



WYDAWNICTWO POLITECHNIKI KOSZALIŃSKIEJ

CHEMIA ŻYWNOŚCI

Agnieszka Szparaga



POLITECHNIKA KOSZALIŃSKA

Agnieszka Szparaga

Chemia żywności

KOSZALIN 2023

ISBN 978-83-7365-602-4

Przewodniczący Uczelnianej Rady Wydawniczej
Zbigniew Danielewicz

Recenzja
Ireneusz Kapusta
Michał Świeca

Projekt okładki
Aleksandra Iwaszkiewicz
Anna Stępień

© Copyright by Wydawnictwo Uczelniane Politechniki Koszalińskiej
Koszalin 2023

WYDAWNICTWO UCZELNIANE POLITECHNIKI KOSZALIŃSKIEJ
75-620 Koszalin, ul. Raławicka 15-17

Koszalin 2023, wyd. I, ark. wyd. 5,62

Spis treści

1. Oznaczanie białek w produktach mlecznych i produktach ubocznych fermentacji mlekowej techniką spektrofotometryczną i metodą formolową .	6
1.1. Wstęp teoretyczny	6
1.2. Część praktyczna	8
1.2.1. Oznaczanie białka w serwatce techniką spektrofotometryczną.....	9
1.2.2. Oznaczanie zawartości białka ogółem i kazeiny w mleku metodą formolową	10
2. Analiza całkowitej zawartości związków polifenolowych w naparach oraz sokach.....	12
2.1. Wstęp teoretyczny	12
2.2. Część praktyczna	13
3. Oznaczanie antocyjanów w świeżych oraz mrożonych produktach owocowych i warzywnych	17
3.1. Wstęp teoretyczny	17
3.2. Część praktyczna	19
4. Ilościowe oznaczanie flawonoidów w mąkach z nasion roślin bobowatych	22
4.1. Wstęp teoretyczny	22
4.2. Część praktyczna	24
5. Określenie stopnia zafałszowania miodów poprzez oznaczenie cukrów redukujących	28
5.1. Wstęp teoretyczny	28
5.2. Część praktyczna	30
6. Oznaczanie zawartości skrobi w mąkach pszennych oraz bezglutenowych metodą Ewersa	33
6.1. Wstęp teoretyczny	33
6.2. Część praktyczna	35
7. Kompleksometryczne oznaczanie jonów wapnia i magnezu w wodach mineralnych.....	38
7.1. Wstęp teoretyczny	38

7.2. Część praktyczna	40
7.2.1. Oznaczanie jonów wapnia.....	41
7.2.2. Oznaczanie jonów magnezu.....	42
8. Ocena kwasowości produktów spożywczych jako wskaźnika ich świeżości i autentyczności.....	43
8.1. Wstęp teoretyczny	43
8.2. Część praktyczna	46
8.2.1. Oznaczanie kwasowości ogólnej w soku owocowym.....	46
8.2.2. Oznaczenie kwasowości ogólnej w serach według.....	47
8.2.3. Oznaczanie kwasowości ogólnej piwa	48
8.2.4. Oznaczanie kwasowości mąki w zawieszynie	49
9. Oznaczanie stężenia witaminy C w produktach owocowych i warzywnych techniką spektrofotometryczną	51
9.1. Wstęp teoretyczny	51
9.2. Część praktyczna	53
10. Analiza błonnika pokarmowego - oznaczanie włókna obojętno-detergentowego w surowcach roślinnych	56
10.1. Wstęp teoretyczny	56
10.2. Część praktyczna	58
11. Oznaczanie likopenu w świeżych pomidorach i przetworach pomidorowych.....	63
11.1. Wstęp teoretyczny	63
11.2. Część praktyczna	65
12. Ilościowa i jakościowa ocena barwników roślinnych w zależności od pH środowiska.....	68
12.1. Wstęp teoretyczny	68
12.2. Część praktyczna	70
12.2.1. Ocena wpływu pH środowiska na barwniki w żywności	71
12.2.2. Ilościowe oznaczenie barwników asymilacyjnych.....	72
13. Ocena barwy i jakości olejów w zależności od czasu przechowywania i obróbki termicznej	74

13.1. Wstęp teoretyczny	74
13.2. Część praktyczna	76
13.2.1. Oznaczenie barwy olejów	76
13.2.2. Ocena wpływu obróbki termicznej na barwę olejów	78
13.2.3. Oznaczanie jakości olejów – Ocena liczby kwasowej.....	79
13.2.4. Oznaczanie jakości olejów – Ocena liczby nadtlenkowej	81
14. Wpływ procesów termicznych na zawartość tiocyjanianów w warzywach.	84
14.1. Wstęp teoretyczny	84
14.2. Część praktyczna	85
15. Oznaczanie lepkości roztworów skrobi w zależności od temperatury i stężenia z wykorzystaniem reometru oscylacyjnego.....	90
15.1. Wstęp teoretyczny	90
15.2. Część praktyczna	92
16. Pytania na zaliczenie teoretyczne, weryfikujące wiedzę studentów	94
17. Literatura	96

1. Oznaczanie białek w produktach mlecznych i produktach ubocznych fermentacji mlekowej techniką spektrofotometryczną i metodą formolową

1.1. Wstęp teoretyczny

Białka należą do związków wielkocząsteczkowych, składających się z aminokwasów połączonych wiązaniami peptydowymi (w określonych sekwencjach i rodzajach). Zawierają szereg pierwiastków w tym węgiel (50-55%), wodór (6-7%), tlen (20-23%) i azot (12-19%). Ponadto w składzie białek występują również inne pierwiastki, takie jak siarka, fosfor, żelazo i miedź. Aminokwasy tworzące białka posiadają dwie grupy funkcyjne, tj. grupę aminową i grupę karboksylową. Obecność grup aminowych odpowiada za właściwości zasadowe, podczas gdy grup karboksylowych za właściwości kwasowe. Aminokwasy cechują właściwości amfoteryczne, ujawniające się w zależności od pH środowiska - przybieranie charakteru kwaśnego, gdy znajdują się w środowisku zasadowym, a zasadowego w kwaśnym roztworze.

Białka odgrywają niezwykle ważną rolę we wzroście i prawidłowym funkcjonowaniu organizmu człowieka, a wraz z węglowodanami i lipidami, stanowią najważniejsze składniki odżywcze w diecie. Dodatkowo białka pełnią wiele innych funkcji w organizmie, m.in. wykazują aktywność enzymatyczną oraz biorą udział w transporcie składników odżywczych i innych związków biochemicznych przez błony komórkowe. Aby utrzymać te ważne funkcje, konieczne jest dostarczanie organizmowi dobrej jakości białek poprzez dietę.

Biorąc pod uwagę źródło pochodzenia, białka można podzielić na trzy grupy tj. białka roślinne, zwierzęce i białka grzybowe. Białka roślinne pochodzą z surowców roślinnych, takich jak orzechy, soja i zboża. Natomiast białka zwierzęce to białka pochodzące z produktów zwierzęcych, m.in. mleko, jaja, mięso i produkty rybołówstwa. Mianem białka pełnowartościowego określa się jedynie białko zwierzęce, ze względu na fakt, iż zawiera niezbędne (ograniczające) aminokwasy (zwłaszcza aminokwasy zawierające atomy siarki tj. metionina i cysteina). Obie grupy białek (roślinne i zwierzęce) mogą podlegać trawieniu do bioaktywnych peptydów, które są wykorzystywane w technologii żywności oraz w technologii farmaceutycznej.

Dla określenia stężenia białka i aminokwasów w żywności, przeprowadza się analizę ilościową. W celu uzyskania wiarygodnej informacji o zawartości białka niezbędne jest zastosowanie odpowiedniej metody analitycznej. Analizując produkty spożywcze korzysta się z metod ilościowych oraz jakościowych, by móc określić nie tylko ilość białka, ale również jego rodzaj i skład aminokwasowy. Analiza jakościowa obejmuje kilka charakterystycznych reakcji, w tym reakcję ksantoproteinową, reakcję Hopkinsa-Colego, reakcję Millona, reakcję nitroprusydkową oraz reakcję Sakaguchi. Natomiast w analizie ilościowej wykorzystuje się metody pośrednie i bezpośrednie tj. Kjeldahla, Lowry'ego, Bradforda, biuretową, miareczkowanie formolowe, a także techniki z zakresu spektrofotometrii i turbidometrii. Ocena poziomu aminokwasów w białkach może być wykonana za pomocą metody kolorymetrycznej, grawimetrycznej, chromatograficznie lub mikrobiologicznie.

Prawidłowe oznaczanie zawartości białka w żywności ma tak duże znaczenie, ponieważ bardzo często decyduje o wartości ekonomicznej produktu spożywczego (np. mleko, pszenica).

