



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“

ХИМИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА „ХИМИЧНА ТЕХНОЛОГИЯ“



ЛИЛИЯ СТОЯНОВА СТОЯНОВА

***Влияние на органичното производство върху състава на
тютюневи семена и възможности за приложение на
глицеридното масло***

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

за присъждане на образователната и научна степен „доктор“

Област на висше образование - 4. Природни науки, математика и информатика;

Професионално направление - 4.2. Химически науки;

Докторска програма: Технология на животинските и растителни мазнини, сапуните,
етеричните масла и парфюмерийно-козметичните препарати

Научен ръководител: доц. д-р Мария Ангелова-Ромова

ПЛОВДИВ, 2024 г.

Дисертацията съдържа: 171 страници и включва 35 таблици, 42 фигури и 2 схеми. Библиографската справка обхваща 172 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден от Разширен катедрен съвет в Катедра „Химична технология“, ПУ „Паисий Хилендарски“ (Протокол № 12 от 19.11.2024 г.) и насрочен за защита пред научно жури в състав:

- Проф д.н. Венелина Попова
- Проф. д-р Марияна Перифанова-Немска
- Проф. д-р Магдален Златанов
- Проф. д-р Гинка Антова
- Доц. д-р Жана Петкова

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на 24.02.2025 г. от 11:00 часа в зала „Компас“ на ПУ „Паисий Хилендарски“.

Материалите по защитата са на разположение в Централната библиотека на ПУ „Паисий Хилендарски“.

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Тютюнът (*Nicotiana tabacum* L.) е едно от най-изследваните растения сред техническите култури в България и света. Отглежда се предимно заради листната му маса, която съдържа алкалоида никотин, с цел влагане в тютюневи продукти за пушене, дъвчене и смучене. Тютюнопроизводството в България включва основно отглеждане на дребнолистни тютюни от сортови групи *Басми* и *Кабакулак* и едролистни тютюни от сортова група *Виржиния*. Сортова група *Басми* е типична за Южна България, като с изявена търговска значимост са сортовете от екотип *Крумовград*. Сортова група *Кабакулак* е характерна за култивиране предимно в Северна България. Отглеждането на тютюн в България се извършва съгласно два типа агротехнически практики – конвенционално производство и органично производство. От 2016 г. Институт по тютюна и тютюневи изделия – с. Марково отглежда с научна цел тютюн върху сертифицирано био поле в опитна станция на института в гр. Гоце Делчев. Този индустриален вид тютюн се отличава с изцяло органична технология на производство, без участие на съвременни препарати за растителна защита и торене на почвата.

През последните години особен интерес предизвикват освен листата на тютюневото растение и тютюневите семена, произвеждани в изключително голямо количество и често явяващи се отпадъчен продукт при производството. Тютюневите семена са тъмнокафяви на цвят, малки по размер, с яйцевидна форма и изпъкнал релеф по едната страна, завършващи в стърчащ хилум в малкия край на семето. В съцветието на тютюна може да се съдържат между 3000 и 5000 семена. При правилно съхранение те могат да се запазят за дълъг период от време и да се използват както за култивиране, така и като суровина за преработка. Химичният състав на тютюневите семена зависи от сорта, начина на отглеждане и съхранение. Чрез преработката на тютюневи семена могат да се получат два потенциално ценни продукта: глицеридно масло и експелер. Различните сортове тютюн дават добър добив на масло, достигащ до 40% от общата маса на семената, а останалата част се състои от сурови влакнини, протеини, нишесте и неорганичен материал. Маслото не съдържа никотин и има ниско съдържание на наситени мастни киселини. Сред ненаситените мастни киселини, влизащи в състава на тютюневото масло, в най-голямо количество се открива линоловата киселина. Тя е n-6 незаменима киселина, с доказан положителен ефект върху човешкото здраве и търсена добавка в редица фармацевтични и козметични продукти. Наред с мастните киселини, тютюневото масло съдържа и други биологично активни вещества, полезни за здравето като токофероли, фосфолипиди, стероли и полифеноли.

В световен мащаб науката обръща внимание към възможната алтернативна употреба на тютюна и запазването на тази техническа култура като важна икономическа суровина и все повече се набляга на значимостта на цветовете и семената на това растение. Разширената характеристика на химичния състав на тютюневи семена и глицеридно масло, проследен във времето и при различни условия на производство, може да даде насоки за селектиране на сортове, подходящи за максимално оползотворяване, както и да даде нови направления за затворен производствен цикъл с минимални отпадъчни продукти. Тютюневият шрот от семена и глицеридно масло не е достатъчно проучен по отношение на ползите му върху човешкото здраве и крие потенциал за хранителна суровина и терапевтично масло с приложимост в медицината и козметиката.

II. ЗАКЛЮЧЕНИЕ ОТ ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Проучвани са:

- предимно тютюневи семена от сортове *Виржиния, Бърлей и Мериленд*;
- химичния състав на семената и липидния състав на полученото масло от различни сортове и различни географски области;
- мастнокиселинния, стероловия и токоферолов състав на масла от тютюневи семена;
- възможностите за използване на маслото за производство на биодизел и се работи в насока използване на тютюневи семена и глицеридно масло от тях за прилагането им във фармацевтичната, козметичната и хранително-вкусовата промишленост.

При направения литературен обзор липсват данни за:

- химичния и липидния състав на тютюневи семена, отгледани в условия на органично производство;
- химичния и липидния състав на тютюневи семена от една сортова група за две последователни години на вегетация;
- химичния и липидния състав на отпадъчни тютюневи семена и възможности за оползотворяването им;
- антиоксидантна активност на екстракти от семена, шрот и глицеридно масло от тютюн;
- влагане на тютюнево масло в козметични продукти – тяхната стабилност, състав и възможност за развиване на микроорганизми.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ

Използвани са семена от ориенталски тютюн, екотип *Крумовград*, сортова група *Басми*, България. Те са събирани в края на вегетационния период на растението. Тютюневите семена са различни по размер и качество, затова подлежат на почистване и фракциониране. Семената с размер над 0,5 mm се определят като годни за кълняемост и са използвани за култивиране и семеподдържане, а тези с размер под 0,5 mm са окачествени като негодни – отпадъчни.

Тютюневите растения са отгледани и предоставени от Институт по тютюна и тютюневи изделия – с. Марково, както следва:

- Семена от ориенталски тютюн (годни за употреба), сортова група *Басми*, сорт *Крумовград 58 (био)*, отгледан върху сертифицирано биополе с писмено доказателство №0058291021, издадено от Космосерт АД, в опитна станция на Институт по тютюна и тютюневи изделия, гр. Гоце Делчев в две последователни години (2020 и 2021 г.) – *Кр 58 (био)*;
- Семена (годни за употреба) от ориенталски тютюн, сортова група *Басми*, сорт *Крумовград 58*, отгледан при конвенционални условия в опитна станция, с. Козарско в две последователни години (2020 и 2021 г.) – *Кр 58 (конв.)*;
- Семена от ориенталски тютюн (годни за употреба), сортова група *Басми*, сорт *Крумовград 90*, отгледан при конвенционални условия в опитна станция, с. Козарско в две последователни години (2020 и 2021 г.) – *Кр 90 (конв.)*;
- Отпадъчни тютюневи семена (негодни за употреба) от различни сортове ориенталски тютюни и различни години на вегетация;

-
- Студено пресовано масло от гроздови семена, закупено от търговската мрежа (Mara international LTD, Испания);
 - Цитронелово етерично масло (от лимонена трева), закупено от търговската мрежа (Bioherba R Ltd, България).

Използваните реактиви и свидетели са с необходимата чистота за анализ, предоставени от фирмите "Sigma Aldrich", "Merk", "Honeywell", "РаЙ - Хим".

Приложени са стандартизирани, валидирани и вътрешно лабораторни методи за анализ.

IV. ОСНОВНА ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Основната цел на изследванията е да се проследи влиянието на органичното производство върху състава на тютюневи семена и извлеченото от тях глицеридно масло и да се оценят възможностите за тяхното приложение.

За осъществяване на така поставената цел е необходимо да се решат следните задачи:

- Проследяване и сравняване на основните химични показатели на органично произведени тютюневи семена от един и същи сорт тютюн с такива, получени при конвенционално (традиционно) производство.
- Определяне на физични и химични показатели на тютюнево масло, получено от семена отгледани в органични и конвенционални условия.
- Проследяване на промените в химичния и липидния състав на семена от два сорта тютюн от една и съща сортова група за две години на вегетация.
- Приложение и оптимизиране на различни техники за извличане на глицеридно масло от тютюневи семена.
- Определяне на биологично активни вещества и тяхната антиоксидантна активност в тютюневите семена, масло и шрот.
- Определяне на химичния и липидния състав на отпадъчни тютюневи семена и полученото от тях масло с цел тяхното приложение.
- Изследване на възможности за приложение на масло от органично произведени тютюневи семена за козметични цели.

V. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Проследяване и сравняване на основните химични показатели на органично произведени тютюневи семена от един и същи сорт тютюн с такива, получени при конвенционално (традиционно) производство

Масленото съдържание на изследваните сортове ориенталски тютюн е между 36,50% и 42,32% (**Таблица 1**). При сорт *Кр 58 (конв.)* се отчита разлика от 6% спрямо масленото съдържание на семената за двете последователни години. При същия сорт *Кр 58 (био)*, отгледан в условия на органично производство, разликата е наполовина - 3%. Получените резултати за органично произведения сорт са сходни със стойностите от семена сорт *Кр 90 (конв.)*.

Съдържанието на общ азот в изследваните тютюневи семена е около 3,5%. При семена от сорт *Кр 90 (конв.)* то е 3,18% и за двете реколти. Семената от сорт *Кр 58 (био)* са с близко средно азотно съдържание от 3,06% до 3,22%. При другия конвенционално отгледан сорт *Кр 58 (конв.)* се наблюдава най-ниската отчетена

стойност на общ азот за реколта 2021 г. – 2,98%. Съдържанието на протеини е около 20% от общия им химичен състав. Отчетените стойности са без значителни разлики (18,65% до 21,03%) между отделните години на изследване и показват устойчивост по отношение на този показател.

Таблица 1. Общ химичен състав на тютюневи семена от сортова група *Басми* в две последователни години

Реколта Показатели	Сорт тютюн					
	<i>Кр 58 (био)</i>		<i>Кр 58 (конв.)</i>		<i>Кр 90 (конв.)</i>	
	2020	2021	2020	2021	2020	2021
Масленост, %	41,70± 0,92	38,40± 0,42	42,32± 0,11	36,50± 0,28	40,02± 0,74	38,50± 0,57
Протеини, %	19,14± 0,66	20,10± 0,14	21,03± 0,48	18,65± 0,21	19,90± 0,30	19,88± 2,00
- общ азот	3,06±0,11	3,22±0,02	3,37±0,08	2,98±0,03	3,18±0,05	3,18±0,32
Въглеhidрати, % (по разлика)	28,90± 0,28	31,72± 0,05	26,73± 0,42	33,41± 0,25	31,19± 0,14	30,63± 0,87
Пепел, %	3,60±0,00	3,57±0,21	3,60±0,04	4,93±0,02	3,26±0,42	4,46±0,02
Влага, %	6,66±0,05	6,21±0,01	6,32±0,03	6,51±0,00	5,63±0,01	6,53±0,02
Енергийна стойност, kcal/100 g	567,5±0,8	552,9±1,4	571,9±1,2	535,8±0,7	564,5±0,9	548,5±1,5

Mean ± SD, (p<0,05), n = 3

Общото съдържание на въглеhidрати в семена от сорт *Кр 90 (конв.)* е 30,63 - 31,19%. То е отчетено с най-ниска стойност при сорт *Кр 58 (био)* – 28,90% (2020 г.) и най-високо при сорт *Кр 58 (конв.)* – 33,41% (2021 г.). Получените данни за пепелно съдържание на семената, произведени през 2020 г. и от двата сорта тютюн, независимо от начина на отглеждане, са сходни (3,26 - 3,60%). При изследване на конвенционално произведените семена сорт *Кр 58 (конв.)* и *Кр 90 (конв.)* от реколта 2021 г. се забелязва завишаване на пепелното съдържание с около 1% (4,46 - 4,93%). При органично произведения сорт *Кр 58 (био)* не се наблюдава значителна разлика в пепелното съдържание, средно за двете години 3,58%. Тютюневите семена от сортове *Кр 58* и *Кр 90* се характеризират със съдържание на влага между 5,63% и 6,66%. Най-голяма разлика е отчетена в получените стойности при сорт *Кр 90 (конв.)* – 1% между първата и втората година. Разликите във водното съдържание при сорт *Кр 58* не надхвърлят 0,5% независимо от метода на отглеждане. Енергийната стойност на тютюневите семена е между 535,8 - 571,9 kcal/100g. Семената от реколта 2020 г. се отличават с по-висока енергийна стойност (564,5 - 571,9 kcal/100g) от тези от реколта 2021 г. (535,8 - 552,9 kcal/100g), което се дължи на установената по-висока масленост в тютюневите семена за същия период.

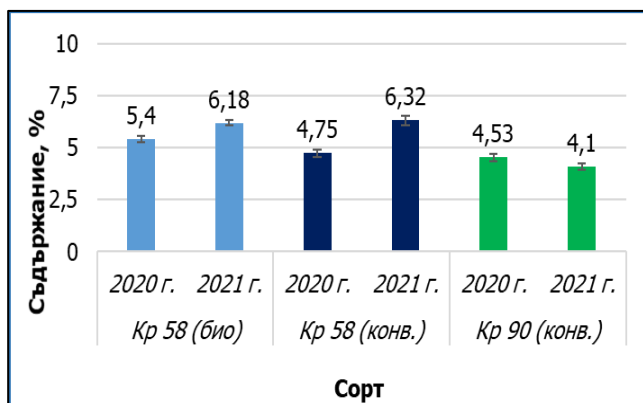
Приложени са стандартизирани методи за анализ на съдържание на общи и редуциращи захари в тютюневи семена чрез използване на автоанализатор в поток (**Таблица 2**). Общите захари не надвишават 3,0%, а редуциращите захари са около 0,5%.

Таблица 2. Съдържание на общи и редуциращи захари, определени чрез анализ в поток

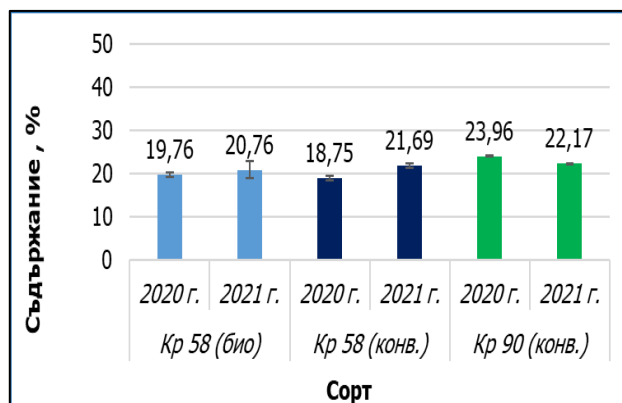
Реколта	Сорт					
	<i>Кр 58 (био)</i>		<i>Кр 58 (конв.)</i>		<i>Кр 90 (конв.)</i>	
	2020	2021	2020	2021	2020	2021
Общи захари, %	2,34±0,02	2,32±0,02	2,36±0,04	1,92±0,02	1,90±0,02	2,11±0,02
Редуциращи захари, %	0,59±0,02	0,59±0,02	0,52±0,03	0,51±0,02	0,47±0,04	0,55±0,02

Mean ± SD, (p<0,05), n = 3

Съдържанието на нишесте в изследваните тютюневи семена е представено на **Фигура 1**. То е най-високо при семена от сорт *Кр 58 (био)* и *Кр 58 (конв.)* – 6,18% и 6,32% през 2021 г. Семената от реколта 2020 г. на същия сорт тютюн, при двата различни начина на култивиране, имат по-ниско съдържание на нишесте - около 1% и 2%. При сорт *Кр 90 (конв.)* е отчетена най-ниска стойност и за двете последователни години, както следва: 4,53% - 2020 г. и 4,10% - 2021 г.



