

»Mladi za napredek Maribora 2013«

30. srečanje

**SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČANJE LIKOPENA V PLODOVIH  
PARADIŽNIKA (*S. LYCOPERSICUM*) TREH RAZLIČNIH HIBRIDOV:  
DASHER F1, BOLZANO F1 IN KENTARO F1**

Raziskovalno področje: biotehnologija, kmetijstvo, živilstvo

(raziskovalna naloga)

0,5 d | KOSOPÁSÜORP Ô  
T ^} d | KÖÜP ÖÜÖZÖXÖVCSÊŠWÔRÁT ÖRP ÔP Q  
¥[ | KÖÖQ PZÖRÁT ÖÜ ÖÜ

Maribor, februar 2013

»Mladi za napredek Maribora 2013«

30. srečanje

**SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČANJE LIKOPENA V PLODOVIH  
PARADIŽNIKA (*S. LYCOPERSICUM*) TREH RAZLIČNIH HIBRIDOV:  
DASHER F1, BOLZANO F1 IN KENTARO F1**

Raziskovalno področje: biotehnologija, kmetijstvo, živilstvo

(raziskovalna naloga)

PROSTOR ZA NALEPKO

Maribor, februar 2013

## POVZETEK

Namen moje raziskave je bil ugotoviti, kako se koncentracija likopena spreminja v plodovih paradižnika v času zorenja – od julija do septembra 2012. Primerjal sem tri različne hibride paradižnika: Kentaro F1, Bolzano F1 in Dasher F1, ki sem jih gojil na domačem vrtu. Zanimalo me je, koliko likopena vsebujejo sveži plodovi omenjenih kultivarjev paradižnika, in kako se vsebnost le-tega spreminja v času zorenja. Zelo pomemben dejavnik pri dozorevanju plodov je vreme. Količino likopena sem določal s spektrofotometrično metodo po Sadlerju (1990). Metodo sem nekoliko modificiral in jo prilagodil raziskavi. Likopen sem ekstrahiriral z mešanico etanola, acetona in heksana v razmerju 1:1:2 v/v. Analiza rezultatov je pokazala, da količina likopena variira med hibridi. Največ likopena vsebujeta kultivarja Kentaro F1 in Dasher F1, najmanj pa kultivar Bolzano F1. Količina likopena je bila najmanjša v začetku julija in največja v začetku septembra. Likopen se v plodovih večinoma nahaja v sočnem tkivu, nekaj pa ga je tudi v celičnih stenah. Rezultati raziskave kažejo na to, da se količina likopena v plodovih paradižnikov spreminja skozi celo dobo zorenja in variira tudi med kultivarji.

## ZAHVALE

Iskreno se želim zahvaliti obema mentoricama,  
za pomoč in nasvete pri nastajanju te raziskovalne naloge.

Zahvaljujem se tudi svojima profesoricama biologije in kemije  
za dodatne nasvete pri pisanju naloge.

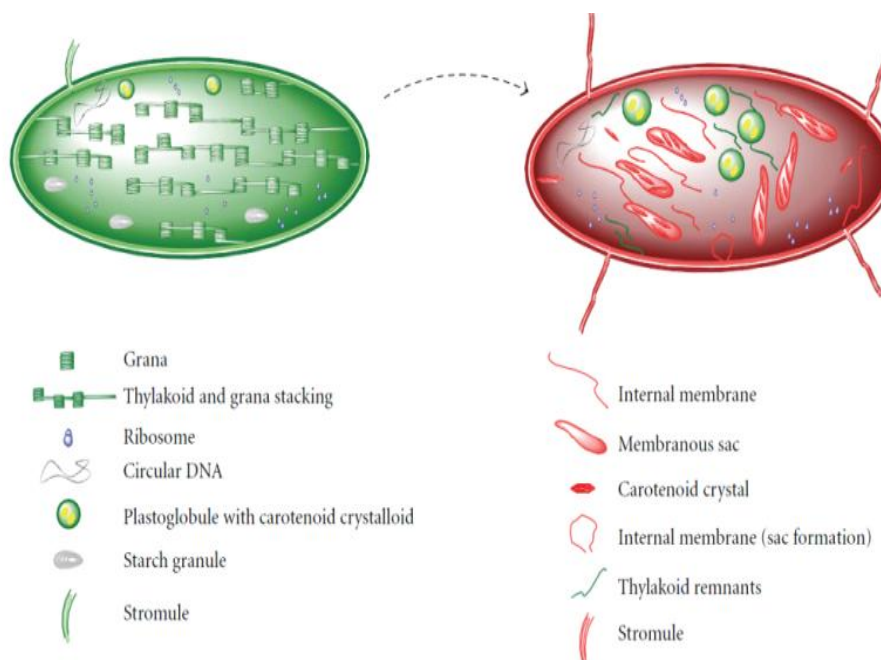
# KAZALO

<b>1 UVOD .....</b>	<b>6</b>
1.1 Raziskovalno vprašanje in hipoteze .....	8
<b>2 MATERIALI IN METODA .....</b>	<b>9</b>
2.1 Rastlinski materiali in pogoji za gojenje vzorcev paradižnika .....	9
2.2 Kemikalije .....	10
2.3 Pripomočki .....	11
<b>3 RAZVOJ METODE .....</b>	<b>12</b>
<b>4 EKSPERIMENTALNI DEL.....</b>	<b>15</b>
4.1 Priprava topila za ekstrakcijo in označevanje erlenmajeric .....	15
4.2 Priprava homogenatov iz plodov paradižnika .....	15
4.3 Tehtanje homogenatov .....	16
4.4 Postopek ekstrakcije likopena (Sadler, 1990) .....	16
4.5 Spektrofotometrična analiza ekstraktov z likopenom .....	18
<b>5 REZULTATI.....</b>	<b>18</b>
<b>7 ZAKLJUČEK.....</b>	<b>26</b>
<b>8 PRILOGE .....</b>	<b>28</b>
<b>9 VIRI IN LITERATURA .....</b>	<b>31</b>

# 1 UVOD

Paradižnik je zelo pomemben del prehrane Slovencev. Gojijo ga skoraj v vsakem vrtu. Sadijo različne kultivarje, ki se med seboj razlikujejo po barvi in velikosti plodov ter vsebnosti likopena. Tudi sam sem v sezoni 2012 gojil tri kultivarje hibridnega paradižnika: Dasher F1, Kentaro F1 in Bolzano F1. Znano je, da je rdeča barva paradižnikov povezana s koncentracijo karotenoida likopena, ki je v novejših raziskoval pokazal pozitivne učinke na človekovo zdravje. Likopen je nenasičen karotenoid, ki vsebuje 11 konjugiranih in 2 nekonjugirani dvojni vezi. Nahaja se v določenem sadju in zelenjavi. Likopen je topen v maščobah (Sandmann, 1994) in je vzrok za rdečo obarvanost paradižnikov, lubenic, rdečih grenivk in drugega sadja in zelenjave. Likopen je znan kot karotenoid z izjemno visoko antioksidantsko aktivnostjo in je v primerjavi z  $\beta$ -karotenom dvakrat močnejši (Di Mascio et al, 1989).

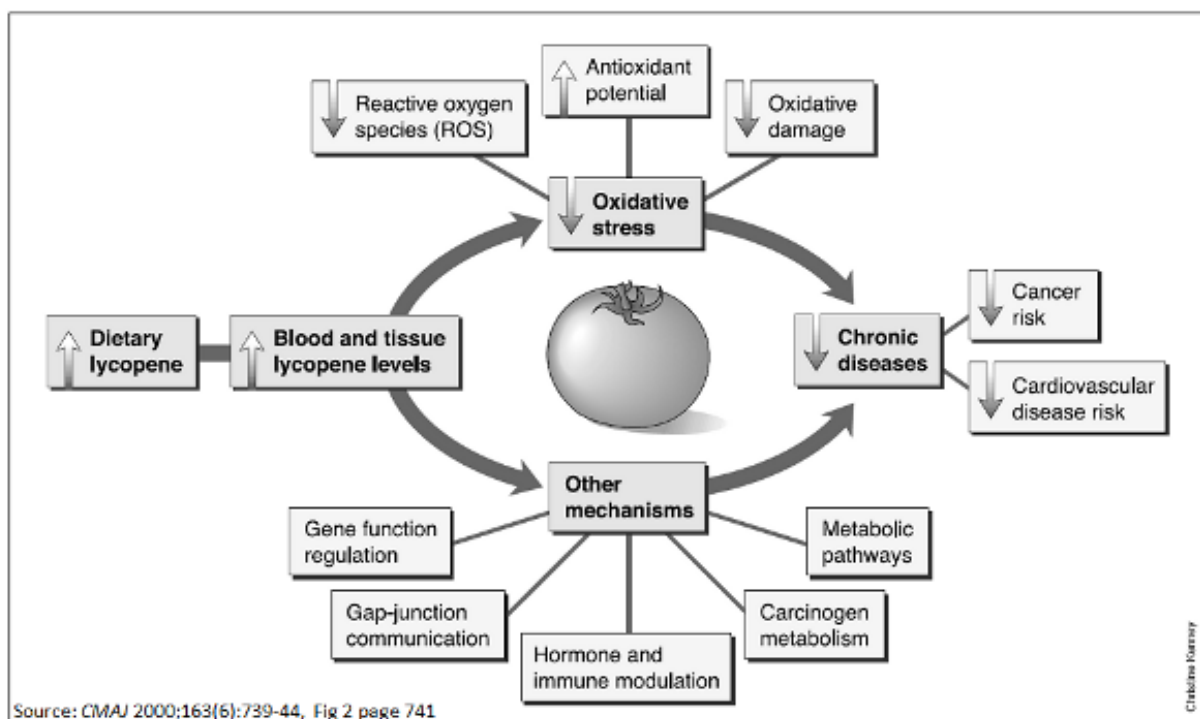
Biosinteza likopena narašča od začetka dobe zorenja, ko se kloroplasti začnejo preoblikovati v kromoplaste (Kirk in Tilney-Bassett, 1978). Kromoplasti so plastidi, v katerih fotosinteza ne poteka, akumulirajo pa karotenoide in rastlinskim organom dajejo žive barve (Bathgate et al, 1985).