Każda z metod oznaczania zawartości białka ma swoje zalety i wady. Metoda Kjeldahla jest uznawana na całym świecie za metodę standardową i dlatego łatwo jest porównywać wyniki z innymi laboratoriami. Natomiast jest to metoda pośrednia i nie mierzy się w niej białka tylko ilość azotu, zatem może dojść do przeszacowania zawartości białka z powodu stosowania standardowego współczynnika korekcji azotu 6,25. Metoda Dumasa jest szybka i nie wymaga stosowania środków chemicznych, ale jest kosztowna w przygotowaniu i niezbyt dokładna, ponieważ nie mierzy prawdziwego białka. Metody spektrofotometryczne UV-vis, w tym metody biuretowa, Bradforda i Lowry'ego, są łatwe w użyciu, nie są kosztowne i umożliwiają oznaczanie ilościowe niewielkich koncentracji białka. Mogą one jednak dawać fałszywie dodatnie wyniki ilości białka w zależności od zastosowanej metody przygotowania próbki i rozpuszczalności badanej próbki. Bezpośrednia analiza aminokwasów obejmuje hydrolizę białka za pomocą kwasu solnego (HCl), a następnie ilościowe oznaczenie aminokwasów za pomocą techniki HPLC (wysokosprawnej chromatografii cieczowej).

Oznaczanie zawartości białka techniką spektrofotometrii UV-vis (analizy w nadfiolecie i świetle widzialnym), bazuje na oddziaływaniu próbki żywności ze światłem UV. Światło UV ma zakres długości fali od około 100 do 400 nm. Związki (w zależności od budowy chemicznej), które mogą absorbować promienie UV to związki o jasnych i przezroczystych barwach. W metodzie z wykorzystaniem spektrofotometru UV-vis, badana próbka musi być klarowna i całkowicie rozpuszczona, bez obecności cząstek koloidalnych ani zawiesin.

Omawiana metoda opiera się na zdolności białek do naturalnego pochłaniania lub rozpraszania światła w obszarze UV-vis (widzialnego) widma elektromagnetycznego, albo na chemicznej lub fizycznej modyfikacji białek tak, aby pochłaniały (lub rozpraszały) światło w tym obszarze. Pierwszym elementem w metodach spektrofotometrycznych jest przygotowanie krzywej kalibracyjnej absorbancji w zależności od stężenia białka, wykorzystując serię roztworów białka o znanym stężeniu. Kolejnym krokiem jest pomiar absorbancji analizowanego roztworu przy tej samej długości fali. Bazując na krzywej wzorcowej wyznacza się stężenie białka. Tryptofan i tyrozyna silnie absorbują światło ultrafioletowe przy długości fali 280 nm. Zawartość tryptofanu i tyrozyny w wielu białkach pozostaje dość stała, dlatego absorbancja roztworów białek przy 280 nm może być wykorzystana do określenia ich stężenia. Główną zaletą metody jest prosta i nieniszcząca procedura analityczna, która nie wymaga stosowania skomplikowanych odczynników. Do wad metody zalicza się fakt, że kwasy nukleinowe obecne w próbkach żywności również silnie mogą absorbować światło w tym obszarze i dlatego mogą zakłócać pomiar zawartości białka. Jednak dla przewyżczenia tych zakłóceń opracowano metody pozwalające rozwiązać ten problem, np. poprzez pomiar absorbancji przy dwóch różnych długościach fali.

Miareczkowanie formolowe jest metodą, którą najczęściej wykorzystuje się jako szybką analizę zawartości białka w mleku i jego frakcjach. Takie miareczkowanie cieszy się dużym zainteresowaniem jako nieskomplikowana i mało czasochłonna metoda oznaczania zawartości kazeiny w mleku, przeznaczonym do produkcji sera. Jednak może być również stosowane do oznaczania stopnia hydrolizy białka, poprzez wykazanie poziomu amin I-rzędowych w procesach przetwarzania lub przechowywania produktów spożywczych. Zasada metody opiera się na neutralizacji próbki z wykorzystaniem NaOH z dodatkiem formaldehydu, w którym grupa aminowa jest związana i nie wpływa na reakcję kwasowo-zasadową NaOH, tworząc dimetylol. Najczęściej wykorzystywanym wskaźnikiem jest fenoloftaleina. Metoda ta obejmuje miareczkowanie próbki do punktu końcowego fenoloftaleiny, lub dodanie roztworu formaldehydu i miareczkowanie uwolnionego kwasu do tego samego punktu końcowego. Objętość zasady użytej w drugim miareczkowaniu jest miarą ilości grup aminowych, które były pierwotnie obecne i połączyły się z formaldehydem.

1.2. Część praktyczna

Celem ćwiczenia jest oznaczenie białka metodą spektrofotometryczną oraz formolową w produktach spożywczych (mlecznych oraz odpadowych).

Analizowane produkty spożywcze

- mleko
- serwatka

Odczynniki chemiczne

- albumina
- kazeina
- 0,1 M roztwór NaOH
- 2% roztwór fenoloftaleiny
- formalina rozcieńczona wodą w stosunku 1:1 (uwaga trucizna!)
- odczynnik Folina-Ciocalteu
- odczynnik A ($\text{NaOH} + \text{Na}_2\text{CO}_3$)
- odczynnik B ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$)

Szkło laboratoryjne, sprzęt i akcesoria

- waga analityczna
- spektrofotometr UV-vis
- kolby miarowe o pojemności 50 ml
- kolby stożkowe o pojemności 100 ml
- pipety szklane

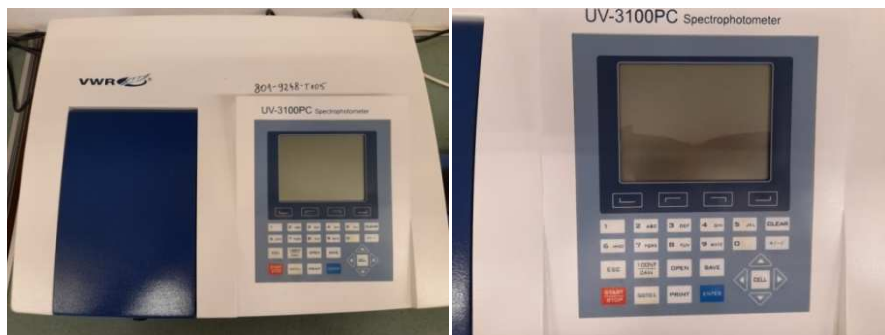
1.2.1. Oznaczanie białka w serwatce techniką spektrofotometryczną

W wyniku działania odczynnika miedziowego zachodzi reakcja biuretowa białka z jonami miedzi w środowisku zasadowym (przyłączenie jonów miedzi do wiązań peptydowych), a następnie zachodzi redukcja odczynnika fosfomolibdeno-fosfowolframowego (odczynnik Folina-Ciocalteu) do błękitu fosfomolibdenowego.

Przygotowanie krzywej wzorcowej

Przygotować odczynnik miedziowy (odmierzyć do kolby stożkowej 50 ml odczynnika A i 1 ml odczynnika B, dokładnie wymieszać). Rozpuścić 10 mg albuminy w 50 ml wody destylowanej. Przenieść roztwór do kolby miarowej o pojemności 100 ml i uzupełnić wodą destylowaną do kreski. Do kolb miarowych o pojemności 10 ml odmierzyć odpowiednio 1, 2, 3, 4 i 5 ml roztworu wyjściowego albuminy. Kolby uzupełnić wodą destylowaną do kreski. Obliczyć stężenie albuminy w przygotowanych roztworach. Z roztworów tych pobrać po 1 ml do probówek, następnie dodać po 5 ml odczynnika miedziowego, a po 10 min 0,5 ml odczynnika Folina-Ciocalteu i dokładnie wymieszać. Po upływie 30 min wykonać pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda_{\text{max}} = 750 \text{ nm}$ (rys. 1). Wykonać trzy równoległe próby i próbę zerową (postępowanie jak w przypadku roztworów powyżej, jednak zamiast 1 ml

roztworu albuminu pobrać 1 ml wody destylowanej). Sporządzić wykres zależności absorbancji od stężenia albuminy ($\mu\text{g/ml}$).



Rys. 1. Spektrofotometr VWR UV-vis. Legenda panelu sterowania: GOTO λ – ustawianie długości fali; 0ABS- ustawianie dla pomiaru absorbancji próby ślepej.

Oznaczenie właściwe

Do próbki odmierzyć 1 ml serwatki, dodać 5 ml uprzednio przygotowanego odczynnika miedziowego, wymieszać i pozostawić na 10 minut. Dodać 0,5 ml odczynnika Folina-Ciocalteu i ponownie dokładnie wymieszać. Po upływie 30 min wykonać pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda_{\text{max}} = 750 \text{ nm}$. Wykonać trzy równoległe próby i próbę zerową.

Obliczenia

Korzystając ze wcześniej wykreślonej krzywej wzorcowej, odczytać na podstawie absorbancji stężenie białka w serwatce ($\mu\text{g/ml}$).

1.2.2. Oznaczanie zawartości białka ogółem i kazeiny w mleku metodą formolową

Oznaczenie właściwe

Do kolby stożkowej o pojemności 50 ml odmierzyć 10 ml mleka. Następnie dodać 3 krople fenoloftaleiny i miareczkować 0,1 M roztworem NaOH do jasnorożowej barwy. Do tej samej kolby z miareczkowanym roztworem dodać 4 ml formaliny (świeżo zobojętnionej NaOH wobec fenoloftaleiny) i ponownie miareczkować roztworem NaOH do uzyskania jasnorożowej barwy.