Фигура 1. Съдържание на нишесте в тютюневи семена



Фигура 2. Съдържание на фибри в тютюневи семена

Съдържанието на фибри в изследваните проби тютюневи семена е високо, между 18,75% при *Кр 58 (конв.)* – 2020 г. и 23,96% при *Кр 90 (конв.)* – 2020 г. При всички проби се наблюдават разлики в съдържанието на фибри между двете реколти в рамките на около 1%. Получените резултати показват, че фибрите в тютюневите семена са в най-голямо процентно съдържание от това на общите въглехидрати (64 - 77%) (**Фигура 2**).

Макро- и микроелементите в тютюневи семена са представени от осем идентифицирани елемента – калий, натрий, калций, магнезий, желязо, манган, мед и цинк (**Таблица 3**). От макроелементите преобладаващи са калий (7294,0 – 8657,0 mg/kg) и магнезий (4021,6 – 4947,0 mg/kg), а от микроелементите желязо (167,5 – 342,4 mg/kg). Съдържанието на натрий в тютюневите семена от сорт *Кр 58*, независимо от начина на производство, е по-ниско (11,0 – 15,5 mg/kg) от установеното количество при семена от сорт *Кр 90 (конв.)* - 18,0 -18,9 mg/kg. При органично произведените тютюневи семена съдържанието на калций е два пъти по-малко в сравнение с количеството му при семена от *Кр 90 (конв.)* и същевременно е по-високо от това в *Кр 58 (конв.)*. Съдържанието на магнезий в семена *Кр 58 (био)* е по-високо

от това в конвенционално произведените семена. От микроелементите, желязото е преобладаващ елемент. Семената от сорт *Кр 90 (конв.)* се отличават с почти два пъти по-високо съдържание на желязо (340,5 – 342,4 mg/kg) в сравнение със семената от сорт *Кр 58* (167,5 – 196,5 mg/kg), независимо от начина на отглеждане. Съдържанието на останалите елементи в изследваните тютюневи семена е в близък порядък.

Таблица 3. Съдържание на макро- и микроелементи в тютюневи семена

Елемент, mg/kg	Сорт					
	<i>Кр 58 (био)</i>		<i>Кр 58 (конв.)</i>		<i>Кр 90 (конв.)</i>	
	2020	2021	2020	2021	2020	2021
K	8200,0±1,8	8000,0±1,6	7294,0±1,4	7545,0±1,5	8500,0±1,8	8657,0±1,6
Na	12,0±0,9	15,5±0,8	12,0±0,5	11,0±0,2	18,0±0,8	18,9±0,5
Ca	356,0±1,2	305,9±1,4	255,9±0,8	245,6±0,4	756,0±1,2	758,0±0,8
Mg	4848,5±1,4	4947,0±1,2	4197,2±1,5	4021,6±1,4	4598,0±1,6	4600,0±1,8
Fe	167,5±1,2	196,5±1,0	189,5±0,8	187,2±1,0	340,5±0,8	342,4±1,2
Mn	54,5±0,6	42,3±0,8	50,0±0,5	50,5±0,8	62,5±0,8	60,5±0,8
Cu	18,5±0,5	15,0±0,5	15,5±0,4	16,2±0,6	16,0±0,6	16,8±0,6
Zn	59,0±0,8	50,5±0,5	50,0±0,6	50,5±1,0	72,0±0,7	71,0±0,8

Mean ± SD, (p<0,05), n = 3

Тютюневото растение е източник на полифенолни съединения – фенолни киселини и флавоноиди. В семената на тютюн от сорт *Кр 58 (био)*, отгледан в условия на органично производство, количеството на рутин и хлорогенова киселина не надвишава 0,3 mg/g (**Таблица 4**). Впечатление прави, че при същия сорт семена *Кр 58 (конв.)*, рутин и хлорогенова киселина не се идентифицират.

Таблица 4. Съдържание на полифеноли в метанолни екстракти от тютюневи семена

mg/g	Реколта	Сорт					
		<i>Кр 58 (био)</i>		<i>Кр 58 (конв.)</i>		<i>Кр 90 (конв.)</i>	
		2020	2021	2020	2021	2020	2021
Рутин		0,25±0,05	0,27±0,02	N/D	N/D	0,20±0,02	N/D
Хлорогенова киселина		0,20±0,02	0,23±0,04	N/D	N/D	N/D	N/D

Mean ± SD, (p<0,05), n = 3; N/D – липсва пик за съответното вещество

В семената от тютюн от сорт *Кр 90 (конв.)*, който също се отглежда съгласно стандартните практики за сорта, се установява наличие само на рутин (0,20 mg/g) в близки граници до количествата, определени в органично произведения сорт *Кр 58 (био)* – 0,25 - 0,27 mg/g.

Заклучение:

➤ Химичният състав на семената от сорт *Кр 58* е без големи отклонения през проучвания вегетационен период спрямо сорт *Кр 90*, което показва, че изследваните параметри могат да се приемат за типични за семена от екотип *Крумовград*, сортова група *Басми*.

➤ Изследваните тютюневи семена се характеризират с високо съдържание на основните макронутриенти – мазнини, протеини и въглехидрати, независимо от начина на производство.

- Семената от проучваните сортове тютюни се отличават с ниско общо съдържание на захари, но богати на фибри.
- Органичното производство не оказва съществено влияние върху състава на основните химични компоненти на семената.
- В състава на органично произведените тютюневи семена се откриват макар и ниски нива на полифенолни съединения – рутин и хлорогенова киселеина, които липсват при конвенционално произведените семена от същия сорт.

2. Определяне на физични и химични показатели на тютюнево масло, получено от семена, отгледани в органични и конвенционални условия

Физичните и химичните характеристики на глицеридно масло от тютюневи семена, произведени в конвенционални и органични условия са представени в **Таблица 5**. Коефициентът на рефракция се използва като показател за определяне чистотата на пробата и за контрол на настъпили процеси на хидрогениране и изомеризация. При изследваните глицеридни тютюневи масла са отчетени стойности в диапазон 1,4745 – 1,4761. Получените данни показват висока ненаситеност на маслото.

Таблица 5. Физикохимични показатели на масло от тютюневи семена

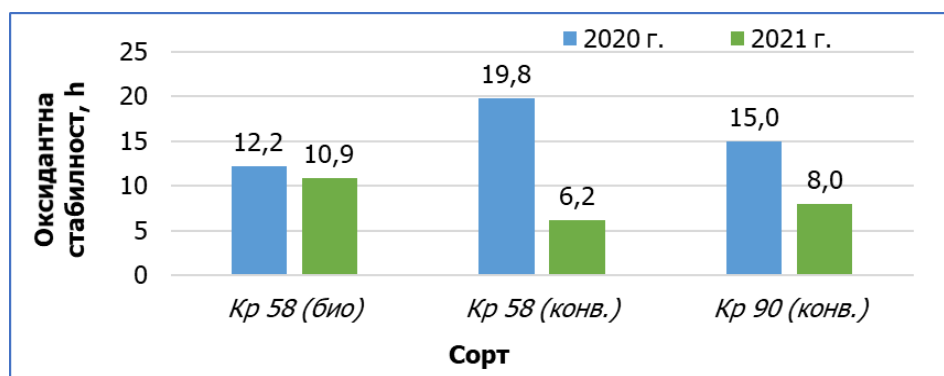
Реколта Показател	Сорт					
	<i>Кр 58 (био)</i>		<i>Кр 58 (конв.)</i>		<i>Кр 90 (конв.)</i>	
	2020	2021	2020	2021	2020	2021
Креф	1,4757 ±0,0001	1,4745 ±0,0001	1,4760 ±0,0002	1,4760 ±0,0001	1,4761 ±0,0002	1,4761 ±0,0001
ПОЧ, meqO ₂ /kg	2,41±0,03	1,89±0,07	2,70±0,02	2,20±0,04	2,40±0,05	2,00±0,06
КЧ, mgKOH/g	3,29±0,10	3,32±0,05	3,90±0,12	3,60±0,03	3,70±0,07	3,30±0,06
СМК, %	1,66±0,50	1,67±0,42	1,78±0,26	1,82±0,28	1,76±0,36	1,70±0,45
ЙЧ, gI ₂ /100g	134±1	137±3	134±1	138±2	139±4	140±1

Mean ± SD, n = 3; Креф – коефициент на рефракция; ПОЧ – пероксидно число; КЧ – киселинно число; СМК – свободни мастни киселини; ЙЧ – йодно число

Пероксидното число за изследваните тютюневи масла е в граници 1,89 - 2,70 meqO₂/kg, като няма значителни разлики в маслата от двете години на отглеждане. Маслото от сорт *Кр 58 (био)* има стойности за ПОЧ, съвпадащи с тези на маслото от произведения сорт *Кр 90 (конв.)*. Киселинното число на маслата е в граници между 3,29 – 3,90 mg KOH/g. Най-ниско киселинно число е отчетено при масло от семена сорт *Кр 58 (био)* – 3,29 mg KOH/g и има близки стойности през двете реколти. Конвенционално произведените семена имат по-високи стойности за киселинно число от органично произведените, като се наблюдава минимална разлика между двете реколти. Изследваните масла от семена на сорт *Кр 58 (био)* за двете години имат най-ниско съдържание на свободни мастни киселини (СМК) спрямо конвенционално произведените. Получените резултати за СМК са в граници между 1 - 5%. Йодното число, като показател за ненаситеността на мастнокиселинния, състав е относително високо – 134 - 140 gI₂/100g и определя тютюневото масло да бъде със слаба

оксидантна стабилност. Стойностите за йодно число при сорт *Кр 90 (конв.)* са най-високи от трите изследвани проби масло – 139 - 140 gI₂/100 g.

Резултатите за оксидантна стабилност на изследваните глицеридни масла са представени на **Фигура 3**. Отчетеният индукционен период е в диапазон от 6,2 до 19,8 h. Маслата от сорт *Кр 58 (био)* имат близка оксидантна стабилност през двете години, съответно 12,2 h и 10,9 h. Голяма разлика в стабилността се наблюдава при маслото, извлечено от конвенционално произведените семена през двете последователни години.



Фигура 3. Оксидантна стабилност на тютюнево масло

Заклучение:

➤ Маслото от органично произведени семена може да бъде отчетено с по-добри показатели поради по-ниските стойности за киселинно и пероксидно число, както и по-добра повтаряемост по отношение на оксидантната стабилност спрямо маслото от конвенционално произведените семена през проследените реколти.

3. Проследяване на промените в химичния и липидния състав на семена от два сорта тютюн от една и съща сортова група за две години на вегетация

3.1. Мастнокиселинен състав на глицеридно масло от тютюневи семена

Тютюневите семена от сортова група *Басми* – сорт *Кр 58 (био)*, *Кр 58 (конв.)* и *Кр 90 (конв.)* имат висок процент масленост – от 36,50 до 42,32%. Установени са 14 мастни киселини в маслата и при двата сорта тютюневи семена, като резултатите са представени в **Таблица 6**. В мастнокиселинния състав на всички изследвани глицеридни масла преобладаващо е съдържанието на линолова киселина (C_{18:2}) между 64,40% и 69,49. Разликите в съдържанието на линолова киселина между двете последователни години на отглеждане по сортове е между 0,5 – 3,5%. Втора по съдържание мастна киселина (МК) в тютюневото масло е олеиновата – 13,48% - 17,70%. В маслото от семена от сорт *Кр 58 (био)*, тя е в най-голямо количество от изследваните проби – 17,3 - 17,7%. В състава на тютюневото масло сред ПНМК се откриват и малки количества линоленова киселина (C_{18:3}): 0,50% - 0,68%. От НМК най-високо съдържание се отчита за палмитиновата между 10,98% и 14,20%. Маслото от семена сорт *Кр 58 (био)* я съдържа в по-голямо количество (12,00 – 14,20%), спрямо конвенционално произведените сортове (10,98 – 13,80%). Във фракцията на НМК втора по съдържание е стеариновата (1,53 – 3,70%). Нейното количество се увеличава с намаляване на съдържанието на олеиновата киселина и при двата сорта. Варирането в процентното съдържание на всички идентифицирани мастни киселини през двете

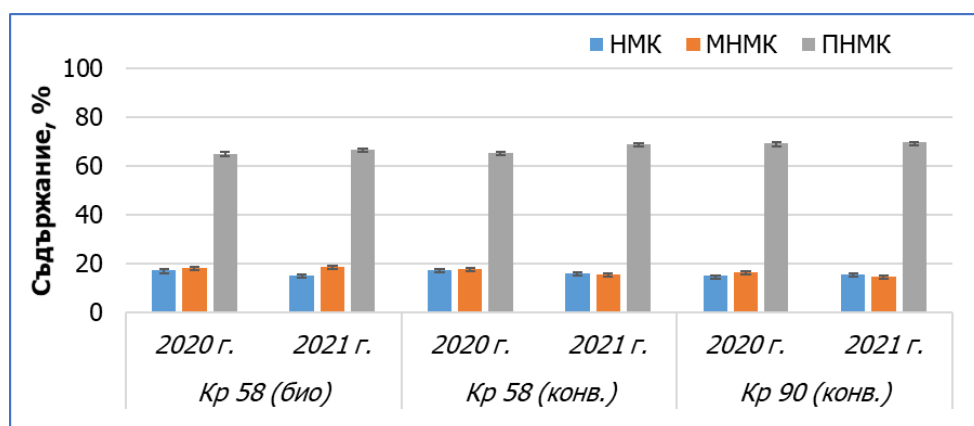
реколти за трите изследвани масла е в рамките между 1 и 3%, което показва добра устойчивост на културата.

Таблица 6. Мастнокиселинен състав на масло от тютюневи семена

Мастни киселини, %		Сорт					
		<i>Кр 58 (био)</i>		<i>Кр 58 (конв.)</i>		<i>Кр 90 (конв.)</i>	
		2020	2021	2020	2021	2020	2021
C _{14:0}	Миристинова	0,10± 0,00	0,10± 0,00	0,10± 0,00	0,10± 0,00	N/D	0,11± 0,00
C _{15:1}	Пентадеканова	0,10± 0,00	N/D	N/D	0,30± 0,00	N/D	0,21± 0,00
C _{16:0}	Палмитинова	14,20± 0,5	12,00± 0,40	13,80± 0,60	11,20± 0,50	13,08± 0,40	10,98± 0,40
C _{16:1}	Палмитоолеинова	0,10± 0,02	0,20± 0,02	0,10± 0,01	0,20± 0,01	0,05± 0,00	0,20± 0,00
C _{17:0}	Маргаринова	0,10± 0,02	0,20± 0,02	0,20± 0,00	0,30± 0,01	0,14± 0,01	0,20± 0,01
C _{17:1}	Хептадеканова	0,30± 0,02	0,40± 0,02	0,20± 0,01	0,30± 0,01	0,10± 0,00	0,41± 0,01
C _{18:0}	Стеаринова	2,30± 0,04	2,10± 0,05	2,90± 0,02	3,70± 0,02	1,53± 0,01	3,42± 0,02
C _{18:1}	Олеинова	17,30± 0,50	17,70± 0,60	17,20± 0,80	14,40± 0,60	16,11± 0,60	13,48± 0,50
C _{18:2}	Линолова	64,40± 0,80	65,90± 0,50	64,70± 0,50	68,20± 0,40	68,99± 0,80	69,49± 0,40
C _{18:3}	Линоленова	0,50± 0,02	0,60± 0,02	0,50± 0,02	0,60± 0,02	N/D	0,68± 0,04
C _{20:0}	Арахинова	0,10± 0,00	0,20± 0,01	N/D	0,20± 0,01	N/D	0,19± 0,02
C _{20:1}	Гадолиева	0,20± 0,01	0,10± 0,01	0,10± 0,00	0,10± 0,00	N/D	0,12± 0,00
C _{22:0}	Бехенова	0,20± 0,01	0,40± 0,02	0,20± 0,01	0,30± 0,02	N/D	0,38± 0,02
C _{22:1}	Ерукова	0,10± 0,00	0,10± 0,00	N/D	0,10± 0,00	N/D	0,13± 0,00

Mean ± SD, n = 3; N/D – не се идентифицира пик на съответното вещество

Мастните киселини са разпределени спрямо броя на двойни връзки в тях на наситени и ненаситени мастни киселини – моно- (с една двойна връзка) и поли- (с повече от една двойна връзка) в процентно съдържание, представено на **Фигура 4**. Най-високо е съдържанието на полиненаситените мастни киселини (ПНМК), което се обуславя от високото количество на линолова киселина при всички анализирани проби. Съдържанието на наситени (НМК) и мононенаситени (МНМК) мастни киселини е в близки граници. При масло от сорт *Кр 58 (конв.)* НМК и МНМК са в съотношение 1:1 и за двете години. Глицеридното масло от сорт *Кр 90 (конв.)* е с най-ниско съдържание на НМК - 14,75 – 15,28%. Не са установени различия по отношение на идентифицираните мастни киселини при сорт *Кр 58 (био)* и *Кр 58 (конв.)*.



