

A teljes kutatási időszak során a cél nem csak új, tudományos eredmények elérése volt, hanem részben a tudományos diákköri (TDK) munkában, részben pedig a doktorandusz képzésben résztvevő hallgatók beavatása a tudományos kutatásba, illetve az eredmények közzétételébe. Összesen hat magyar és négy angol nyelvű publikáció jelent meg, illetve lett elfogadva közzétételre, ezekben összesen nyolc TDK és két doktorandusz hallgató volt társszerző.

A kutatás első időszakában (2006) TDK hallgatókkal azt vizsgáltuk, hogy a lipoxigenáz (LOX) izoenzim eloszlása a különböző zöldségekben és gyümölcsökben (cékla, feketeribizske, a málna) mennyire jellemző lehet. Eredményeinket két magyar nyelvű közleményben (Olaj, Szappan, Kozmetika 2006) foglaltuk össze. Ezen kívül először előzetes (2006), majd részletes (2007) biokémiai vizsgálatokat végeztünk a rezisztens almafajták hosszan tartó tárolása során olyan paramétereken (glükózból kifejezhető redukáló cukortartalom, almasavban kifejezhető szerves savtartalom, összfenol tartalom, FRAP érték, a növényeket érintő stresszhatások következtében jellemző módon megváltozó enzimaktivitás: peroxidáz, polifenol-oxidáz, LOX, pektin-metil-észteráz), amelyek az utóérésre és az öregedési folyamatokra jellemzők. Eredményeinket egy magyar nyelvű (Olaj, Szappan, Kozmetika 2006) és egy angol nyelvű közleményben jelentettük meg (Acta Alimentaria 2008).

A 2006. évben kezdtük el, és a 2007. évben fejeztük be Szedlák Ildikó doktorandusszal a különböző dohányfajtákkal végzett termesztési és érlelési kísérleteink biokémiai vizsgálatát, amelyet egy magyar (Olaj, Szappan, Kozmetika 2007) és angol nyelvű közleményben publikáltunk (Journal of International Horticultural Sciences 2007). Bár kezdetben a kutatásunkat a dohányiparral kapcsolatos folyóiratok túl tudományosnak, a tudományos fórumok túlságosan ipari jellegűnek találták, egy angol nyelvű közleményünket elfogadta a legrangosabb, a dohánykutatással foglalkozó folyóirat (Beitrag zur Tabakforsch. Int./Contribut. Tobacco Res.), a várható közzételési időpont 2010. Részben közzételési nehézségünk is oka volt annak, hogy a 2008. évben a dohánynövényt, mint fehérjében gazdag, potenciális élelmiszeripari alapanyagot kezdtük tanulmányozni. Megállapítottuk, hogy a dohánynövény egyik zöld fehérje komponense kiválóan alkalmas a tojás hiányában nem megfelelő színű, tönkölyből készült tésztafélék színezésére. A dohányfehérjék ilyen irányú felhasználásával kapcsolatos angol nyelvű cikkünket az Acta Alimentaria a 2008. év végén fogadta el, várható közzételési ideje 2010.

A 2008. évben végzett dohánykutatásunk szorosan összefonódott a reformtáplálkozásban egyre népszerűbb, a koleszterinben gazdag tojás felhasználását nem igénylő, fehérjében gazdag gabonafélék, elsősorban a tönköly biokémiai vizsgálatával. Megállapítottuk, hogy a különböző gabonafélék (búza, durum és tönköly) különböző finomságú őrlményeit jól lehet a LOX izoenzim összetételükkel jellemezni, esetenként minősíteni. Eredményeinket magyar nyelvű közleményben foglaltuk össze (Olaj, Szappan, Kozmetika 2008).

A 2009. évben nyolcféle diófajta különböző módon (természetes és emelt hőmérsékletű, légbefúvatásos) szárított mintáinak (Érdi Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutató-Fejlesztő Kht. Elvira majori kísérleti telepe) avasodási hajlamát vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a különböző szárításmód okozott ugyan némi változást a különböző biokémiai paraméterekben, de ez a változás nem olyan mértékű, amely a mesterséges körülmények között szárított diók gyorsabb avasodásához, azaz minőségromlásához vezetne. Előzetes eredményeinket magyar nyelvű közleményben foglaltuk össze, amely az Olaj, Szappan, Kozmetika folyóirat 2009. évi utolsó számában fog megjelenni. Ezek a kísérleti eredmények esetleg gazdasági haszonnal is kecsegtethetnek, mivel segítségükkel a diófélék gazdaságos szárításának paraméterei biztonságosabban kidolgozhatók. Az együttműködést folytatjuk.

ACTA ALIMENTARIA

Editorial Office

H-1022 BUDAPEST

Herman Ottó u. 15.

HUNGARY

Tel.: (36-1)-3558244/198

Fax: (36-1)-3558928

e-mail: actaalim@cfri.hu

Szedljak Ildikó PhD hallgató

Budapesti Corvinus Egyetem
Alkalmazott Kémia TanszékBudapest

Villányi út 29-43.

1118

Tisztelt Szerző!

Örömmel értesítjük, hogy a Szerkesztőség

SZEDLJAK, I., SZÁNTAI-KŐHEGYI, K., KOSÁRY, J.: Study of tobacco plant as a possible nutritive protein source.

c. cikkét publikálásra elfogadta. A cikk először online-preview formában jelenik meg (a folyóirat előfizetői számára hozzáférhető, idézhető formában, DOI-számmal ellátva). Nyomtatott formában előreláthatóan a folyóirat 38. kötet 3-4. számában fog megjelenni.

Budapest, 2009. február 23.

Üdvözlettel

Dr. Beczner Judit CSc
koordináló szerkesztő

STUDY OF TOBACCO PLANT AS A POSSIBLE NUTRITIVE PROTEIN SOURCE

I. SZEDLJAK^a, K. SZÁNTAINÉ KÖHEGYI^a and J. KOSÁRY^{b*}^aDepartment of Grain and Industrial Plant Technology^bDepartment of Applied Chemistry, Corvinus University of Budapest, H-1518 Budapest, P.O. Box 53. Hungary

The changes in the activity of enzyme polyphenol oxidase, the concentration of total soluble phenolic compounds and soluble protein content in different tobacco cultivars (Virginia and Burley) during cultivation, then in a combined curing model system were studied. The latter was a special combination of air-curing and flue-curing methods followed by a long fermentation period to optimize the treatment of tobacco plants used both as protein sources and starting materials in tobacco industry. The results suggest that a cultivation period of 13-14 weeks could be better for tobacco plants as protein sources, however, for starting materials for industrial use 16-17 weeks are optimal. It was found a four-week curing period could be the best for two tobacco cultivars (Virginia and Burley) in the case of using them both as protein sources and starting materials in tobacco industry.

Keywords: protein source, soluble protein content, polyphenol oxidase, total phenol content, tobacco cultivation and curing

*To whom correspondence should be addressed.

Fax: (36)-1-372-6255; e-mail: judit.kosary@uni-corvinus.hu

Tobacco plant (*Nicotiana tabacum* L.) is used not only in the tobacco industry but also for other purposes. Nicotine in isolated form is a component of sprays in plant protection and this compound is an important agent in the study of different nerve-cell receptors. During smoking active carcinogenic agents can be produced in tobacco products, therefore smoking is considered a dangerous health risk agent. Tobacco leaves as well as other higher plant leaves contain soluble and insoluble proteins which are usually equal in quantity (TSO, 1990). Tobacco leaf proteins are well balanced containing high levels of essential amino acids. Nowadays high protein content, especially soluble protein fraction (F1 and F2 proteins) of the tobacco plant is considered a protein source in nutrition as a supplement. F1 protein is an enzyme called RUBISCO (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase) and F2 protein is a mixture of soluble proteins of both cytoplasmic and chloroplast origin (KUNG et al., 1980).

The effect of the high density plant production and different genotypes of tobacco plant on the biomass and the soluble protein was studied earlier. A significant difference was found in the total protein content of different genotypes (93-146 mg total protein/g dry tobacco plant). The deproteinized fibrous residue of tobacco was planned to use as supplemental animal feed (SHEEN, 1983). For the isolation of tobacco proteins different

methods were studied. For example an aqueous two-phase partitioning system was used for the fractionating of therapeutic proteins from tobacco extract to separate antibodies and enzymes. This method was a part of a research of transgenic plants that are used for the production of desired recombinant proteins (PLATIS & LABROU, 2006). It is possible to isolate soluble proteins before making use of leaf material for starting materials in tobacco industry (KUNG et al., 1980).

Polyphenols and pigments are components influencing tobacco quality and usability (TSO, 1990). Changes in chlorophyll and polyphenol concentration chlorophyll mutants of tobacco Burley were studied but instead of GAE values the results were given in mg/g units (SHEEN et al., 1979). Based on preliminary biochemical studies realized in our laboratory some correlation was found between the concentration of total phenol content and the activity of polyphenol oxidase in green upper leaves of tobacco cultivars, Virginia and Burley (SZEDLJAK et al., 2007b). It was presumed that the study of the activity of the enzymes taking part in the metabolism of polyphenols and pigments (e.g. polyphenol oxidase) could be informative about the quality of tobacco plant and products.

Then we studied the changes in the activity of enzymes polyphenol oxidase and peroxidase and the concentration of total soluble phenolic compounds of different tobacco cultivars (Virginia and Burley) measured in tobacco plants during cultivation. A high polyphenol oxidase activity was found in the increasing and maximum period of total phenol content, then because of the decrease of substrate phenol content the activity of polyphenol oxidase also decreased (SZEDLJAK et al., 2007a). The first review of tobacco polyphenol oxidase was published in 1959 (CLAYTON, 1959). In most of the cases the activity of tobacco polyphenol oxidases was measured in isolated form therefore the comparison of data could be difficult.

Now we studied the changes in the activity of polyphenol oxidase, the concentration of total soluble phenolic compounds and soluble protein content in different tobacco cultivars (Virginia and Burley) during cultivation, then in a combined curing model system, that was a special combination of air-curing and flue-curing methods followed by a long fermentation period to optimize the treatment of tobacco plants used both as protein sources and starting materials in tobacco industry.

Soluble tobacco proteins can be isolated in fractions of different colours (green, brown, tan) (JONG & PITTARELLI, 1991). As a part of our research the chemical properties, biochemical and colour parameters were studied in different milling products and dried pastas made of spelt (*Triticum spelta* L), that had been not examined earlier (SZEDLJAK et al., 2008). We examined the possibility of using the green protein fraction of tobacco as colouring agent of different pastas made from spelt replacing spinach because of its high calcium oxalate content.