Obliczenia

Ogólną zawartość białka w mleku (B) w % należy obliczyć wg wzoru:

$$B = a \times 1,92$$

gdzie:

a – liczba ml 0,1 M NaOH zużytego do **drugiego** miareczkowania

1,92 – współczynnik przeliczeniowy (1 ml 0,1 M NaOH odpowiada 1,92 g białka w 100 g próbki).

Ogólną zawartość kazeiny w mleku (K) w % należy obliczyć wg wzoru:

$$K = a \times 1,47$$

Porównać uzyskany wynik z przeciętną zawartością białka w mleku (3-3,5%).

2. Analiza całkowitej zawartości związków polifenolowych w naparach oraz sokach

2.1. Wstęp teoretyczny

Na przestrzeni ostatnich lat można zaobserwować, że zarówno naukowcy i producenci żywności coraz więcej zainteresowania poświęcają polifenolom. Wynika to przede wszystkim z uznanych właściwości przeciwutleniających tych związków oraz ich prawdopodobnej roli w prewencji chorób, związanych ze stresem oksydacyjnym (nowotwory, choroby układu krążenia i choroby neurodegeneracyjne). Dodatkowo związki polifenolowe mogą regulować aktywność wielu enzymów (w tym telomerazy, cyklooksygenazy oraz lipooksygenazy) i receptorów komórkowych. Jednak jak dotąd, specyficzne działanie biologiczne tych fitozwiązków jest jeszcze słabo poznane. Szacuje się, że w roślinach wyższych występuje około 250 tysięcy cząsteczek o strukturze polifenolowej, tzn. zawierających grupy hydroksylowe przyłączone do pierścieni aromatycznych. Wiele z nich rozpoznano w roślinach jadalnych. Związki polifenolowe są wtórnymi metabolitami roślin. Można je podzielić na różne grupy, bazując na liczbie zawartych w nich pierścieni fenolowych oraz elementów strukturalnych, które wiążą te pierścienie ze sobą. Rozróżnia się zatem najprostsze kwasy fenolowe, flawonoidy, stilbeny i lignany. Wśród kwasów fenolowych podział obejmuje pochodne kwasu benzoowego i pochodne kwasu cynamonowego. Kwasy benzoowe posiadają w swojej budowie siedem atomów węgla (C6-C1) i należą do najprostszych kwasów fenolowych, występujących w przyrodzie. Natomiast kwasy cynamonowe posiadają dziewięć atomów węgla (C6-C3). Substancje te charakteryzują się posiadaniem w cząsteczce pierścienia benzenowego, grupy karboksylowej oraz jednej lub więcej grup hydroksylowych i/lub metoksyloowych.

Zawartość kwasu hydroksybenzoowego w roślinach jadalnych jest na ogół bardzo niska. Szczególnym przypadkiem jest herbata, będąca źródłem kwasu galusowego. Natomiast kwasy hydroksycynamonowe występują częściej niż kwasy hydroksybenzoowe. W grupie tej występują kwasy p-kumarowy, kawowy, ferulowy i sinapowy, które rzadko obecne są w postaci wolnej w przyrodzie. Wyjątek stanowią produkty spożywcze przetworzone tj. poddane procesom, podczas których dochodzi do hydrolizy połączeń glikozydowych tj. zamrażaniu, sterylizacji lub fermentacji. Wykazano, że zawartość kwasu

kawowego (wolnego i zestryfikowanego) stanowi od 75% do 100% całkowitej zawartości kwasów hydroksycynamonowych w przypadku większości owoców. Natomiast kwas ferulowy jest charakterystyczny dla ziaren zbóż. Zawartość kwasu ferulowego w ziarnie pszenicy stanowi do 90% wszystkich polifenoli.

Związki polifenolowe występujące w żywności i napojach są szybko wchłaniane i metabolizowane u ludzi. Mikrobiota jelitowa pełni kluczową rolę w procesie ich wchłaniania. Zawartość polifenoli w żywności i napojach zależy w dużym stopniu od uprawy roślin, procesów technologicznych i przemian, zachodzących w trakcie przechowywania.

Do analizy produktów spożywczych, pod kątem zawartości polifenoli, stosuje się metody spektrofotometryczne, takie jak zmiatanie syntetycznego rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowego DPPH, z odczynnikiem Folina-Ciocalteu lub oznaczania zdolności redukcji jonów żelaza FRAP. W porównaniu z metodami opartymi na chromatografii, metody te są mniej czułe i specyficzne. Obecnie, wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa HPLC z detekcją diodową DAD lub spektrometrią mas MS jest coraz częściej wykorzystywaną metodą analityczną do analizy polifenoli w żywności.

Metoda oznaczania polifenoli z wykorzystaniem odczynnika Folina-Ciocalteu jest metodą kolorymetryczną. Jej istota opiera się na redukcji odczynnika, będącego mieszaniną molibdenianu sodu, wolframianu sodu i innych związków chemicznych, poprzez przeniesienie pojedynczego elektronu z fenolu na odpowiedni kompleks. W środowisku zasadowym, regulowanym roztworem węglanu sodu, przy pH około 10, proces dysocjacji protonu fenolowego prowadzi do powstania anionu fenolanowego, który jest następnie zdolny do redukcji odczynnika Folina-Ciocalteu. W efekcie tej reakcji, zachodzącej pomiędzy związkami fenolowymi a odczynnikiem, tworzy się niebieski kompleks, który wykazuje maksymalną absorpcję w pobliżu długości fali 760 nm. Podkreślić należy również ograniczenia tej metody. Odczynnik Folina-Ciocalteu jest bowiem w dużym stopniu reaktywny także w stosunku do innych związków, występujących w produktach spożywczych (witaminy, aminokwasy, białka, węglowodany, kwasy organiczne, jony nieorganiczne i kompleksy metali). Dla przezwyciężenia trudności zaproponowano jednak różne procedury, poprawiające specyficzność oznaczania polifenoli z wykorzystaniem metody kolorymetrycznej.

2.2. Część praktyczna

Celem ćwiczenia jest ekstrakcja oraz oznaczenie ogólnej zawartości związków fenolowych w surowcach roślinnych.

Analizowane produkty spożywcze

- herbata zielona
- herbata czarna
- sok z czarnej porzeczki
- napar z kawy

Odczynniki chemiczne

- 80% alkohol metylowy
- 14% węglan sodu
- odczynnik Folina-Ciocalteau (rozcieńczony wodą destylowaną 1:5)

Szkło laboratoryjne, sprzęt i akcesoria

- kolba Erlenmeyera o pojemności 250 ml
- kolby miarowe o pojemności 10 ml
- kolby miarowe o pojemności 100 ml
- moździerz
- próbówki szklane
- próbówki wirownicze
- lejek
- sącze
- wytrząsarka
- wirówka laboratoryjna
- waga laboratoryjna
- wyparka próżniowa
- pipety automatyczne
- spektrofotometr UV-vis

Przygotowanie próbki

Odważyć 1-10 g rozdrobnionej próbki (uzgodnić z Prowadzącym). Dodać 20 ml 80% metanolu i wytrząsać na wytrząsarce przez 20 minut. Ekstrakcję przeprowadzić jeszcze dwukrotnie używając do tego celu po 20 ml 80% metanolu i wytrząsać na wytrząsarce przez 15 minut. Uzyskane ekstrakty sączyć przez sącze do kolby o pojemności 100 ml. Połączone ekstrakty zagęścić na wyparce próżniowej do całkowitego odparowania rozpuszczalnika (rys. 2).



Rys. 2. Wyparka próżniowa do zagęszczania ekstraktów

Rozpuścić ekstrakt w 2-3 ml metanolu i przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 10 ml, popłukując kolbkę 2-3 krotnie metanolem (używając do tego celu nie więcej niż 2 ml metanolu), uzupełnić do kreski.

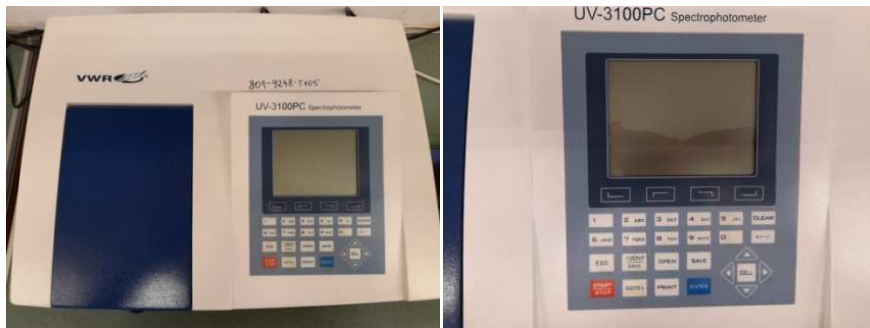
Oznaczenie właściwe

Pobrać 250 μ l badanej próbki i dodać 250 μ l odczynnika Folina-Ciocalteu, 500 μ l węgla sodowego oraz 4000 μ l wody destylowanej (całkowita objętość próbki wynosić powinna 5 ml). Próbki przygotować w probówkach wirowniczych. Po dodaniu wszystkich odczynników i wody próbki ostrożnie wymieszać. Probówki wirownicze dokładnie zamknąć korkiem i odstawić do statywu na 25 minut (rys. 3). Po tym czasie odwirować przez 5 minut przy prędkości 7000.



