagcserefolyamataira. Befolyásolják egymás szaporodását, fejlődését. A társflórának nagy jelentősége van a toxinképző penészek esetén. Egyes gombafajok között szinergista és antagonistá kapcsolat is lehet. Előfordulhat ugyanis, hogy bizonyos mikotoxinok szinergista hatással vannak egymásra, így jelentős mértékben emelik az anyaghalmoz toxikus hatását. Kevés vagy egyetlen fajt tartalmazó mintákat súlyosabban kell megítélni, hiszen több faj jelenléte esetén kisebb az esély mikotoxin termelésére (SZIGETI, 1976a-d).

2.4 Oxidoreduktáz enzimek szerepe a növények életfolyamataiban és feldolgozásuk során

A növényi eredetű élelmiszeripari és egyéb ipari nyersanyagok, mint eredetileg élő szervezetek, tulajdonságainak jelentős része különböző enzimeinek aktivitásával, illetve biomolekuláinak minőségével, mennyiségével, illetve viselkedésével jól jellemezhető. A különböző célokra termesztett növényeket termesztéskor, betakarításkor és nyersanyagokká történő feldolgozásuk során számos – stresszhatásoknak tekinthető – behatás éri, amely hatására bennük különböző – elsősorban enzimaktivitást érintő – változások mennek végbe a sejtek stressz okozta sérülésekor bekövetkező intenzív oxigénbehatás káros hatásainak kiküszöbölésére. Mivel ezek a változások minőségrontó tényezők kialakulásának veszélyét jelenthetik, megismerésük feltétlenül kívánatos. A megnövekedett aktivitású enzimek közül a három legjellemzőbb a peroxidáz (POX), a polifenol-oxidáz (PPO) és a lipoxigenáz (LOX). Ezeknek az enzimeknek azonban nem csak az abiotikus és biotikus stressz hatások kivédésében lehet szerepe, hanem más, az élelmiszeripari és egyéb növényi eredetű alapanyagok minőségének befolyásolásában is. A fentiek alapján érthető, hogy egyre inkább elterjedő módszer, hogy a növényi stressz vizsgálatokor, illetve a tárolt élelmiszeripari nyersanyagok vizsgálatokor egyes enzimek aktivitását mérik.

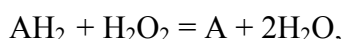
A lipoxigenázok aktivitásának vizsgálatára is van példa, bár ritkán tudatosan, a növényi stressz vizsgálatával kapcsolatban. Megállapították például, hogy fertőződéskor a búzában a peroxidázok és a lipoxigenázok aktivitása, valamint a lipid-peroxidáció mértéke jobban megemelkedett, mint a burgonyában (ABDOU et al., 1993). Az utóbbi években végzett kutatások (GRECHKIN, 1998) azt mutatták, hogy különböző növényi stresszek nem csak aktiválhatják a lipoxigenázokat, hanem képződésüket is intenzívebbé tehetik. A lipoxigenázok katalizálta folyamatokban keletkező zsírsav-hidroperoxidokból képződő vegyületek a stressz jelzésében és a válaszreakciók kiváltásában – így a membrán védelmében játszanak szerepet, sőt egyesek közülük antimikrobás hatásúak. A növényi eredetű élelmiszeripari nyersanyagokban ezeket az enzimeket – elsősorban a peroxidázt, de egyre inkább a lipoxigenázt is – az előfőzés eredményességének ellenőrzésére alkalmazzák (MUFTUGIL, 1985).

2.4.1 Peroxidázok (POX) (E.C. 1.11.1.7.)

A peroxidázok (hidrogénperoxid-oxidoreduktáz protohem csoportot tartalmazó enzimek közé tartoznak, mivel kofaktoruk vas-porfirin komplex (DUNFOLD & STILLMANN, 1976).

A peroxidázokat igen eltérő élőlénycsoportokban találták meg. Ismertek úgynevezett bakteriális kataláz-peroxidázok, élesztő citokróm-c-peroxidázok, lignin és mangán-peroxidázok. Ezek az enzimek eltérnek egymástól elsődleges szerkezetüket és szubsztrát specifitásukat tekintve, azonban sok esetben aktív centrumuk felépítése nagyon hasonló (FINZEL et al., 1984; POULOS et al., 1993; PATTERSON & POULOS, 1995; SCHULLER et al., 1996).

A gomba peroxidáz enzimek nagyon alacsony pH-án (pH=3) képesek oxidálni hidrogén-peroxid jelenlétében a veratril-alkoholt (TIEN & KIRK, 1988). Igen elterjedten vannak jelen a növényi szervezetekben. Működésük során különböző elektron donor vegyületeket oxidálnak. A peroxidázok az oxigén hatására a szövetek víztartalmából képződő és a szöveteket károsító hidrogén-peroxidot képesek elbontani (EVERSE et al., 1991). Ez a folyamat nagyon elterjedt a növényvilágban. A peroxidázok által katalizált folyamatot általánosan a következőképpen írhatjuk fel:



AH_2 többféle vegyület lehet, mint oxidálható szubsztrát (GOMBKÖTŐ & SAJGÓ, 1985; HARASZTY, 1988; SÁRKÁNY & HARASZTY, 1990; LÁNG, 2002).

Hidrogén donorok lehetnek a következők: fenolok, aminok, aszkorbinsav, citokróm-c, indolecetsav, szervesetlen ionok.

A peroxidázok elősegíthetik a hidrogén-peroxid képződését is. Ebben a folyamatban monofenolok szerepelnek, mint katalizátor. A peroxidázok számos izoenzimjét sikerült már izolálni. Az egyes izoenzimek specifikitását tekintve többé-kevésbé eltérnek egymástól.

A peroxidázok élettani szerepe folyamatosan kutatott téma. A legtöbb szerző két fontos élettani funkció köré csoportosítja azt a számos feladatot, melyet a peroxidázok végeznek a növényi sejtekben. Az egyik legfontosabb a hidrogén-peroxid elbontása. A másik az elektrondonorok fiziológiai hatással rendelkező oxidációs termékeinek előállítása (lignin szintézis, etilénbioszintézis, stb.).

A peroxidázok számtalan folyamatot katalizálnak a növényi sejtekben (WELINDER, 1992). Részt vesznek a sejtfal, a lignin képződésében, az öregedési folyamatokban, a patogének elleni védelemben, az auxin oxidációjában, a flavonoidok lebontásában. Szerepük egyértelműen bizonyított a különböző abiotikus és biotikus hatások okozta stresszben.

Előfordulásuk változatos, zöld szövetekben a kloroplasztiszokban koncentrálnak, míg nem fotoszintetizáló sejtekben, a citoplazmában és a sejtfalban fordulnak elő (LÁSZTITY, 1981; WILSON & VAN STADEN, 1990; LÁNG, 2002). A peroxidázok aktivitásának mérése általánosan elterjedt – még olyan folyamatokban is, amelyek végbemenetelében nem ez az enzim a meghatározó. Ennek oka elsősorban az, hogy a növények peroxidáz tartalma és aktivitása kiemelkedően magas és könnyen mérhető.

Dohány peroxidázok izolálását és teljes körű jellemzését is elvégezték (GAZARIAN et al., 1996). A vizsgálatok alá vetett dohány peroxidáz (36 kDa; pI: 3,5) a veratril-alkoholt oxidálja extrém körülmények között, igen széles pH (1,5-5,0) tartományban. Működését jelentősen meghatározta az alkalmazott kalcium és magnézium jelenléte. Újabb és újabb dohány POX enzimeket izoláltak és jellemezték transzgenikus dohány növényekből (GAZARIAN & LAGRIMINI, 1996).

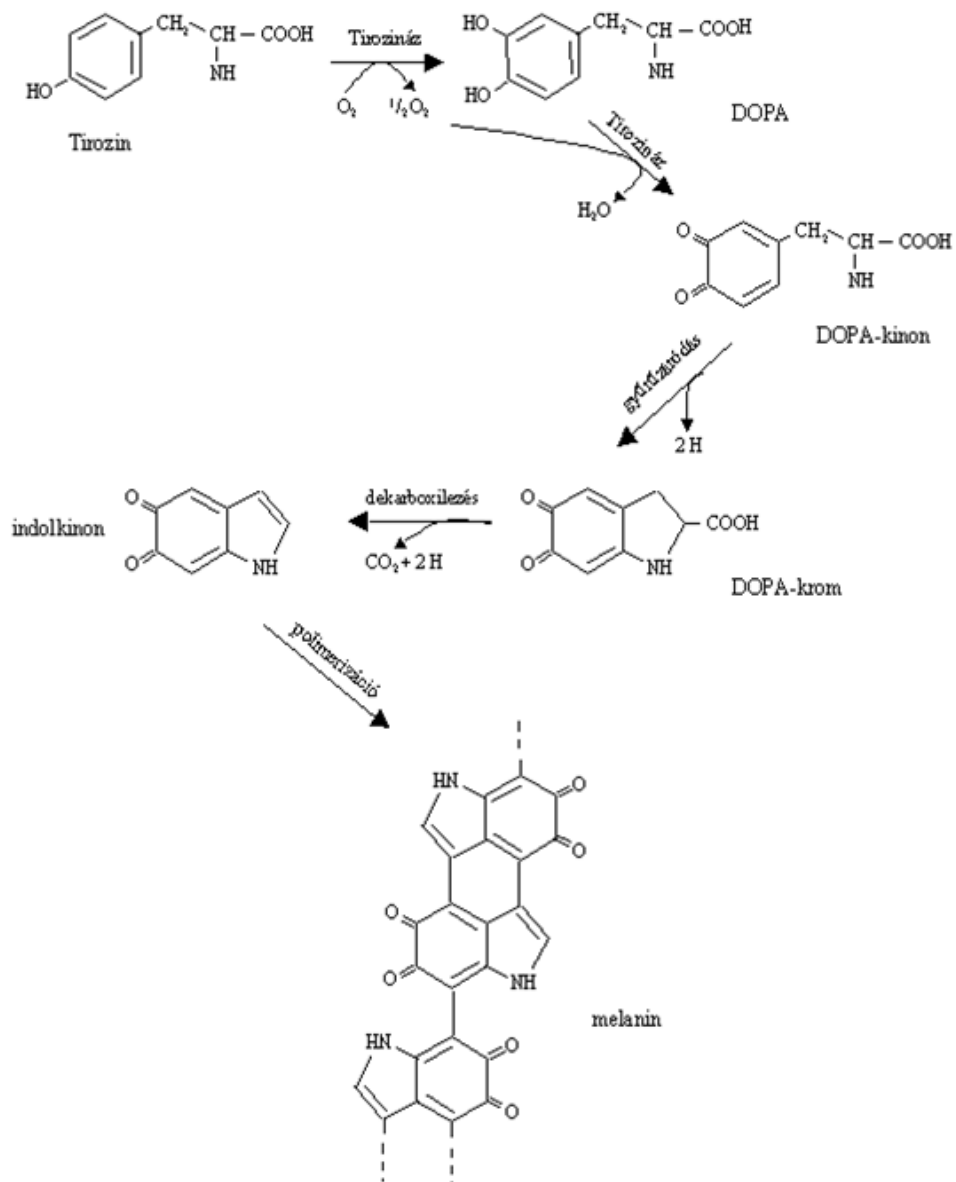
Napjainkig nagyon kevés kutató vizsgálta a fejlődő dohánynövény leveleiben a POX aktivitás változását és annak okait.

2.4.2 Polifenol-oxidázok (PPO) (E.C. 1.14.18.1.)

Az utóbbi időkben más, a növényi stressz hatás szempontjából fontos enzimek, elsősorban a polifenol-oxidázok aktivitásának tesztelése is előtérbe került (KENNEDY & FILIPPIS, 1999). Számos növényi szövetre jellemző, hogy a sejtszerkezet károsodás esetén oxigén jelenlétében megbarnul (CLAYTON, 1959). Ilyen látványos barnulási folyamatnak lehetünk szemtanúi a burgonya, alma, körte, gomba vágási felületén is. Ebben a folyamatban vesz részt a polifenol-oxidáz (o-difenol: O₂-oxidoreduktáz) réztartalmú fehérje, mely oxigén felhasználásával különböző

fenolokat oxidál. Monofenolok, difenolok reakcióit is katalizálhatja (LÁNG, 2002). Az egyik polifenol-oxidáz enzim, a tirozináz katalizálta reakció szerepe a melanin bioszintézisben (3. ábra). A polifenol-oxidáz a fotoszintetizáló szövetekben a kloroplasztiszokban lokalizált, a nem fotoszintetizáló szövetek sejtjeiben pedig peroxiszómákban. A PPO enzimek fontos szerepet töltenek be a növényi stressz-rezisztencia kialakításában. Az általuk katalizált reakciókban képződő kinonok vesznek részt a vírusok inaktiválásában (MAYER et al., 1979; CONSTABEL et al., 1995; THIPYAPONG et al., 1995; THIPYAPONG et al., 1997). Szubsztrátja lehet a DOPA (3,4-dihidroxi-fenilalanin). Monofenolok átalakítására is képes, ebben az esetben H-donor jelenlétében O₂ felhasználásával difenollá alakítja (ROBB, 1984; SHEPTOVITSKY & BRUDVIG, 1996; SANCHEZ –AMAT et al., 1997). Az enzim tisztítása többféle módszerrel megtörtént már (KADER et al., 1997; DING et al., 1998). CHUNHUA SHI (2001) és munkatársai dohány PPO I. enzimet izoláltak, melynek meghatározták pH optimumát és optimális hőmérsékleti értékét (pH: 7; T= 40 °C). A szerző szerint kiemelt jelentősége van a PPO enzimeknek a dohány feldolgozásakor, hiszen a dohány minőséget a megfelelő színparaméterekkel éri el a dohány, ebben a folyamatban pedig nagy jelentősége van azon enzimológiai változásoknak, melyek katalízisében fő szerepet kapnak a PPO enzimek. Az előbbieken említett hatásmechanizmusa teszi erre alkalmassá, miszerint képes a polifenolos vegyületeket oxidálni kinon származékokká, ezen intermediereken keresztül pedig kialakulnak a színes melanoidinek. BROOThAERST (2000) már izolált dohány PPO I. enzimet, azonban részletes bemutatását még nem végezte el. Transzgenikus dohányból izoláltak számos új PPO enzimet (BROOThAERTS et al., 2000), valamint lakkáz típusú dohány enzimet is (RICHARDSON & McDOUGALL, 1997). Korábban már izolálták és jellemezték a dohány PPO I. és II. enzimeket, melyek molekulatömegét is meghatározták (35800 Da; 35600 Da). A PPO II. enzim csak o-difenolokat képes oxidálni, para-és meta-difenolokat, valamint monofenolokat nem oxidál. A PPO enzimek hatásmechanizmusát többféle hatásnak kitéve vizsgálták. Vizsgálták sav-és lúg sokk, SDS (FLURKEY, 1986; MOORE & FLURKEY, 1990; SANCHEZ-FERRER et al., 1993), poliaminok (JIMÉNEZ et al., 1991), proteázok (GOLBECK & CARMARATA, 1981) és zsírsavak (HUTCHENSON & BUCHANAN, 1980; SÖDERHALL & SÖDERHALL, 1989) hatását is. HUI JIANG és munkatársai (2003) sodium-dodecil-szulfáttal (SDS) aktiválták a PPO II. dohány enzimet és meghatározták, valamint összevetették hőmérséklet és pH optimumát a PPO II. enzimmel. Az SDS-PPO II. enzim komplex hőoptimuma 50 °C, 10 °C-kal magasabb, mint a PPO II. enzimé volt.

A kutatók többsége elsősorban csak a dohánylevélből izolált enzimeket (PPO I, PPO II) próbálta jellemezni, a termesztés során nem. Kínai kutatók viszont a mi vizsgálatainkkal körülbelül egyidőben, a szárítás alatti PPO aktivitás változásait követték nyomon a Kínában termesztett dohányfajtákban.



3. ábra Az egyik polifenol-oxidáz enzim, a tirozináz katalizálta reakció szerepe a melanin bioszintézisben

2.4.3 Lipoxigenázok (LOX) (EC 1.13.11.12)

A dioxigenázokhoz tartozó lipoxigenázok olyan, nem-hem vasat tartalmazó enzimek, amelyek az 1(Z),4(Z)-pentadién egységeket tartalmazó politelítetlen zsírsavak oxigén felvételét katalizálják és a reakció során hidroperoxidokon keresztül optikailag tiszta (S)-hidroperoxi-zsírsavak keletkeznek. A különböző növények olyan sokféle lipoxigenázt tartalmaznak, hogy a különféle lipoxigenázokat nem izoenzimnek, hanem külön enzimesoportnak tekintik. Számos növényben, elsősorban a szójában, a babban, a burgonyában, az uborkában, a rizsben és az árpában igen sokféle lipoxigenázt detektáltak. A lipoxigenázok hatására a telítetlen C₁₈ zsírsavakból, a linolsavból és a linolénsavból 9- vagy 13-hidroperoxidok képződhetnek. Az előző folyamatot katalizáló lipoxigenázokat 9-LOX, az utóbbiakat 13-LOX lipoxigenázoknak nevezték el (FEUSSNER & WASTERNAK, 1998).

A lipoxigenázok szerkezetét, aktivitását és típusait elsősorban a szójában tanulmányozták, mert benne a lipoxigenázok aktivitása gyakran egy nagyságrenddel nagyobb, mint egyéb növényekben, és, mivel egyes lipoxigenáz izoenzimnek szerepe lehet a szójaliszt minőségének megőrzésében. Megállapították, hogy a szója lipoxigenázok szubsztrátjai C₁₈ telítetlen zsírsavak, az izoenzim pH optimumuk, szubsztrát specificitásuk, molekulatömegük, stabilitásuk és aktiválhatóságuk alapján megkülönböztethetők. A lipoxigenázok izoenzim összetételére a lipoxigenáz aktivitásának pH függése alapján lehet következtetni (SONG et al., 1990).

Az elmúlt években az Alkalmazott Kémia Tanszéken vizsgálták a különböző behatásoknak kitett növényekben és növényi szövetekben, illetve a növények csírázása során a lipoxigenázok aktivitás emelkedése hogyan oszlik meg különböző lipoxigenáz izoenzim között (KOSÁRY et al. 2005), majd az azonosított termős és porzós egyedektől származó ginkgófa levelek lipoxigenáz izoenzim összetételének vizsgálata alapján megkülönböztették az egyedeket nemük szerint, sőt kísérleteket tettek arra, hogy különböző növényfajtákat megkülönböztessék lipoxigenáz izoenzim összetételük alapján (KOSÁRY et al. 2006).

A dohány lipoxigenázokat is csak elsősorban izolált formában vizsgálták (SIEDOW, 1991), nem pedig a termesztés során. Magyar kutatók azt vizsgálták, hogy a lipoxigenáz izoenzimnek mi a szerepe egyes növények, többek között a dohánynövények ellenállóságában bizonyos betegségek, pl. dohánymozaik vírus esetében (KÜNSTLER et al., 2007).

2.5 A dohánynövény fehérje összetételének jelentősége

Bár kétségtelen, hogy számtalan alternatív fehérjeforrás létezik táplálkozás és takarmányozás céljára, de érdekesnek tűnhet a dohányfehérjék vizsgálata is ebből a szempontból. A dohánylevélfehérje és más magasabb rendű növény fehérjéi két nagy csoportba sorolhatóak. Beszélhetünk

úgynevezett oldható- és nem oldható fehérje frakcióról. A két fehérjefrakció mennyisége közel azonos. Az oldható fehérjecsoport további két részre osztható molekulatömegük szerint:

1. csoport (18 S) / FI frakció
2. csoport (4- 6 S) / FII frakció.

A vegetációs idő kezdeti szakaszában az FI és FII frakció közel azonos mennyiségben van jelen. Az érés előrehaladtával ez az arány megváltozik az FI protein frakció lebomlása következtében.

Az FI fehérje frakcióról jóval többet tudunk, mint az FII frakcióról. Annak megfelelően bővülnek az ismeretek, minél eredményesebb a szárítás technológiájának fejlesztése, valamint ahogyan a biokémia területén egyre jobban bővülnek az ismeretek. A levél proteinek hozzájárulnak a füst minőségéhez, azok prekursorai több káros füstkomponensnek, mint például a kinonoknak, hidrogén-cianidnak és számos más nitrogén tartalmú komponensnek (**GROB 1961; DONG et al. 1978; TSO, 1990**) szerint az oldható fehérje frakció meghatározó szerepet tölt be a dohány minőségének kialakításában. Továbbá arra is fény derült, hogy bizonyos aminosavak, mint mutagének okozhatnak kárt, ha azok magas, a dohány égési hőmérsékletének vannak kitéve. Ezek az aminosavak a következők: triptofán, glutaminsav, lizin. A dohánylevél fehérjének szárítás előtti eltávolítása kedvezőbb összetételű alapanyagot szolgáltat cigaretta és szivar gyártásához.

Először **WILDMANN és BOLDNER (1947)** izolálta és jellemezte az FI frakciót. Az oldható fehérjék megtalálhatóak minden olyan élő szervezetben, amelyek klorofill „a” molekulákat tartalmaznak, beleértve a prokariota kék-zöld algákat is. Az FI frakció a magasabb rendű növényekben nagy mennyiségben tartalmaz ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase-t (RuBisCo). A RuBisCo, a fenolos komponensekhez kötődve, erőteljesen lerontja ezen fehérje frakció emészthetőségét az emberi szervezetben (**PEDONE et al., 1995**).

Az FI protein molekulatömege 550,000 és nyolc nagy (LS) és nyolc kisebb (SS) alegységből épül fel, amelyek kétrétegű szerkezetbe rendeződnek, minden réteg négy nagy és négy kicsi további alegységből áll (**BAKER et al., 1975**).

A dohánylevelek fehérjéi kedvező arányban és megfelelő mennyiségben tartalmaznak esszenciális aminosavakat. **KUNG (1980)** és munkatársai kísérleteik során meghatározták a dohánylevelek oldható fehérje tartalmát a növény, különböző fejlődési fázisaiban. Vizsgálataik kiterjedtek az izolált fehérje kémiai analízisére, valamint tápértékének meghatározására is. Valójában ez a kísérletsorozat és számos más munka célja az volt, hogy bizonyítékokat kapjanak arról, valóban érdemes-e a dohány növény felhasználását táplálkozás tekintetében is kiterjeszteni. A növények leveleiben található fehérje a világ legbőségesebb fehérjeforrása, valamint ilyen módon mondhatjuk, hogy a fehérjék szintézisével közvetlenül és eredményesen hasznosul a nap energiája. Számos próbálkozás ismert a világban, sok kutató előállított levél-fehérje koncentrátumot

különböző növényi fehérjékből emberi és állati táplálkozás céljára. Felhasználásuk mégsem terjedt el, ennek számos oka van, például az, hogy színük, ízük, sőt áruk sem volt megfelelő a fogyasztók számára. **LOWE (1977)** és **WILDMAN (1979)** alapján bemutatásra került egy egyszerű, dohány FI fehérje frakció, kristályosítási módszer. Ekkor már a dohány fehérjét táplálkozási célból ajánlották. Természetesen a dohánylevelek fehérjetartalmának elkülönítése más megközelítésben is hasznos lehet. A dohányosok szempontjából óriási jelentőségű, mert ha eltávolítják a táplálkozási szempontból hasznos, de a dohány füstjének minősége szempontjából káros fehérje frakciókat, majd a fehérjementesített leveleket vetik alá a hagyományos dohány feldolgozási technológiának, akkor egy biztonságosabb, kevésbé káros molekula halmaz kerül a szárítókba, majd a fermentálókba és végül a cigarettafüstbe. Tehát összefoglalva a dohány fehérje eltávolítása, táplálkozási célra való felhasználása kettős pozitív eredménnyel járhat.

DONALD (1986) és munkatársai különböző termesztési körülmények között nevelt dohány növények fehérje tartalmának mennyiségi változásait követték nyomon a termesztés alatt. A dohánylevél fehérjének különböző frakcióit vizsgálták. Három nagyobb fehérje frakció különíthető el:

1. kloroplastisz eredetű fehérje komplex
2. fehér fehérje komplex (FI protein frakció)
3. fehér fehérje komplex (FII protein frakció)

KUNG és munkatársai (1980) üvegházban termesztett (július- október között) dohány növények leveleiben vizsgálták a fehérje frakciók változásait. Az FI frakció mennyisége a termesztés hetedik hetében kezdett csökkenni. Eközben még a levelek fejlődése folyamatban volt. Az F II frakció mennyisége ez alatt az idő alatt változatlan maradt. Természetesen az FI frakció mennyiségének csökkenése miatt az összfehérjetartalom is csökkent. Az FI frakció mintegy 40-50%-a az összfehérjetartalomnak. Az FI és FII fehérje frakció drasztikus degradációja a levelek beérése közeledtével jelentősen felgyorsult. Korábbi munkák eredményei (**DORNER et al., 1957**) is alátámasztják **KUNG** eredményeit, miszerint az FI frakció a dohánylevelek beérésével elvész. Később megjelent tanulmányok (**PETERSON et al., 1975**) is igazolták, hogy az árpa növény esetében is a növény FI frakciója a beéréssel erősen lecsökken. Az is világossá vált, hogy az extrahálható, oldható fehérje mennyiségét számos paraméter befolyásolja (növény fejlettségi foka, termesztés körülményei). A dohány növényekkel végzett kísérleti eredmények is alátámasztják ezeket a publikációkat.

2.5.1 A dohányfehérje alkalmazásának lehetőségei a takarmányozásban és a táplálkozásban

Az esszenciális aminosav összetétel a dohánylevelek fehérjeiben megegyezik a szójabab fehérjeiben találhatóéval, sőt előnyösebb a rizs, a búza és a kukorica fehérjéinek aminosav összetételénél (**BLOCK & BOLLING, 1951; BLOCK & WEIS, 1956**), azonban az nem vethető össze a tej fehérjéivel (**FAO, 1957**).

A dohánylevél FI frakció és az összes oldható fehérjéinek aminosavai közül a lizin és a metionin kevesebb, mint a kazeinben. Míg a dohánylevelek FI frakciójának és összes oldható levélfehérjének szerin és a tirozin tartalma között jelentős különbség van.

A termesztési kísérleteket számos kutató kiegészítette állat etetési kísérletekkel. A dohány leveleiben található fehérjék aminosav összetételét a kazein aminosav összetételével vetették össze (**KUNG & TSO, 1978; KUNG et al., 1980**).

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy számos magasabb rendű növény fehérjefrakcióinak táplálkozási célú felhasználásának gondolata megfordult a kutatók fejében és ennek következtében számos kísérlet sorozatot is végrehajtottak (**ACQUADRO et al., 2009**). A dohány levél-fehérje frakcióinak humán táplálkozású felhasználása azért ígéretesebb a többi növény fehérjével szemben, mert a dohány fehérjei egyszerűen és tisztán kristályosíthatók, nem tartalmaznak szénhidrátokat és lipideket, valamint egyéb szennyeződések. A dohány oldható fehérje frakciója mindössze 5-10%-ban tartalmaz nem fehérje alkotókat. A dohány fehérjék másrésről fontos prekursorai számos nem kívánatos komponensnek. Ezeknek a fehérje frakcióknak a szárítás előtt történő eltávolítása egy biztonságosabb dohányipari alapanyagot eredményezne.

Az etetési kísérletek, valamint a fehérje tápértékének meghatározása szerint a dohány FI frakció és az oldható fehérje tápértéke közel azonos a kazein tápértékével.

Egyéb növényi fehérje frakciókkal összevetve a dohánylevél FI és oldható fehérje frakcióinak aminosav összetétele hasonló. Továbbá hasonló a szójabab és lucerna fehérjével, míg a rizs, búza és kukorica fehérjéinek tápértéke elmarad a dohány fehérje tápértékéhez képest.

Hazánkban is folytak olyan irányú kutatások, melyek a dohánynövény újszerű hasznosítását tűzték ki célul (**MÓGER, 1983**). A kutatások és a megvalósított kísérletek célja egyrészt nikotin, másrészt a fehérje gazdaságos kinyerése zöld dohánynövényből. Az egyszerű takarmányfehérjéknek zöldnövényből történő előállítására különböző eljárásokat dolgoztak ki, melyek közül már néhányat bemutattam. Hazánkban az ilyen irányú kutatások 1985-1990 közötti időszakra koncentráálódtak. A kísérleti eredmények alapján a *Nicotiana rustica* fajhoz tartozó fajtákat tartották e célra leginkább alkalmasnak. A szelekciós kísérletek olyan hibrideket eredményeztek, amelyek leveleinek nikotintartalma elérte a 6-8%-ot is. A kettős cél elérése érdekében a termesztés feltételeire is oda kellett figyelni. Külön kísérletek voltak szükségesek annak érdekében, hogy kidolgozzanak egy új

termesztési technológiát. Nem csak a jó tápanyagellátás (főleg a N), hanem az öntözés biztosítása is feladatként vetődött fel.

Gazdaságossági szempontból önmagában sem a nikotin kinyerése, sem a fehérje preparátum előállítása nem gazdaságos. Azonban gazdasági szempontból is ígéretesnek látszanak olyan kombinált módszerek, amelyek segítségével a dohányfehérjék kinyerhetők a növény dohányipari felhasználása előtt vagy alatt (**KUNG et al., 1980; PLATIS & LABROU, 2006**) – akár a feldolgozás során nem hasznosuló, úgynevezett hulladék anyagokból.

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Kísérletek helye, alkalmazott műszerek és berendezések, valamint vegyszerek

A dolgozat kísérleti része a Budapesti Corvinus Egyetem, Alkalmazott Kémia Tanszékén (tanszékvezető: Dr. Fodor Péter), a Gabona- és Iparinövény Technológia Tanszékén (megbízott tanszékvezető: Dr. Somogyi László), a Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszékén (tanszékvezető: Dr. Maráz Anna), valamint a szolnoki dohányfermentáló üzemben (Continental Tobacco, Dohányfermentáló Zrt.) történt.

A vizsgált dohányok kémiai összetételének meghatározása a BRAN & LUEBBE gyártmányú AA 3 típusú folyamatos analizátorral történt (**4. ábra**). Meghatározásra került az összes cukor-, redukáló cukor-, alkaloid-, fehérje-, nitrát-, valamint a klorid-tartalom. Az eredményeim ismertetése során csak az összes- és redukáló cukortartalmi értékeket teszem közzé.

A műszer teljesen automatikus működésű rendszer, amely víz, talaj, növényi, kémiai és ipari minták analizálására képes, több mint 700 féle elemzésre alkalmas.



4. ábra Bran & Luebbe gyártmányú AA 3 típusú folyamatos autoanalizátor

A műszer a CORESTA ajánlott módszerei szerint dolgozik (CORESTA ajánlott módszerek /htPF://www.coresta.org).

A pufferek pH értékeinek meghatározását a pH209 pH Meter, Hanna Instruments műszerrel végeztem.

Méréseimet még a következő műszerek felhasználásával hajtottam végre:

- Analitikai Mérleg (Precisa 40SM-200A)
- Centrifuga, Mikro 22-R, 1015 rotor (Hettlich Zentrifugen, Tuttlingen, Németország).
- Rázógép (Ika-Vibrax-Vxr-Nr.514336, Janke & Kungel GmbH)
- Spektrofotométer [Helios Gamma egyfényutas UV/VIS spektrofotométer (9423 UVG 1002E)].
- Vízköpenyes termosztát (inkubátor szekrény)
- Világos látóterű Zeiss mikroszkóp
- Objektív és okulár mikrométer

A vizsgálataim során alkalmazott vegyszerek és oldószerek SIGMA termékek voltak

3.2 Az eredmények statisztikai értékelése

Az alkalmazott statisztikai módszerek a két dohányfajta csoportnál a következők voltak:

átlag- és szórásszámítás,

kéttényezős variancia-analízis, ismétlés nélkül.

A mikrobiológiai vizsgálataimat kivéve valamennyi bemutatott eredmény három parallel mintavételből és mintánként három parallel mérés átlagából adódott. Az eredmények szórása minden esetben $\pm 5\%$ értékhatáron belül volt. Az egyedi szórásértékeknek az ábrákon való feltüntetésétől az áttekinthetőség érdekében eltekintettem.

A kéttényezős variancia-analízis elvégzésével tisztázni kívántam azt, hogy az egyes tényezőknek, úgy, mint a dohányfajtanak és a szárpozíciónak milyen súlyú hatása van a POX, PPO, PF és vízben oldható fehérjetartalom alakulására a termesztési és a feldolgozási periódusban.

3.3 Saját termesztésű dohánynövényeim vizsgálata

Saját termesztési kísérleteimhez a köztermesztésben legnagyobb területen termesztett dohányfajtákat választottam ki. A dohánypalánták két fajtacsoporthoz tartoztak, azok Virginia és Burley típushoz tartozó fajták voltak, amelyeket a Szolnoki Fermentáló Üzemtől kaptam. A fajták az üzem kérésére nem kerülnek pontos megnevezésre, azokat sorszámokkal különböztetem meg egymástól:

Virginia fajták:

Virginia1 (V1), Virginia2 (V2), Virginia3 (V3) (2. kép).

Burley fajták:

Burley1 (B1), Burley2 (B2) (**1. kép**), Burley3 (B3), Burley4 (B4), Burley5 (B5).

Ezeket, az azonosító jelöléseket használom az eredmények közlésénél is. Választásom azért esett ezekre a fajtákra, mert Magyarországon ezek szerepelnek legnagyobb arányban a köztermesztésben.

3.3.1 Vegetációs időszak

A 2005. és 2006. termesztési években a Szolnoki Fermentáló Üzem az általuk nevelt dohány palántákból rendelkezésünkre bocsátott 50-50 darab palántát. Mivel jellemzőbbnek találtam a 2006. évi eredményeimet, ezért most csak ezekkel kapcsolatos vizsgálataimat mutatom be az elsődleges feldolgozás során, bár megjegyzem, hogy az előző évi eredményektől ezek évi eredmények nem sokban különböztek.



1. kép: Burley 2 fajta



2.kép: Virginia 3 fajta

A dohánypalánták kiültetésére, 2006. június 2-án került sor. A dohánypalántákat 15 literes műanyag konténerekben, 3:1 arányú földkeverékekben helyeztem el (balkáni tőzeg, palántaföld).

