

A dohány penészesedésének objektív vizsgálata katalázaktivitás alapján

BERKY FERENC

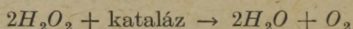
Kereskedelmi Minőségellenőrző Intézet, Budapest

Érkezett: 1958. április 17-én

Irodalmi adatok szerint a dohányszárítás és fermentálás biokémiai magyarázatával kapcsolatban számos kutató foglalkozott az enzimaktivitás (kataláz, peroxidáz, fenoláz, oxigenáz) mérésével a szárítás és fermentálás lefolyása alatt (4., 5., 6., 7.). Módszereket dolgoztak ki a különböző enzimaktivitások mérésére és összefüggést igyekeztek megállapítani a fermentálási folyamat intenzitása, valamint a dohány enzimaktivitása között. A fermentálási folyamat intenzitását valószínűleg a dohány aktív enzimek tartalma szabja meg, amely a dohány saját enzimeiből és a mikroorganizmusok enzimeiből tevődik össze. A fermentálási folyamat intenzitása, valamint a fermentálás közben lejátszódó kémiai folyamatok szempontjából a fenti két fajta enzim között különbség nincs (5).

A dohány enzimek közül a kataláz enzim a legjobban karakterizáló enzimek közé tartozik, amely úgy a dohánylevélben, mint a legtöbb mikroorganizmusban jelen van.

Loew által a dohánylevélben 1901-ben felfedezett kataláz enzim gyorsítja a hidrogénperoxid bomlását.



Abderhalden (1) szerint a tiszta kataláz készítmény molekulásúlya 250—300.000. Egy molekula kataláz 0°C-on és 6,6 pH érték mellett másodpercenként 54.000 molekula hidrogénperoxidot bont el. A kataláz aktivitás meghatározása a kataláz enzim által elbontott hidrogénperoxid mennyiségének mérésén alapul. Egyes kutatók (5, 7) a fermentálás folyamatával kapcsolatos enzimaktivitás tanulmányozására a kataláz aktivitást használták és összefüggést állapítottak meg a katalázaktivitás és fermentálási energia között. A fermentálás előrehaladásával a dohány katalázaktivitása csökken. A fermentált dohány katalázaktivitása kisebb, mint a nem fermentált kiindulási anyagé. Schmidt (5) Havanna II c dohány fermentálásával kapcsolatos kísérleteiből összefüggést állapított meg a dohány összcsíraszámra és kataláz aktivitása között. Havanna II C dohánnyal végzett kísérletsorozatában különböző összcsíraszámú és különböző nedvességtartalom mellett fermentált dohányminták katalázaktivitását határozta meg. A nagyobb nedvességtartalom mellett fermentált és nagyobb összcsíraszámú dohányminták nagyobb kataláz aktivitást mutattak, mint a kisebb nedvességtartalom mellett fermentált és kisebb összcsíraszámú dohány minták.

Az összcsíraszám és a katalázaktivitás közti összefüggés módját ad arra, hogy a katalázaktivitás nagyságából következtetést vonhassunk le a dohány fertőzöttségére vonatkozóan. Ha egy dohányminta katalázaktivitása nagy, akkor az egyben nagyfokú fertőzöttségre, nagy összcsíraszámra utal. Ilyenformán objektív módszer áll rendelkezésünkre a dohány fertőzöttségének, illetve penészesedési fokának mérésére kataláz aktivitás alapján. A katalázaktivitás és a fertőzöttség foka közti összefüggés alapján további következtetést vonhatunk le a dohány eltarthatóságára nézve. Nyilvánvaló, hogy kis katalázaktivitású kevésbé fertőzött dohány adott körülmények között (relatív nedvesség, hőmérséklet) később fogja a penészesedés jeleit mutatni, mint egy nagy katalázaktivitású erősen fertőzött dohány. Ilyenformán megvan a lehetősége annak, hogy a fermentált dohány, vagy a kész dohánygyártmány penészfertőzöttségét a szabad szemmel, vagy nagyítóval

látható penészedés határán alul is kimutassuk. Ez utóbbinak nagy ipari és raktározási jelentősége van, mert lehetőség adódik kellő óvintézkedés megtételére a penészedés érzékszervi megállapíthatósága előtt (pl. jobb tárolási körülmények, szellőztetés, soronkívüli feldolgozás, hőkezelés stb.).

