

Sposób obniżania zawartości kwasu szczawiowego w ogonkach liściowych rabarbaru

Przedmiotem wynalazku jest sposób obniżania zawartości kwasu szczawiowego w ogonkach liściowych rabarbaru, zwłaszcza rabarbaru ogrodowego dla uzyskania korzystnego materiału roślinnego na cele farmaceutyczne i kosmetyczne.

Rabarbar obejmuje około 60 gatunków roślin z rodzaju *Rheum* L. z rodziny Polygonaceae [Xiang H., Zuo J., Guo F., Dong D. What we already know about rhubarb: a comprehensive review. *Chin Med*, 15,88, 2020]. Rabarbar zaliczany jest do wieloletnich upraw małoobszarowych. Plantację użytkuje się przez okres 10–15 lat. Jest on uprawiany nie tylko do bezpośredniego spożycia, ale również jako surowiec dla przemysłu, z przeznaczeniem do naturalnego zakwaszania przetworów owocowo-warzywnych i kandyzowania, ma też zastosowanie w farmacji [Matyjaszczyk E., Dobrzański A. Ochrona rabarbaru (*Rheum raponticum* L.) przed chwastami w Polsce i innych krajach. [Weed management in rhubarb (*Rheum raponticum* L.) in Poland and other countries]. *Progress in Plant Protection/Postępy w Ochronie Roślin* 55 (4), 466–471, 2015].

Rabarbar jest źródłem biologicznie aktywnych składników odpowiadających za właściwości przeczyszczające, moczopędne, przeciwbakteryjne, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe [Huang, Z., Xu, Y., Wang, Q., & Gao, X. Metabolism and mutual biotransformations of anthraquinones and anthrones in rhubarb by human intestinal flora using UPLC-QTOF/MS. *Journal of Chromatography B*; 1104; 59–66, 2019; Jintao, X., Yongli, S., Liming, Y., Quanwei, Y., Chunyan, L., Xingyi, C. Nearinfrared spectroscopy for rapid and simultaneous determination of five main active components in rhubarb of different geographical origins and processing. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*; 205; 419–427, 2018]. W ogonkach liściowych rabarbaru pomimo występowania kilku cennych naturalnych składników aktywnych (antrachinony, diantrony, stylbeny i flawonoidy), które przyczyniają się do poprawy stanu zdrowia ludzi i zwierząt [Krafczyk, N., Kötke, M., Lehnert, N., & Glomb, M. A. Phenolic composition of rhubarb.

European Food Research and Technology; 228(2), 187–196, 2008] znajdują się duże ilości kwasów organicznych w tym kwasu szczawiowego, który negatywnie oddziałuje na zdrowie konsumentów [Oszmiański, J., i Wojdyło, A. Polyphenol content and antioxidative activity in apple purées with rhubarb juice supplement. International Journal of Food Science and Technology; 43(3); 501-509, 2008]. Szczawiany występują w żywności pochodzenia roślinnego i zwierzęcego w formie rozpuszczalnych soli sodu i potasu oraz nierozpuszczalnych – szczawianu wapnia [Brzozowska A. Toksykologia żywności. Wyd. SGGW, Warszawa 2010]. W roślinach rabarbaru najwięcej szczawianów występuje w ogonkach i dolnych liściach, a najmniej w korzeniach. Kwas szczawiowy wchłania się łatwo z przewodu pokarmowego. Szczawian wapnia wchłania się po częściowym rozkładzie w żołądku. Im wyższa kwasowość soku żołądkowego, tym więcej szczawianu wapnia ulega rozkładowi [<https://wegecentrum.pl/2018/12/07/wszystko-o-kwasie-szczawiovym-w-diecie-roslinnej/>]. Zawartość tego składnika determinuje przydatność ogonków liściowych rabarbaru jako ważnego składnika wielu produktów przemysłu spożywczego. Korzystnie niska zawartość kwasu szczawiowego zwiększa możliwości stosowania rabarbaru jako wypełniacza/substytutu innych składników pochodzenia roślinnego o wyższej cenie. Głównie rabarborem zastępuje się owoce miękkie takie jak: czereśnie, wiśnie, aronia czy inne owoce jak jabłka, gruszki.