1. Materials and methods

1.1. Materials

Chemicals were purchased from SIGMA-ALDRICH Co. and REANAL Finechemical Co. (Budapest, Hungary). Both Virginia (V-TMC1) and Burley (B-TMC2) tobacco cultivars (*Nicotiana tabacum* L.) (V-Tabak Hungarian Tobacco Manufacturing Company, Szolnok, Hungary) were grown in Budapest (Hungary). These variety-names are artificial names given by the business-management of the Company in these double blind tests. The cultivation of these varieties is widely distributed in Hungary.

1.2. Methods

1.2.1. Method of cultivation and curing of tobacco plants. In the cultivation period tobacco seedlings were grown in a seedbed by V-Tabak Hungarian Tobacco Manufacturing Company, Szolnok, Hungary transplanted to individual plastic plant bags (15 l) containing a soil mixture (Palántaföld) of different kinds of peats and composts (GARRI Trade and Service Ltd., Budapest, Hungary) on June 2nd 2006, then they were growing in open-air conditions. The conditions of cultivation were described earlier (SZEDLJAK et al., 2007a). Samplings were taken from upper leaves once a week from August 11th until the harvest (September 29th).

In the curing period upper tobacco leaves were dried in a special store-room for four weeks in a controlled way (20-25 °C and 85-90% relative humidity) without passing air through the samples. In the fermentation period bales containing upper tobacco leaves in agglomerated form were stored for eighteen weeks in a controlled way (20-25 °C and 85-90% relative humidity). Samplings were taken once a week.

A tobacco upper leaf was homogenized, then the extract (0.10 g cm⁻³ in water after centrifugation for 10 min at 4 °C at 10,000 rpm) was made from 5.0 g of the homogenized mixture. Data measured of concentrated aqueous extractions were compared to data of other extractive agents described in the literature and no significant differences were found (SZEDLJAK et al., 2007a).

1.2.2. Measurement of activity of polyphenol oxidase. Polyphenol oxidase (EC 1.14.18.1) activity was detected in sodium acetate (instead of sodium phosphate) buffer (pH 6.5) using pyrocatechol substrate (WATSON & FLURKEY, 1986). One unit of polyphenol oxidase activity was defined as the amount of enzyme that caused 0.01 unit of change in absorbance of the reaction mixture (1.0 ml) in 1 min at 420 nm.

1.2.3. Determination of total phenol content. Total phenol content was measured by the colorimetric method with Folin & Ciocalteu's phenol reagent (SINGLETON & ROSSI, 1965) and the results were expressed in Gallic Acid Equivalent (GAE) value (mmol gallic acid/g dry weight of tobacco leaves).

1.2.4. Determination of protein concentration. Protein concentration was measured by Layne method (LAYNE, 1957).

1.2.5. Determination of water content. Water content of samples were determined by Sartorius M 50 Aquatest instrument. The water content of fresh tobacco leaves was about 90% and their water content decreased to 10% during the fermentation period.

1.3. Statistical analysis

Data of samples were calculated on the dry weight of leaves. Three individual extracts were made in the case of all samples and three different determinations were made from the same extract with a standard deviation $\pm 5\%$.

2. Results and discussion

The changes in the activity of enzyme polyphenol oxidase, the concentration of total soluble phenolic compounds and soluble protein content in different tobacco cultivars (Virginia and Burley) were studied separately during the cultivation period, in the combined curing model system and in the fermentation period.

2.1. Cultivation period

During cultivation in the concentration of total soluble phenolic compounds expressed in GAE value (mmol gallic acid/g dry tobacco) of tobacco leaves we found an increase up to week 12 (0.68 for Virginia and 0.93 for Burley) then a decrease to a quasi-constant level (0.32) (Fig. 1). This was attributed to the balance of the synthesis of phenols and then *via* their degradation the synthesis of colouring agents. The higher maximum total phenol levels in Burley suggest a more intensive synthesis of colouring agents than in Virginia.

Fig. 1.

In polyphenol oxidase activity (U/g dry tobacco) of tobacco leaves we found a high activity at the start of our studies for both Virginia (39835) and Burley (32373) followed by a significant decrease (1880-2321) (Fig. 2). We found high polyphenol oxidase activities only in the increasing and maximum period of the total phenol content.

Fig. 2.

In the tobacco industry protein concentration is often calculated indirectly on the basis of total nitrogen content. Now soluble protein concentration of tobacco samples were determined directly by the Layne method (LAYNE, 1957). We found a dynamic period of increase of soluble protein content of tobacco leaves (mg protein/g dry tobacco) of both Virginia (60.0) and Burley (52.0) up to week 14 followed by a decrease (23.0-20.0). Slightly higher protein concentrations were detected in Virginia than in Burley (Fig. 3). These results suggest that the highest soluble protein content in tobacco plants was at weeks 13-14 of the cultivation period. The traditional cultivation period is longer (16-17 weeks) for tobacco plants used in tobacco industry.

Fig. 3.

2.2. Curing period

In the curing period the changes suggested a combination of a biochemical hydrolysis followed by an oxidation process (Fig. 4). In the concentration of total soluble phenolic compounds the slight increase (0.37→0.41 for Virginia and 0.35→0.43 for Burley) was attributed to the enzymatic hydrolysis liberating of soluble phenol derivatives from their fixed insoluble forms. The following decrease (0.30 for Virginia and 0.21 for Burley) was attributed to their oxidative degradation forming coloured compounds.

Fig. 4.

In this period we found no correlation between the concentration of total soluble phenolic compounds and the decreasing polyphenol oxidase activity data (4470→1231 for Virginia and 10436→2475 for Burley) (Fig. 5). This fact suggests that the role of polyphenol oxidase in the oxidation of phenolic compounds in curing is reduced compared to their direct oxidation by oxygen.

Fig. 5.

We found a slight increase in the soluble protein concentrations (12.0→16.5 for Virginia and 11.0→14.0 for Burley) in the curing period (Fig. 6). This increase could be attributed to the partial hydrolysis of insoluble protein fraction. We found higher soluble protein concentrations in Virginia than in Burley.

Fig. 6.

2.3. Fermentation period

In the long (18 weeks) fermentation period the deactivation of polyphenol oxidase (1200→55 for Virginia and 1820→76 for Burley) taking part in the elimination of the dangerous oxygen species forming could be characteristic for the collapse of the regulation system in tobacco leaves. The decrease in the concentration of total soluble phenolic compounds (0.51→0.29 for Virginia and 0.26→0.04 for Burley) could be attributed to their advanced oxidative degradation during fermentation. The decrease in the concentration of soluble protein content (8.84→4.70 for Virginia and 5.55→3.15 for Burley) could be attributed to the hydrolysis and other degradation processes of soluble proteins. These results suggest that the end of the short curing period (4 weeks) could be the most favourable term for different tobacco cultivars when they are used both as protein sources and starting materials in tobacco industry.

3. Conclusion

As the tobacco plant could be a protein source, the changes in the activity of enzyme polyphenol oxidase, the concentration of total soluble phenolic compounds and soluble protein content in different tobacco cultivars (Virginia and Burley) were studied during the cultivation then a combined curing model system followed by a fermentation period to find the optimum parameters in the treatment of tobacco plants for using both as protein sources and starting materials in tobacco industry. The results suggest that the optimum protein content in tobacco plants was at weeks 13-14 of the cultivation period. The traditional cultivation period is longer (16-17 weeks) for tobacco plants used in tobacco industry. When tobacco plants are used both as protein sources and starting materials in tobacco industry the end of the short, four-week curing period could be the best term for Virginia and Burley tobacco plants.

*

The authors are grateful for the financial support of the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA K63162).

References

- CLAYTON, R.A. (1959): Properties of tobacco polyphenol oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 81, 404-417.
- DE JONG, D.W. & PITTARELLI, G. (1991): Tobacco leaf protein: II. Genetic and fractionation approaches to improving tobacco leaf protein production. *Beitr. Tabakforsch. Int.*, 15, 43-52.
- 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. Fd. Sci.*, 45, 320-327.
- LAYNE, E. (1957): Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. –in: COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O. (Eds.) *Methods in enzymology*. Academic Press Inc., New York, pp 447-454.
- PLATIS, D. & LABROU, N.E. (2006): Development of an aqueous two-phase partitioning system for fractionating therapeutic proteins from tobacco extract. *J. Chromatogr. A*, 1128, 114–124.
- SHEEN, S.J. (1983): Biomass and chemical composition of tobacco plant under high density grown. *Beitr. Tabakforsch. Int.*, 12, 35-42.
- SHEEN, S.J., DEJONG, D.W. & CHAPLIN, J.F. (1979): Polyphenol accumulation in chlorophyll mutants of tobacco under two cultural practices. *Beitr. Tabakforsch. Int.*, 10, 57-64.
- SINGLETON, V.L. & ROSSI, J.A. (1965): Colorimetry of total phenols with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158.
- SZEDLJAK I., MAKÁR F., KOLLÁR A. & KOSÁRY J. (2008): A lipoxigenázok izoenzim összetételének változásai a növényekben. 9. A tönkölybúza (*Triticum spelta* L.) vizsgálata biokémiai módszerekkel. (Changes in the composition of lipoxygenase isoenzymes in plants. 8. Using biochemical methods for the study of spelt (*Triticum spelta* L.). *Olaj, Szappan, Kozm.* (accepted for publication).
- SZEDLJAK, I., SZÁNTAINÉ KÖHEGYI, K. & KOSÁRY J. (2007a): Preliminary biochemical studies on a model growing of different tobacco plant (*Nicotiana tabacum* L.) cultivars. *Int. J. hort. Sci.*, 13, 83-87.
- SZEDLJAK, I., TAR, Z. & KOSÁRY, J. (2007b): A lipoxigenázok izoenzim összetételének változásai a növényekben. 8. Különböző dohánytípusok zöld hegyleveleinek (*Nicotiana tabacum* L.) vizsgálata betakarításkor biokémiai módszerekkel. [Changes in the

composition of lipoxygenase isoenzymes in plants. 8. Using biochemical methods for the study of green tobacco upper leaves (*Nicotiana tabacum* L.) of different cultivars]. *Olah, Szappan, Kozm.*, 56, 72-75.

TSO, T.C. (1990): Production, physiology and biochemistry of tobacco plant. IDEALS, Inc., Beltsville, Maryland, pp. 533-557.

WATSON, R.A. & FLURKEY, W.H. (1986): Use of contact prints for recording polyphenoloxidase isoenzymes separated by electrophoresis. *J. Sci. Fd. Agric.*, 37, 791-796.