Фигура 4. Съдържание на наситените и ненаситени (моно- и поли-) мастни киселини в състава на тютюнево масло през две последователни години

3.2. Функционални свойства на липидите – липидни индекси

Функционалните свойства на тютюневото масло, се определят на база мастнокиселинния състав чрез математически изчислени липидни индекси (**Таблица 7**).

Таблица 7. Липидни индекси на масло от тютюневи семена

Липидни индекси	Сорт					
	Кр 58 (био)		Кр 58 (конв.)		Кр 90 (конв.)	
	2020	2021	2020	2021	2020	2021
Атерогенен индекс	0,18± 0,02	0,15± 0,01	0,17± 0,01	0,14± 0,01	0,15± 0,01	0,14± 0,01
Тромбогенен индекс	0,39± 0,04	0,32± 0,02	0,39± 0,02	0,34± 0,00	0,34± 0,00	0,33± 0,01
Хипохолестеролемичен/ Хиперхолестеролемичен индекс	5,75± 0,05	6,96± 0,02	5,93± 0,01	7,36± 0,01	6,51± 0,02	7,54± 0,02
Еквивалент на алилна позиция (АРЕ)	164,4± 0,05	168,4± 0,06	164,8± 0,05	166,4± 0,04	170,2± 0,05	167,3± 0,05
Еквивалент на бисалилна позиция (ВАРЕ)	65,4± 0,04	67,1± 0,03	65,7± 0,02	69,4± 0,05	68,99± 0,04	70,85± 0,04
Индекс на оксидантна стабилност	0,97± 0,01	0,89± 0,01	0,95± 0,01	0,79± 0,01	0,81± 0,01	0,72± 0,01
Окисляемост	0,66± 0,01	0,67± 0,01	0,66± 0,01	0,70± 0,01	0,69± 0,00	0,71± 0,01
Индекс на пероксидация	65,85± 0,01	67,56± 0,01	66,14± 0,02	69,79± 0,04	69,40± 0,02	71,21± 0,01

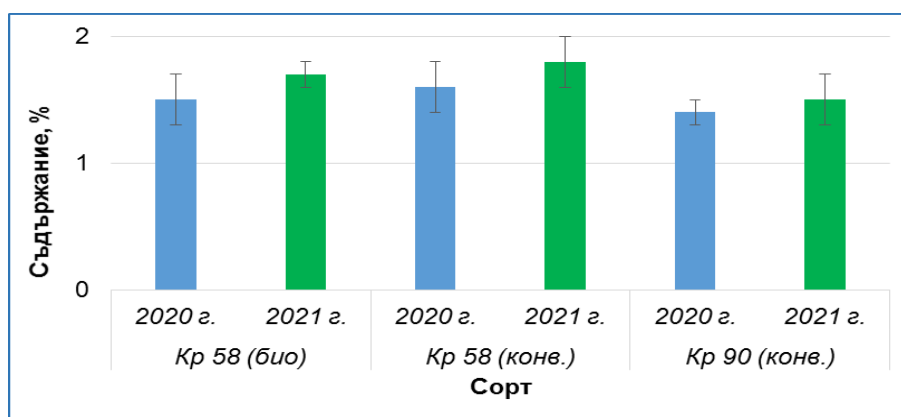
Mean ± SD, (p<0,05), n = 3

Атерогенният индекс на маслата е между 0,14 – 0,18, а тромбогенният индекс е в диапазона от 0,32 до 0,39. Тези два индекса са показател за влиянието на маслото върху кръвоносната система при употребата му за хранителни цели. Стойности под 0,5 се смятат за добър показател с нисък риск. Съотношението хипохолестеролемия/хиперхолестеролемия (h/H) е индекс, с цел да установи ефекта на мастните киселини върху съдържанието на холестерола. Стойностите за h/H индекс са между 5,75 (*Кр 58 (био)*) и 7,54 (*Кр 90 (конв.)*). h/H индекс на маслото от реколта 2021 г. е по-висок при всички изследвани проби. Маслото от семената на органично отгледания сорт има по-нисък h/H индекс от конвенционално произведените.

В **Таблица 7** са представени и еквивалентите на алилна (APE) и бис-алилна (BAPE) позиция, които посочват броя на двойните връзки и тяхната позиция в структурата на мастните киселини. Високите стойности на APE и BAPE предполагат бързо окисление. Индексът на оксидантна стабилност за всички масла е под 1. Маслото от конвенционално отгледаните сортове е по-склонно към окисление от полученото от биологично произведения сорт. Индексът на пероксидация показва по-ниски стойности за маслото от сорт *Кр 58 (био)* спрямо това от конвенционално произведените семена. Високи стойности на индекса на пероксидация предвиждат завишени нива на вторични метаболити, като малонов диалдехид. В началните етапи на окисление на изследваното тютюнево масло получените стойности са в граници от 65,85 до 71,21.

3.3. Фосфолипиден състав на тютюнево масло

Общото съдържание на фосфолипиди в изследваните тютюневи масла е в граници от 1,4% до 1,8% (**Фигура 5**), като по-високо съдържание на фосфолипиди е отчетено през 2021 г., независимо от сорта и начина на отглеждане на семената.



Фигура 5. Общо фосфолипидно съдържание в масло от тютюневи семена в две последователни години

Най-ниско съдържание на фосфолипиди са установени при маслата от семена сорт *Кр 90 (конв.)* и през двете години - 1,4% и 1,5%. Тютюневите масла от сорт *Кр 58 (конв.)* и сорт *Кр 58 (био)* не се различават съществено по съдържанието на фосфолипиди. Индивидуалният фосфолипиден състав на маслото и за двата сорта включва изолирани осем фосфолипида: фосфатидилхолин (ФХ); фосфатидилинозитол (ФИ); фосфатидилетаноламин (ФЕА); фосфатидни киселини (ФК); лизофосфатидилхолин (ЛФХ); фосфатидилсерин (ФС); монофосфатидилглицерол (МФГ); дифосфатидилглицерол (ДФГ) (**Таблица 8**). Най-високо е съдържанието на

ФИ, ФХ и ФК, като ФИ е между 30,3% и 61,7%. Най-ниско е съдържанието наДФГ - между 1,0% и 4,0%. В маслото от тютюневи семена *Кр 58 (конв.)* е установено най-високо съдържание на ФИ, като не се наблюдава съществена разлика между реколтите - 61,7% (2020 г.) и 61,0% (2021 г.). Маслото от семена на органично произведения сорт *Кр 58 (био)* има по-ниско съдържание на ФИ (38,0%- 2020 г и 36,0% - 2021 г.) спрямо същото от конвенционално произведен сорт. От друга страна съдържанието на ФИ в масло от семена сорт *Кр 58 (био)* и *Кр 90 (конв.)* е близко.

Фосфатидилхолинът е изолиран в най-голямо количество при тютюнево масло от сорт *Кр 58 (био)* – 24,3% - 2020 г. и 23,2% - 2021 г. Фосфатидните киселини в тютюневото масло от сорт *Кр 58 (био)* и *Кр 90 (конв.)* са в близки граници между 12,0% и 14,0%, докато при маслото от семена сорт *Кр 58 (конв.)* се наблюдават по-ниски стойности с около 4 – 5%. Голяма разлика в съдържанието на МФГ се отчита при масло от семена *Кр 58 (био)* и *Кр 58 (конв.)*: от 9,0 – 9,1% до 1,0 – 1,5%.

Таблица 8. Индивидуален фосфолипиден състав на тютюнево масло от две последователни години

Фосфолипиди, %	Сорт					
	<i>Кр 58 (био)</i>		<i>Кр 58 (конв.)</i>		<i>Кр 90 (конв.)</i>	
	2020	2021	2020	2021	2020	2021
ФХ	24,3±0,2	23,2±0,6	9,9±0,6	9,5±0,4	19,9±0,1	18,9±0,8
ФИ	38,0±0,6	36,0±0,8	61,7±0,2	61,0±0,7	30,3±0,8	31,0±0,4
ФЕА	2,1±0,1	2,0±0,0	2,5±0,4	2,0±0,0	4,1±0,1	5,0±0,7
ФК	12,3±0,4	12,0±0,1	8,6±0,3	8,8±0,1	12,8±0,1	14,0±0,7
ЛФХ	6,1±0,0	5,9±0,1	9,9±0,1	10,0±0,0	6,8±0,3	8,0±0,6
ФС	4,1±0,2	3,9±0,1	4,9±0,4	4,5±0,1	11,6±0,4	12,0±0,7
МФГ	9,1±0,3	9,0±0,2	1,5±0,2	1,0±0,1	8,8±0,6	7,5±0,4
ДФГ	4,0±0,1	4,0±0,1	1,0±0,0	1,0±0,0	2,2±0,1	1,8±0,1

Mean ± SD, (p<0,05), n = 3

3.4. Неосапуняеми вещества и стероли в тютюнево масло

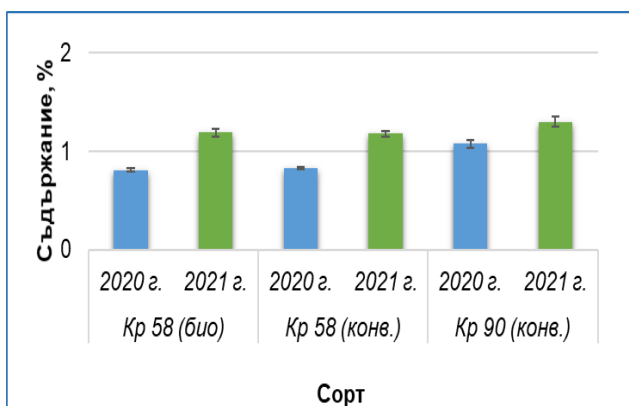
Общото съдържание на неосапуняеми вещества в глицеридните масла от изследваните тютюневи семена е средно около 3%. Резултатите показват, че при органично произведения сорт *Кр 58 (био)* между двете години се отчита разлика около 1%, съответно 2,93% (2020 г.) и 1,87% (2021 г.). Маслото от тютюневи семена сорт *Кр 90 (конв.)* съдържа най-голямо количество неосапуняеми вещества – 3,37% (2020 г.) и 2,89% (2021 г.) (**Фигура 6**). Стероли са част от неосапуняемите вещества в семена. В тютюневото масло от изследваните сортове семена е установено средно съдържание на стероли – 1,07%. Общото им съдържанието през 2020 г. е по-ниско и при двата сорта спрямо съдържанието през 2021 г. Органично и конвенционално произведеният сорт *Кр 58* имат близки стойности и за двете реколти (**Фигура 7**).

Определен е и индивидуалният стеролов състав на тютюневите масла. В маслата са идентифицирани осем компонента (**Таблица 9**). Най-високо е съдържанието на β -ситостерол, отчетено при масло от тютюневи семена сорт *Кр 90 (конв.)* – 66,87% (2020 г.) и 66,89% (2021 г.). Наличието му в масло от конвенционално и органично произведени семена на сорт *Кр 58* е в един порядък: 63,24 - 65,38% при сорт *Кр 58*

(био) и 63,44 - 65,15% при сорт *Кр 58 (конв.)*. В по-голямо количество са установени още кампестерол (17,25 – 19,52%) и стигмастерол (7,15 – 8,66%). Последният е в най-голямо количество при органично произведения сорт *Кр 58 (био)* 8,42% - 2020 г. и 8,66% - 2021 г.



Фигура 6. Неосапуняеми вещества в масло от тютюневи семена в две последователни години



Фигура 7. Общо съдържание на стероли в масло от тютюневи семена в две последователни години

От представените данни прави впечатление и по-високото съдържание на холестерол - 4,71% при *Кр 58 (конв.)* през 2021 г. до 7,69% през 2020 г. при *Кр 58 (био)*. Маслото, извлечено през 2021 г. от сорт *Кр 58 (конв.)*, не съдържа брасикастерол, който е в минимални количества в маслата извлечени от тютюневите семена от другите реколти. Δ^5 – Авенастерол и Δ^7 – стигмастерол също са в минимални количества или отсъстват в маслата през посочения вегетационен период.

Таблица 9. Индивидуален стеролов състав на масло от тютюневи семена в две последователни години

Реколта	Сорт					
	<i>Кр 58 (био)</i>		<i>Кр 58 (конв.)</i>		<i>Кр 90 (конв.)</i>	
Стероли, %	2020	2021	2020	2021	2020	2021
Холестерол	7,69± 0,06	5,86± 0,05	5,99± 0,06	4,71± 0,04	5,89± 0,08	5,82± 0,05
Брасикастерол	0,04± 0,01	0,21± 0,04	0,12± 0,03	N/D	0,30± 0,10	0,17± 0,02
Кампестерол	19,18± 0,48	18,92± 0,27	19,00± 0,05	19,52± 0,28	17,25± 0,05	18,36± 0,05
Стигмастерол	8,42± 0,05	8,66± 0,05	7,75± 0,05	7,15± 0,05	7,80± 0,25	8,00± 0,05
β -Ситостерол	63,24± 0,05	65,38± 0,06	65,15± 0,08	63,44± 0,05	66,87± 0,08	66,89± 0,08
Δ^5 - Авенастерол	0,13± 0,03	N/D	0,14± 0,01	0,50± 0,08	N/D	N/D
Δ^7 - Стигмастерол	0,04± 0,01	N/D	N/D	0,06± 0,01	0,05± 0,01	N/D
Δ^7 - Авенастерол	1,26± 0,05	0,97± 0,05	1,84± 0,05	4,61± 0,08	1,83± 0,05	0,76± 0,05

Mean ± SD, n = 3; N/D – не се идентифицира пик на съответното вещество

3.5. Токоферолов състав на тютюнево масло

Маслото от тютюневи семена е изследвано за общо съдържание на токофероли и индивидуален токоферолов състав, като данните са представени в **Таблица 10**. Съдържанието на токофероли в тютюневото масло се влияе от външни фактори на средата и сорта на растението. Общото съдържание на токофероли в маслото от изследваните тютюневи семена е в граници от 291 mg/kg (*Кр 58 (био)*) до 355 mg/kg (*Кр 90 (конв.)*). През втората година то е значително по-ниско, отколкото през първата експериментална година. Най-голяма разлика е отчетена при сорт *Кр 90 (конв.)*, където през 2020 г. съдържанието на токофероли е 355 mg/kg, а през 2021 г. то е почти наполовина – 124 mg/kg. Маслото от конвенционалния сорт *Кр 58 (конв.)* има близки стойности за общо съдържание на токофероли за двете реколти.