Rabarbar zbiera się dwukrotnie w ciągu okresu wegetacyjnego, pierwszy raz w maju i drugi raz w sierpniu gdy osiąga tzw. „dojrzałość zbiorczą”. Rabarbar jest „dojrzały” przez całą wiosnę i lato jednak długie dojrzewanie powoduje wzrost zawartości kwasu szczawiowego w ogonkach liściowych i obniżenie prozdrowotnego charakteru. Dlatego też rabarbar zbiera się w maju a następnie w sierpniu. Dwukrotny zbiór sprawia, że nowe ogonki liściowe gromadzą kwas szczawiowy ale nie takie ilości, które byłyby szkodliwe.

Kwas szczawiowy w organizmie człowieka pochodzi z pożywienia lub jest końcowym produktem metabolizmu m.in. kwasu askorbinowego. Jednym z najbardziej znanych źródeł szczawianów jest rabarbar. Sporadyczne spożycie produktów zawierających szczawiany nie wpływa negatywnie na stan zdrowia człowieka, natomiast nadmierna ich podaż z dietą przy niedostatecznej ilości wapnia i witaminy D może wywierać ujemny wpływ na wchłanianie i retencję wapnia, a konsekwencji na bilans wapnia w organizmie. Może również prowadzić do kamicy nerkowej. Zaleca się nieprzekraczanie podaży 40-50 mg szczawianów/dobę. Stosowanie ogonków liściowych rabarbaru o dużej zawartości kwasu szczawiowego jako substytutu innych surowców roślinnych może potęgować problem wysokiej zawartości kwasu

szczawiowego w różnego typu produktach spożywczych [Dżugan M., Pasternakiewicz A. Ćwiczenia laboratoryjne z chemii żywności, Wyd. Uniwersytetu Rzeszowskiego, Rzeszów 2010].

Antyodżywcze działanie kwasu szczawiowego jest uwarunkowane nie tylko zawartością jonów szczawianowych w pożywieniu, ale również stosunkiem molowym kwasu szczawiowego do pierwiastków, z którymi tworzy on nierozpuszczalne sole. Biorąc pod uwagę stosunek molowy kwasu szczawiowego do wapnia to ogonki liściowe rabarbaru zaliczamy do produktów, w których zawartość kwasu szczawiowego wielokrotnie przekracza zawartość wapnia – stosunek molowy $(\text{COOH})_2/\text{Ca} > 2$. Ponadto do tej grupy zaliczyć można szpinak, szczaw, botwinę, herbatę, kawę i kakao [Pasternakiewicz A., Dżugan M. Ćwiczenia laboratoryjne z toksykologii żywności, Rzeszów 2012, Wyd. Uniwersytetu Rzeszowskiego].

Znane są w stanie techniki sposoby obniżania zawartości kwasu szczawiowego w ogonkach liściowych rabarbaru. Jednym z nich jest gotowanie w wodzie i gotowanie na parze ogonków liściowych rabarbaru. Gotowanie jest metodą redukcji rozpuszczalnych szczawianów, szczególnie w przypadku gdy po ugotowaniu ogonków liściowych wodę odlewamy. W zależności od zastosowanej metody gotowania, ilość szczawianów rozpuszczalnych w stosunku do całkowitej ilości pozostałych szczawianów w gotowanym rabarbarze może się różnić [Savage GP., Nguyen HHV. Oxalate availability in raw and cooked rhubarb. Proceeding of the Nutrition Society of New Zeland, vol. 35, 2011]. Dodatkowo szczawiany zredukować można przez blanszowanie oraz przez proces fermentacji [Van Boekel, M.; Fogliano, V.; Pellegrini, N.; Stanton, C.; Scholz, G.; Lalljie, S. A review on the beneficial aspects of food processing. Mol. Nutr. Food Res. 54, 1215–1247, 2010]. Macerowanie w serwatce również obniża koncentrację szczawianu w żywności [<https://www.washcoll.edu/learn-by-doing/food/reconnect/detoxify/oxalates.php>].

