

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 244476 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **441045**

(22) Data zgłoszenia: **2022.04.27**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.10.30 BUP 44/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.01.29 WUP 05/2024**

(51) MKP:

A01G 22/05 (2018.01)

A01G 7/06 (2006.01)

A01G 7/00 (2006.01)

A01C 21/00 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Rzeszowski, Rzeszów, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

MIŁOSZ ZARDZEWIĄŁY, Gać, PL

NATALIA MATŁOK, Zasów, PL

TOMASZ PIECHOWIAK, Strzyżów, PL

MACIEJ BALAWEJDER, Albigowa, PL

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Sylwia Błażej-Sosnowska,
Rzeszów, PL**

(54) Tytuł:

**Sposób zwiększania zawartości składników bioaktywnych w owocach pomidora
oraz zwiększania aktywności antyoksydacyjnej tych owoców**

PL 244476 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób zwiększania zawartości składników bioaktywnych w owocach pomidora, zwłaszcza składników takich jak witamina C czy polifenole oraz zwiększania aktywności antyoksydacyjnej tych owoców.

Pomidor zwyczajny (*Solanum lycopersicum* L.) należy do rodziny psiankowatych i jest rośliną uprawianą na całym świecie [Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, 32(1), 170–189]. W Polsce najczęściej pomidorów produkowano „bez osłon”, jednakże ze względu na coraz większe wymagania konsumentów pod kątem walorów smakowych i wizualnych ten rodzaj uprawy ustępuje miejsca uprawie „pod osłonami” [Brzozowski P., Zmarlicki K. 2019 Perspektywy, szanse i zagrożenia dla produkcji pomidorów pod osłonami. Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice].

Największe zbiory najlepszej jakości pomidorów otrzymuje się ze szklarni posiadających najnowsze systemy kontroli produkcji [Jabłońska, L., Olewnicki, D. (2011). Zmiany w powierzchni upraw ogrodniczych pod osłonami w Polsce w pierwszej dekadzie XXI w. *Problemy Rolnictwa Światowego*, 11(4), 122]. Do najczęstszych osłon stosowanych podczas produkcji pomidorów w Polsce należą: szklarnie, w których pomidory rosną na wełnie mineralnej, tunele ogrzewane, tunele nieogrzewane [Chudzik, A. (2010). Opłacalność produkcji pomidorów pod osłonami w województwie lubelskim i w rejonie Sandomierza. *Roczniki Naukowe Stowarzyszenia Ekonomistów Rolnictwa i Agrobiznesu*, 12(3), 33–89].

Przyrodnicze środowisko produkcji to czynnik kształtujący jakość surowca. Dążenie rolnika do ograniczenia zawartości substancji niepożądanych w produkcji, opiera się w zasadzie na stosowaniu racjonalnych metod agrotechniki, celem uzyskania odpowiedniej jakości produktów, oraz zadawalającej efektywności gospodarki. W Polsce może występować przenawożenie azotowe roślin. Wyraża się ono wzrostem zawartości frakcji N-NO₃, która zredukowana aminami do N-NO₂, tworzy w sprzyjających warunkach nitrozoaminy. Przypisuje się im kancero- i teratogenność. Szczególne znaczenie ma kontrola zawartości azotanów w składnikach pożywienia małych dzieci, bardzo wrażliwych na ich obecność w pokarmie. Przykładem wpływu nawożenia na jakość technologiczną surowców może być związek nawożenia potasowego ze wzrostem skłonności do obniżania jakości owoców i warzyw. Powszechna jest opinia o zagrożeniach zdrowotnych powodowanych przez środki chemicznej ochrony roślin. W Polsce zagrożenie to nie ma charakteru ogólnego, lecz może wystąpić incydentalnie gdy nie są przestrzegane okresy karencji.

Na jakość surowca wpływa ponadto sąsiedztwo innych roślin (allelпатия, czyli wzajemne oddziaływanie roślin), racjonalna gospodarka, zabiegi agrotechniczne, zwalczanie szkodników i chorób, odpowiednia pora i dojrzałość w czasie zbioru.

W celu gwarancji niskiej zawartości kadmu, cynku, ołowiu w surowcach roślinnych należy utrzymywać glebę w odpowiednim pH.

W stanie techniki znane są czynniki biotyczne i abiotyczne wpływające na zawartość wybranych składników bioaktywnych w uprawianych roślinach. Do czynników abiotycznych zalicza się stosowane nawożenia. Dla znawcy jest oczywiste, że stosowanie odpowiedniego nawożenia NPK oraz mikroelementowego wpływa na zawartość składników bioaktywnych, takich jak: karotenoidy, witamina C oraz antyoksydantów małowcząsteczkowych [Schulzová, Věra and Hajšová, Jana (2007) Biologically active compounds in tomatoes from various fertilisation systems. Poster at: 3rd QLIF Congress: Improving Sustainability in Organic and Low Input Food Production Systems, University of Hohenheim, Germany, March 20–23, 2007]. Metodą tą można osiągnąć standardowe dla danej odmiany pomidora zawartości tych związków. Ponadstandardowe zawartości wybranych składników bioaktywnych można osiągnąć stosując czynniki chemiczne. Wykazano, że stosując kwas salicylowy oraz ekstrakty roślinne w trakcie uprawy można modyfikować aktywność wybranych enzymów, w tym peroksydazy i oksydazy polifenolowej, przez co osiągnięto zwiększone zawartości składników bioaktywnych oraz wyższą odporność roślin pomidora [K. Narasimhamurthy, K. Soumya, A.C. Udayashankar, C. Srinivas, S.R. Niranjana, Elicitation of innate immunity in tomato by salicylic acid and *Amomum nilgiri* against *Ralstonia solanacearum*, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Volume 22, 2019].

Zwiększone zawartości składników bioaktywnych, w tym małowcząsteczkowych antyoksydantów oraz polifenoli osiągnięto stosując handlowe preparaty o nazwie Activane®, Micobiol®, Stemicol®, co przedstawiono w pracy „Potencjalne elicytory produkcji metabolitów wtórnych i aktywności antyoksydacyjnej pomidorów [Cham, A. K., Zacarias, M. del C. O. Saldaña, H. L. Vázquez Alvarado, R. E. , Olivares Sáenz, E. , Martinez-Ávila, G. C., & Alvarado Gómez, O. G. (2021). Potential elicitors on secondary

metabolite production and antioxidant defence activity of two tomato [*Solanum lycopersicum* L. varieties. Italian Journal of Agronomy, 16(3), <https://doi.org/10.4081/ija.202E1883>].