A kiültetést követően a palántákat gyakrabban, majd később a növények igénye szerint locsoltam. Az öntözésen túl folyamatos tápanyag utánpótlásra is szükség volt. Tetejezés nem történt a termesztés során.

A palánták kiültetésétől az első mintavételezésig eltelt vegetációs időt előtermesztési periódusnak nevezem és jelölöm az ábrákon. A mintavételezés akkor kezdődhetett, amikor a dohánylevelek mindhárom szárpozícióban kellő számban differenciálódtak (aljlevél, anyalevél, hegylevél). Az

előtermesztést (69 nap) követően a mintavételek időpontjai napokban: 1., 9., 13., 21., 27., 36., 44., 50. nap. A vizsgálatokhoz a növény felső (hegylevelek), középső (anyalevelek) és alsó (aljlevelek) törési övezetéből vettem a mintákat, minden esetben az egészséges és ép leveleket. A mérések megkezdése előtt homogenizáltam az egyes mintákhoz tartozó dohányleveleket.

3.3.2 Természetes szárítási periódus

A fent említett termesztett dohányfajták betakarítását a dohánylevelek technikai érettségi állapotában kezdtem meg (2006. 09. 29-én). A betakarítás folyamatosan, a dohánylevelek beérésével történt. A leveleket zsinórra fűzve helyeztem el a szárítóba. Ezért értelemszerűen az aljlevelek kerültek először a szárítóba (faszerkezetű pajta, teljes szellőzésű), majd az anyalevelek és végül a hegylevelek. Hetente (7., 14., 21., 28. napon) történt a több helyről nyert, majd homogenizált mintavétel. A szárítás utolsó hetében, mely a fermentáció kezdeti időpontjával azonosítható, kezdtem a homogenizált levélminták mikrobiológiai feltérképezését.

3.3.3 Kombinált szárítási periódus

A természetes szárítástól eltérően, zárt helyiségben, szellőzés nélkül történt a szárítás, 80-90% relatív páratartalom mellett és 20-25 °C-on.

3.3.4 Fermentációs periódus

A fermentációt a dohány ipari szempontból legértékesebb leveleivel, az anyalevelekkel végeztem. A természetes szárítási kísérlet végén külön a Virginia és Burley fajták egészséges, ép szárított anyaleveleit kiválogattam és kisméretű (saját kísérleteimen 20 literes), úgynevezett fermentációs boxba préseltem. Az üzemben fermentált adagok ennél lényegesen nagyobbak voltak, egyszerre kb. 500 kg dohánylevelet préseltek össze. Külön fermentáltam a Virginia és Burley típusú dohányleveleket. Hetente vettem mintát. A fermentáció körülményei a következők voltak: külső 20-25 °C, 85-90% relatív páratartalom. Mikrobiológiai mérésekhez a fermentáció kezdetén (szárítás végén), a fermentáció közepén (10 hét), valamint a fermentáció végén vettem mintát (18 hét). Elvégeztem a minták kémiai analízisét a fermentáció kezdetén (szárítás végén), a fermentáció közepén (10 hét), valamint a fermentáció végén. A fermentációs kísérlet alatt nyomon követtem a hőmérséklet, a relatív páratartalom, valamint a pH értékek változásait is.

3.3.5 Fermentáló üzem dohánymintái

A mérésekhez egy Burley és egy Virginia típusú dohány szárított anyaleveleit használtam fel, amelyeket a szolnoki termesztő körzetben neveltek a 2004-2005-2006 termesztési évben. A Burley dohány szárítása természetes úton, pajtában (3 hét), a Virginia dohány szárítása mesterségesen, szárító kamrában (5 nap) ellenőrzött körülmények között történt az irodalmi részben leírt módon (2.2.4).

3.4 Biokémiai módszerek

3.4.1 Mintaelőkészítés, kivonatok készítése

Minden esetben egész dohánylevél került homogenizálásra. Vizsgálataimhoz kivonatot (0,10 g ml⁻¹) készítettem, a kivonószer ionmentes víz volt, a LOX aktivitás mérése kivételével. A LOX aktivitás méréséhez az irodalomban leírt (SONG et al., 1990) kivonószer (olyan 0,05 M TRISZ-acetát puffer pH 8,20, amely 0,38 M szacharózt és 0,02 M kalcium kloridot tartalmaz) bizonyult megfelelőnek. A kivonatkészítés során a dohánylevél homogenizátumot 25:1 arányban kvarchomokkal 2 percig, majd a megfelelő mennyiségű együtt 5 percig, dörzsmozsárban dörzsöltem +4 °C hőmérsékleten, végül centrifugáltunk (6 ezer g, +4 fok, 10 perc).

3.4.2 Peroxidáz enzimaktivitás meghatározása

A kivonatok POX aktivitását irodalmi módszerrel (BJORKSTEIN, 1968) mértem, hidrogén-donorként o-dianizidint alkalmaztam. A POX aktivitásmérésének reakcióelegye a kivonaton (0,02 ml) kívül o-dianizidint (0,41 mM) és hidrogén-peroxidot (1,84 mM) tartalmazott 0,1 M nátrium-acetát pufferben (pH 5,1) (1,0 ml). A reakcióelegyek abszorbancia-változását 438 nm helyett, technikai okokból 430 nm hullámhosszon mértem. Az 1 ml reakcióelegyben, 1 perc alatt elreagáló hidrogén-peroxid molekulák számát (μmol) tekintettem a peroxidáz aktivitás egységének (U), erre o-dianizidin abszorpciós koefficiensének segítségével következtettem ($\epsilon = 7,32 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1}$). Az eredményeim bemutatásakor az ábrákon a POX aktivitást mindig U egységben adtam meg.

3.4.3 Polifenol-oxidáz enzimaktivitás meghatározása

A PPO aktivitásmérésének reakcióelegye a kivonaton (0,12 ml) kívül pirokatechint (0,014 M) tartalmazott az általában szokásos nátrium-foszfát helyett 0,1 M nátrium-acetát pufferben (pH 6,5) (1,57 ml). A reakcióelegyek abszorbancia-változását 420 nm hullámhosszon mértem. Az irodalmi gyakorlat szerint (**WATSON & FLURKEY, 1986**) az 1 ml reakcióelegyben 1 perc alatt bekövetkező 0,001 vagy 0,01 abszorbancia változást tekintik az enzim aktivitás egységének (U), közülük az utóbbit, a 0,01 abszorbancia változást tekintetem az enzim aktivitás egységének (U).

3.4.4 Lipoxigenáz enzimaktivitás meghatározása

A LOX aktivitás mérésére a dohánylevelekből a mintavételt a többiekkel azonos módon és töménységben végeztem. A kivonatok lipoxigenáz aktivitását és izoenzim összetételét, azaz az enzimaktivitás pH függését a legelterjedtebb irodalmi módszerrel (**SONG et al., 1990**), a monohidroperoxidok kettős kötésének 234 nm hullámhossznál mért abszorbancia változásának segítségével határoztam meg. A vizes linolsav szubsztrát oldat 0,008 M linolsavat, 0,25% TWEEN 20 emulgeátort és 0,01 M nátrium-hidroxidot tartalmazott 0,05 M TRISZ-acetát pufferben (pH 9,20). A lipoxigenázok aktivitásmérésének reakcióelegye linolsav szubsztrát oldatot (0,03 ml) és dohány kivonatot (0,02 ml) tartalmazott a megfelelő pufferben: 0,05 M TRISZ-acetát puffer (pH 4,5-6,1), 0,05 M kálium-foszfát puffer (pH 6,3-7,3), 0,05 M nátrium-borát puffer (pH 7,5-9,3) (1,35 ml). Az 1 ml reakcióelegyben 1 perc alatt bekövetkező egységnyi abszorbancia változást tekintetem az enzim aktivitás egységének (U). A kivonatok több napig megtartották eredeti lipoxigenáz aktivitásukat +4 °C hőmérsékleten és ez alatt az idő alatt izoenzim összetételük sem módosult.

3.4.5 Vízben oldható polifenol tartalom meghatározása

A kivonatok vízben oldható polifenol tartalmát az irodalom szerint (**SINGLETON & ROSSI, 1965**) mértük meg és galluszsav ekvivalensben (GSE) (mmol galluszsav száraz dohány g⁻¹) adtam meg. A vizes mérési elegyek (1,50 ml) Folin-Ciocalteu reagenst (0,125 ml), metanolt (0,005 ml) és 0,05 ml kivonatot tartalmaztak. Az elegyket szobahőmérsékleten egy percreg inkubáltam, majd

nátrium-karbonát vizes oldalat (0,7 M) adtam hozzá (1,0 ml), ezután 5 percig 50 °C hőmérsékleten inkubáltam, végül hűtés után fotometráltam (750 nm). A kalibrációt galluszsav oldattal végeztem.

3.4.6 Vízben oldható fehérjetartalom meghatározása

A kivonatok vízben oldható fehérjetartalmát (mg vízben oldható fehérje száraz dohány g⁻¹) Layne módszerével (LAYNE, 1957) mértem meg. A vizes mérési elegyek (2,50 ml) biuret reagenst (1,50 ml) és 0,05 ml kivonatot tartalmaztak. Az elegyeket 37 °C hőmérsékleten inkubáltam 20 percig, majd hűtés után fotometráltam (580 nm). A kalibrációt marhaszérum albumin oldattal végeztem.

3.5 Mikrobiológiai vizsgálatok

A mikrobiológiai vizsgálatok kiterjedtek mind a saját termesztésű dohányok fermentációs szakaszára, mind az üzemi kísérletekre. A mikrobiológiai vizsgálatokat az Élelmiszertudományi Kar Mikrobiológiai - és Biotechnológiai Tanszékén végeztem. Mikrobiológiai vizsgálatokhoz a mintákat egyrészt a fermentáló üzemben a **39. ábrán** jelzett technológiai fázisokban steril eszközökkel vettem, steril mintavevő edényekbe. A saját termesztésű dohányminták fermentációs periódusának kezdeti fázisában, a fermentáció közepén (10. hét), valamint a fermentáció végén (18 hét) vettem steril eszközökkel mintát.

A mikroorganizmusok mennyiségi meghatározásához hígítási, felületi szélesztéses lemezmodszert alkalmaztam.

A mikrobiológiai vizsgálatok kivitelezése minden alkalommal steril fülke alatt történt (HORVÁTH, 1980), megakadályozva ezzel a befertőződés veszélyét. Az alkalmazott tápközegek összetétele és elkészítési módja a **II. MELLÉKLETBEN** található (ALCAMO, 1996).

3.5.1 Alap szuszpenzió, „törzsoldat” készítése

A megfelelően homogenizált dohánylevél mintákból alap szuszpenziót, azaz „törzsoldatot” készítettem a mikrobiológiai vizsgálatokhoz.

A mintákból 10g dohány (leveles) bemérése után, 90 cm³ steril hígító oldat (0,1%-os peptonvíz) hozzáadásával pipettázható alap szuszpenziót, „törzsoldatot” állítottam elő. Ennek megfelelően a szuszpenzió a dohánylevél minta 10¹ hígítási fokának felel meg.

A bemérés után azzal a céllal, hogy a dohány levelein lévő talaj és raktári mikroorganizmusok bekerüljenek a pipettázható törzsoldatba, 10 percig tartó, alapos keverést végeztem

(A homogén szuszpenzió készítésére, a keverésre, valamint a bemérések pontosságára minden esetben ügyeltem, mert az itt elkövetett hibák a további hígítások révén megsokszorozódnak.)

3.5.2 Hígítási sor készítése

Az alap szuszpenzióból (törzs szuszpenzióból) a további, 10-es alapú hígítási sorozat készítéséhez 9 cm³ -ként kiadagolt 0,1%-os peptonvizet használtam fel.

Az RDE (redrying előtti), az RDU (redrying utáni), valamint az FU (fermentáció utáni), valamint a fermentációs modellkísérlet mintáinak alap szuszpenziójából egyaránt többtagú, 10-es alapú hígítási sort állítottam elő, hogy a hígítási sorból leoltást végezzek a tenyésztési élősejtszám meghatározásokhoz.

3.5.3 Mezofil aerob mikroorganizmusok élősejt számának meghatározása

A TGE tápagar, a mezofil aerob élőcsíraszám meghatározására alkalmas táptalaj. A Petri csészében megszilárdított, steril TGE tápagar lemez felületére 0,1ml mintát pipettáztam, majd alkohollal lelángolt steril szélesztő bottal szétterítettem az elkülönítendő sejteket. (A tápagar lemez megszilárdulása és a felületi nedvesség elpárologtatása, leszáritása után került sor a szélesztésre.)

A beoltott Petri-csészéket felfordított helyzetben, termosztátban inkubáltam, 30 °C- on. A mezofil aerob élőcsíraszám meghatározásánál 2-4 napos inkubáció után leszámoltam a kifejlődött telepeket.(Előírás szerint azokat a Petri-csészéket vettem figyelembe a telepszámlálásnál, ahol a telepszám 300-30 közé esett). A jellegzetes telepekből való izolátumgyűjtéskor, tiszta tenyészetek előállítására, azok tisztaságának ellenőrzésére alkalmaztam az oltókaccsal való szélesztést.

3.5.4 Mezofil aerob spórás baktériumok vizsgálata

A mezofil aerob összes élőcsíra szám meghatározásához hasonló módon végeztem a mezofil aerob spóraképző baktériumok tenyésztését. A szélesztés szintén TGE agaron történt.(A megszilárdított, steril agar lemez felületén szétkentem a hígítási fokozatonként elkülönített 0,1 cm³-oldatot). Azzal a különbséggel, hogy előtte a mintákból készített törzsoldatot 80 °C-on, 15 percen át hőkezelttem, majd hígítási sort készítve, a hígításokból és a törzsoldatból is elvégeztem a minták felületi

szélesztését. A törzsoldat 80 °C-os, 15 perces hőkezelését csak a baktériumok spórái képesek túlélni. A két napos 30 °C-os inkubáció után megtörtént a spórákból képződött telepek számlálása.

3.5.5 Penész-élesztőszám meghatározása

A penészek és az élesztőgombák telepképző egységeinek meghatározásához bengálrózsa-agar táptalajt alkalmaztam, amely klóramfenikolt tartalmazott. Az előzőekhez hasonlóan felületi szélesztéses módszerrel történt a penészek és az élesztőgombák telepképző egységeinek meghatározása. Itt is 0,1 cm³ mintát szélesztettem a szelektív RBC táptalajra. Az inkubálás szintén 30 °C-on történt négy napon át, majd ezt követte a telepszámlálás. (A telepek növekedését, számának esetleges változását 1 hét után leellenőriztem.)

3.5.6 Anaerob mikroorganizmusok mennyiségi meghatározása

Anaerob csírák tenyésztésére a MERCK által forgalmazott RCM táptalajt alkalmaztam. A törzsoldatból és a hígítási sorozat tagjaiból is 2 párhuzamos leoltást végeztem: 10 -10 ml táplevesbe 1-1ml mintát mértem, majd steril paraffinolajat rétegeztem a beoltott táplevesek felületére. Mivel a meghatározás nemcsak a mezofil összes anaerob mikroorganizmusra terjedt ki, hanem az anaerob spórás baktériumokra is, ezért a korábban leírt módon 80 °C-os (15 perc) hőkezelésnek vettem alá a törzsoldatot, majd a hőkezelés után az elkészített hígítási sor tagjaiból és a törzsoldatból is 1-1 ml mintát mértem be az RCM táplevesekbe.

A bemérés után történt 1-1ml steril paraffin olaj felrétegzése a kémcsövek tartalmának felszínére. Így tudtam biztosítani az anaerob mikroorganizmusok tenyésztésének alapvető feltételét, a tápleves levegőtől való elzárását.

Az anaerob mikroorganizmusok vizsgálatához határhígítási eljárást alkalmaztam (MPN módszer), 2 párhuzamos táplevesbe való beoltással. A tenyésztési idő után a mikrobaszaporodást mutató pozitív kémcsövek számából, Hoskins táblázat segítségével, matematikai statisztikai alapon következtettem a minták legvalószínűbb élőcsíra számára.

3.5.7 Penészgombák izolálása

A penészgombák faj szerinti meghatározásához az izolátumok tisztaságát, valamint a telepmorfológiai jellemzőket meghatározott tápközegeken, 25 °C-on tenyésztve ellenőriztem. A határozókönyvek a Czapek-Dox-agar, valamint a malátás agar használatát írják elő.

Az izolálási módszer lényege az volt, hogy a már kiöntött és megszilárdult táptalaj felületének közepére egy pontban, szűrt oltással vittem fel a vizsgálandó penészgombából inokulumot. Az inkubálás 25 °C-on történt, majd 7-14 nap elteltével elvégeztem az izolátumok makroszkópos bélyegeinek megfigyelését. (Az inkubálás során kifejlődött telepből törzsfenntartás céljára Saboraud ferde agarra is oltást végeztem.)

3.5.8 Mikroszkópos preparátumok készítése a penészgombák faj szerinti meghatározáshoz

A Czapek –Dox agaron és a Malátás agaron kifejlődött telepeket először makroszkóposan, majd sztereomikroszkóppal, 400-600-szoros nagyítással vizsgáltam. A penészgomba fajok azonosításához azonban nélkülözhetetlenek a tárgylemezes preparátumok. Félig tartós preparátumokat készítettem, laktofenol – gyapotkék alkalmazásával. A tárgylemezre cseppentett festékbe preparáló tüvel bevitettem a micélium egy darabját a szaporítószervekkel együtt. A fedőlemez óvatos ráhelyezése után a penészgombák propagulumait tartalmazó preparátumot mikroszkópos mérésre is felhasználtam. A cellux szalagos módszerrel, amikor cellux szalagot óvatosan a penész-telep felületéhez érintettem, még kevésbé törtem össze a törékeny hifa-képleteket és szaporítószerveket. Ebben az esetben is laktofenol-gyapotkék festéket használtam a cellux szalagon megtapadt hifaképletek, penészpropagulumok jobb, kontrasztosabb megfigyeléséhez.

A fajok azonosításához **THOM & RAPER (1949)**, **RAPER & FENNEL (1965)**, **FASSATIOVA (1984)** módszereit, határozókulcsait használtam, valamint **PITT (1999)** határozókönyvét alkalmaztam. Az *Aspergillus* nemzetség fajsoportjainak határozókulcsát **RAPER & FENNEL (1965)** nyomán, a *Penicillium* nemzetség fajainak határozókulcsát **RAPER & THOM (1949)** nyomán végeztem el (**UBRIZSY & VÖRÖS, 1968; RAMIREZ, 1982**).

4 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

4.1 A mintavétel fontossága

Kísérleti munkám során tudatosodott bennem, hogy nem csak a dohánynövény különböző pozíciójú leveleinek érettségi állapota, így anyagi összetétele lehet különböző (**BORSOS, 2002**), hanem egyetlen dohánylevélben sem egyenletes az összetétel. Tehát egy nem megfelelő mintavétel félrevezethető lehet. Ennek elkerülésére valamennyi dohányfajta esetében három-három, véletlenszerűen kiválasztott dohánynövény került megmintázásra. Minden egyes mintavételnél minden pozícióból két levelet dolgoztunk fel azonos módon. A vizsgált dohánylevelek teljes egészét turmixgéppel homogenizáltam. Ebből a homogenizátumból készítettem a megfelelő kivonatokat az Anyagok és módszerek című fejezetben (3.3.1.) leírtak szerint.

Mint korábban említettem a dohánylevelek pozíciójának (hegy-anya-aljlevelek) fontosságát az adatok értékelése szempontjából. Ezért a különböző mintavételi időpontokban az eredményeket a levélpozíció alapján is megkülönböztetem. Az Anyagok és módszerekben (3.2.1.) leírtak szerinti mintavételi időpontokat az alábbi megfontolások szerint választottam ki.

A palánták kiültetésétől az első mintavételezésig eltelt vegetációs időt (69 nap) előtermesztési periódusnak nevezem. A mintavételezés akkor kezdődhetett, amikor a dohánylevelek mindhárom szárpozícióban kellő számban differenciálódtak. A vegetációs időszak alatt törekedtem az egyforma mintavételezési szakaszokra, de ennek több esetben technikai akadályai voltak, ezért a szakaszok 4 és 9 nap között változtak.

A szárítási periódusban az alkalmazott módszertől függetlenül a mintavételezést hetente végeztem. A szárítóhelyiség különböző helyeiről gyűjtött, összesen négy, megfelelő pozíciójú levélből végeztem el a homogenizálást.

A fermentációs szakaszban csak az anyaleveleket vizsgáltam. A fermentációs boxba (a box úrtartalma a saját termesztésű dohány esetében 20 liter volt) bepréselt levelekből általában hetente (fermentációs célra ritkábban), speciális mintavételi eszközzel, több helyről (a saját termesztésű dohány esetében két, az üzemi minták esetében négy helyről) vettem mintákat, amelyeket homogenizáltam.

Az ábrákban és a táblázatokban előforduló valamennyi eredmény átlagérték, amelyeket a (3.3.9.9.) helyen megadottak alapján két mintavétel és a három paralelmérés értékeiből számoltam ki.

A továbbiakban a mérési eredmények ismertetésekor az adatok változását a termesztési, illetve a kezelési idő függvényében, valamennyi dohányfajtára vonatkozólag egy ábrában mutatom be a levelek szárpozíciója szerint.

4.2 Saját termesztésű dohánynövények

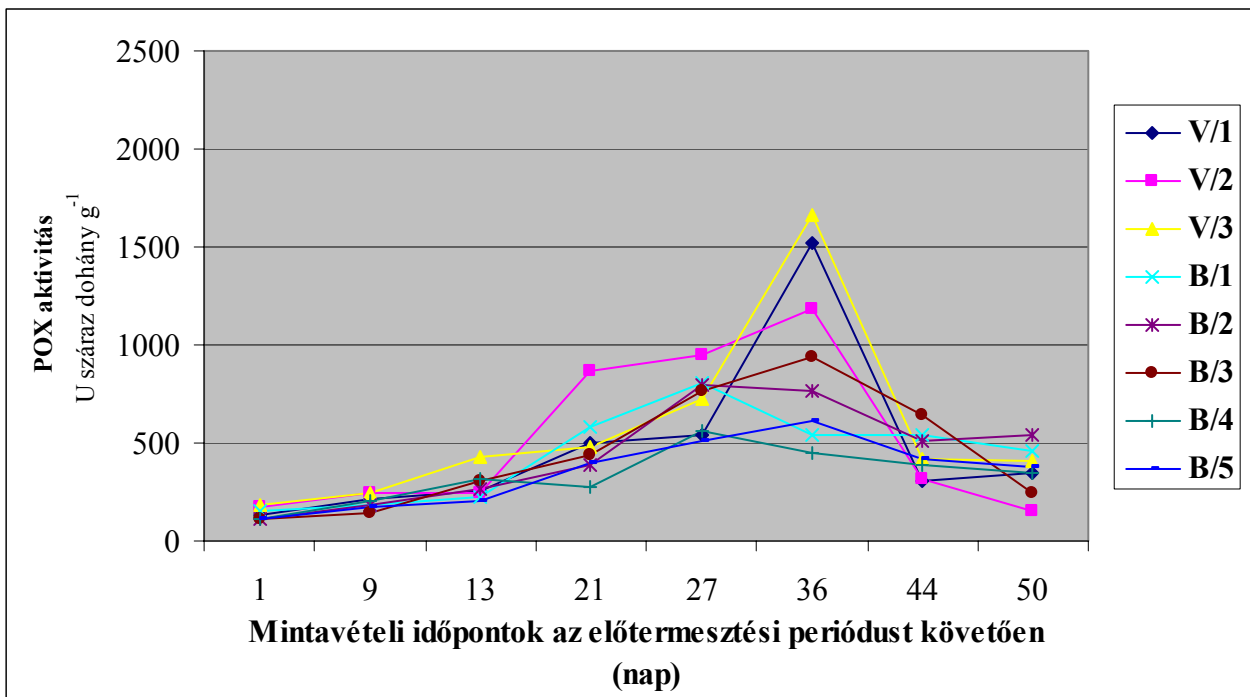
Valamennyi saját termesztésű dohányfajtámat (V/1; V/2; V/3; B/1; B/2; B/3; B/4; B/5) valamennyi szakaszban (vegetáció, szárítás és fermentációs) nyomon követtem. A dohánynövény biokémiai vizsgálataival kapcsolatos előkísérleteimet tudományos közleményben foglaltam össze (SZEDLJAK et al., 2007/a).

4.2.1 Vegetációs időszak

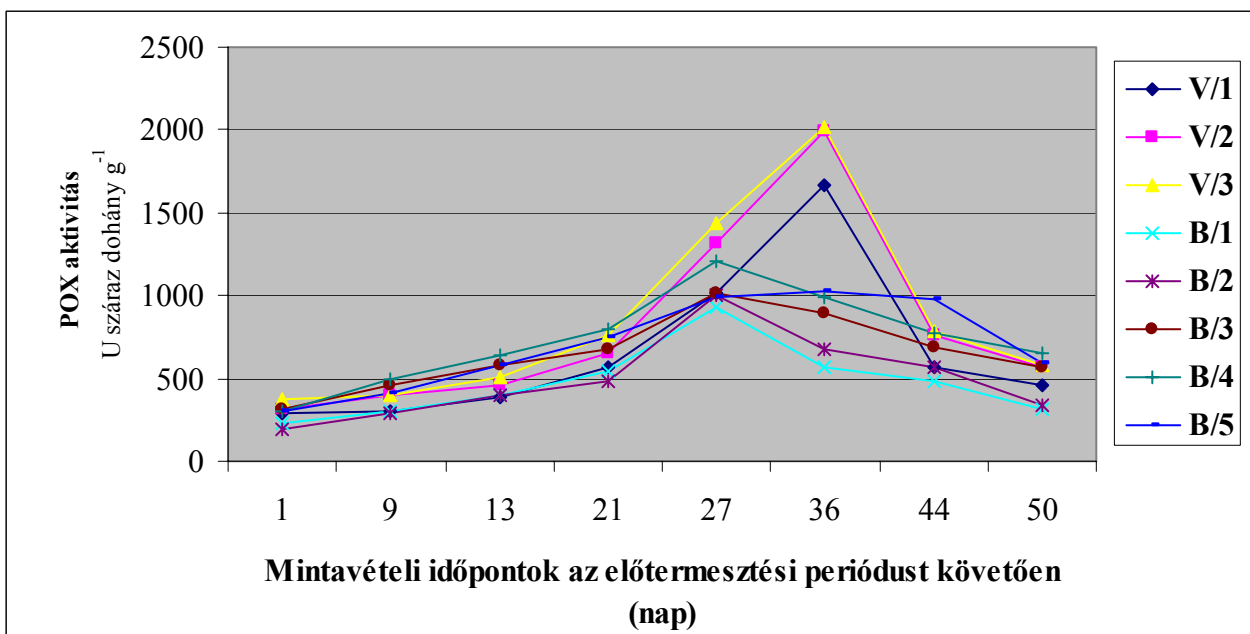
A vegetációs időszakban, dohánytermesztési gyakorlatnak megfelelően, a szárpozíciók megjelenésekor, a kihalántázástól számított 69. naptól kezdve végeztem a mintavételezéseket – a lehetőségek szerint 6.-9. napos időközönként. A vegetációs időszak alatti, az átlagos nyári körülményektől jelentősen eltérő időjárási körülményeket (radikális hőmérsékletváltozás és jelentős csapadék) regisztráltam. A vegetációs időszakkal kapcsolatos eredményeimet tudományos közleményben foglaltam össze (SZEDLJAK et al, 2007/b).

4.2.1.1 A saját termesztésű dohánylevél peroxidáz aktivitása

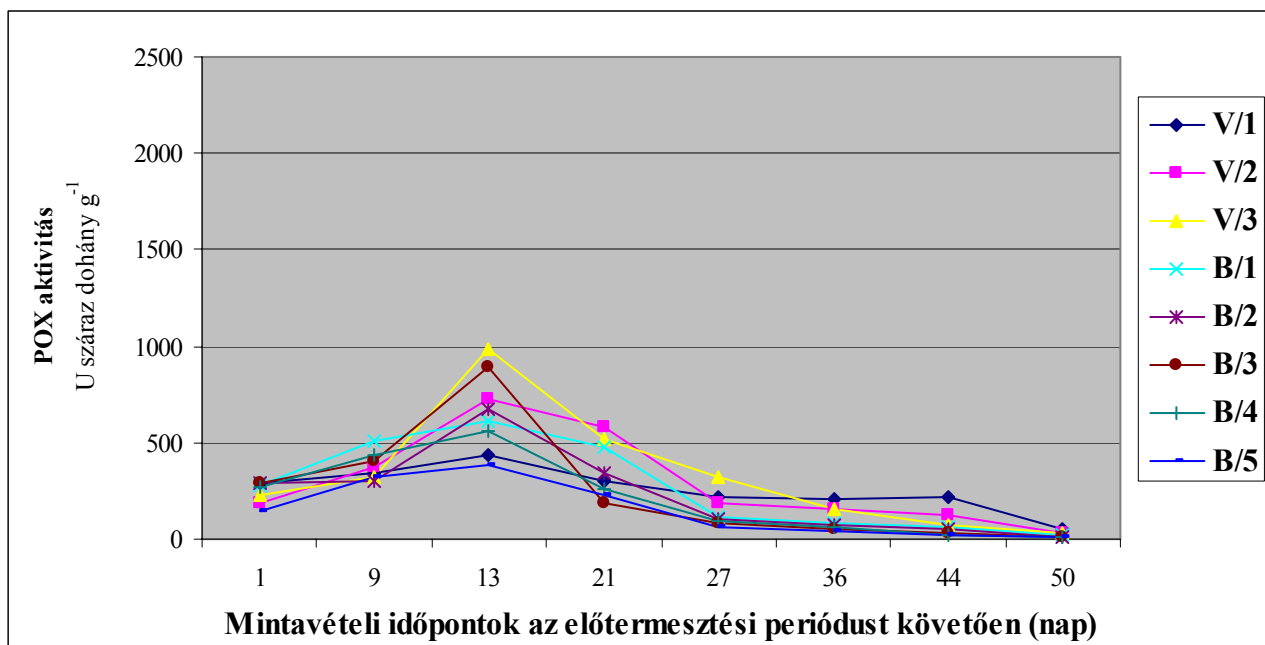
Mint már korábban említettem (2.4.1.), az irodalomban ilyen jellegű, a dohánytermesztésre vonatkozó POX aktivitási adatokkal nem találkoztam. Általános növényteni megfontolások alapján arra következtettem, hogy a POX értékek alakulása a termesztés folyamán szorosabb összefüggésben állhat a termesztés körülményeivel (hőmérséklet, csapadék), mint a termesztési idővel. A különböző pozíciójú dohánylevelek POX aktivitás változásait az **5., 6. és 7. ábra** mutatja be.



5. ábra POX aktivitás értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták hegyleveleiben, a vegetációs időszakban



6. ábra POX aktivitás értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták anyaleveleiben, a vegetációs időszakban



7. ábra POX aktivitás értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták aljleveleiben, a vegetációs időszakban

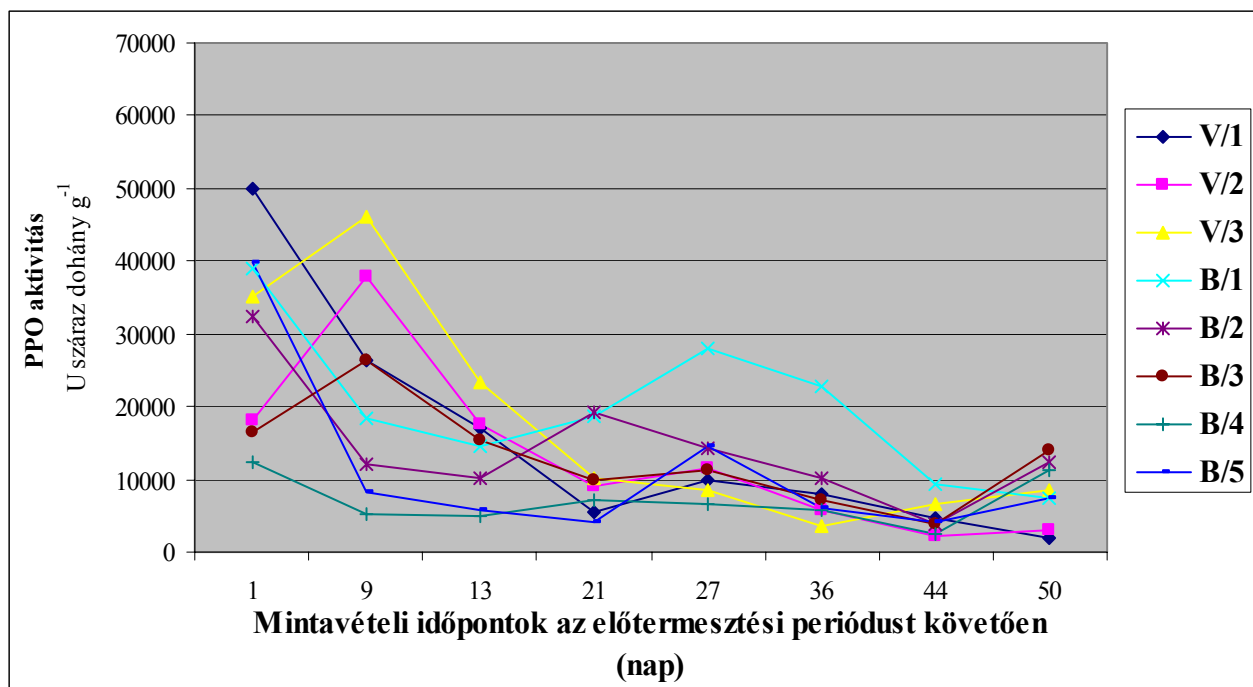
A vegetációs időszak alatt megfigyeltem az átlagos nyári hőmérsékleti és csapadékbeli viszonyokat. Az átlaghőmérsékletnél alacsonyabb hőmérsékletet az ültetés 69. napjától számított vizsgálati időszak előtti héten, valamint a vizsgálati időszak 34. és 38. napja között tapasztaltam, az átlagosnál magasabb hőmérséklet pedig 21. és 25. nap között volt. Nagyobb mennyiségű csapadék vizsgálati időszak 6-7. és 11-12. napjai között esett.