Kolejnym sposobem redukcji zawartości kwasu szczawiowego w ogonkach rabarbaru znanym ze stanu techniki jest zastosowanie wapnia, który ma zdolność wiązania się z rozpuszczalnym szczawianem, tworząc nierozpuszczalny szczawian wapnia. Dostępność szczawianów w pożywieniu zmienia się poprzez dodanie dodatkowego wapnia. Dla przykładu dodanie mleka krowiego i/lub mleka kokosowego znacznie zmniejsza zawartość rozpuszczalnych szczawianów w ogonkach rabarbaru poddanych obróbce termicznej [Savage GP., Martensson L., Sedcole JR. Composition of oxalates in baked taro (*Colocasia esculenta* var. Schott) leaves cooked alone or with additions of cow milk or coconut milk. Journal of Food

Composition and Analysis 22(1), 83-86, 2009]. Sposoby te jednak generują w produktach nierozpuszczalne związki kwasu szczawiowego głównie szczawian wapnia, które przy kontakcie z sokami żołądkowymi o niskim pH konwertowane są do łatwo przyswajalnego kwasu szczawiowego

Żaden ze znanych ze stanu techniki sposobów redukcji zawartości kwasu szczawiowego w ogonkach liściowych rabarbaru nie pozwala na wytworzenie ogonków liściowych o obniżonej zawartości kwasu szczawiowego w formie użytecznej dla przemysłu spożywczego tj. świeżej, nieprzetworzonej.

Znane ze stanu techniki sposoby obniżania zawartości kwasu szczawiowego wiążą się z zastosowaniem metod bezpowrotnie zmieniających pozostałe właściwości ogonków liściowych co w znacznym stopniu ogranicza ich dalsze wykorzystanie. Wszystkie znane ze stanu techniki sposoby redukcji zawartości kwasu szczawiowego w ogonkach liściowych rabarbaru wykluczają ich wykorzystanie do bezpośredniego spożycia w stanie świeżym. Po zastosowaniu tych metod nie ma możliwości pozyskania soku rabarbarowego, który jest tłoczony na świeżo i wykorzystywany w przemyśle spożywczym. Ponadto znane sposoby redukcji zawartości kwasu szczawiowego ograniczają wykorzystanie rabarbaru w farmacji.

Celem wynalazku jest uzyskanie ogonków liściowych rabarbaru ogrodowego w postaci świeżej, nieprzetworzonej, o obniżonej zawartości kwasu szczawiowego. Dalszym celem wynalazku jest zapewnienie takiego sposobu redukcji kwasu szczawiowego aby zebrane ogonki liściowe w czasie przechowywania zachowały zmienione właściwości.

Zaproponowany sposób pozbawiony jest wad metod stosowanych dotychczas do obniżania zawartości kwasu szczawiowego. W wyniku zastosowania sposobu według wynalazku produkowane są ogonki liściowe rabarbaru o obniżonej zawartości kwasu szczawiowego, w postaci świeżej, nieprzetworzonej, nadającej się do wykorzystania w przemyśle spożywczym i farmacji. Problemem technicznym jaki rozwiązuje wynalazek jest zatem zapewnienie sposobu obniżenia zawartości kwasu szczawiowego w ogonkach liściowych rabarbaru, przy zachowaniu zebranych części rośliny w stanie nieprzetworzonym. Sposób pozwala na uniknięcie destrukcyjnych procesów, które wprawdzie pozwalają na obniżenie zawartości kwasu szczawiowego lecz jednocześnie prowadzą do utraty korzystnych składników bioaktywnych.

Przedmiotem wynalazku jest sposób obniżania zawartości kwasu szczawiowego w ogonkach liściowych rabarbaru charakteryzujący się tym, że przed planowanym zbiorem

ogonków liściowych rabarbaru poddaje się roślinę rabarbaru ozonowaniu w atmosferze gazowego ozonu o stężeniu 10 ppm przez 1 do 5 minut, następnie pozostawia się roślinę w podłożu na okres 24-48 godzin celem przeprowadzenia procesów metabolicznych. Planowany zbiór korzystnie prowadzi się wtedy gdy następuje „dojrzałość zbiorcza” rośliny.