Captions

Fig. 1. Changes in the concentration of total soluble phenolic compounds expressed in GAE value (mmol gallic acid/g dry tobacco) in Virginia and Burley tobacco plants during cultivation. ♦: Virginia; ■: Burley

Fig. 2. Changes in polyphenol oxidase (PPO) activity (U/g dry tobacco) in Virginia and Burley tobacco plants during cultivation. ♦: Virginia; ■: Burley

Fig. 3. Changes in soluble protein content (mg protein/g dry tobacco) in Virginia and Burley tobacco plants during cultivation. ♦: Virginia; ■: Burley

Fig. 4. Changes in the concentration of total soluble phenolic compounds expressed in GAE value (mmol gallic acid/g dry tobacco) in Virginia and Burley tobacco plants during our combined curing model system. ♦: Virginia; ■: Burley

Fig. 5. Changes in polyphenol oxidase (PPO) activity (U/g dry tobacco) in Virginia and Burley tobacco plants during our combined curing model system. ♦: Virginia; ■: Burley

Fig. 6. Changes in soluble protein content (mg protein/g dry tobacco) in Virginia and Burley tobacco plants during our combined curing model system. ◆: Virginia; ■: Burley

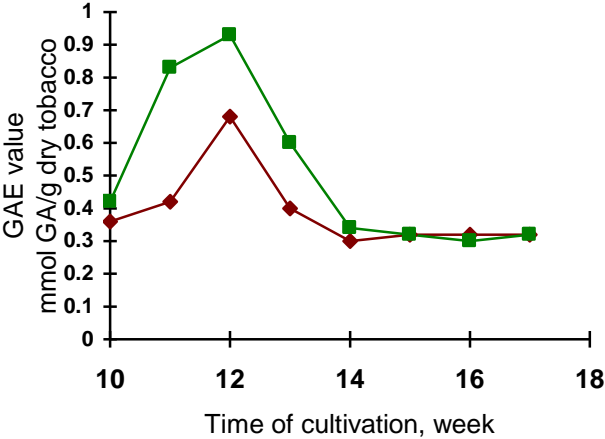


Fig. 1.

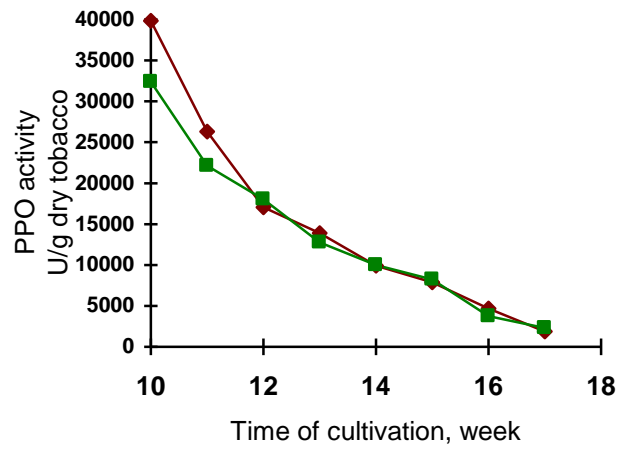


Fig. 2.

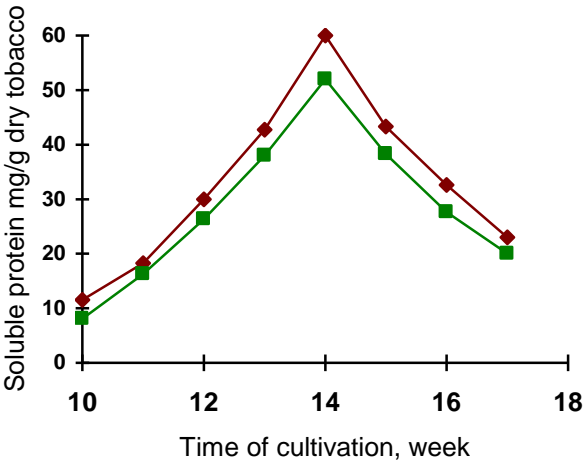


Fig. 3.

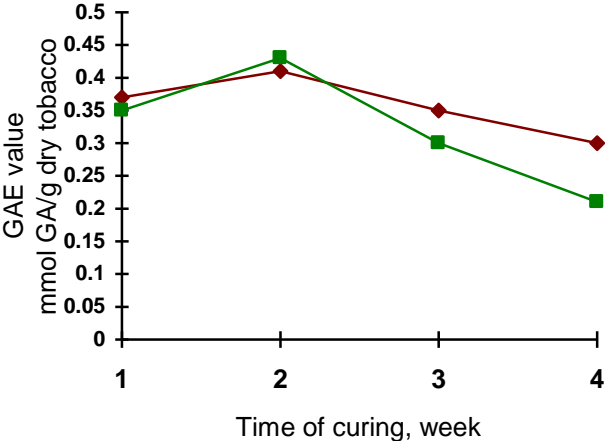


Fig. 4.

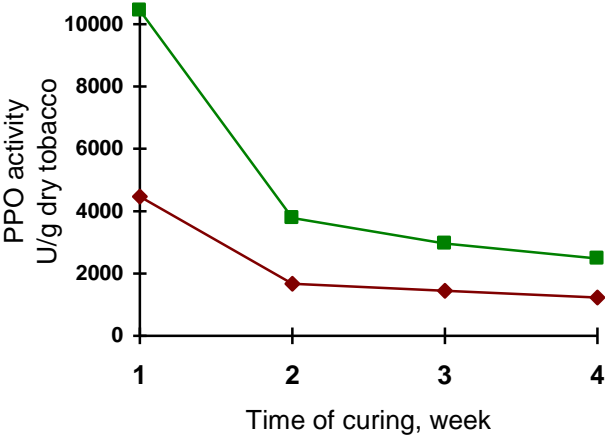


Fig. 5.

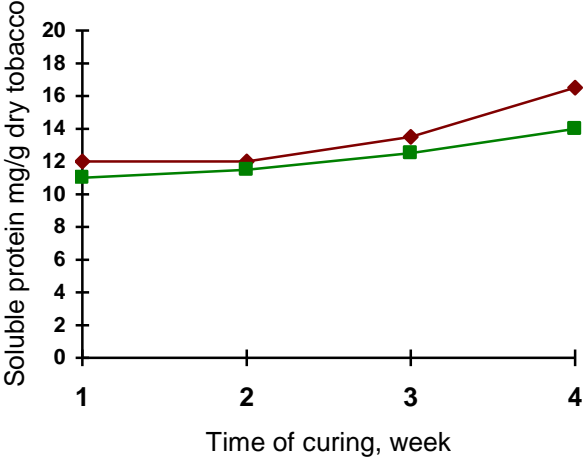


Fig. 6.

: Again about the Manuscript-Kosáry

Subject: Re: Again about the Manuscript-Kosáry
From: MuellerB <MuellerB@beitraege-bti.de>
Date: Wed, 01 Jul 2009 18:53:25 +0200
To: Kosáry Judit <judit.kosary@uni-corvinus.hu>

Dear Professor Kosary,

I would like to inform you that I have sent you an e-mail containing the acceptance of your manuscript on April 23, 2009. It was sent to your t-online e-mail address.

Your manuscript has been accepted for publication by the Editorial Board. It will be published in our issue 1 of Vol. 24 which will appear in January 2010.

Kind regards
Yours
Brigitte Mueller

Kosáry Judit schrieb:
THE EDITORIAL OFFICE

BEITRÄGE ZUR Tabakforschung International
Contributions to tobacco research

June 29th 2009.

Dear Brigitte Müller,

About a week ago I sent you an e-mail from my home address (jkosary@t-online.hu), that four months ago (Feb 10th 2009.) I sent you our revised manuscript (Biochemical studies on curing and fermentation processing periods of different tobacco plant (*Nicotiana tabacum* L.) cultivars.) with the notices to the Reviewers, both by mail and in file form. In the answer (Feb 17th 2009.) you promised me a quick reflection, but I have not got the decision of the Advisory Board about the manuscript. Could you write me that the manuscript was accepted or refused?

Yours sincerely

Professor Judit Kosáry

Biochemical studies on curing and fermentation processing periods of different tobacco plant (*Nicotiana tabacum* L.) cultivars

By

*Ildikó Szedlják¹, Katalin Szántainé Kőhegyi¹ and Judit Kosáry*²*

Corvinus University of Budapest, Faculty of Food Sciences, H-1518, P.O.B. 53, Hungary

¹Department of Grain and Industrial Plant Technology

²Department of Applied Chemistry

SUMMARY

We studied the changes in the activity of enzymes polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POX), the concentration of total soluble phenolic compounds and soluble protein content in different tobacco cultivars (Virginia and Burley) during curing that was a special combination of air-curing and flue-curing methods and a long fermentation period. In the curing period the changes in data suggested a combination of the biochemical processes and the direct effect of oxygen. A slight increase then a decrease in the concentrations of both total soluble phenolic compounds and the soluble protein content were detected. In this period we found no correlation between the concentration of total soluble phenolic compounds, the decreasing PPO and the increasing POX activity. In the fermentation period a deactivation of the enzymes (PPO and POX) and a decrease in the concentration of both total soluble phenolic compounds and soluble protein content were found. These results suggest that the end of curing period is the most favourable term for protein isolation from different tobacco cultivars.

INTRODUCTION

Tobacco plant (*Nicotiana tabacum* L.) is used not only in the tobacco industry but also for other purposes. The biochemical study of different important tobacco components could be useful. Polyphenols and pigments are components influencing tobacco quality and usability. It was presumed that the study of the activity of the enzymes taking part in the metabolism of polyphenols and pigments (e.g. polyphenol oxidase) could be informative about the quality of tobacco plant and products. The concentration of phenol derivatives in tobacco plant is determined by the balance of their synthesis and degradation (1).

Polyphenol oxidases (PPO) (EC 1.14.18.1) are copper enzymes using molecular oxygen in the catalysis of the oxidative degradation of dihydroxybenzol (pyrocatechol and hydroquinon) derivatives (synthesized by the oxidation of phenol content) to quinones, that can polymerize spontaneously to different pigments (e.g. melanines). These processes can be useful in tobacco (by enrichment in colour and quality agents). On the other hand it can cause a deterioration in nutrient quality of fruits and vegetables (by enzymatic browning) (2). In the case of various stress conditions in the accumulation and oxidation of different polyphenol derivatives undesirable toxic active oxygen species could form therefore the activity of special enzymes, above all peroxidases (POX) (EC 1.11.1.7) for the degradation of these dangerous species was also increased (3).

Tobacco leaves as well as other higher plant leaves contain soluble and insoluble proteins which are usually equal in quantity. It was found that the water soluble protein fraction of tobacco leaves is well balanced containing high levels of essential amino acids,

therefore it is considered a protein source in nutrition (4). After isolation of soluble proteins the residual leaf material can be used in the tobacco industry (5).