A POX aktivitás adatok alapján feltételezem, hogy a Virginia érzékenyebb a hőmérsékletváltozásra és a csapadéokra (abiotikus sokkok), mint a Burley. A melegedésre viszont a Burley valamivel jobban reagált, mint a Virginia (az anyalevelekben a POX aktivitás maximuma melegedéskor, a 27. napon volt, a Virginiában tapasztalható maximum a lehüléskor, a 36. napon). A lehülésre mindegyik Virginia fajta, a melegedésre csak a V/2 fajta reagált számottevően. A Burley fajták POX aktivitása általában alacsonyabb volt, közülük a B/3 bizonyult aránylag érzékenynek. A változások legerősebben az anyalevelekben voltak nyomon követhetők, de a hegylevelek sem voltak sokkal kevésbé érzékenyek. A legkisebb változások az aljlevelekben voltak tapasztalhatók. A különböző szárpozíciójú levelekben az alapvető POX aktivitásszint különbségek természetesen nem a stresszhatásnak, hanem annak köszönhető, hogy az aljlevelek jóval idősebbek, mint az anyalevelek, a hegylevelek pedig még ennél is fiatalabbak.

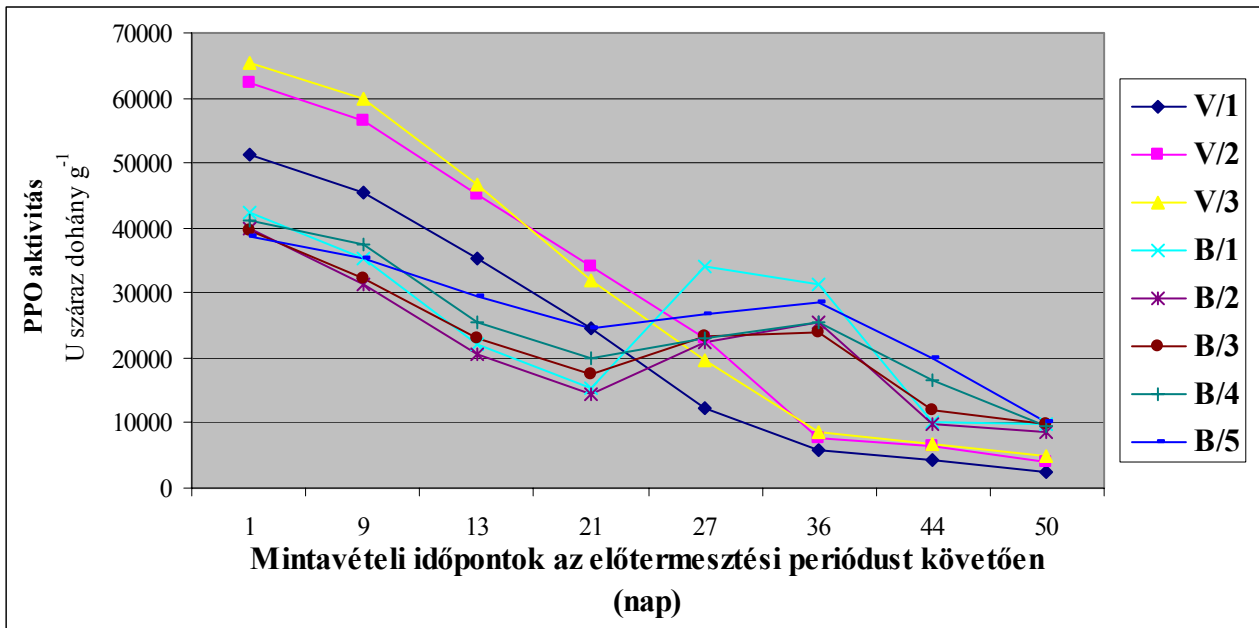
Természetesen nem zárható ki az, hogy a POX aktivitási maximumok nem csak az időjárás viszontagságaira, hanem a levelek életkorára is jellemzőek lehetnek. De ez esetben a hegylevelek és az anyalevelek között is időeltolást kellett volna tapasztalnom.

4.2.1.2 A saját termesztésű dohánylevél polifenol-oxidáz aktivitása

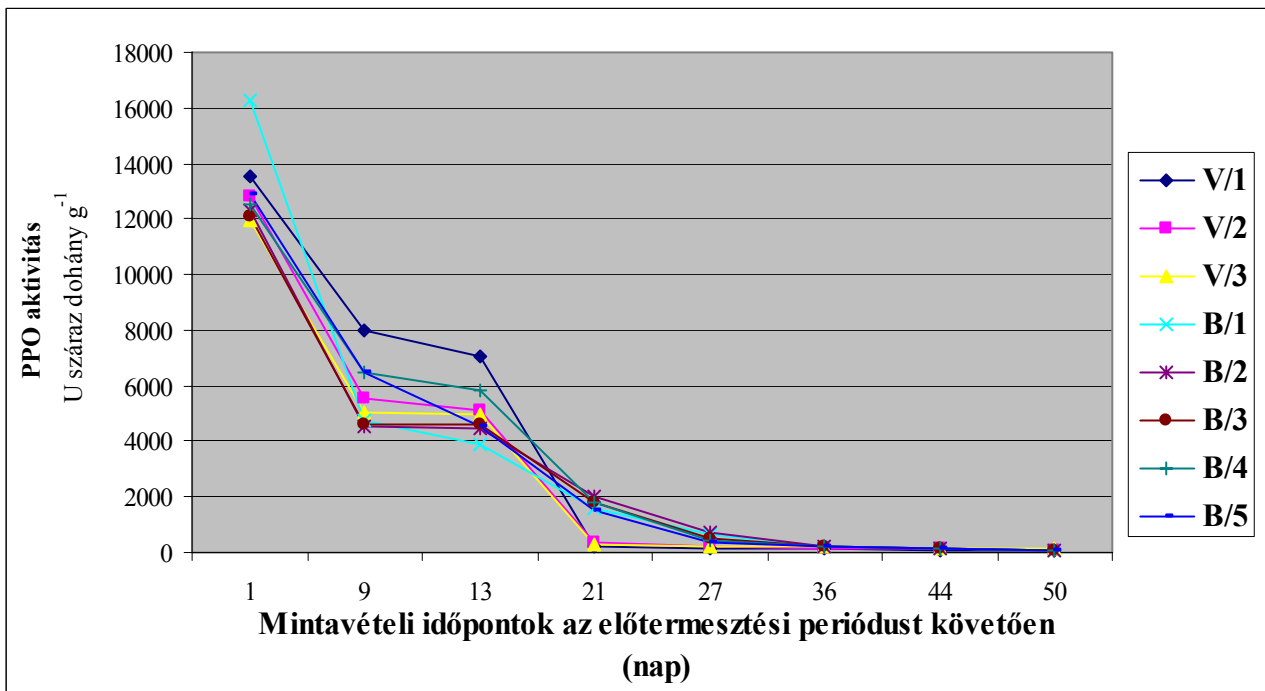
Az irodalomban a dohánytermesztésre vonatkozó PPO aktivitási adatok sem igen fordulnak elő. A PPO növénybiológiai tevékenységének figyelembevételével feltételeztem, hogy a vegetációs időszak első felében a PPO aktivitás igen magas, mivel ez idő alatt alakulnak ki azok a fenolos intermedierek, amelyekből a dohány értékes pigmentjei képződhetnek az érlelés során. Ugyanakkor nem zárhattam ki azt sem, hogy a PPO aktivitás értékek alakulására a termesztés folyamán a körülmények (hőmérséklet, csapadék) is hatással voltak. A különböző pozíciójú dohánylevelek PPO aktivitás változásait a **8., 9. és a 10. ábrák** mutatják be.



8. ábra PPO aktivitás értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták hegyleveleiben, a vegetációs időszakban



9. ábra PPO aktivitás értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták anyaleveleiben, a vegetációs időszakban



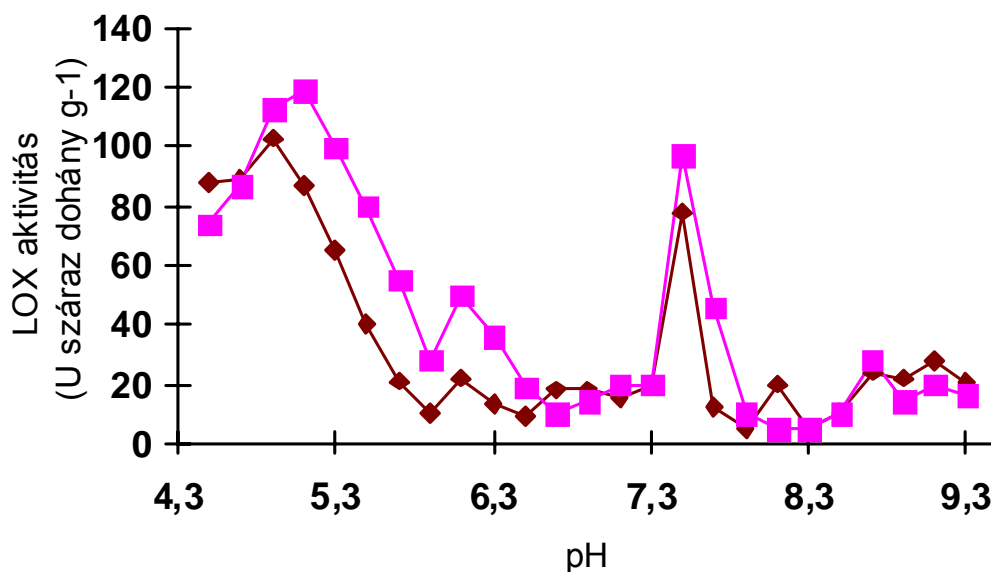
10. ábra PPO aktivitás értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták aljeveleiben, a vegetációs időszakban

A PPO aktivitás adatai az általam vártak megfelelően csökkentek a vegetációs idő előrehaladtával, a Virginia és a Burley PPO aktivitások között nem mutatkozott jelentős különbség. Még az hegylevelekhez és az anyalevelekhez képest lényegesen alacsonyabb PPO aktivitásról induló, és azoknál gyorsabban csökkenő PPO aktivitású aljevelekben is megmutatkozott a csapadék

aktivitásnövelő hatása a vizsgálati időszak 13. napján. A PPO esetében is az anyalevélben mértük a legnagyobb PPO aktivitást (különösen a Virginia fajtnál), és a csökkenő aktivitás értékekre ez esetben a hőmérséklet ingadozása volt látható hatással a Burley fajták esetében a vizsgálati időszak 27. és 36. napja között. A hegylevelek esetében is érvényesült a PPO aktivitás csökkenő tendenciája, de a vizsgálati időszak első 21 napjában az egyes típusok PPO aktivitásának alakulása meglehetősen egyéni volt. Kezdetben a polifenolok kialakulásához nagy polifenol-oxidáz aktivitás szükséges, azok továbbalakulása viszont már ilyen magas aktivitást nem igényel. Ez az oka az idősebb aljlevelek alacsonyabb kezdeti PPO aktivitásának is.

4.2.1.3 A saját termesztésű dohánylevél lipoxigenáz aktivitása

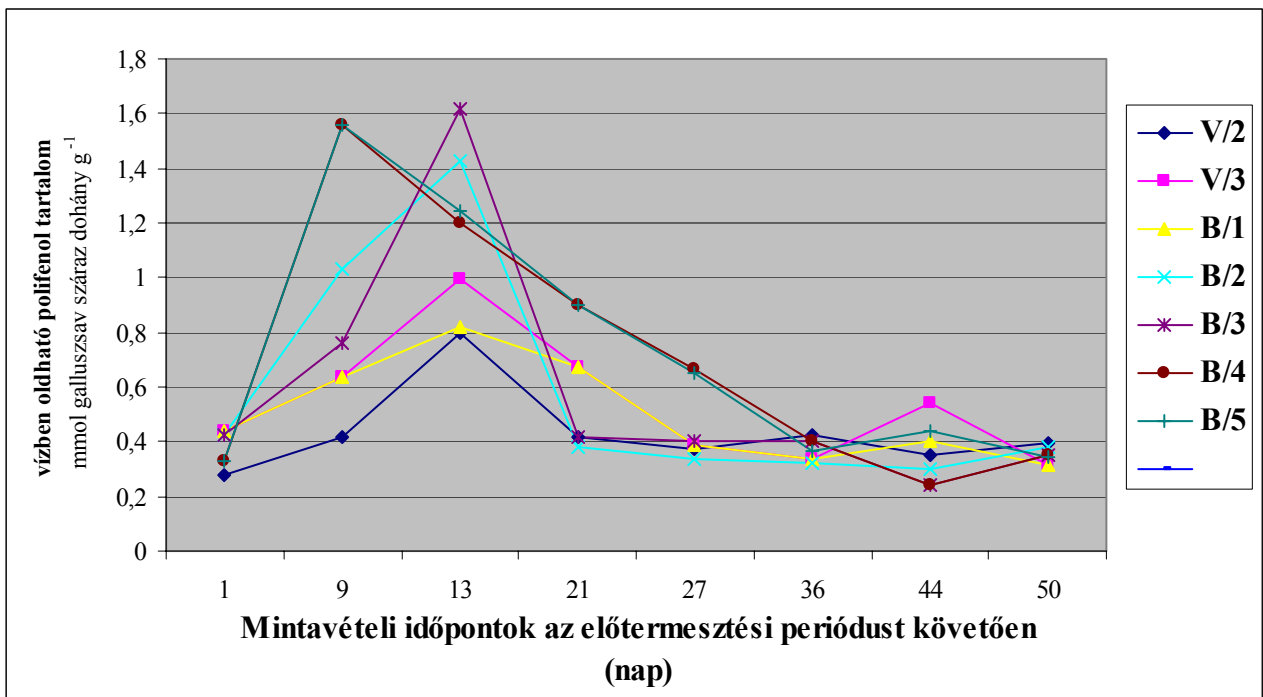
Az Alkalmazott Kémia Tanszéken korábban részletesen foglalkoztak a LOX izoenzimek aktivitásának és összetételének változásaival, valamint azzal, hogy a LOX izoenzim összetétel mennyire lehet jellemző az egyes növények különböző szerveire, illetve alkalmas-e az egyes fajták megkülönböztetésére (**KOSÁRY, 2005**). Eredetileg célul tűztem ki az különböző dohánytípusok, és azokon belül a különböző dohányfajták megkülönböztetése lehetőségeinek vizsgálatát a lipoxigenáz izoenzim összetételük alapján. A dohány az első olyan növény, amely különböző típusai LOX izoenzim eloszlásának vizsgálatai során nem találtam szignifikáns különbséget az egyes típusok között. A különböző Virginia, illetve Burley fajták, sőt a két típus leveleinek LOX aktivitása között gyakorlatilag semmi különbség nem volt, ezért csak egy szemléltető ábrán a vegetációs időszak végén, a hegylevelek értékeinek átlag aktivitásait mutatom be (**11. ábra**). Mivel a teljes vizsgálatok során a dohány LOX izoenzim eloszlásaiban számottevő különbséget nem találtam, a további vizsgálataim bemutatásától eltekintek. Ebből le kellett vonnom azt a következtetést, hogy a dohány LOX ilyen irányú vizsgálatokra nem alkalmas.



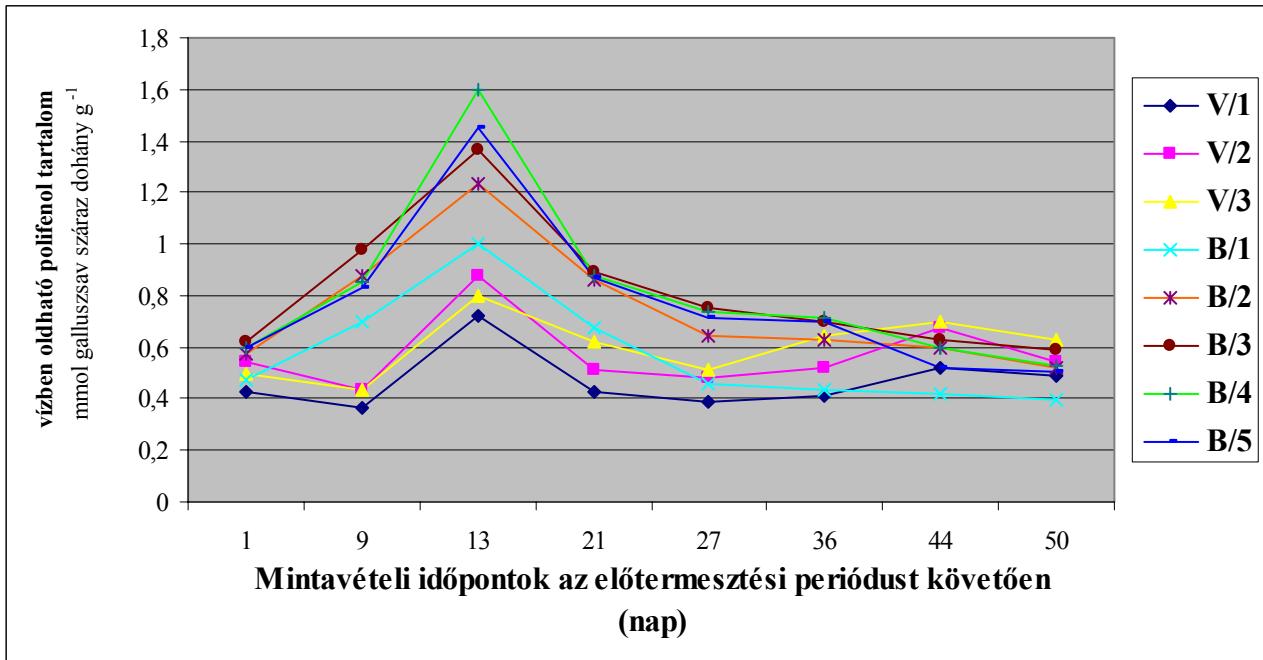
11. ábra A Virginia (◆)és a Burley (■) dohánytípusok hegylevél LOX aktivitásának (U száraz dohány g-1) alakulása a pH függvényében

4.2.1.4 A saját termesztésű dohánylevél vízben oldható polifenol tartalma

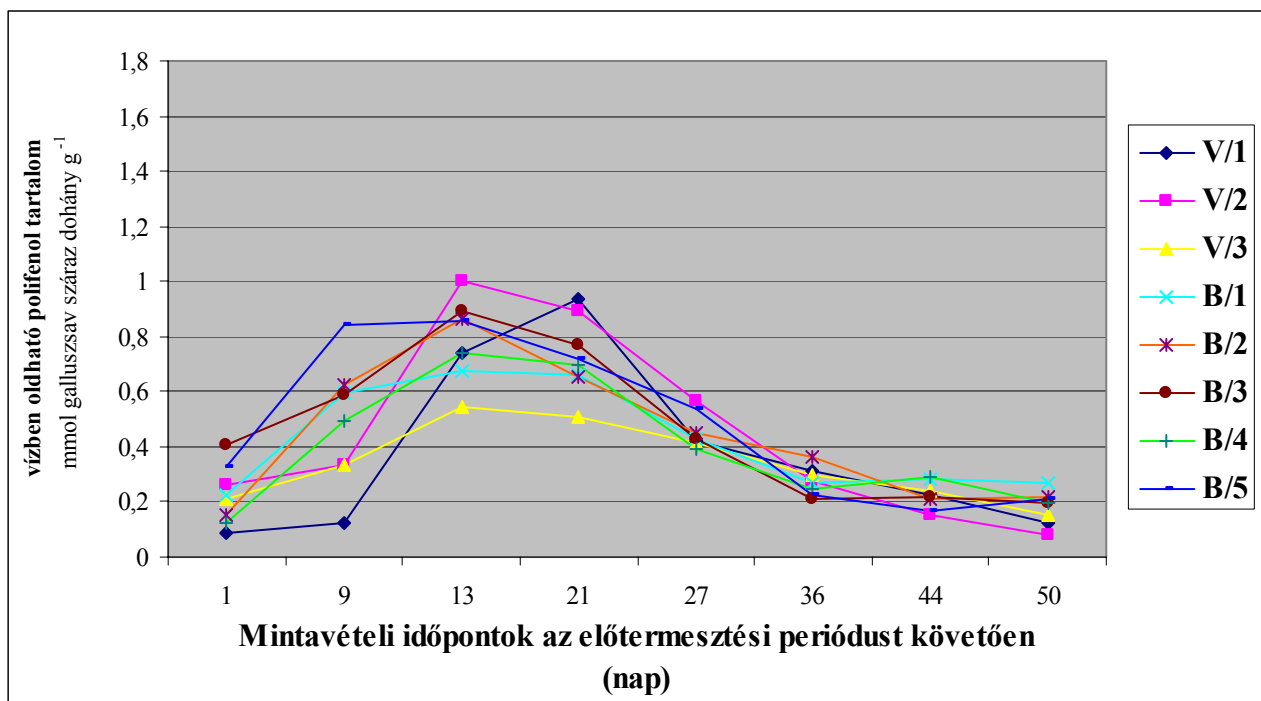
A különböző dohánylevelekben a vízben oldható polifenol (PF) tartalmat is megmértem, mivel ezek szolgálnak a dohány fontos színanyagainak kiindulási vegyületeiként. A polifenolok mennyiségének alakulását előre nehéz volt az irodalom alapján megbecsülnöm, mert ott általában az oldhatatlan polifenol tartalommal együtt adták meg a TP (total phenol) értéket. Ezt megkülönböztetően jeleztem a vízben oldható polifenol tartalmat PF rövidítéssel. A PPO szubsztrátjai fenolos hidroxilcsoportot tartalmazó vegyületek, amelyekből az oxigén hatására polifenolok, belőlük előbb kinonok, majd sötét színanyagok képződnek a dohányérlelés során. Mivel feltételezhető, hogy a polifenolok oxidatív degradációja már a növényi fejlődés előrehaladtával elkezdődik, ezért a vegetációs időszak végére a vízben oldható PF tartalom csökkenését vártam az oldhatatlan polifenol tartalom javára. Természetesen ez esetben sem zárhattam ki a termesztés körülményeinek hatását. A különböző pozíciójú dohánylevelek PF értékeinek változásait a **12.**, **13.** és **14 ábrák** mutatják be.



12. ábra **Vízben oldható polifenol tartalom értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták hegyleveleiben, a vegetációs időszakban**



13. ábra **Vízben oldható polifenol tartalom értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták anyaleveleiben, a vegetációs időszakban**



14. ábra **Vízben oldható polifenol tartalom értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták aljleveleiben, a vegetációs időszakban**

A különböző dohányfajták különböző pozíciójú leveleiben a termesztés vizsgálati időszakának első felében meglehetősen hektikusan változott, de minden esetben kirajzolódott egy maximum a vizsgálati időszak 13. és 21. napja között, ami a vízben oldható fenolok fokozott képződésével, majd továbbalakulásával magyarázható. Ennek tulajdonítható, hogy a vizsgálati időszak első és utolsó napján gyakorlatilag azonos vízben oldható PF értékeket mértem. A hegylevelekben tapasztaltam a legmagasabb értékű vízben oldható PF tartalmat. A Virginia és a Burley esetében igen hasonló értékeket kaptam.

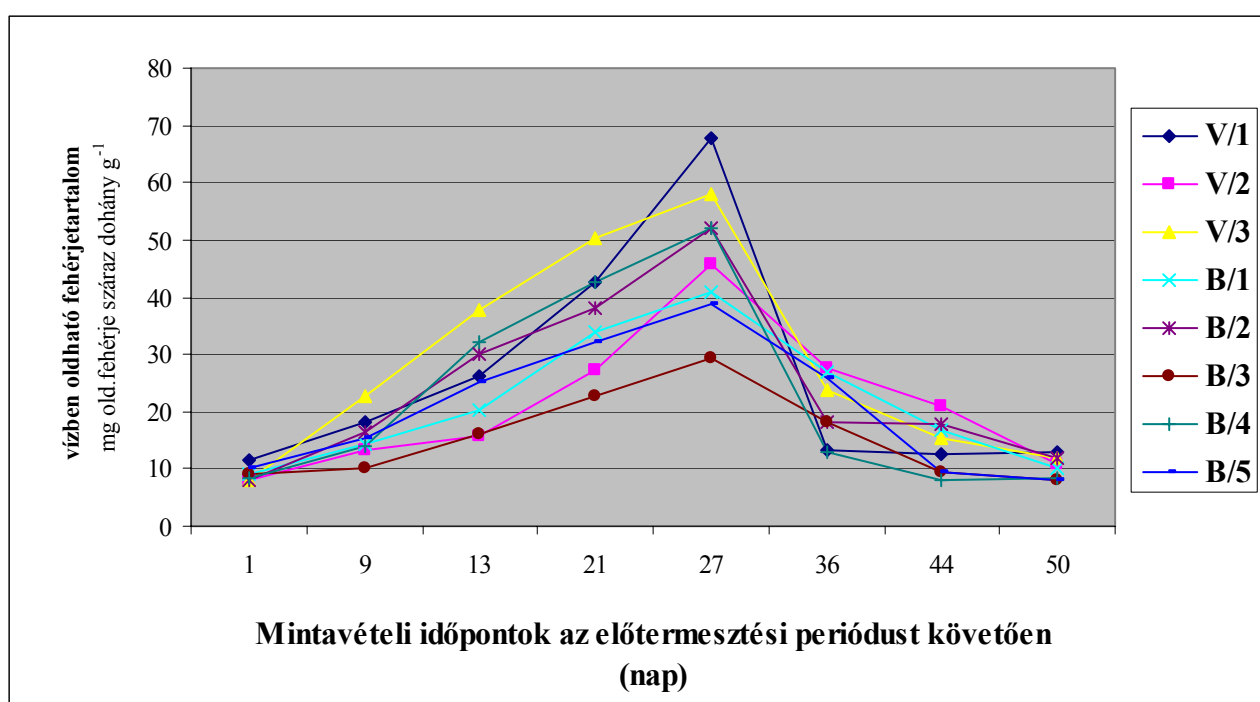
4.2.1.5 **A saját termesztésű dohánylevél vízben oldható fehérjetartalma**

A dohánylevél sokkal értékesebb biomolekula összetevőket és egyéb komponenseket tartalmaz, semhogy csak a dohányipar használja. Az irodalmi áttekintésben (2.5.) utaltam arra, hogy belőle gyógyszer alapanyagokat is izolálnak, sőt táplálkozási szempontból előnyös aminosav összetételű fehérjetartalmának felhasználhatóságát is vizsgálták. Igazából egy olyan komplex felhasználás látszik gazdaságilag is előnyösnek, hogy a fehérjekivonás után a dohánylevelet még dohányipari célokra is hasznosítsák, illetve a feldolgozás során nem hasznosuló, úgynevezett hulladék anyagokból nyerjenek ki fehérjét. A táplálkozási célra hasznosítható dohányfehérje (F1) elsősorban a fotoszintézis sötét szakaszának kulcsenzime, a RUBISCO (FELLER et al., 2008; ACQUADRO

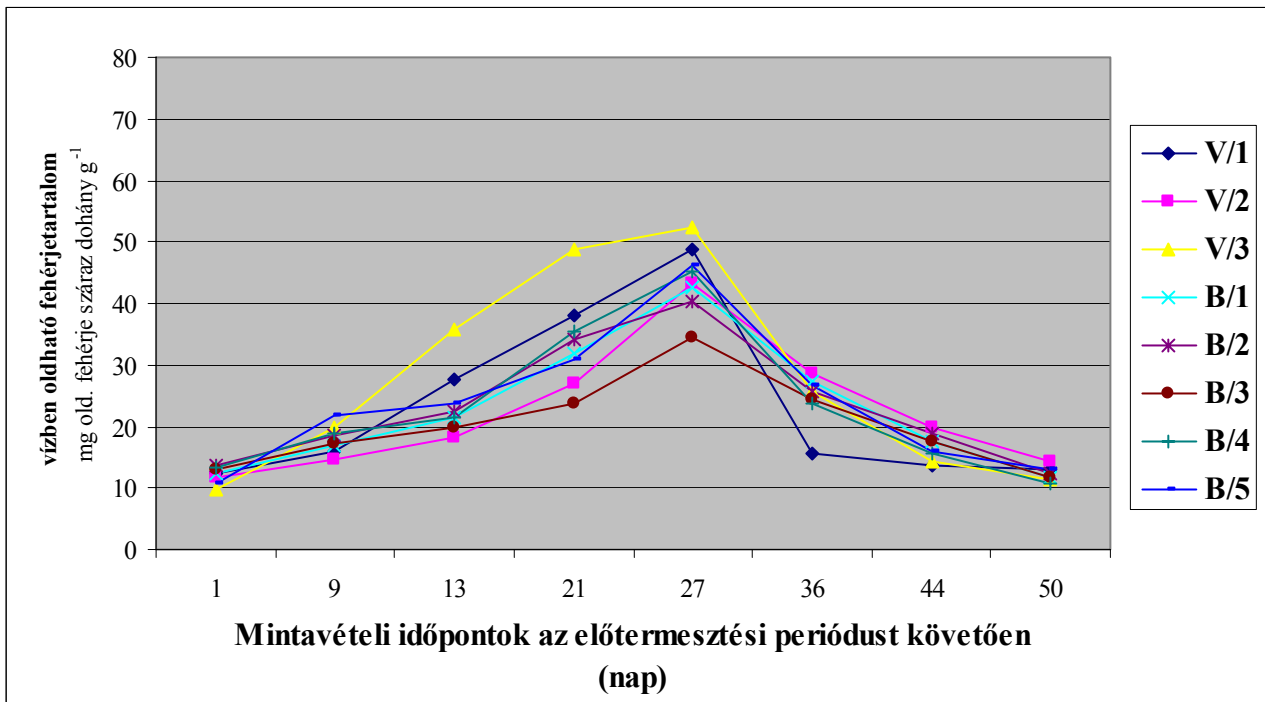
et al., 2009). Mivel a dohánynövény termesztési kísérleteimnek egyik célja éppen a fehérjehasználtság lehetőségeinek vizsgálata volt, a minták vízben oldható fehérjetartalmát is nyomon követtem.

Általában a dohányok vizsgálatánál nem fehérjetartalmat, hanem össznitrogént mérnek és abból egy szorzószám segítségével következtetnek a fehérjetartalomra (LAYTEN & NIELSEN, 2002).

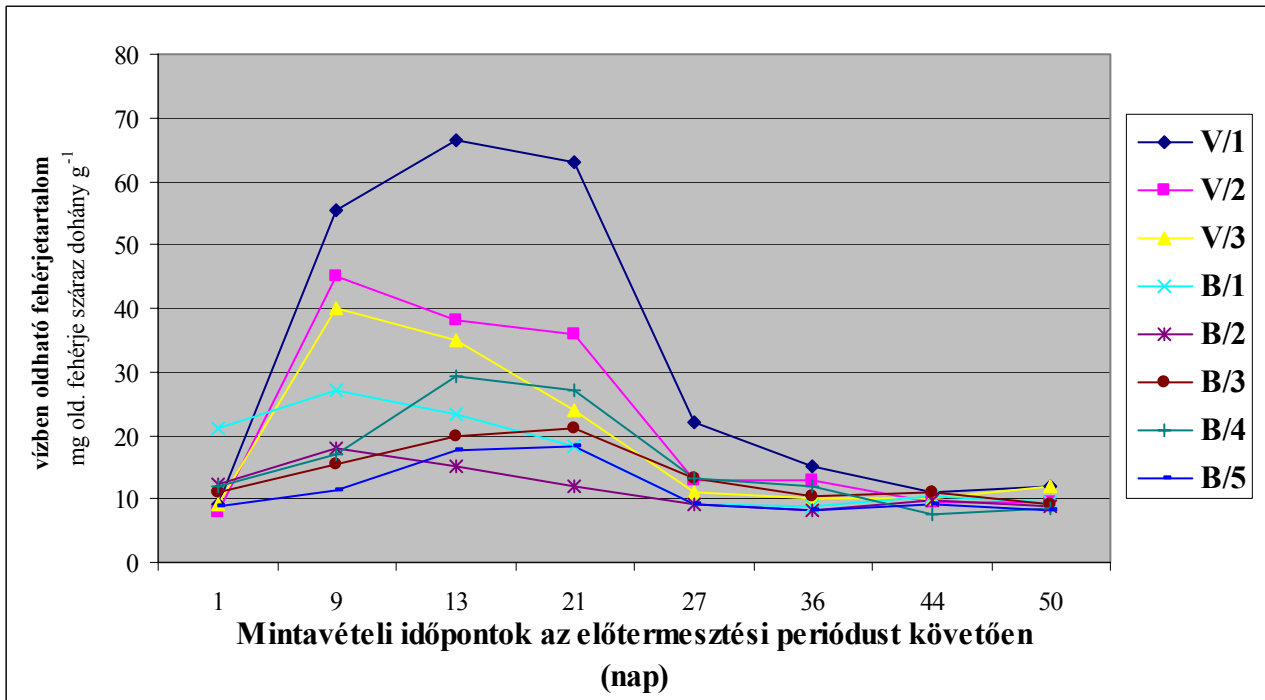
Az általános gyakorlattól eltérően a vízben oldható fehérjetartalom meghatározását választottam, mert az oldhatatlan fehérjeállománynak kisebb jelentőséget tulajdonítottam az esetleges takarmányozási és táplálkozási felhasználás szempontjából. A különböző pozíciójú dohánylevelek vízben oldható fehérjetartalom változásait a 15., 16. és 17. ábrák mutatják be.