Slika 1: Shematska predstavitev sprememb, ki potekajo med preoblikovanjem kloroplasta – levo, v kromoplast – desno [Fielding et al, 2005]

Agarvalova raziskava iz leta 1998 je pokazala, da obdelava paradižnika poveča biodosegljivost likopena s povečanjem površine, ki je na voljo za prebavo v človekovem telesu. V svežih plodovih paradižnika je precej likopena ujetega v tkivu ploda v celičnih stenah, zato ob zaužitju le-tega človeško telo lahko absorbira likopen, ki je dosegljiv v sočnem tkivu. Termična ali mehanska obdelava poškoduje celične stene, posledično pa se tako sprosti tudi likopen, ki je ujet znotraj celičnih sten (Fielding et al, 2005).

Po prebiranju strokovnih člankov sem se odločil, da bom količino likopena v paradižnikih iz domačega vrta določil s pomočjo spektrofotometrične metode. Po posvetu z mentorico sem izbral metodo po Sadlerju iz leta 1990, saj je bilo mogoče pridobiti vse materiale zanjo, zdela pa se je tudi najbolj hitra in natančna. Metoda temelji na ekstrakciji likopena iz homogeniziranega paradižnika s pomočjo mešanice organskih topil – etanola, acetona in heksana v razmerju 1:1:2 v/v. Ekstrakt likopena, ki sem ga pridobil po tej ekstrakciji sem prelil v kiveto in izmeril absorbanco vzorca pri valovni dolžini 503nm. Absorbanca likopena pri tej valovni dolžini je karakteristična samo za likopen raztopljen v heksanu, in zato je možnost, da bi pri merjenju absorbance na rezultat vplivala še prisotnost kakšnega drugega karotenoida (Fish et al, 2002).



Slika 2: Možni učinki likopena na človekovo zdravje (Pridobljeno 26. 12. 2012 iz: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043452606510022>)

## 1.1 Raziskovalno vprašanje in hipoteze

### Raziskovalno vprašanje:

Koliko likopena je v plodovih paradižnika in kako vsebnost le-tega variira v plodovih treh hibridnih kultivarjev paradižnika (*Solanum lycopersicum*): Kentaro F1, Bolzano F1 in Dasher F1 v času dobe zorenja, od 13. julija do 11. septembra 2013?

### Hipoteze:

H1: Pojavile se bodo razlike v koncentraciji likopena (mg/kg) prisotnega v plodovih paradižnika, saj bomo preučevali tri različne kultivarje.

H2: Kultivar Bolzano F1 ima rumeno-oranžne plodove. Znano je, da je vsebnost likopena povezana s prisotnostjo rdeče barve plodu. Z ozirom na to dejstvo lahko predpostavimo, da bodo vzorci kultivarja Bolzano F1 vsebovali manj likopena kot pri kultivarjih Kentaro F1 in Dasher F1, ki imata rdeče plodove.

H3: Vsebnost likopena v vzorcih paradižnikov bo naraščala od julija do septembra, nato pa bo padla (konec zoritvene dobe).



## 2 MATERIALI IN METODA

### 2.1 Rastlinski materiali in pogoji za gojenje vzorcev paradižnika

Vse meritve so bile izvedene v času od julija 2012 do septembra 2012 v laboratorijih farmacevtskega podjetja Marifarm d.o.o. Plodove, ki sem jih uporabil v svoji raziskavi sem gojil sam, na lastnem vrtu. Sadike kultivarjev so bile kupljene v lokalni kmetijski zadrugi in posajene v začetku maja 2012. Rastline so bile zaščitene pred soncem in točo z zaščitno mrežo ter zalite vsak dan. V lanski sezoni so na našem vrtu rastle trije kultivarji paradižnika, vsi hibridi prve filialne generacije. <sup>1</sup>



Slika 3: Paradižniki na mojem vrtu (vir: lasten)

<sup>1</sup> Na zgornji sliki je predstavljeno okolje, v katerem so paradižniki rastle. S črko A sem označil kultivar Kentaro F1, rdeč Japonski koktejl paradižnik s sladkimi plodovi; B označuje kultivar Bolzano F1, mesnati paradižnik z rumeno-oranžnimi plodovi; C predstavlja kultivar Dasher F1, ki ima podolgovate, sladke rdeče plodove.

Tabela 1: Najvišja, najnižja in povprečna dnevna temperatura in povprečna relativna vlažnost za vsak dan, ko smo nabrali plodove za spektrofotometrično analizo<sup>2</sup>

Dan obiranja plodov	Najvišja temperatura (°C) ± 1°C	Najnižja temperatura (°C) ± 1°C	Povprečna dnevna temperatura (°C) ± 1°C	Povprečna relativna vlažnost (%) ± 1%
16. julij	22.4	13.4	16.9	66
30. julij	26.8	16.4	21.0	67
13. avgust	25.4	13.7	19.9	54
27. avgust	24.9	13.7	18.2	53
11. september	29.8	14.8	21.5	65

Za vsako ekstrakcijo sem obral 5 zrelih plodov vsakega kultivarja, ki so bili podobno veliki. V raziskavo sem vključil samo popolnoma zrele vzorce, pri determinaciji zrelosti plodu, pa sem si pomagal z Ameriško lestvico določevanja zrelosti paradižnika: *“Color classification requirement in United States standards for grades of fresh tomatoes chart”*, ki jo je objavil Ameriški državni oddelek za agrikulturo leta 1975 (priloga 2).

## 2.2 Kemikalije<sup>3</sup>

- n-heksan, čistost: ≥99% (GC)
- etanol absolute, čistost: ≥99.8% (GC)
- aceton, čistost: ≥99.9%

<sup>2</sup> Povprečne temperature med dvema ekstrakcijama so lahko določene s pomočjo grafov iz priloge 1.

<sup>3</sup> Vsi navedeni reagent so bili kupljeni pri podjetju Sigma-Aldrich in so bili analitične čistosti.

## 2.3 Pripomočki

- plodovi paradižnika kultivarjev: Kentaro F1, Bolzano F1, Dasher F1
- destilirana voda
- 15 epruvet (20 ml) v stojalu
- pipeta (10ml  $\pm$  0.02mL)
- pipeta (15ml  $\pm$  0.06mL)
- Pasteurjeve pipete (5 ml and 10mL)
- 15 erlenmajeric (250mL) z zamaški
- 3 čase (100mL)
- steklenica (2000mL) z zamaškom
- merilni valj (1000 mL  $\pm$  5mL)
- 2 merilna valja(500 mL  $\pm$  2mL)
- merilni valj (100mL  $\pm$  1mL)
- natančna tehtnica Mettler Toledo XS20002S/M ( $\pm$ 0.01g)
- terilnica in pestilo
- laboratorijski mešalec (IKA RS 10 Basic)
- homogenizator (Retsch Grindomix GM 200)
- centrifuga (Tehtnica Železniki, LC – 320)
- UV-Vis spektrofotometer (Perklin Elmer: Lambda 25)
- UV-Vis spektroskopske celice (Perklin Elmer)
- računalnik s programom UV-Win Lab
- parafilm
- nož
- deska za rezanje

### 3 RAZVOJ METODE

#### *a) Kako je bila originalna metoda modificirana?*

Po prebiranju strokovne literature sem se odločil, da bom opisan namen raziskovalne naloge najlažje dosegel s postopkom ekstrakcije likopena iz paradižnika po Sadlerju (1990). Ko sem preučil omenjeni eksperiment, sem opazil pomanjkljivosti v originalni metodi, zato sem sam omenjeno metodo modificiral in jo nekoliko prilagodil svoji raziskavi, da bi bili končni rezultati čim natančnejši. Formule za izračun vsebnosti likopena v ekstraktih (mg/kg sveže teže) sem izpeljal po metodi Marie Perez et al, 2008.