We found only a few publications about the biochemical studies on growing tobacco plants and on tobacco leaves during and after curing processes. The changes of phenol derivatives in tobacco leaves during flue-curing process were studied by Chinese researchers and found a rapid enhance in the first 24 h of curing then a decrease until 72 h. At the end of curing an increase again was detected. The changes in PPO and POX activity were the opposite (6). Earlier we studied the changes in the activity of enzymes PPO and POX, the concentration of total soluble phenolic compounds and soluble protein content of different tobacco cultivars (Virginia and Burley) measured in tobacco plants during cultivation. We found some correlation between the concentration of total soluble phenolic compounds and PPO activity data (7).

Now we studied the changes in the activity of enzymes PPO and POX, the concentration of total soluble phenolic compounds and soluble protein content of different tobacco cultivars during a curing process, that was a special combination of air-curing and flue-curing methods followed by a long fermentation period.

MATERIALS AND METHODS

Material

The green upper and bottom leaves of tobacco cultivars (*Nicotiana tabacum* L.) Virginia and Burley were given by V-Tabak Hungarian Tobacco Manufacturing Company, Szolnok, Hungary in the autumn of 2005 (30.09.2005) and the curing was started on the same day. For biochemical studies the tobacco leaves were homogenized and the extracts (0.10 g ml⁻¹ in water after centrifugation for 10 min at 4 °C at 10,000 rpm) were made. Chemicals were purchased from SIGMA-ALDRICH Co. and REANAL Finechemical Co., (Budapest, Hungary).

Methods

In the curing period tobacco leaves (upper and bottom leaves separately) were dried in a special store-room for four weeks in a controlled way (20-25 °C and 85-90% relative humidity) without passing air through the samples. In the fermentation period bales containing a mixture of upper and bottom tobacco leaves in agglomerated form were stored for eighteen weeks in a controlled way (20-25 °C and 85-90% relative humidity). Samplings were taken in every weeks.

POX activity of the extracts was determined using *o*-dianisidine as hydrogen donor in sodium acetate (pH 5.1) (8). One unit of POX activity was defined as the amount of enzyme that caused decomposition of 1 μmole hydrogen peroxide in the reaction mixture (1.0 ml) in 1 min.

PPO activity was detected in sodium acetate (instead of sodium phosphate) buffer (pH 6.5) using pyrocatechol substrate (9). One unit of PPO activity was defined as the amount of enzyme that caused 0.01 unit of change in absorbance of the reaction mixture (1.0 ml) in 1 min at 420 nm.

Total phenol content was measured by the colorimetric method with Folin & Ciocalteu's phenol reagent (10) and the results were expressed in Gallic Acid Equivalent (GAE) value (mmol gallic acid dry weight of tobacco leaves g⁻¹).

Protein concentration was measured by Layne method (11). Data of samples were calculated on the dry weight of leaves. Water content of samples were determined by Sartorius

M 50 Aquatest instrument. The results are given as the average values of four replications with a standard deviation $\pm 5\%$.

RESULTS AND DISCUSSION

Samplings were taken every weeks during the curing and fermentation periods. Originally for the samples complex extraction methods were generally used by Tris-acetate buffer and surfactants followed by a partial purification before the analysis of the samples (12). But earlier we found that because of the presence of the hydrophobic components in food industrial raw materials of plant origin a concentrated aqueous solution (0.50 g ml^{-1} in water) could be used for the measurement of the activity of enzymes with acidic and neutral pH optima and the total phenol content of the samples without previous purification (13). Because of the relatively low water content of tobacco plant (lower than in fruits) aqueous solutions were only 0.10 g ml^{-1} in water. Data measured of concentrated aqueous extractions were compared to data of other extractive agents described in the literature and no significant differences were found.

The results of our combined curing model system

The first step of tobacco leaf processing is the curing. There are two different types of drying of tobacco leaves as far as the applied curing technologies are concerned: air-curing and

flue-curing. Air-curing is also referred to as „natural” curing because environmental conditions during curing are largely determined by the prevailing weather. Flue-curing is primarily controlled by the air temperature and the amount of dry air that passes through the mass of tobacco (1). Our model system was a special combination of air-curing and flue-curing methods: tobacco leaves (upper and bottom leaves separately) were dried in a special store-room for four weeks under controlled circumstances ($20\text{-}25 \text{ }^\circ\text{C}$ and $85\text{-}90\%$ relative humidity) without passing air through the leaves.

In the concentration of total soluble phenolic compounds expressed in GAE value ($\text{mmol gallic acid dry tobacco g}^{-1}$) of tobacco leaves in curing we found a slight increase from 30.09.

(0.35-0.37 for upper and 0.12-0.22 for bottom leaves) to 07.10. (0.41-0.43 for upper and 0.38-0.41 for bottom leaves) followed by a decrease until 21.10. (0.21-0.30 for upper and 0.22-0.24 for bottom leaves) (Figure 1). The increase was attributed to the hydrolysis deliberating of soluble phenolic compounds from their fixed insoluble forms. The decrease of total soluble phenolic compound content was attributed to their oxidative degradation to synthesize of colouring agents.

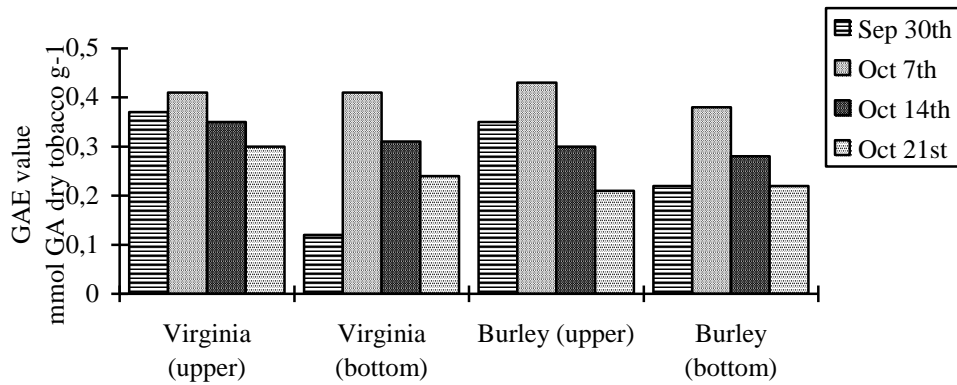


Figure 1. Changes in the concentration of total soluble phenolic compounds expressed in GAE value (mmol gallic acid dry tobacco g⁻¹) in upper and bottom leaves of Virginia and Burley tobacco cultivars during our combined curing model system

In PPO activity (U dry tobacco g⁻¹) of tobacco leaves in curing at the start of our studies (30.09.) we found a high activity (4470 for Virginia and 10436 for Burley) in upper leaves (the younger) and low activity in bottom leaves (the older) (94 for both Virginia and Burley) then a radical decrease in both upper leaves (1231 for Virginia and 2475 for Burley at 21.10.) and bottom leaves (61 for Virginia and 65 for Burley at 21.10.) was detected (Figure 2). We found no correlation between the concentration of total soluble phenolic compounds and the PPO activity data. This suggests a direct oxidation of phenolic compounds instead of enzymatic oxidation catalysed by PPO in curing.

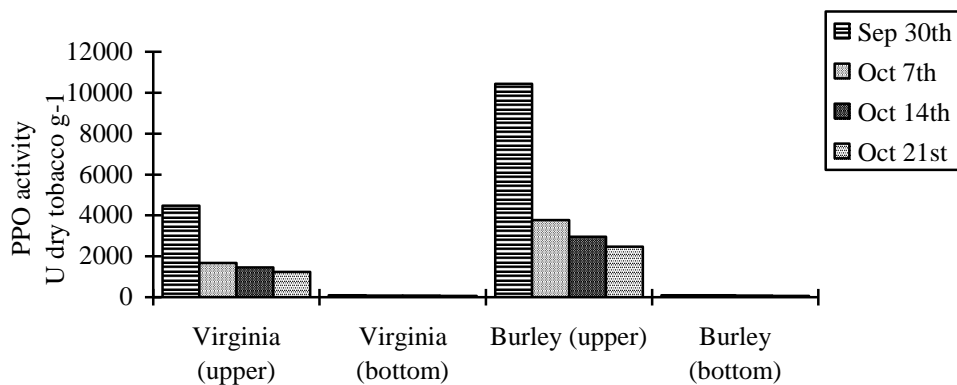


Figure 2. Changes in PPO activity (U dry tobacco g⁻¹) in upper and bottom leaves of Virginia and Burley tobacco cultivars during our combined curing model system

The continuous increase (in upper leaves from 303 to 1767 for Virginia and from 394 to 985 for Burley; in bottom leaves from 38 to 205 for Virginia and from 14 to 97 for Burley) in POX activity ($\mu\text{mol min}^{-1}$ dry tobacco g⁻¹) of tobacco leaves in curing could be

characteristic for a stress situation (Figure 3). Similar deviation was found earlier in change of POX and PPO activity of tobacco leaves during cultivation (7).

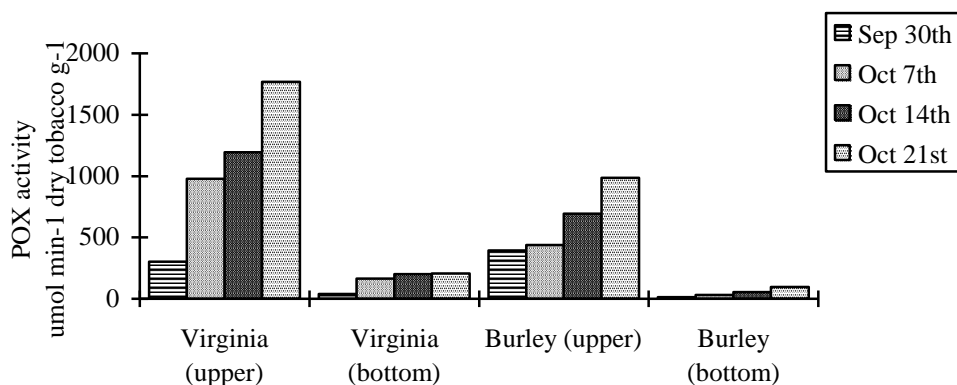


Figure 3. Changes in POX activity ($\mu\text{mol min}^{-1}$ dry tobacco g^{-1}) in upper and bottom leaves of Virginia and Burley tobacco cultivars during our combined curing model system

In the tobacco industry protein concentration is calculated generally in an indirect way on the basis of total nitrogen content or by amino acid analysis. Above protein nitrogen the total nitrogen content contains also alkaloid and nitrate nitrogen content. Now the soluble protein concentration of tobacco samples were determined directly by the Layne method using biuret for calibration (11).