Wykazano również, że stosowanie fitohormonów, takich jak kwas abscysynowy (ABA) pozytywnie wpływa na zwiększenie zawartości wybranych składników bioaktywnych, głównie antyoksydantów małowcząsteczkowych poprzez aktywację układów enzymatycznych, takich jak amoniakolizaza fenyloalaniny (PAL) odpowiedzialnej za syntezę polifenoli w pomidorach [Tao, X.; Wu, Q.; Aalim, H.; Li, L.; Mao, L.; Luo, Z.; Ying, T. Effects of Exogenous Abscissic Acid on Bioactive Components and Antioxidant Capacity of Postharvest Tomato during Ripening. *Molecules* 2020, 25, 1346].

Stosowanie nawozów jak i innych preparatów chemicznych, jest metodą wzbogacania owoców i warzyw w składniki bioaktywne, jednak generującą pozostałości stosowanych środków chemicznych. Nawet wykorzystywanie w uprawie roślin ww. środków zgodnie z zasadami powoduje ryzyko zanieczyszczenia środowiska pozostałościami tych związków lub niepożądane działania na organizmy żywe bytujące w ekosystemie. Z kolei środki typu elicytorów działają selektywnie na zwiększanie określonych składników uprawianych roślin i następnie zbieranych owoców do spożycia przez człowieka. Należy jednak zaznaczyć, że ich pozostałości również obecne są w surowcu roślinnym. W dziedzinie techniki stale poszukuje się innych środków, które pozwolą na zwiększenie składników bioaktywnych w owocach lub warzywach przeznaczonych do zdrowej diety człowieka, które pozbawione są ww. wad.

Wynalazek wychodzi naprzeciw tym opisanym wyżej problemom. Celem wynalazku jest zapewnienie sposobu takiej uprawy pomidora, która prowadzi do zwiększenia ilości składników bioaktywnych w owocach pomidorów. W szczególności celem wynalazku jest zapewnienie sposobu, który zapewni zwiększenie zawartości składników bioaktywnych w owocach pomidora, takich jak np. witamina C czy polifenole i składniki wpływające na wzrost aktywności antyoksydacyjnej tych owoców. Dalszym celem wynalazku jest więc zapewnienie owoców pomidora o korzystnych walorach odżywczych jako elementu diety człowieka.

Spadek jakości pożywienia człowieka powoduje konieczność suplementacji diety lub wynajdowania nowych sposobów upraw owoców i warzyw wzbogacających je w składniki bioaktywne ważne dla zdrowia człowieka. Wynalazek wychodzi naprzeciw tym oczekiwaniom.

Przedmiotem wynalazku jest sposób zwiększania zawartości składników bioaktywnych w owocach pomidora oraz zwiększania aktywności antyoksydacyjnej tych owoców charakteryzujący się tym, że w całym okresie wzrostu roślin pomidora, od przyjęcia rośliny do gruntu do końca okresu wegetacyjnego, poddaje się je cyklicznemu ozonowaniu raz w tygodniu w atmosferze gazowego ozonu o stężeniu od 0,1 ppm do 2 ppm przez 1 do 3 minut, przy czym w trakcie ozonowania uprawa jest osłonięta.

Korzystnie składnikami bioaktywnymi są witamina C i/lub polifenole. Korzystnie składnikiem bioaktywnym jest witamina C. Korzystnie składnikiem bioaktywnym są polifenole.

Korzystnie składnikami bioaktywnymi są antyoksydanty wpływające na całkowity potencjał antyoksydacyjny.

Korzystnie stężenie ozonu wynosi 2 ppm. Korzystnie również, gdy gazowy ozon podaje się cyklicznie przez 1 minutę, 1,5 minuty, 3 minuty.

Sposób według wynalazku nie jest oczywisty, ponieważ znany był w literaturze fitotoksyczny wpływ ozonu troposferycznego na ekosystemy leśne i rośliny uprawne. Na roślinach w wyniku działania ozonu troposferycznego pojawiają się plamy chlorotyczne i nekrotyczne [Zapletal M., Cudlin P., Chroust P., Urban O., Pokorný R., Edwards-Jonášová M., Czerný R., Janouš D., Taufarová K., Večeřa Z., Mikuška P., Paoletti E. 2011. Ozone flux over a Norway spruce forest and correlation with net ecosystem production. *Environmental Pollution* 159: 1024–1034]. Stąd znawcy w dziedzinie mogą być zniechęceni do stosowania tego środka na rośliny.

Dobór parametrów sposobu nie jest przypadkowy. Zaskakujące było ustalenie, iż dobrane odpowiednio dawki gazowego ozonu podawane cyklicznie nie działały fitotoksycznie. Stwierdzono, że ozonowane owoce nie wykazują wtórnego skażenia skutkującego przyspieszonym pogarszaniem się jakości surowca. Ponadto korzystne jest, aby sposób według wynalazku możliwy był w relatywnie łatwy sposób do zastosowania przez rolnika w trakcie wegetacji tak, aby uzyskać korzyści stosowania sposobu według wynalazku w trakcie wzrostu roślin. Tak jest w przypadku wynalazku.

Sposób zwiększania składników bioaktywnych w owocach pomidora według wynalazku ma wiele zalet. Przede wszystkim stosowanie ozonu na uprawy roślin pomidora jest metodą bezpozostałościową poprawiania jakości owoców. Stosowanie tego czynnika nie wpływa negatywnie na środowisko naturalne, ponieważ ozon rozkłada się do tlenu atmosferycznego, jednak jest wystarczająco trwały aby wywołać efekt zwiększenia zawartości składników bioaktywnych.

Zastosowanie sposobu ozonowania w kontrolowanych warunkach wiąże się z wystąpieniem stresu oksydacyjnego w strukturach komórkowych rośliny wyniku, którego poprzez aktywację układów enzymatycznych produkowane są większe ilości metabolitów wtórnie wpływających na jakość finalną surowca roślinnego [Piechowiak, T., & Balawejder, M. (2019). Impact of ozonation process on the level of selected oxidative stress markers in raspberries stored at room temperature. *Food Chemistry*, 298, 125093]. Wiąże się to ze wzrostem ilości pozytywnych dla człowieka składników bioaktywnych w owocach co wpływa na poprawę ich wartości pokarmowych i aspektów prozdrowotnych.

Polifenole to wtórne metabolity roślinne. Występują w kwiatach, liściach, owocach i nasionach. To one odpowiadają za barwę roślin, chronią je przed niekorzystnymi warunkami środowiska (niskie temperatury, susza). Ponadto mogą pełnić funkcję hormonów, regulatorów wzrostu oraz inhibitorów wielu reakcji enzymatycznych. Polifenole są także cennym składnikiem w diecie człowieka. Metabolizm tych związków w ludzkim organizmie zachodzi głównie w wątrobie i nerkach. Wiadome jest, że dieta bogata w warzywa i owoce pomaga w zachowaniu zdrowia na co wpływ ma właśnie zawartość w nich polifenoli. Dieta dostarczająca tych cennych fitozwiązków może chronić przed wieloma chorobami, m.in. układu krążenia, nowotworami, próchnicą oraz chorobą wrzodową żołądka i dwunastnicy.