Korzystnie ozonowanie prowadzi się przez 5 minut.

Korzystnie po ozonowaniu pozostawia się rośliny w podłożu na okres 24 godzin celem przeprowadzenia procesów metabolicznych.

Korzystne są parametry ozonowania: stężenie 10 ppm i czas ekspozycji roślin na działanie ozonu 1 minuta. Również korzystne są parametry ozonowania: stężenie 10 ppm i czas ekspozycji roślin na działanie ozonu 3 minut. Również korzystne są parametry ozonowania: stężenie 10 ppm i czas ekspozycji roślin na działanie ozonu 5 minut. Dla znawcy jest oczywiste, że czasy ekspozycji pomiędzy 1 minutą a 5 minutami również będą realizować cel wynalazku. Zakres stężenia 10 ppm należy traktować jako przybliżony z dokładnością +/- 1 ppm.

Sposób według wynalazku nie jest oczywisty, ponieważ opisano w literaturze fitotoksyczny wpływ ozonu troposferycznego na ekosystemy i rośliny uprawne [Schaub M, Skelly JM, Zhang JW, Ferdinand JA, Savage JE, Stevenson RE, Davis DD, Steiner K. Physiological and foliar symptom response in the crowns of *Prunus serotina*, *Fraxinus americana* and *Acer rubrum* canopy trees to ambient ozone under field conditions. *Environmental Pollution*; 133(3); 553-67, 2005; Zapletal M., Cudlín P., Chroust P., Urban O., Pokorný R., Edwards-Jonášová M., Czerný R., Janouš D., Taufarová K., Večeřa Z., Mikuška P., Paoletti E. Ozone flux over a Norway spruce forest and correlation with net ecosystem production. *Environmental Pollution*; 159; 1024–1034, 2011]. Znawcy pracujący w dziedzinie techniki wynalazku mogą być zatem zniechęceni do stosowania tego środka na rośliny. Stan techniki ujawnia, że ozon może być zastosowany do zwiększania zawartości wybranych związków bioaktywnych. Na przykład jak ujawniono w pracy [Zardzewiały, M.; Matlok, N.; Piechowiak, T.; Gorzelany, J.; Balawejder, M. Ozone Treatment as a Process of Quality Improvement Method of Rhubarb (*Rheum rhaponticum* L.) Petioles during Storage. *Appl. Sci.* 10, 8282, 2020] zastosowanie ozonu zwiększa trwałość przechowalniczą zebranych ogonków liściowych rabarbaru oraz zwiększa zawartość wybranych związków bioaktywnych jak i obniża obciążenie mikrobiologiczne. Efekt ten wywołany jest poprzez modyfikację metabolizmu zebranych ogonków liściowych.

Zaskakujące okazało się, że stosując gazowy ozon w kontrolowanych warunkach tj. jednorazowo stosując zabieg ozonowania na roślinach przy określonych parametrach w okresie produkcyjnym nie zaobserwowano fitotoksycznego efektu w postaci widocznych nekroz na powierzchni liści a analiza zebranego surowca wykazała, że po typowym okresie przechowywania ogonki liściowe wykazywały znacznie obniżony poziom kwasu szczawowego w porównaniu do kontroli. Należy zauważyć, że ozon stosuje się w sposobie według wynalazku w relatywnie wysokim stężeniu, jednak wbrew ogólnej wiedzy znawcy ozon nie wpłynął negatywnie na uprawę rabarbaru. Co więcej, po przeprowadzeniu sposobu według wynalazku zamiast spodziewanego wzrostu zawartości substancji bioaktywnej zaobserwowano spadek zawartości niekorzystnej substancji bioaktywnej w rabarbarze.

Wyniki sposobu według wynalazku pokazano na rysunku, gdzie Fig. 1. przedstawia diagram zawartości kwasu szczawowego w ogonkach liściowych rabarbaru ogrodowego w zależności od zastosowanej dawki ozonu w czasie przechowywania w warunkach chłodniczych dla prób i kontroli.