Rys. 3. Wirówka laboratoryjna MPW wraz ze stojakiem na próbki wirownicze – sposób umieszczenia probówek wirowniczych w rotorze wirówki

Następnie zmierzyć wartość absorbancji (rys. 4) przy długości fali 720 nm wobec próby zerowej. Próba zerowa: 250 μ l odczynnika Folin-Ciocalteu, 500 μ l węgla sodowego, 4250 μ l wody destylowanej.



Rys. 4. Spektrofotometr VWR UV-vis. Legenda panelu sterowania: GOTO λ – ustawianie długości fali; 0ABS- ustawianie dla pomiaru absorbancji próby ślepej.

Obliczenia

Wyznaczyć zawartość związków fenolowych (ZF) w mg/ml badanej próbki zgodnie ze wzorem:

$$ZF = A \times 0,3707 - 0,0005$$

gdzie:

A – wartość absorbancji

3. Oznaczanie antocyjanów w świeżych oraz mrożonych produktach owocowych i warzywnych

3.1. Wstęp teoretyczny

Antocyjany (w przeciwieństwie do chlorofili i karotenoidów) są rozpuszczalnymi w wodzie wakuolarnymi pigmentami, które mają barwę od czerwonej przez niebieską do prawie czarnej, w zależności od pH. Konsekwencją ich obecności w wielu roślinach jest występowanie fioletowego, niebieskiego i czerwonego koloru tkanek. Obecnie zidentyfikowano około 550 różnych antocyjanów. Różnice w strukturze chemicznej tych związków, w zależności od pH, powodują, że antocyjany są często stosowane jako naturalne wskaźniki pH (zmieniają barwę z czerwonej w środowisku kwaśnym na niebieską w zasadowym). Związki te uważa się za jedną z największych i najważniejszych grup pigmentów rozpuszczalnych w wodzie w królestwie roślin.

Chemicznie antocyjany należą do klasy cząsteczek organicznych zwanych flawonoidami (grupy związków polifenolowych). Wszystkie flawonoidy mają trzyczęściowy szkielet fenolowy. Flawonoidy, które są hydroksylowane (-OH) lub metoksyłowane (-OCH₃) w różnym stopniu w siedmiu określonych pozycjach (R1 - R7) wokół szkieletu flawonoidowego, należą do klasy flawonoidów zwanych antocyjanidynami. Natomiast antocyjany są glukozydami antocyjanidyn. Oznacza to, że do części aglikonowej dołączone zostały od jednej do kilku cząsteczek cukru (kowalencyjnie przyłączone do szkieletu flawonoidu, zwykle w pozycji #3 pierścienia C). Obecność cząsteczki cukru powoduje zwiększoną rozpuszczalność antocyjanu w wodzie.

Antocyjany należą do związków, które mają zdolność absorpcji światła o określonej długości fali. Właśnie dzięki temu zjawisku odznaczają się kolorem. Pigmentacja antocyjanów jest efektem występowania dodatniego ładunku na szkielecie węglowym cząsteczki. Podkreślić należy jednak, że ładunek jest determinowany przez kwasowość czynną środowiska. W przypadku, gdy pH ma wartość 1,0, pierścień węglowy obdarzony jest ładunkiem dodatnim i cząsteczka jest zabarwiona. Przy wyższym pH, wynoszącym 4,5, następuje uwodnienie pierścienia węglowego, ładunek dodatni podlega zneutralizowaniu, a cząsteczki stają się bezbarwne. Stwierdzono istnienie zależności pomiędzy kwasowością czynną a wyglądem

widma absorpcji promieniowania UV-vis antocyjanów. Przy pH 1,0 antocyjany silnie absorbują światło o długości fali od 460 do 550 nm (światło niebieskie, cyjanowe i zielone), a ich maksimum absorpcji wynosi około 520 nm. Natomiast przy pH 4,5 antocyjany nie absorbują światła w zakresie widzialnym.

W krajach Unii Europejskiej (EU) ekstrakty antocyjanów ze źródeł spożywczych są ogólnie dozwolone. Jednak antocyjany odgrywają coraz większą rolę, już nie tylko jako barwniki żywności, ale także jako przeciwutleniacze (antyoksydanty). Związki te wykazują działanie terapeutyczne, w tym przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, chemoprotekcyjne, a także przeciwnowotworowe. W przemyśle spożywczym antocyjany są wykorzystywane jako naturalne barwniki, będące alternatywą dla związków syntetycznych. Zapotrzebowanie na takie surowce rośnie na przestrzeni ostatnich lat, ze względu na coraz większą świadomość konsumentów.

Metody analityczne, umożliwiające identyfikację antocyjanów i określenie ich źródła są wykorzystywane w kontroli jakości oraz do określania autentyczności produktów spożywczych. Zawartość antocyjanów w warzywach i owocach jest uznawana za wskaźnik ich dojrzałości. Do oznaczania zawartości antocyjanów i kontroli jakości produktów, zasobnych w te związki, opracowano szereg metod analitycznych. Najpowszechniej stosowane są metody spektrofotometryczne, wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), strefowa elektroforeza kapilarna (CZE), spektroskopia w podczerwieni IR z transformacją Fouriera, chromatografia cieczowa z detekcją fotodiodową oraz wykorzystaniem spektrometrii mas (LC-DAD-ESI/MS), a także połączenie innych technik.

Obecnie spektrofotometria uznawana jest za szybką i prostą metodę wyznaczania zawartości antocyjanów. Niestety ma pewne ograniczenia. Nie może być wykorzystywana w przypadku próbek o złożonych matrycach, co wynika z absorpcji tła w obszarze UV-vis. W związku z tym zaproponowano różne techniki korekcji tła (rozkład termiczny, promieniowanie ultrafioletowe, obróbka alkaliczna i metoda enzymatyczna), które pozwalają na rozwiązanie tego problemu. W metodach spektrofotometrycznych wykorzystywana jest unikalna zależność absorpcji światła przez antocyjany w zależności od wartości pH.

W przeciwieństwie do antocyjanów, maksimum absorpcji dla dodatkowych substancji w próbkach żywnościowych nie jest zależne od kwasowości środowiska. W związku z tym spektrofotometryczna metoda oznaczania koncentracji antocyjanów nazywana jest metodą różnicową pH. Pomiaru absorpcji światła o długości fali 520 nm dokonuje się przez wzorce

antocyjanów oraz próbki produktów spożywczych przy dwóch wartościach pH: 1,0 i 4,5. W procedurze tej wykorzystuje się zależność, że wartości absorbancji odnotowane przy pH 1,0 związane są z obecnością wszystkich substancji w próbce (absorbują światło o długości fali 520 nm), w tym antocyjanów. W przypadku wartości absorbancji, rejestrowanych przy pH 4,5, wykazano, że wywołane są one tylko innymi substancjami, a nie antocyjanami. Zatem dla wyznaczenia absorbancji antocyjanów wystarczy posłużyć się jedynie różnicą wartości absorbancji przy pH 4,5 i przy pH 1,0.

3.2. Część praktyczna

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z wybranymi grupami antocyjanów, sposobami ich wyodrębniania oraz oznaczaniem ogólnej ich zawartości w różnych surowcach roślinnych (wg metody Ronalda E. Wrolstade'a; AOAC, 1974).

Analizowane produkty spożywcze

- owoce i warzywa o ciemnoczerwonym i granatowym zabarwieniu (borówki, maliny) świeże oraz mrożone

Odczynniki chemiczne

- 80% alkohol metylowy zakwaszony do pH 2
- roztwór o pH 4,5 (450 ml 1M octan sodu, 220 ml 1M kwas solny oraz 330 ml wody destylowanej)
- roztwór o pH 1 (120 ml 0,2M chlorek sodu, 390 ml 0,2M kwas solny)

Szkło laboratoryjne, sprzęt i akcesoria

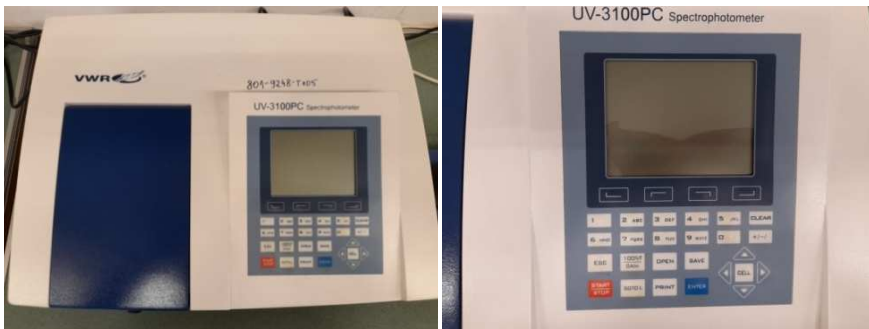
- kolba Erlenmeyera o pojemności 250 ml
- kolba okrągła płaskodenna ze szlifem o pojemności 100 ml
- kolba miarowa o pojemności 50 ml
- próbówki szklane
- lejek duży
- lejek mały do kolbki miarowej
- moździerz
- sączi filtracyjne średnie
- waga analityczna
- wyparka próżniowa
- spektrofotometr UV-vis

Przygotowanie próbki

Odważyć 10 g rozdrobnionej próbki (otrzymanej od Prowadzącego) i ekstrahować czterokrotnie w 30 ml 80% metanolu zakwaszonego do pH 2. Uzyskany ekstrakt sączyć przez sączek, i po zagęszczeniu przenieść do kolbki miarowej o pojemności 50 ml. Tak uzyskany ekstrakt służy do dalszych badań.