15. ábra Vízben oldható fehérjetartalom értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták hegyleveleiben, a vegetációs időszakban



16. ábra **Vízben oldható fehérjetartalom értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták anyaleveleiben, a vegetációs időszakban**



17. ábra **Vízben oldható fehérjetartalom értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták aljleveleiben, a vegetációs időszakban**

A vízben oldható PF tartalomhoz hasonlóan a vízben oldható fehérjetartalom is maximumgörbe szerint változott valamennyi vizsgált dohányminta esetében (hegylevelek és az anyalevelek esetében a vizsgálati időszak 27. napján, illetve az aljlevelekben elhúzódva a 9.-21. napján). A Virginia fajták valamivel magasabb vízben oldható fehérjetartalom maximumot mutattak, különösen az aljlevelekben e vizsgálati időszak 13. és 21. napja között. A vegetációs időszak végére a legmagasabb fehérjetartalmat a hegylevelekben mértük, ez esetben is a Virginia fajták voltak valamivel jobbak (10-13 mg oldható fehérje száraz dohány g^{-1}), közülük is a V/1 volt a legjobb (13 mg oldható fehérje száraz dohány g^{-1}). A vegetációs időszak végén általában alacsonyabb volt a Burley fajták esetében a vízben oldható fehérjetartalom a hegylevelekben is (7-12 mg oldható fehérje száraz dohány g^{-1}). A legmagasabb értéket a B/2 fajta mutatta (12 mg oldható fehérje száraz dohány g^{-1}).

Az eredmények azt sugallják, hogy a vízben oldható fehérjetartalom szempontjából egy rövidebb vegetációs periódus (a vizsgálati időszak 22.- 29. napja) előnyösebb lenne, mint a dohányipari feldolgozásnál ideálisnak tekinthető, általam vizsgált vegetációs periódus (a vizsgálati időszak 43.- 50. napja). A dohánynövény fejlődése során bekövetkező, vízben oldható fehérjetartalom változásaival kapcsolatos eredményeimmel kiemelten foglalkozik az Acta Alimentaria folyóiratban megjelent közlemény (SZEDLJAK et al., 2010b).

Kutatásom során annak a lehetőségeit is kerestem, hogyan hasznosítható az igen gazdaságosan termesztendő dohánynövény a legfontosabb felhasználási területén, a dohányiparon kívül, illetve azzal párhuzamosan. A vízben oldható fehérjetartalom végig követésével talán sikerült némi támpontot nyújtanom egy esetleges, további kutatáshoz.

4.2.2 Szárítási periódus

A magyar dohányipar gyakorlata szerint a Burley dohány szárítása természetes úton, zsinórra fűzve, jó szellőzésű pajtában (3 hét), a Virginia dohány szárítása mesterségesen, szárító kamrában (5 nap, **2. ábra**) ellenőrzött körülmények (hőkezelés, légbefúvatás, stb.) között történik. A Virginia dohány igen költséges mesterséges szárítását az aránylag magas cukortartalom megóvása miatt tartották szükségesnek (BORSOS, 2002).

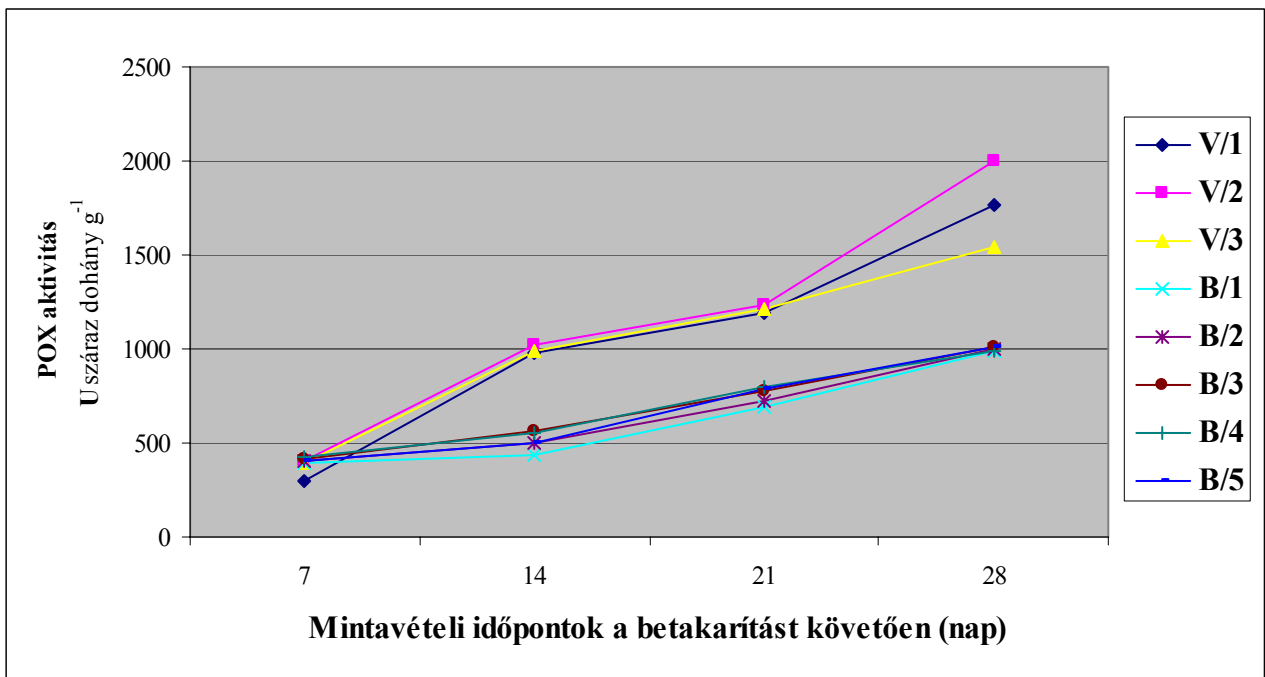
4.2.2.1 A saját termesztésű dohánynövény szárítása

Saját szárítási kísérleteimben célul tűztem ki a Virginia dohányszárítást olcsóbb szárítási körülményeinek kidolgozását. Első közelítésben mind a Virginia, mind a Burley fajtákra a

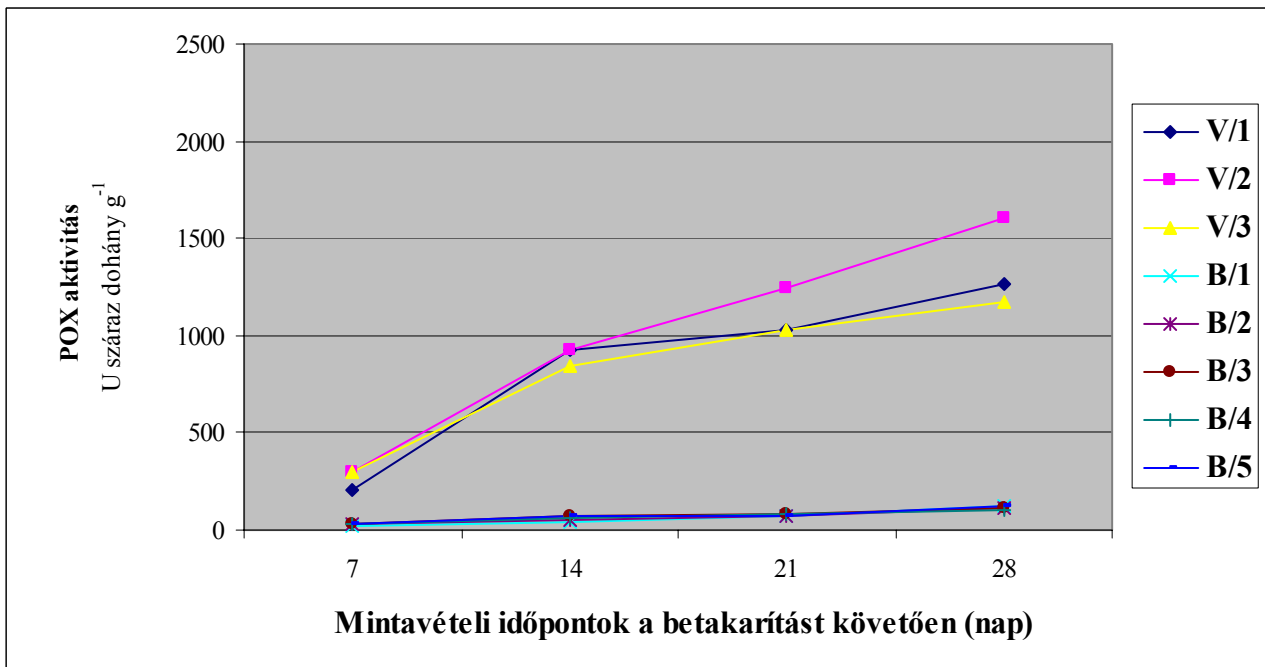
természetes és mesterséges szárítási körülmények kombinálását választottam: A szárítást felfűzött állapotban, de zárt, szabályozott paraméterű helyiségben (20–25 °C és 85–90% relatív páratartalom) és légbevezetés nélkül végeztem. A saját termesztésű dohánynövény kombinált szárításával kapcsolatos eredményeimet két tudományos közleményben foglaltam össze (**SZEDLJAK et al, 2010a; SZEDLJAK et al, 2010b**). A különböző Virginia, illetve Burley fajták eredményei között csak jelentéktelen eltéréseket tapasztaltam.

4.2.2.2 A kombinált szárítási módszer biokémiai értékelése

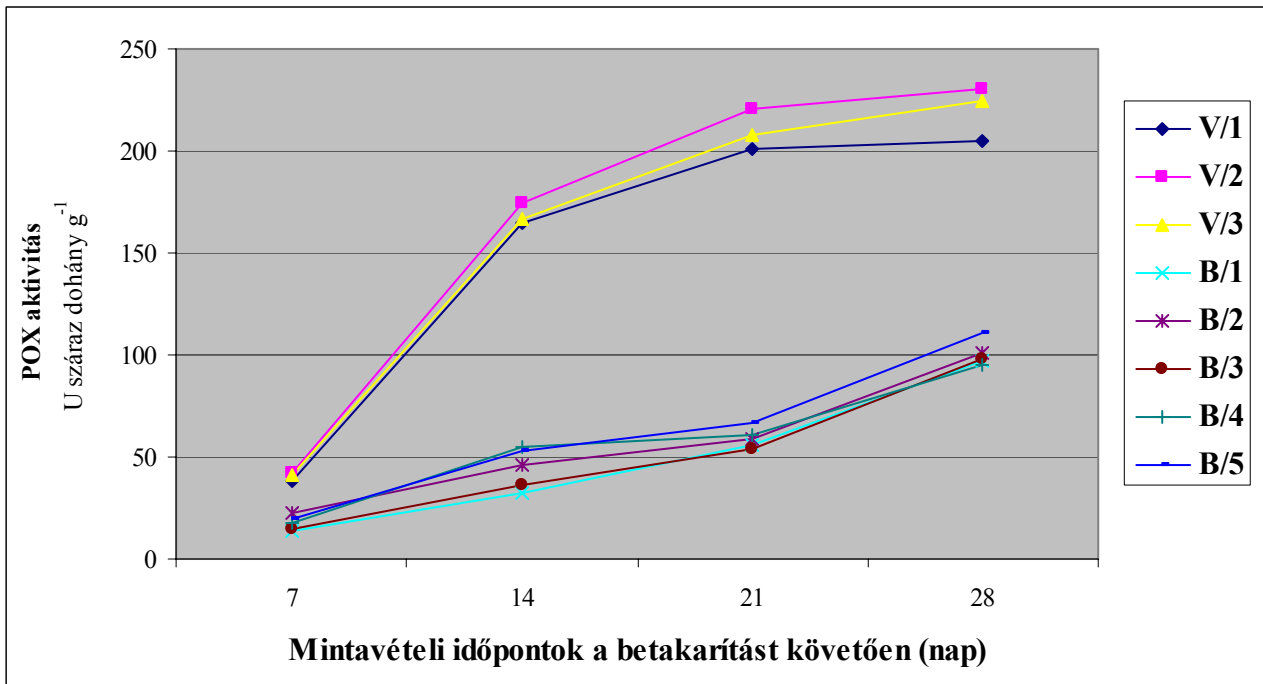
A kombinált szárítás során a vizsgált dohányfajtáknál a POX aktivitása folyamatosan és jelentősen nőtt. A Virginia fajtákban, a hegylevelekben és az anyalevelekben (300→1600-1800 $\mu\text{mol perc}^{-1}$ száraz dohányg⁻¹) a Burley fajtákban, a hegylevelekben ehhez képest a POX aktivitás növekedése kisebb volt (300→1000 $\mu\text{mol perc}^{-1}$ száraz dohányg⁻¹), az anyalevelekben és az aljlevelekben a POX aktivitás növekedése ellenére is elhanyagolhatóan alacsony volt (**18., 19. és 20. ábra**). A dohánylevelek POX aktivitásának változása a kombinált szárítás során valószínűleg elsősorban a szárítás okozta stressz állapotnak tulajdonítható, ahogy annak volt tulajdonítható a vegetációs időszakban is a hőmérséklet ingadozására és a hirtelen csapadéokra (4?). Nem kizárt, hogy a Virginia erősebb stressz válasza a termesztési körülményekre általában tapasztalható fokozott érzékenységgel (**BORSOS, 2002**) indokolható.



18. ábra POX aktivitás értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták hegylevelében a kombinált szárítási periódusban

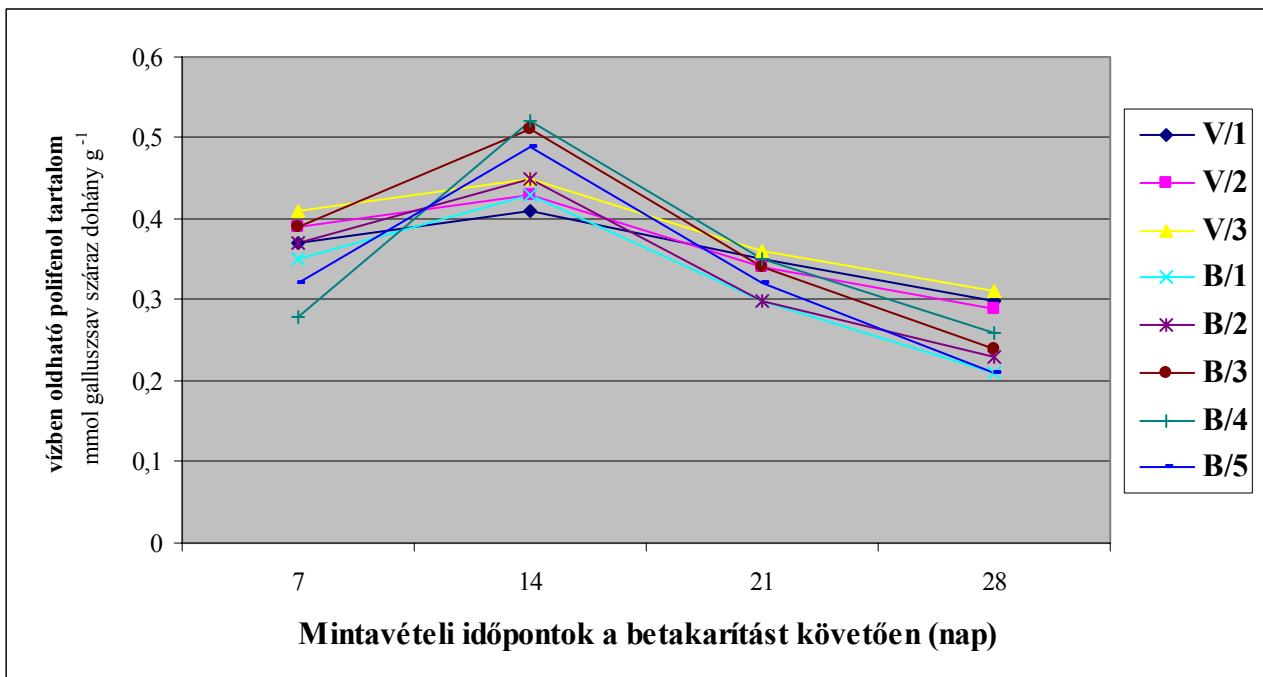


19. ábra POX aktivitás értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták anyaleveleiben a kombinált szárítási periódus alatt

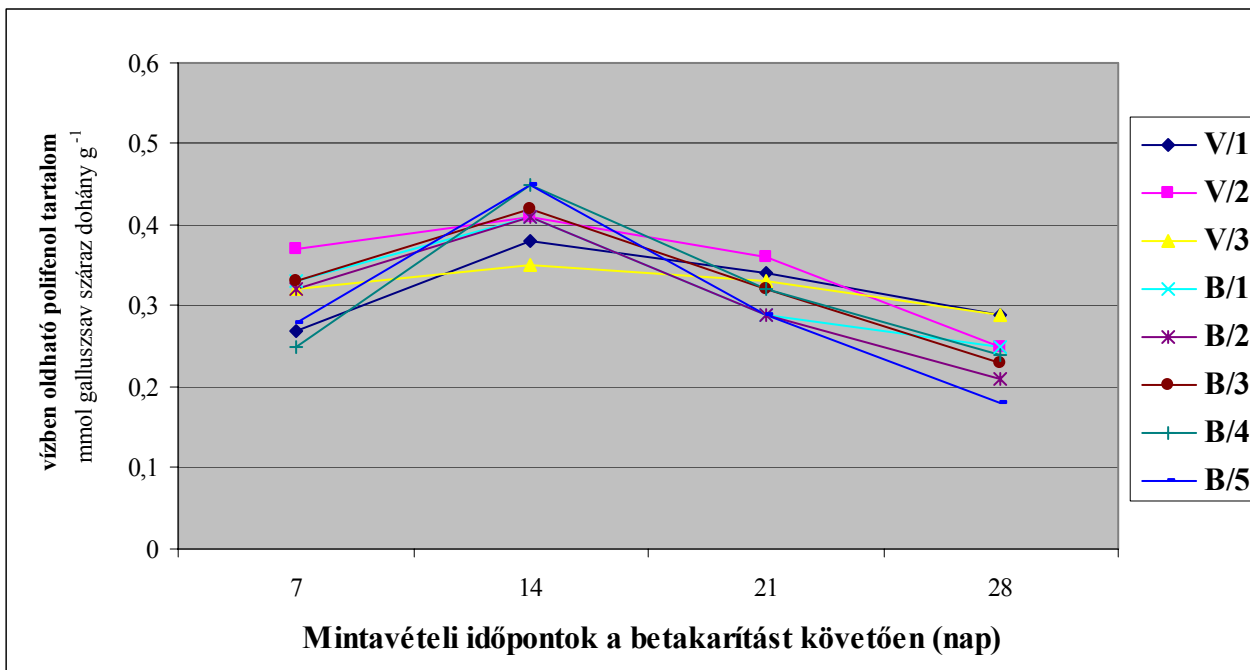


20. ábra POX aktivitás értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták aljeveleiben a kombinált szárítási periódus alatt

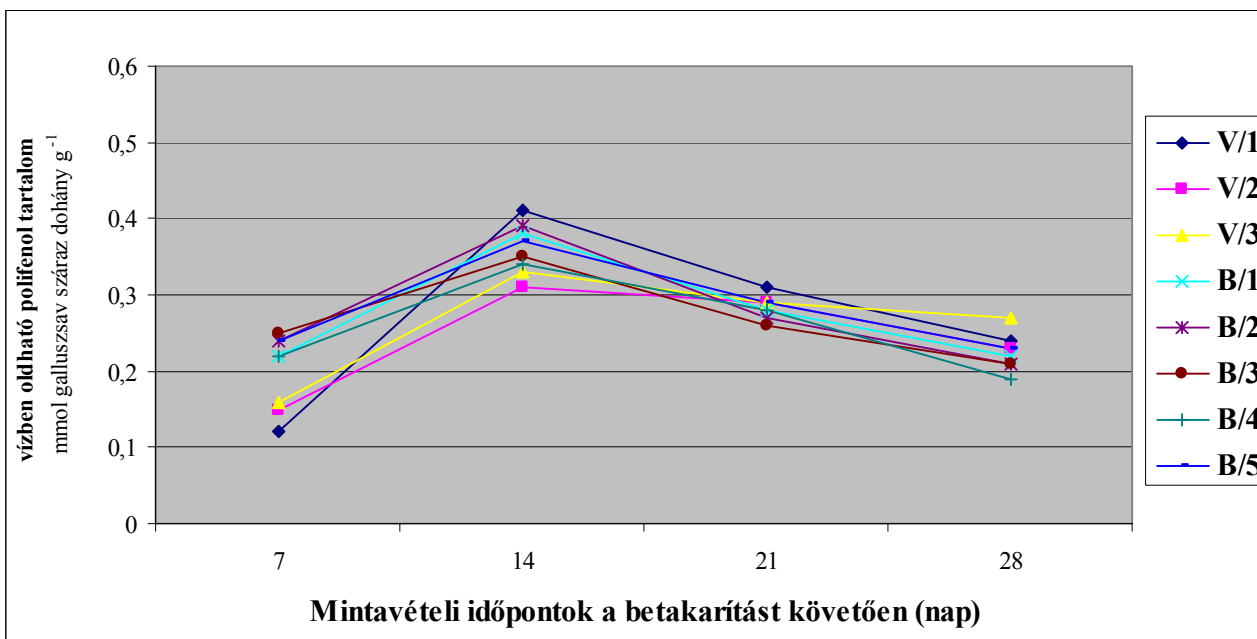
A további biokémiai mérések eredményei azt mutatták, hogy a kombinált szárítási periódus a biokémiai hidrolízisek és az azt követő különböző oxidációs folyamatok kombinációja. A vízben oldható polifenol tartalomban bekövetkező kezdeti enyhe emelkedés (például 0,37→0,41 GSE a Virginia és 0,35→0,43 GSE a Burley típusok hegylevelei esetében, **21. ábra**) azt mutatja, hogy a vízben oldhatatlan fenolos régió egy része enzimes hidrolízis útján a vízben oldható fenolokká alakul. A szárítás 14. napja után a vízben oldható polifenolok koncentrációjában bekövetkező csökkenés (például 0,30 GSE a Virginia és 0,21 GSE a Burley típusok hegylevelei esetében) a fenolokból kiinduló, oxidatív enzimes barnulási folyamatok beindulására utal (**21., 22. és 23. ábra**).



21. ábra Vízben oldható polifenol tartalom értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták hegyleveleiben a kombinált szárítási periódus alatt



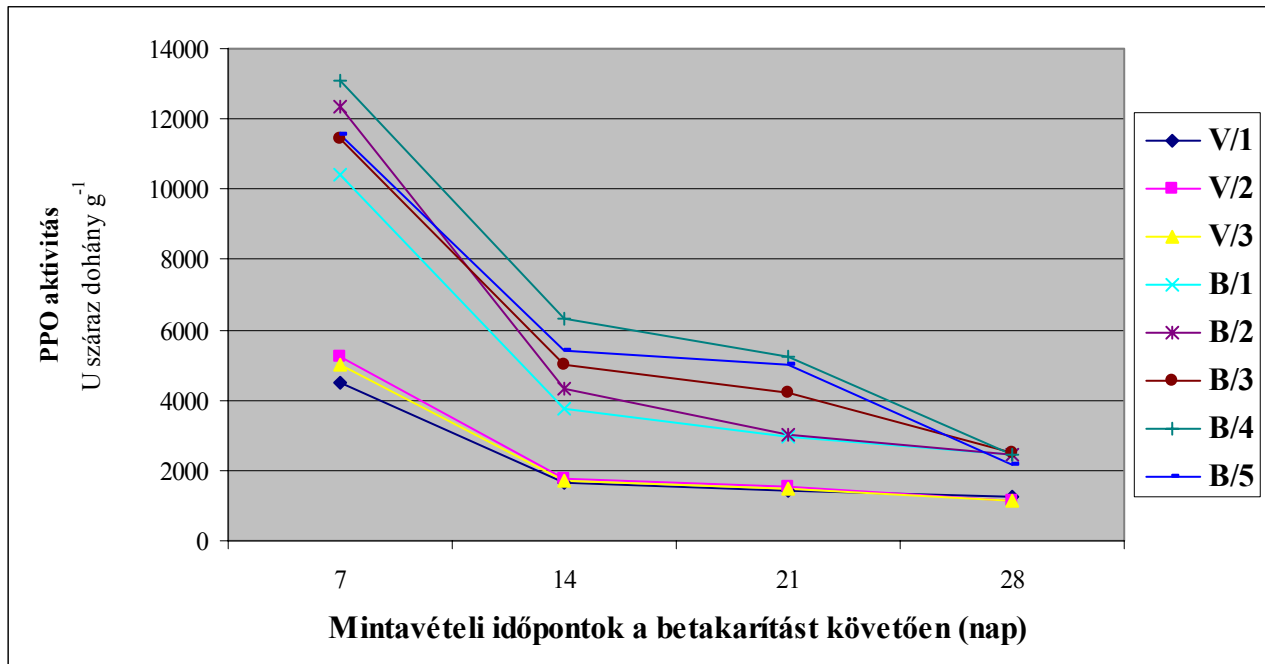
22. ábra **Vízben oldható polifenol tartalom értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták anyaleveleiben a kombinált szárítási periódus alatt**



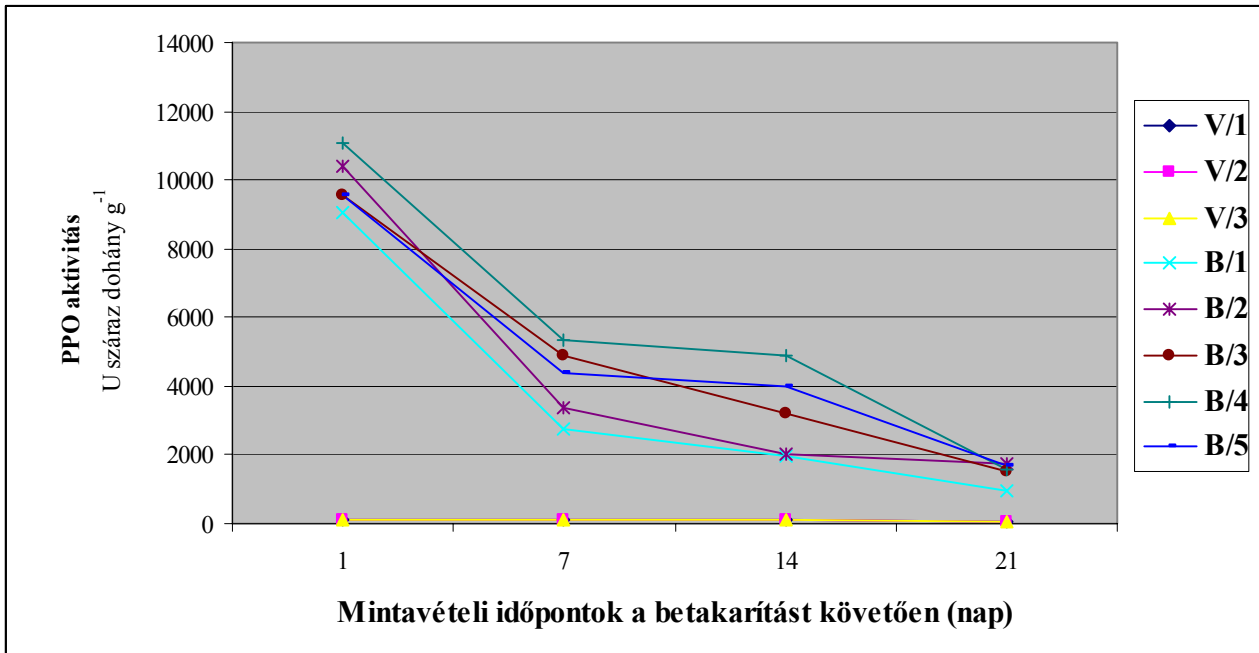
23. ábra **Vízben oldható polifenol tartalom értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták aljleveleiben a kombinált szárítási periódusban**

Mivel a kombinált szárítási folyamatok során a csökkenő PPO aktivitás (24., 25. és 26. ábra) (például 4470→1231 U száraz dohány g⁻¹ a Virginia és 10436→2475 U száraz dohány g⁻¹ a Burley

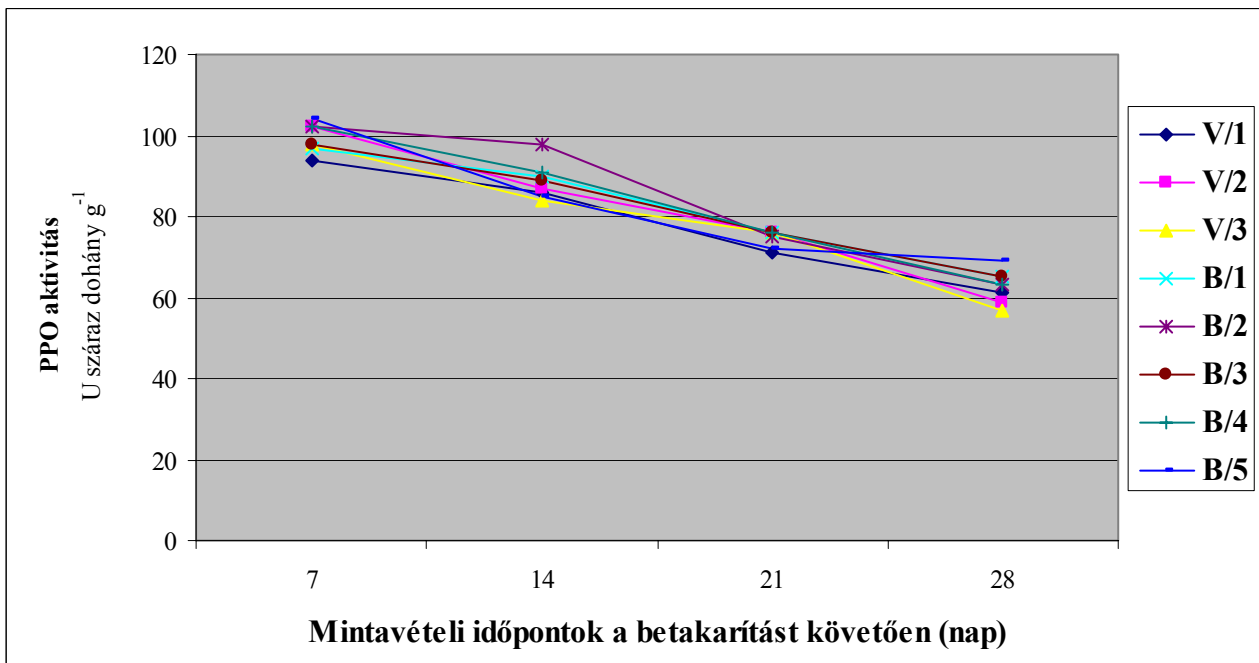
típusok hegylevelei esetében) és a vízben oldható polifenol tartalom nagyságának változása között nem találtam korrelációt. Feltételezem, hogy ebben a periódusban a fenolos vegyületek kialakulásában nem csak a PPO, hanem direkt oxidációs folyamatok is részt vesznek. A vizsgálatok ebben a szakaszában feltételeztem, hogy a Burley típusok szignifikánsan magasabb PPO aktivitásának tulajdonítható, hogy a későbbi fermentációs periódusban a Burley dohány sokkal sötétebb színű lesz, mint a Virginia.