In the concentration of soluble protein content ($\text{mg protein dry tobacco g}^{-1}$) of tobacco leaves in curing we found a continuous enhance in upper leaves (from 12 to 16.5 for Virginia and from 11.0 to 14.0 for Burley). In bottom leaves we found a slight enhance from 30.09. (9.3) to 07.10. (10.4) for Virginia and from 30.09. (8.8) to 14.10. (11.0) for Burley followed by a decrease until 21.10. (9.8 for Virginia and 9.9 for Burley) (Figure 4). The increase was attributed to the partial hydrolysis of insoluble protein fraction and the decrease in bottom leaves to the further hydrolysis of soluble proteins to amino acids.

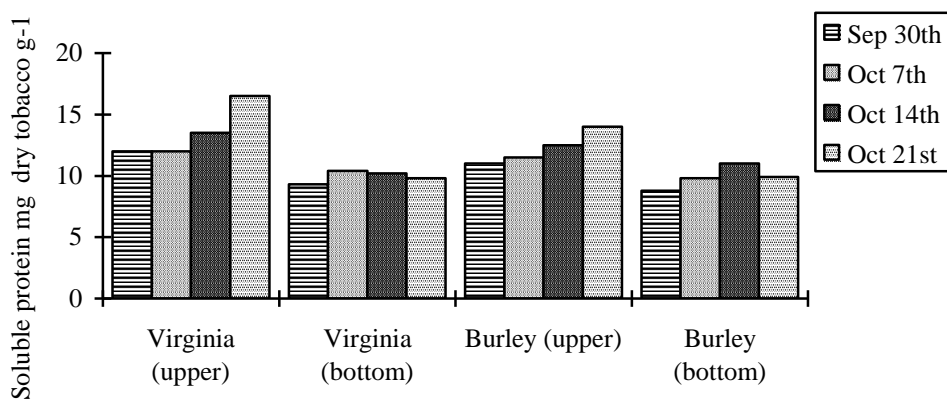


Figure 4. Changes in soluble protein content (mg protein dry tobacco g⁻¹) in upper and bottom leaves of Virginia and Burley tobacco cultivars during our combined curing model system

The results of our twenty-week long fermentation model system

The second stage of tobacco leaf processing was the fermentation. In our eighteen-week long model system bales containing a mixture of upper and bottom tobacco leaves in agglomerated form were stored under controlled circumstances (20-25 °C and 85-90% relative humidity). In our laboratory fermentation model the tobacco leaves were agglomerated by hand-press therefore the presence of air in bales was considerable. The samples were taken from the inside part of the bales and not only the activity of enzymes PPO and POX, the concentration of total soluble phenolic compounds and soluble protein content, but also the pH values of the samples were measured.

We found a slight decrease (from 5.5 to 5.1) in pH values of Virginia samples and a slight enhance (from 6.1 to 6.5) in Burley samples (Figure 5).

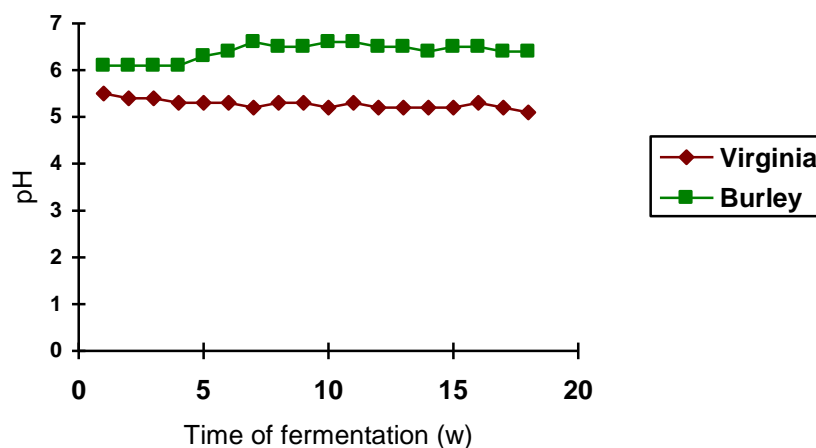


Figure 5. Changes in pH values in the bales of Virginia and Burley tobacco leaves in the fermentation model

In the concentration of total soluble phenolic compounds expressed in GAE value (mmol gallic acid dry tobacco g⁻¹) of tobacco leaves we found a continuous decrease (from 0.51 to 0.29 for Virginia and from 0.26 to 0.04 for Burley) in our fermentation model (Figure 6). We suppose that during fermentation the presence of the air was enough for the oxidative degradation phenolic compounds.

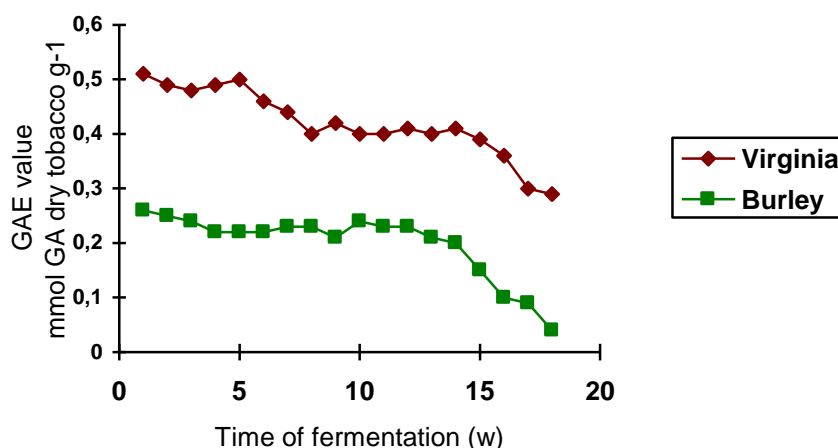


Figure 6. Changes in the concentration of total soluble phenolic compounds expressed in GAE value (mmol gallic acid dry tobacco g⁻¹) in the bales of Virginia and Burley tobacco leaves in the fermentation model

We found a further radical decrease in PPO activity (U dry tobacco g⁻¹) of tobacco leaves (from 1200 to 55 for Virginia and from 1820 to 76 for Burley) in our fermentation model (Figure 7). This fact suggests a direct oxidation of phenolic compounds instead of enzymatic oxidation catalysed by PPO not only in curing model but also in fermentation model. We found a rapid decrease in POX activity ($\mu\text{mol min}^{-1}$ dry tobacco g⁻¹) of tobacco leaves during fermentation. From 525 for Virginia and 209 for Burley POX activity values diminished to zero practically in three weeks. The deactivation of the enzymes (PPO and POX) taking part in the elimination of the dangerous oxygen species forming in stress situations could be characteristic for the collapse of the regulation system in tobacco leaves during fermentation.

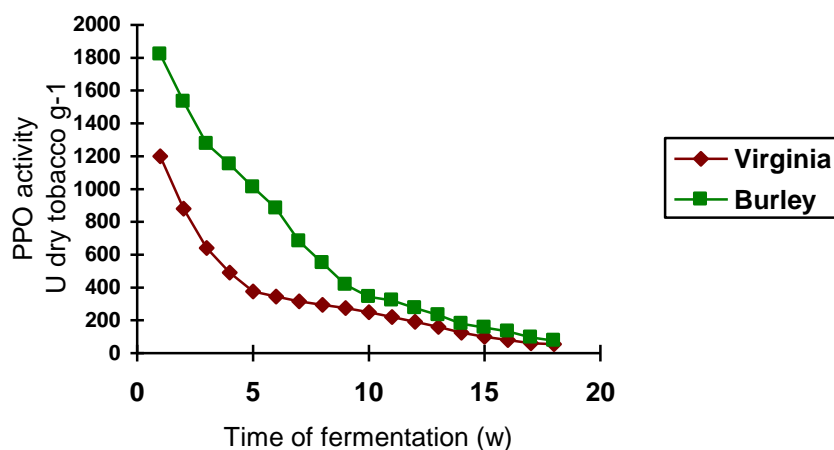


Figure 7. Changes in PPO activity (U dry tobacco g⁻¹) in the bales of Virginia and Burley tobacco leaves in the fermentation model

Because of the further hydrolysis of soluble proteins to amino acids we found a continuous decrease (from 8.84 to 4.70 for Virginia and from 5.55 to 3.15 for Burley) in the concentration of soluble protein content (mg protein dry tobacco g⁻¹) of tobacco leaves in our

fermentation model (Figure 8). The difference in the rate of the hydrolysis in different tobacco cultivars could be attributed to the differences in their pH values.

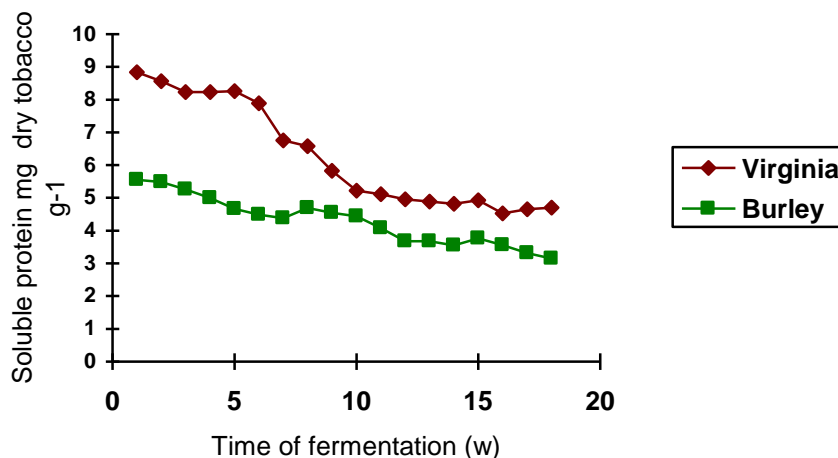


Figure 8. Changes in soluble protein content (mg protein dry tobacco g⁻¹) in bales of Virginia and Burley tobacco leaves in the fermentation model

CONCLUSION

We studied the changes in the activity of enzymes PPO and POX, the concentration of total soluble phenolic compounds and soluble protein content in different tobacco cultivars (Virginia and Burley) during curing that was a special combination of air-curing and flue-curing methods and a long fermentation period.