Obniżenie zawartości kwasu szczawowego w ogonkach liściowych rabarbaru prawdopodobnie przebiega w wyniku następującego mechanizmu. Ozon jako silny utleniacz może wpływać na poziom tego kwasu poprzez jego bezpośrednie utlenienie ale bardziej prawdopodobne jest działanie poprzez modyfikację metabolizmu roślin. Stosowanie niższego niż 1 ppm stężenia gazowego ozonu nie przynosi pożądanego efektu (jak w przykładzie 2), natomiast stosowanie wyższych niż 50 ppm skutkuje efektem fitotoksycznym (jak w przykładzie 3 - nie badano kwasu szczawowego gdyż uszkodzono liście). Dłuższe czasy ozonowania niż 5 min przy stężeniu ozonu 10 ppm wywoływały występowanie nekroz roślin.

Sposób według wynalazku możliwy jest w relatywnie łatwy sposób do zastosowania przez rolnika. Generatory ozonu dostępne są w sprzedaży. Osłonę na roślinę celem uzyskania zadanego stężenia ozonu może stanowić dowolna osłona o umiarkowanej gazoszczelności ograniczająca nadmierne ruchy gazu.

Poniższe przykłady prezentują działanie wynalazku. Pokazano w nich dla przykładowych warunków prowadzenia sposobu wpływ ozonu na zawartość kwasu szczawowego w ogonkach liściowych rabarbaru (przykład 1). Pokazano również, że w niższym jak i w wyższym stężeniu niż optymalnie wybrane – 10 ppm, przeprowadzenie ozonowania nie realizuje celu wynalazku, tj. obniżenia zawartości w ogonkach liściowych rabarbaru kwasu szczawowego (przykład 2 i 3).

Zaobserwowano, iż zaraz po poddaniu roślin rabarbaru działaniu gazowego ozonu nie notuje się natychmiastowej zmiany w ilości kwasu szczawiowego. Dopiero pozwolenie roślinie na przeprowadzenie procesów metabolicznych skutkuje obserwacją zmian w stężeniu kwasu szczawiowego. Ustalono eksperymentalnie, iż optymalne jest pozostawienie roślin w podłożu po ozonowaniu na 24h do 48h, po którym to czasie następuje spadek zawartości kwasu szczawiowego w rabarbarze. Zatem dopiero po tym czasie zebrane ogonki liściowe winny być zebrane i przekazane do chłodni. Korzystnie jest to czas 24h.

Przykład 1

W trakcie wegetacji całe rośliny rabarbaru ogrodowego umieszczono w komorze do ozonowania (osłona foliowa), o wymiarach 150x150x100 cm. Komorę do ozonowania nakładano na rośliny i za pomocą gumowego węża doprowadzano strumień ozonu z generatora Korona L5 Zdrowa Żywność. Stężenie ozonu kontrolowano czujnikiem ozonu 106M Ozone Solution. Proces ozonowania prowadzono przez 1, 3 lub 5 minut utrzymując stężenie ozonu na poziomie 10 ppm. Po zakończonym procesie ozonowania roślin rabarbaru komorę usuwano i w ten sposób niwelowano atmosferę ozonu z okolic rośliny. Roślinę pozostawiono w gruncie celem umożliwienia przeprowadzenia procesów metabolicznych. Zbioru ogonków liściowych dokonano po 24 godzinach. Przeprowadzono badanie zawartości kwasu szczawiowego w ogonkach liściowych rabarbaru.

Materiał do badań stanowiły ogonki liściowe Rabarbaru ogrodowego (*Rheum rhaponticum* L.) odmiany Malinowy, pochodzące z pierwszego zbioru wykonanego 25 maja 2022 roku. Do badań przeznaczono ogonki liściowe rabarbaru o długości powyżej 20 cm i minimalnej szerokości w połowie długości powyżej 2 cm.