Таблица 10. Съдържание на токофероли в тютюнево масло – общ и индивидуален състав

Реколта \ Токофероли	Сорт					
	<i>Кр 58 (био)</i>		<i>Кр 58 (конв.)</i>		<i>Кр 90 (конв.)</i>	
	2020	2021	2020	2021	2020	2021
γ-Токоферол, %	27,3±0,3	33,1±0,2	32,8±0,1	48,5±0,2	24,5±0,5	35,1±0,1
δ-Токоферол, %	72,7±0,5	66,9±0,4	67,2±0,4	51,5±0,6	75,5±0,4	64,9±0,3
Общо токофероли, mg/kg	325±15	291±15	317±26	307±19	355±17	124±13

Mean ± SD, (p<0,05), n = 3

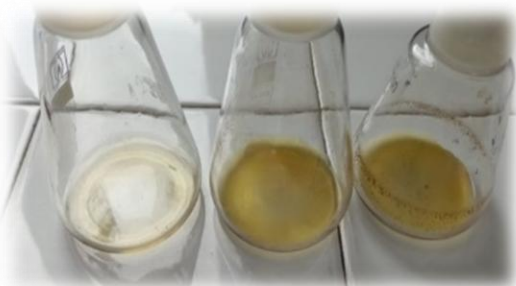
Индивидуалният токоферолов състав на изследваните тютюневи семена е представен само от два хомолога- γ (24,5 - 48,5%) и δ токоферол (51,5 - 75,5%), като количеството на втория преобладава. Маслото от сорт *Кр 58 (био)* се отличава с по-високо съдържание на δ-токоферол в сравнение γ-токоферол, като през 2020 г. съотношението е 1:3, а през 2021 – 1:2. При маслото от конвенционалния сорт тютюн *Кр 58 (конв.)* също преобладава δ-токоферол, но съотношението за двете реколти е 1:2 – 2020 г. и 1:1 – 2021 г. Тази тенденция се наблюдава и при резултата за маслото от сорт *Кр 90 (конв.)*, където съдържанието на γ-токоферол е 24,5 – 35,1%, а δ токоферол – 64,9 -75,5%.

Заклучение:

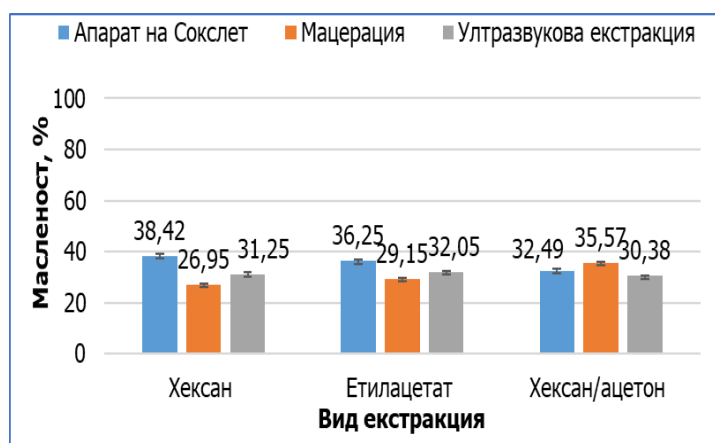
- Маслото от тютюневи семена се характеризира с високо съдържание на линолова киселина.
- Общият липиден състав на всички изследвани семена е с малки отклонения в двете последователни реколти, което ги прави подходящи сортове за добив на масло със стабилни показатели по отношение на техния мастнокиселинен състав.
- Глицеридното масло има добри атерогенни и тромбогенни свойства.
- Холестеролемичният индекс на маслото попада в стойности на традиционно използвани растителни масла, като маслото от органично произведени семена е с по-нисък индекс спрямо маслото от конвенционално произведените семена.
- Маслото от органично произведените семена се отличават с по-високо съдържание на фосфатидилхолин и токофероли в сравнение с конвенционално произведените сортове.

4. Приложение и оптимизиране на различни техники за извличане на глицеридно масло от тютюневи семена

Методи за извличане на масло – мацерация и ултразвукова екстракция са приложени за добиване на глицеридно масло от органично произведени тютюневи семена сорт *Кр 58 (био)*. Избрани са три вида екстрагенти за екстрахиране на липидната фракция от семената, като подборът им е на база полярен индекс (P'), като мярка за степента на взаимодействие. Използвани са *n*-хексан ($P' = 0$), *n*-хексан:ацетон 1:1, (*v/v*) ($P' = 2,5$) и етилацетат ($P' = 4,4$). Резултатите от проведените анализи показват различен цвят на маслото според вида на използвания разтворител (**Фигура 8**). Глицеридното масло, извлечено с *n*-хексан, има най-добри визуални качества – бледо жълто на цвят, бистро и без примеси. Маслото извлечено с етилацетат е потъмнено, докато при използване на комбинацията *n*-хексан:ацетон се наблюдава потъмняване и наличие на други мастноразтворими компоненти. Съдържанието на масло, независимо от използвания екстрагент и метода на екстракция, е в границите от 26,95% до 38,42% (**Фигура 9**).



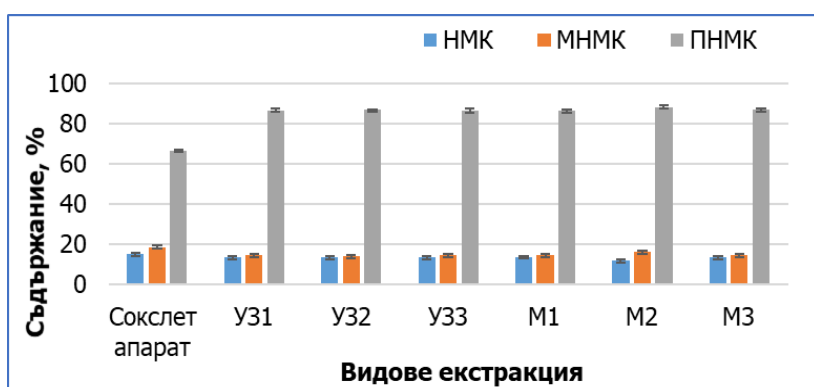
Фигура 8. Масло, извлечено с различни по полярност екстрагенти (ляво – с *n*-хексан; по средата – етилацетат; дясно - *n*-хексан:ацетон)



Фигура 9. Маслено съдържание на семена при различни видове екстракция и използване на различен екстрагент, %

Най-висока масленост с екстрагент *n*-хексан (38,42%) и етилацетат (36,25%) се постига чрез екстракция с апарат на Сокслет. При използване на екстрагент *n*-хексан:ацетон най-висок добив се отчита по метода на мацерация – 35,57%. В зависимост от метода на екстракция при използване на апарат на Сокслет добивът на масло нараства в посока на неполярен екстрагент – *n*-хексан:ацетон < етилацетат < *n*-хексан. При мацерацията зависимостта е обратна – *n*-хексан < етилацетат < *n*-хексан:ацетон. При извличане на маслото чрез ултразвукова екстракция не се отчита голяма разлика в добива на масло спрямо отделните разтворители. Основната мастна киселина във всички екстрахирани глицеридни масла, независимо от вида на използвания екстрагент и метод, е линоловата $C_{18:2}$ (70,80 – 71,74%), поради което маслата се означават като „линолов тип“. Втора по съдържание, идентифицирана мастна киселина, е олеиновата $C_{18:1}$ – 13,50 - 15,58%. Във фракцията на НМК най-голямо е съдържанието на палмитиновата киселина $C_{16:0}$ – 9,73 – 10,03%, следвана от стеариновата - 1,58-3,18%. Всички останали мастни киселини са под 1,0%. По отношение влиянието на използвания екстрагент и метод за екстракция не се наблюдава съществена разлика в мастнокиселинния състав. Линоловата киселина се

извлича еднакво добре с *n*-хексан, етилацетат и *n*-хексан:ацетон. Съдържанието на линолова киселина е близо с 5,0% повече спрямо получения резултат при екстракция със Сокслет апарат – 65,90% (виж. **Таблица 6**). По-високото съдържание на линолова киселина е за сметка на по-ниското съдържание на палмитинова и олеинова киселина при екстракция с ултразвук и мацерация. Изчислено е процентното съдържание на наситени мастни киселини (НМК), мононенаситени мастни киселини (МНМК) и полиненаситените мастни киселини (ПНМК) в маслата, получени с различни екстрагенти и вид на екстракция. Маслото от тютюневи семена, независимо от начина на добиване, се характеризира с високо съдържание на ПНМК. При ултразвукова екстракция на маслата НМК и МНМК са в съизмерими отношения около 13,0%, а ПНМК са над 70,0%, докато при екстракция със Сокслет между НМК и МНМК се наблюдава до 3,0% разлика в полза на МНМК. Данните от **Фигура 10** показват, че при Сокслет екстракция с *n*-хексан делът на НМК е 15,0%, МНМК представляват 18,5% от общия мастнокиселинен състав, а ПНМК – 66,5%. Най-ниски стойности на НМК са отчетени при мацерация с етилацетат – 11,0%.



Фигура 10. Съдържание на наситени, мононенаситени и полиненаситени мастни киселини в тютюнево масло, при различни условия на екстракция - Ултразвукова екстракция с: *n*-хексан (У31), етилацетат (У32), *n*-хексан:ацетон (У33); Мацерация с: *n*-хексан (М1), етилацетат (М2) и *n*-хексан:ацетон (М3)

Определено е общото съдържание на токофероли в екстрахираните масла над 200 mg/kg, независимо от метода на екстракция и използвания екстрагент (**Таблица 11**).

Таблица 11. Общ и индивидуален токоферолов състав на масло от тютюневи семена с различни екстрагенти и методи на екстракция

ТФ	Апарат на Сокслет	Ултразвукова екстракция			Мацерация		
	<i>n</i> -хексан	<i>n</i> -хексан	етил-ацетат	<i>n</i> -хексан:ацетон	<i>n</i> -хексан	етил-ацетат	<i>n</i> -хексан:ацетон
γ-ТФ, %	33,1±0,2	37,5±0,4	39,1±0,2	37,6±0,2	36,2±0,1	37,7±0,2	36,6±0,5
δ-ТФ, %	66,9±0,4	62,5±0,6	60,9±0,5	62,4±0,3	63,8±0,3	62,3±0,4	63,4±0,5
Общо ТФ, mg/kg	291±15	228±5	275±17	265±18	221±12	289±10	235±14

Mean ± SD, (p<0,05), n = 3

Най-високо е съдържанието на токофероли при масло, екстрахирано с *n*-хексан чрез апарат на Соклет (291 mg/kg), а най-ниско чрез метод на мацерация със същия екстрагент (221 mg/kg). При ултразвукова екстракция най-високо съдържание на токофероли се получава с етилацетат - 275 mg/kg и *n*-хексан:ацетон - 265 mg/kg, а по метода на мацерация с етилацетат - 289 mg/kg. Индивидуалният токоферолов състав е представен от два изомера – γ - и δ -. Процентното съдържание на δ -токоферол е по-голямо спрямо това на γ -токоферол във всички изследвани проби.

Заклучение:

- Глицеридно масло от тютюневи семена може успешно да се извлича освен по класически метод с апарат на Соклет в присъствие на екстрагент *n*-хексан, също така и чрез прилагане на мацерация с хексан:ацетон.
- Мастнокиселинният състав на маслото не се влияе от вида на използвания екстрагент и техниката за екстракция.
- Общото съдържание на токофероли в тютюнево масло е най-високо при използване на класически метод на екстракция със Соклет апарат и неполярен екстрагент *n*-хексан.
- За извличане на тютюнево масло с високо съдържание на токофероли успешно може да се използват и ултразвукова екстракция или мацерация с полярен екстрагент етилацетат.

5. Определяне на биологично активни вещества и тяхната антиоксидантна активност в тютюневите семена, масло и шрот

5.1. Общо фенолно съдържание и антиоксидантна активност на семена

Тютюневите семена са използвани за приготвяне на екстракти с два екстрагента – 95% етанол и 60% метанол. Общото фенолно съдържание на екстрактите от тютюневи семена с 95% етанол за двете реколти не надвишава 1,12 mg GAE/g. При органично произведения тютюн *Кр 58 (био)* се наблюдава най-високо ОФС за двете години на вегетация, като през 2020 г. (1,12 mg GAE/g) стойностите са по-високи от тези през 2021 г. (0,80 mg GAE/g). Конвенционално отгледаните сортове *Кр 58 (конв.)* и *Кр 90 (конв.)* имат близки стойности - 0,75 mg GAE/g и 0,70 mg GAE/g (**Таблица 12**). Общото фенолно съдържание на екстрактите, получени с 60% метанол за двете години, е с по-високи стойности спрямо етанолните екстракти при всички видове семена.

Таблица 12. Общо фенолно съдържание в екстракти от тютюневи семена за две последователни години

Сорт	Екстрагент			
	95% етанол		60% метанол	
	mg GAE/g			
	2020	2021	2020	2021
<i>Кр 58 (био)</i>	1,12±0,02c	0,80±0,04b	2,02±0,02d	1,60±0,04c
<i>Кр 58 (конв.)</i>	0,75±0,04a	0,70±0,02a	1,07±0,02a	1,35±0,05b
<i>Кр 90 (конв.)</i>	0,70±0,04a	0,80±0,02b	1,07±0,05a	1,41±0,03b

Mean ± SD, ($p < 0,05$), $n = 3$

Изследвана е антиоксидантната активност (АОА) на тютюневите екстракти по три метода (DPPH, FRAP и ABTS – методи), които принадлежат към различен механизъм на действие. DPPH и ABTS методите принадлежат към тези за трансфер на водороден атом, а FRAP метода – към трансфер на електрони.

Антиоксидантната активност на етанолните екстракти от тютюневи семена, изследвана и по трите метода, е по-висока през 2020 г. спрямо 2021 г. Етанолните екстракти от тютюневи семена (реколта 2020 г.) имат най-висока АОА, изследвана по FRAP метод - 1,61 - 3,34 mM TE/g, следвана от ABTS метод - 0,30 - 1,57 mM TE/g и DPPH метод – от 0,82 mM TE/g до 1,04 mM TE/g. С най-висока активност по DPPH и ABTS метод са екстрактите от семена сорт *Кр 58 (био)* и през двете години. Екстрактите от семена сорт *Кр 90 (конв.)* и *Кр 58 (конв.)* имат близки стойности за DPPH и ABTS метод през 2021 г., докато през 2020 г. стойностите се различават.

Прави впечатление, че АОА, определена по FRAP метод на екстрактите от конвенционално произведени семена, реколта 2020 г. е два пъти по-малка от отчетената активност за биологично отгледаните семена. Не се наблюдава разлика в АОА на екстрактите, изследвани по FRAP метод през 2021 г. - от 2,20 mM TE/g (*Кр 58 (конв.)*) до 2,39 mM TE/g (*Кр 58 (био)*). Данните за антиоксидантната активност на екстракти, получени с 95% етанол, са представени в **Таблица 13**.

Таблица 13. Антиоксидантна активност на екстракти от тютюневи семена за две последователни години

Метод \ Сор	Екстрагент – 95% етанол					
	DPPH	ABTS	FRAP	DPPH	ABTS	FRAP
	mM TE/g					
	2020 г.			2021 г.		
<i>Кр 58 (био)</i>	1,04± 0,02d	1,57± 0,02d	3,34± 0,05e	0,68± 0,01b	0,65± 0,02c	2,39± 0,02d
<i>Кр 58 (конв.)</i>	0,96± 0,02d	0,30± 0,00a	1,61± 0,04a	0,56± 0,00a	0,58± 0,01c	2,20± 0,04c
<i>Кр 90 (конв.)</i>	0,82± 0,01c	0,63± 0,02c	1,84± 0,04b	0,60± 0,00ab	0,45± 0,00b	2,31± 0,04d

Mean ± SD, (p < 0,05), n = 3

Получените резултати за антиоксидантната активност на екстракти от изследваните тютюневи семена с 60% метанол са по-високи от резултатите, получени при екстрактите с етанол **Таблица 14**. Антиоксидантната активност, определена по DPPH метод през 2020 г., е най-висока за екстрактите от органично произведени тютюневи семена - 1,19 mM TE/g. През 2021 г. се отчита по-висока стойност при всички екстракти от тютюневи семена - 0,45 до 1,53 mM TE/g. За разлика от 2020 г., при която най-висока е активността при биологично произведените семена, през 2021 г. конвенционално произведеният сорт *Кр 90 (конв.)* се характеризира с най-голяма активност 1,53 mM TE/g. Екстрактите от *Кр 58 (био)* имат стабилни стойности на АОА по този метод за двете реколти с разлика под 0,05 mM TE/g. Антиоксидантната активност на тютюневи семена, реколта 2020 г., определена чрез ABTS метода, варира от 2,12 mM TE/g (*Кр 90 (конв.)*) до 2,80 mM TE/g (*Кр 58 (био)*), а от реколта 2021 г. – от 2,40 mM TE/g (*Кр 58 (био)*) до 3,89 mM TE/g (*Кр. 90 (конв.)*). От данните се вижда, че АОА на екстрактите от 2020 г. е по-ниска от тази през 2021 г. за всички екстракти от семена, аналогично на резултатите получени при DPPH метод.