In the curing period the changes in data suggested a combination of the biochemical processes and the direct effect of oxygen. In the concentration of total soluble phenolic compounds the slight increase was attributed to the enzymatic hydrolysis deliberating of soluble phenol derivatives from their fixed insoluble forms. The following decrease was attributed to their oxidative degradation forming coloured compounds. In this period we found no correlation between the concentration of total soluble phenolic compounds and the decreasing PPO activity data. This fact suggests a direct oxidation of phenolic compounds instead of enzymatic oxidation catalysed by PPO in curing. The continuous increase of POX activity in tobacco leaves could be characteristic for the presence of oxygen.

The slight increase then a decrease in the soluble protein concentrations in the curing period could be attributed to the partial hydrolysis of insoluble protein fraction followed by the further hydrolysis of soluble proteins to amino acids. We found higher soluble protein concentrations in Virginia than in Burley. The difference in the rate of the hydrolysis in different tobacco cultivars could be attributed to the differences in their pH values.

In fermentation period the deactivation of the enzymes (PPO and POX) taking part in the elimination of the dangerous oxygen species forming could be characteristic for the collapse of the regulation system in tobacco leaves. The decrease in the concentration of both total soluble phenolic compounds and soluble protein content could be attributed to their advanced oxidative degradation during fermentation. These results suggest that the end of curing period is the most favourable term for protein isolation from different tobacco cultivars.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks are due to the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA K63162) for supporting this research and to Tar, Z. for technical assistance.

REFERENCES

1. Tso, T.C.: Production, physiology and biochemistry of tobacco plant; IDEALS, Inc., Beltsville, Maryland, USA, 1990, pp. 533-557.
2. Shi, C., Y. Dau, X. Xu, Y. Xie and Q. Liu: The purification of polyphenol oxidase from tobacco; *Protein Expr. Pur.* 24 (2002) 51-55.
3. Camacho-Cristóbal, J.J., D. Anzellotti and A. González-Fontes: Changes in phenolic metabolism of tobacco plants during short-term boron deficiency; *Plant Physiol. Biochem.* 40 (2002) 997-1002.
4. Kung, S.D., J.A. Saunders, T.C. Tso, D.A. Vaughan, M. Womack, R.C. Staples and G.R. Beecher: Tobacco as a potential food source and smoke material: nutritional evaluation of tobacco leaf protein; *J. Food Sci.* 45 (1980) 320-327.
5. Tso, T.C.: Tobacco research and its relevance to science, medicine and industry. *Beitr. Tabakforsch. Int.* 22 (2006) 133-146.
6. Gong, C.-R., A.-H. Wang and S.-F. Wang: Changes of polyphenols in tobacco leaves during the flue-curing process and correlation analysis on some chemical components; *Agricult. Sci. China* 5 (2006) 928-932.
7. Szedljak, I., K. Szántainé Kőhegyi and J. Kosáry: Preliminary biochemical studies on a model growing of different tobacco plant (*Nicotiana tabacum* L.) cultivars. *J. Int. Horticult. Sci.* 13 (2007) 7-10.
8. Bjorkstein, H.: Participation of horseradish oxyperoxidase (compound III) in interenzymic reaction steps; *Biochim. Biophys. Acta* 151 (1968) 309-311.
9. Watson, R.A. and W.H. Flurkey: Use of contact prints for recording polyphenoloxidase isoenzymes separated by electrophoresis; *J. Sci. Food Agricult.* 37 (1986) 791-796.
10. Singleton, V.L. and J.A. Rossi: Colorimetry of total phenols with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents; *Am. J. Enol. Vitic.* 16 (1965) 144-158.
11. Layne, E.: Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins; *in* *Methods in Enzymology*, edited by S.P. Colowick and N.O. Kaplan, Academic Press Inc., New York, 1957, pp. 447-454. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall: Protein measurement with the folin phenol reagent; *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.

12. Ruiz, J.M., G. Bretones, M. Baghour, L. Ragala and A. Belakbir, L. Romero: Relationship between boron and phenolic mechanism in tobacco leaves; *Phytochem.* 48 (1998) 269-272.
13. Kápolna, B., D. Radva and J. Kosáry: A lipoxigenázok izoenzim összetételének változásai a növényekben. 7. A tárolt rezisztens almafajták (*Malus domestica* Borkh.) minőségének vizsgálata biokémiai módszerekkel; Changes in the composition of lipoxygenase isoenzymes in plants. 7. Using biochemical methods to study the quality of stored apple cultivars (*Malus domestica* Borkh.) resistant to different diseases; *J. Oil Soap Cosmetics* 55 (2006) 99-105.

Address for correspondence

Judit Kosáry

Corvinus University of Budapest

Faculty of Food Sciences

H-1518, P.O.B. 53, Hungary

Department of Applied Chemistry

Olaj, Szappan, Kozmetika 58/3 (2009), közlésre elfogadva 2009

A lipoxigenázok izoenzim összetételének változásai a növényekben. 10. A különböző diófajták (*Juglans regia* L.) avasodási hajlamának vizsgálata biokémiai módszerekkel

KOSÁRY JUDIT, BUJDOSÓ GÉZA, SZENTIVÁNYI PÉTER, REHUS DÓRA, EMMERT
MIRJAM, FARKAS CSILLA

ÖSSZEFOGLALÁS

A különböző diófajták terméseit betakarítás után természetes és mesterséges körülmények között szárítottuk, majd a különböző dióbél minták biokémiai paramétereit és avasodási hajlamát vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a vizsgált diófajták betakarítás után természetes körülmények között, illetve mesterséges körülmények között, emelt hőmérsékleten (35 °C) történő szárítása némileg megváltoztatja ugyan a diófajták lipoxigenáz és a peroxidáz aktivitását, illetve a viselkedésüket az intenzív peroxidációs tesztben, de ez a változás nem olyan mértékű, amely a mesterséges körülmények között szárított diók gyorsabb avasodásához, azaz minőségromlásához vezetne.

SUMMARY

*Changes in the composition of lipoxygenase isoenzymes in plants. 10. Studies on the propensity for rancidification of different walnut (*Juglans regia* L.) cultivars by biochemical methods*

Fruits of different walnut (*Juglans regia* L.) cultivars were dried post harvest under natural and artificial conditions and then the biochemical parameters and the propensity for rancidification of different walnut kernels were studied. We found slight changes in the activity of lipoxygenase and peroxidase of walnut cultivars dried under natural circumstances and artificial conditions at elevated (35 °C) temperature and in their behaviour in the intensive peroxidation test, but these changes were not enough to cause a strong rancidity or quality deterioration in walnuts dried under artificial conditions.

Bevezetés

A héjastermésű gyümölcsök két legnépszerűbb képviselője a dió (*Juglans regia* L.) és a mandula (*Prunus amygdalus*). A különböző mandulafajták és a belőlük készített marcipán vizsgálatával korábban már foglalkoztunk [1]. A diófának majdnem minden porcikáját

felhasználják. Táplálkozási szempontból a dióbél a legértékesebb, amely értékes tápanyagokat, vitaminokat és ásványi anyagokat tartalmaz. Olajtartalma magas – mintegy 50%, könnyen avasodó olaja nem csak 73% linolsavat tartalmaz, hanem linolénsav tartalma is említésre méltó. A dióolaj, amelynek enyhe fényvédő hatása is van, a hajolajok fontos komponense. A zölddió olajos kivonatát hajerősítőnek használják. A dió csersavban és illóolajokban gazdag levelének forrázatát külsőleg lemosásra, bőrpanaszokra, a pattanásos bőr kezelésére, valamint a haj színének sötétítésére használhatják [2].

A különböző diófajták terméseit betakarítás után természetes és mesterséges körülmények között szárítottuk, majd a különböző dióbél minták biokémiai paramétereit és élelmiszeripari felhasználhatóságát tanulmányoztuk. Most az avasodási tulajdonságok vizsgálatával kapcsolatos eredményeinket mutatjuk be.

Ismert az, hogy a növényeket érintő stresszhatások (ilyenek a betakarítás és a tárolás körülményei is) sok esetben az oxigén koncentráció káros mértékű emelkedésével, ennek következtében az avasodási folyamatok gyorsulásával járnak. A növényi szervezetekben több olyan enzimrendszer működik, amely képes a nem kívánatos oxigén felesleget elreagáltatni, érthető módon ezek aktivitása stresszhatáskor jellemző módon megnőhet [3]. Az ilyen módon megnövekedett aktivitású enzimek közül a három legfontosabb a peroxidáz, a polifenol-oxidáz és a lipoxigenáz [4].

Azonban hamarosan nyilvánvalóvá vált, hogy a vizsgált diófélék polifenol-oxidáz aktivitása elhanyagolhatóan alacsony, ezért munkánk során a vizsgált diófajták peroxidáz (POX) és lipoxigenáz (LOX) aktivitási értékeit, valamint peroxid-számmal jellemezhető avasodási hajlamát, illetve ezek antioxidánsokkal való befolyásolhatóságát tanulmányoztuk. Kutatásunkban nem csak a más, növényi eredetű élelmiszer alapanyagok lipoxigenáz összetételének tanulmányozása során szerzett korábbi tapasztalatainkat használtuk fel, hanem azokat is, amelyeket az intenzív peroxidációs teszt kidolgozása [5] során nyertünk.

Vizsgálati anyagok és módszerek

A vizsgálatok során alkalmazott vegyszerek és oldószerek SIGMA termékek voltak. A vizsgált, hazai nemesítésű diófajtákat az Érdi Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutató - Fejlesztő Kht. Érd-Elvira majori Kísérleti Telepén termesztették. A frissen szüretelt dió még 30-40% vizet tartalmazott. A természetes körülmények között szárított (száradó) diókat jól szellőztetett, nem fűtött helyiségben, többszöri átforgatással tartottuk

súlyállandóságig (kb. két hét), ez az ideálisnak tekinthető 10-12% víztartalmat jelentette. A mesterséges körülmények között a diókat diószárítóban szárítottuk (35 °C hőmérsékletű levegő kb. 55-60 óra hosszát történő befúvatásával) ugyancsak 10-12% víztartalomig. Az egyes diófajták nevét a továbbiakban rövidítve használjuk (1. Táblázat). A természetes körülmények között szárított diók nevéhez a „Nat”, a mesterséges körülmények között szárított diók nevéhez az „Sz” jelzést illesztettük.