Pozytywny wpływ witaminy C na zdrowie jest znany – poniżej wymieniono tylko kilka z jej zastosowań. Kwas askorbinowy, popularnie zwany witaminą C, to jeden z najważniejszych związków organicznych koniecznych dla prawidłowego rozwoju organizmów żywych. Witamina C należy do grupy nasyconych alkoholi polihydroksylowych. Jest skutecznym przeciwutleniaczem, który zapobiega procesom starzenia (także skóry), poprawia pracę układu krążenia i działa przeciwnowotworowo. Witamina C uszczelnia i wzmacnia naczynia krwionośne, co zapobiega tworzeniu się sińców, krwotoków czy krwawień dziąseł. Hamuje także utlenianie cholesterolu frakcji LDL, a co za tym idzie, wpływa na zmniejszenie patologicznych zmian miażdżycowych w naczyniach krwionośnych. Witamina C ułatwia przyswajanie żelaza, uczestniczy w tworzeniu erytrocytów (krwinek czerwonych), wspiera proces gojenia się ran. Uczestniczy w procesie syntezy kolagenu, wpływając na stan tkanki łącznej. Ponadto bierze udział w syntezie neuroprzekaźników, poprawiając pracę mózgu. Aktywuje wiele enzymów, uczestniczy w przemianach aminokwasów, zwłaszcza tyrozyny, bierze udział w syntezie hormonów steroidowych (kortykosteroidów). Dlatego niezwykle ważne jest dostarczenie organizmowi odpowiedniej dawki witaminy C wraz z pożywieniem lub w postaci suplementu diety.

Antyoksydanty, czyli przeciwutleniacze, są substancjami, które opóźniają lub hamują proces oksydacji, czyli utleniania danej substancji, przy czym działają one w dużo mniejszym stężeniu w porównaniu do stężenia substancji, która ulega utlenianiu [Bartosz G. 2013. *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*. Wydawnictwo Naukowe PWN].

Właściwości antyoksydacyjne wykazuje wiele rodzajów związków chemicznych występujących w roślinach – najczęściej w ich częściach jadalnych, takich jak: owoce, liście, bulwy, korzenie czy nasiona [Hendrich A.B., Malon R., Pola A., Shirataki Y., Motohashi N., Michalak N. 2002. Differential interaction of Sophora isoflavonoids with lipid bilayers. *Europ. J. Pharma. Sci.* 16(3), 201–208].

Antyoksydanty roślinne można podzielić na następujące grupy:

- kwasy fenolowe (kwas kawowy, elagowy, ferulowy) oraz flawonoidy z sześcioma podgrupami, do których należą: flawonole (kwercetyna, kempferol), flawanole (katechina, gallusan epikatechiny), flawanony (naringenina, hesperydyna), flawony (apigenina, luteolina), antocyjany (cyjanidyna, malwidyna) i izoflawonoidy (genisteina, daidzeina); osobną grupę polifenoli tworzą stilbeny (resweratrol);
- karotenoidy, m.in. alfa i beta-karoten, likopen;
- kwas askorbinowy;
- tokoferole [Czerwiecki L. 2009. Współczesne poglądy na rolę przeciwutleniaczy roślinnych w profilaktyce chorób cywilizacyjnych. *Rocz. PZH* 60, 3, 201–206].

Celem ustalenia jak prowadzenie sposobu według wynalazku wpływa na zawartość składników bioaktywnych w pomidorach zebranych z upraw poddanych ozonowaniu, przeprowadzono ustalenie zawartości wybranych składników bioaktywnych w owocach w trakcie ich wegetacji jak i w trakcie przechowywania.

Działanie wynalazku zilustrowano na fig. 1–8.

Fig. 1 ilustruje wykres słupkowy całkowitej zawartości polifenoli w czerwonych dojrzałych pomidorach w czasie wegetacji w zależności od warunków procesu ozonowania.

- Fig. 2 ilustruje wykres słupkowy całkowitej zawartości polifenoli w czerwonych dojrzałych pomidorach podczas przechowywania w zależności od warunków procesu ozonowania w czasie wegetacji roślin.
- Fig. 3 ilustruje wykres słupkowy całkowitej zawartości polifenoli w zielonych pomidorach podczas przechowywania w zależności od warunków procesu ozonowania w czasie wegetacji roślin.
- Fig. 4 ilustruje wykres słupkowy całkowitej zawartości witaminy C w czerwonych dojrzałych pomidorach w czasie wegetacji w zależności od warunków procesu ozonowania w czasie wegetacji roślin.
- Fig. 5 ilustruje wykres słupkowy całkowitej zawartości witaminy C w czerwonych dojrzałych pomidorach podczas przechowywania w zależności od warunków procesu ozonowania w czasie wegetacji roślin.
- Fig. 6 ilustruje wykres słupkowy aktywności antyoksydacyjnej jakie wykazują czerwone dojrzałe pomidory w czasie wegetacji w zależności od warunków procesu ozonowania w czasie wegetacji roślin.
- Fig. 7 ilustruje wykres słupkowy aktywności antyoksydacyjnej jakie wykazują czerwone dojrzałe pomidory podczas przechowywania w zależności od warunków procesu ozonowania w czasie wegetacji roślin.
- Fig. 8 ilustruje wykres słupkowy aktywności antyoksydacyjnej jakie wykazują zielone pomidory podczas przechowywania w zależności od warunków procesu ozonowania w czasie wegetacji roślin.

Fig. 1–8 opisane zostaną szczegółowo w przykładach realizacji wynalazku.

Wybrano trzy testy jako reprezentatywne do określenia działania wynalazku: badanie aktywności antyoksydacyjnej, badanie zawartości polifenoli i zawartości witaminy C w owocach pomidora.

Badania przeprowadzono na zebranych owocach dojrzałych czerwonych w trakcie wegetacji oraz owocach dojrzałych czerwonych w trakcie przechowywania. Zaobserwowano bowiem, że korzystne skutki uprawy roślin pomidora widoczne są zaraz po zbiorze, ale również owoce nie tracą składników bioaktywnych w trakcie 24 godzin przechowywania.

Wynalazek został opisany w przykładach, które nie mają mieć znaczenia ograniczającego, a pokazują reprezentatywne sposoby zwiększania zawartości składników bioaktywnych w owocach pomidora. Przykłady pokazują również efekt jaki zostaje osiągnięty poprzez stosowanie sposobu według wynalazku.