24. ábra PPO aktivitás értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták hegyleveleiben a kombinált szárítási periódus alatt

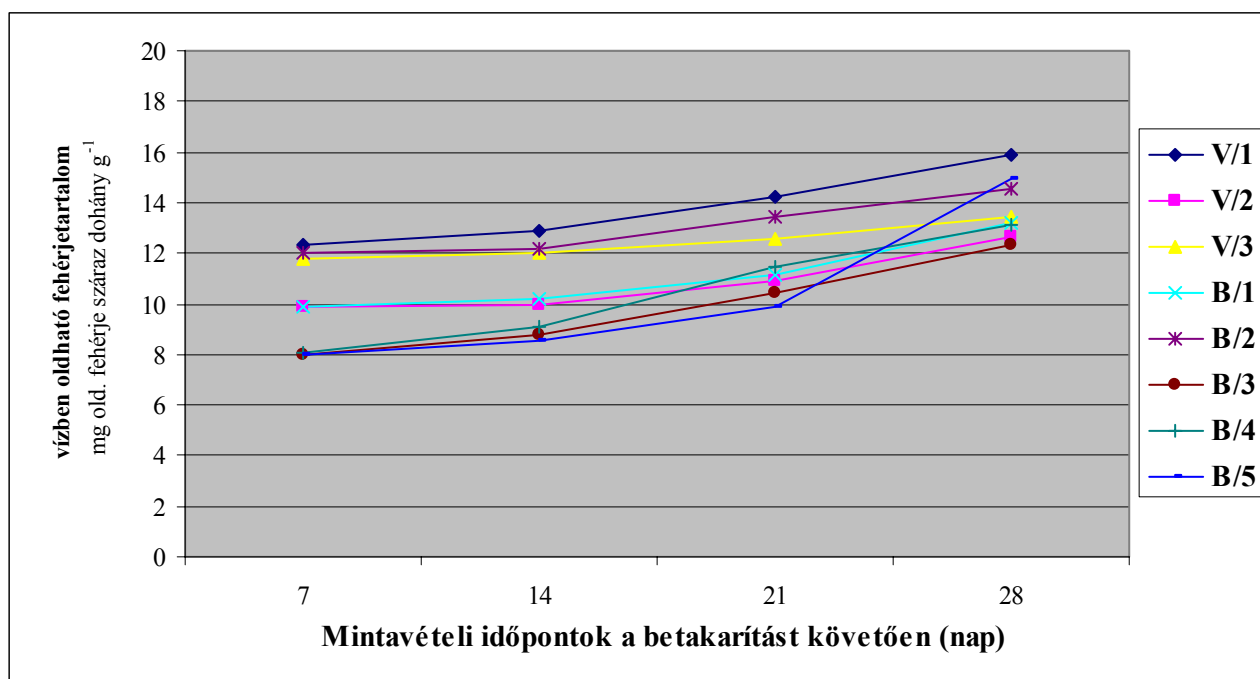


25. ábra PPO aktivitás értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták anyaleveleiben a kombinált szárítási periódus alatt

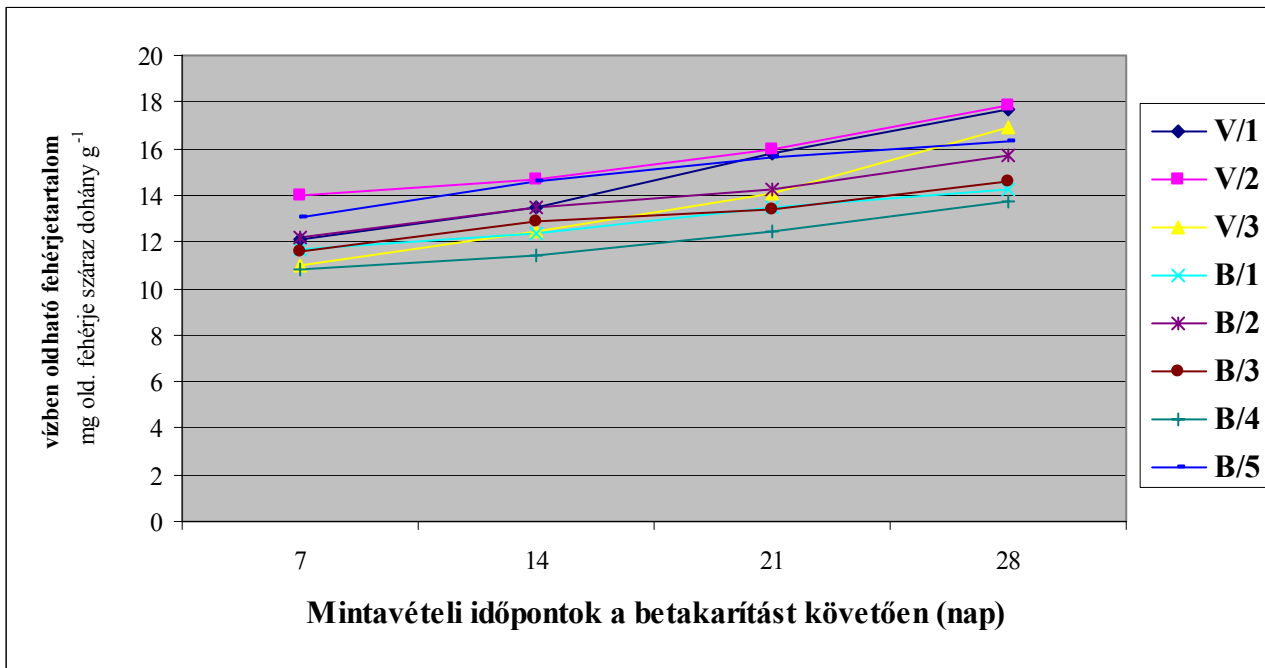


26. ábra PPO aktivitás értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták aljeveleiben a kombinált szárítási periódus alatt

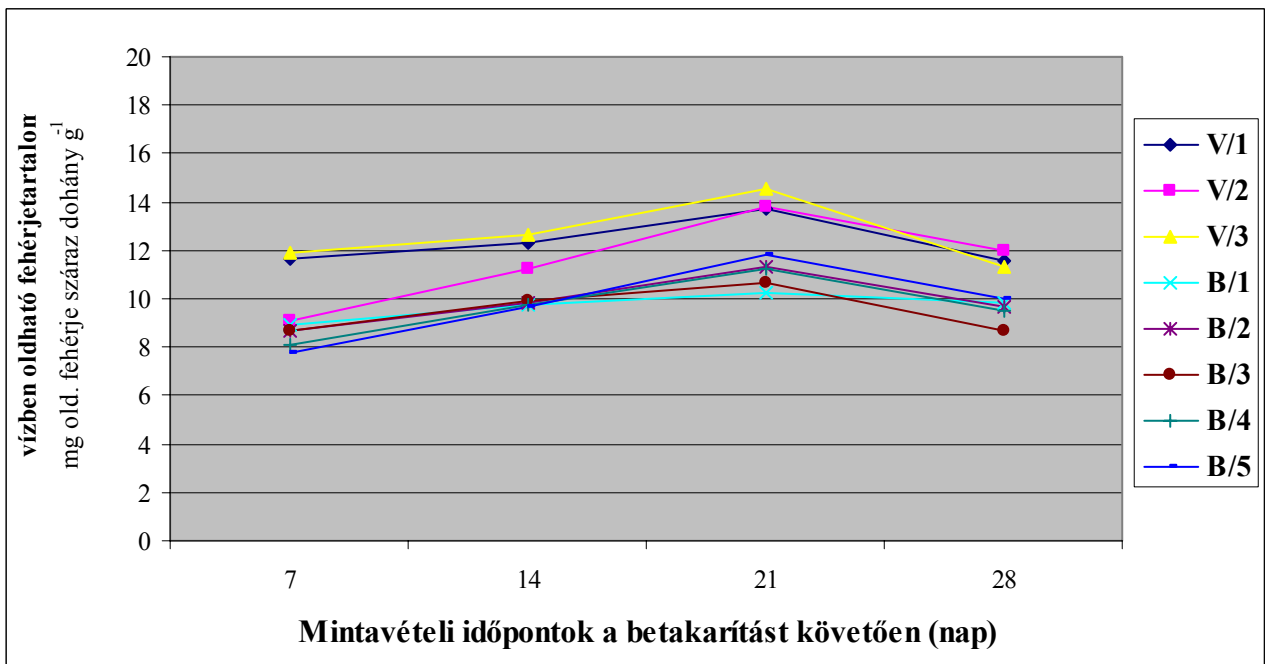
A kombinált szárítás során a vízben oldható fehérjetartalom változása közel egyformán alakult a Virginia és a Burley fajták esetében (27., 28. és 29. ábra). Az anyalevelekben valamivel magasabb fehérjetartalmakat mértem (11-14→14-18 mg fehérje száraz dohány g⁻¹), mint a hegylevelekben (8-12→12-16 mg fehérje száraz dohány g⁻¹). Az aljlevelekben, amelyek fejlődésben mindig előbbre tartanak, mint az egyéb levelek, a vízben oldható fehérjetartalom változása esetében egy enyhe maximum görbe volt tapasztalható a 21. napnál (8-12→11-14, illetve 11-14→9-12 mg fehérje száraz dohány g⁻¹). A tapasztalt enyhe vízben oldható fehérjetartalom növekedés feltételezésem szerint annak tulajdonítható, hogy az oldhatatlan fehérjék részleges hidrolízise vízben oldható fehérjékké általában gyorsabb (az aljlevelekben később lassabb), mint ezek hidrolízise aminosavakká. A dohánylevelek vízben oldható fehérjetartalmának ez a növekedő tendenciája azt sugallja, hogy nem csak a vegetációs periódus végén, hanem a kombinált szárítás után is alkalmas lehet a dohánylevél a fehérjetartalom kivonására, illetve a maradék felhasználására a fermentációs periódusban.



27. ábra Vízben oldható fehérjetartalom értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták hegyleveleiben a kombinált szárítási peiódus alatt



28. ábra **Vízben oldható fehérjetartalom értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták anyaleveleiben a kombinált szárítási periódus alatt**



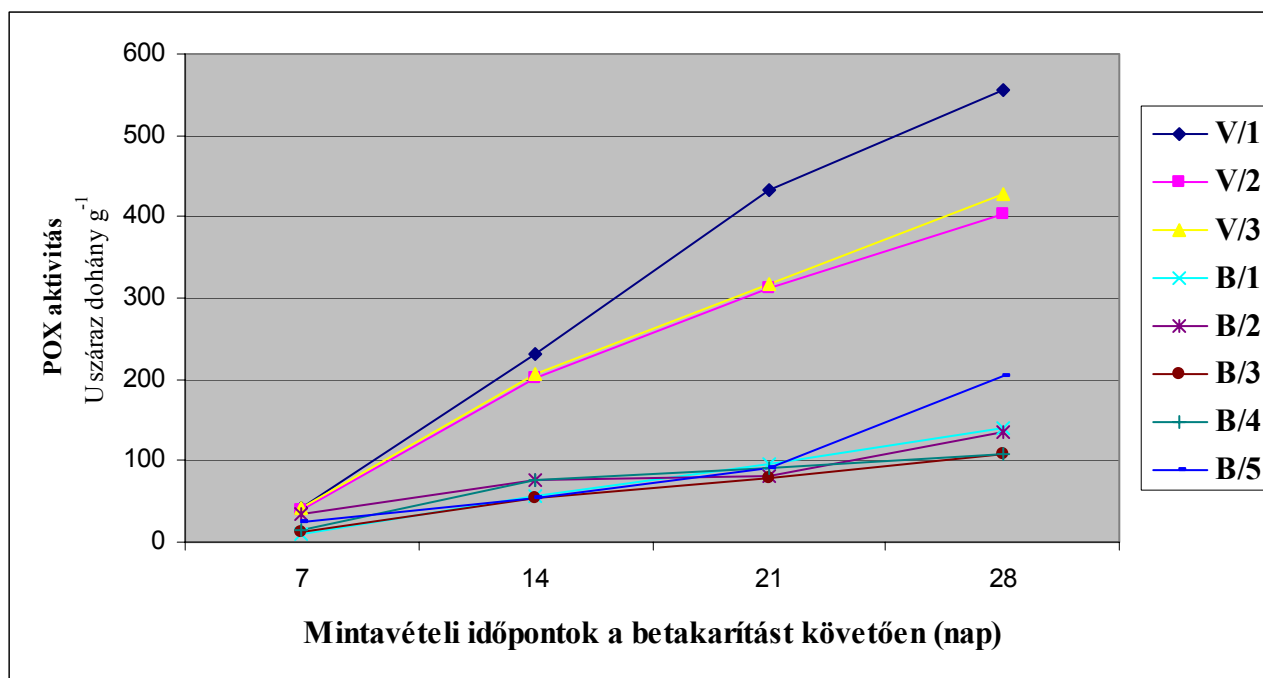
29. ábra **Vízben oldható fehérjetartalom értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták aljleveleiben a kombinált szárítási periódus alatt**

A kombinált szárítás során nem találtam olyan különbséget a Virginia és a Burley dohányfajták között, ami kizárná a Virginia természetes szárításának lehetőségét. Mivel a mesterséges szárítás

igen költséges, a kombinált szárítás eredményein felbátorodva mindkét dohányfajtát természetes úton is megszártítottam.

4.2.2.3 A természetes szárítási módszer biokémiai értékelése

A jó szellőzésű pajtában, természetes körülmények között száradó dohánylevelekben a kombinált szárításhoz igen hasonló eredményeket kaptam. A POX aktivitás növekedése ebben az esetben is a Virginia fajtákban volt erősebb. A kombinált szárításhoz képest az aktivitás eredmények mintegy 15-20 százalékkal voltak magasabbak (kivéve az aljleveleknél, mert itt a különbség még nagyobb volt). Ez azt jelenti, hogy a szabályozott légtér a dohányleveleknek kisebb stresszt jelentett, mint a hőmérsékleti ingadozásoknak és változó páratartalomnak jobban kitett pajta. Mivel lényegesebb eltérést csak az aljlevelek POX aktivitásában tapasztaltam a kombinált módszerhez képest, kizárólag ennek az ábráját (30. ábra) tüntetem fel.



30. ábra POX aktivitás értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták aljleveleiben a természetes szárítási periódus alatt

A PPO aktivitás csökkenésében, illetve a vízben oldható polifenol tartalom változásában is ugyanolyan tendenciát találtam a természetes szárítás esetében, mint a kombinált szárításkor. Nem csak az egyéni mérési eredmények voltak szinte azonosak, hanem ugyanúgy nem volt korreláció a

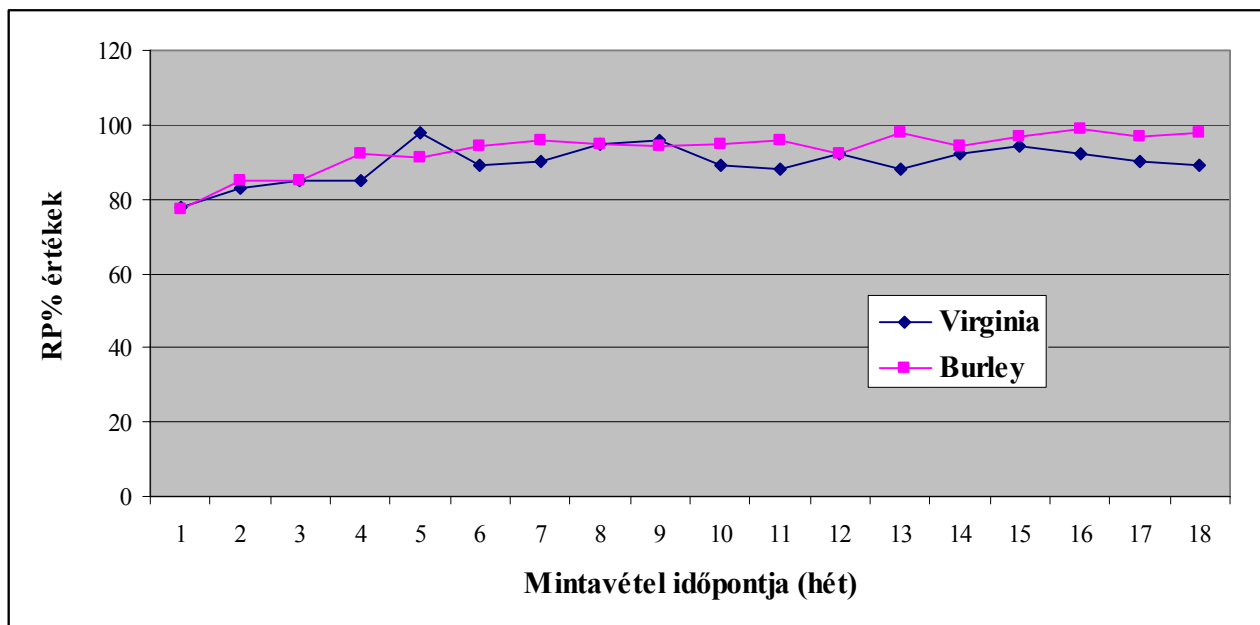
PPO aktivitás, illetve a vízben oldható polifenol tartalom között, ezért a PPO és a PF mérésekkel kapcsolatban nem mutatok be ábrát. Ugyanez vonatkozik a vízben oldható fehérje értékekre is.

A kombinált és a természetes szárítás során mért adatok alapján kijelenthető, hogy eddigi tapasztalataink szerint nem csak a Burley, hanem a vizsgált Virginia fajták is száríthatók természetes körülmények között.

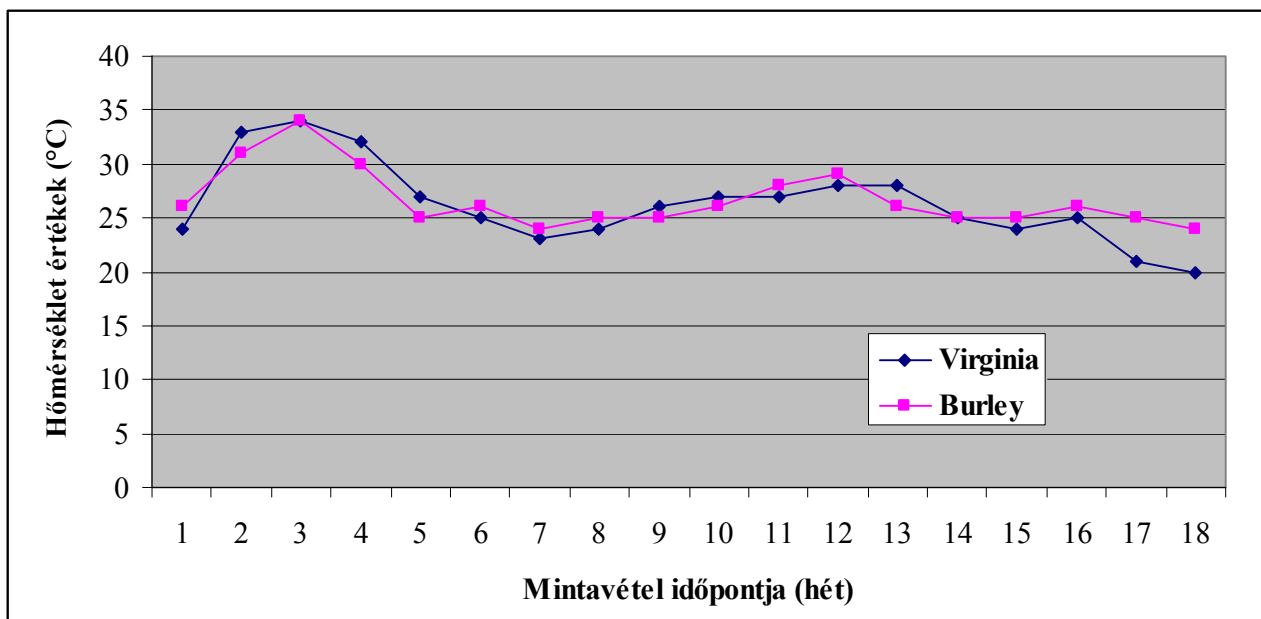
4.2.3 Fermentációs periódus

A fermentációs periódusban kizárólag a dohányipari szempontból legfontosabb levélfajták, az anyalevelek vettek részt. A különböző Virginia, illetve Burley fajtákat ebben a fázisban egymástól már nem különböztettük meg, a mintákat homogenizáltuk.

A hosszú (18 hetes) fermentációs periódusban mind a kombinált, mind a természetes szárítás után a dohány anyaleveleket fermentációs boxba préselve, 20-25 °C külső hőmérsékleten, 85-90 % relatív páratartalom mellett tároltam. Mivel a préselés következtében boxban az oxigéntartalom jelentősen lecsökkenhet, feltételezhető, hogy a fermentáció alatt az anaerob folyamatok előtérbe kerülhetnek. A fermentációs box belsejében bekövetkező hőmérsékleti és páratartalombeli változások mindkét esetben igen hasonlóak voltak. A 31. és 32. ábrákon a kombinált szárítás utáni, a fermentációs boxon belüli relatív páratartalom, illetve hőmérsékleti változásokat mutatom be.



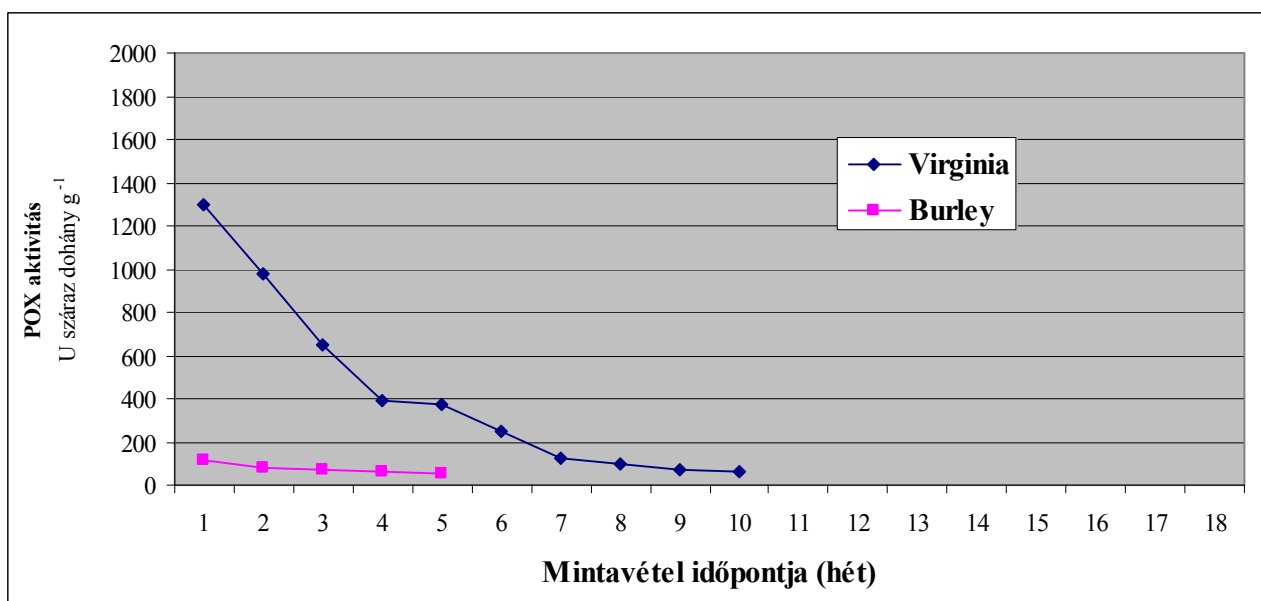
31. ábra A fermentációs boxon belüli relatív páratartalom értékek (RP%) a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták anyaleveleinél a kombinált szárítás utáni fermentációs periódusban



32. ábra A fermentációs boxon belüli hőmérsékleti értékek a saját termesztésű Virginia és Burley dohányfajták anyaleveleinél a kombinált szárítás utáni fermentációs periódus alatt

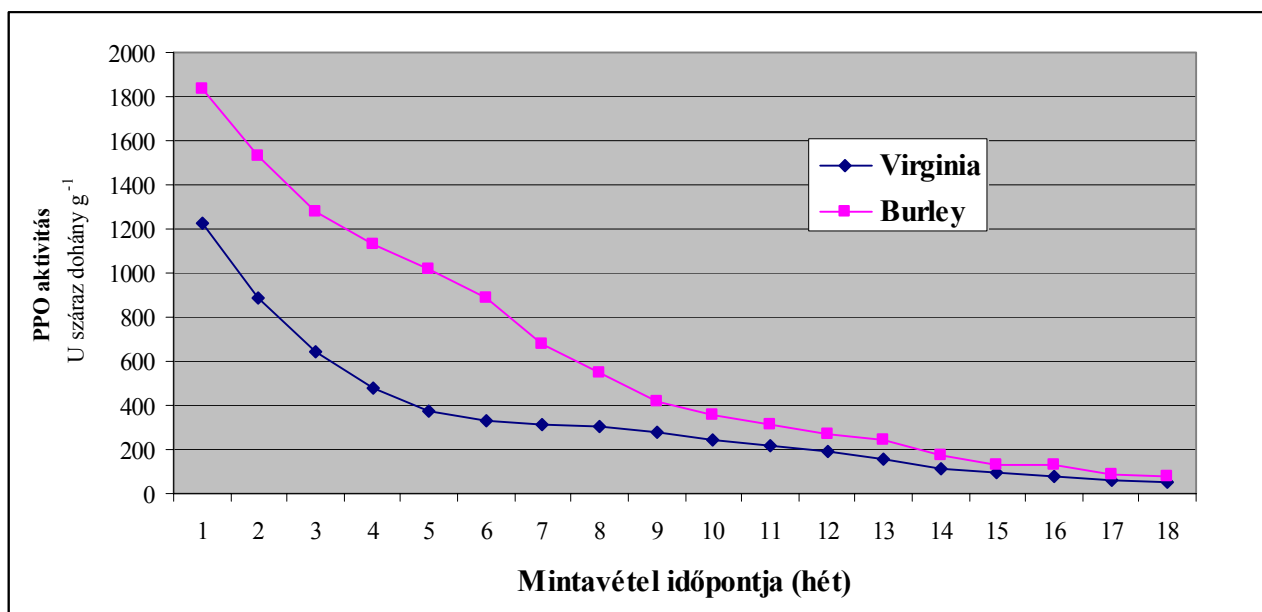
4.2.3.1 Fermentáció a kombinált szárítás után

A fermentáció során a dohánylevelek POX aktivitása a Virginiában lényegesen magasabb volt, mint a Burleyben (a fermentáció első hete után $1300 \mu\text{mol perc}^{-1}$ száraz dohány g^{-1} a Virginiára és $150 \mu\text{mol perc}^{-1}$ száraz dohány g^{-1} a Burleyre), de mindkét dohányfajta esetében az aktivitás az idő előrehaladtával drámaian csökkent, Burley esetében a fermentáció 6. hetében, a Virginia esetében a fermentáció 11. hetében teljesen megszűnt (33. ábra). A POX aktivitás ilyen mértékű csökkenését a dohánylevél enzimszisztémájának a fermentáció során bekövetkező fokozatos leépülésének tulajdonítható.



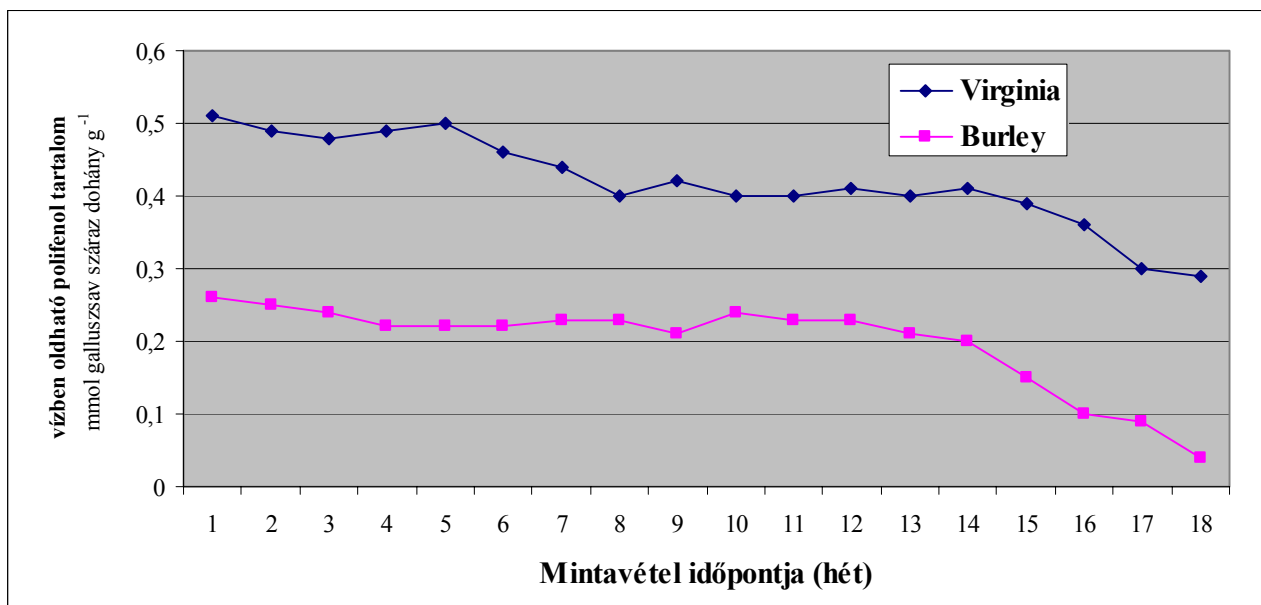
33. ábra POX aktivitás értékek a saját termesztésű, kombinált szárításnak alávetett Virginia és Burley dohányfajták anyaleveleiben, a fermentációs periódus alatt

A fermentációs periódusban a dohánylevelek PPO aktivitása a szárítási periódusban mért értékekhez képest gyakorlatilag megszűnt (1200→55 U száraz dohány g⁻¹ a Virginiára és 1820→76 U száraz dohány g⁻¹ a Burleyre). Ez azt jelenti, hogy azok a veszélyes oxigén gyökök, amelyeket a PPO el tudna bontani, érintetlenül maradván tönkreteszik a dohánylevél enzimszisztémáját. A Burley dohánylevél szignifikánsan magasabb PPO aktivitása a fermentáció során is tapasztalható volt (34. ábra).



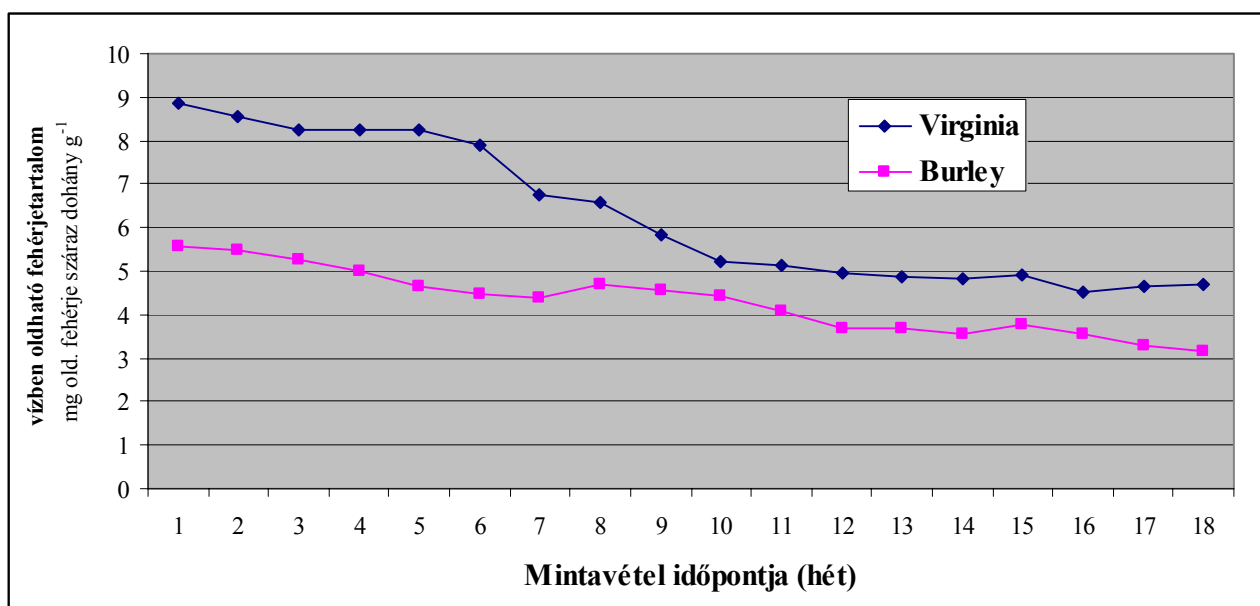
34. ábra PPO aktivitás értékek saját termesztésű, kombinált szárításnak alávetett Virginia és Burley dohányfajták anyaleveleiben, a fermentációs periódus alatt

A fermentációs periódusban a vízben oldható polifenol tartalom csökkenése (0,51→0,29 GSE Virginiára és 0,26→0,04 GSE a Burleyre) feltételezhetően fenolok barna színanyaggá (melanin) történő további oxidációjának az eredménye (35. ábra).



35. ábra Vízben oldható polifenol tartalom értékek a saját termesztésű, kombinált szárításnak alávetett Virginia és Burley dohányfajták anyaleveleiben, a fermentációs periódus alatt

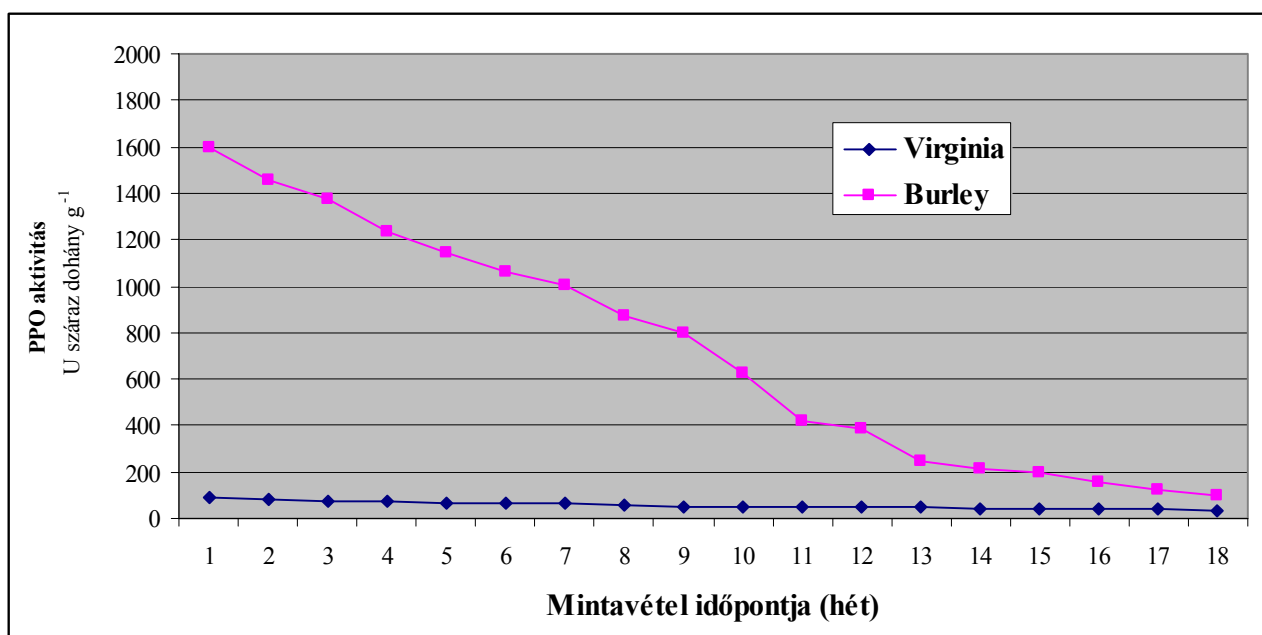
A fermentáció során a dohánylevelek vízben oldható fehérjetartalma is csökkent (8,84→4,70 mg fehérje száraz dohány g⁻¹ a Virginiára és 5,55→3,15 mg fehérje száraz dohány g⁻¹ a Burleyre) feltételezhetően a hidrolitikus és egyéb fehérje lebomlási folyamatok következtében (**36. ábra**).