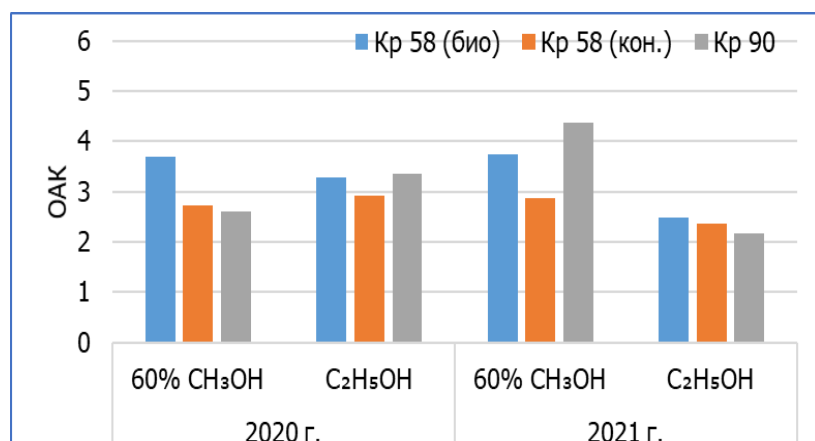
Таблица 14. Антиоксидантна активност на екстракти от тютюневи семена с 60% метанол, за две последователни реколти

Метод	Екстрагент – 60% метанол					
	DPPH	ABTS	FRAP	DPPH	ABTS	FRAP
	mM TE/g					
	2020 г.			2021 г.		
Сорт						
Кр 58 (био)	1,19± 0,02c	2,80± 0,00d	4,12± 0,04c	1,21± 0,01c	2,94± 0,02e	4,16± 0,04cd
Кр 58 (конв.)	0,32± 0,02a	2,27± 0,04b	2,86± 0,02a	0,45± 0,00b	2,40± 0,02c	3,14± 0,02b
Кр 90 (конв.)	0,34± 0,01ab	2,12± 0,04a	3,22± 0,02b	1,53± 0,01d	3,89± 0,04f	4,24± 0,04d

Mean ± SD, (p < 0,05), n = 3

Екстрактите с метанол от семена сорт *Кр 90 (конв.)* и *Кр 58 (био)* имат по-висока активност спрямо конвенционално произведените семена сорт *Кр 58*, изследвани чрез FRAP метода и през двата вегетационни периода. Антиоксидантната активност, определена по FRAP метод на екстрактите от сорт *Кр 58 (био)*, не се различава съществено през двете последователни години (4,12 mM TE/g за 2020 г. и 4,16 mM TE/g – 2021 г.), докато при останалите проби се наблюдава увеличение през 2021 г. Отчетената активност по този метод е най-висока в сравнение с другите приложени методи за AOA на екстрактите. Антиоксидантната активност на екстракти от тютюневи семена от органично произведения сорт *Кр 58 (био)* е най-висока по FRAP метод. Средни стойности на AOA на екстрактите е отчетена по ABTS метод, а най-ниска по DPPH метод.

За да се оцени общата антиоксидантна активност на екстрактите се прилага използването на математически изчислен относителен антиоксидантен капацитет (ОАК) на екстрактите въз основа на приложените методи за определяне на AOA - FRAP, ABTS и DPPH метод. На **Фигура 11** е представен относителният антиоксидантен капацитет на 60% метанолни и етанолни екстракти от тютюневи семена за 2020 г. и 2021 г.

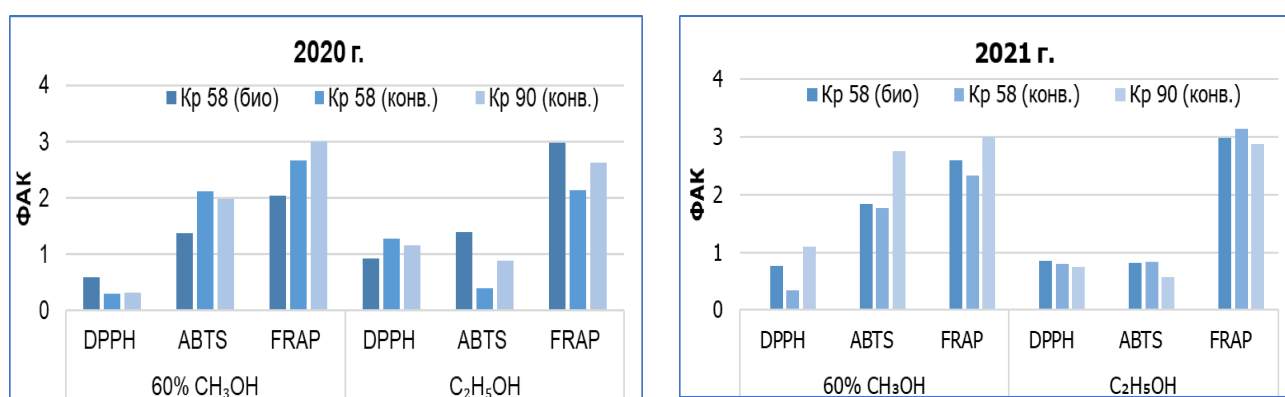


Фигура 11. Относителен антиоксидантен капацитет (ОАК) на екстракти от тютюневи семена, получени с екстрагент 60% метанол и 95% етанол за две последователни години

Относителният антиоксидантен капацитет за реколта 2020 г. е най-висок при екстрактите с 60% метанол от сорт *Кр 58 (био)* – 3,68, следвани от *Кр 58 (конв.)* – 2,73 и *Кр 90 (конв.)* – 2,61. Етанолните екстракти са с антиоксидантен капацитет между 2,92 (*Кр 58 (био)*) и 3,35 (*Кр 90 (конв.)*). От данните на фигурата се вижда, че

етанолните екстракти от семена сорт *Кр 58 (конв.)* и *Кр 90 (конв.)* имат по-висок АОА капацитет спрямо метанолните екстракти през тази година. Екстрактите от биологично произведените семена са с приблизително еднакъв относителен антиоксидантен капацитет и при двата екстрагента. През 2021 г. с най-голям антиоксидантен капацитет са метанолните екстракти от семена сорт *Кр 90 (конв.)* – 4,38, следвани от екстрактите на биологично отгледани семена сорт *Кр 58 (био)* – 3,74. Етанолните екстракти за всички изследвани семена през този период са с най-нисък антиоксидантен капацитет – под 2,49 *Кр 58 (био)*.

Фенолният антиоксидантен коефициент (ФАК) определя антиоксидантния капацитет на фенолните съединения. Представлява съотношението между общото фенолно съдържание и специфичния антиоксидантен капацитет, определен по метод за антиоксидантна активност. Данните за ФАК за тютюневите семена за двете реколти са представени на **Фигура 12**.



Фигура 12. Фенолен антиоксидантен коефициент (ФАК) на екстракти от тютюневи семена за 2020 и 2021 г.

От данни на фигурите става видно, че най-голяма зависимост между фенолните съединения и антиоксидантния капацитет на екстрактите се отчитат по FRAP метод, както за екстрактите с 60% метанол, така и за екстрактите с 95% етанол. През 2020 г. фенолният антиоксидантен коефициент при екстрактите с 60% метанол от сорт *Кр 58 (био)* е най-голям по DPPH метод – 0,59, по ABTS метод за конвенционално произведените семена от същия сорт – 2,12 и по FRAP метод за семената сорт *Кр 90 (конв.)* - 3,01. При екстрактите с 95% етанол през 2020 г. по DPPH метод най-голям фенолен антиоксидантен коефициент е отчетен при сорт *Кр 58 (конв.)* – 1,28, а по ABTS метод – 1,40 и FRAP метод – 2,98 за сорт *Кр 58 (био)*. През 2021 г. екстрактите с 60% метанол имат най-голям фенолен антиоксидантен коефициент при семена сорт *Кр 90 (конв.)* и по трите метода: DPPH - 1,09; ABTS - 2,76 и FRAP - 3,01. Етанолните екстракти през 2021 г. от трите вида семена отчитат най-добри резултати по FRAP метод - от 2,89 до 3,14.

5.2. Общо фенолно съдържание и антиоксидантна активност на шрот

След обезмасляване на тютюневите семена се получава шрот, който е използван за приготвяне на екстракти с три екстрагента – вода, 95% етанол и 60% метанол. Данните са представени в **Таблица 15**. Общото фенолно съдържание на екстракти от шрот на тютюневи семена варира според използвания екстрагент както следва: с вода - от 2,37 mg GAE/g до 3,98 mg GAE/g (*Кр 58 (конв.)*); с 95% етанол - 1,15 mg GAE/g до

2,37 mg GAE/g (*Кр 58 (био)*); с 60% метанол - 2,50 mg GAE/g (*Кр 90 (конв.)*) до 3,10 mg GAE/g (*Кр 58 (конв.)*).

Таблица 15. Общо фенолно съдържание на екстракти от шрот на тютюневи семена за две последователни години

Сорт	Екстрагент					
	вода	95% етанол	60% метанол	вода	95% етанол	60% метанол
	mg GAE /g					
	2020 г.			2021 г.		
<i>Кр 58 (био)</i>	3,11± 0,20bc	2,37± 0,19c	2,9± 0,10bc	3,66± 0,20de	1,15± 0,04a	2,6± 0,10a
<i>Кр 58 (конв.)</i>	3,98± 0,10e	1,94± 0,11bc	3,1± 0,00c	2,37± 0,20a	1,76± 0,15b	2,6± 0,10a
<i>Кр 90 (конв.)</i>	2,66± 0,10ab	1,70± 0,07b	2,5± 0,00a	3,45± 0,20cd	1,65± 0,45ab	2,8± 0,20ab

Mean ± SD, ($p < 0,05$), $n = 3$

Получените резултати показват, че най-високо съдържание на общи фенолни съединения се откриват при водните екстракти от сорт *Кр 58 (конв.)* през 2020 г. - 3,98 mg GAE/g, а през 2021 г. при сорт *Кр 58 (био)* - 3,66 mg GAE /g. Сорт *Кр 58 (био)* има най-високо ОФС при екстрактите получени с вода през 2020 г. - 3,11 mg GAE/g, и най-ниско през 2021 г. - 1,15 mg GAE/g, получен с 95% етанол. Чрез екстракция с 60% метанол се извличат най-добре фенолните съединения от шрот на семена сорт *Кр 58 (конв.)* през 2020 г. и сорт *Кр 90 (конв.)* през 2021 г. Ефективността на екстрагентите спрямо полученото ОФС са в следният ред - вода > 60% метанол > 95% етанол.

Антиоксидантна активност на екстрактите от шрот на тютюневи семена е анализирана чрез три метода за активност. DPPH радикалът е разтворим в различни органични разтворители, но не и във вода. Поради тази причина антиоксидантната активност (АОА) по DPPH метод е определена само за екстрактите от шрот на тютюневи семена с 95% етанол и 60% метанол. Резултатите са представени в **Таблица 16.**

Таблица 16. Антиоксидантна активност на екстракти от шрот на тютюневи семена от реколта 2020 и 2021 г., определена по DPPH метод

Сорт	Екстрагент			
	95% етанол	60% метанол	95% етанол	60% метанол
	mM TE/g			
	2020 г.		2021 г.	
<i>Кр 58 (био)</i>	1,97±0,04b	3,16±0,03bc	0,63±0,14a	3,18±0,04c
<i>Кр 58 (конв.)</i>	3,35±0,03c	3,06±0,01bc	1,93±0,11b	3,23±0,03c
<i>Кр 90 (конв.)</i>	2,25±0,10b	2,68±0,05a	0,67±0,14a	3,08±0,06b

Mean ± SD, ($p < 0,05$), $n = 3$

Анализираните екстракти имат антиоксидантна активност по DPPH метод от 0,63 mM TE/g до 3,35 mM TE/g. Получените стойности на екстракти с 60% метанол са по-високи от етанолните екстракти. Най-висока активност се отчита при сорт *Кр 58*

(конв.) с етанол - 3,35 mM TE/g през 2020 г. и с 60% метанол - 3,23 mM TE/g през 2021 г. Антиоксидантната активност на екстрактите с етанол през 2021 г. е по-ниска спрямо 2020 г., което съвпада с получените резултати за АОА на екстракти от семена (Таблица 14). Екстрактите с 60% метанол през 2021 г. са с по-висока активност от реколта 2020 г. АОА на екстрактите с 60% метанол от шрот на биологично отгледани семена е с най-малко разлики в стойностите от двете реколти - 3,16 mM TE/g през 2020 г. и 3,18 mM TE/g през 2021 г.

Антиоксидантната активност на водни, етанолни и 60% метанолни екстракти от шрот на тютюневи семена, определена чрез ABTS метод, е показана в Таблица 17.

Таблица 17. Антиоксидантна активност на екстракти от шрот на тютюневи семена от реколта 2020-2021 г., определена по ABTS метод

Сорт	Екстрагент					
	вода	95% етанол	60% метанол	вода	95% етанол	60% метанол
	mM TE/g					
	2020 г.			2021 г.		
Кр 58 (био)	10,90± 0,02c	10,95± 0,05e	14,70± 0,07e	11,90± 0,10d	2,76± 0,05a	10,10± 0,02a
Кр 58 (конв.)	9,20± 0,02a	11,79± 0,04f	14,20± 0,05de	12,90± 0,20f	4,94± 0,04c	11,10± 0,02c
Кр 90 (конв.)	10,60± 0,10b	9,63± 0,02d	10,90± 0,02b	12,30± 0,10e	3,42± 0,04b	14,70± 0,02e

Mean ± SD, (p<0,05), n = 3

Стойността на водните екстракти е между 9,20 mM TE/g и 12,90 mM TE/g, сорт *Кр 58 (конв.)*. Антиоксидантната активност на екстрактите от шрот, реколта 2021 г. е по-висока от тази на екстрактите от реколта 2020 г. Най-ниска е АОА на сорт *Кр 58 (конв.)* - 9,20 mM TE/g през 2020 г. и сорт *Кр 58 (био)* - 11,90 през 2021 г. Най-висока АОА е отчетена през 2021 г., при сорт *Кр 58 (конв.)* - 12,90 mM TE/g. Етанолните екстракти имат обратна зависимост спрямо водните екстракти от шрот, като през 2020 г. са с по-висока АОА от получените резултати през 2021 г. Антиоксидантната активност на екстрактите, получени с етанол, е между 2,76 mM TE/g и 11,79 mM TE/g. Висока стойност се отчита при сорт *Кр 58 (био)* и *(конв.)* през 2020 г.

Резултатите по ABTS метод, получени с 60% метанол, са най-високи спрямо получените данни с другите екстрагенти. Отчетената антиоксидантна активност е между 10,10 mM TE/g и 14,70 mM TE/g. Получените резултати за сорт *Кр 58 (био)* – 2020, *Кр 58 (конв.)* и сорт *Кр 90 (конв.)* – 2021 г. са близки. Най-ниска стойност е отчетена с 60% метанол при шрот от сорт *Кр 58 (био)* - 2021 г.