Že na samem začetku eksperimenta sem naletel na težavo. V originalni metodi so količino homogenata paradižnika, potrebnega za ekstrakcijo odpipetirali v erlenmajerice s pomočjo mikro pipete. Ker so bili plodovi, ki sem jih vključil v raziskavo, sorazmerno majhni, je homogenizacija predstavljala velik izziv. Kljub homogenizaciji pri najvišji hitrosti so bili v vzorcih še vedno prisotni večji delci, zato sem le-te dodatno ročno homogeniziral s pomočjo terilnice in pestila. Ker je bil vzorec tudi po tem še vedno pregost, da bi ga odmeril s pipeto, sem se odločil za alternativno pot, za odmerjanje količine homogenata s pomočjo tehtnice. Količino vzorca za ekstrakcijo sem natehtali in zapisali mase.

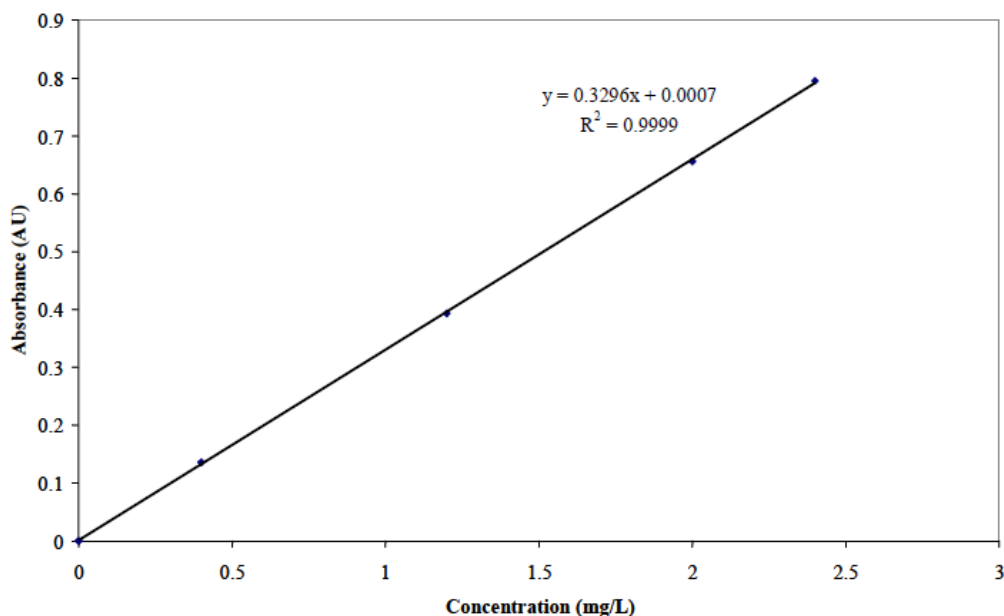
Med ekstrakcijo smo z laboratorijskim stresalnikom 10 minut stresali mešanice v zaprtih erlenmajericah pri hitrosti 150 Mot/min, da bi se ves prisoten likopen raztopil v topilu. Ker smo kasneje po standardnem postopku ekstrakcije morali dodati vodo, da smo ločili polarne in nepolarne plasti, sem se odločil, da ponovim stresanje pri isti hitrosti ponovno za 10 minut, da bodo faze popolnoma ločene.

Metoda po Sadlerju iz leta 1990 predvideva uporabo nerazredčenega homogenata paradižnikov. Ker sem sledil temu navodilu, je obstajalo tveganje, da bo po ekstrakciji v vzorcu za spektrofotometer še vedno prisoten kakšen droben košček. Ker bi ravno ti koščki lahko vplivali na absorbanco vzorca, sem pred uporabo ekstraktov za spektrofotometrično analizo le-te centrifugiral pri hitrosti 3000 vrtljajev/min dodatnih 5 minut. Za spektrofotometer sem uporabil le zgornje 3 cm iz centrifugirane epruvete.

Da bi dobil natančne rezultate, sem se odločil, da bom naredil 5 paralel za vsak kultivar, da bom vsak vzorec spektrofotometrično izmeril trikrat. Čisto na koncu sem se odločil, da bom svoje rezultate primerjal z reprezentativno kalibracijsko krivuljo pridobljeno iz strokovne literature, da bom lahko določil natančnost svoje metode.

*b) Izpeljava formul za določitev vsebnosti likopena v mg/kg*

Količino likopena v paradižniku (mg/kg) je mogoče določiti na dva načina – z uporabo eksperimentalnih podatkov ali s teoretično metodo, ki za določitev uporablja kalibracijsko krivuljo in Beer-Lambertov zakon. Da bom lahko svoje rezultate primerjal s teoretičnimi vrednostmi, bom uporabil kalibracijsko krivuljo, pridobljeno iz raziskave Marie Perez et al (2008).



Graf 1: Kalibracijska krivulja likopena – absorbanca pri 503 nm v odvisnosti od koncentracije likopena v heksanu ( $\text{mgL}^{-1}$ )

Visok korelacijski koeficient ( $R^2 = 0.9999$ ) označuje veliko, skoraj stoo odstotno natančnost te standardne krivulje in nam omogoča natančno izpeljavo formul za izračun vsebnosti likopena s pomočjo Beer-Lambertovega zakona.

Najprej moramo poznati molarni ekstinkcijski koeficient likopena v heksanu, ki ima vrednost  $17.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Maria Perez et al, 2008).

Nato s pomočjo Beer-Lambertovega zakona sledi :

$$\text{Absorbanca pri 503nm } (A_{503}) = \epsilon (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times b(\text{cm}) \times [\text{koncentracija likopena (M)}],$$

kjer je  $\epsilon$  molarni ekstinkcijski koeficient likopena v heksanu in  
b dolžina poti UV-svetlobe skozi kiveto.

Z upoštevanjem vrednosti  $\epsilon$  kot tudi z upoštevanjem vrednosti molekulske mase likopena, ki znaša  $536.9 \text{ g mol}^{-1}$  in z ureditvijo enot dobimo končno enačbo (eksperimentalno formulo), ki se glasi:

$$\text{Količina likopena (mg/kg)} = A_{503} \times 31.2 / \text{teža homogenata (g)}$$

Medtem ko zgornja enačba temelji na eksperimentalno pridobljenih podatkih, ki sem jih pridobil sam, lahko izpeljal tudi teoretično formulo z vnosom podatkov v Beer-Lambertovo enačbo:

$$\text{Količina likopena (mg/kg)} = (A_{503} - 0.0007) \times 30.3 / \text{teža homogenata (g)}$$

Uporaba obeh formul z istimi absorpcijskimi podatki omogoča evalvacijo metode in primerjavo eksperimentalne vrednosti s teoretičnimi.

## 4 EKSPERIMENTALNI DEL

### 4.1 Priprava topila za ekstrakcijo in označevanje erlenmajeric

Topilo, ki sem ga uporabil za ekstrakcijo likopena je bilo sestavljeno iz mešanice n-heksana, etanola in acetona v razmerju 2:1:1 v/v. Organska topila so bila zmešana v razmerju in bila shranjena v zamašeni steklenici do uporabe. Označil sem vse erlenmajerice in epruvete z imenom kultivarja in datumom. Pripravil sem 5 erlenmajeric in 5 epruvet za vsak kultivar, za vsako meritev.

### 4.2 Priprava homogenatov iz plodov paradižnika

Plodovi paradižnika so bil nabrani zjutraj, na dan izvajanja ekstrakcije. Ko sem obral 5 plodov posameznega kultivarja, sem jih dal v vrečko, katero sem označil z imenom paradižnikovega kultivarja. Enako sem storil tudi za ostala dva kultivarja in vse skupaj v hladilni torbi prinesel v laboratorij, kjer sem najprej pripravil čaše za homogenate ter jih označil. Sledila je homogenizacija. Plodove paradižnika sem na grobo narezal z nožem in jih stresel v homogenizator, ki jih je nato homogeniziral 3 minute pri  $10 \times 10^3$  obratih na minuto. Po treh minutah, sem homogenat prelil v pripravljeno čašo. Če so po homogenizaciji v homogenatu še vedno bili opazni večji koščki paradižnikov, sem le-tega dodatno homogenizirali s pomočjo terilnice in pestila. Postopek sem ponovil za vse tri kultivarje. Homogenate v čašah sem zaprl z parafilmom.



Slika 3: Homogenati paradižnikov v označenih čašah iz meritve 11. sept. 2012  
(vir: lasten)

### 4.3 Tehtanje homogenatov

Okrog 1.00 grama paradižnikovega homogenata je bilo stehtanega v pripadajočo 250 ml erlenmajerico. Natehtal sem 5 vzorcev za vsak kultivar ter erlenmajerice zaprl z zamaškom.