A kataláz enzim által elbontott hidrogénperoxid mennyiségének (katalázaktivitás) mérésére általában két módszert használnak: a gázometriás módszert és a permanganometriás módszert.

A *gázometriás módszer* lényege a tejiparban és a konzerviparban használatos módszerhez hasonlóan az, hogy 5 g finoman őrölt dohányport 50 ml desztillált vízzel és 10 ml 5%-os hidrogénperoxiddal elegyítenek és az oxigéngáz térfogatát eudiométeresőben mérik. A meghatározással párhuzamosan vakpróbát végeznek: 5 g dohányport 50 ml desztillált vízzel elegyítenek, a kataláz inaktivitása végett 10 percig forrallnak és lehűlés után 10 ml 5%-os hidrogénperoxidot adnak hozzá. E módszernél használatos viszonylag nagy bemérések (5 g dohánypor) a módszerből eredő pontatlanságokat nagyrészt kiküszöbölik (2, 3, 4, 5).

A *permanganometriás módszer* lényege az, hogy a kataláz enzim által el nem bontott hidrogénperoxidot $n/10$ káliumpermanganáttal való titrálással határozzák meg.

A permanganometriás módszer nagyobb pontosságánál fogva igen jól használható oldatok, különösen tisztított enzimdoldatok katalázaktivitásának mérésére, mint ezt az enzimmetodikai közlemények tartalmazzák. Azonban erősen színes oldatban, egyéb permanganátot fogyasztó anyagok (pl. cukrok) jelenlétében a titrálás végpontjának észlelése nehézkes és az eredmények reprodukálása gyakorlatot igényel. A fenti körülmények a dohánynál is fennállanak. Mint ismeretes, a dohány vizes extraktjának színe a dohányfajtától függően sötétebb, vagy világosabb barna és permanganátot fogyasztó redukáló anyagokat is tartalmaz. A titrálás folyamán azonban a dohányextrakt barna színe fokozatosan világosodik és a titrálás végpontja közelében a káliumpermanganát által okozott rózsaszín színeződés már jól észlelhető és kellő gyakorlat esetén jó reprodukálható eredmények kaphatók. A jobb reprodukálhatóság miatt a permanganometriás módszer alkalmasabbnak látszott a dohánypenészedés objektív vizsgálatára, mint a gázometriás módszer, ezért vizsgálatainkban ezt a módszert használtuk. E módszer alapján a katalázaktivitás mérésére a katalázszám szolgál.

A katalázszám 1 g légszáraz dohány által 4 óra alatt elbontott hidrogénperoxid mennyisége mg-okban (6). A katalázszám meghatározása az alábbi módszer szerint történik: 1 g légszáraz dohányport 100 ml-es mérőlombikba mérünk, hozzáadunk 50—60 ml desztilláltvizet és 4 óráig gyakori rázás mellett szobahőmérsékleten állni hagyjuk. Ezután a mérőlombikot jelig töltjük, a lombik tartalmát száraz szűrőpapíron szűrjük és a szűrlet 20 ml-ét (0,2 g dohány) használjuk fel a katalázszám meghatározására.

20 ml extrakthoz 20 ml vizet és 2 ml 1%-os hidrogénperoxidot adunk, 4 óráig szobahőmérsékleten állni hagyjuk, majd híg kénsavval megsavanyítva az el nem bomlott hidrogénperoxidot megtitráljuk. A titrálás végét 10 másodperc alatt el nem tűnő rózsaszín színeződés jelzi. A meghatározással párhuzamosan 20 ml inaktivált extraktal vakpróbát végzünk. 20 ml extraktot forró vízfürdőn 10 percig melegítünk, hűlni hagyjuk, majd a továbbiakban a fentiek szerint járunk el.