Oznaczenie zawartości kwasu szczawiowego

Na wadze technicznej odważono 5 g ogonków liściowych rabarbaru. Zalano 50 ml wrzącej destylowanej wody i odczekano 10 minut. Następnie napar przesączono, 5 ml naparu przeniesiono do probówki wirówkowej o poj. 10 ml. Dodano 2 ml 5% roztworu CaCl_2 i 2 ml acetonu, następnie wymieszano. Wstawiono przygotowane próbki do lodówki na 30 min. Powstały osad szczawianu wapnia odwirowano w wirówce przy 4000 obr./min. przez 15 min. Płyn z nad osadu zlano, a osad przeniesiono ilościowo do kolby stożkowej o pojemności 50 ml za pomocą 5 ml 10% kwasu siarkowego i rozpuszczono na gorąco w łaźni wodnej.

Miareczkowano natychmiast (na gorąco) 0,02 N roztworem nadmanganianu potasowego do uzyskania różowej barwy, utrzymującej się ok. 1 min. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono ilość rozpuszczalnego kwasu szczawiowego w 100 g produktu przyjmując, że 1 ml 0,02 N KMnO_4 odpowiada 0,9 mg $(\text{COOH})_2$ [Dżugan M., Pasternakiewicz A. Ćwiczenia laboratoryjne z chemii żywności, Wyd. Uniwersytetu Rzeszowskiego, Rzeszów 2010].

Tabela 1. Zawartość kwasu szczawiowego w ogonkach liściowych rabarbaru ogrodowego 24 h po procesie ozonowania.

Warunki ozonowania	Zawartość kwasu szczawiowego w ogonkach liściowych rabarbaru [$\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$]
Kontrola (brak ozonowania)	368 ± 11
10 ppm, 1 minuta	347 ± 17
10 ppm, 3 minuty	271 ± 21
10 ppm, 5 minut	252 ± 23

Z wyników pokazanych w tabeli 1 wynika, że w wyniku przeprowadzenia sposobu według wynalazku nastąpiło obniżenie zawartości kwasu szczawiowego w ogonkach liściowych rabarbaru względem kontroli.

W celu stwierdzenia długofalowości skuteczności zabiegu, pobrane po 24 godzinach od ozonowania próbki do badań umieszczone zostały w komorze chłodniczej w temperaturze $1 \text{ }^\circ\text{C}$. Wykonano oznaczenie zawartości kwasu szczawiowego po 24, 72, 120 godzinach od umieszczenia ogonków liściowych w chłodni. Wyniki pokazano na Fig. 1.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów: badanie zawartości kwasu szczawiowego w ogonkach liściowych rabarbaru po 24 godzinach od przeprowadzenia ozonowania (tabela 1) oraz badanie zawartości kwasu szczawiowego w ogonkach liściowych rabarbaru po 24 godzinach od przeprowadzenia ozonowania a następnie po umieszczeniu w chłodni (Fig. 1), stwierdzono, że ozonowanie o stężeniu 10 ppm w czasie 1, 3 i 5 minut wpłynęło korzystnie na badany parametr surowca, tj. obniżeniu uległa zawartość kwasu szczawiowego w ogonkach liściowych rabarbaru.

Obniżenie nie tylko nastąpiło po 24 h od ozonowania ale też obniżona zawartość kwasu szczawiowego utrzymywała się podczas przechowywania typowego dla rabarbaru czyli w chłodni. Fig. 1 pokazuje, że najkorzystniej działała dawka ozonu o stężeniu 10 ppm w czasie 5 minut i obniżyła średnio zawartość kwasu szczawiowego w ogonkach liściowych rabarbaru o 35,5% w porównaniu do kontroli. Dawka ozonu 10 ppm stosowana przez 1 minutę obniżyła zawartość badanego kwasu w analizowanym surowcu średnio o 8% w porównaniu do kontroli. Z kolei fumigacja ozonem o stężeniu 10 ppm przez 3 minuty zredukowała ilość kwasu szczawiowego średnio o 29% w stosunku do kontroli.