Slika 4: Natehtani homogenati kultivarja Kentaro F1 iz meritve 11. sept. 2012  
(vir: lasten)

### 4.4 Postopek ekstrakcije likopena (Sadler, 1990)

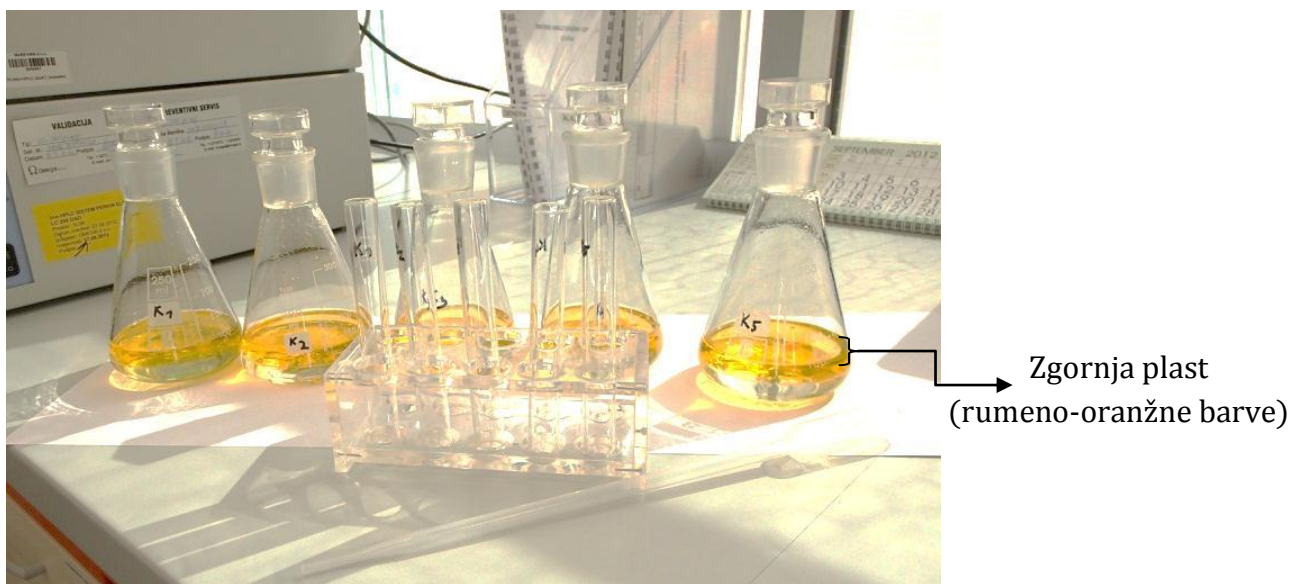
1. S pomočjo 100 ml merilnega valja sem dodal 100 ml pripravljene mešanice organskih topil v vsako erlenmajerico s homogenatom. Erlenmajerice sem tesno zaprl in jih s pomočjo laboratorijskega mešalnika stresal 10 min pri hitrosti 150 Mot/min. Ker so bili laboratoriji konstantno klimatizirani na 20°C, je bila temperatura okolice stalno kontrolirana.



Slika 5: Homogenati Kentaro F1 z topilom iz meritve 11. sept. 2012 (vir: lasten)



2. Nato sem s 15 ml pipeto vsebini homogenata in topil dodal 15 ml destilirane vode, da sem ločil faze med seboj. Erlenmajerice sem znova zamašil ter jih ponovno stresal 10 minut pri isti hitrosti.
3. Po desetih minutah sem erlenmajerice nežno prenesel na delovno mizo. Vzorce sem pustil stati približno 1 minuto, da se je vsebina nehala premikati. Med tem sem prinesel 15 ml Pasteurjeve pipete, ki sem jih uporabil za prenos likopenovega ekstrakta iz erlenmajerice v epruveto. Za nadaljnjo analizo sem uporabil zgornjo (oranžno) plast topil (mešanico likopena in heksana). Odpipetiral sem približno 15 ml vsebine zgornje plasti iz vsake erlenmajerice in jo prenesel v označeno epruveto. Posebej pozoren sem bil, da pri zajemanju vsebine s Pasteurjevo pipeto iz zgornje plasti, ne bi zajel še česar iz spodnje plasti. Za vsak prenos sem uporabil sveže pipete.



Slika 6: Vsebina pred prenosom ekstrakta zg. plasti iz meritve 11. sept. 2012 (vir: lasten)

4. Epruvete z ekstrakti sem dal v centrifugo za 5 minut pri 3000 vrtljajev/min, da sem morebitne delce, ki so bili še vedno prisotni spravil na dno vzorca v epruveti. Po centrifugiranju sem epruvete naložil v stojalo in jih prenesel k spektrofotometru.

#### 4.5 Spektrofotometrična analiza ekstraktov z likopenom

1. Najprej sem prižgal računalnik, in uporabil program UV-Win Lab ter vklopil spektrofotometer. Nato sem merilno napravo kalibriral po navodilih iz priročnika o uporabi<sup>4</sup> s pomočjo opcije »Auto-Zero«.
2. Po uspešni kalibraciji, je program vprašal po prvem vzorcu: »Please instert Kentaro F1 Sample 1«. S pomočjo 5 ml Pasteurjeve pipete sem odpipetiral približno 1 ml vzorca iz zgornje polovice prve epuvete z ekstraktom ter spral kiveto. Nato sem odpipetiral cca. 3 ml ekstrakta ter ga vstavil v kiveto, ki sem jo nato položil v spektrofotometer in izvedel meritev absorbance. Postopek sem ponovil pri vseh vzorcih.

## 5 REZULTATI

Tabela 2: Povprečna absorbanca likopena pri valovni dolžini 503 nm, mase vzorcev in eksperimentalno določena količina likopena prisotna v plodovih treh kultivarjev paradižnika 16. julija 2012

Kultivar	Ponovitev	POVPREČNA ABSORBANCA PRI 503nm ±0.003	MASA [grami] ± 0,01	KOLIČINA LIKOPENA [mg/kg sveže teže]
KENTARO	1	0,3075	1,17	8,20
	2	0,3532	1,29	8,54
	3	0,3236	1,06	9,52
	4	0,3072	1,02	9,40
	5	0,3329	1,07	9,71
BOLZANO	1	0,0481	1,34	1,12
	2	0,0477	1,52	0,98
	3	0,0315	1,06	0,93
	4	0,0362	1,10	1,03
	5	0,0668	1,24	1,68
DASHER	1	0,3673	1,09	10,51
	2	0,4321	1,31	10,29
	3	0,3768	1,05	11,19
	4	0,4023	1,14	11,01
	5	0,4931	1,23	12,50

<sup>4</sup> Pridobljeno 11. 1. 2013 iz URL naslova: [http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-136839TCH\\_Validating\\_UV\\_Visible.pdf](http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-136839TCH_Validating_UV_Visible.pdf)

Tabela 3: Povprečna absorbanca likopena pri valovni dolžini 503 nm, mase vzorcev in eksperimentalno določena količina likopena prisotna v plodovih treh kultivarjev paradižnika 30. julija 2012

Kultivar	Ponovitev	POVPREČNA ABSORBANCA PRI 503nm $\pm 0,003$	MASA [grami] $\pm 0,01$	KOLIČINA LIKOPENA [mg/kg sveže teže]
KENTARO	1	0,4550	1,09	13,02
	2	0,4442	1,08	12,83
	3	0,4203	1,03	12,73
	4	0,4996	1,17	13,32
	5	0,4881	1,15	13,24
BOLZANO	1	0,0448	1,04	1,34
	2	0,0455	1,05	1,35
	3	0,0618	1,02	1,89
	4	0,0423	1,04	1,27
	5	0,0450	1,03	1,36
DASHER	1	0,5458	1,03	16,53
	2	0,4985	1,05	14,81
	3	0,5622	1,02	17,19
	4	0,5460	1,05	16,22
	5	0,5714	1,11	16,06

Tabela 4: Povprečna absorbanca likopena pri valovni dolžini 503 nm, mase vzorcev in eksperimentalno določena količina likopena prisotna v plodovih treh kultivarjev paradižnika 13. avgusta 2012

Kultivar	Ponovitev	POVPREČNA ABSORBANCA PRI 503nm $\pm 0,003$	MASA [grami] $\pm 0,01$	KOLIČINA LIKOPENA [mg/kg sveže teže]
KENTARO	1	0,5455	1,05	16,21
	2	0,5636	1,04	16,90
	3	0,6022	1,17	16,06
	4	0,5952	1,08	17,69
	5	0,5748	1,07	16,76
BOLZANO	1	0,0538	1,02	1,65
	2	0,0573	1,12	1,60
	3	0,0658	1,15	1,79
	4	0,0558	1,05	1,66
	5	0,0553	1,02	1,69
DASHER	1	0,6984	1,11	19,63
	2	0,7786	1,12	21,70
	3	0,6256	1,13	17,27
	4	0,6897	1,11	19,39
	5	0,6154	1,02	18,82

Tabela 5: Povprečna absorbanca likopena pri valovni dolžini 503 nm, mase vzorcev in eksperimentalno določena količina likopena prisotna v plodovih treh kultivarjev paradižnika 28. avgusta 2012