Dla poniższych badań ujawnionych w przykładach realizacji wynalazku, rośliny pomidorów uprawiano następująco. Przedplonem dla pomidorów była cebula. Po zbiorze przedplonu pobrano łaskę Egnera próby glebowe z powierzchni pola, gdzie zaplanowano na przyszły rok uprawę pomidora. Na podstawie analizy gleby dokonano ustalenia dawek nawozowych odpowiednich dla roślin pomidora. Zbadany odczyn gleby był odpowiedni dla uprawy pomidora i wynosił 6,1. Jesienią zastosowano nawożenie fosforowo-potasowe i wykonano orkę. Wiosną przeprowadzono uprawę przedsięwną. Sadzonki pomidorów wysadzono po ustąpieniu wiosennych przymrozków w systemie pasowo-rzędowym. Dwa rzędy roślin tworzące pas, posadzono w odległości 50 cm, a między nimi pozostawiono przejście szerokości 100 cm. Odległość między roślinami w rzędach wynosiła 40 cm. Nawożenie wielkoskładnikowe (NPK Mg Ca) zastosowano od 3 tygodnia po wysadzeniu rozsady. W okresie intensywnego kwitnienia i plonowania stosowano oprysk zawierający mikroelementy. Rośliny pomidora prowadzono „na jeden pęd”, to znaczy, że regularnie usuwano wyrastające pędy boczne, aby skoncentrować energię rośliny na rozwoju owoców. Przy prowadzeniu pomidorów na jeden pęd systematycznie usuwano pędy boczne pojawiające się w kątach liści. Pędy te wyłamywano we wczesnej fazie wzrostu. Dodatkowo przeprowadzano usuwanie nadmiaru liści w celu przyspieszenia dojrzwania owoców oraz poprawy zdrowotności roślin, tj. m.in. lepsze wietrzenie, poprawa warunków świetlnych w dolnych partiach roślin. Pomidory w połowie sierpnia ogławiano, czyli usuwano wierzchołek pędu głównego. Wierzchołki pomidorów usunięto powyżej 2–3 liści nad ostatnim rozwiniętym kwiatostanem.

Materiał do badań stanowiły rośliny pomidora zwyczajnego (*Solanum lycopersicum* L.) odmiany Remiz. Poza zastosowaniem sposobu według wynalazku, pomidor uprawiany był zgodnie z zasadami prawidłowej agrotechniki, jak opisano powyżej.

Dla poniżej opisanych przykładów stosowano następującą procedurę ozonowania w trakcie uprawy. Do zamkniętego tunelu foliowego, w którym prowadzono uprawę pomidora tunelowego, za po-

mocą przewodu gumowego doprowadzany był strumień ozonu z generatora Korona L5 Zdrowa Żywność. Stężenie ozonu kontrolowano czujnikiem ozonu 106M Ozone Solution. Badano wpływ różnych dawek ozonu podawanego raz w tygodniu od momentu przyjęcia się sadzonek do końca okresu wegetacji roślin na owoce pomidora. Uprawę prowadzono pod osłoną, którą w warunkach eksperymentów był tunel foliowy, a w warunkach polowych uprawy może to być osłona w postaci kartonu, tektury czy folii.

Kontrolą w eksperymentach były owoce pomidora roślin, które uprawiano bez traktowania gazowym ozonem. Poza tym uprawa przebiegała analogicznie jak dla upraw eksperymentalnych.

Dla eksperymentów opisanych w przykładach, rośliny pomidora uprawiane były jednakowo, zmienna była dawka gazowego ozonu podawanego raz w tygodniu. Badano właściwości dojrzałych czerwonych owoców pomidora ze zbioru w miesiącu sierpień, na który to czas przypada największy plon. Zielone owoce pomidora zbierano w miesiącu październik z uwagi na zamieranie zielonych części roślin. Na zebrane owoce pomidora nie stosowano już ozonowania, własności jakie owoce pomidora nabrały wynikają ze stosowania ozonowania w określonej dawce w trakcie wzrostu roślin (wegetacji) i owoców na tych roślinach.

Proces ozonowania w trakcie uprawy roślin pomidora prowadzono w odrębnych tunelach foliowych przez 1, 1,5 i 3 minuty, utrzymując każdorazowo stężenie ozonu pod osłoną na poziomie 2 ppm. Następnie po procesie ozonowania tunel foliowy otwierano z obu stron i przewietrzano. Ozonowanie przeprowadzano cyklicznie raz w tygodniu. Na czas przeprowadzenia ozonowania należy osłonić rośliny jeśli pomidor jest gruntowy lub jako osłonę wykorzystać tunel w przypadku uprawy pomidora tunelowego/szklarniowego. Osłoną może być osłona z folii z tworzywa sztucznego, z tektury/kartonu lub innego materiału. Osłonę można zdjąć po przeprowadzeniu ozonowania i nałożyć ponownie w kolejnych cyklach ozonowania. Ozonowanie prowadzi się przez cały okres wzrostu roślin pomidora, tj. od trzech tygodni po wysadzeniu (po przyjęciu rośliny do gruntu) do końca okresu wegetacyjnego.

W trakcie prowadzenia doświadczeń, podczas cyklicznego cotygodniowego dostarczania gazowego ozonu do tunelu umieszczano w nim wentylator, przy użyciu, którego wywoływano ruch powietrza wewnątrz tunelu. Wszystkie rośliny dzięki temu rozwiązaniu znajdowały się w atmosferze ozonu o takim samym stężeniu.

W celu stwierdzenia skuteczności sposobu według wynalazku pobierano zielone i czerwone pomidory do analiz chemicznych opisanych poniżej.

Przykład 1. Zwiększenie zawartości polifenoli

Całkowitą zawartość polifenoli oznaczono za pomocą metody opisanej przez Piechowiak i in. 2021 [Piechowiak, T., Skóra, B., Grzelak-Błaszczyk, K. et al. Extraction of Antioxidant Compounds from Blueberry Fruit Waste and Evaluation of Their In Vitro Biological Activity in Human Keratinocytes (HaCaT). Food Anal. Methods 14, 2317–2327 (2021), <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02056-7>].

Oznaczanie poziomu związków polifenolowych rozpoczęto od przygotowania krzywej wzorcowej. W tym celu przygotowano serie roztworów wzorcowych kwasu galusowego o stężeniu 1 mg/ml. Do 7 podpisanych probówek typu eppendorf odpipetowano po 500 µl metanolu. Do pierwszej probówki dodano 500 µl wzorcowego roztworu kwasu galusowego o stężeniu 1 mg/ml, a następnie całość wymieszano. Roztwór ten wykorzystano do następnych rozcieńczeń, otrzymując roztwory o stężeniach 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,0312, 0,015, 0,0078 mg/ml. Do płytki 96-dołkowej odpipetowano po 20 µl wzorcowego roztworu kwasu galusowego o stężeniach: 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,0312, 0,015, 0,0078 mg/ml, 80 µl wody destylowanej, 25 µl odczynnika Folin-Ciocalteu i 50 µl 20% Na₂CO₃. Po 30 minutach inkubacji mierzono absorbancję przy długości fali 700 nm. Wygenerowana krzywa kalibracyjna posłużyła do obliczenia zawartości polifenoli w owocach pomidora. Próbkę właściwą przygotowywano przez odpipetowanie 20 µl ekstraktu pomidora, 80 µl wody destylowanej 25 µl reagentu Folin-Ciocalteu oraz 50 µl 20% roztworu Na₂CO₃ do dołków płytki. Płytkę inkubowano przez 30 min, po czym mierzono absorbancję roztworów przy 700 nm.