36. ábra Vízben oldható fehérjetartalom értékek a saját természetű, kombinált szárításnak alávetett Virginia és Burley dohányfajták anyaleveleiben, fermentációs periódus alatt

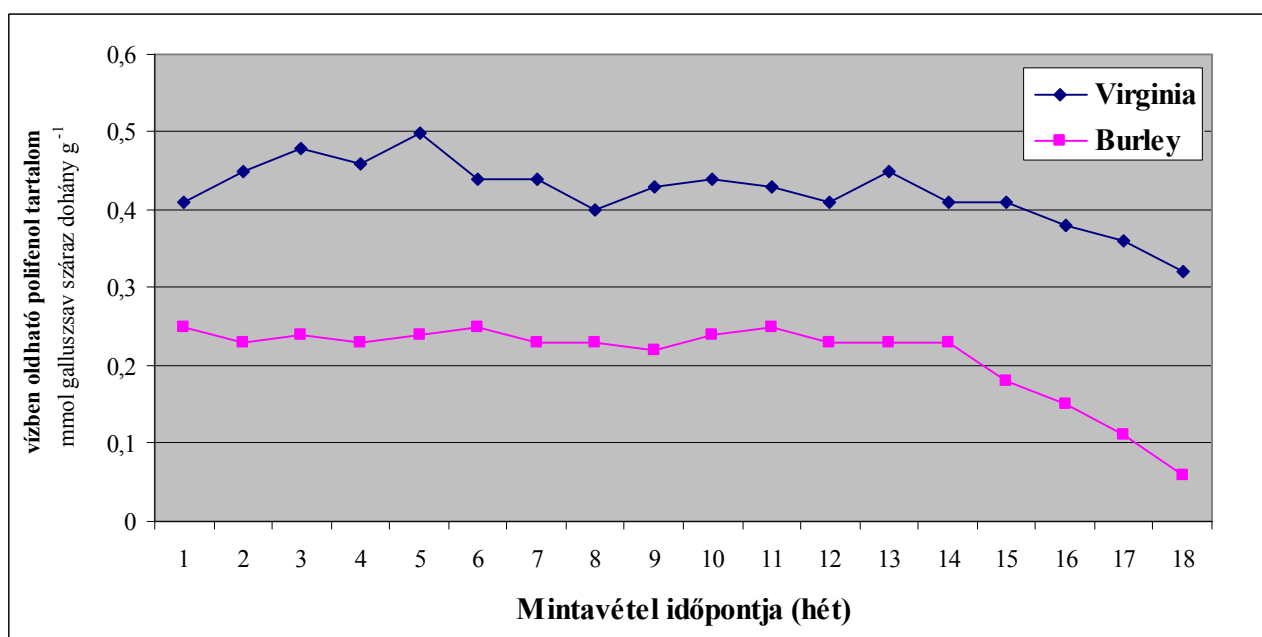
4.2.3.2 Fermentáció a természetes szárítás után

A természetesen körülmények között szárított dohánylevelek fermentációjában a kombinált szárítás utánihoz képest hasonló tendenciát mutató biokémiai változások mentek végbe, de a POX aktivitás esetében mindkét dohánylevél típusnál az aktivitás értékek kb. 20 százalékkal magasabbak voltak, ezért külön bemutatásuktól eltekintek.



37. ábra PPO aktivitás értékek a saját termesztésű, természetes szárításnak alávetett Virginia és Burley dohányfajták anyaleveleiben, a fermentációs periódus alatt

A PPO aktivitás változásainál is hasonló tendencia mutatkozott, mint a kombinált szárítás utáni fermentációnál, de a Virginia esetében a PPO aktivitás sokkal gyorsabban csökkent, mint a kombinált szárítás utáni fermentációnál (37. ábra).



38. ábra Vízben oldható polifenol tartalom értékek a saját termesztésű, természetes szárításnak alávetett Virginia és Burley dohányfajták anyaleveleiben, a fermentációs periódus alatt

A természetes szárítás utáni fermentáció során a vízben oldható polifenol tartalom is a kombinált szárítás utánihoz hasonlóan alakult (**38. ábra**), de a természetes szárítás utáni fermentációnál az értékek valamivel alacsonyabbak voltak, és nagyságuk is jobban hullámzott, mint a kombinált szárítás esetében.

A vízben oldható fehérjetartalom változásai gyakorlatilag megegyeztek a kétféle szárítás utáni fermentáció során, ezért ezek a természetes szárítás utáni fermentáció során mért eredmények bemutatásától eltekintek.

4.2.3.3 A saját termesztésű dohány anyalevelek kémiai analízise a fermentációs periódus során

A Corvinus Egyetemen rendelkezésemre álló metodikák nem engedtek meg széleskörű kémiai analízist, de lehetőségem nyílt arra, hogy a szolnoki dohányfermentáló üzemben az üzemi minták mellett a saját termesztésű dohányleveleim kémiai analízisét is elvégezzem a fermentációs periódus során. Elsősorban a vizsgált dohány anyalevelek cukortartalmának vizsgálata miatt volt szükségem a kémiai analízisekre, amelyek értékei gyakorlatilag nem különböztek a kétféle szárítási módszer után következő fermentáció során. A kétféle szárítási módszernek a kémiai összetételre gyakorolt hatásán keresztül tudtam igazolni azt a feltevésemet, hogy az általam termesztett Virginia fajok magas cukortartalmát nem veszélyezteti a természetes szárítási módszer (**6. és 7. táblázat**).

Az egyéb analitikai eredményekkel kapcsolatban csak azt kívánom megjegyezni, hogy bár a fermentációs folyamat során egyes vizsgálati értékek változtak ugyan, de a folyamat kezdetekor és végekor mért értékek (kivéve a Virginia klorid ion tartalmát) számottevően nem különböztek egymástól. Megjegyzem, hogy a fermentáció során képződő, a különböző dohányok élvezeti értékére vonatkozó információk általában csak érzékszervi, illetve elektronikus orral és elektronikus nyelvvel történő vizsgálatok alapján értékelhetők.

6. táblázat A kémiai analízis eredményeinek alakulása a saját termesztésű, kombinált szárításnak alávetett Virginia és Burley dohányfajták anyaleveleiben, a fermentációs periódus alatt

Minta -vétel ideje (hét)	Red. cukor tart. g/100 g száraz dohány		Összcukor tart. g/100 g száraz dohány	
	Virg.	Burl.	Virg.	Burl.
4	19,52	1,23	20,52	1,31
8	19,01	1,21	19,67	1,27
12	18,89	1,20	19,68	1,26
16	21,52	1,21	21,68	1,28
18	21,31	1,22	21,65	1,44

7. táblázat A kémiai analízis eredményeinek alakulása a saját termesztésű, természetes szárításnak alávetett Virginia és Burley dohányfajták anyaleveleiben, a fermentációs periódus alatt

Minta -vétel ideje (hét)	Red. cukor tart. g/100 g száraz dohány		Összcukor tart. g/100 g száraz dohány	
	Virg.	Burl.	Virg.	Burl.
4	19,62	1,16	20,43	1,21
8	19,11	1,12	19,56	1,28
12	18,78	1,13	19,67	1,24
16	21,43	1,23	21,76	1,29
18	21,34	1,23	21,75	1,39

4.2.4 A saját termesztésű dohánynövény feldolgozásának összefoglalása

4.2.4.1 Vegetációs periódus

A saját termesztésű dohánynövény elsődleges feldolgozása során kapott különböző vizsgálati értékeket korábban már bemutattam (4.2.). Megállapítható volt, hogy a különböző szárpozíciójú levelekben egyaránt a POX aktivitás nagyságának változásai elsősorban az extrém időjárási

körülményeknek voltak köszönhetőek. Bár a vegetációs időszak folyamán számottevő különbségek alakultak ki az egyes dohánytípusok, és azokon belül az egyes fajták között, a termesztési periódus végére számottevő különbség nem mutatkozott, bár a Virginia fajták kissé érzékenyebbek voltak az időjárási viszonyokra, és kezdetben a PPO aktivitásuk is némileg magasabb volt, mint a Burley típusoké. A vegetációs időszak végére a legmagasabb fehérjetartalmat a hegylevelekben mértük, ez esetben is a Virginia fajták voltak valamivel jobbak közülük is a V/1. A Burley fajták esetében a vízben oldható fehérjetartalom a hegylevelekben is némileg alacsonyabb volt, a legmagasabb értéket a B/2 fajta mutatta. Az eredmények azt sugallják, hogy a vízben oldható fehérjetartalom szempontjából egy rövidebb vegetációs periódus előnyösebb lenne, mint a dohányipari feldolgozásnál ideálisnak tekinthető, általam vizsgált vegetációs periódus.

A teljes vegetációs időszakban rögzített adatokkal elvégeztem az ismétlés nélküli kéttényezős varianciaanalízist, melynek eredményei a **8. táblázatban** láthatók.

8. táblázat Kéttényezős varianciaanalízis (ismétlés nélkül) eredményei a saját termesztésű dohányokra vonatkozóan a vegetációs időszakban

Dohánytípusok	Összehasonlítási szempontok	POX	PPO	PF	Vízben oldható fehérje tartalom
Virginia	Szárpozíció	+	+	+	+
	Fajta	+	—	+	—
Burley	Szárpozíció	+	+	+	+
	Fajta	—	+	+	+

+ p= 5% szinten szignifikáns különbség

— p= 5% szinten nincs szignifikáns különbség

Az eredmények szerint megállapíthatom, hogy lényeges különbség volt tapasztalható mind a szárpozíció, mind a fajták és a mért jellemzők tekintetében (**8. táblázat**).

4.2.4.2 Szárítási periódus

Eredetileg a Virginia dohányfajták olcsóbb szárítási körülményeinek kidolgozását tűztem ki célul. Ennek érdekében először mind a Virginia, mind a Burley fajtákra a természetes és mesterséges szárítási körülmények kombinálását választottam. Azonban hamarosan kiderült, hogy az általam

termesztett Virginia fajták magas cukortartalma az irodalmi várakozásokkal ellentétben nem bomlott le számottevően, ezért áttértem a természetes szárítási módszerre, amely mérési eredményei majdnem megegyeztek a kombinált szárítás után mért eredményekkel.

A POX aktivitás változásai arra engedtek következtetni, hogy a Virginia fajták stresszérzékenysége a szárítási periódusban is nagyobb, mint a Burley fajtáké. Mivel a kombinált szárítási folyamatok során a csökkenő PPO aktivitás és a vízben oldható polifenol tartalom nagyságának változása között nem találtam korrelációt, feltételezem, hogy ebben a periódusban a fenolos vegyületek kialakulásában nem csak a PPO, hanem direkt oxidációs folyamatok is részt vesznek. A Burley típusok szignifikánsan magasabb PPO aktivitásának tulajdonítható, hogy a későbbi fermentációs periódusban a Burley dohány sokkal sötétebb színű lesz, mint a Virginia. A dohánylevelek vízben oldható fehérjetartalmának a szárítás során tapasztalható némileg növekedő tendenciája azt sugallja, hogy nem csak a vegetációs periódus végén, hanem a kombinált szárítás után is alkalmas lehet a dohánylevél a fehérjetartalom kivonására, illetve a maradék felhasználására a fermentációs periódusban.

9. táblázat Kéttényezős varianciaanalízis (ismétlés nélkül) eredményei a saját termesztésű, kombinált szárításnak alávetett dohányokra vonatkozóan

Dohánytípusok	Összehasonlítási szempontok	POX	PPO	PF	Vízben oldható fehérje tartalom
Virginia	Szárpozíció	+	+	+	+
	Fajta	+	—	—	—
Burley	Szárpozíció	+	+	+	+
	Fajta	+	+	—	+

+ p= 5% szinten szignifikáns különbség

— p= 5% szinten nincs szignifikáns különbség

Az eredmények szerint megállapíthatom, hogy lényeges különbség volt tapasztalható mind a szárpozíció, mind a fajták és a mért jellemzők tekintetében a kombinált szárítási periódusban is (9. táblázat). Mivel a kombinált és a természetes szárítási periódus eredményei között jelentős eltérés nem volt tapasztalható, így csak a kombinált szárítás során rögzített eredmények statisztikai

értékelését mutatom be. Mind a vegetációs időszakban, mind a szárítási periódusban a vizsgált jellemzők szignifikáns különbséget mutattak szárpozíció szerint (**8-9. táblázat**).

4.2.4.3 Fermentációs periódus

Az alkalmazott kétféle szárítási módszer után végzett fermentációs periódusban a vizsgálati eredmények gyakorlatilag nem különböztek egymástól. A Burley fajtákban mért, a kezdeti időszakban szignifikánsan magasabb PPO aktivitás, illetve bennük az alacsonyabb vízben oldható polifenol tartalom azt jelzi, hogy a fermentációs periódusban a Burley fajtákban a fenolok nagyobb arányban oxidálódnak melanin színanyaggá.

4.2.5 A saját termesztésű dohány anyalevelek mikrobiológiai vizsgálata a fermentációs periódus során

A fermentáció során három mintavétel történt: a fermentáció kezdetekor (0. hét), a 10. hét végén, valamint a fermentáció befejezésekor (18. hét). A vizsgálatokat mindkét szárítás utáni fermentációban elvégeztem. Mivel azonban a tenyésztési eredmények a kétféleképpen szárított dohánylevelek esetében gyakorlatilag megegyeztek, csak a kombinált szárítás utáni fermentáció során kapott eredményeket mutatom be.

4.2.5.1 Mezofil aerob mikrobaszám

10. táblázat A mezofil aerob mikroorganizmusok számának változása a saját termesztésű, ombinált szárításnak alávetett Virginia dohányleveleken, a fermentációs periódusban

Fajta	Telepképző egység/g száraz dohány (*10 ⁵)			
	Penészgombák	Élesztő gombák	Aerob spórás baktériumok	Összes mezof. aerob telepk. mikroorg
Virginia Ferm. kezdete	0	0	3,5	4,2
Virginia Ferm. közepe (10 hét)	0	0	960	1008
Virginia Ferm. Vége (18 hét)	0	0	0,002	0,005

11. táblázat A mezofil aerob mikroorganizmusok számának változása a saját termesztésű, kombinált szárításnak alávetett Burley dohányleveleken, a fermentációs periódusban

Fajta	Telepképző egység/g száraz dohány (*10 ⁵)			
	Penészgombák	Élesztő gombák	Aerob spórás baktériumok	Összes mezof. aerob telepk. mikroorg
Burley Ferm. Kezdet	0,08	0	3,14	9
Burley Ferm. közepe (10 hét)	55	0	476	748
Burley Ferm. vége (18 hét)	13	0	1,12	6

Élesztőgombákat egyik dohánytípus fermentációja során sem izoláltam (10. és 11. táblázat).

Meglepő eredmény az, hogy a jelentősen magasabb cukortartalommal rendelkező Virginia leveleken egyáltalán nem találtam penészgombákat, ezzel szemben az alacsony cukortartalmú

Burley leveleken igen az általam alkalmazott vizsgálati módszerrel. A spórás baktériumok a fermentáció időtartamának közepére (10 hét) jelentős mértékben felszaporodtak, majd a kísérlet végére (18 hét) mindkét dohánytípus esetén számuk lecsökkent.

A mezofil aerob mikroorganizmusok mennyiségi vizsgálata azt demonstrálja, hogy mindkét dohányfajta fermentációjánál a baktériumok, ezen belül az aerob spórás baktériumok száma a fermentáció időtartamának közepéig két nagyságrendnyi növekedést mutatott, majd a csökkenésük mértéke már eltérő. Ez a Virginia fajtánál sokkal jelentősebb volt, öt nagyságrendnyi, míg a Burley esetén ez csak két nagyságrendnyi volt. Az aerob spórás baktériumok a *Bacillus* nemzetség tagjai.

A Virginia leveleken penészgombákat nem izoláltam. A Burley dohány hosszú fermentációja során a kezdeti állapotban izolált és faj szerint identifikált *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus* és *Aspergillus flavus* fajok konídiumai túléltek a 18 héten át tartó fermentációs periódust is. Megjegyzem, hogy ezek a túlélő fajok potenciális toxintermelők ugyan, de egy üzemi fermentációs módszereknél ezek toxintermelése gyakorlatilag kiküszöbölhető. Eddigi mérési eredményeim azt mutatják, hogy a Virginia dohány, sőt a Burley dohánylevél is alacsony cukortartalma ellenére kedvező közeg lehet egyes aerob mikróbák számára.

4.2.5.2 Mezofil anaerob mikrobaszám

12. táblázat A mezofil anaerob mikroorganizmusok számának változása a saját termesztésű, kombinált szárításnak alávetett Virginia és Burley dohányleveleken, a fermentációs periódusban

Fajta	Mintavétel ideje	Összes anaerob mikroorg. sejt/g dohány (*10 ⁴)	Spórás anaerob baktériumok spóra/g dohány (*10 ⁴)
Virginia	Ferm. kezdete	26,0	15,0
	Ferm. közepe (10 hét)	64,0	36,0
	Ferm. vége (18 hét)	75,0	44,0
Burley	Ferm. kezdete	35,0	43,0
	Ferm. közepe (10 hét)	44,0	64,0
	Ferm. vége (18 hét)	75,0	95,0

A **12. táblázatban** feltüntetett eredmények szerint mind a Virginia, mind a Burley dohánylevelek megfelelő „táptalajt” biztosítanak az anaerob mikroorganizmusoknak is. A fermentációs periódusban mindkét dohánytípus mintáiban növekedett az anaerob mikrobaszám. A magasabb fehérjetartalommal rendelkező Burley dohány kissé jobb tápközegnek bizonyult az anaerob spórás baktériumoknak, mint a jóval alacsonyabb fehérjetartalmú Virginia levelek. Az anaerob spórás baktériumok a *Clostridium* nemzetség tagjai.

Az anaerob mikroorganizmusok mennyiségi vizsgálatát azért végeztem a kis redoxpotenciál értéket biztosító RCM táplevesben, paraffin-olajzár alatti tenyésztéssel, mert ez a sérült *Clostridium* spórák újraélesztését is lehetővé teszi. A spórás baktériumok közül az aerob fajok, a *Bacillus* nemzetség tagjai így nem képesek szaporodni, viszont az anaerob fajok, így a *Clostridium* nemzetség tagjai csak ilyen körülmények között tenyészthetők (Reinforced Clostridial Medium).

A *Clostridium* nemzetség egyik élettani csoportja a fehérjéket és más nitrogéntartalmú vegyületeket is bontja. Ezen baktériumoknak a többsége erősen proteolitikus, és valamennyinek jellegzetes energianyerési módja az aminosavak erjesztése.

4.2.5.3 A saját termesztésű dohánynövény mikrobiológiai vizsgálatának összefoglalása

A mikrobiológiai vizsgálatok során meglepőnek találtam, hogy a jelentősen magasabb cukortartalommal rendelkező Virginia leveleken egyáltalán nem találtam penészgombákat, ezzel szemben az alacsony cukortartalmú Burley leveleken igen. Az aerob spórás baktériumok mennyiségi vizsgálata megállapítottam, hogy a Virginia fajtánál növekedés mértéke sokkal jelentősebb volt, mint a Burley esetben. Ennek alapján úgy tűnik, hogy a Virginia mesterséges szárítása mikrobiológiai szempontból előnyösebb, mint a természetes szárítás, mert az alkalmazott magas hőmérséklet miatt a fermentációba kerülő dohány fertőzöttsége jóval kisebb, mint a természetes szárítás esetében – ez előzheti meg a fermentáció során a magas cukortartalom miatti igen magas fertőzöttséget. Ez némileg ellent mondott annak a várakozásomnak, hogy a baktériumok a fehérjékben gazdagabb Burley fajtán fognak jobban elszaporodni. Ezek szerint az aerob spórás baktériumok számára a szénhidrát jobb táptalajnak bizonyult.

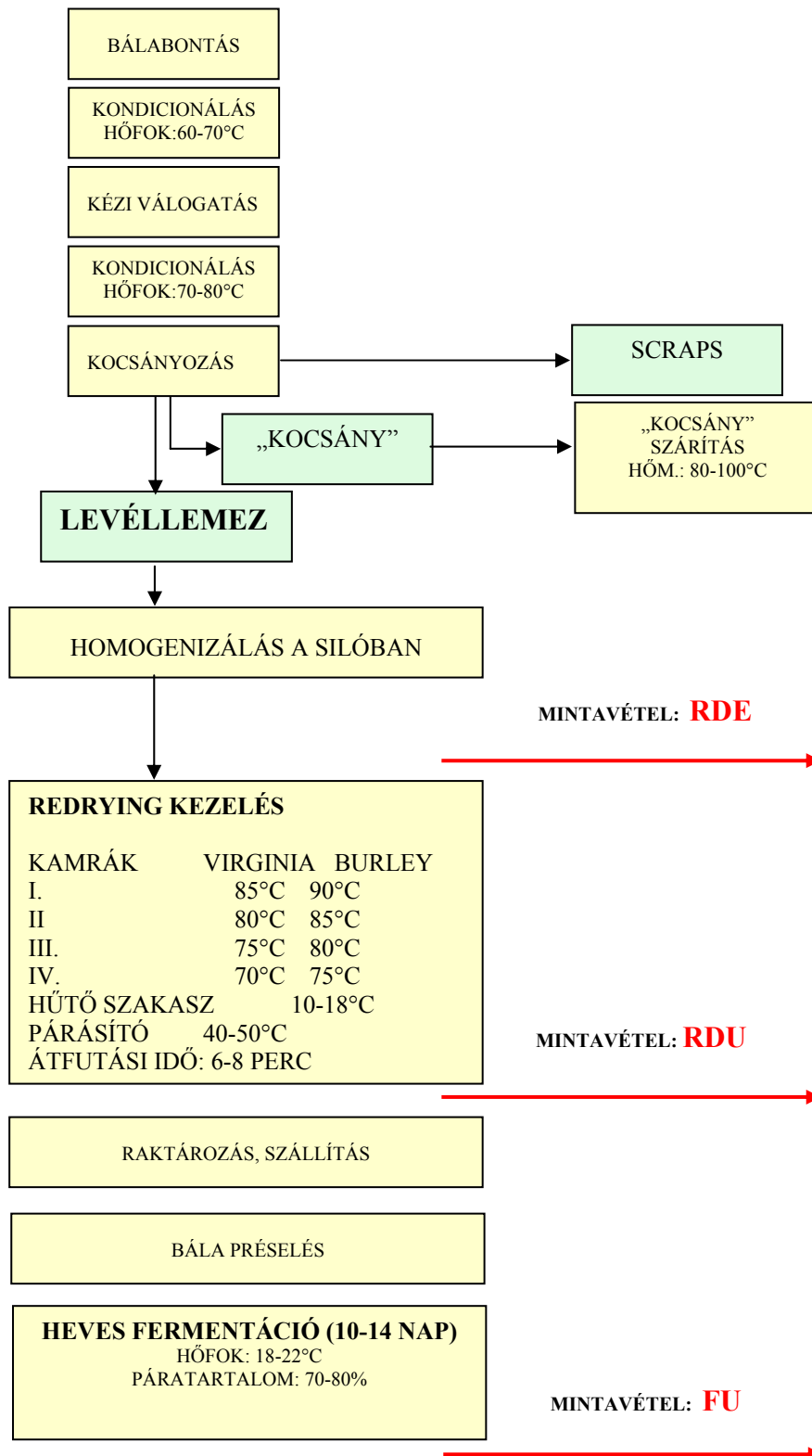
4.3 Az üzemi termesztésű dohány anyalevelek vizsgálata az üzemi gépi fermentálás során

A szolnoki dohányfermentáló üzemben lehetőségem volt arra, hogy az ipari körülmények között 2004 és 2006 között termesztett, majd fermentált Virginia és Burley dohány anyaleveleket részletes vizsgálatnak vessem alá. Ez a vizsgálat sorozat mind üzemi, mind munkaegészségügyi megfontolásból is kívánatosnak tűnt, elsősorban a mikrobiológiai mérések szempontjából. Ugyanis

így lehetőségük volt arra, hogy az üzemi gépi fermentálásnál alkalmazott technológiai fejlesztések eredményeképpen bekövetkező fermentációs paraméterek módosulása és a mikrobiológiai állapot között esetleges összefüggéseket találjanak. Számomra tulajdonképpen ezek a vizsgálatok képezték a saját termesztésű (2005 és 2006) Virginia és Burley dohánynövényekkel kapcsolatos méréseim elővizsgálatait.

A ipari szempontból legfontosabb dohány anyalevelek dohányipari úgynevezett elsődleges feldolgozás (szárítás és fermentáció) sok szempontból különbözik azoktól a módszerektől, amelyeket a saját termesztésű dohánynövényeim kezelése során már ismertettem. A Burley anyalevelek természetes szárítása legfeljebb méreteiben különbözött az általam leírt természetes szárítástól, de a Virginia anyalevelek szárítása mesterséges úton, több lépésben történt, ahogy ezt az irodalmi áttekintésben (2.2.4.) részletesen ismertettem.

A nagyüzemi fermentációra a szárított dohány anyalevelek bálákba csomagolva érkeznek. A kezelés különböző fázisainak sémáját és a mintavételezések helyét a **39. ábra** mutatja be.



39. ábra Az üzemi gépi fermentálás technológiai lépései és a mintavételi helyek

Az üzemi, úgynevezett gépi fermentálás előkezelését (hőkezelés és párasítás) „redying kezelésnek” nevezik, ezt követi a tényleges fermentáció, amit bálapréseles előz meg, és ami körülbelül 14 napig tart. A hagyományos, legalább 18 hetes fermentációtól megkülönböztetve ezt a szakaszt „heves fermentációnak” nevezik. Megjegyzem, a dohány a heves fermentáció után raktárba kerülve tovább fermentálódik. A dohányipari zsargonban a „kocsány” a dohánylevél elkülönített ereze.

A fermentáló üzemből származó mintákat a következő módon jelöltem:

RDE = a redrying alagút előtt vett minta, szárított volt és a keverő tároló silóból származott.

RDU = második mintavételre a redrying kezelés után, a bálapréselest megelőzően került sor.

FU = a harmadik mintát a 14 napos, úgynevezett „heves” fermentációt követően vettem.

A különböző évjáratoknak az üzemi gépi fermentálás során nyert mérési értékei igen hasonlóak voltak, ezért csak egyetlenegy év, a saját dohánytermesztésemet megelőző év (2005) adatait mutatom be (**13. táblázat**).

A növényi stresszre érzékenyen reagáló POX aktivitás a kondicionáló előkezelés során elszenvedett hőhatás miatt emelkedhetett meg, az intenzív redrying kezelés már az enzimaktivitás csökkenésével járt. A Virginia ebben az esetben is érzékenyebben reagált, mint a Burley. A PPO aktivitás változása nem sokban különbözött a természetes szárítás és a hagyományos fermentációnál tapasztaltaktól. A vízben oldható polifenol tartalom ez esetben is valamivel alacsonyabb volt a Burley dohányban, mint a Virginiában, a vízben oldható fehérjetartalmak esetében is a Virginiában mért értékek voltak valamivel magasabbak.

13. táblázat A 2005-ös termesztési évből származó, üzemi termesztésű dohány anyalevelek POX, PPO aktivitás értékeinek, valamint vízben oldható polifenol-és fehérjetartalmának változása az üzemi gépi fermentálás során

2005	Kezelések	POX aktivitás ($\mu\text{mol perc}^{-1}$ száraz dohány g^{-1})	PPO aktivitás (U száraz dohány g^{-1})	Vízben oldható polifenol tartalom (mmol galluszsav száraz dohány g^{-1})	Vízben oldható fehérjetartalom (mg oldható fehérje száraz dohány g^{-1})
Virginia	RDE	2134	2310	0,58	14,23
	RDU	1567	1350	0,49	12,35
	FU	53	43	0,09	10,87
Burley	RDE	512	3421	0,32	13,43
	RDU	421	2950	0,29	12,02
	FU	43	76	0,12	9,38

4.3.1 A dohány anyalevelek kémiai analízise üzemi gépi fermentálás előtt

A kémiai és a mikrobiális analízis vizsgálatokat mind a három üzemi termesztési, majd fermentációs vizsgálatokba bevont évben (2004-2005-2006) végeztem, a kémiai analíziseket az üzemi gépi fermentálás előtt, a mikrobiális vizsgálatokat pedig az üzemi gépi fermentálás alatt. Ezek alatt a vizsgálatok során az alábbiakat mérték: összes nitrogén-, fehérje nitrogén-, összes cukor-, redukáló cukor-, alkaloid-, nitrát- és klorid-tartalom. Ezek közül most csak a cukortartalmakat mutatom be, amelyek szoros kapcsolatban állnak az üzemi gépi fermentálási vizsgálataim eredményével. A kémiai analízis táblázatában (14. táblázat) összefoglalt adatokból egyértelműen kiderül, hogy a Burley dohányok összes cukortartalma nagymértékben elmaradt a Virginia dohányokhoz képest. Ennek megfelelően alakultak a redukáló cukortartalom értékek is. A megjelölt termesztési éveket összehasonlítva jelentős eltérést nem tapasztaltam egyik fajta esetén sem a vizsgálatba vont paraméter tekintetében.

14. táblázat Az üzemi termesztésű dohány anyalevelek kémiai analízise az üzemi gépi fermentálás előtt

Komponens	VIRGINIA DOHÁNY			BURLEY DOHÁNY		
	2004	2005	2006	2004	2005	2006
Összes cukortartalom (g/100 g száraz dohány)	17,49	20,58	19,82	0,97	0,64	0,81
Reduk. cukortartalom (g/100 g száraz dohány)	11,50	14,29	13,05	0,82	0,56	0,67

4.3.2 Az üzemi termesztésű dohány anyalevelek mikrobiológiai vizsgálata üzemi gépi fermentálás alatt

Az üzemi termesztésű dohány anyalevelek üzemi gépi fermentálás alatti mikrobiológiai vizsgálata során is nem csak mennyiségi vizsgálatokat (mikrobaszám) végeztem, hanem a különböző mikrobák azonosítására is törekedtem. Mivel ez utóbbi esetben igen változatos eredményeket kaptam, áttekinthetőbbnek tartottam, ha a Burley és a Virginia típusokat külön tárgyalom.

4.3.2.1 Az üzemi termesztésű Burley dohány anyalevelek mikrobiológiai vizsgálata üzemi gépi fermentálás alatt

A korábbiakhoz hasonlóan a fermentálás alatti dohány anyalevekben először mezofil aerob és anaerob mikroorganizmusokat vizsgáltam

Mezofil aerob mikrobaszám (Burley)

A mezofil aerob mikroorganizmusok közül penészgombákat, az élesztőgombákat és a spórás baktériumokat vizsgáltam (15. táblázat).

15. táblázat Mezofil aerob mikroorganizmusok számának változása a különböző termesztési évből származó, üzemi termesztésű Burley anyalevekben az üzemi gépi fermentálás alatt

Fajta	Kezelések	Telepképző egység/g száraz dohány (*10 ⁴)			
		Penészgombák	Élesztőgombák	Aerob spórás baktériumok	Összes mezof. aerob telepk. mikroorg.
Burley (2004)	RDE	0,14	14,20	14,32	54,32
	RDU	0,00	0,23	28,41	61,36
	FU	0,00	4,32	2,95	21,82
Burley (2005)	RDE	3,3	4,1	35,9	240
	RDU	0,00	0,3	3,6	57,0
	FU	0,00	0,00	2,0	10,4
Burley (2006)	RDE	1,3	12,1	25,9	120
	RDU	0,00	1,4	2,3	27,0
	FU	0,00	0,34	2,1	8,4

Megállapítottam, hogy az üzemi termesztésű Burley anyalevekben a redrying előtt a penészgombák száma egy nagyságrenddel kisebb volt 2004-ben a 2005 és 2006 évjáratokhoz képest. A fermentáció végére mindhárom évben a penészek száma a kimutathatósági érték alá csökkent. (13. táblázat). Az élesztőgombák mikrobaszámának változása analóg módon ugyancsak majdnem nullára csökkent. A spórás baktériumok számában volt a legnagyobb az eltérés. A 2005-es termesztési évből származó minták esetén a redrying kezelés nem növelte, hanem jelentős

mértékben csökkentette az aerob spórás baktériumok számát a másik két termesztési évből származó dohánylevelekkel szemben.

A mezofil aerob mikrobák közül a penészgombák minőségi azonosítása (Burley)

A mikroorganizmusok mennyiségi vizsgálata után elvégeztem azok egyik fontos csoportjánál, a leggyakoribb előfordulású penészgombáknál a minőségi meghatározást is, nemzetség és faj szintjén. A 2005. évből származó Burley dohánylevél minták mutatták a legnagyobb fajgazdagságot a leggyakoribb előfordulású penészgombák esetében, mint azt **14. táblázat** szemlélteti.

16. táblázat Különböző termesztési évből származó, üzemi termesztésű Burley anyaleveleken az üzemi gépi fermentálás alatt azonosított penészgomba fajok (III. Melléklet)

Dohányminták	RDE	RDU	FU
Burley (2004)	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>		
Burley (2005)	<i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Alternaria alternata</i> <i>Alternaria tenuissima</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Penicillium expansum</i> <i>Paecilomyces niveus</i> <i>Paecilomyces Farinosus</i>		
Burley (2006)	<i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Penicillium echinulatum</i>		

A vizsgált dohánymintákon azonosított penészgomba fajokat a **16. táblázatban** tüntettem fel. Látható, hogy mindhárom termesztési évből származó Burley minták esetén a redrying kezelés hatásos volt, penészgombákat nem tudtam izolálni és identifikálni sem a redrying kezelés után vett mintákban (RDU), sem a fermentációt (FU) követően az üzemi mintákból.

Minden termesztési évben előfordult a redrying kezelés előtti mintákban az *Aspergillus parasiticus* nevű faj. A többi penészgomba előfordulása viszont változó jellegű, évjáratok szerint különböztek

az izolálható fajok. A legváltozatosabb penészbiótát a 2005-ös évből származó Burley izolátumok mutatták.(7 faj).

Mezofil anaerob mikrobaszám (Burley)

A mezofil anaerob mikroorganizmusok közül elsősorban a spórás anaerob baktériumokra (*Bacillus* és a *Clostridium* nemzetség) koncentráltam.