Kultivar	Ponovitev	POVPREČNA ABSORBANCA PRI 503nm $\pm 0,003$	MASA [grami] $\pm 0,01$	KOLIČINA LIKOPENA [mg/kg sveže teže]
KENTARO	1	0,3809	1,09	10,90
	2	0,3694	1,07	10,77
	3	0,3580	1,06	10,54
	4	0,3421	1,02	10,46
	5	0,3802	1,06	11,19
BOLZANO	1	0,0480	1,20	1,25
	2	0,0458	1,01	1,41
	3	0,0458	1,10	1,30
	4	0,0422	1,01	1,30
	5	0,0475	1,12	1,32
DASHER	1	0,4508	1,07	13,14
	2	0,4887	1,08	14,11
	3	0,5372	1,16	14,44
	4	0,5748	1,00	17,93
	5	0,5362	1,07	15,63

Tabela 6: Povprečna absorbanca likopena pri valovni dolžini 503 nm, mase vzorcev in eksperimentalno določena količina likopena prisotna v plodovih treh kultivarjev paradižnika 11. september 2012

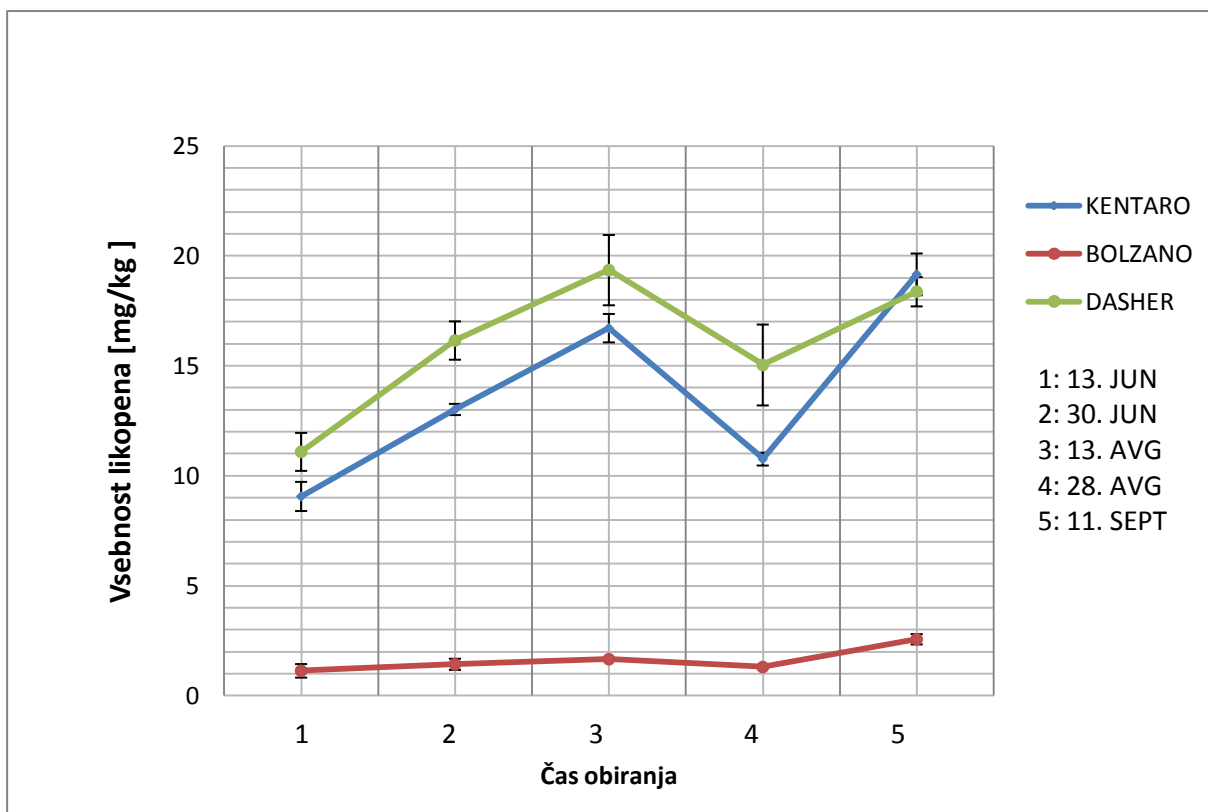
Kultivar	Ponovitev	POVPREČNA ABSORBANCA PRI 503nm $\pm 0,003$	MASA [grami] $\pm 0,01$	KOLIČINA LIKOPENA [mg/kg sveže teže]
KENTARO	1	0,6734	1,08	19,45
	2	0,6196	1,01	19,14
	3	0,6375	1,01	19,69
	4	0,5630	1,00	17,57
	5	0,7565	1,18	20,00
BOLZANO	1	0,0765	1,07	2,23
	2	0,0964	1,04	2,89
	3	0,0861	1,03	2,61
	4	0,0890	1,08	2,57
	5	0,0911	1,09	2,61
DASHER	1	0,6012	1,05	17,86
	2	0,5933	1,01	18,32
	3	0,6137	1,02	19,53
	4	0,6226	1,08	17,98
	5	0,6018	1,03	18,22

Tabela 7: Eksperimentalno določena povprečna količina likopena (mg/kg sveže teže) v plodovih treh kultivarjev od julija do septembra ter njihove standardne deviacije (SD)

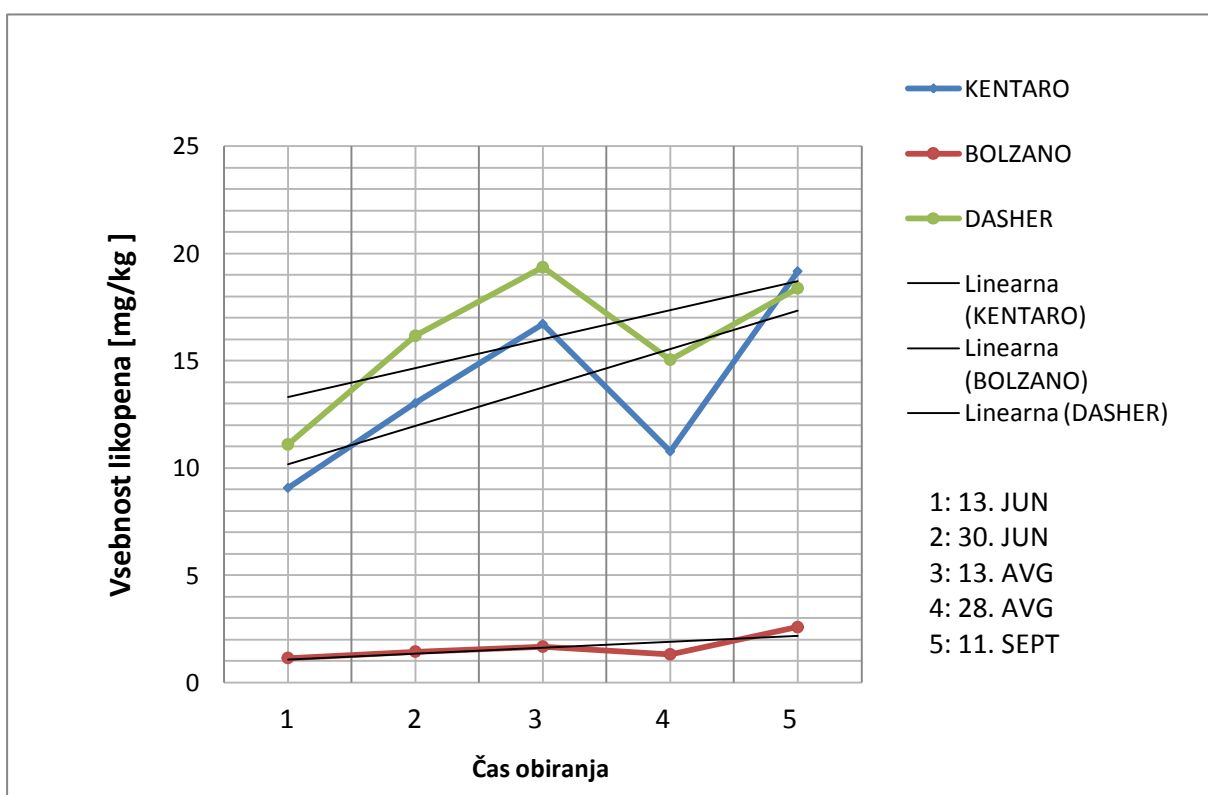
Datum	Povprečna vsebnost likopena (mg/kg sveže teže)				
Kultivar					
SD	16 julij	30 julij	13 avgust	28 avgust	11 september
KENTARO	9,07	13,01	16,72	10,77	19,17
SD (Kentaro)	0,66	0,25	0,65	0,29	0,95
BOLZANO	1,15	1,44	1,68	1,32	2,58
SD (Bolzano)	0,31	0,25	0,07	0,06	0,24
DASHER	11,10	16,16	19,36	15,05	18,38
SD (Dasher)	0,86	0,87	1,59	1,84	0,67