Przykład 2

W trakcie wegetacji całe rośliny rabarbaru ogrodowego umieszczono w komorze do ozonowania (osłona foliowa) o wymiarach 150x150x100 cm. Komorę do ozonowania nakładano na rośliny i za pomocą gumowego węża doprowadzano strumień ozonu z generatora Korona L5 Zdrowa Żywność. Stężenie ozonu kontrolowano czujnikiem ozonu 106M Ozone Solution. Proces ozonowania prowadzono przez 1, 3 lub 5 minut utrzymując stężenie ozonu na poziomie 1 ppm. Po zakończonym procesie ozonowania komorę usuwano i w ten sposób niwelowano atmosferę ozonu z okolic rośliny. Roślinę pozostawiono w gruncie celem umożliwienia przeprowadzenia procesów metabolicznych. Zbioru ogonków liściowych dokonano po 24 godzinach. Przeprowadzono badanie zawartości kwasu szczawiowego w ogonkach liściowych rabarbaru.

Materiałem do badań były ogonki liściowe Rabarbaru ogrodowego (*Rheum rhaponticum* L.) odmiany Malinowy przygotowane jak w przykładzie 1. Zawartość kwasu szczawiowego badano jak w przykładzie 1.

Tabela 2. Zawartość kwasu szczawiowego w ogonkach liściowych rabarbaru ogrodowego 24 h po procesie ozonowania.

Warunki ozonowania	Zawartość kwasu szczawiowego w ogonkach liściowych rabarbaru [mg 100 g ⁻¹]
Kontrola (bez ozonowania)	372 ± 15
1 ppm, 1 minuta	379 ± 18
1 ppm, 3 minuty	375 ± 22

1 ppm, 5 minut	380 ± 19
----------------	----------

Z wyników pokazanych w tabeli 2 wynika, że przy przeprowadzenia sposobu analogicznego jak według wynalazku ale w warunkach niskiego stężenia ozonu (1 ppm) podczas ozonowania roślin rabarbaru, nie nastąpiło obniżenie zawartości kwasu szczawowego w ogonkach liściowych rabarbaru względem kontroli.

W celu stwierdzenia długofalowości skuteczności zabiegu, pobrane po 24 godzinach od ozonowania próbki do badań umieszczone zostały w komorze chłodniczej w temperaturze 1 °C. Wykonano oznaczenie zawartości kwasu szczawowego po 24, 72, 120 godzinach od umieszczenia ogonków liściowych w chłodni. Nie obserwowano zmian zawartości kwasu szczawowego w tych próbkach.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów: badanie zawartości kwasu szczawowego w ogonkach liściowych rabarbaru po 24 godzinach od przeprowadzenia ozonowania (tabela 2) oraz badanie zawartości kwasu szczawowego w ogonkach liściowych rabarbaru po 24 godzinach od przeprowadzenia ozonowania a następnie po umieszczeniu w chłodni (nie pokazano), nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości kwasu szczawowego w ogonkach liściowych rabarbaru ogrodowego po zastosowaniu procesu ozonowania w porównaniu do próby kontrolnej.

Przykład 3

W trakcie wegetacji całe rośliny rabarbaru ogrodowego umieszczono w komorze do ozonowania (osłona foliowa) o wymiarach 150x150x100 cm. Komorę do ozonowania nakładano na rośliny i za pomocą gumowego węża doprowadzano strumień ozonu z generatora Korona L5 Zdrowa Żywność. Stężenie ozonu kontrolowano czujnikiem ozonu 106M Ozone Solution. Proces ozonowania prowadzono przez 1, 3 lub 5 minut utrzymując stężenie ozonu na poziomie 50 ppm. Po zakończonym procesie ozonowania roślin rabarbaru komorę usuwano i w ten sposób niwelowano atmosferę ozonu z okolic rośliny. Roślinę pozostawiono w gruncie celem umożliwienia przeprowadzenia procesów metabolicznych. Nie dokonano zbioru ogonków liściowych, ponieważ po 24 godzinach od ozonowania stwierdzono występowanie nekroz uniemożliwiających pozyskanie materiału do badań.