1. Táblázat : A vizsgált diófajták rövidítésjegyzéke

A diófajta neve	Rövidítés
Milotai 10	M 10
Milotai kései	M kései
Milotai 10 37	M 1037
Milotai bőtermő	M bőtermő
Alsószentiváni 117	A 117
Alsószentiváni kései	A kései
Bonifác	Bonifác
Tizacsécsi 83	T 83

Az enzimaktivitási mérésekhez a különböző diófajták dióbelét megőröltük, homogenizáltuk, majd – a korábbi gyakorlatnak megfelelően [1] olyan 0,05 M TRISZ-acetát pufferrel (pH 8,20) extraháltuk, amely 0,38 M szacharózt és 0,02 M kalcium kloridot tartalmazott (100 mg ml⁻¹). Valamennyi mérési eredményünket a szárított dió tömegére (g) vonatkoztatva adtuk meg. Bemutatott eredményeinket két parallel mintavételből és mintánként három parallel mérés átlagából számoltuk ki, az eredmények szórása $\pm 5\%$ volt

A dióminták peroxid-szám (PO-szám) meghatározásához az irodalmi előíratot [6] a korábbi tapasztalataink alapján [1] módosítottuk. A korábban általunk kidolgozott intenzív peroxidációs tesztnek [7] megfelelően a 100 mg frissen őrölt dióbel mintákat 20 ml térfogatú, nyitott üvegedényben, infralámpa alatt, 40 °C hőmérsékleten, három napig kezeltük. A mintákból a lipid-hidroperoxidokat ecetsav és diklór-etán 1:1 arányú elegyével (5 ml) 1 percig tartó dörzsöléssel, ezután 4 percig tartó rázogatóással oldottuk ki, az elegyhez előbb 0,10 ml 50% töménységű kálium-jodidot, majd 5 perc rázogatóás után 5 ml ionmentes vizet adtunk. A lipid-hidroperoxidok hatására keletkezett jód mennyiségét, 1% töménységű keményítő oldat indikátor jelenlétében, nátrium-tioszulfát mérőoldatos (0.05 M) titrálással határoztuk meg. A PO-szám a 100 g szárított dióban lévő lipid-hidroperoxidokból a kálium-jodid által felszabadított jód mennyisége grammban kifejezve [6].

A frissen készített kivonatok (100 mg ml^{-1}) LOX aktivitását és annak pH függését a legelterjedtebb irodalmi módszerrel [8], a lipid-hidroperoxidok kettős kötésének 234 nm hullámhossznál mért abszorbancia változásának segítségével határoztuk meg. A lipoxigenázok pH függésének vizsgálatához az alábbi puffereket használtuk: $0,05 \text{ M}$ TRISZ-acetát puffer (pH 4,5-6,1), $0,05 \text{ M}$ kálium-foszfát puffer (pH 6,3-7,3), $0,05 \text{ M}$ nátrium-borát puffer (pH 7,5-9,3). Az aktivitásmérésekhez használt vizes linolsav szubsztrát oldat linolsavat ($0,008 \text{ M}$), TWEEN 20 emulgeátort ($0,25\%$) és nátrium-hidroxidot ($0,01 \text{ M}$) tartalmazott $0,05 \text{ M}$ TRISZ-acetát pufferben (pH 9,20). A lipoxigenázok aktivitását az alábbi összetételű reakcióelegyben határoztuk meg: linolsav szubsztrát oldat ($0,025 \text{ ml}$), dió kivonat ($0,025 \text{ ml}$) a megfelelő pufferben ($1,25 \text{ ml}$). Az irodalom szerint [8] az 1 ml reakcióelegyben 1 perc alatt bekövetkező egységnyi abszorbancia változás tekinthető az enzim aktivitás egységének (U). A LOX aktivitást 1 g szárított dióra vonatkoztatva adtuk meg.

A kivonatok POX aktivitását irodalmi módszerrel [9] mértük, hidrogén-donorként *o*-dianizidint alkalmaztunk. A POX aktivitásmérésének reakcióelegye a kivonaton ($0,02 \text{ ml}$) kívül *o*-dianizidint ($0,41 \text{ mM}$) és hidrogén-peroxidot ($1,84 \text{ mM}$) tartalmazott $0,1 \text{ M}$ nátrium-acetát pufferben (pH 5,1) ($1,0 \text{ ml}$). A reakcióelegyek abszorbancia-változását 438 nm helyett, technikai okokból 430 nm hullámhosszon mértük. Az 1 ml reakcióelegyben, 1 perc alatt elreagáló hidrogén-peroxid molekulák számát (μmol) tekintettük a peroxidáz aktivitás egységének (U), erre *o*-dianizidin abszorpciós koefficiensének segítségével következtettünk ($\varepsilon = 7,32 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1}$).

Vizsgálati eredmények megvitatása, értékelése

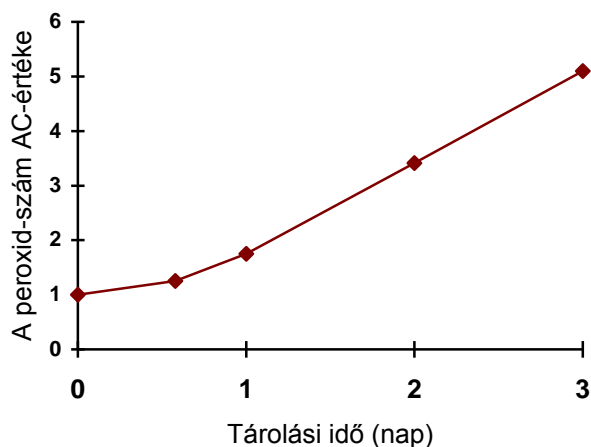
A dióbél és a dióolaj akár élelmiszeripari, akár kozmetikumokban való felhasználását illetően az egyik alapkérdés a dió, mint alapanyag avasodási tulajdonságainak megismerése, mert ezek alapján törekedhetünk az avasodási hajlam mérséklésére megfelelő feldolgozási technológia segítségével és/vagy antioxidáns anyagok adagolásával.

A diófajták avasodási hajlamát korábbi gyakorlatunknak megfelelően [1] a diók lipid-peroxidációjának részletes tanulmányozásával kívántuk jellemezni. A lipid-peroxidáció vizsgálatára korábban egy olyan gyors tesztet [7] dolgoztunk ki (intenzív peroxidációs teszt, IPT), amely infralámpa és emelt hőmérséklet ($35\text{-}55 \text{ }^\circ\text{C}$) alkalmazásával a vizsgált anyag és a levegő kölcsönhatását meggyorsította, lehetővé tette kezelés és a mérés egy edényben (one-

pot-system) történő elvégzését, valamint amelynek segítségével a lipid-peroxidációt gyorsító, illetve lassító hatások egyaránt gyorsan és reprodukálhatóan vizsgálhatóak voltak.

Korábban, a levegő oxigénjére sokkal kevésbé érzékeny mandulabél lipid-peroxidációjának vizsgálatakor [1] elsősorban kinetikai méréseket végeztünk, mert ezek lineáris jellegéből a minták avasodási hajlamára tudtunk következtetni. Ugyanis a lipid-peroxidáció kezdeti szakaszában keletkező lipid-hidroperoxidok koncentrációjának növekedése idővel csökken – jelezve, hogy meggyorsultak azok a bomlási folyamatok, amelyek nagy jelentőségűek az avasodás minőségromló hatásának kialakulásában.

A PO-szám változásait a már korábban [7] is alkalmazott AC-értékekkel is kifejeztük, amely a mérési eredmények konkrét értékétől függetlenül jellemző a lipid-peroxidáció változására. Az AC-érték, azaz aktiválási tényező (activation coefficient) a különböző időpontokban mért peroxid-szám és a minta eredeti, a vizsgálat kezdetekor mért peroxid-számának hányadosa. A dióminták esetén az elővizsgálatok alapján megelégedtünk a kötött idejű, háromnapos vizsgálatokkal. A természetes körülmények között szárított diófajták átlagolt AC-értékeinek kinetikai vizsgálata ugyanis azt mutatta, hogy a változás három napig megközelítően lineáris (1. Ábra).



1. Ábra: A természetes körülmények között szárított diófajták átlagolt AC-értékeinek (PO-szám a kezelés után/PO-szám a kezelés előtt) alakulása az intenzív peroxidációs teszt körülményei között (3 nap, 40 °C)

A különböző élelmiszeripari alapanyagok emelt hőmérsékleten történő szárítása esetében általában számítani kell a lipid-peroxidációs hajlam növekedésére. Tehát a könnyen avasodó olajkomponenst tartalmazó dió esetében alaposan meg kellett vizsgálnunk, hogy a

mesterséges szárítási körülmények nem növelik-e meg a dióbél avasodási hajlandóságát. Eredményeinket a 2. Táblázatban foglaljuk össze, amelyben nem csak a kezelés kezdetén és végén mért PO-számokat, hanem az AC-értékeket is feltüntettük.

2. Táblázat : A vizsgált diófajták PO-száma (g jód szárított dió 100 g⁻¹) és AC-értéke (PO-szám a kezelés után/PO-szám a kezelés előtt)

Diófajta	PO-szám a kezelés előtt	PO-szám a kezelés után (3 nap, 40 °C)	AC-érték
M 10 Nat	0,83	6,56	7,90
M 10 Sz	0,95	6,65	7,00
M kései Nat	1,02	3,26	3,20
M kései Sz	1,27	3,30	2,60
M 10 37 Nat	0,89	2,58	2,90
M 10 37 Sz	1,02	2,75	2,70
M bőtermő Nat	0,76	2,84	4,00
A 117 Nat	0,64	1,34	2,09
A 117 Sz	1,02	1,67	2,00
A kései Nat	1,14	7,64	6,70
A kései Sz	1,40	8,08	6,50
Bonifác Nat	0,76	1,67	2,20
Bonifác Sz	0,89	1,87	2,10
T 83 Nat	0,76	1,98	2,60
T 83 Sz	0,83	2,11	2,54

Az intenzív peroxidációs tesztben egyes diófajták között már a vizsgálatok előtt is voltak bizonyos eltérések, a PO-számok 0,64 és 1,40 között változtak. A háromnapos, 40 °C hőmérsékleten elvégzett, infralámpás intenzív kezelés után a PO-számok megnövekedtek a 1,34-9,08 értékekig. Általában a természetes körülmények között szárított diók kezelés előtt mért PO-száma némileg alacsonyabb volt, viszont a minták a kezelésre valamivel hevesebben reagáltak, mint a mesterségesen szárított egyedek. Ez az oka annak, hogy a természetesen

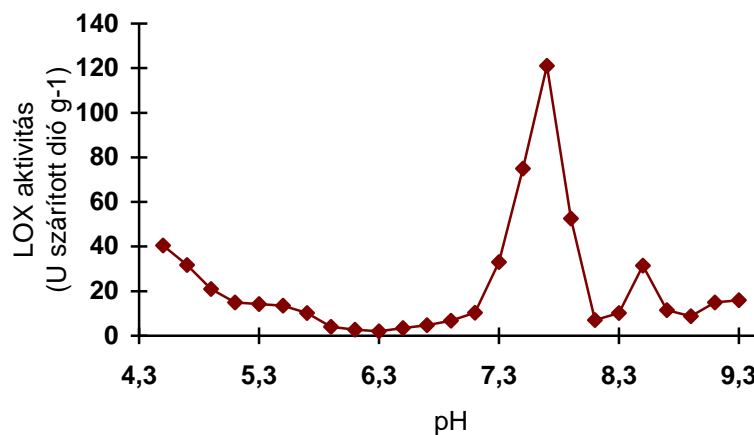
szárított diók AC-értéke ugyan valamivel magasabb volt, de a kezelés végén mért a PO-számok általában nem különböztek jelentősen a kétféle módon szárított diók esetében. Ez azt jelenti, hogy a mesterséges körülmények között szárított diófajták esetében sem kell fokozott avasodási hajlamtól tartanunk.