Tabela 8: Količina likopena (mg/kg) v vseh treh kultivarjih hibridnega paradižnika od julija do septembra izračunana upoštevajoč eksperimentalne ( $X_e$ ) in teoretične ( $X_t$ ) podatke

Kultivar	DAN OBIRANJA	Povprečna vsebnost likopena (mg/kg)				
	TIP PODATKOV	16 julij	30 julij	13 avgust	28 avgust	11 september
KENTARO	$X_e$	9.05	13.01	16.72	10.77	19.17
	$X_t$	8.77	12.63	16.11	10.44	18.63
Relativna napaka (%)		3.47	3.01	3.79	3.16	2.90
BOLZANO	$X_e$	1.15	1.44	1.68	1.32	2.58
	$X_t$	1.10	1.38	1.61	1.26	2.49
Relativna napaka (%)		4.18	4.50	4.17	4.86	3.69
DASHER	$X_e$	11.10	16.16	19.36	15.05	18.38
	$X_t$	10.76	15.67	18.77	14.55	17.67
Relativna napaka (%)		3.16	3.13	3.14	3.44	4.02



Graf 2: Spremembe povprečnih vsebnosti likopena v treh različnih kultivarjih hibridnega paradižnika v odvisnosti od časa obiranja ter  $\pm 1$  (SD)



Graf 3: Linearne regresije povprečnih vsebnosti likopena v treh različnih kultivarjih hibridnega paradižnika v odvisnosti od časa obiranja, od julija do septembra 2012

**Bolzano (enačba »best fit line« in vrednost  $R^2$ ):**

$$y = 0,2746x + 0,8092$$

$$R^2 = 0,5911$$

**Kentaro (enačba »best fit line« in vrednost  $R^2$ ):**

$$y = 1,7937x + 8,3725$$

$$R^2 = 0,4631$$

**Dasher (enačba »best fit line« in vrednost  $R^2$ ):**

$$y = 1,3452x + 11,976$$

$$R^2 = 0,4317$$

## 6 DISKUSIJA IN INTERPRETACIJA REZULTATOV

Rezultati predstavljeni v drugem grafu jasno pokažejo, da količina likopena (mg/kg) variira med posameznimi kultivarji paradižnika (*S. lycopersicum*) iz serije F1. Rezultat tako podpira prvo hipotezo (H1), ki je predvidevala razlike v koncentraciji likopena (mg/kg) prisotnega v plodovih različnih kultivarjev paradižnika.

Vsebnosti likopena v kultivarjih Kentaro F1 in Dasher F1 sta bili signifikantno višji v primerjavi z vsebnostmi likopena pri kultivarju Bolzano F1 skozi celo eksperimentalno obdobje. Plodovi Bolzano F1 so v povprečju vsebovali 10 % manj likopena kot ostala dva kultivarja. Glavni vzrok za omenjeno je verjetno rumena obarvanost plodov kultivarja Bolzano F1. Visoka vsebnost obravnavanega antioksidanta je v literaturi zelo tesno povezana z rdečo obarvanostjo plodov, ki je posledica prisotnosti rdečih likopenskih kristalov. Kultivar Bolzano F1 vsebuje več rumenih karotenoidnih kristalov (Hongbo et al, 2012), kot pa rdečih (to pojasni, zakaj so plodovi tega kultivarja ob koncu zorenja rumeno-oranžne barve, ne pa rdeči), kar je glavni vzrok za nižjo vsebnost likopena. Rezultati potrjujejo drugo hipotezo (H2), da bo količina likopena v sadežih Bolzano F1 manjša v primerjavi z ostalima dvema kultivarjema.

Rezultati so pokazali tri značilnosti, ki so skupne vsem trem kultivarjem. Najprej lahko izpostavimo dejstvo, da so bile izmerjene najnižje koncentracije likopena na samem začetku eksperimentalne dobe, in sicer 9.05 mg/kg za Kentaro F1, 1.15 mg/kg za Bolzano F1 in 11.10 za Dasher F1. Nato so od 16. 7. 2012 do 13. 8. 2012 koncentracije likopena v vseh kultivarjih naraščale z eno posebnostjo: najpočasnejše spremembe v koncentraciji so bile izmerjene za kultivar Bolzano F1. Iz grafov je razvidno, da sta bila naklona premic linearnih regresij za ostala dva kultivarja veliko bolj strma, kot pa premica Bolzano F1, zatorej je tudi rast vsebnosti likopena pri sortah Dasher F1 in Kentaro F1 večja. Omenjeno podpirajo tudi izračunane vrednosti  $R^2$ , kjer sta vrednosti pri kultivarjih z višjo vsebnostjo likopena višji kot pri kultivarju Bolzano F1. Po 13. 8. 2012 opazimo padec v koncentraciji likopena pri vseh preučevanih vzorcih. V septembru (11. 9. 2012) smo nepričakovano izmerili maksimalne vsebnosti likopena v vseh vzorcih. Ti maksimumi so bili: 19.17 mg/kg za Kentaro F1, 2.58 mg/kg za Bolzano F1 in 18.38 mg/kg za Dasher F1.



Ker rezultati niso v skladu z mojo tretjo hipotezo (H3), ki je predvidevala, da bo vsebnost likopena v vzorcih paradižnikov naraščala od julija do septembra, nato pa bo padla, sem poskusil najti razlago za to. Možno je, da je močno in intenzivno deževje v začetku septembra (glej prilogo 1) povzročilo opisan fenomen – veliko vlage v tleh, ki je na voljo za absorpcijo v rastlino paradižnika in visoke temperature ozračja (v začetku septembra so bile izmerjena najvišje povprečne temperature, kot je razvidno iz priloge 1) so povzročile pokanje plodov paradižnika in s tem tudi razpad celičnih sten. Ker je nekaj likopena ujetega tudi znotraj celičnih sten, je z njihovim razpadom bil prost tudi ta (Fielding et al, 2005). Če primerjamo maksimalne vrednosti, ugotovimo, da najnižja vrednost spet pripada kultivarju Bolzano F1. Razlika med vsebnostjo likopena v Bolzanu F1 v primerjavi z ostalima dvema je narastla iz začetnih 10% na 14%.

V večini meritev je bila najvišja vsebnost likopena izmerjena v plodovih kultivarja Dasher F1. Maksimalno vrednost koncentracije likopena tekom cele sezone pa je imel kultivar Kentaro F1. Kljub temu ta meritev ne prinaša signifikantne razlike med obema kultivarjema, saj se intervali napak s standardnim odklonom (v nadaljevanju: error bars) prekrivajo. Najvišje vrednosti likopena sem izmeril pri kultivarju Kentaro F1, ki je v primerjavi s svojo začetno koncentracijo likopena, izmerjeno 13. 7. 2012, le-to povečal za 10.6 mg/kg, sledi mu Dasher F1 z 7.28 mg/kg, in kot smo predvideli, je na zadnjem mestu kultivar Bolzano F1, ki se mu je koncentracija likopena povečala le za 1.44 mg/kg.

Koncentracije likopena v preučeni kultivarjih so bile izračunane po dveh različnih formulah Marie Perez et al (2008) – po formuli, ki upošteva eksperimentalne podatke in formuli, ki poda teoretične vrednosti. Tabela 8 prikazuje vsebnosti likopena v vseh vzorcih, izračunane z uporabo obeh formul. Z upoštevanjem teoretične vrednosti sem lahko izračunal tudi relativno napako. Iz iste tabele je jasno razvidno, da so vse relativne napake pod 5%, zato lahko zaključimo, da ni velike razlike med obema uporabljenima enačbama za izračun koncentracije likopena, in da so rezultati primerljivi. Torej moja modificirana metoda je bila dovolj natančna, da sem po njej pridobil natančne rezultate. Kvaliteto in zanesljivost rezultatov v grafu označujejo in odločno ponazorijo napake s standardnim odklonom, ki predstavljajo  $\pm$  eno standardno deviacijo, ki so za vsako meritev ter za vsak kultivar podane v tabeli 5. Majhne standardne deviacije, ki so v povprečju 0.56 za Kentaro F1, 0.19 za Bolzano F1 in 1.16 za Dasher F1, označujejo, da so vrednosti razporejene okrog srednje vrednosti.

Ker se torej napake s standardnimi odkloni, kot so predstavljene v grafu 2 večinoma ne prekrivajo, to pomeni, da so med posameznimi kultivarji signifikantne razlike v vsebnosti likopena. Tudi nizke vrednosti standardnega odklona potrjujejo, da smo pridobili kakovostne in zanesljive rezultate. Najnatančnejši rezultati so bili pridobljeni za kultivar Bolzano F1 (ta kultivar ima najmanjše standardne deviacije). Vzrok za to je dejstvo, da so plodovi Bolzano F1 v večini 2-3 krat večji kot plodovi drugih dveh kultivarjev in zato je bila homogenizacija bolj učinkovita.