Oznaczenie właściwe

Z przygotowanego ekstraktu pobrać 1 ml do probówek, po czym do jednej dodać 4 ml roztworu o pH 1, a do drugiej 4 ml roztworu o pH 4,5 i odczytać absorbancję przy długości fali $\lambda=526$ nm (rys. 5), używając jako próby odczynnikowej odpowiednich roztworów. W celu wyeliminowania błędów wywołanych zakłóceniami dokonać odczytu również przy długości fali $\lambda=700$ nm.



Rys. 5. Spektrofotometr VWR UV-vis. Legenda panelu sterowania: GOTO λ – ustawianie długości fali; 0ABS- ustawianie dla pomiaru absorbancji próby ślepej.

Obliczenia

Obliczyć zawartość antocyjanów i przedstawić wpływ zamrażania na uzyskane wyniki. Zawartość bioaktywnych związków wyrazić w formie najczęściej występujących w produktach antocyjanów tj. w mg glukozydu 3-O pelargonidyny/100g próbki wyznaczyć na podstawie odczytów absorbancji, zgodnie ze wzorem:

$$A = (A_{526 \text{ pH}1} - A_{700 \text{ pH}1}) - (A_{526 \text{ pH}4,5} - A_{700 \text{ pH}4,5})$$

gdzie:

$A_{526 \text{ pH}1}$ – Absorbancja dla długości fali 526 nm, bufor o pH 1

$A_{700 \text{ pH}1}$ – Absorbancja dla długości fali 700 nm, bufor o pH 1

$A_{526\text{pH}4,5}$ – Absorbancja dla długości fali 526 nm, bufor o pH 4,5

$A_{700\text{pH}4,5}$ – Absorbancja dla długości fali 700 nm, bufor o pH 4,5

Zawartość antocyjanów przeliczyć wg wzoru:

$$C = \frac{A}{\xi L \times MW \times N \times 10}$$

gdzie:

A – wyliczona absorbancja

ξ – absorbancja molarna (dla glukozydu 3-O- pelargonidyny wynosi 31600)

L – grubość kwety (1 cm)

MW – masa molekularna (dla glukozydu 3-O- pelargonidyny wynosi 433,1)

N – współczynnik rozcieńczenia

4. Ilościowe oznaczanie flawonoidów w mąkach z nasion roślin bobowatych

4.1. Wstęp teoretyczny

Flawonoidy to grupa związków pochodzących z wtórnego metabolizmu roślin. Flawonoidy należą do grupy związków fenolowych o zróżnicowanych właściwościach biologicznych. Powszechnie występują w wielu roślinach. Związki te wykazują szerokie spektrum działań terapeutycznych, w tym przeciwwzapalne, przeciwmiażdżycowe, a także przeciwnowotworowe, przeciwwzkrzepowe i przeciwwirusowe. Pomimo faktu, że flawonoidy, dostarczane z dietą mogą odgrywać niezwykle ważną rolę w zdrowiu człowieka, wyznaczenie zaleceń, dotyczących dziennego spożycia tych związków bioaktywnych jest nadal bardzo trudne.

Najnowsze badania dowodzą, że flawonoidy wpływają również na jakość i stabilność żywności, ponieważ nadają produktom spożywczym smak i kolor oraz działają jako naturalny konserwant żywności. Wymienione właściwości sprawiają, że flawonoidy określane są obecnie jako ekonomicznie ważne związki bioaktywne, co doprowadziło do podjęcia prób produkcji flawonoidów poprzez hodowlę tkanek roślinnych *in vitro*. Wiele flawonoidów jest wykorzystywanych w przemyśle spożywczym jako naturalne przeciwutleniacze w olejach i tłuszczach. Ich dodatek zapobiega bowiem utlenianiu lipidów. Dodatkowo wykorzystuje się je jako dodatek do napojów, chroniący przed ekspozycją na światło. Flawonoidy w przemyśle spożywczym pełnią również rolę środka przeciwdrobnoustrojowego oraz zdrowotnego składnika funkcjonalnego w żywności i suplementach diety. Badania nad wykorzystaniem flawonoidów pokazały, że skutecznie hamowały one utlenianie lipidów, oraz jako składnik funkcjonalny prowadziły do opóźniania wzrostu mikroorganizmów, powodujących psucie się mięs. Generalnie ich wykorzystanie w technologii żywności związane jest głównie z aktywnością przeciwutleniającą i przeciwdrobnoustrojową. Na przestrzeni ostatnich lat ich praktyczne wykorzystanie wzrosło, ze względu na fakt ograniczania w produkcji żywności stosowania syntetycznych dodatków (m.in. syntetycznych przeciwutleniaczy BHA i BHT). Flawonoidy są metabolitami roślin, które nie mogą być syntetyzowane przez organizm człowieka. Jednakże

te bioaktywne związki mogą być stosowane jako dodatki do żywności o prozdrowotnych właściwościach.

Chemicznie, bazując na stopniu hydroksylacji i obecności wiązania podwójnego C2-C3 w heterocyklicznym pierścieniu, flawonoidy dzieli się na 13 klas. Najważniejsze reprezentowane są przez flawonole, flawanole, flawony, izoflawony, antocyjanidyny lub antocyjany i flawanony. Jednak nawet w obrębie tych klas istnieje może dodatkowo wiele odmian strukturalnych (w zależności od stopnia uwodornienia i hydroksylacji układów trójpierścieniowych). Flawonoidy występować mogą także jako pochodne sulfonowane i metylowane, sprzężone z monosacharydami i disacharydami oraz tworzące kompleksy z oligosacharydami, lipidami, aminami, kwasami karboksylowymi i kwasami organicznymi.

Flawonoidy uznawane są za jedno z najsilniejszych antyoksydantów pochodzenia roślinnego. Taka wysoka aktywność przeciwutleniająca tych związków wynika z obecności grup hydroksylowych w pozycjach 3' i 4' pierścienia B, które nadają wysoką stabilność tworzonemu rodnikowi, uczestnicząc w przemieszczaniu elektronu, oraz wiązania podwójnego pomiędzy atomami C2 i C3 pierścienia węglowego wraz z grupą karbonylową w pozycji C4, co umożliwia przemieszczenie elektronu z pierścienia B. Również wolne grupy hydroksylowe w pozycji 3 pierścienia węglowego i w pozycji 5 pierścienia A, wraz z grupą karbonylową w pozycji 4, są również istotne dla aktywności przeciwutleniającej tych związków. Podkreślić należy jednak, że aktywność biologiczna flawonoidów maleje wraz z rosnącym stopniem glikozylacji. Zatem glikozydy uznawane są za związki o mniejszym potencjale przeciwutleniającym niż odpowiadające im aglikony.

Jednym z najważniejszych ograniczeń, blokujących postęp w zakresie wyznaczenia zaleceń spożycia flawonoidów przez konsumentów, jest aktualnie brak odpowiednich metod analitycznych do oznaczania zawartości flawonoidów w żywności i poziomu ich spożycia w diecie. Badanie zawartości flawonoidów w produktach spożywczych jest utrudnione, co wynika ze złożonej struktury tych związków, zróżnicowanego ich rozmieszczenia i stężenia w surowcach roślinnych. Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC/MS) jest obecnie najczęściej stosowaną techniką identyfikacji i oznaczania ilościowego flawonoidów. Postęp badawczo-techniczny i możliwość wykorzystania ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją diodową, wielostopniowej spektrometrii mas o wysokiej rozdzielczości i dokładności (UHPLC-DAD-HRAM-MSn), umożliwia obecnie uzyskiwanie znacznie bardziej szczegółowych informacji o próbkach żywności.

Powszechnie do oznaczania zawartości flawonoidów w produktach spożywczych wykorzystuje się kilka technik. Spektrofotometria UV/Vis zyskała największe znaczenie, przede wszystkim z powodu prostoty procedury analitycznej, szybkości, niskich kosztów wykonania analiz i szerokiej dostępności spektrofotometrów w laboratoriach. Opracowano nawet dodatkowe procedury w tej metodzie dla zmniejszenia ilości zakłóceń, które mogą wpływać na absorpcję związków. Metoda spektrofotometryczna ilościowego oznaczania zawartości flawonoidów, opiera się na oznaczaniu kompleksu flawonoid-chlorek glinu, który zapewnia przesunięcie batochromowe i efekt hiperchromowy. W procedurze tej, podczas tworzenia się kompleksów istotne znaczenie ma kilka czynników, takich jak: czas reakcji, stężenie odczynnika $AlCl_3$ oraz struktura chemiczna flawonoidów, które należy wziąć pod uwagę.

4.2. Część praktyczna

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z wybranymi grupami flawonoidów, sposobami ich wyodrębniania oraz oznaczaniem ogólnej ich zawartości w różnych surowcach roślinnych

Analizowane produkty spożywcze

- nasiona roślin bobowatych (soja, fasola, itp.)