17. táblázat Mezofil anaerob mikroorganizmusok számának változása a különböző termesztési évből származó, üzemi termesztésű Burley anyaleveleken az üzemi gépi fermentálás alatt

Fajta	Kezelések	Összes anaerob mikroorg. sejt/g dohány (*10⁴)	Spórás anaerob baktériumok spóra/g dohány (*10⁴)
Burley (2004)	RDE	44,0	2,7
	RDU	4,2	1,5
	FU	19,0	27,0
Burley (2005)	RDE	35,0	5,3
	RDU	3,4	2,7
	FU	29,0	24,0
Burley (2006)	RDE	43,0	3,4
	RDU	4,2	2,7
	FU	13,0	29,0

A **17. táblázatban** feltüntetett eredmények szerint a Burley dohánylevelek megfelelő táptalajt biztosítanak az anaerob mikroorganizmusoknak is. Az összes anaerob mikroorganizmus számát a redrying kezelés egy nagyságrenddel csökkentette, ugyanez nem volt igaz a spórás anaerob baktériumokra. Az anaerob spórás baktériumok esetén az alacsonyabb kezdeti spóraszám a fermentáció végére jelentős növekedést mutatott. Valószínű, hogy ez azzal is magyarázható, hogy a Burley dohánylevelek fehérjetartalma jóval magasabb a Virginia dohánylevelekhez képest, ezáltal a anaerob spórás baktériumoknak kitűnő táptalajt jelent. Megállapítható, hogy mindhárom termesztési évből származó minták anaerob mikrobaszáma hasonlóképpen alakult.

A mikroorganizmusok mennyiségi vizsgálata után elvégeztem azok egy részénél a minőségi meghatározást nemzetség szintjén. A spórás baktériumok a *Bacillus* és a *Clostridium* nemzetség tagjai voltak.

4.3.2.2 Az üzemi termesztésű Virginia dohány anyalevek mikrobiológiai vizsgálata üzemi gépi fermentálás alatt

A korábbiakhoz hasonlóan a fermentálás alatti dohány anyalevekben először mezofil aerob és anaerob mikroorganizmusokat vizsgáltam

Mezofil aerob mikrobaszám (Virginia)

A mezofil aerob mikroorganizmusok közül penészgombákat, az élesztőgombákat és a spórás baktériumokat vizsgáltam.

18. táblázat Mezofil aerob mikroorganizmusok számának változása a különböző termesztési évből származó, üzemi termesztésű Virginia anyaleveken az üzemi gépi fermentálás alatt

Fajta	Kezelések	Telepképző egység/g száraz dohány (*10 ⁴)			
		Penészgombák	Élesztőgombák	Aerob spórás baktériumok	Összes mezof. aerob telepk. mikroorg.
Virginia (2004)	RDE	0,09	0,25	0,38	36
	RDU	2,1	1,7	32,7	40
	FU	0,01	12,6	2,6	16,5
Virginia (2005)	RDE	0,01	0,15	0,42	24
	RDU	2,3	2,1	34,7	43
	FU	0,07	12,4	3,1	18,5
Virginia (2006)	RDE	0,03	0,32	0,42	28
	RDU	1,9	1,6	42,2	46
	FU	0,02	14,5	2,7	20,6

A Burley dohány anyalevekhez képest magasabb cukortartalommal rendelkező Virginia dohány anyalevekben a penészgombák számát a redrying kezelés nem csökkentette (**18. táblázat**), sőt kissé megemelte. (A változás a redrying kezelése után egy nagyságrend növekedés.). A Virginia dohány jó táptalajnak minősült az élesztőgombák számára is, mindhárom termesztési évben a fermentáció végére megnövekedett mennyiségük.(A redrying és a fermentáció után is egy-egy nagyságrendnyi élesztőgomba szám növekedés volt megfigyelhető.) Az aerob spórás baktériumok

száma mindhárom termesztési évben a redrying kezelés után szintén kb. egy nagyságrenddel megnövekedett, de a fermentáció végére ugyanarra a szintre visszacsökkent.

A mezofil aerob mikrobák közül a penészgombák minőségi azonosítása (Virginia)

A mikroorganizmusok mennyiségi vizsgálata után a Virginia esetében is a penészgombáknál végeztem minőségi meghatározást nemzetség és faj szintjén.

19. táblázat Különböző termesztési évből származó, üzemi termesztésű Virginia anyaleveleken az üzemi gépi fermentálás alatt azonosított penészgomba fajok (III. Melléklet)

Dohányminták	RDE	RDU	FU
Virginia (2004)	<i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus sclerotiorum</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Alternaria chartarum</i>
Virginia (2005)	<i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Aspergillus niger</i> <i>Alternaria alternata</i> <i>Rhizopus sp.</i> <i>Penicillium echinulatum</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Penicillium echinulatum</i>
Virginia (2006)	<i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Penicillium echinulatum</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>

A 19. táblázatban összefoglalt eredmények alapján látható, hogy a magasabb cukortartalmú dohányfajta igen optimális táptalaja lehet a vizsgált mikroba csoportnak. Mind a redrying kezelés előtt, mind utána, valamint a fermentáció végén is sikerült penész gombafajokat azonosítanom. Az *Aspergillus parasiticus* elnevezésű penészfaj minden termesztési évben, az összes vizsgálati ponton felfedezhető volt. *Aspergillus niger* jelent meg a 2004-2005-ös termesztési évben a redrying kezelés előtt és után, azonban a fermentáció végén már nem volt identifikálható. Az *Aspergillus sclerotiorum* csak a szárított Virginia leveleken volt kimutatható, a 2004-es termesztési évben. Továbbá a 2004-es termesztési évben a fermentáció végén jelent meg az *Alternaria chartarum*, a 2005-es termesztési évben a redrying kezelés előtt pedig az *Alternaria alternata* és a *Rhizopus sp.*

fajokat sikerült azonosítanom. A 2005 és a 2006-os termesztési évben a redrying kezelés előtt vett mintában *Penicillium echinulatum* nevezetű fajt sikerült azonosítanom.

Mezofil anaerob mikrobaszám, üzemi minták (Virginia)

20. táblázat Mezofil anaerob mikroorganizmusok számának változása különböző termesztési évből származó üzemi Virginia anyaleveleken

Fajta	Kezelések	Összes anaerob mikroorg. sejt/g dohány (*10 ⁴)	Spórás anaerob baktériumok spóra/g dohány (*10 ⁴)
Virginia (2004)	RDE	23,0	2,3
	RDU	2,5	1,5
	FU	3,4	6,2
Virginia (2005)	RDE	32,0	3,2
	RDU	2,6	1,6
	FU	4,4	7,5
Virginia (2006)	RDE	29,0	4,4
	RDU	2,8	2,1
	FU	3,9	7,5

A 20. táblázat alapján kijelenthetjük, hogy a Virginia dohánylevelek megfelelő táptalajt biztosítanak az anaerob mikroorganizmusoknak is. Az összes anaerob mikroorganizmus számát a redrying kezelés egy nagyságrenddel csökkentette, ugyanez nem volt igaz a spórás anaerob baktériumokra.

Az anaerob spórás baktériumok esetén az alacsonyabb kezdeti spóraszám a redrying kezelés utáni csökkent sejtszámhoz képest a fermentáció végére csak kisebb növekedést mutat. Valószínű, ez azzal is magyarázható, hogy a Virginia dohánylevelek fehérjetartalma a többi dohányféléhez képest jóval alacsonyabb, így ez a sejtszám növekedés nem éri el a tízszeres értéket a fermentáció után, mert az anaerob spórás baktériumok tápanyaga a fehérje. Mindhárom termesztési évből származó minták anaerob mikrobaszáma hasonlóképpen alakult.

4.3.2.3 Az üzemi termesztésű Burley és Virginia dohány anyalevelek üzemi gépi fermentációja során nyert mikrobiológiai vizsgálatok összehasonlítása

Összességében elmondhatjuk, hogy a mesterséges szárítású Virginia dohánylevelek a szárítás érélyes körülményei miatt a redrying kezelés előtt a Burley típusnál alacsonyabb aerob mikroorganizmus számmal kerültek be az üzembe. Ennek azért van nagy jelentősége, mert ez az oka annak, hogy a mikroorganizmusok számára igen kedvező magas cukortartalom ellenére sem emelkedett a fermentáció végére 1000000 tke/g fölé a vizsgált mikroba csoportok mennyisége.

A Burley dohánylevelek a természetes szárítási körülmények miatt magasabb mikroba számmal kerültek be az üzembe. A Burley minták esetében a redrying kezelés volt az, ami lecsökkentette az élesztőgombák számát, és tette tönkre a penészgombákat. A spórás baktériumok száma mindhárom évből származó mintában a redrying kezelés hatására egy nagyságrend értékben lecsökkent.

Mindkét dohánytípus minőségi mikrobiológiai vizsgálatának eredményei alapján elmondhatjuk, hogy az azonosított penészgombafajok között voltak toxintermelők, azonban a fermentáció paraméterei nem kedveztek a toxintermelésnek. A heves fermentáció során a bálában mért hőmérséklet 30-35 °C volt, a vízáktivitás értékek 0,7 alattiak voltak. Bár munkám során nem tértem ki a toxin termelés lehetőségének vizsgálatára, az általam izolált fajok az irodalmi adatok szerint 0,7 vízáktivitás érték alatt nem képesek toxint termelni, így nem történhet toxinképződés a fermentáció során. Eddigi mérési eredményeink azt mutatják, hogy mind a Virginia és mind a Burley dohány, kedvező táptalaj lehet a mikroorganizmusok számára, ezért különösen fontos a fermentáció kezdeti nedvességtartalmának szigorú ellenőrzése és folyamatos nyomon követése a későbbi feldolgozási fázisokban is.

A Burley és Virginia típusok a spórás anaerob baktériumokra vonatkozóan hasonló tendencia mutatkozott, mint az aerob mikroorganizmusok esetében. De ebben az esetben a Virginia fertőzöttsége már kezdettől fogva nagyobb volt.

5 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

PhD értekezésem új tudományos eredményeit az alábbiakban foglalom össze.

1. A dohányiparban az elmúlt években új fajtként köztermesztésbe vont Virginia és Burley dohányfajták saját termesztése során elsőként követtem nyomon biokémiai módszerekkel a peroxidáz, a polifenol-oxidáz és a lipoxigenáz enzimek aktivitását, illetve a dohányminőség kialakulásában fontos szerepet játszó vízben oldható polifenol tartalmat, és ezek alakulásából következtetéseket vontam le.
2. Megállapítottam, hogy a POX, PPO, aktivitás értékeket, a vízben oldható polifenol tartalmat, valamint a vízben oldható fehérjetartalmat a leveleknek a száron való elhelyezkedése (kora) erősen meghatározza, mind a vegetációs időszakban, mind a szárítási periódusban. A különböző dohánytípusokban, illetve dohányfajtákban a lipoxigenáz izoenzim eloszlásaiban viszont nincs számottevő különbség, ezért a dohánynövényben ez az enzim ilyen irányú vizsgálatokra nem alkalmas.
3. Úgy találtam, hogy a vízben oldható fehérjetartalom, így az esetleges élelmiszeripari felhasználás szempontjából egy rövidebb vegetációs periódus (13-14 hét) előnyösebb lehet, mint általam vizsgált, dohányipari szempontok szerint választott vegetációs periódus (16-17 hét).
4. Mind a kombinált, mind a természetes szárítási módszer után a vizsgált dohánylevelek vízben oldható fehérjetartalmának mért növekedő tendenciája alapján sikerült némi támpontot nyújtanom egy esetleges, olyan további kutatáshoz, amely az igen gazdaságosan termesztendő dohánynövénynek a legfontosabb felhasználási területén, a dohányiparon kívül, illetve azzal párhuzamosan való hasznosításával foglalkozik.
5. A magas cukortartalmú Virginia dohánytípus esetében a költséges mesterséges szárítási módszer kiváltására kombinált szárítási módszert dolgoztam ki, amelynek során megállapítottam, hogy a Virginia dohánylevelek cukortartalma nem csökken sem a kombinált, sem a természetes szárítási körülmények között.
6. A mikrobiológiai vizsgálatok során megállapítottam, hogy a Virginia mesterséges szárítása mikrobiológiai szempontból előnyösebb, mint a természetes szárítás, mert az alkalmazott magas hőmérséklet miatt a fermentációba kerülő dohány fertőzöttsége jóval kisebb, mint a természetes szárítás esetében – ez előzheti meg a fermentáció során a magas cukortartalom miatti igen magas fertőzöttséget.

7. Az üzemi termesztésű dohány anyalevelek üzemi gépi fermentálás előtti és alatti részletes kémiai, biokémiai és mikrobiológiai vizsgálatával támpontokat nyújtottam az üzemi fermentálás paramétereinek (elsősorban a redrying kezelés hőmérsékletének) pontosabb beállításához. Mivel mind a Virginia és mind a Burley dohány, kedvező táptalaj lehet a mikroorganizmusok számára, ezért különösen fontos a fermentáció kezdeti nedvességtartalmának szigorú ellenőrzése és folyamatos nyomon követése a későbbi feldolgozási fázisokban is.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

Doktoranduszi kutatómunkám célja két dohánytípus (Virginia és Burley) ezen belül három Virginia és öt Burley fajta termesztése és elsődleges feldolgozása, valamint mind a saját, mind pedig üzemi termesztésű dohánylevelek biokémiai és mikrobiológiai vizsgálata volt. A saját termesztésű dohánynövényekkel történő vizsgálataimmal kapcsolatban célul tűztem ki üzemi termesztésű dohány anyalevelek biokémiai és mikrobiológiai vizsgálatát az üzemi gépi fermentálás során. Célkitűzéseim összetettségének megfelelően kutatómunkám is sokrétű volt. Biokémiai módszerekkel a peroxidáz, a polifenol-oxidáz és a lipoxigenáz enzimek aktivitását, illetve a dohányminőség kialakulásában fontos szerepet játszó vízben oldható polifenol tartalmat, valamint a dohánynövény esetleges élelmiszeripari felhasználása szempontjából döntő fontosságú vízben oldható fehérjetartalmat vizsgáltam. Ez utóbbi tanulmányozását különösen fontosnak tartottam a dohánynövény esetleges élelmiszeripari felhasználása szempontjából. Ilyen jellegű vizsgálatokat korábban nem igen végeztek. Megállapítottam, hogy a vízben oldható fehérjetartalom, így az esetleges élelmiszeripari felhasználás szempontjából egy rövidebb vegetációs periódus előnyösebb lehet, mint általam vizsgált, dohányipari szempontok szerint választott vegetációs periódus. A saját termesztésű dohánylevelek szárítása során a magas cukortartalmú Virginia fajtára az általánosan alkalmazott, drága, mesterséges szárítás kiváltására egy, a természetes és mesterséges szárítás paramétereinek felhasználásával egy kombinált módszert dolgoztam ki, és ezt a módszert valamennyi saját termesztésű dohányfajtámon kipróbáltam. Később megállapítottam, hogy a Virginia dohánylevelek cukortartalma nem csökken természetes szárítási körülmények között sem. Megállapítottam, hogy mind a kombinált, mind a természetes szárítási módszer után a vizsgált dohánylevelek vízben oldható fehérjetartalmának a növekedő tendenciája miatt nem csak a vegetációs periódus végén, hanem a szárítás után is alkalmas lehet a dohánylevél a fehérjetartalom kivonására, illetve a maradék felhasználására a fermentációs periódusban. A vízben oldható fehérjetartalom végig követésével talán sikerült némi támpontot nyújtanom egy esetleges, olyan további kutatáshoz, amely az igen gazdaságosan termesztendő dohánynövénynek a legfontosabb felhasználási területén, a dohányiparon kívül, illetve azzal párhuzamosan való hasznosításával foglalkozik. A kétféle szárítási módszer utáni fermentációs periódusban a biokémiai vizsgálatok, valamint a mikrobiológiai vizsgálatok eredményeit összehasonlítottam. Ez utóbbiban a Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék segített. A mikrobiológiai vizsgálatok során megállapítottam, hogy a Virginia mesterséges szárítása mikrobiológiai szempontból előnyösebb, mint a természetes szárítás, mert az alkalmazott magas hőmérséklet miatt a fermentációba kerülő dohány fertőzöttsége jóval kisebb, mint a természetes szárítás esetében. Az üzemi termesztésű dohány anyalevelek üzemi gépi fermentálás előtti és alatti részletes kémiai, biokémiai és

mikrobiológiai vizsgálatával támpontokat nyújtottam az üzemi fermentálás paramétereinek (elsősorban a redrying kezelés hőmérsékletének) pontosabb beállításához. Mivel mind a Virginia és mind a Burley dohány, kedvező táptalaj lehet a mikroorganizmusok számára, ezért különösen fontos a fermentáció kezdeti nedvességtartalmának szigorú ellenőrzése és folyamatos nyomon követése a későbbi feldolgozási fázisokban is.

7 SUMMARY

The aim of my PhD dissertation was the biochemical studies of eight varieties of Virginia (three varieties) and Burley (five varieties) tobacco cultivars during their cultivation and primary treatment (curing and fermentation). In addition the microbiological studies of tobacco leaves of both own cultivation and industrial cultivation during fermentation were accomplished.

Practically I was the first who measured the activity of so-called stress enzymes (peroxidase, polyphenol oxidase and lipoxygenase), the level of the water soluble polyphenol content (characteristic for the quality of tobacco) and the level of the water soluble protein content (characteristic for the possible use of tobacco for food industry) in eight varieties of Virginia and Burley cultivars during my own cultivation.

By statistic methods in the activity of peroxidase, polyphenol oxidase, the level of the water soluble polyphenol content and the level of the water soluble protein content of tobacco leaves I found significant differences according to their different positions (their age). At the same time I found that tobacco lipoxygenase can not be used to find a convergence between the lipoxygenase isoenzyme compositions of different varieties of tobacco.

I found that a shorter cultivation period (13-14 weeks) is more favourable for tobacco plants as protein source than for tobacco cultivated for industrial use (16-17 weeks). I found slightly increasing protein concentrations for both Virginia and Burley varieties in the curing period of both open-air-curing and combined curing. The end of curing period was found as the most favourable term for protein isolation from different tobacco cultivars.

A new and cheap curing system (named combined-curing) was worked out that was a special combination of open-air-curing and flue-curing methods, especially for Virginia varieties of high sugar content. I used both open-air-curing and combined-curing for all tobacco plants of own cultivation. Later on I found that the open-air-curing did not decrease the high sugar content of Virginia varieties.

On the basis of the comparative biochemical and microbiological studies of the effect of open-air-curing and own combined-curing methods on the fermentation period of tobacco leaves I found that the flue-curing was more advantageous for Virginia of high sugar content because during these longer curing methods the infection of Virginia by different microbes was higher than in the case of flue-curing.

During the biochemical and microbiological studies on the fermentation period of industrial cultivation of tobacco plants I worked out better parameters for flue-curing and fermentation period

than the presently used parameters (especially for the temperature of redrying treatment). As the leaves of both Virginia and Burley are good substrates of microbes, the possibility of infection before the fermentation could be an important parameter. Before and during fermentation and further processes a control of humidity (stronger than it is nowadays) is suggested.

8 MELLÉKLET

8.1 I. Melléklet: Irodalomjegyzék

ABDALLAH F. (1970): Can tobacco quality be measured? Lockwood Publishing Co., Inc., New York, N. Y.

ABDALLAH F. (1974): Sensory testing of cigarette smoke, Panel selection, training, and use; Ph.D. dissertation, North Carolina State University, Raleigh, N. C.

ABDOU EL S., GALAL A., BARNA B. (1993): Changes in lipidperoxidation, superoxide dismutase, peroxidase and lipoxigenase enzyme activities in plant-pathogen interactions. In: Mózsik G, Emerit I, Fehér J, Matkovics B, Vincze A, eds. Oxygen Free Radicals and Scavengers in the Natural Sciences. Budapest: Akadémia Kiadó, February 10-13, 1993, Pécs, 29- 33.

ACQUADRO A., FALVO S., MILA S., ALBO G. A., COMINO C., MOGLIA A., LANTERI S. (2009): Proteomics in globe artichoke: Protein extraction and sample complexity reduction by PEG fractionation. Electrophoresis 30 (9): 1594-1602.

ADELHORST K., BJÖRKLING, F., GODFREYSEN, S. E., KIRK, O. (1990): Enzyme catalysed preparation of 6-O-acylglycopyranoside. Synthesis. 112-115

AKEHURST B. C. (1981): Tobacco (Tropical Agriculture Series), Longman Group Ltd. London 223-265.

ALCAMO E. (1996): Cliffs Quick Review: Microbiology. Wiley Publishing Inc. New York, 119-124.

AMIN A. N. M. (1979): Dynamic transformations of chemical constituents during flue-curing of *Nicotiana tabacum* L. Ph.D thesis, North Carolina State University

ANDERSEN R. A., KASPERBAUER M. J (1973): Chemical Composition of Tobacco Leaves Altered by Near-Ultraviolet and Intensity of Visible Light. Plant Physiol. 51 (4): 723-726.

ANDERSEN R. A., KASPERBAUER M. J., BURTON H. R. (1985): Shade During Growth-Effects on Chemical Composition and Leaf Color of Air-Cured Burley Tobacco. Agr. J. 77 (4): 543-546.

ANDRES S., BOUDOUX R., RENAND J., ZUBER J. (2003): TSNA levels in the mainstream smoke of simplified blend prototypes. Beitr. Tabakf. Intern. 20 (5): 331-340.

BAKER T. S., EISENBERG D. I., EISERLING A., WEISMANN L. (1975): The structure of form 1 crystals of RuDP carboxylase. J. Molec. Biol., 91 (4): 391-399.

- BATA Á., DRASKOVICS I., ETTER L., KOUDELA SZ., NOVÁK E. K., SÁNDOR G., SZIGETI G., TÉREN J., VÁNYI A. (1990):** Mikotoxinok, toxinogén gombák, mikotoxikózisok. Magyar Élelmezéstudományi Egyesület, 227-240.
- BELJAKOVA Z. P. (1966):** Izmenyenyije pigmentov plasztidvontogeneze lisztjev tabaka; Tabak, 2 (4): 41-43.
- BIACS P., GRUIZ K., HOLLÓ J.(1975):** A dohánylipidek vizsgálata.I. A dohánylevél lipidjeinek változása a növény vegetatív fejlődési folyamatában. Dohányip. 22 (3): 105-111.
- BJORKSTEIN H. (1968):** Participation of horseradish oxyperoxidase (compound III) in interenzymic reaction steps. Biochim. Biophys. Acta 151 (2): 309-311.
- BLANC M., KAELIN P., GADANI F. (2002):** Bacillus thuringiensis (Bt) for the control of insect pests in stored tobacco: a review. Beitrage zur Tabakforschung International 20 (1): 15-22.
- BLOCK R. J., BOLLING D. (1951):** „Amino Acid Composition of Protein and Foods” 2nd ed., Charles C. Thomas, Springfield, III. 125-176.
- BLOCK R. J., WEIS K. W. (1956):** „Amino Acid Handbook” Charles C. Thomas, Springfield, III. 21.
- BORSOS J. (2002):** A dohány termesztése és gazdaságkultúrája. Szaktudás Kiadó Ház Rt. Budapest, 49-54, 187-197.
- BROOThAERTS W., McPHERSON J., LI B., RANDALL E., LANE WD., WIERSMA PA (2000):** Fast apple and tobacco leaf polyphenol oxidase activity assay for screening transgenic plants. J. Agric. Food Chem. 48 (12): 5924-5928.
- CHAPLIN J. F., MINER J. S. (1981) :** Tobacco Leaf Chemistry: Its Origin, Understanding and Current Trends. Recent Adv. In Tob. Sci. Proceeding 7, 35th Conference
- CHEN Y., LUO Y., LI X. (2005):** Study on combined treatment of pulp sludge and tobacco residue in compostion. Jiangsu Agr. Sci., 2005 (1): 92-94.
- CHOUTEAU J. (1966):** Pigmentation du tabac sec en fonction de l' alimentation azote'e et patossique de la plante; Role des Polifenols, Ann. S. E. I. T. A. (3): 123-133.
- CHRISTENSEN C. M., KAUFMANN H. H. (1969):** Grain storage the role of fungi in quality loss. Univ. Min. Press. Minneapolis 3-16; 76-93.
- CHUNHUA SHI, YA DAI, BINGLE XIA, XIAOLONG XU, YONG SHU XIE, QINGLIANG LIU (2001):** The Purification and Spectral Properties of Polyphenol oxidase I. from Nicotiana tabacum. Plant Molec. Biol. Rep. 19 (4):381-382.
- CLAYTON R. A. (1959):** Properties of tobacco polyphenol oxidase. Arch. Biochem. Biophys. 81 (2):404-417.

- CONSTABEL CP., BERGEY DR., RYAN CA. (1995):** Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. *Proc Acad Sci. USA* 92 (2): 407-411.
- COURT W. A., HENDEL J. G. (1984):** Changes in leaf pigments during senescence and curing of flue-cured tobacco. *Can. J. Plant Sci.* 64 (1): 229-232.
- COURT W. A., HENDEL J. G. (1985):** Phenolic constituents of flue-cured tobacco at different stages of plant growth. *Tob. International* 187: 32-5.
- COURT W. A., BINNS M. R., HENDEL J. G. (1983):** Examination of the influence of curing and stalk position on the phenolic constituents of flue-cured tobacco. *Tob. Sci.* 27, 51-55.
- COURT W. A., HENDEL, J. G., POCS R. (1993):** Influence of transplanting and harvesting date on the agronomic and chemical characteristics of flue-cured tobacco *Tob. Sci.*, 37, 59-64.
- DAVIS D. L. (1976):** Waxes and lipids in leaf and their relationship to smoking quality and aroma. *Rec. Sci.* 2, 80-111.
- DEMECZKY M., NÉMETHY L., EGRI L., JENEY K., LUMNITZER G., TOLNAY P. (1952):** Dohánykémiai ismeretek Élelmiszeripari Lapkiadó, Budapest, 119.
- DÉVAINÉ K. M.-McINTOSH R. (1986):** Vizsgáló berendezés és mérési módszer a kocsányok hossz-szerinti eloszlásának vizsgálatára, *Dohányip.* 2, 63-68.
- DING CK., CHACHIN K., UEDA Y. (1998):** Purification and properties of polyphenol oxidase from loquat fruit. *J. Agric. Food. Chem.* 46 (10): 4144-4149.
- DONALD W., DE JONG, JAMES A. SAUNDERS (1986):** Fluctuations in Protein level of Tobacco Leaves and Consequences for Extractability. *Beitrag zur Tabakforsch. Internat.* 13 (3): 139-149.
- DONG M. I. SCHMELTZ, E. JACOBS, D. HOFFMAN (1978):** Aza-arenes in tobacco smoke. *J. Anal. Toxicology* 2: 21-25.
- DORNER R.W., KAHN A., WILDMAN S. G. (1957):** The proteins of green leaves 7. Synthesis and decay of the cytoplasmic protein during the life of tobacco leaf. *J. Biol. Chem.* 229: 945.
- DRWIEGA J. (1980):** Changes in the content of carbohydrates in Virginia type tobacco during technological processes. 1. Changes during flue curing. *Biuletyn Informacyjny Centralnego Laboratorium Przemysłu Tytoniowego* No. 1/2. 39-55.
- DUNFOLD H. B., STILLMAN J. S. (1976):** On the function and mechanism of peroxidase. *Coordination Chemistry Reviews*, 19, 187-251.
- ENZELL C. R. (1976):** Terpenoid Components of Leaf and Their Relationship to Smoking and Quality and Aroma. *Rec. Adv. Tob. Sci.* 2, 32-79.
- ENZELL C. R., WAHLBERG I. (1980):** Leaf composition in relation to smoking quality and aroma. *Rec. Adv. Tob. Sci.* 6, 64-122.

- EVERSE J., EVERSE K., GRISHAM H.B. eds (1991):** Peroxidases in Chemistry and Biology CRC Press Boca Raton, 199-220.
- FAO (1957):** Protein requirements. Nutrition studies No. 16, FAO, UN Rome
- FASSATIOVA O. (1984):** Penészek és fonalgombák az alkalmazott mikrobiológiában, Mezőgazdasági Kiadó, 49-52, 107-140, 141-165, 182-188, 193-199.
- FELLER U., ANDERS I., DEMIREVSKA K. (2008):** Degradation of RUBISCO and other chloroplast proteins under abiotic stress. Gen. Appl. Plant Physiology, Special Issue, 34 (1-2), 5-18.
- FEUSSNER, I., WASTERNAK, C. (1998):** Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids. Fett/Lipid 100: 146-152.
- FINZEL, B.C., POULOS T. L., KRAUT J. (1984):**J. Biol. Chem. 259, 13027-13036.
- FLURKEY W. H. (1986):** Polyphenoloxidase in higher plants: immunological detection and analysis of in vitro translation products. Plant Physiol. 81, 614-618.
- FOLKMAYER T. (1970a):** A fermentálás elméleti alapjai I. Dohányújság, 3. 1-8.
- FOLKMAYER T. (1970b):** A fermentálás elméleti alapjai II. Dohányújság, 4. 125-132.
- FRANKENBURG W. G. (1946):** Chemical changes in the harvested tobacco leaf. I. Chemical and enzymatic conversions during the curing process. Adv. Enzymol., 6, 309-87.
- FRANKENBURG W. G. (1949):** The chemistry of tobacco. Southern Chemists, March 1949, 315-30.
- FRANKENBURG W. G. (1950):** Chemical changes in the harvested tobacco leaf. II. Chemical and enzymic conversions during fermentation and aging, Adv. Enzymology 10. 325.
- GANG XIANG, HONGYAN YANG, LIU YANG, XIA ZHANG, QIUE CAO, MINGMING MIAO (2010):** Multivariate statistical analysis of tobacco of different origin, grade and variety according to polyphenols and organic acids. Microchemical J. 95, 198-206.
- GARAGULY G. (1963):** Antibiotikumok hatásának tanulmányozása a dohány TUF. kiképzése során előforduló penész leküzdésekor. Dohányipar, 4. 182.
- GARAGULY G. (1964):** Penészgomba megjelenése mesterséges szárítópajtában. Dohányip. 2. 73.
- GAZARIAN I. G., L. MARK LAGRIMINI, SIMON J. GEORGE, ROGER N. F. THORNELEY (1996):** Anionic tobacco peroxidase is active at extremely low pH. Veratryl alcohol oxidation with a pH optimum of 1,8. Biochem J. 320, 369-372.
- GAZARIAN I. G., LAGRIMINI L.M. (1996):** Purification and unusual kinetic properties of a tobacco anionic peroxidase. Phytochemistry 41, 1029-1034.
- GHABRIAL S. A. (1976):** Studies on the microflora of air-cured Burley tobacco Tobacco Science, Yearbook, Volume XX. 80-82.
- GIOVANNOZZI M. (1961):** Studi sulla fermentazione dei tabacchi. IL. Tabacco. 700. 227.

- GOHEEN D. W., HOYT C.H. (1985):** Lignin. In: Kirk-Othmer Concise Encyclopedia of Chemical Technology, (ed. D. Eckroth) p. 699. John Wiley & Sons, New York
- GOLBECK J. H., CARMARATA K.V. (1981):** Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.* 67, 977-984.
- GOMBKÖTŐ G., SAJGÓ M. (1985):** Biokémia Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1985.
- GONG CHANG-RONG, WANG AI-HUA, WANG SONG-FENG (2006):** Changes of Polyphenols in Tobacco Leaves During the Flue-Curing Orocess and Correlation Analysis in Some Chemical Components; *Agricultural Sciences in China* 5 (12):928-932.
- GRECHKIN A. (1998):** Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog. Lipid Res.* 37, 317-352.
- GREEN C. R., COLBY D. A., COOPER P. J., et al. (1980):** Advances in analytical methodology of leaf and smoke. *Rec. Adv. Tob. Sci.*, 6, 123-83.
- GROB K. (1961):** Analytical determination of the quality of tobacco in Switzerland; *CORESTA Information Bulletin* 1. 89-91.
- GRUIZ K., BIACS P., BEZSILLA B., (1977):** Dohánylipidek vizsgálata II. Érés gyorsítószerek hatása a dohánylevél lipidjeire. *Dohányip.* 24 (3) 94-98.
- GWYNN G. R., McCLURE W. F. (1974):** Differences among tobacco varieties and breeding material in chlorophyll content during curing; *Tob. Sci.*, 18, 1-3.
- GWYNN G. R. (1978):** Chlorophyll disappearance in yellow and green tobaccos; *Tob. Sci.*, 22, 141-143.
- GYŐRIVÁNYI B. (1982):** Dohányszárítás és fermentálás. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest
- HARASZTY Á. (1988):** Növény szervezettan és növényélettan. Tankönyvkiadó, Budapest, 490.
- HORVÁTH S. (1980):** Mikrobiológiai praktikum. Tankönyvkiadó Budapest
- HUI JIANG, CHUNHUA HI, YONGSHU XIE, XIAOLONG XU, QINGLIANG LIU (2003):** Activation of tobacco leaf polyphenol oxidase by sodium dodecyl sulfate. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* Vol. 40, October 350-353.
- HUTCHENSON S. W., BUCHANAN B. B. (1980):** *Plant Physiol.* 66, 1150-1154.
- IZQUIERDO TAMAYO, A.A., MEDEIROS A., COTA R.C. (1958):** Estudios sobre la flora bacteriana del tabaco. *Inst. Nac. Inv. Agron. Bol.* 38:1-36.
- JIMÉNEZ-ATIÉNZAR M., PEDRONO M. A., GARCIA-CARMONA F. (1991):** Activation of polyphenol oxidase by polyamines. *Biochem. Int.* 25, 861-868.
- JOHNSON W. H. (1970):** Characterization of oxidative browning in flue cured tobacco; *Tobacco*, 2, 17.