Megvizsgáltuk, hogy a természetes körülmények között szárított dióminták AC-értékeit mennyire csökkentik egyes, az intenzív peroxidációs teszt során alkalmazott adalékanyagok, amelyekből 20 mg mennyiséget dolgoztunk össze a 100 mg őrlött dióbéllel a kezelés előtt. A közismerten antioxidáns hatású α -tokoferol az AC-értékeket átlagosan az eredeti 30-45 százalékára csökkentette. Két, eddig kevésbé vizsgált izoflavonoid származékot is teszteltünk, a szintetikus eredetű 7-hidroxi-izoflavont, valamint a természetben is előforduló, de szintetikusán is előállítható genisteint. Ez a két vegyület kevésbé volt hatásos. A 7-hidroxi-izoflavon 70-80, a genistein pedig 75-85 százalékára tudta az AC-értékeket csökkenteni. Ez azt jelenti, hogy a flavonoidokhoz [10] hasonlóan az izoflavonoidok is csak korlátozottan alkalmazhatók antioxidánsként.

A természetes és mesterséges szárítás dióbélre gyakorolt hatásának értékeléséhez a lipid-peroxidációban közvetlenül résztvevő enzim, a LOX aktivitására gyakorolt hatást is vizsgálnunk kellett. Ez a vizsgálat szolgáltatott ugyanis információkat arra nézve, hogy a dió lipid-peroxidációjában milyen szerepet játszanak az autooxidációs és milyent a LOX katalizálta oxidációs folyamatok. A LOX izoenzimek a többszörösen telítetlen zsírsavak oxigén felvételét katalizálják, e reakció során lipid-hidroperoxidok keletkeznek, amelyek oxidatív degradációja vezet az avasodáshoz, a rövid szénláncú, kellemetlen szagú oxo-vegyületek keletkezéséhez [8]. Ugyanakkor oxigén jelenlétében a lipid-peroxidáció spontán módon, kémiai úton is végbemehet.

A LOX izoenzimek számos tulajdonságukban, így aktivitásuk pH optimumában és aktiválhatóságukban jelentősen különbözhetnek egymástól [8]. A LOX izoenzimek a LOX aktivitás pH függésének vizsgálatával különböztethetők meg és a pH optimum szerint jelölhetők. Korábban részletesen foglalkoztunk 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 [1,3,4]. A vizsgált diófajták LOX izoenzim összetételére azonban az egységesség volt jellemző. A vizsgált diófajták LOX aktivitásának pH függését átlagolt ábrán mutatjuk be (2. Ábra). Ennek alapján döntöttünk úgy, hogy a szárítás körülményeinek a LOX

aktivitásra gyakorolt hatását csak három olyan pH értéken (pH 4,50, 7,70 és 8,50) vizsgáljuk, amelyeknél kiemelkedő aktivitást tapasztaltunk.



2. Ábra: A természetes körülmények között szárított diófajták átlagolt LOX aktivitásának (U szárított dió g^{-1}) alakulása a pH függvényében

Valamennyi vizsgált diófajtára egységesen jellemző volt, hogy a LOX aktivitás mindhárom pH értéken alacsonyabb értéket mutatott a mesterséges körülmények között, emelt hőmérsékleten szárított diók esetében, mint a természetes körülmények között szárított diókban. Maguk, az egyes pH értékeknél mért LOX aktivitás mennyiségek ($4,06-154,13 U$ szárított dió g^{-1}), valamint ezek csökkenése (a természetes körülmények között szárított dióban mért LOX aktivitáshoz, mint 100 százalékhoz viszonyítva, és százalékban kifejezve a LOX aktivitás 35-87%) a fajták és pH értékek szerint meglehetősen eltérő volt.

Az eredmények tendenciája egyértelműen azt mutatta, hogy a mesterséges körülmények között, emelt hőmérsékleten szárított diókban a lipid-peroxidációs teszt kezdetekor mért, a természetes körülmények között diókban mérteknél valamivel magasabb PO-szám adatok kémiai oxidáció erősebb érvényesülésének köszönhető. Viszont az a tény, hogy a mesterséges körülmények között szárított diókban a három napos intenzív peroxidációs teszt után mért PO-szám nem sokkal különbözött a természetes körülmények között szárított diókénál, csökkent LOX aktivitásuknak tulajdonítható. A mért POX aktivitás értékeknél is hasonló tendencia érvényesült (3. Táblázat).

3. Táblázat : A vizsgált diófajták LOX aktivitása (U szárított dió g^{-1}) különböző pH értékeken és POX aktivitása ($\mu mol\ perc^{-1}$ szárított dió g^{-1})

Diófajta	LOX (pH 4,50)	LOX (pH 7,70)	LOX (pH 8,50)	POX
M 10 Nat	25,69	123,03	48,67	0,56
M 10 Sz	9,46	87,88	35,15	0,36
M kései Nat	43,26	109,51	20,28	1,10
M kései Sz	35,15	105,46	10,82	0,62
M 10 37 Nat	44,62	187,93	51,38	0,88
M 10 37 Sz	40,56	56,78	10,82	0,62
M bőtermő Nat	44,62	95,99	59,49	0,47
A 117 Nat	20,28	77,06	20,28	0,39
A 117 Sz	12,17	56,78	9,46	0,28
A kései Nat	63,54	154,13	12,17	1,47
A kései Sz	50,02	133,85	4,06	0,53
Bonifác Nat	48,67	100,05	10,82	1,33
Bonifác Sz	14,87	94,64	4,06	0,80
T 83 Nat	32,00	120,33	29,74	1,67
T 83 Sz	18,93	81,12	12,17	0,43

Megállapítható tehát, hogy a vizsgált diófajták betakarítás után természetes körülmények között, illetve mesterséges körülmények között, emelt hőmérsékleten történő szárítása némileg megváltoztatja ugyan a diófajták lipid-peroxidációs hajlamát, illetve LOX és POX aktivitását, de ez a változás nem olyan mértékű, amely a mesterséges körülmények között szárított diók gyorsabb avasodásához, azaz minőségromlásához vezetne. A vizsgált diófajták részletes bemutatásával, illetve azok részletes biokémiai vizsgálatával külön közlemények foglalkoznak.

Köszönetnyilvánítás

Ezt a kutatást az OTKA (K63162 sz. kutatási projekt) támogatta. A különböző diófajtákat az Érdi Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutató-Fejlesztő Kht. Érd-Elvira majori Kísérleti

Telepén természetették. A szerzők köszönetet mondanak Nógrádi Mihálynak a 7-hidroxi-izoflavon és a genistein átadásáért.

Irodalom

1. *Kosáry J., Balogh T., Kiss N., Korbász M.:* A lipoxigenázok izoenzim összetételének változásai a növényekben. 3. A mandula (*Prunus amygdalus*) vizsgálata biokémiai módszerekkel. Olaj, szappan, kozmetika **53**, 11-13 2004.
2. *Hajdú I.* (Szerk.): Kozmetikai kézikönyv. Műszaki Könyvkiadó, Budapest, 1994.
3. *Kosáry J., Radva D.:* A lipoxigenázok izoenzim összetételének változásai a növényekben. 6. A lipoxigenázok izoenzim összetételének változásai a növényekben. 6. A fekete ribizli (ribiszke) fajták (*Ribes nigrum L.*) lipoxigenázainak vizsgálata. Olaj, szappan, kozmetika **55**, 12-15 2006.
4. *Kápolna B., Radva D., Kosáry, J.:* A lipoxigenázok izoenzim összetételének változásai a növényekben. 7. A tárolt rezisztens almafajták (*Malus domestica* Borkh.) minőségének vizsgálata biokémiai módszerekkel. Olaj, szappan, kozmetika **55**, 99-105 2006.
5. *Kosáry, J., Takács, M., Siró, I.:* Intensive peroxidation test for studying lipid peroxidation. Acta Aliment. **31**, 57-62 2002.
6. *Lásztity R., Törley R.* (szerk.): Élelmiszer-analitika II. Alkalmazott élelmiszer-analitika, Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 340-341 1987.
7. *Kosáry J., Takács M., Siró I.:* Az olajok lipid-peroxidációjának vizsgálata intenzív peroxidációs teszttel (IPT). Olaj, szappan, kozmetika, **49**, 49-53 2000.
8. *Song, Y., Love, M.H., Murphy, P.:* Subcellular localization of lipoxygenase-1 and -2 in germinating soybean seeds and seedlings. J. Am. Oil Chem. Soc., **67**, 961-965 1990.
9. *Bjorkstein, H.:* Participation of horseradish oxyperoxidase (compound III) in interenzymic reaction steps. Biochim. Biophys. Acta **151**, 309-311 1968.
10. *Ogata, M., Hoshi, M., Shimotohno, K., Urano, S., Endo, T.:* Antioxidant activity of magnolol, honokiol, and related phenolic compounds. J. Am. Oil Chem. Soc. **74**, 557-562 1997.

A szerzők neve, beosztása, címe:

Dr. Kosáry Judit, egyetemi tanár

**Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Kar Alkalmazott Kémia Tanszék
1518 Budapest, Villányi út 29-43.**

Bujdosó Géza, tudományos munkatárs

**Budapesti Corvinus Egyetem Kertészettudományi Kar Gyümölcsstermő Növények
Tanszék**

1518 Budapest, Villányi út 29-43.

Szentiványi Péter, tudományos főmunkatárs

Gyümölcs- és Dísnövénytermesztési Kutató - Fejlesztő Kht.

1223 Budapest, Park u. 2.

Rehus Dóra, BSc élelmiszermérnök hallgató

Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Kar

1518 Budapest, Villányi út 29-43.

Emmert Mirjam, BSc élelmiszermérnök hallgató

Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Kar

1518 Budapest, Villányi út 29-43.

Farkas Csilla, BSc élelmiszermérnök hallgató

Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Kar

1518 Budapest, Villányi út 29-43.