Odczynniki chemiczne

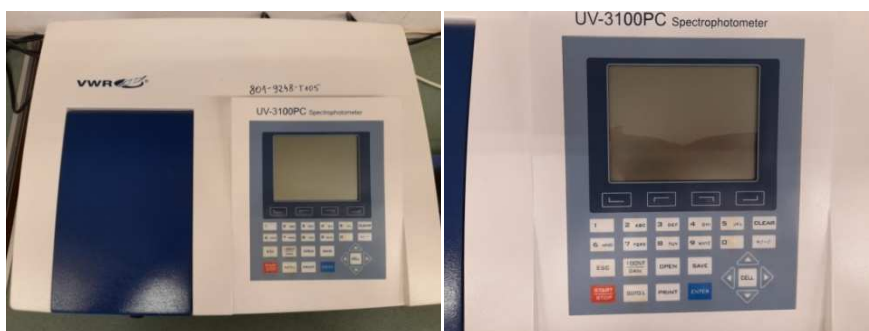
- 10% $AlCl_3 \cdot 6 H_2O$ metanolowy roztwór
- mieszanina C_3H_6O (aceton) : H_2O : HCl w stosunku 70:29:1

Szkło laboratoryjne, sprzęt i akcesoria

- waga laboratoryjna
- kolba miarowa o pojemności 25 ml
- probówki szklane
- probówki wirownicze
- pipety automatyczne
- wirówka laboratoryjna
- spektrofotometr UV-vis
- młynek laboratoryjny

Przygotowanie krzywej wzorcowej

Przygotować w kolbie miarowej o pojemności 25 ml roztwór wzorcowy kwercetyny o stężeniu 1 mg/ml (w mieszaninie aceton: woda: kwas solny). Ponumerować 6 probówek od 0 do 5. Odpipetować kolejno roztwór wzorcowy kwercetyny zgodnie z tabelą 1. Następnie do wszystkich probówek dodać (zgodnie z tabelą 1) odpowiednią ilość mieszaniny aceton:kwas solny:woda (70:29:1). Dodać 1 ml 2% $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (metanолоwowy roztwór). Zawartość wszystkich probówek dokładnie wymieszać i po upływie 10 minut zmierzyć absorbancję przy długości fali $\lambda=430$ nm, stosując jako próbę odniesieniową zawartość probówki oznaczonej numerem 0 (rys. 6).



Rys. 6. Spektrofotometr VWR UV-vis. Legenda panelu sterowania: GOTO λ – ustawianie długości fali; 0ABS- ustawianie dla pomiaru absorbancji próby ślepej.

Wykreślić krzywą wzorcową zależności stężenia kwercetyny (mg/ml) od wartości absorbancji (na papierze milimetrowym).

Tabela 1. Sposób przygotowania krzywej wzorcowej

Nr próby	Wzorzec kwercetyny (ml)	Mieszanina aceton:kwas solny:woda (ml)
0	-	1
1	0,125	0,875
2	0,250	0,750
3	0,500	0,500
4	0,750	0,250
5	1,000	-

Przygotowanie próbki

Nasiona roślin bobowatych, wskazane przez prowadzącego należy zmielić (rys. 7) w młynku laboratoryjnym (do postaci mąki).



Rys. 7. Młynek laboratoryjny do mielenia nasion roślin bobowatych

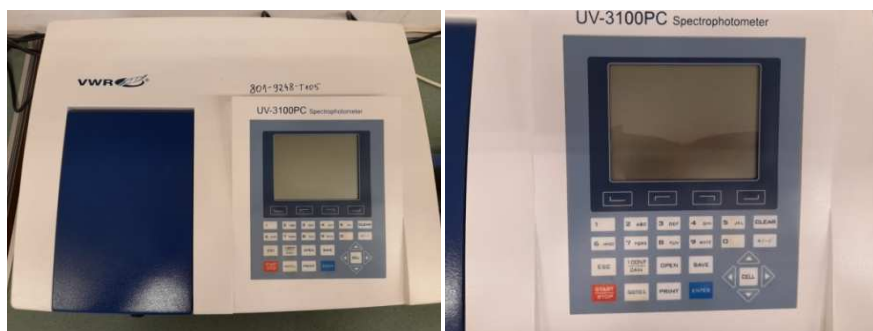
Następnie odważyć 0,25 g rozdrobnionej próbki i ekstrahować w 4 ml mieszaniny aceton:woda:kwas solny (próbki wirownicze). Przygotować w przedstawiony sposób 3 próbki (opisać w celu identyfikacji). Probki zwirować przez 10 minut przy prędkości 6800 (rys. 8). Po zwirowaniu z otrzymanych próbek pobrać supernatant i połączyć w 1 próbę (ekstrakt).



Rys. 8. Wirówka laboratoryjna MPW wraz ze stojakiem na próbki wirownicze – sposób umieszczenia próbek wirowniczych w rotorze wirówki

Oznaczenie właściwe

Pobrać 1 ml ekstraktu (po wirowaniu) i dodać 1 ml 2% $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (metanолоwый roztwór) i po upływie 10 minut, dokonać odczytu absorbancji przy długości fali $\lambda=430$ nm. Użyć jako próby ślepej 1 ml mieszaniny woda: aceton: kwas solny i 1 ml 2% AlCl_3 w metanolu.



Rys. 9. Spektrofotometr VWR UV-vis. Legenda panelu sterowania: GOTO λ – ustawianie długości fali; 0ABS- ustawianie dla pomiaru absorancji próby ślepej.

Obliczenia

Na podstawie wykreślonej krzywej wzorcowej określić zawartość flawonoidów w badanych mąkach z nasion roślin bobowatych (uwzględniając masę kwercetyny w 1 ml – krzywa wzorcowa, oraz masę nasion w 1 ml ekstraktu). Zawartość flawonoidów wyrazić jako ekwiwalent kwercetyny w mg na g produktu.

5. Określenie stopnia zafalszowania miodów poprzez oznaczenie cukrów redukujących

5.1. Wstęp teoretyczny

Miód jest naturalnym środkiem spożywczym. Jest to niezwykle złożony produkt spożywczy. Składa się w głównej mierze z cukrów i innych składników, takich jak enzymy, aminokwasy, kwasy organiczne, karotenoidy, witaminy, minerały i substancje aromatyczne. Miód jest także zasobny we flawonoidy i kwasy fenolowe, tj. związki czynne o szerokim zakresie działania biologicznego (naturalne przeciwutleniacze). Głównymi składnikami miodu są cukry proste (monosacharydy), takie jak glukoza i fruktoza, oraz cukry złożone (dwucukry), takie jak sacharoza. Dominującymi cukrami, występującymi w miodzie są glukoza i fruktoza.

Węglowodany są nie tylko istotnym źródłem energii czy błonnika pokarmowego w diecie, ale także kształtują właściwości organoleptyczne produktów spożywczych (smak, wygląd i tekstura). Określenie rodzaju i stężenia węglowodanów w żywności jest ważne z wielu powodów. Przede wszystkim ze względu na znakowanie produktów spożywczych wartością odżywczą, możliwość wykrywania zafalszowań, kształtowanie jakości żywności (właściwości fizykochemiczne żywności zależą od rodzaju i stężenia obecnych w niej węglowodanów) i procesy przetwarzania surowców i produktów spożywczych (wydajność przetwarzania jest uzależniona od rodzaju i stężenia obecnych w niej węglowodanów).

Węglowodany nazywane też sacharydami lub cukrami, składają się z atomów węgla, wodoru i tlenu. Chemicznie klasyfikuje się je jako:

- monosacharydy (glukoza, fruktoza i galaktoza),
- disacharydy (sacharoza, laktoza i maltoza),
- oligosacharydy (maltodekstryna, cyklodekstryna itp.),
- polisacharydy (skrobia, glikogen i celuloza).

Wolne monosacharydy można dodatkowo sklasyfikować w zależności od reakcji chemicznych, jakim ulegają, na cukry redukujące i nieredukujące. Cukry redukujące charakteryzują się wolnymi grupami hemiacetalowymi lub hemiketalowymi i mogą podlegać utlenianiu przez słabe czynniki utleniające. Do grupy cukrów redukujących zaliczane są glukoza, fruktoza i galaktoza (monosacharydy) oraz laktoza i maltoza (disacharydy). Oznaczanie ilościowe

tej grupy węglowodanów jest ważne dla przemysłu spożywczego, ponieważ ich zawartość w produktach spożywczych jest wskaźnikiem niektórych cech żywności, m.in. smaku, aromatu czy naturalności. Dodatkowo stężenie niektórych cukrów redukujących jest definiowane i kontrolowane przez ustawodawstwo europejskie. Dla miodu określono, że powinien on zawierać nie mniej niż 60 g cukru redukującego na 100 g produktu. Natomiast w przypadku win ich klasyfikacja następuje w zależności od stężenia cukrów (wytrawne - poniżej 5 g/l, półwytrawne - 5-15 g/l, półsłodkie - 15-25 g/l i słodkie - 25-125 g/l). Również w przypadku ziemniaków zawartość cukrów jest bezpośrednio związana z kolorem produktu końcowego po smażeniu. Wysoka koncentracja cukrów redukujących w ziemniakach prowadzi do ciemnienia w wyniku reakcji Maillarda (pomiędzy cukrami redukującymi a aminokwasami), co jest efektem niepożądanym. Natomiast niska zawartość cukrów redukujących skutkuje jasnymi kolorami produktów gotowych o pożądanej jakości.