A katalázszámot a két titrálás eredményének különbségéből számítjuk ki.

$$\text{Katalázszám} = (V_1 - V_2) \cdot f \cdot 5 \cdot 1,708$$

$V_1 =$ a vakpróbánál fogyott $n/10$ káliumpermanganát ml-ek száma,

V_2 = a fővizgálatnál fogyott n/10 káliumpermanganát ml-ek száma,
 f = n/10 káliumpermanganát faktora,
 és 1,7008 = 1 ml n/10 káliumpermanganát hidrogénperoxid egyenértéke mg-okban.

A titrálás végpontját (10 másodperc alatt el nem tűnő rózsaszín színézódés) stopperórával mérjük.

Vizsgálataink szerint a módszer 0,1 ml pontossággal reprodukálható, amely $0,17 \times 5 = 0,85$ katalázszámnak felel meg.

Közleményünk célja az, hogy a fentiek alapján összefüggést állapítsunk meg a dohány katalázaktivitása és penészesedési foka között, valamint az, hogy a dohány penészfertőzöttségét esetleg még a szabad szemmel, vagy nagyítóval látható penészesedés határán alul is kimutassuk.

Kísérleti rész.

Kísérletsorozatunk első lépéseként meghatároztuk több kereskedelmi forgalomból vett hazai (Kossuth, Terv, Harmonia) és bolgár szivarka minta (Rila, Femina, Rhodope, Arda) katalázszámát, amely gyakorlatilag 0-nak adódott. Ugyancsak megvizsgáltuk vidéki elfekvő raktárkészlethez származó, de még nem dohos, nem penészes szivarkaminták katalázaktivitását, amely gyakorlatilag ugyancsak 0-nak adódott. Célunk ezzel a penészesedési veszély esetleges korai kimutatása volt. Annak megállapítása érdekében, hogy van-e összefüggés a dohány penészesedési foka és kataláz aktivitása között, a következő tájékoztató vizsgálatot végeztük el: meghatároztuk „friss” gyártásból származó Kossuth szivarkaminta katalázaktivitását, majd 100% relatív nedvességet biztosító, vizet tartalmazó exszikkátorba tettük. 5 nap múlva a mintán kiscukor, 8 nap múlva nagyfokú penészesedés volt észlelhető, ugyanakkor a minta katalázaktivitása is ugrásszerűen növekedett.

1. táblázat

Idő /nap/	Katalázszám	Subjektív vizsgálat
0	2	penészmentes
5	27	penészes
8	70	erősen penészes

A szivarkamintát eredeti, porítatlan állapotban tettük az exszikkátorba. A dohányt csak közvetlenül a katalázszám mérése előtt porítottuk és úgy tettük porításra alkalmassá, hogy azt az exszikkátorból kivéve termosztátban 35 C°-on egy napig szárítottuk.

A fenti előkísérlet bebizonyította, hogy a penészes dohány katalázaktivitást mutat és hogy a penészesedés foka és a katalázaktivitás között összefüggés állapítható meg.

A fenti előkísérlet után Terv szivarkát penész-előhívás céljából 20%-os kénsavval előállított 87% relatív páratartalmú térbe helyeztünk. Célunk az volt, hogy a latencia-időszakot a fenti előkísérlethez viszonyítva meghosszabbítsuk és így lehetőség legyen a penészesedés esetleges korai kimutatására. Feltételeztük ugyanis, hogy a 87% relatív páratartalmú exszikkátorba helyezett dohányminta már néhány nap múlva némi aktivitást fog mutatni, amely a latencia-időszak alatt fokozatosan növekedni fog. Emellett nem látszott célszerűnek, hogy a penészesedés látható megjelenése után a penésztelepek gyors fejlődése miatt a katalázaktivitás igen rövid idő alatt maximális értéket érjen el.