Fig. 1 ilustruje wykres słupkowy całkowitej zawartości polifenoli w czerwonych dojrzałych pomidorach w czasie wegetacji roślin, w zależności od czasu poddawania roślin pomidora na działanie gazowego ozonu w jego cyklicznym podaniu raz w tygodniu. Badanie wykonywano niezwłocznie po zebraniu owoców. W przypadku zawartości polifenoli w czerwonych dojrzałych pomidorach pobranych w czasie wegetacji, najbardziej korzystne jest cykliczne ozonowanie podczas okresu wzrostu i rozwoju gazowym ozonem o stężeniu 2 ppm w czasie 1 minuty.

Fig. 2 ilustruje wykres słupkowy całkowitej zawartości polifenoli w czerwonych dojrzałych pomidorach badanych podczas przechowywania, w zależności od czasu poddawania roślin pomidora na

działanie gazowego ozonu w jego cyklicznym podaniu raz w tygodniu. Badanie wykonywano 24 godziny po zbiorze. W czasie przechowywania czerwonych owoców w temperaturze 10–13°C i wilgotności 85–90% z danego wariantu pobrano próby materiału do badań na zawartość polifenoli. W przypadku zawartości polifenoli w czerwonych dojrzałych pomidorach badanych w trakcie przechowywania, najbardziej korzystne jest cykliczne ozonowanie podczas okresu wzrostu i rozwoju gazowym ozonem o stężeniu 2 ppm w czasie 1 minuty.

Fig. 3 ilustruje wykres słupkowy całkowitej zawartości polifenoli w zielonych pomidorach badanych podczas przechowywania, w zależności od czasu poddawania roślin pomidora na działanie gazowego ozonu w jego cyklicznym podaniu raz w tygodniu. Badanie wykonywano 24 godziny po zbiorze. W czasie przechowywania zielonych owoców w temperaturze 12–13°C i wilgotności 85–90% z danego wariantu pobrano próby materiału do badań na zawartość polifenoli. W przypadku zawartości polifenoli w zielonych pomidorach badanych w trakcie przechowywania, najbardziej korzystne jest cykliczne ozonowanie podczas okresu wzrostu i rozwoju gazowym ozonem o stężeniu 2 ppm w czasie 1 minuty.

We wszystkich eksperymentach zaobserwowano zwiększoną zawartość polifenoli w owocach pomidorów zebranych z upraw traktowanych gazowym ozonem względem kontroli.

Przykład 2. Zwiększenie zawartości witaminy C

Witaminę C oznaczono metodą miareczkowania zgodnie z metodologią przedstawioną przez Małłok i in. [Małłok, N.; Piechowiak, T.; Zardzewiały, M.; Gorzelany, J.; Balawejder, M. Effects of Ozone Treatment on Microbial Status and the Contents of Selected Bioactive Compounds in *Origanum majorana* L. Plants. Plants 2020, 9, 1637].

Witamina C była oznaczana następującą metodą: porcję 5 g rozdrobnionego owocu pomidora wymieszano z 50 ml 2% roztworu kwasu szczawiowego przez 15 minut. Zawiesinę przefiltrowano. 10 ml filtratu miareczkowano roztworem 2,6-dichlorolindofenolu (SigmaAldrich) o stężeniu 25 mg/100 ml. W celu obliczenia zawartości witaminy C wykorzystano wzór:

$$C = \frac{VMV_{km}}{V_p m}$$

gdzie V = objętość roztworu standardowego, M = stężenie roztworu standardowego, V_{km} = objętość kolby miarowej, V_p = objętość filtratu, m = masa próbki [Małłok, N.; Piechowiak, T.; Zardzewiały, M.; Gorzelany, J.; Balawejder, M. Effects of Ozone Treatment on Microbial Status and the Contents of Selected Bioactive Compounds in *Origanum majorana* L. Plants. Plants 2020, 9, 1637].

Fig. 4 ilustruje wykres słupkowy całkowitej zawartości witaminy C w czerwonych dojrzałych owocach pomidora w czasie wegetacji, w zależności od czasu poddawania roślin pomidora na działanie gazowego ozonu w jego cyklicznym podaniu raz w tygodniu. Badanie wykonywano niezwłocznie po zebraniu owoców. W przypadku zawartości witaminy C w czerwonych dojrzałych pomidorach pobranych w czasie wegetacji, najbardziej korzystne jest cykliczne ozonowanie podczas okresu wzrostu i rozwoju gazowym ozonem o stężeniu 2 ppm przez 1 minutę. W przypadku tego wariantu zawartość witaminy C w owocach była najwyższa.

Fig. 5 ilustruje wykres słupkowy całkowitej zawartości witaminy C w czerwonych dojrzałych owocach pomidora badanych podczas przechowywania, w zależności od czasu poddawania roślin pomidora na działanie gazowego ozonu w jego cyklicznym podaniu raz w tygodniu. Badanie wykonywano 24 godziny po zbiorze. W czasie przechowywania czerwonych owoców w temperaturze 10–13°C i wilgotności 85–90% z danego wariantu pobrano próby materiału do badań na zawartość witaminy C. W przypadku zawartości witaminy C w czerwonych dojrzałych owocach pomidora pobranych w czasie wegetacji, najbardziej korzystne jest cykliczne ozonowanie podczas okresu wzrostu i rozwoju gazowym ozonem o stężeniu 2 ppm przez 1 minutę.

We wszystkich eksperymentach zaobserwowano zwiększoną zawartość witaminy C w owocach pomidorów zebranych z upraw traktowanych gazowym ozonem względem kontroli.

Przykład 3. Aktywność antyoksydacyjna

Potencjał przeciwutleniający określono metodą 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu (DPPH) [Piechowiak, T., Skóra, B., Grzelak-Błaszczak, K. et al. Extraction of Antioxidant Compounds from Blueberry Fruit Waste and Evaluation of Their In Vitro Biological Activity in Human Keratinocytes (HaCaT). Food Anal. Methods 14,2317-2327 (2021), <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02056-7>].