Na koncu se mi zdi pomembno, da ocenim tudi kvaliteto uporabljene metode. UV-Vis spektrofotometrična analiza se je izkazala kot zelo natančna metoda za določanje vsebnosti likopena v paradižnikih. Ena največjih prednosti te metode, v primerjavi z ostalimi, ki jih omenja strokovna literatura (npr. HPLC analiza ...) je ta, da zanjo ne potrebujemo niti veliko vzorca niti veliko dodatnih kemikalij (organskih topil). Zaradi tega je metoda hitra in tudi ne predraga. Glede na vse ugotovitve in pridobljene končne rezultate menim, da je bila uporabljena metoda ustrezen način, da sem poiskal odgovor na zastavljeno raziskovalno vprašanje. Ena izmed slabosti, ki sem jo napravil, je verjetno razlika v masah homogenatov uporabljenih za ekstrakcijo.

## 7 ZAKLJUČEK

Kot je bilo predvideno, smo uspešno ekstrahirali likopen iz vseh treh kultivarjev, njegova koncentracija pa variira med vsemi tremi kultivarji skozi celo dobo zorenja. Najnižje koncentracije sem izmeril 13. julija 2012: 9.05 mg/kg za Kentaro F1, 1.15 mg/kg za Bolzano F1 in 11.10 za Dasher F1. Najvišje vrednosti likopena smo zaznali na zadnjem merjenju, 11. septembra 2012. Le-te so dosegle naslednje vrednosti: 19.17 mg/kg za Kentaro F1, 2.58 mg/kg za Bolzano F1 in 18.38 mg/kg za Dasher F1. Statistične analize so pokazale statistično signifikantne razlike v vsebnosti likopena (mg/kg) med preučevanimi kultivarji. To vodi do zaključka, da koncentracija likopena variira celo dobo zorenja pri vseh treh kultivarjih.

Ko sem opravil opisan eksperiment, se mi je porodila nova ideja. Maksimumi, ki so se pojavili na koncu eksperimenta (na koncu dobe zorenja), so bili rezultat poškodb celičnih sten v plodovih, ki so povzročile sproščanje likopena.

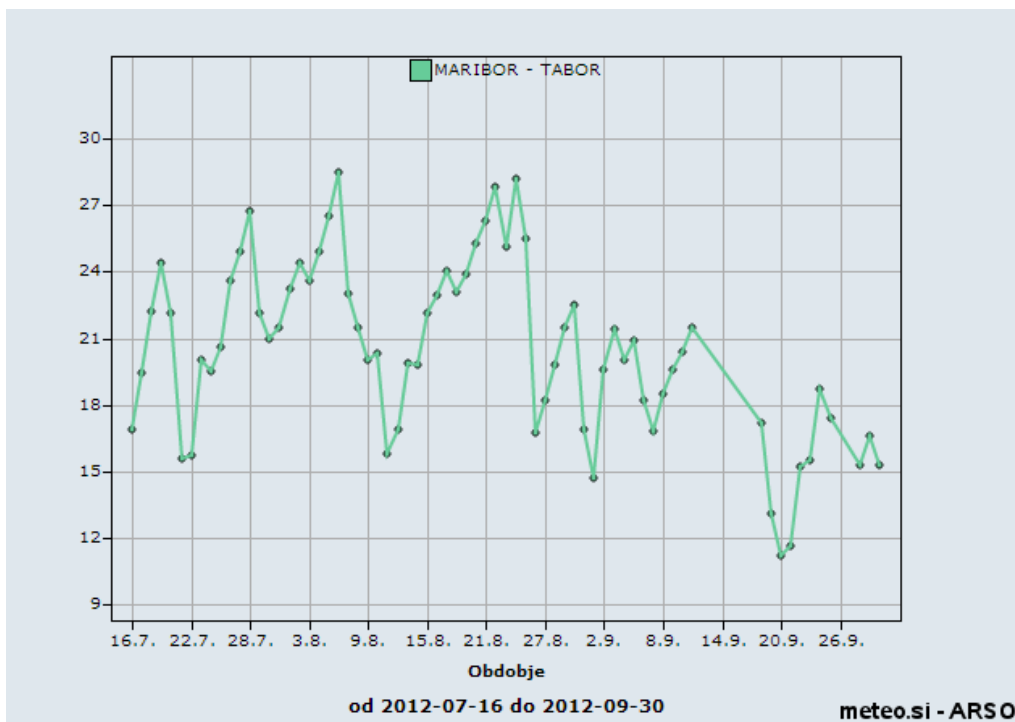
S termično obdelavo vzorcev, ki povzročijo razpad celičnih sten iz plodov, smo pridobili tudi likopen, ki je ujet v celičnih stenah in tako še dodatno povečali natančnost naših rezultatov. Zanimivo bi bilo primerjati rezultate vsebnosti likopena po dveh metodah: z uporabo homogenata iz termično obdelanih in svežih (kot sem v svojem eksperimentu to storil jaz) plodov.

Posebej zanimivo bi bilo tudi preveriti, kako je s vsebnostjo  $\beta$ -karotena v proučevanih kultivarjih; mogoče obstaja korelacija med vsebnostjo likopena in koncentracijo  $\beta$ -karotena. Kot sem omenil v uvodu, je likopen danes prepoznan kot potencialno zdravilo za mnoge bolezni (rak, bolezni srca in ožilja...). In če znanstvene študije nakazujejo povezavo med likopenom in razvojem rakavih celic, bi bilo zelo zanimivo preveriti, če prisotnost likopena resnično lahko inhibira rast in razvoj celic rakavega tkiva (Ankita et al, 2012). Pridobivanje likopena z naprednimi in bolj učinkovitimi biotehnološkimi postopki bi omogočilo pridelavo likopena v večjih količinah in posledično bi se dostopnost do likopena zelo povečala.

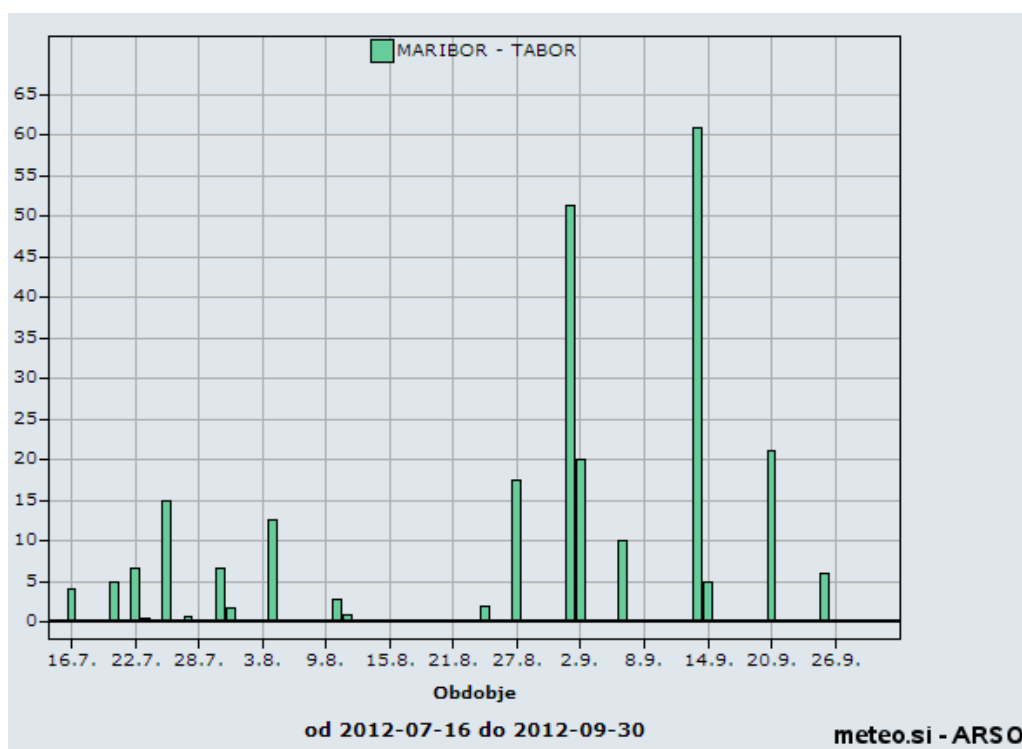
## 8 PRILOGE

Priloga1: Vremenski podatki pridobljeni od slovenske meteorološke službe  
(Pridobljeno 17. 10. 2012 iz: <http://meteo.arso.gov.si/met/sl/archive/>)