A vizsgálati anyagot ennél a kísérletsorozatnál is eredeti, porítatlan állapotban helyeztük az exszikkátorba. Első lépésként meghatároztuk a vizsgálati anyag katalázaktivitását az exszikkátorba helyezés előtt, majd megvizsgáltuk a minta katalázaktivitásának változását az idő függvényében. Az aktivitás mérésekkel párhuzamosan szubjektív megfigyeléseket is végeztünk. Az exszikkátorból bizonyos időközökben katalázszám mérésére kivett részletmintákat a fenti előkísérlethez hasonlóan úgy tettük porításra alkalmassá, hogy azokat termosztátban 35 C°-on egy napig szárítottuk. Magasabb hőmérséklet és hosszabb szárítási idő az esetleges aktivitáscsökkenés miatt nem látszott célszerűnek.

II. táblázat

Idő /nap/	Katalázszám	Szubjektív vizsgálat
0	—	penészmentes
2	—	„
4	—	„
6	—	„
8	—	„
13	2	„
15	6	penészesedési nyomai
17	8	gyengén pnnészes
18	8	„
20	19	penészes
22	49	erősen penészes penészes
24	91	igen erősen penészes
27	100	„ „ „
29	93	„ „ „

A fenti táblázatból látható, hogy a penészesedés érzékszervi megállapíthatósága előtt az exszikkátorból kivett dohányminták katalázaktivitását gyakorlatilag nem mutatnak. A penészesedés nyomainak megjelenése után viszont a katalázaktivitás a szubjektív vizsgálatnak megfelelően rohamosan növekszik.

A fenti következtetések alátámasztása végett az alábbi módosított kísérletsorozatot végeztük el:

25 db Kossuth szivarkát (kb 25 g) légszáraz állapotban finoman porítottunk és az így kapott homogén dohányporból bemérőedényekébe pontosan 1 g-os mintákat mértünk be katalázaktivitás meghatározás céljából. Az 1 g-os dohánymintákat tartalmazó bemérő edényeket 25%-os kénsavval előállított 80% relatív páratartalmú exszikkátorba helyeztük penészelőhívás céljából és bizonyos időközökben mértük az egyes minták katalázszámát. Azzal, hogy a kísérlethez felhasznált dohányt előzőleg porítottuk, biztosítottuk az egyes katalázszám mérésekhez felhasznált részletminták homogenitását. Az 1 g-os részletminták penészelőhívás előtti bemérésével viszont biztosítottuk azt, hogy mindig azonos szárazanyagtartalmú dohányminta kerüljön vizsgálatra. Azonkívül így elkerülhető volt az exszikkátorból bizonyos időközökben kivett minták termosztátban való szárítása a porítást megelőzően. Feltehető volt ugyanis, hogy az aktivitás mérést megelőző szárítás aktivitáscsökkenést eredményez, amely különösen a penész-előhívás kezdeti szakaszában, amikor még csak kis aktivitás várható, rontja a módszer érzékenységét.

Ennél a kísérletnél azért választottunk 80% relatív páratartalmú teret penészelőhívás céljára, hogy a latencia időszakot az előző kísérlethez viszonyítva meghosszabbítsuk és a penészesedés látható megjelenése után a penésztelepek fejlődését lassítsuk. Ezzel a penészesedés előrehaladásával kapcsolatos katalázaktivitás növekedést folyamatosabbá akartuk tenni. A mérések és megfigyelések eredményét a III. táblázat mutatja:

III. táblázat

Idő /nap/	Katalázszám	Subjektív vizsgálat
0	—	penészmentes
2	—	„
8	—	„
14	—	„
22	—	„
30	—	„
37	3	penészesedés nyomai
41	8	gyengén penészes
44	17	penészes
48	18	„
50	40	erősen penészes
55	56	„
57	92	igen erősen penészes
59	102	„ „ „
62	98	„ „ „