- JUAN M. RUIZ, ROSA M. RIVERO, INMACULADA LOPEZ-CANTARERO, LUIS ROMERO (2003):** Role of Ca²⁺ in the metabolism of phenolic compounds in tobacco leaves (*Nicotiana tabacum*, L.). *Plant Growth Regulation* 41: 173-177.
- KADER F., ROVEL B., GIRARDIN M., METCHE M. (1997):** Mechanism of browning in fresh highbush blueberry fruit, partial purification and characterization of blueberry polyphenol oxidase. *J. Sci. Food Agric.* 73: 513-516.
- KALIANOS A. G. (1976):** Phenolics and acids in leaf and their relationship to smoking quality and aroma. *Recent Adv. Tobacco Science* 2:61-79.
- KANDRA GY. (1971):** A polifenolok jelentősége és szerepük a dohány szárítás és fermentálás során; *Dohányip.* 18 (4): 165-169.
- KAO CORPORATION (2005):** Reduction of phenolic compound precursors in tobacco. World Intellectual Property Organization WO 099493
- KENNEDY B. F., DE FILIPPIS L.F. (1999):** Physiological and oxidative response to NaCl of the salt tolerant *Grevillea illicifolia* and the salt sensitive *Grevillea arenaria*. *J. Plant Physiol.* 155 (6): 746-754.
- KOEPPE D.E., L.M. ROHRBAUGH, E. L. RICE, S. H. WENDER (1970):** Effect of age and chilling temperatures on the concentration of scopolin and caffeoylquimic acids on tobacco. *Physiol. Plant* 23 (2): 258-66.
- KOSÁRY J., KÉTSZERI D., KERESKÉNYI É., RADVA D. (2006):** A lipoxigenázok izoenzim összetételének változásai a növényekben. 5. Az olajtartalom oxidatív károsodását csökkentő tényezők a különböző céklafajtákban (*Beta vulgaris* L. *SSP Esculeta* var. *rubra*). *Olaj, szappan, kozm.* 55 (2): 65-67.
- KOSÁRY J., SZŐLLŐSI D., FÜSTÖS ZS. (2005):** A lipoxigenázok izoenzim összetételének változásai a növényekben. 4.A tárolt vöröshagyma (*Allium cepa*) minőségének ellenőrzése biokémiai módszerekkel. *Olaj, szappan, kozm.* 54 (1): 18-20.
- KOVÁCS I. (1970):** Dohánygyárak raktározása és anyagmozgatása. *Dohányip.* 17 (4): 161.
- KRETOVICH V. L. (1945):** "A. I. SMIRNOV": (obituary). *Biokhimiia*, 10 (1): 23.
- KUNG S. D., TSO T. C. (1978):** Tobacco as a potential food source and smoke material. *J. Food Sci.* 43 (6): 1844-1847.
- KUNG S. D., SAUNDERS J. A., TSO T.C., VAUGHAN D. A., WOMACK M., STAPLES R.C., BEECHER G. R. (1980):** Tobacco as a potential food source and smoke material: nutritional evaluation of tobacco leaf protein. *J. Food Sci.*, 45 (2): 320-327.
- KÜNSTLER A., KIRÁLY L., POGÁNY M., TÓBIÁS I., GULLNER, G. (2007):** Lipoxigenase and glutathione peroxidase activity in tobacco leaves inoculated with Tobacco mosaic virus., *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 42 (2): 197-207.

- LÁNG F. (Szerk.) (2002):** Növényélettan. A növényi anyagcsere I. Budapest, ELTE Eötvös Kiadó. 998.
- LÁSZTITY R. (1981):** Az élelmiszerbiokémia alapjai. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 202-203.
- LAYNE E. (1957):** Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: Colowick, S. P., Kaplan, N. O., eds. *Methods in Enzymology* 3 447-454 New York, USA: Academic Press Incorporation
- LAYTEN D. D.; NIELSEN M. T. (2002):** Tobacco Production, Chemistry and Technology 104-182, 265-312.
- LEFFINGWELL J. C. (1976):** Nitrogen components of leaf and their relationship to smoking quality and aroma *Rec. Adv. Tob. Sci.* 2, 1-31.
- LI Y.; LI X.; LIN G.; WANG L.; XIANG D.; QIN X. (2009):** Relationship between polyphenol contents and altitude in Hubei flue-cured tobacco leaves. *J. of Hubei University for Nat. Natur. Sci.* ed. 27 (3):. 267-270.
- LONG R. C., WEYBREW J. A. (1981):** Major chemical changes during senescence and curing. *Rec. Adv. Tob. Sci.* 7, 40-74.
- LOWE R. H. (1977):** Crystallization of Fraction I protein from tobacco by a simplified procedure; *FEBS Letters* 78. (1): 98-100.
- LUCAS G. B., POUNDS J. R. (1973):** Aromas of stored tobacco enriched with various microflora. *Tob. Int.* 175 (25): 53-55.
- LUCAS G. B., POUNDS J. R., SNOW J. P. (1973):** Mold control of stored tobacco with propionic and acetic acids. *Tob Int.* 175 (25): 51.
- MASSEY E. D. (2000):** Aflatoxin B1 and tobacco products. *Beitr. zur Tabakforsch. Internat.* 19 (3):. 167-168.
- MAYER AM., HAREL E. (1979):** Polyphenol oxidase in plants. *Phytochem* 18 (2): 193-215.
- MENDEL S., BOURLAS E. C., DEBARDELEBEN M. Z. (1984):** Factors influencing tobacco quality. *Beitr. Tob.* 12 (3): 53-58.
- MÓGER J. (1983):** Új lehetőségek a dohány-növény hasznosításában *Magyar Dohányújság* 46 (1): 24-27.
- MOHAPATRA S. C., JOHNSON W. H.(1980):** Postharvest physiology of bright leaf tobacco. I. Comparative biochemical changes during yellowing and drying phases of during. *Tob. Sci.* 24, 37-39.
- MOORE B.M., FLURKEY W. H. (1990):** Sodium dodecyl sulfate activation of a plant polyphenoloxidase. Effect of sodium dodecyl sulfate on enzymatic and physical characteristics of purified broad bean polyphenol oxidase. *J. Biol. Chem.* 265 (9): 4982-4988.

- MORIN A., POIRIER N., VALLÉE S., PORTER A. (2000):** Methods for confirming the Gram reaction of Gram- variable *Bacillus* species isolated from tobacco. *Beitr. zur Tabakforsch. Intern.* 19 (2): 97-101.
- MUFTUGIL N.(1985):** The peroxidase enzyme activity of some vegetables and its resistance to heat. *J. Sci. Food Agric.* 36 (9): 877-880.
- NÉMETHI L., HALÁSZ (1971):** Nemzetközi együttműködésben végzett fermentálási kísérletek eredményei, *Dohányip.* 5-6: 111-121.
- NYIRED I., FÉSÜS I., DRUCKER T. (1976):** A mikotoxin kutatás és vizsgálat egyes eredményei a takarmányiparban. *Élelm. Ip.* 27 (3): 90.
- OKAZAKI M.F., HINO K., NAGASAWA, Y. MIURA (1982):** Effects of nutritional factors on formation of scopoletin and scopolin in tobacco tissue cultures. *Agr. and Biol. Chem.* 46 (3): 601-607.
- PATTERSON W. R., POULOS T.L. (1995):** Crystal structure of recombinant pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Biochemistry* 34 (13): 4331-4341.
- PAWLOWSKA A. (1973):** Studies on polyphenols in tobacco, 1. Trials to determine the effects of polyphenols on tobacco flavor characteristics. *Biol. Central. Labor. Przem. Tyton* (1-2): 71-81.
- PEDONE S., SELVAGGINI R., FANTOZZI F. (1995):** Leaf protein availability in food: Significance of the binding of phenolic compounds to ribulose-1,5-diphosphate carboxylase. *Lebensmit.-Wissensch. und Techn.* 28 (6): 625-634.
- PENN P. T., A. WEYBREW (1958):** Some factors affecting the content of principal polyphenols. *Tob. Sci.* 2, 268.
- PENN P. T., STEPHENS R.L., WEYBREW J. A. (1958):** The in vitro synthesis of a cherry red pigment. *Tobacco Science* 2, 102-105.
- PETERSON L.W., HUFFAKER R. C. (1975):** Loss of RuBPCase and increase of proteolytic activity during senescence of detached primary barley leaves. *Plant Physiol.* 55 (6):1009-1015.
- PHILLIPS M., BACOT A. M. (1953):** The chemical composition of certain grades of type 11, American flue-cured tobacco; *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 36, 504-524.
- PIERRE V., CHANTAL C. (1973):** La protection du tabac contre les moisissures. *An. du Tab. Paris, SEITA, Sect.* 1-11. 69.
- PITT J.I., HOCKING A.D. (1999):** *Fungi and Food spoilage*, 2nd edn. Chapman and Hall Food Science Book, Aspen Publication, Goithesburg, 69-72, 67-73, 87-95, 189-198, 203-338, 339-416.
- PLATIS D., LABROU, N. E. (2006):** Development of an aqueous two-phase partitioning system for fractionating therapeutic proteins from tobacco extract. *J. Chromat. A*, 1128 (1-2): 114–124.
- POPOVA V., DRACHEV D., OMAR A. (2003):** Main chemical and technological indexes os Burley tobacco. *Scientific works of Anniversary conference 50 years UFT Plovdiv, L.* 370-373.

- POULOS T. L., EDWARDS S. L., WAIRISHI H., GOLD M.H. (1993):** Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å. *J. Biol. Chem.* 268 (6): 4429-4440.
- PYRIKI C. (1959):** Beziehungen zwischen der chemischen Zusammensetzung des Tabaks und den Merkmalen des Rauches; *Ber. Inst. Tabakforsch. Dresden* 6, 66-105.
- PYRIKI C., HOFMANN W. F. (1959):** Über Chinatabake, II. Mitteilung: Die weiteren Merkmale der Tabake und die Wechselbeziehungen zwischen der chemischen Zusammensetzung und der Handelsqualität; *Ber. Inst. Tabakforsch. Dresden* 6, 106-125.
- QUIU L., ZHAO M., LI F., QI W., ZHANG W., YUE X, CUI J. (2003/2004):** Changes in biological activity during artificial fermentation of flue-cured tobacco. *Tob. Sci.* 46, 24-27.
- RAMIREZ C. (1982):** Manual and atlas of the Penicillia. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 223-248, 455-469.
- RICHARDSON A., McDOUGALL G. J. (1997):** A laccase-type polyphenol oxidase from lignifying xylem of tobacco. *Phytochem.* 44 (2): 229-235.
- ROBB D. A. (1984):** Copper Protein and Copper enzyme. , CRC Press. Boca Raton, (Fla).Vol.2. (Lontie R. ed.) 207-241.
- RUBINSTEIN I., PEDERSEN G. W. (2002):** Bacillus species are present in chewing tobacco sold in the United States and evoke plasma exudation from oral mucosa. *Clinical and Diagnostic Lab. Immun.* 9.(5): 1057-1060.
- SANCHEZ-AMAT A., SOLANO F. (1997):** A pluripotent polyphenol oxidase from the melanogenic marine alteromonas shares catalytic capabilities. *Biochem. Biophys. Res Comm.* 240: (3): 787-792.
- SANCHEZ-FERRER A, LAVEDA F., GARCIA-CARMONA F. (1993):** Partial purification of soluble potato polyphenol oxidase by partitioning in an aqueous two-phase system. *J. Agric Food Chem.* 41 (10): 1583-1586.
- SÁRKÁNY S., HARASZTY Á. (1990):** Növényismeret. Tankönyvkiadó, Budapest, 234-245.
- SCHULLER D.J., BAN N. van HUYSTEE R. B., McPHERSON A., POULOS T.L. (1996):** The crystal structure of peanut peroxidase. *Struct.* 4 (3): 311-321.
- SHEEN S. J., CALVERT J. (1968):** Studies on Polyphenol Content, Activities and Isozymes of Polyphenol Oxidase and Peroxidase During Air-curing in Three Tobacco Types. *Plant Physiol.* 44 (2): 199-204.
- SHEEN S. J. (1969):** Quantitative variation in polyphenol content in the green and air-cured leaves of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.): *Tob. Sci.*, 13, 10-12.
- SHEEN S. J. (1973):** Correlation between chlorophyll and Chlorogenic Acid Content in Tobacco Leaves; *Plant Physiol*, 52 (5): 422-426.

- SHEEN S. J., De JONG, D. W., CHAPLIN, J. F. (1979):** Polyphenol accumulation in chlorophyll mutants of tobacco under two cultural practices; Beitr. Tabakforsch. Int. 10 (1): 57-64.
- SHEPTOVITSKY Y.G., BRUDVIG G. W. (1996):** Isolation and Characterization of Spinach Photosystem II. Membrane - associated Catalase and Polyphenol Oxidase. Biochemistry 35 (50): 16255-16263.
- SHMUK A. A. (1953):** The chemistry and technology of tobacco. Published by Pishchepromizdat, Moscow, Vol. 3, 531-602.
- SIEDOW J. N. (1991):** Plant Lipoxygenase: Structure and Function. Annual Review of Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. 42, 145-188.
- SINGLETON V. L., ROSSI J. A. (1965):** Colorimetry of total phenols with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents Am. J. Enol. Vitic. 16 (3): 144-158.
- SMEETON B. W. (1987):** Genetic control of tobacco quality. Rec. Adv. Tob. Sci., 13, 3-26.
- SNOOK M. E., MASON P. F., SISSON V. A. (1986):** Polyphenols in the Nicotiana species. Tob. Sci. 30, 43-49.
- SÖDERHALL I., SÖDERHALL K. (1989):** Purification of polyphenol oxidase from *Daucus carota* cell cultures. Phytochem. 28 (7): 1805-1808.
- SONG Y., LOVE M. H., MURPHY P. (1990):** Subcellular localization of lipoxygenase-1 and -2 in germinating soybean seeds and seedlings. J. Am. Oil Chem. Soc., 67 (12): 961-965.
- SZEDLJAK I., KOSÁRY J., TAR ZS. (2007a):** A lipoxigenázok izoenzim összetételének változásai a növényekben. 8. Különböző dohánytípusok zöld hetyelevelének (*Nicotiana tabacum* L.) vizsgálata betakarításkor biokémiai módszerekkel. Olaj, szappan, kozm. 1., 72-75.
- SZEDLJAK I., SZÁNTAINÉ KÖHEGYI K., KOSÁRY J. (2007b):** Preliminary biochemical studies on a model growing of different tobacco plant (*Nicotiana tabacum* L.) cultivars. Intern. J. of Hort. Sci. (2): 83-87.
- SZEDLJAK I., SZÁNTAINÉ KÖHEGYI K., KOSÁRY J. (2010a):** Biochemical studies on curing and fermentation processing periods of different tobacco plant (*Nicotiana tabacum* L.) cultivars. Beitr. zur Tabakforsch. Intern. 24 (1): 24-28.
- SZEDLJAK I., SZÁNTAINÉ KÖHEGYI K., KOSÁRY J. (2010b):** Study of tobacco plant as a possible nutritive protein source. Acta Alimentaria 3., 149-156.
- SZIGETI G. (1976a):** A takarmányok gombák okozta minőségromlása II. Gabonaipar. 23. 25.
- SZIGETI G. (1976b):** A takarmányok gombák okozta minőségromlása III. Gabonaipar. 24. 70.
- SZIGETI G. (1976c):** A takarmányok gombák okozta minőségromlása IV. Gabonaipar. 25. 134.
- SZIGETI G. (1976d):** Mikotoxinok jelentősége az élelmiszeriparban. Élelm. Ip. 27 (3) 90.
- TERPÓ A. (1987):** Növényrendszertan az ökonómbotanika alapjaival II. Mezőgazdasági Kiadó Budapest, 679-685.

- THIPYAPONG P., STEFFENS J. C. (1997):** Tomato polyphenol oxidase, *Plant Physiol.* 115 (2): 409-418.
- THIPYAPONG P., JOEL DM., STEFFENS JC. (1995):** Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. *Phytochem.* 40 (3): 673-676.
- TIEN M., KIRK T. K. (1988):** Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Meth. In Enzymol.* 161, 238-249.
- TÓTH J. (1973):** Dohányszárítás és fermentálás. Jegyzet. MÉM kiadvány
- TÓTH J. (1975):** A dohány fermentálása. Jegyzet. Dohányipari továbbképző szakbizottság kiadványa
- TSO T. C. (1990):** Production, physiology, and biochemistry of tobacco plant, IDEALS, Inc. 105-134; 487-522; 615-634.
- UBRIZSY G., VÖRÖS J. (1968):** Mezőgazdasági mykológia. Akadémiai Kiadó, Budapest. 430-440, 455.
- VEPRASKAS M. J., MIRER G.S., PEEDING G. F (1986):** Relationship of dense tillage pan, soil properties and supsoiling to tobacco root growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 50 (6):1541-1546.
- WALKER E. K., LEE T. T (1968):** Relationship of phenolic constituents to maturity, stalk position, and certain physical characteristics of flue-cured tobacco. *Can. J. Plant Sci.* 48 (4): 381-391.
- WATSON R. A., FLURKEY W. H. (1986):** Use of contact prints for recording polyphenoloxidase isoenzymes separated by electrophoresis *J. Sci. Food Agricult.* 37 (8): 791-796.
- WEAVING A. C. (1958):** The polyphenols of flue-cured tobacco separation and identification of the major polyphenols. *Tob. Sci.* 2, 1-8.
- WELINDER K. G. (1992):** Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2 (3): 388-393.
- WELTY R E., LUCAS G. B., FLETCHER I.T., YANG H. (1968):** Fungi isolated from tobacco leaves and brown-spot lesions before and after flue-curing. *Appl. Microbiol.* 16 (9):. 1309-1313.
- WELTY R. E., VICKROY G. D. (1975):** Evaluations of cigarettes made with mold-damaged and nondamaged flue-cured tobacco. *Beitr. zur Tabakforsch.* 8 (2): 102-106.
- WELTY R. E., WEEKS W. W. (1976): WESTON T. J. (1969):** Studies on the synthesis of chlorogenic acid in tobacco leaves during flue-curing. *Tobacco Science* 13, 82-85.
- WILDMAN S. G. (1947):** The proteins of green leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 14, 381-413.
- WILDMAN S. G. (1979):** Tobacco, a potential food crop; *Crops and Soils Mag.* 31 (4): 7-9.
- WILKINSON F. B., PHILLIPS M., BACAT A. M. (1954):** Chlorogenic and caffeic acids in certain standard grades of U. S. type 12 tobacco; *J. Assoc, Off, Agri. Chem.* 37, 1004-1012.

- WILLIAMSON R. E., GWYNN G. R. (1982):** Variation of polyphenols in flue-cured tobacco cultivars attributed to location, stalk position and year. *Crop Sci.* 22 (1):144-146.
- WILSON P.J., VAN STADEN J. (1990):** Rhizocaline, rooting co-factors, and the concept of promoters and inhibitors of adventitious rooting- a review. *Annals of Bot.* 66 (4): 479-490.
- WILSON R. A., MOOKHERJEE B. D., VINALS J. F. (1982):** A comparative analysis of the volatile components of Virginia, Burley, Turkish and black tobaccos. Paper presented at 184th National ACS Meeting, sept. 12-17, Kansas City
- WYNDER A., HOFFMANN W. (1967):** Tobacco and tobacco smoke, Academic press, London, 5-38.
- XU X. Y., SUN WS. (2003):** Synthesis of polyphenolic compounds and their effects on tobacco quality. *China Tob. Sci.* 1, 3-5.
- YAN X. F., HAN J. F. (1987):** Research advance in polyphenolic compounds of tobacco. *Acta Agri. Boreali-Sinica.* 2, 31-38.
- YANG H., ZHOU J., WANG Y., YANG C., DUAN F., LUO Z. (2005):** Study on the contents of chlorogenic acid and rutin in the different genotype of flue-cured tobacco leaves. *Tobacco Agri. Sci.* 1, 187-191.
- ZIA U. KHAN, SUHAIL AHMAD, EIMAN MOKADDAS & RACHEL CHANDY (2004):** Tobacco Agar, a New Medium for Differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 42 (10): 4796–4798.
- ZHU ZQ. (1993):** Production, physiology and biochemistry of tobacco. Shanghai, Fareast Press (translation of book written by Zuo TJ).

<http://www.coresta.org>

8.2 II. Melléklet: A felhasznált tápközegek összetétele

1. Tripton-glükóz-élesztőkivonat (TGE agar)

Összetétele (g/l): Trypcasin (5g), Glükóz (1g), Élesztőkivonat (2,5g), Agar (20g),

pH=7,0

Előállítása:

A komponenseket elszuszpendáltam és vízfürdön forralva feloldottam, majd 121°C-on 15 percig sterilizáltam a tápközeget.

2. Malátás agar

A penészgombák izolátumainak telep morfológiai és mikroszkópos morfológiai vizsgálataihoz a MERCK cég portáptalaját, Malátás-agar termékét használtam fel.

Összetétele (g/l): Malátakivonat (30,0 g), Szójaliszt /szójahidrolizátum/ (3,0 g), Agar-agar (15,0 g)

Előállítása:

A felhasználási javaslat szerint 48 g portáptalajot adtam 1 l desztillált vízhez, amelyet vízfürdön való melegítés, feloldás után autoklávban 10 percig 121°C-on sterilizáltam. A táptalaj pH értéke: $5,6 \pm 0,2$; 25°C-on.

3. Bengálrózsa – Klóramfenikol, RBC agar

Szintén a MERCK cég portáptalaját használtam fel, a célom a táptalaj választásánál az volt, hogy a penészek és az élesztők számára megfelelő közeget alkalmazzak. (A klóramfenikol a baktériumok szaporodását gátolta, a bengálrózsa pedig a penészgombák növekedési sebességét mérsékelte, így a gyorsabb növekedési sebességű penésztelepek összenövése nem következett be, ami jobb telepszámlálást eredményezett. Izolátumok gyűjtése is jobban kivitelezhető volt erről a szelektív tápközegről.)

Összetétele (g / l): mikrobiológiai pepton (5,0 g), glükóz (10,0 g), KH_2PO_4 (1,0 g), MgSO_4 (0,5 g), Bengálvörös (0,05 g), Chloramphenicol (0,1 g) Agar-agar (15,5 g)

Előállítása:

A felhasználási javaslat szerint 32,2 g portáptalajt adtam 1 l desztillált vízhez, amelyet vízfürdön oldottam fel, majd autoklávban 15 percig 121°C-on sterilizáltam. A felhasználás előtt 50°C-ra hűtöttem vissza a táptalajt és steril Petri csészébe lemezt öntöttem. (A bengálrózsa fényérzékeny, így az RBC agart, a felületi szélesztéshez kiöntött lemezeket leszáritás után, felhasználásig sötétben kell tárolni). A táptalaj pH értéke: $7,2 \pm 0,2$; 25°C-on.

4. Czapek-Dox-Agar

Mint szintetikus táptalajt alkalmaztuk a fenn említett portáptalajt, melynek a gyártója szintén a Merck cég volt. A legjellemzőbb penészgombák – faj szerinti meghatározásuk céljából - izolálásra kerültek, ennek a célnak megfelelően választottam ezt a táptalajt, amelyet a határozókönyvek a malátás agar mellett a legtöbb penészgomba esetén előírnak a makroszkópos telep morfológiai és a mikroszkopos bélyegek megfigyeléséhez

Összetétele (g / l): NaNO_3 (3,0 g), $\text{K}_2\text{H PO}_4$ (1,0 g), MgSO_4 (0,5 g), FeSO_4 (0,5 g), szacharóz (30,0 g), agar (13,0 g), desztillált víz (1000 ml)

Előállítás:

A felhasználási javaslat szerint 48 g portápközeget adtam 1 l desztillált vízhez, majd vízfürdőn való szuszpendálás, felmelegítés után autoklávban 15 percig 121°C -on sterilizáltam. A táptalaj pH értéke: $7,3 \pm 0,2$; 25°C -on.

5. Clostridiumok tenyésztésére alkalmas RCM tápleves

A tápközeg anaerob mikroorganizmusok tenyésztésére és a Clostridiumok spóráinak felélesztésére alkalmas.

Összetétele (g / l): húsextrakt (10,0 g), pepton (5,0 g), élesztőextrakt (3,0 g), D+ (glükóz) (5,0 g), Keményítő (1,0 g), NaCl (5,0 g), Nátrium- acetát (3,0 g), L- Cysteinum- choline (0,5 g)

Előállítás:

A felhasználási javaslat szerint 33 g portápközeget adtam 1 l desztillált vízhez, vízfürdőn elszuszpendáltam és feloldottam, ezután 10 ml-ként kémcsövekbe adagoltam, majd autoklávban 15 percig 121°C -on sterilizáltam. A táptalaj pH értéke: $6,8 \pm 0,2$; 25°C -on.

6. Sabourand táptalaj

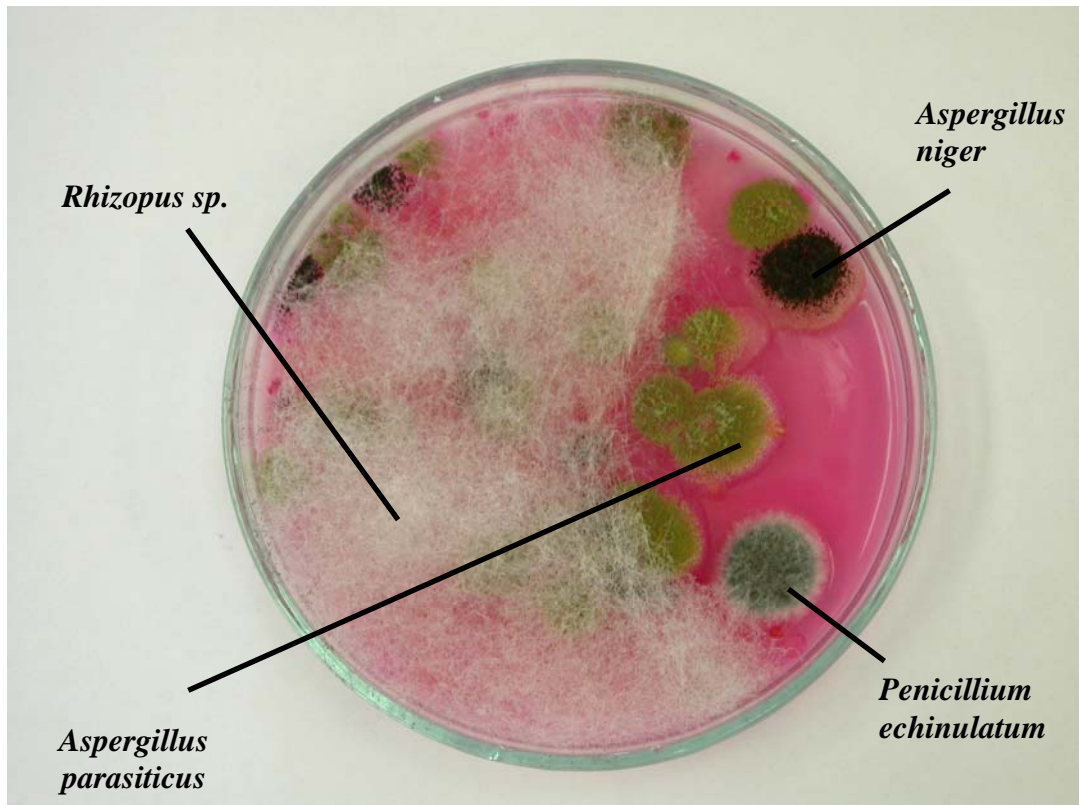
A táptalaj alkalmas a penészgombák törzs-izolátumainak fenntartására, tárolására.

Összetétele (g / l): pepton és casein (5,0 g), pepton és hús (5,0 g), D + (glükóz) (10,0 g), Maltóz (10,0 g), agar-agar (15,0 g)

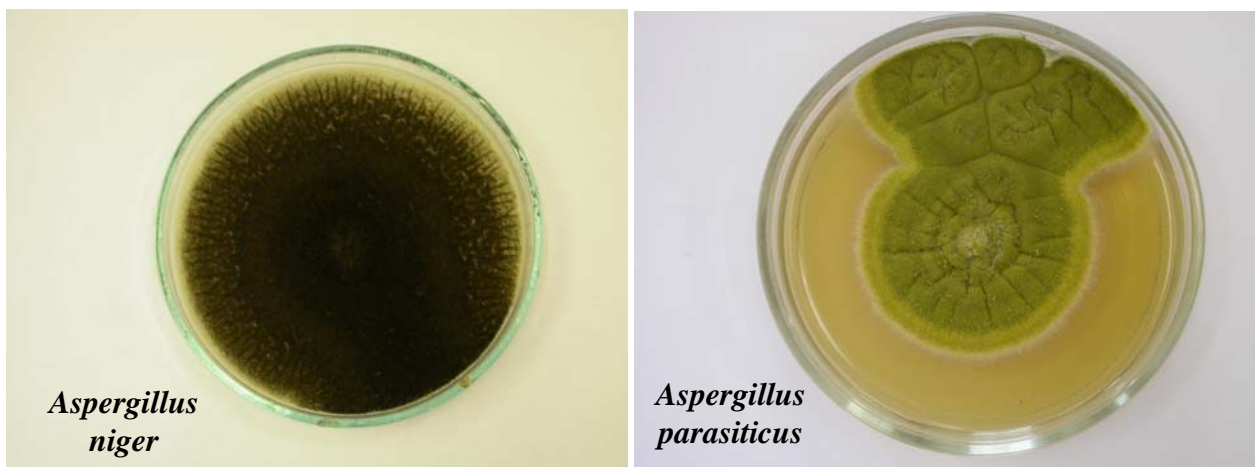
Előállítás:

45 g portápközeget adtam 1 l desztillált vízhez, majd vízfürdőn elszuszpendáltam és feloldottam, ezután pedig autoklávban 15 percig 121°C -on sterilizáltam. A táptalaj pH értéke: $5,4 \pm 0,2$; 25°C -on.

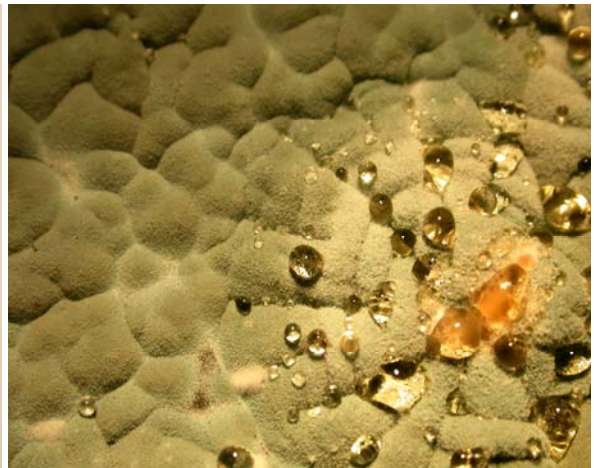
8.3 III. Melléklet: A dohánymintákról izolált és azonosított mikroorganizmusok



Szárított Virginia dohánylevelekről izolált penészgombák RBC tápközegen
(19. táblázat; RDE; 2005)



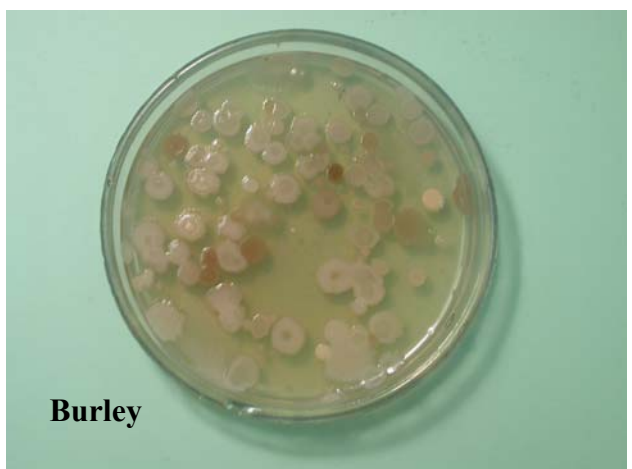
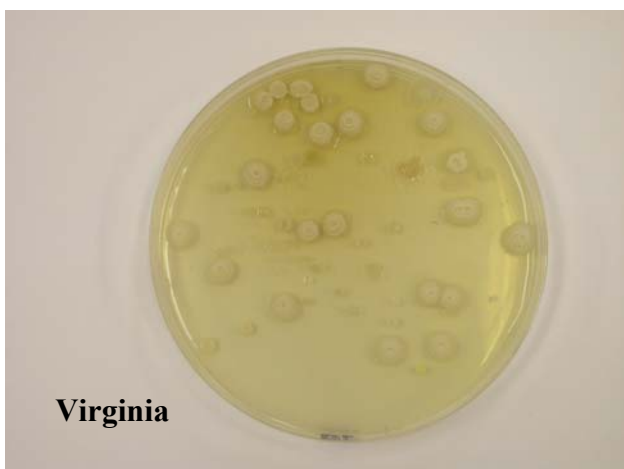
Szárított Burley dohánylevelekről izolált penészgombák Czapek-agaron
(16. táblázat; RDE; 2004)



Fermentált Virginia dohánylevelekről izolált *Penicillium echinulatum* Czapek-agaron
(19. táblázat; FU; 2005)



Szárított Virginia dohánylevelekről izolált *Aspergillus sclerotiorum* Czapek-agaron
(19.táblázat; RDE; 2004)



A fermentált dohánylevelekről izolált aerob spórás baktériumok TGE agaron

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Kosáry Judit** egyetemi tanárnak az MTA doktorának, aki mindenben segített, támogatott a gyakran reménytelennek és kilátástalannak tűnő doktoranduszi munkámban.

Köszönet **Dr. Fodor Péternek**, az MTA doktorának, egyetemi tanárnak az éveken át tartó munkámhoz nyújtott segítségéért.

Köszönetet szeretnék mondani **Szántainé Dr. Kőhegyi Katalin**, egyetemi adjunktusnak, kolléganőmnek és kedves barátomnak kitűnő szakmai tanácsaiért, doktoranduszi munkámban való önzetlen segítségéért. Máig tartó kitartása példaértékű számomra.

Külön köszönet Juhászné **Dr. Román Mariann**, egyetemi docensnek, aki a mikrobiológiai mérésekben önzetlenül segített, éveken át támogatott, szakmai tanácsaival vezette munkámat. Köszönet a **Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék** vezetőjének és dolgozóinak, hogy lehetővé tették számomra, hogy tanszékükön elvégezhessem a hosszadalmas, éveken át tartó mikrobiológiai méréseimet.

Köszönet a **Gabona-és Iparinövény Technológia Tanszék** munkatársainak, akik segítettek, támogatták doktoranduszi munkámat éveken át.

Külön köszönet a **Continental Tobacco Dohányfermentáló Zrt.** munkatársainak, hogy önzetlenül támogatták munkámat, hiszen szakmai támogatásuk nélkül nem készülhetett volna el dolgozatom.

Köszönet kedves kollégáimnak, az **Élelmiszerkémiai és Táplálkozástudományi Tanszék** dolgozóinak, akik nagy türelemmel és önzetlenül segítették munkámat.

Köszönet **családomnak és barátaimnak.**