W celu wykonania seryjnych rozcieńczeń wzorcowego przeciwutleniacza (kwercetyny) do sporządzenia krzywej kalibracyjnej, w pierwszej kolejności do 7 odpowiednio zaznaczonych probówek typu

eppendorf odpipetowano po 500 µl metanolu. Do pierwszej dodano 500 µl wzorcowego roztworu kwercetyny o stężeniu 0,5 mg/ml, następnie całość wymieszano. Do drugiej probówki dodano 500 µl zawartości pierwszej probówki, do trzeciej probówki dodano 500 µl zawartości drugiej. Postępowano tak aż do ostatniej probówki. Kolejną czynnością było odpipetowanie 20 µl wzorcowego roztworu kwercetyny oraz 180 µl rodników DPPH o stężeniu 100 µM do płytki 96-dołkowej. Następnie płytkę inkubowano przez 15 minut w ciemnym miejscu. Po tym czasie zmierzono absorbancję przy 515 nm wobec metanolu. W celu określenia aktywności antyoksydacyjnej owoców pomidora, 20 µl ekstraktu z pomidora dodawano do 180 µl rodników DPPH o stężeniu 100 µM. Po 15 minutach inkubacji w ciemnym miejscu mierzono absorbancję przy 515 nm.

Fig. 6 ilustruje wykres słupkowy aktywności oksydacyjnej w czerwonych dojrzałych owocach pomidora w czasie wegetacji, w zależności od czasu poddawania roślin pomidora na działanie gazowego ozonu w jego cyklicznym podaniu raz w tygodniu. Badanie wykonano niezwłocznie po zbiorze owoców. W przypadku aktywności antyoksydacyjnej w czerwonych dojrzałych owocach pomidora pobranych w czasie wegetacji najkorzystniejsze jest cykliczne ozonowanie podczas okresu wzrostu i rozwoju gazowym ozonem o stężeniu 2 ppm przez 3 minuty.

Fig. 7 ilustruje wykres słupkowy aktywności oksydacyjnej w czerwonych owocach pomidora podczas przechowywania, w zależności od czasu poddawania roślin pomidora na działanie gazowego ozonu w jego cyklicznym podaniu raz w tygodniu. Badanie wykonywano 24 godziny po zbiorze. W czasie przechowywania czerwonych owoców w temperaturze 10–13°C i wilgotności 85–90% z danego wariantu pobrano próby materiału do badań na aktywność antyoksydacyjną. W przypadku aktywności antyoksydacyjnej w czerwonych dojrzałych owocach pomidora podczas przechowywania, najkorzystniejsze jest cykliczne ozonowanie podczas okresu wzrostu i rozwoju gazowym ozonem o stężeniu 2 ppm przez 3 minuty.

Fig. 8 ilustruje wykres słupkowy aktywności antyoksydacyjnej w zielonych owocach pomidora badanych podczas przechowywania, w zależności od czasu poddawania roślin pomidora na działanie gazowego ozonu w jego cyklicznym podaniu raz w tygodniu. Badanie wykonywano 24 godziny po zbiorze. W czasie przechowywania zielonych owoców w temperaturze 12–13°C i wilgotności 85–90% z danego wariantu pobrano próby materiału do badań na aktywność antyoksydacyjną. W przypadku aktywności antyoksydacyjnej w zielonych owocach pomidora podczas przechowywania, najkorzystniejsze jest cykliczne ozonowanie podczas okresu wzrostu i rozwoju gazowym ozonem o stężeniu 2 ppm przez 1 minutę.

We wszystkich eksperymentach zaobserwowano zwiększoną aktywność anty oksydacyjną w owocach pomidorów zebranych z upraw traktowanych gazowym ozonem względem kontroli.

Przedstawione przykłady potwierdzają, iż uprawa roślin pomidora, podczas której cyklicznie traktuje się rośliny pomidora gazowym ozonem zapewniając określone jego stężenie, skutkuje zwiększeniem zawartości składników bioaktywnych w owocach pomidora. Takie owoce stanowią wartościowszym tym samym zdrowszy składnik pokarmowy dla człowieka niż owoce pomidora uprawiane bez stosowania sposobu według wynalazku.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób zwiększania zawartości składników bioaktywnych w owocach pomidora oraz zwiększania aktywności antyoksydacyjnej tych owoców, **znamienny tym**, że w całym okresie wzrostu roślin pomidora, od przyjęcia rośliny do gruntu do końca okresu wegetacyjnego, poddaje się je cyklicznemu ozonowaniu raz w tygodniu w atmosferze gazowego ozonu o stężeniu od 0,1 ppm do 2 ppm przez 1 do 3 minut, przy czym w trakcie ozonowania uprawa jest osłonięta.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że składnikami bioaktywnymi są witamina C i/lub polifenole.
3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że składnikami bioaktywnymi są antyoksydanty wpływające na aktywność anty oksydacyjną.
4. Sposób według zastrz. 1 albo 2 albo 3, **znamienny tym**, że stężenie ozonu wynosi 2 ppm.