Również w przypadku przetwarzania i przechowywania owoców zawartość cukrów redukujących jest ważnym parametrem. Stwierdzono bowiem, że zawartość cukrów ogółem i redukujących w owocach podczas przechowywania jest wyższa podczas przechowywania ich w temperaturze otoczenia w porównaniu z owocami przechowywanymi w warunkach chłodniczych. Może to wynikać nie tylko z tempa metabolizmu, ale również z faktu, że wysoka temperatura i niska wilgotność względna powodują przekształcenie nierozpuszczalnych węglowodanów w cukry rozpuszczalne. Również w przypadku poddawania owoców i warzyw zamrażaniu obserwuje się zmiany w poziomach cukrów redukujących. Skrobia podlega wówczas hydrolizie. Podczas zamrażalniczego przechowywania poziom cukrów redukujących wzrasta z powodu hydrolizy zarówno oligo- jak i polisacharydów przez jednostronny atak protonów na wiązanie glikozydowe, co prowadzi w efekcie do uwolnienia przede wszystkim glukozy.

Zdecydowana większość metod analitycznych, wykorzystywanych do ilościowego oznaczania cukrów redukujących, bazuje na detekcji kolorymetrycznej, która opera się na utlenianiu grup karbonylowych, a następnie reakcji z cząsteczką absorbującą promieniowanie UV-Vis. Najbardziej rozpowszechnione metody analityczne to metody Somogyi i Nelsona, Park i Johnsona, z kwasem 3,5-dinitrozosalicylowym (DNS), dwuchromianem miedzi (CuBic) oraz neokuproiną (Nc).

Wiele z metod analitycznych jest pracochłonnych i czasochłonnych. Zapotrzebowanie na odczynniki chemiczne i wymagane duże ilości próbek utrudniają często prowadzenie tzw. szybkich testów.

Cukry redukujące można analizować ilościowo metodą DNS. W procedurze tej stosuje się glukozę jako wzorzec (dla tego cukru wykonuje się krzywą wzorcową). DNS ulega reakcji z wolną grupą karbonylową cukrów redukujących w warunkach alkalicznych (pH zasadowe), tworząc w efekcie kwas 3-amino-5-nitrozosalicylowy. Produkt tej reakcji jest związkiem aromatycznym o maksymalnej absorpcji przy 540 nm, co umożliwi ilościowy pomiar spektrofotometryczny obecnych w próbkach cukrów redukujących.

Metoda ta pozwalała na wyznaczenie całkowitego stężenia cukrów redukujących znajdujących się w próbkach (m.in. w miodzie). Jednak jej ograniczeniem jest fakt, że w środowisku zasadowym oraz przy działaniu wysokiej temperatury, zarówno fruktoza, jak i glukoza są w stanie reagować z DNS i redukować go do ANS, co jest określane przez czerwono-brązowy kolor, który wytwarza. Przedstawiona metoda analityczna jest wygodną i stosunkowo niedrogą metodą, jednak ze stosunkowo niską specyficnością, aby prawidłowo interpretować wyniki należy przygotować dokładne krzywe wzorcowe, dla każdego cukru oddzielne.

5.2. Część praktyczna

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości cukrów redukujących w miodach i określenie czy ich koncentracja spełnia wymagania dla tej grupy produktów spożywczych lub czy zostały one zafałszowane.

Analizowane produkty spożywcze

- miód nektarowy
- miód spadziowy

Odczynniki chemiczne

- 1% [w/v] roztwór kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (DNS) w 0,4 M NaOH
- 10 mM roztwór glukozy

Szklano laboratoryjne, sprzęt i akcesoria

- waga analityczna
- naczynia wagowe
- mieszadło magnetyczne
- pipety automatyczne
- cylindry miarowe
- kolby miarowe o pojemności 100 ml
- probówki szklane

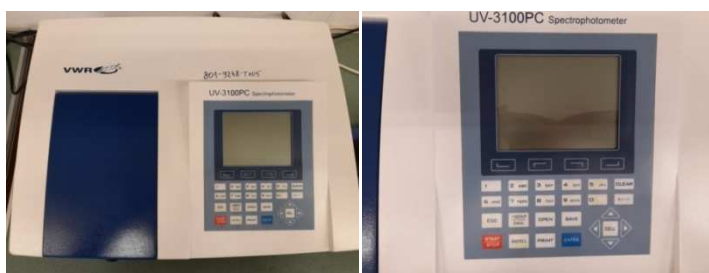
- spektrofotometr UV-vis
- łaźnia wodna

Przygotowanie próbki

Do kolby miarowej o pojemności 100 ml odważyć 1 g miodu (zapisać dokładną masę naważki), a następnie uzupełnić kolbę wodą destylowaną do kreski i mieszać, aż do całkowitego rozpuszczenia się miodu. Następnie przygotować po 5 ml roztworów miodu 10- i 100- krotnie rozcieńczonego, wykorzystując do tego metodę seryjnych rozcieńczeń. Tak samo postępować w przypadku obu próbek miodu.

Przygotowanie krzywej kalibracyjnej

Używając roztworu 10 mM glukozy i wody destylowanej sporządzić po 5 ml roztworów glukozy o stężeniu 1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10mM. Przygotować i podpisać 6 probówek szklanych, a następnie odmierzyć do nich roztwory wzorcowe według tabeli 2.



Rys. 10. Spektrofotometr VWR UV-vis. Legenda panelu sterowania: GOTOλ – ustawianie długości fali; 0ABS- ustawianie dla pomiaru absorancji próby ślepej.

Tabela 2. Przygotowanie roztworów wzorcowych glukozy

Nr próbówki	Roztwór i jego objętość		
	2 ml	4 ml	1 ml
1	Woda dejonizowana	Woda dejonizowana	1% DNS
2	1 mM glukoza	Woda dejonizowana	1% DNS
3	2,5 mM glukoza	Woda dejonizowana	1% DNS
4	5 mM glukoza	Woda dejonizowana	1% DNS
5	7,5 mM glukoza	Woda dejonizowana	1% DNS
6	10 mM glukoza	Woda dejonizowana	1% DNS

Zawartość probówek dokładnie wymieszać i wstawić na 15 minut do łaźni wodnej ustawionej na 100°C (rys. 11).



Rys. 11. Łaźnia wodna ze stojakiem na probówki

Probówki schłodzić i zmierzyć absorbancję roztworów przy długości fali 550 nm wobec próby zerowej (woda dejonizowana – probówka nr 1). Wykonać trzy pomiary absorbancji dla każdego stężenia glukozy (rys. 10). Wykreślić krzywą wzorcową na papierze milimetrowym (zależność stężenia glukozy od absorbancji).

Oznaczenie właściwe

Dla obu miodów należy postępować identycznie. Przygotować i opisać 4 probówki szklane. Do trzech z nich odmierzyć po 2 ml przygotowanego roztworu miodu, roztworu miodu 10- krotnie rozcieńczonego i roztworu miodu 100-krotnie rozcieńczonego. Do czwartej probówki dodać 2 ml wody dejonizowanej. Następnie do każdej probówki dodać 4 ml wody dejonizowanej i 1 ml roztworu 1% DNS. Zawartość probówek dokładnie wymieszać i wstawić na 15 minut do łaźni wodnej ustawionej na 100°C. Probówki schłodzić i zmierzyć absorbancję dla próbek miodów przy długości fali 550 nm wobec próby zerowej. Dla każdego roztworu miodu wykonać trzy pomiary absorbancji.

Opracowanie wyników

Na podstawie uzyskanych wartości absorbancji dla miodów oraz wyznaczonej krzywej kalibracyjnej wyznaczyć stężenie cukrów redukujących w przygotowanych roztworach miodu. Obliczyć zawartość cukrów redukujących w miodzie. Analiza wyników powinna obejmować stwierdzenia, co do prawidłowości zawartości cukrów oraz możliwym wykryciu zafałszowania.

6. Oznaczanie zawartości skrobi w mąkach pszennych oraz bezglutenowych metodą Ewersa

6.1. Wstęp teoretyczny

Mąka pszenna ma szereg właściwości funkcjonalnych w produkcji żywności, które są przypisywane w głównej mierze dwóm podstawowym składnikom wielkocząsteczkowym. Należą do nich gluten (białko) oraz skrobia (polisacharyd niestrukturalny). Skrobia zlokalizowana jest w bielmie w formie mikroskopijnych cząstek określanych jako granulki skrobiowe. Wyróżnia się skrobię typu A (duże granulki) i typu B (małe granulki). Oba rodzaje charakteryzują się odmienną morfologią, zawartością amylozy, względną krystalicznością i mikrostrukturą. Różnice te determinują właściwości termiczne i reologiczne mąk.