A közölt táblázat alapján összefüggés állapítható meg a penészesedés foka és a katalázaktivitás között. A penészesedés nyomainak megjelenése után az egyes minták katalázaktivitása a szubjektív vizsgálatnak megfelelően rohamosan növekszik. Az a törekvésünk viszont, hogy az egyes minták katalázaktivitását még jóval a penészesedés megjelenése előtt kimutassuk, nem járt sikerrel. A közölt vizsgálati módszer azonban lehetőséget ad arra, hogy a penészesedés fokát objektív úton mérjük és kezdeti penészesedés esetén a penészfertőzöttséget minden vitát kizáróan megállapítsuk. Ugyanis szabad szemmel néha nehézségbe ütközik a penész megfigyelése, pl. nagy-kiterjedésű levélfelületen, vagy félgvártmányban. Jól használható a módszer a penész és sókivirágzás, valamint hőkezelt dohányok elhalt és élő penésztelepeinek megkülönböztetésénél. A penészes hőkezelt dohány katalázaktivitása biztos választ ad arra, hogy vajon a hőkezelés elégséges volt-e és a penésztelepek teljesen elpusztultak-e? Így a hőkezelés optimális körülményei (időtartam, hőmérséklet) katalázaktivitás mérések segítségével jól megválaszthatók.

IRODALOM

- (1) *Abderholden E.*: Vitamine, Hormone, Fermente. Berlin u. Wien, 1944.
- (2) *Zeilinger*: Beiträge zum Katalaseproblem der Milch: Milchwirtschaftliche Forschung 14/1932 : 342.
- (3) *Burstein A. I.* u. *Frum F. S.*: Z. U. L. 62, 489, 1931.
- (4) *Ligeti L.*—*Tolnay P.*: Dohányipar 1955. III—IV. hó.
- (5) *Schmidt J. A.*: Tabak-Forschung 15, 1955.
- (6) *Barta, L.*: Biochem. Z. 257, 406, 1932.
- (7) *Barta L.*: Z. U. L. 75, 437, 1938.

ОБЪЕКТИВНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЛЕСНЕВЕНИЯ ТАБАКА
НА ОСНОВЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗА

Ф. Берки

Автор сообщает методы определения активности каталаза. Установил зависимость активности каталаза от степени плесневения табака. Но не удалось установить при помощи метода начальное плесневение перед органолептическим установлением.

OBJEKTIVE PRÜFUNG DER SCHIMMELBILDUNG VON TABAK
AUF GRUND DER KATALASEAKTIVITÄT

F. Berky

Der Verfasser beschreibt die zur Messung der Katalaseaktivität dienenden Methoden. Er stellt einen Zusammenhang zwischen der Katalaseaktivität und des Verschimmelungsgrades von Tabak fest. Versuch eines Nachweises der Infektion durch Schimmel mit dieser Methode — noch vor der organoleptischen Feststellung der Schimmelbildung — führte zu keinem positiven Ergebnis.

L'ANALYSE OBJECTIVE DE LA MOISSURE DU TABAC, À LA
BASE DE L'ACTIVITÉ CATALASE

F. Berky

Les modes du mesurage de l'activité catalase y sont exposées, en vérifiant ainsi la corrélation entre l'activité catalase et l'état de la moisissure du tabac. L'établissement de la contamination par la moisissure à cette méthode, avant l'examen sensoriel, ne s'est pas révélé fructueux.

OBJECTIVE EXAMINATION OF THE MOULDINESS OF TOBACCO
ON THE BASIS OF THE CATALASE ACTIVITY

F. Berky

Methods for measurements of the catalase activity are surveyed by the author. A correlation was found between catalase activity and degree of mouldiness of tobacco. Attempts to detect the contamination of tobacco by mildews by this method at a date when mouldiness is not yet detectable by organoleptic investigations failed.