Rysunki

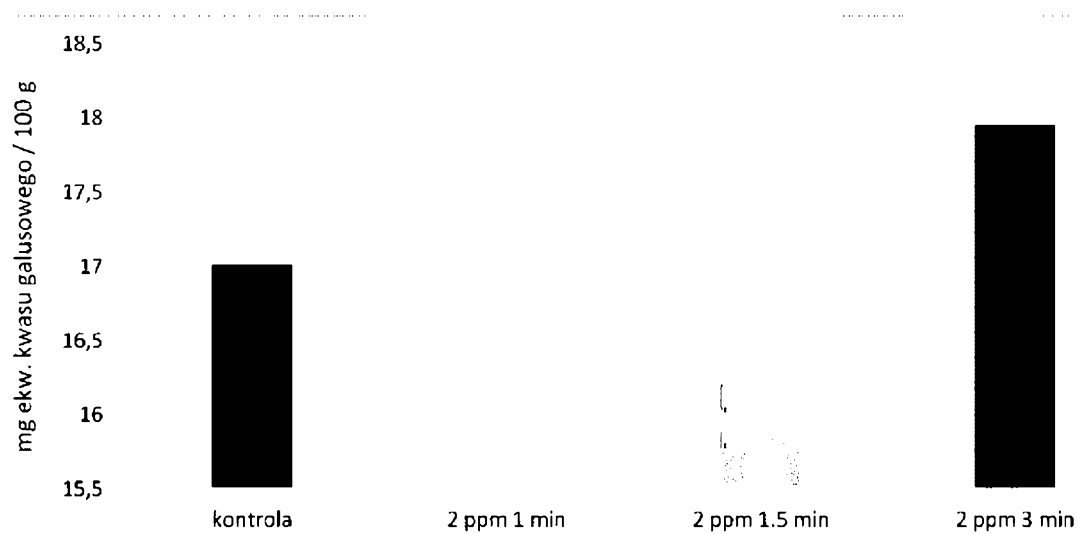


Fig. 1

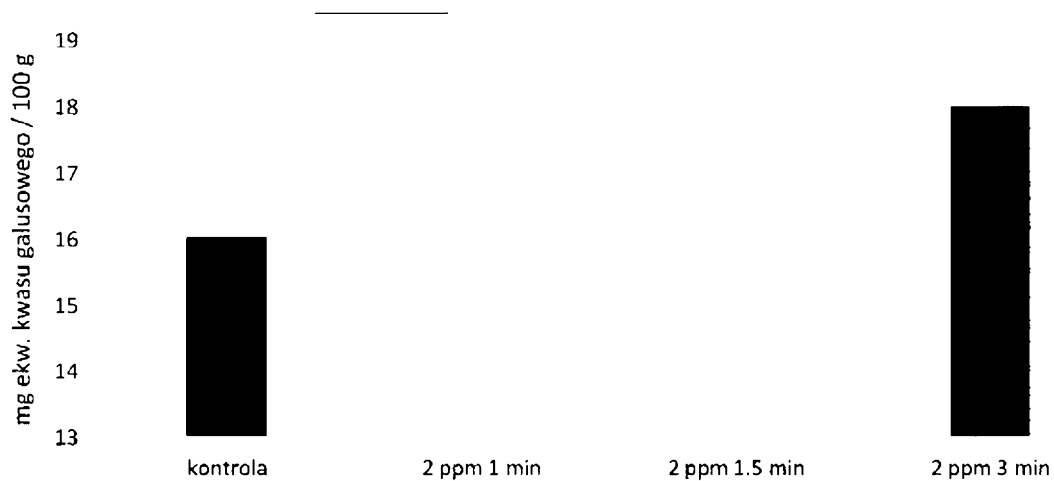


Fig. 2

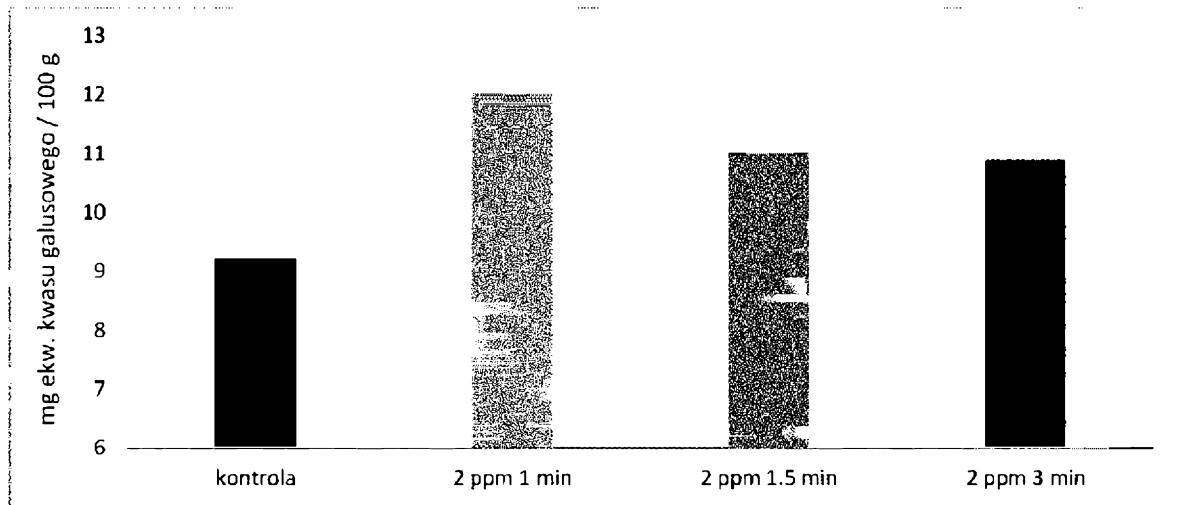


Fig. 3

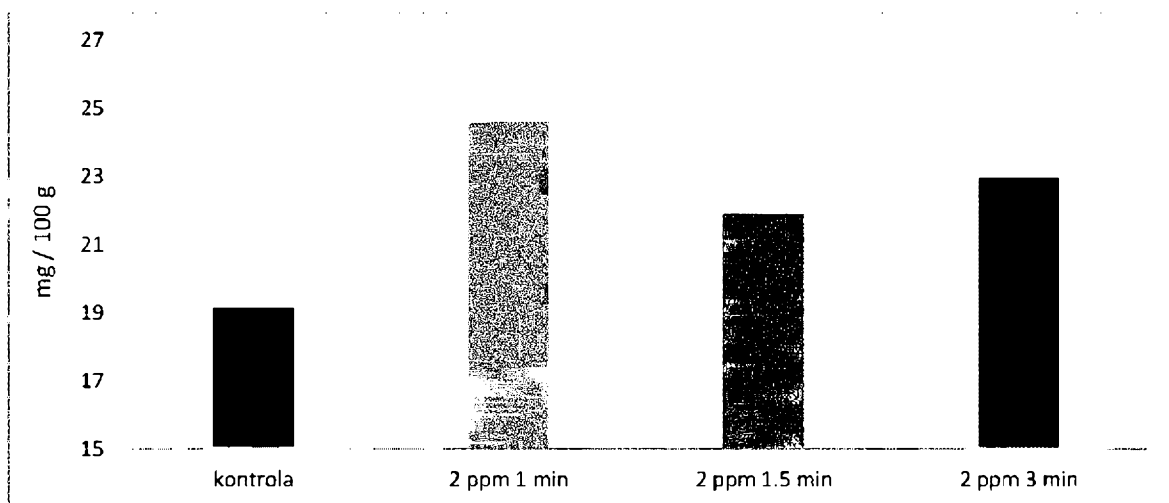