Възможността на екстрактите от шрот на тютюневи семена да редуцират Fe³⁺ е представена в Таблица 18. Водните екстракти при сорт *Кр 58 (био)* и *(конв.)* имат близки стойности – 7,45 mM TE/g и 7,59 mM TE/g, а сорт *Кр 90 (конв.)* има най-високата активност през 2021 г. - 9,67 mM TE/g.

Етанолните екстракти от реколта 2020 г. имат по-висока активност от тези през 2021 г. Най-високата АОА по този метод е отчетена именно за реколта 2020 г., сорт *Кр 58 (био)* - 23,1 mM TE/g. През 2021 г. резултатите по FRAP метод за сорт *Кр 58 (био)* - 4,20 mM TE/g и сорт *Кр 90 (конв.)* - 4,30 mM TE/g са сходни. При използване

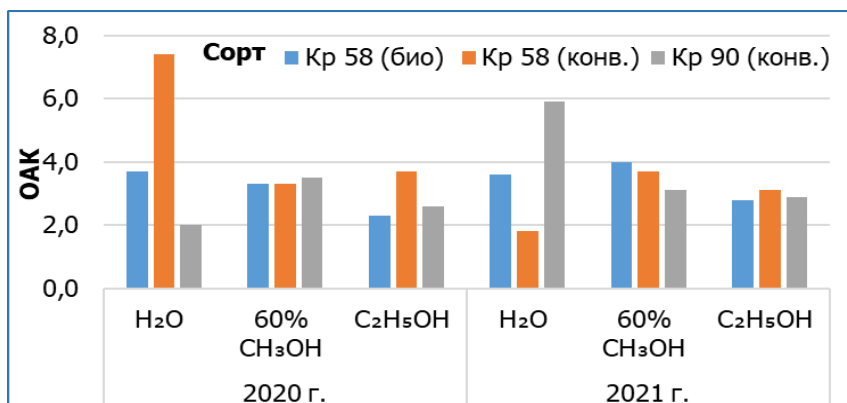
на екстрагент 60% метанол се наблюдава по-висок резултат през 2020 г. с най-голяма стойност при сорт *Кр 58 (био)* - 12,40 mM TE/g, а през 2021 г. при този сорт се отчита най-ниска стойност - 7,43 mM TE/g.

Таблица 18. Антиоксидантна активност на екстракти от шрот на тютюневи семена от реколти 2020 и 2021 г., определена по FRAP метод

Сорт	Екстрагент					
	вода	95% етанол	60% метанол	вода	95% етанол	60% метанол
	mM TE/g					
	2020			2021		
<i>Кр 58 (био)</i>	7,45± 0,33ab	23,10± 0,55e	12,40± 0,06f	7,96± 0,33ab	4,20± 0,06a	7,43± 0,03a
<i>Кр 58 (конв.)</i>	7,59± 0,58ab	10,80± 0,11c	11,34± 0,06e	5,75± 0,36ab	8,40± 0,08b	7,85± 0,06b
<i>Кр 90 (конв.)</i>	5,02± 0,06a	16,80± 0,06d	8,36± 0,06c	9,67± 0,58b	4,30± 0,14a	8,91± 0,06d

Mean ± SD, (p < 0,05), n = 3

Относителният антиоксидантен капацитет (ОАК) на изследваните екстракти показва най-висока активност за 2020 г. на водния екстракт на сорт *Кр 58 (конв.)* – 7,4, следван от етанолния екстракт на същия сорт – 3,7 (**Фигура 13**).

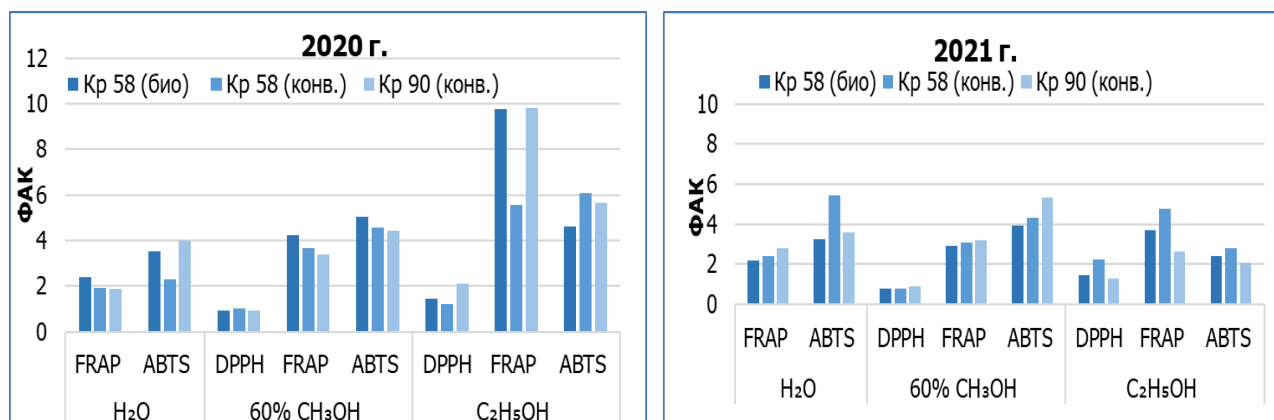


Фигура 13.
Относителен антиоксидантен капацитет (ОАК) на екстракти от шрот на тютюневи семена, получени с екстрагенти вода, 95% етанол и 60% метанол за две последователни години

През 2021 г. с най-голям относителен капацитет са водният екстракт на сорт *Кр 90 (конв.)* – 5,9 и метанолните екстракти при сорт *Кр 58 (био)* и *(конв.)*. От данните на фигурата се вижда, че ОАК на етанолните екстракти при сортовете и през двете години е в близък порядък (от 2,3 до 3,7). Водните екстракти имат ОАК от 1,8 до 7,4, а метанолните от 3,1 до 4,0, което показва, че при първите относителният антиоксидантен капацитет варира в широки граници, но в същото време е и най-висок. По-високите стойности на ОАК при водните екстракти се дължат на факта, че там коефициентът е изчислен при нулева стойност за DPPH метод.

На **Фигура 14** е представен фенолният антиоксидантен коефициент (ФАК) на екстрактите от шрот за двете години на проследяване. От водните екстракти с най-голям ФАК през 2020 г. е екстрактът от шрот *Кр 90 (конв.)* при ABTS метод (3,99), а през 2021 г. – *Кр 58 (конв.)* – 5,46. Фенолният антиоксидантен коефициент с 60% метанол е най-висок при ABTS метод и при трите сорта през двете години (3,94 - 5,03).

FRAP метод с 95% етанол през 2020 г. има по-висок фенолен антиоксидантен коефициент спрямо другите методи и в сравнение с данните през следващата реколта. Именно по FRAP метод е реализиран и най-високият коефициент - 9,75 при сорт *Кр 58 (био)* и 9,83 при сорт *Кр 90 (конв.)*.



Фигура 14. Фенолен антиоксидантен коефициент (ФАК) на екстракти от шрот на тютюневи семена за 2020 и 2021 г

5.3. Общо фенолно съдържание и антиоксидантна активност на масло

Общото фенолно съдържание на глицеридното масло, извлечено от тютюневите семена е представено в **Таблица 19**. Използвани са екстрагенти 80% етанол и 80% метанол. Общото фенолно съдържание в изследваните проби е между 0,29 mg GAE/g - сорт *Кр 90 (конв.)* и 1,70 mg GAE/g – сорт *Кр 58 (био)*. С най-високо ОФС се отличава маслото от органично произведените сорт *Кр 58 (био)*, а с най-ниско съдържание на фенолни съединения е маслото сорт *Кр 90 (конв.)*. Общото им количество в масло от конвенционално произведените семена е наполовина по-ниско от отчетеното в екстрактите от семена.

Таблица 19. Общо фенолно съдържание на масло от тютюневи семена

Сорт	Екстрагент	
	80% етанол	80% метанол
	mg GAE/g	
<i>Кр 58 (био)</i>	1,44±0,06b	1,70±0,17b
<i>Кр 58 (конв.)</i>	0,32±0,01a	0,34±0,01a
<i>Кр 90 (конв.)</i>	0,30±0,01a	0,29±0,01a

Mean ± SD, (p<0,05), n = 3

Антиоксидантната активност (АОА) на тютюневото масло (**Таблица 20**) показва липса на статистически значими различия между активността на екстрактите по DPPH метод както с 80% етанол, така и с 80% метанол. Антиоксидантната активност за масло от сорт *Кр 58 (био)* (0,92 - 1,10 mM TE/g), определена по ABTS метода, е наполовина от стойността при конвенционалните сортове, независимо от използвания екстрагент. Близки са данните за АОА на маслото по FRAP метод. Най-ниска активност е отчетена при сорт *Кр 58 (био)*, която не надвишава 1 mM TE/g. При маслата от сорт *Кр 58 (конв.)* и *Кр 90 (конв.)* данните с 80% етанол са с по-високи стойности спрямо

тези с 80% метанол. Най-висока активност по FRAP метод проявява маслото от сорт *Кр 58 (конв.)* - 2,71 mM TE/g. Антиоксидантната активност на тютюнево масло е по-ниска от отчетената в семената. Това се дължи на факта, че маслото представлява неполярната фракция в тютюневите семена, извлечена чрез екстрагент *n*-хексан.

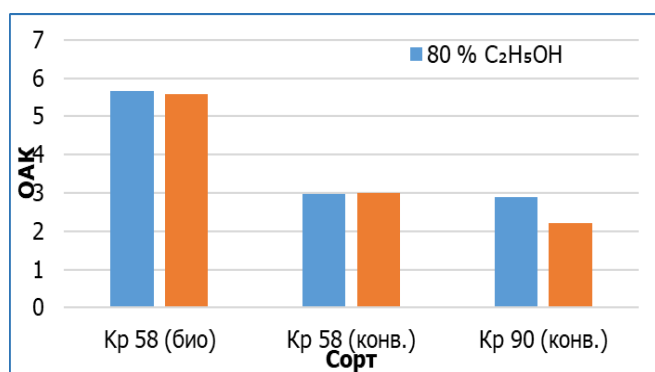
Таблица 20. Антиоксидантна активност на масло от тютюневи семена

Сорт	Екстрагент					
	80% етанол			80% метанол		
	DPPH	ABTS	FRAP	DPPH	ABTS	FRAP
	mM TE/g					
<i>Кр 58 (био)</i>	0,52± 0,03b	1,10± 0,05a	0,85± 0,06a	0,45± 0,06b	0,92± 0,12a	0,93± 0,09a
<i>Кр 58 (конв.)</i>	0,44± 0,01a	2,70± 0,00b	2,71± 0,81b	0,44± 0,02b	2,70± 0,00b	2,40± 0,37b
<i>Кр 90 (конв.)</i>	0,47± 0,00ab	2,70± 0,00b	1,66± 0,50a	0,26± 0,01a	2,70± 0,00b	1,12± 0,12a

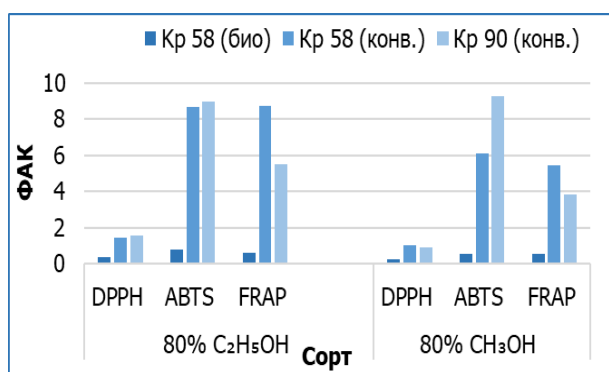
Mean ± SD, ($p < 0,05$), $n = 3$

Общият антиоксидантен капацитет (**Фигура 15**) на маслото показва най-висока стойност при това от сорт *Кр 58 (био)* 5,59 - 5,66, както на екстрактите с метанол, така и с етанол. Не се наблюдава разлика между антиоксидантния капацитет на екстрактите с етанол/метанол при маслото от сорт *Кр 58 (конв.)* – 2,98/3,01 и *Кр 58 (био)* – 5,66/5,59. При сорт *Кр 90 (конв.)* метанолните екстракти имат по-нисък антиоксидантен капацитет – 2,20 от екстрактите, получени с етанол – 2,89.

На **Фигура 16** е показан фенолният антиоксидантен коефициент (ФАК) на масло от тютюневи семена. ФАК показва по-добри резултати при екстракция с 80% етанол (от 0,4 – DPPH метод до 9,0 – ABTS метод), отколкото с 80% метанол (от 0,3 – DPPH метод до 9,3 – ABTS метод).



Фигура 15. Относителен антиоксидантен капацитет (ОАК) на екстракти от тютюнево масло



Фигура 16. Фенолен антиоксидантен коефициент (ФАК) на екстракти от тютюнево масло

Фенолният антиоксидантен коефициент е по-висок при маслото от конвенционално произведени семена. Най-високи стойности се отчитат по ABTS метод при сорт *Кр 90 (конв.)* както с метанол, така и с етанол. От данните на фигурата е видно, че фенолният антиоксидантен коефициент с етанол и метанол има еднаква зависимост спрямо резултатите при маслото от различните сортове, а именно – коефициентът е най-нисък при *Кр 58 (био)* по всички методи, като с най-висок коефициент при ABTS метод е *Кр 90 (конв.)*, а при FRAP - *Кр 58 (конв.)*.

Заклучение:

- Органично произведените семена от сорт *Кр 58 (био)* имат по-високо общо фенолно съдържание и съответно по-висока антиоксидантна активност спрямо конвенционално отгледаните семена и през двете вегетации.
- Екстрактите показват по-висока антиоксидантна активност спрямо FRAP метода за трансфер на електрони (способност да редуцират Fe^{3+} до Fe^{2+}), в сравнение с методите за трансфер на водороден атом (ABTS метод и DPPH метод).
- Общото фенолно съдържание и антиоксидантната активност на екстракти от шрот са по-високи от тези на семената.
- Получените резултати за АОА на екстрактите от шрот с 60% метанол са по-високи спрямо активността с другите екстрагенти – вода и 95% етанол.
- Най-високо общо фенолно съдържание се отчита в маслото от органично отгледани семена сорт *Кр 58 (био)* – средно 1,57 mg GAE /g.
- Маслото от биологично отгледани семена има най-висок антиоксидантен капацитет – 5,66/5,59, но най-ниска зависимост по отношение на фенолния антиоксидантен коефициент.
- От използваните екстрагенти, по-добри резултати се отчитат при семена и шрот с 60% метанол, а при масло с 80% етанол и 80% метанол.

6. Определяне на химичния и липидния състав на отпадъчни тютюневи семена и полученото от тях масло с цел тяхното приложение.

Тютюневите семена могат да бъдат сметнати за отпадък в случаите, когато не са необходими за култивиране или са компрометирани. Свръхпроизводството на семена също води до генериране на остатъчни количества без употреба. Тютюневи семена се разделят на малки (под 0,5 mm) и големи (над 0,5 mm). Тези, с размер под 0,5 mm, се смятат за негодни за посев и се отделят като отпадък. С цел да се определи качеството и възможността за потенциалната им употреба са извършени анализи за определяне на химичен и липиден състав на семена от сборна фракция на сорт *Крумовград 58* и *90* с размер под 0,5 mm, разглеждани като отпадъчни семена от сортова група *Басми*.

6.1. Химичен състав

Извлеченото от отпадъчните тютюневи семена масло ги определя като добър източник на мазнини. Масленото съдържание на семената е 32,1%. Освен с добро маслено съдържание, отпадъчните семена се характеризират и с високо съдържание на протеини - 29,4 Общото съдържание на въглехидрати (27,6%) в тютюневите семена е типично за семената за това растение (до 30%). Прави впечатление и високото процентно съдържание на фибри (26,6%), което дава основание отпадъчните семена да бъдат добър източник на неразтворими въглехидрати. Резултатите за пепелно съдържание, като показател за минерални елементи, е високо и съвпада с получени данни за пепелно съдържание на семена с размер над 0,5 mm. На база на получените данни за съдържание на въглехидрати, протеини и мазнини в отпадъчните семена е изчислена тяхната енергийна стойност – 517 kcal/100 g (**Таблица 21**).