Povprečne temperature v Mariboru od 16. 7. 2012 to 30. 9. 2012



Količina padavin (mm) v Mariboru od 16. 7. 2012 do 30. 9. 2012



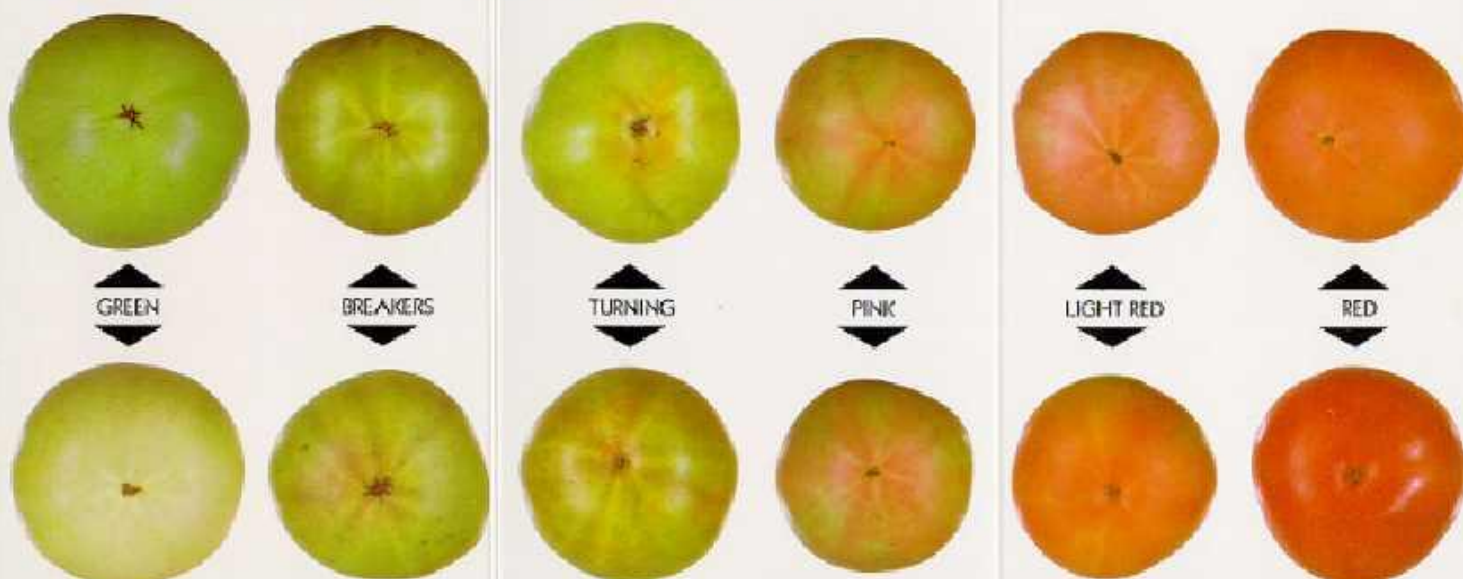
Priloga 2: "Color classification requirement in United States standards for grades of fresh tomatoes"

# COLOR CLASSIFICATION REQUIREMENTS IN

UNITED STATES STANDARDS FOR GRADES OF FRESH

United Fresh Fruit and Vegetable Association  
in cooperation with  
U. S. Department of Agriculture  
Agricultural Marketing Service  
Fruit and Vegetable Division

# TOMATOES



(1) "Green" means that the surface of the tomato is completely green in color. The shade of green color may vary from light to dark.

(2) "Breakers" means that there is a definite break in color from green to tannish-yellow, pink or red on not more than 10 percent of the surface.

(3) "Turning" means that more than 10 percent but not more than 30 percent of the surface, in the aggregate, shows a definite change in color from green to tannish-yellow, pink, red, or a combination thereof.

(4) "Pink" means that more than 30 percent but not more than 60 percent of the surface, in the aggregate, shows pink or red color.

(5) "Light red" means that more than 60 percent of the surface, in the aggregate, shows pinkish-red or red. Provided, that not more than 90 percent of the surface is red color; and,

(6) "Red" means that more than 90 percent of the surface, in the aggregate, shows red color.

The above photographs are only guides illustrating the shade and approximate surface color specified for each of the color terms. These photographs do not necessarily depict absolute limits of minimum or maximum shades and/or percentage of color required for each term.

Ripeness Stage	External Color <sup>a</sup>
Green	All percentages refer to both color distribution and intensity.
Breaker	There is a definite break in color from green to tannish-yellow, pink or red on not more than 10% of the surface.
Turning	10% to 30% of the surface is not green; the aggregate, shows a definite change from green to tannish-yellow, pink, red, or a combination thereof.
Pink	30% to 60% of the surface is not green; the aggregate, shows pink or red color.
Light red	60% to 90% of the surface is not green; the aggregate, shows pinkish-red or red.
Red	More than 90% of the surface is not green; the aggregate, shows red color.

Priloga 3: Primer izračuna teoretične vrednosti koncentracije  
likopena in relativne napake

Calculating theoretical yields of lycopene

$$x = \text{Lycopene content (mg/kg)} = (A_{503} - 0.0007) \cdot \frac{30.3}{g \text{ tissue}}$$

$x_t$ ... theoretical value  
 $x_e$ ... experimental value

$$RE = \text{Relative error (\%)} = \left( \frac{x_e \cdot 100\%}{x_t} \right) - 100$$

28th August

Custas:  $\frac{1.573}{5.12} = 0.3072$   
 $\frac{1.573}{1.06} = 1.483$

$x_t = 10.44$  mg/kg RE = 3.16%  
 $x_e = 10.77$

Bokaro:  $\frac{1.573}{1.07} = 1.47$   
 $\frac{1.573}{1.088} = 1.445$

$x_t = 1.256$  mg/kg RE = 4.86%  
 $x_e = 1.317$

Dashue:  $\frac{1.573}{1.07} = 1.47$   
 $\frac{1.573}{1.096} = 1.434$

$x_t = 14.55$  mg/kg RE = 3.44%  
 $x_e = 15.05$

## 9 VIRI IN LITERATURA

Ankita, J., Vinod, J., Samir M. (2012). *Role of lycopene in the prevention of cancer*.

[Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu:

<http://connection.ebscohost.com/c/articles/79349117/role-lycopene-prevention-cancer> [Citirano 11. 2. 2013, 11:56]

Agarwal, S. in Rao, A.V. (1998). *Tomato lycopene and low-density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study*. [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9832077> [Citirano 13. 12. 2012, 12:56]

Bathgate, B., Purton, M. E., Grierson, D. in Goodenough, P.W. (1985). *Plastid changes during the conversion of chloroplasts in ripening tomatoes*. [Elektronski vir]. Dostopno na

URL naslovu: <http://link.springer.com/article10.1007%2F00395042?LI=true>

[Citirano 13. 12. 2012, 12:26]

Di Mascio, P., Kaiser, S. P. in Sies H. (1989). *Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher*. [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003986189904670> [Citirano 10. 12. 2012, 10:21]

Fielding, J. M., Rowley, K. G., Cooper, P. in O' Dea, K. (2005). *Increases in plasma lycopene concentration after consumption of tomatoes cooked with Olive oil*. [Elektronski vir].

Dostopno na URL naslovu: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15927929> [Citirano 10. 12. 2012, 15:33]

Gerster, H. (1997). *The potential role of lycopene for human health*. [Elektronski vir].

Dostopno na URL naslovu: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9100211> [Citirano 10. 12. 2012, 16:03]

Hongbo, C. et al. (2012). *Comprehending crystalline  $\beta$ -carotene accumulation by comparing engineered cell models and the natural carotenoid-rich system of citrus*. [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu:

<http://jxb.oxfordjournals.org/content/early/2012/05/18/jxb.ers115> [Citirano 17. 12. 2012, 14:15]

Leffingwell, J. (2008): *LYCOPENE – The Ultimate Phytochemical Nutraceutical?* [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.leffingwell.com/lycopene.htm> [Citirano 16. 12. 2012, 08:15]

Johary, A. et al. (2012). *Role of lycopene in the prevention of cancer.* [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.ijnpnd.com/article.asp?issn=2231-0738;year=2012;volume=2;issue=3;spage=167;epage=170;aulast=Johary#ref29> [Citirano 17. 12. 2012, 14:49]

Kirk, J. T. O., & Tilney-Bassett, R. A. E. (1967). *The plastids; their chemistry, structure, growth, and inheritance.* London: W.H. Freeman.

Sadler, G., Davis, J. in Dezman, D. (1990). *Rapid Extraction of Lycopene and  $\beta$ -Carotene from Reconstituted Tomato Paste and Pink Grapefruit Homogenates.* [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.1990.tb03958.x/abstract> [Citirano 17. 12. 2012, 16:29]

Thompson, K. A., Marshall, M. R., Sims, C. A., Wei, C. I., Sargent, S. A. in Scott, J. W. (2000). *Cultivar, Maturity, and Heat Treatment on Lycopene Content in Tomatoes.* [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2000.tb13588.x/abstract> [Citirano 17. 12. 2012, 17:48]

W. M. Harris and A. R. Spurr (1969). *Chromoplasts of tomato fruit. II. The red tomato.* [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu: <http://aob.oxfordjournals.org/content/108/2/291.full> [Citirano 17. 12. 2012, 18:05]

U. S. Department of Agriculture (1975). *Color Classification Requirements In United States Standards For Grades Of Fresh Tomatoes.* [Elektronski vir]. Dostopno na URL naslovu: <http://postharvest.ucdavis.edu/pfvegetable/TomatoPhotos/?repository=30014&a=83755> [Citirano 18. 12. 2012, 19:05]