Fig. 4

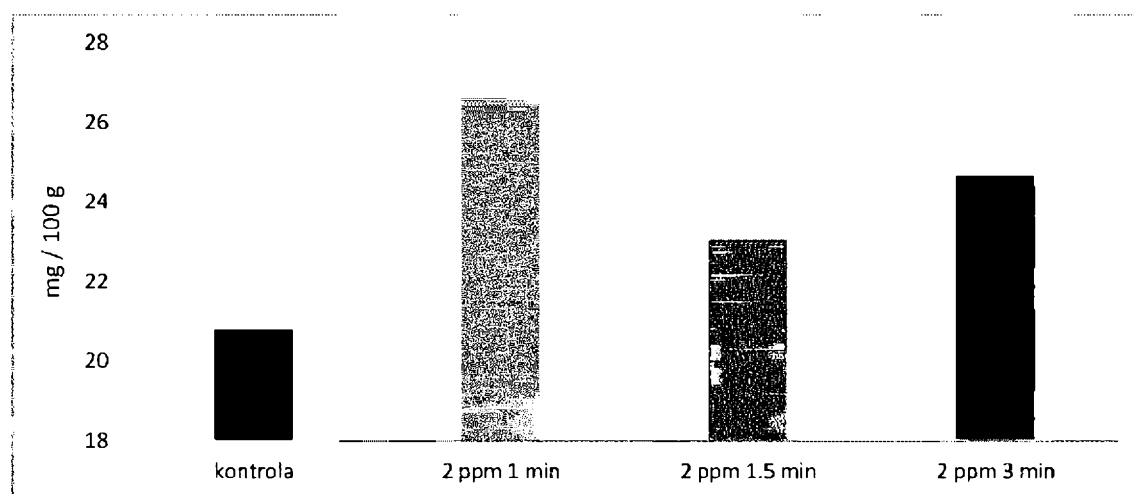


Fig. 5

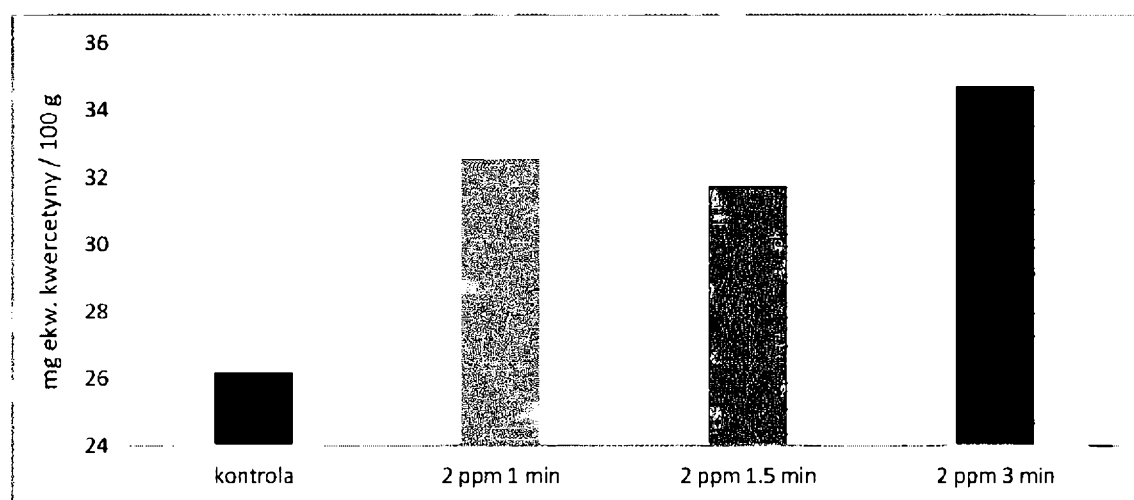


Fig. 6

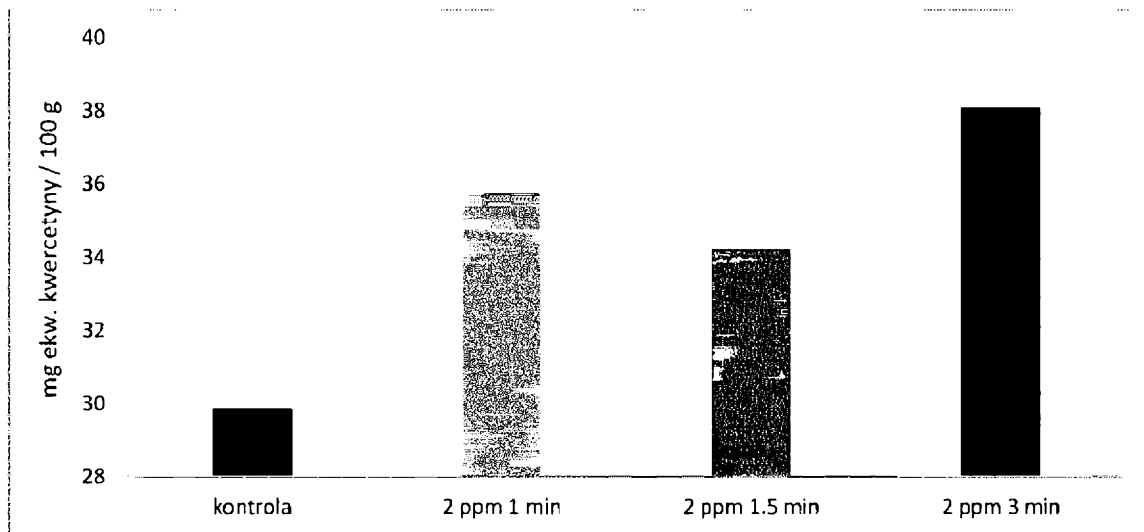


Fig. 7

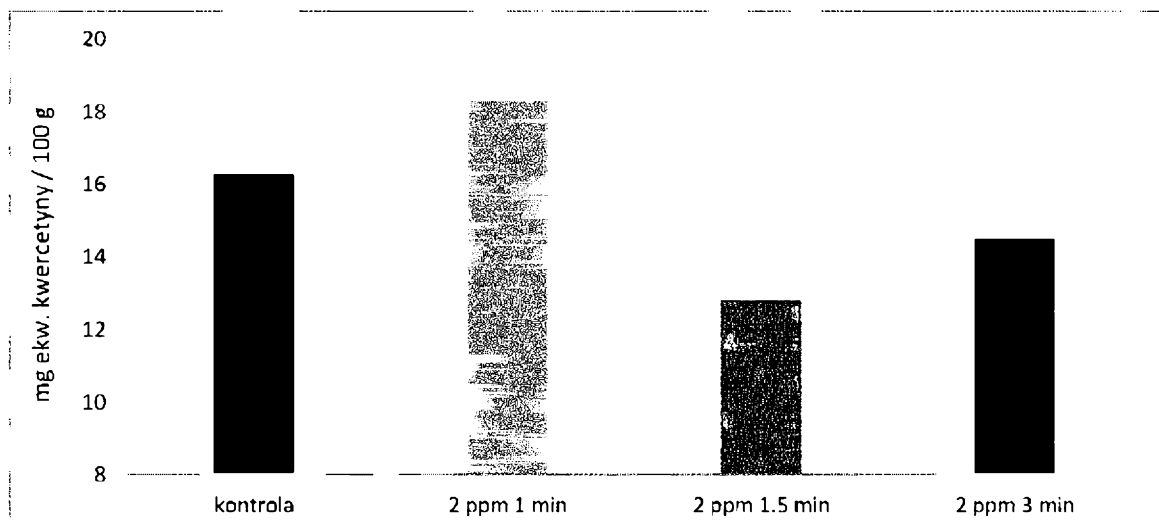


Fig. 8