6.2. Липиден състав

Глицеридното масло от отпадъчни тютюневи семена е анализирано за индивидуален мастнокиселинен състав (**Таблица 22**). Идентифицирани са десет мастни киселини, като три от тях преобладават в състава. Линоловата киселина е в най-голямо количество (71,94%), следвана от олеиновата (13,70%) и палмитиновата

(12,86%). Маслото е богато на полиненаситени мастни киселини (71,94%) и е с почти еднакво съдържание на наситени (14,30%) и мононенаситени (13,76%) мастни киселини.

Таблица 21. Общ химичен състав на отпадъчни тютюневи семена

Химичен състав	Отпадъчни семена
Масленост, %	32,1±1,0
Протеини, %	29,4±1,4
Въглехидрати, %	27,6±0,5
Фибри, %	26,6±0,6
Пепел, %	4,3±0,3
Влага, %	6,6±0,03
Енергийна стойност, kcal/100 g	517±3

Mean ± SD, (p<0,05), n = 3

Таблица 22. Мастнокиселинен състав на масло от отпадъчни тютюневи семена

Мастни киселини, %	Масло от отпадъчни семена
C _{8:0} Каприлова	0,05±0,01
C _{11:0} Ундеканова	0,04±0,01
C _{12:0} Лауринова	0,06±0,01
C _{15:0} Пентадеканова	0,02±0,01
C _{16:0} Палмитинова	12,86±0,05
C _{17:0} Маргаринова	0,14±0,01
C _{17:1} Хептадеценева	0,06±0,01
C _{18:0} Стеаринова	1,13±0,01
C _{18:1} Олеинова	13,70±0,10
C _{18:2} Линолова	71,94±1,05
НМК	14,30±0,02
МНМК	13,76±0,11
ПНМК	71,94±1,05

Mean ± SD, (p<0,05), n = 3

Липидните индекси на глицеридно масло от отпадъчни тютюневи семена са представени в **Таблица 23**. Атерогенният и тромбогенният индекс на масло от отпадъчни семена не надвишава 1,0. Стойностите са ниски, което показва добри атерогенни и тромбогенни свойства. Хипохолестеролемичен/Хиперхолестеролемичен индекс на масло от отпадъчни тютюневи семена е 7,0. Препоръчително е този индекс да има стойности над 1,0, което прави маслото подходящо за превенция от заболявания на сърдечно-съдовата система. Индексът на пероксидация при масло от отпадъчни тютюневи семена е сравнително висок (72,0), което показва склонност към окисление на маслото. Предвиждането на срока на годност на дадено масло може да бъде оценен чрез индекса за оксидантна стабилност. Стойностите за APE (171,0) и BARE (72,0) са в корелация с високия процент на ненаситени мастни киселини в състава на маслото. Индексът за оксидантна стабилност е 1,0. Това показва склонност на маслото към окисление и определя по-кратък срок на годност.

Таблица 23. Липидни индекси на глицеридно масло от отпадъчни тютюневи семена

Липидни индекси	Тютюнево масло
Атерогенен индекс	0,2±0,0
Тромбогенен индекс	0,3±0,0
Хипохолестеролемичен/Хиперхолестеролемичен индекс	7,0±0,1
Индекс на пероксидация	72,0±1,0
Еквивалент на алилна позиция (APE)	171,0±1,9
Еквивалент на бис-алилна позиция (BAPE)	72,0±1,0
Индекс на оксидантна стабилност	1,0±0,1

Mean ± SD, (p<0,05), n = 3

Биологично активни компоненти в липидната фракция от отпадъчни тютюневи семена, както при всички растителни семена, се състои от фосфолипиди, неосапуняеми вещества, стероли и токофероли. Данните за общото им съдържание в отпадъчните тютюневи семена и глицеридно масло са представени в **Таблица 24**. Отпадъчните тютюневи семена са анализирани по отношение на общо съдържание на фосфолипиди – 0,2% в семена и 1,5% в масло. Неосапуняемите вещества в отпадъчните семена са 0,7%, а в маслото от тях 3,4%. Общото съдържание на стероли в семената (0,2%) и маслото (0,7%) е ниско. Общото съдържание на токофероли в изследваните отпадъчни семена е 4,0 mg/kg, а в глицеридното масло - 144 mg/kg. Идентифицирани са γ -токоферол и δ -токоферол, като γ -токоферолът е в по-голямо количество (81,5 mg/kg).

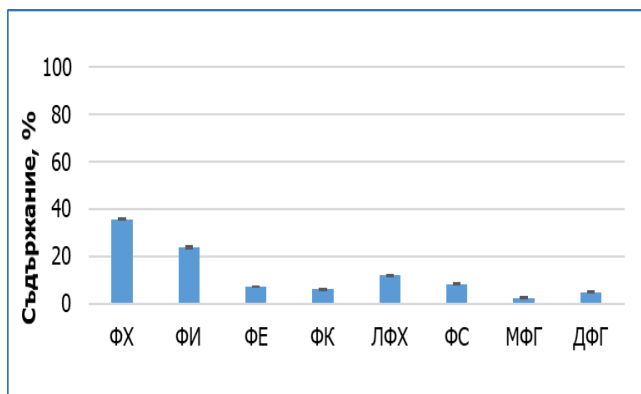
Таблица 24. Липиден състав на отпадъчни тютюневи семена

Биологично активни компоненти	Съдържание в отпадъчни семена	Съдържание в масло от отпадъчни семена
Фосфолипиди, %	0,2±0,06	1,5±0,2
Неосапуняеми вещества, %	0,7±0,1	3,4±0,9
Стероли, %	0,2±0,1	0,7±0,4
Токофероли, mg/kg	4,0±1,0	144,0±6,0
γ -токоферол, mg/kg	2,3±0,2	81,5±2,1
δ -токоферол, mg/kg	1,7±0,7	62,5±2,4

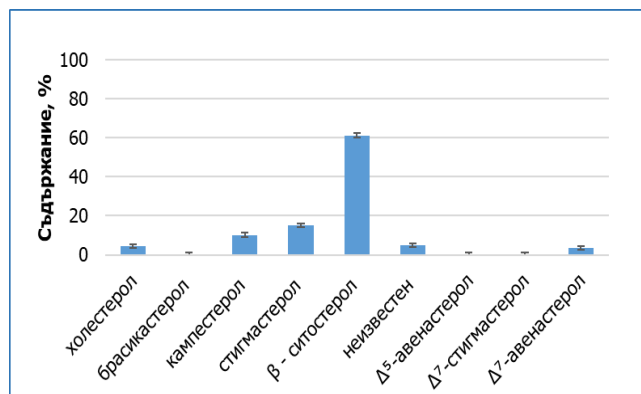
Mean ± SD, (p<0,05), n = 3

Индивидуалният фосфолипиден състав на маслото от отпадъчни тютюневи семена е представено на **Фигура 17**. Най-високо е съдържанието на фосфатидилхолин 35,7%. Фосфатидилинозитол (23,8%) и лизофосфатидилинозитол (11,9%) се откриват също в по-голямо количество спрямо другите идентифицирани фосфолипиди.

Основни растителни стероли са β -ситостерол и кампестерол, като същите се идентифицират и в най-голямо количество в маслото от отпадъчните тютюневи семена. В глицеридното масло са установени девет вида стероли, като индивидуалният им състав е характерен за тютюневи семена – **Фигура 18**. Най-високо е съдържанието на β -ситостерол (61,2%), следвано от стигмастерол (15,2%) и кампестерол (10,2%). Съдържанието на холестерол в маслото от отпадъчни тютюневи семена е 4,5%.



Фигура 17. Индивидуален фосфолипиден състав на масло от отпадъчни тютюневи семена



Фигура 18. Индивидуален стеролов състав на масло от отпадъчни тютюневи семена

ФХ – фосфатидилхолин; ФИ – фосфатидилинозитол; ФЕА – фосфатидилетаноламин; ФК – фосфатидни киселини; ЛФХ – лизофосфатидилхолин; ФС – фосфатидилсерин; МФГ – монофосфатидилглицерол; ДФГ – дифосфатидилглицерол

6.3. Антиоксидантна активност на екстракти от отпадъчни семена

Екстрактите от отпадъчни семена са анализирани за общо фенолно съдържание и антиоксидантна активност. Използвани са екстрагенти вода, 60% метанол и 95% етанол. Резултатите показват, че общото фенолно съдържание (ОФС) в семената е от 0,89 mg GAE/g до 2,34 mg GAE/g, спрямо използвания екстрагент Най-високо е ОФС извлечено с 60% метанол - 2,34 mg GAE/g, а най-ниско с етанол 0,89 mg GAE/g.

Антиоксидантната активност на екстрактите от отпадъчни семена с 60% метанол по ABTS и FRAP методи е по-висока спрямо получените резултати за другите два екстрагента – вода и етанол. Относителният антиоксидантен капацитет (ОАК) на водните екстракти е 1,41, а за екстрактите с 60% метанол и 95% етанол е с еднаква стойност - 3,32. Резултатите са представени в **Таблица 25**.

Таблица 25. Общо фенолно съдържание (ОФС) и антиоксидантна активност (АОА) на екстракти от отпадъчни семена

Екстрагент	АОА при методи				ОАК
	ОФС, mg GAE /g	DPPH, mM TE/g	ABTS, mM TE/g	FRAP, mM TE/g	
вода	1,46±0,43	-*	3,82±2,85	3,14±0,25	1,41
60% метанол	2,34±0,28	8,71 ±0,53	5,97±0,42	7,53±1,65	3,32
95% етанол	0,89±0,08	8,96±1,29	0,20±0,32	2,41±0,22	3,32

Mean ± SD, n = 3 *- не е проведено изпитване

Заклучение:

- Отпадъчните тютюневи семена могат да се използват, като добър природен източник на мазнини, протеини и фибри.
- Отпадъчните семена не се отличават по химичен и липиден състав от годните за култивиране семена с размер над 0,5 mm.
- Глицеридното масло от отпадъчни тютюневи семена може да се използва за терапевтични и козметични цели.

7. Изследване на възможности за приложение на масло от органично произведени тютюневи семена за козметични цели

За да се оцени тютюневото масло, като базично масло за козметични цели са използвани два подхода:

- анализ на глицеридно тютюнево масло и съпоставяне с добре познато козметично масло със сходен състав – гроздово масло;
- разработване на емулсионен крем с тютюнево и гроздово масло, анализ и сравнение.

Тютюнево масло от семена сорт *Кр 58 (био)* и студено пресовано гроздово масло са изследвани за основни физични компоненти, като резултатите са представени в **Таблица 26**.

Таблица 26. Физични параметри на тютюнево и гроздово масло

Физични параметри	Масло	
	Тютюнево	Гроздово
Пероксидно число, meqO ₂ /kg	2,15±0,37	3,45±0,07
Оксидантна стабилност (100°C), h	12,20±0,10	9,20±0,10
Киселинно число, mg KOH/g	3,26±0,04	0,18±0,01
Индекс на рефракция	1,476±0,000	1,473±0,000
Йодно число, g I ₂ /100 g	136,85±0,20	134,58±0,24

Mean ± SD, (p<0,05), n = 3

Получените данни за двете масла са сходни. Тютюневото масло има по-ниско пероксидно число (2,15 meqO₂/kg), отколкото гроздовото масло (3,45 meqO₂/kg). Полученият резултат е в граници между 1 - 3 meqO₂/kg, смятано за препоръчително за масла, използвани в козметични продукти. Бавното окисление на тютюневото масло се доказва и от по-високата му оксидантната стабилност. В присъствие на кислород маслото остава стабилно в продължение на 12,2 h при 100°C, докато гроздовото масло показва по-ниска стабилност - 9,20 h при 100°C. От друга страна, маслото от тютюневи семена има по-високо киселинно число (3,26 mg KOH/g) спрямо гроздовото масло (0,18 mg KOH/g). Тютюневото и гроздовото масло имат сходен индекс на рефракция над 1,470. Йодното число на маслата (136,85 и 134,58 gI₂/100 g) отговаря на техния мастнокиселинен състав, посочен в **Таблица 27**. Тютюневото и гроздовото масло са проучени по отношение на мастнокиселинен състав, като резултатът показва, че и двете масла могат да бъдат смятани за ненаситени с високо съдържание на линолова киселина (тютюнево масло - 65,90% и гроздово масло - 60,16%). Тютюневото масло е с по-високо съдържание на палмитинова киселина (C_{16:0} – 12%) и по-ниско на олеинова киселина (C_{18:1} - 17,70%) спрямо гроздовото масло, където (C_{16:0} - 7,98% и C_{18:1} - 27,11%).

Идеалните липиди имат съотношение между НМК, МНМК и ПНМК съответно 1:1:1. При тютюневото масло това съотношение е 1:1:4, а при гроздовото масло - 1:2:4. Тютюневото масло е със съотношение по-близко до идеалния липид в сравнение с това на гроздовото масло, като прави впечатление високият резултат за ПНМК и при двете масла, дължащ се на високия процент линолова киселина.

Таблица 27. Мастнокиселинен състав на тютюнево и гроздово масло

Мастни киселини, %		Масло	
		Тютюнево	Гроздово
C 14:0	Миристинов	0,10±0,00	0,04±0,01
C 16:0	Пламитинова	12,00±0,50	7,98±0,21
C 16:1	Палмитоолеинова	0,20±0,05	0,12±0,01
C 17:0	Маргаринава	0,20±0,03	0,07±0,02
C 17:1	Хептадеканова	0,40±0,05	0,05±0,01
C 18:0	Стеаринова	2,10±0,01	3,14±0,55
C 18:1	Олеинова	17,70±0,20	27,11±0,30
C 18:2	Линолова	65,90±0,80	60,16±0,20
C 18:3 n-6	Линоленова	0,60±0,20	0,04±0,02
C 18:3 n-3	Линоленова	N/D	0,43±0,03
C 20:0	Арахинова	0,20±0,05	0,25±0,05
C 20:1	Гадолиева	0,10±0,04	0,24±0,05
C 22:0	Бехенова	0,40±0,05	0,30±0,05
C 22:1	Ерукова	0,10±0,00	0,03±0,00

Mean ±SD, n=3; N/D – не е идентифициран

Анализът за съдържание на токофероли показва, че и двете масла са богати на тези съединения. Съдържанието на токофероли е представено от α -, γ - и δ -токофероли и два токотриенола – α - и γ -. Общото съдържание на токофероли в тютюневото масло е 175,0 mg/kg, като това количество е наполовина от установеното количество в гроздовото масло (498,0 mg/kg). δ -Токоферол доминира в тютюневото масло (68,4%), докато в гроздовото масло този изомер не е установен. Гроздовото масло е богато на α -токоферол (52,4%). α - и γ -Токотриенол са идентифицирани само в гроздовото масло. Съдържанието на γ -токоферол в двете масла е с почти еднакви стойности. Резултатите са представени в **Таблица 28**.

Таблица 28. Токоферолов състав на тютюнево и гроздово масло

Токофероли	Масло	
	Тютюнево	Гроздово
α -Токоферол, %	7,1±0,1	52,4±1,7
α -Токотриенол, %	N/D*	9,2±0,4
γ -Токоферол, %	24,5±1,1	25,2±0,6
γ -Токотриенол, %	N/D	13,2±0,8
δ -Токоферол, %	68,4±0,6	N/D
Общо, mg/kg	175,0±2,1	498,0±4,2

Mean ± SD, n = 3, N/D – не е идентифициран

Анализите за възможното приложение на тютюнево масло в козметиката, продължават с влагането му в емулсионен крем, като същият подход е приложен и за гроздовото масло. За целта на експеримента е избрана емулсия тип масло – вода (O/W), тъй като при нея се позволява съдържание на емолиента до 80%, има

охлаждащ и матиращ ефект върху кожата. Този тип базова емулсия спомага за внасянето на хидрофилни молекули. Недостатък е, че тези емулсии са термонестабилни и са добра среда за развитие на микроорганизми, а също така се пенят при емулгиране. За да се намалят тези ефекти, са добавени като антипенител – диметикон, етерично масло с антимикубно действие и доказана функция на природен консервант – етерично масло от лимонена трева. Избрана е най-ниската възможна концентрация на етерично масло (0,5%), тъй като то може да предизвика чувствителност при по-високи концентрации. Лимонената трева се използва с доказано приложение като репелент за насекоми, за облекчаване на мускулни болки, противогъбични и антимикубни свойства, което го прави подходящ избор при съставяне на емулсионен крем тип хидратант (например като мляко за тяло).

Емулсионната база на основа на тютюнево масло е създадена чрез подбор на съставки с идея за органичен, натурален продукт. Използвано е масло от тютюн, отгледан в условия на органично производство, върху сертифицирано биополе, като главен емолиент във формулата. Останалите съставки са вода и глицерол (овлажнители), глицерил стеарат SA (емулгатор), цетеарилов алкохол (регулатор на вискозитета), пчелен восък (ко-емулгатор) и диметикон (емолиент). Единствено диметиконът е синтетичен продукт, макар че според различните законодателства, употребата на определени съставки в регламентирани граници е допустима.

Приготвени са емулсионни бази с представените съставки, както на основата на тютюнево масло, така и на основата на гроздово масло. Получените емулсионните бази E1 (с тютюнево масло) и E2 (с гроздово масло) са бели на цвят, имат хомогенен външен вид, без бучки, не се разслояват при съхранение и се отмиват лесно с вода. Емулсионните бази са без мирис, а тези с добавено 0,5% етерично масло от лимонена трева имат слаб, свеж цитросов мирис (**Фигура 19**).



Фигура 19. Емулсионни кремове:

E1 - емулсионна база с тютюнево масло, E1 - LO – емулсионна база с тютюнево масло + 0,5 % етерично масло от лимонена трева, E2 – емулсионна база с гроздово масло, E2 - LO – емулсионна база с гроздово масло + 0,5 % етерично масло от лимонена трева

Определени са някои физични и химични показатели на приготвените емулсии, като резултатите са представени в **Таблица 29**. Съдържанието на влага във всички проби е над 80%. Индексът на рефракция за всички емулсии е над 1,600, което в сравнение с индекса на вложените масла, е високо. Емулсиите с етерично масло имат по-висок индекс спрямо базовите, най-нисък коефициент на рефракция се отчита при E2, а най-висок при E2-LO. При E1 и E1-LO стойностите за този показател са близки.

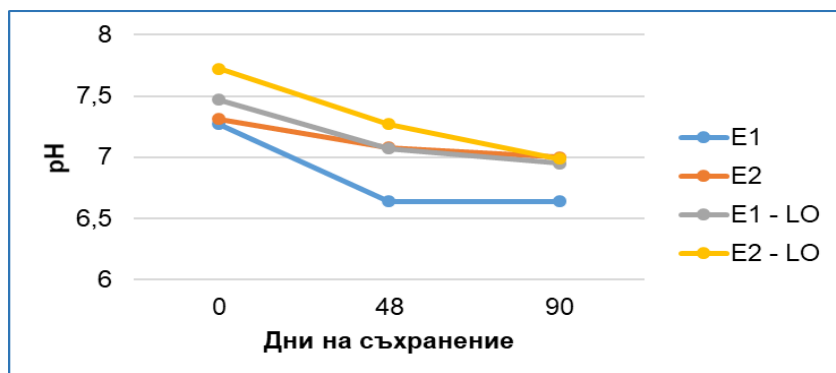
Емулсионните кремове са изследвани и за оксидантна стабилност. Базата E1 има малко по-ниска оксидантна стабилност спрямо E2, като стойностите са в един порядък. Добавеното 0,5% етерично масло от лимонена трева повишава оксидантната стабилност при E1-LO.

Таблица 29. Физични показатели на емулсионни кремове с тютюнево и гроздово масло

Показатели	База		База с 0,5% масло от лимонена трева	
	E1	E2	E1 - LO	E2 - LO
Влага, %	82,2±0,8	85,1±0,7	81,1±0,5	84,0±0,7
Индекс на рефракция	1,644±0,000	1,624±0,000	1,651±0,000	1,675±0,000
Оксидантна стабилност (110°C), h	2,60±0,01	2,77±0,01	3,85±0,02	2,68±0,02

Mean ± SD, (p<0,05), n = 3

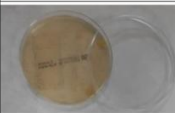

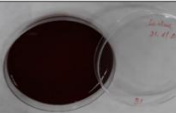


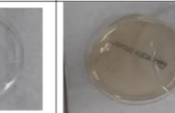


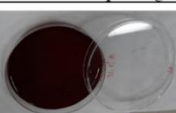


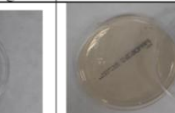
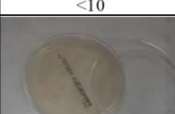
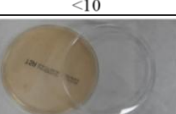
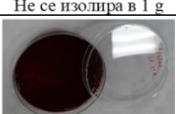



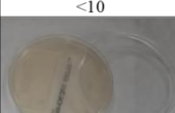





Емулсията с тютюнево масло (E1) има по-ниско рН отколкото емулсия E2 на основата на гроздово масло (**Фигура 20**). рН на емулсиите, измерено веднага след приготвяне и охлаждане, показва техния алкален характер – рН > 7. След 48 дни рН намалява, като E1 е с рН 6,64 и тази стойност се запазва до 90 дни след приготвяне и съхранение. Емулсионен крем E1-LO и E2 имат неутрален характер след 48 дни на съхранение. Емулсия E2-LO запазва алкалния си характер до 48 ден и след това придобива неутрално рН както другите емулсии. Неутралното рН на емулсията се дължи на високото съдържание на вода и липсата на добавен рН регулатор.



Фигура 20. рН на емулсионни кремове по време на съхранение

Емулсионните кремове с високо водно съдържание предполагат по-лесна контаминация с плесени гъби и дрожди, както и по-ниска антимикробна активност. Затова е проведен анализ за общ брой микроорганизми, плесени и дрожди, и антимикробна активност по отношение на Gram-положителни (*Staphylococcus aureus*) и Gram-отрицателни бактерии (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). Получените резултати са представени в **Таблица 30**. Данните показват, че изолираните общ брой мезофилни микроорганизми при три от емулсиите са под 10 cfu/g. Единствено емулсия E2 има общо микробно число (ОМЧ) $1,1 \cdot 10^4 \pm 6,4 \cdot 10^3$ cfu/g. Плесените и дрождите за всички емулсии са под 10 cfu/g. Gram-положителни и Gram-отрицателни бактерии не са изолирани. Въпреки високото си водно съдържание, емулсиите имат добри антимикробни свойства, като E1 има по-добро ОМЧ спрямо E2. Етеричното масло от лимонена трева оказва положително влияние в E2-LO подтискайки развитието на колонии от микроорганизми.

Таблица 30. Микробиологичен анализ на емулсионни кремове с тютюнево и гроздово масло

Емулсия	ОБМ, cfu/g	Плесени и дрожди, cfu/g	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
E2	1,1.10 ⁴	<10	Не се изолира в 1 g	Не се изолира в 1 g	Не се изолира в 1 g	Не се изолира в 1 g
						
E2-LO	<10	<10	Не се изолира в 1 g	Не се изолира в 1 g	Не се изолира в 1 g	Не се изолира в 1 g
						
E1	<10	<10	Не се изолира в 1 g	Не се изолира в 1 g	Не се изолира в 1 g	Не се изолира в 1 g
						
E1-LO	<10	<10	Не се изолира в 1 g	Не се изолира в 1 g	Не се изолира в 1 g	Не се изолира в 1 g
						

ОБМ – Общ брой анаеробни мезофилни микроорганизми

Заклучение:

- Тютюневото масло може успешно да бъде прилагано, като базово козметично масло и влагано в козметични формули, с добри физични и химични характеристики.
- Емулсионният крем на основата на тютюнево масло може да бъде определен като овлажнител.
- Разработеният козметичен препарат на основа на тютюнево масло може да бъде определен, като близък до натурална и същевременно достъпен на база вложените в него съставки.

VI. ИЗВОДИ

Извършените изследвания и получените резултати позволяват да се обобщят следните изводи:

- Направена е подробна характеристика на химичния и липидния състав на два сорта български тютюневи семена – сорт *Крумовград 58* и *Крумовград 90* отгледани в условия на органично и конвенционално производство. Установено е, че органично произведените тютюневи семена са богат източник на макронутриенти с висока енергийна стойност. Тютюневите семена са природен източник на линолова киселина – 65%, независимо от начина на култивиране на тютюневото растение.

- Установено е, че органично произведените тютюневи семена и полученото от тях глицеридно масло се отличават с по-високо съдържание на биологично активни вещества – фосфолипиди, токофероли и полифенолни съединения. Добитото от тях глицеридно масло е и с добра оксидантна стабилност и с добри атерогенни и тромбогенни свойства.

- Проследяването на химичния състав на два сорта тютюневи семена от сорта група *Басми*, в два последователни вегетационни периода, ги определя като устойчива култура без значение от начина на производство. Тютюневите семена от сорт

Крумовград 58 и *Крумовград 90* могат да бъдат успешно използвани като източник на фибри и суровина за добив на глицеридно масло.

- Методът на извличане и използваният екстрагент оказват влияние върху добива на глицеридно масло и токофероловия му състав. Мастнокиселинният състав на маслото се запазва с ненаситен характер, независимо от приложението метод за извличане/екстракция.

- Екстрактите от семена, шрот и масло могат да бъдат източник на полифенолни съединения. Най-подходящият екстрагент за извличане на полифенолни съединения от тютюневи семена и тютюнев шрот е 60% метанол, а за извличането им от тютюнево масло – 80% етанол и 80% метанол. Екстрактите от семена показват по-висока антиоксидантна активност по FRAP метода за трансфер на електрони (способност да редуцират Fe^{3+} до Fe^{2+}) в сравнение с методите за трансфер на водороден атом (ABTS метод и DPPH метод). Установена е по-висока антиоксидантната активност на екстрактите от шрот в сравнение с тези от семената и глицеридното масло. Най-висок относителен антиоксидантен капацитет имат екстрактите от изследваното тютюнево масло. Екстрактите от органично произведени тютюневи семена, шрот и масло имат по-добро общо фенолно съдържание и по-висок относителен антиоксидантен капацитет от конвенционално произведените.

- Установено е, че отпадъчни, негодни за посев тютюневи семена са ценен източник на глицеридно масло и енергия. Те имат идентичен химичен и липиден състав с годните за употреба тютюневи семена и могат да бъдат също успешно използвана суровина.

- Установено е че, тютюневото масло е подходяща съставка за изготвянето на хидратиращи козметични продукти. Разработена е рецепта за получаването на емулсионен крем на основата на тютюневото масло.

VII. ПРИНОСИ НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ

- За първи път е изследван химичният състав на семена от български сорт тютюн, отгледан в условия на органично производство.

- За първи път е направено проучване за общо съдържание на фенолни съединения и антиоксидантна активност на екстракти от семена, шрот и масло от органично и конвенционално произведени български сортове тютюн.

- За първи път подробно е проучен химичния и липидния състав на отпадъчни негодни за посев тютюневи семена. Доказана е възможността пълноценно да се оползотворят отпадъчните тютюневи семена за добив на глицеридно масло, фибри и природни антиоксиданти.

ПРИЛОЖНИ

- Използвани са различни техники за екстракция на глицеридно масло от тютюневи семена. Установено, че екстракция на масло чрез мацерация и ултразвук с екстрагент *n*-хексан: ацетон са бързи и достъпни методи за добив на масло.

- Предложен е метод за извличане на глицеридно тютюнево масло с високо съдържание на токофероли – мацерация и ултразвукова екстракция с екстрагент етилацетат.

- Разработена е рецептура за получаването на емулсионен крем на основата на естествени съставки, съдържащ тютюнево масло и етерично масло от лимонена трева, като естествен консервант.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ ПО ДИСЕРТАЦИОННАТА РАБОТА

1. Stoyanova L., Romova, M. (2024). Bioactive compounds and nutritive Composition of Waste seeds from *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae). *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 12(1). doi: <http://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.12.1.30>; Реферирано и индексирано в WoS и Scopus (Q3)

2. Stoyanova, L., Angelova Romova, M., Docheva, M., Kirkova, D. (2024). Total phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from tobacco waste seeds, grown under organic production. *International Journal of Secondary Metabolite*, 11(3), 408-420. <https://doi.org/10.21448/ijsm.1370869>; Реферирано и индексирано в Scopus (Q4)

3. Stoyanova, L., Angelova-Romova, M. (2024). Chemical composition of seeds from organically grown tobacco plants. *Bulgarian Chemical Communications*, 56 (D2) 49-54, DOI:10.34049/bcc.56.D.S2P34; Реферирано и индексирано в WoS (Q4)

4. Stoyanova, L., Angelova Romova, M., Docheva, M., Kirkova, D., Dureva, V. (2023). Determination of polyphenols in oriental tobacco seeds of Krumovgrad ecotype grown conventionally and under bio production conditions. *Ecology and Health Conference*, 2367-9530 Plovdiv 2023, 66-70. <http://hst.bg/bulgarian/conference.htm>

IX. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ КОНФЕРЕНЦИИ

1. Семинар ACM2 – Инструментални техники за химически анализ - 2 Юни 2022, Пловдив

Постер – "*Lipid composition of seeds from oriental tobacco grown in a bio-field*" – L. Stoyanova, M. Angelova-Romova

2. Конференция с международно участие „ЕКОЛОГИЯ И ЗДРАВЕ“ 2023 – есен

Доклад – „*Определяне на полифеноли в семена от ориенталски тютюн от екотип Крумовград, отгледан конвенционално и в условията на биопроизводство*“ – Л. Стоянова, М. Ангелова-Ромова, М. Дочева, Д. Киркова, В. Дурева

3. 12-та Научна конференция по химия с международно участие на Химически факултет към ПУ „Паисий Хилендарски“ – октомври 2023 г.

Постер – "*Chemical composition of seeds from organically grown tobacco plants*" – L. Stoyanova, M. Angelova-Romova

4. Xth International conference of young scientists – Plovdiv 2024

Постер – "*Influence of the extraction method on tocopherol content in tobacco seed oil*" – L. Stoyanova, M. Angelova-Romova, D. Kirkova, M. Docheva, V. Dureva

5. Семинар ACM2- Инструментални техники и методи за химичен анализ – предизвикателства и нови решения - 5 Юни 2024, Пловдив

Постер – "*Formulation of Oil-in-Water Emulsion Utilizing Tobacco Seed Oil*" – L. Stoyanova, M. Angelova-Romova

X. ЦИТИРАНИЯ

1. Stoyanova, L., Romova, M.. (2024). Bioactive compounds and nutritive Composition of Waste seeds from *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae). *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 12(1):

➤ Abd El-Baset, Walid S., Rania IM Almoselhy, and Susan MM Abd-Elmageed. (2024). Physicochemical characteristics and nutritional value of safflower oil: A potential sustainable crop for Egypt. *North African Journal of Food and Nutrition Research*, 8(18) 140-153.

Благодарности:

Изказвам своята искрена признателност към моят научен ръководител доц. д-р Мария Ангелова-Ромова и целият колектив на Катедра „Химична технология“ за прекрасната работна атмосфера, предаден опит и подкрепа в трудните моменти по реализиране на дисертационния труд.

Благодаря на ръководството на Институт по тютюна и тютюневи изделия – с. Марково и на колегите от отдел „Химия на тютюна и тютюнев дим“, без които нямаше да мога да осъществя идеите си.

Не на последно място, благодаря на своето семейство за това, че бяха до мен и споделиха всички позитиви и негативи от желанието ми за лична и професионална реализация.