Ponadto właściwości funkcjonalne mąk pszennych zależą od ogólnego udziału dwóch typów polimerów D-glukozy w ziarnach skrobi, którymi są amyloza i amylopektyna. W skrobi pszennej amyloza stanowi od 25 do 28%. Natomiast udział amylopektyny jest znacznie większy i mieści się w zakresie 72-75%. Amyloza jest liniowym polisacharydem o cząsteczkach połączonych glikozydowymi wiązaniami α -(1-4). Występuje ona przede wszystkim w amorficznej skrobi, a jej rola związana jest z zahamowaniem wchłaniania wody, uplastycznianiem granulek skrobiowych i aktywnością chemiczną. Natomiast amylopektyna jest polisacharydem silnie rozgałęzionym, w którym cząsteczki połączone są wiązaniami α -(1-6)-glikozydowymi. Jest ona odpowiedzialna za krystaliczność skrobi, co z kolei wpływa na nierozpuszczalność w wodzie, właściwości pęcznienia i lepkość.

Skrobia jest głównym węglowodanem zapasowym w ziarnach pszenicy i stanowi około 60-75% ziarna. W mąkach pszennych jej udział wynosi 70-80%. Pełni ona niezwykle ważną rolę w żywieniu człowieka (ponad 50% spożycia kalorii w krajach zachodnich i do 90% w krajach rozwijających się). Podkreślić jednak należy, że szybkość, z jaką skrobia jest trawiona i wchłaniana w organizmie człowieka, może być zróżnicowana w zależności od jej składu. Niektóre rodzaje skrobi, które są trawione powoli, uważane są za pomocne w utrzymaniu poziomu glukozy we krwi. Dodatkowo skrobia jest również surowcem o ogromnym znaczeniu przemysłowym. Jest również szeroko wykorzystywana w przemyśle spożywczym, papierniczym, tekstylnym,

chemicznym i farmaceutycznym, m.in. jako zagęszczacz, stabilizator, klej, środek żelujący, środek zatrzymujący wodę i substancja wypełniająca.

Należy pamiętać, że skrobia jest makroskładnikiem wielu produktów spożywczych, a jej właściwości i interakcje z innymi składnikami (woda, lipidy), są obecnie przedmiotem zainteresowania przemysłu spożywczego i żywienia człowieka. Możliwości przewidywania funkcjonalności skrobi bazujące na wiedzy o jej strukturze a także wyjaśnienie sposobu jej oddziaływania z innymi głównymi składnikami produktów spożywczych, pozostają jednymi z najważniejszych wyzwań w technologii żywności. Wiadomo już, że amyloza w skrobi determinuje upakowanie amylopektyny w kryształy i organizację lameli krystalicznych w granulkach, co jest istotne dla właściwości związanych z pobieraniem wody. Natomiast na własności termiczne i tworzenie żelu może mieć wpływ zarówno zawartość amylozy, jak i sama struktura amylopektyny. Obecnie wskazanie związku pomiędzy strukturą granulki skrobi a przydatnością do określonego procesu produkcji żywności lub jej właściwościami odżywczymi jest głównym elementem wyzwań dla chemii żywności.

Do oznaczania zawartości węglowodanów w żywności stosuje się wiele różnych metod analitycznych (metody wagowe, chemiczne, polarymetryczne). Najczęściej stosowane metody obejmują pomiar współczynnika załamania światła oraz wykorzystanie spektroskopii w podczerwieni IR. Wykorzystuje się również enzymatyczne oznaczanie zawartości skrobi i produktów jej degradacji w produktach żywnościowych z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC. Powszechnie stosowane procedury oznaczania skrobi w żywności opierają się również na metodach grawimetrycznych, jodometrycznych i polarymetrycznych. W Unii Europejskiej metoda polarymetryczna jest oficjalną metodą stosowaną do analizy skrobi w paszach.

W metodach polarymetrycznych wykorzystuje się zależność, że cząsteczki, zawierające asymetryczny atom węgla, mają zdolność do skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego. Do pomiarów wykorzystuje się polarymetr, który jest urządzeniem mierzącym kąt, o jaki obraca się światło spolaryzowane podczas przechodzenia przez badany roztwór. Polarymetr składa się ze źródła światła monochromatycznego, polaryzatora, rurki szklanej na próbkę oraz analizatora mierzącego kąt rotacji. Stopień polaryzacji jest zależny od stężenia optycznie czynnych cząsteczek. Wartość kąta skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego zależy również od temperatury i długości fali użytego światła, dlatego parametry te są zwykle standaryzowane na 20°C i 589,3 nm (linia D dla sodu). Podkreślić należy także, że zawartość skrobi w większości produktów spożywczych nie może być analizowana w sposób bezpośredni. Wynika to

z faktu, iż skrobia znajduje się w strukturalnie i chemicznie złożonej matrycy żywnościowej. Sama skrobia często występuje w postaci półkryształicznej (skrobia granulowana lub retrogradowana), która jest niedostępna dla odczynników chemicznych, powszechnie używanych do oznaczania jej koncentracji. W związku z tym, przed przeprowadzeniem procedury analitycznej, niezbędne jest jej wyizolowanie z innych składników obecnych w matrycy żywnościowej. Pierwszym sposobem jest wirowanie. Granulki skrobi są nierozpuszczalne w wodzie i mają stosunkowo dużą gęstość (1500 kg/m^3), w związku z tym podczas wirowania można je oddzielić od innych materiałów rozpuszczalnych w wodzie o mniejszej gęstości. Drugim sposobem oddzielenia skrobi jest wykorzystanie różnej rozpuszczalności związków chemicznych. Monosacharydy i oligosacharydy są rozpuszczalne w roztworze etanolu, natomiast skrobia jest nierozpuszczalna. Dlatego w dalszym etapie skrobię można oddzielić od węglowodanów, filtrując lub odwirowując roztwór.

6.2. Część praktyczna

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości skrobi w mąkach pszennych oraz bezglutenowych metodą polarymetryczną w roztworze kwasu solnego.

Analizowane produkty spożywcze

- Mąki pszenne
- Maki bezglutenowe

Odczynniki chemiczne

- kwas solny (ciężar właściwy 1,19 i 1,125 g/ml)
- roztwór Carreza I (rozpuścić w wodzie 21,9 g octanu cynku, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COOH})_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ i 3 g lodowatego kwasu octowego. Uzupełnić wodą do 100 ml)
- roztwór Carreza II (rozpuścić w wodzie 10,6 g heksacyjanożelazianu (II) potasu $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3\text{H}_2\text{O}$. Uzupełnić do 100 ml wodą)

Szkło laboratoryjne, sprzęt i akcesoria

- zlewki o pojemności 150 ml
- kolby miarowa o pojemności 100 ml
- pipety
- lejek
- sączek twardy
- polarymetr kołowy

Przygotowanie próbki

Od tego momentu przygotowanie próbki wykonywać pod dygestorium w fartuchu kwasoodpornym. Pobrać 2,5 g próbki (dwie próbki różnych mąk przygotowywać analogicznie) do zlewki o pojemności 150 ml z 10 ml wody destylowanej i dodać 20 ml stężonego (c. wł. 1,19 g/ml) kwasu solnego, dokładnie wymieszać i pozostawić na 30 minut. Po tym czasie całą próbkę przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 100 ml, popłukując zlewkę trzykrotnie kwasem solnym o c.wł. 1,125 g/ml, używając do tego celu za każdym razem 10 ml kwasu (nie uzupełniać do kreski).

Odbiałczanie

Do kolbki zawierającej badaną próbkę dodać 20 ml Carreza I, delikatnie wymieszać i odstawić na 5 min, po tym czasie dodać 20 ml Carreza II delikatnie wymieszać i pozostawić na 15 min. Uzupelnąć do kreski używając do tego celu kwasu solnego o c.wł. 1,125 g/ml wymieszać i sączyć przez popałdowany sączek (twardy).

Oznaczanie właściwe

Włączyć polarymetr (rys. 12) i odczekać około 5 minut przed dokonaniem pomiaru. Otrzymany przesącz oznaczyć polarymetrycznie w rurce o długości 20 cm, pamiętając o wyzerowaniu aparatu. Pomiaru dokonać trzykrotnie dla każdej z analizowanych mąk).



Rys. 12. Polarymetr kołowy wraz z rurką polarymetryczną

Obliczenia

Mnożąc odczytany kąt skręcenia płaszczyzny polaryzacji przez współczynnik 0,2475 uzyskuje się zawartość skrobi w gramach w analizowanej naważce. Mnożąc natomiast przez 9,90 otrzymuje się procentową zawartość skrobi w badanym produkcie. Zawartość skrobi obliczyć w g/100g. Za wynik

końcowy przyjmuje się średnią arytmetyczną z przynajmniej dwóch równoległych oznaczeń. Wskazać różnice pomiędzy zawartością skrobi w obu mąkach.

7. Kompleksometryczne oznaczanie jonów wapnia i magnezu w wodach mineralnych

7.1. Wstęp teoretyczny

Woda jest niezbędnym składnikiem diety człowieka, dostarczającym wielu mineralnych składników. Jest składnikiem wszystkich produktów spożywczych, jednak nie stanowią one dla organizmu człowieka podstawowego źródła. Zdaniem dietetyków, należy zapewnić dzienne spożycie na poziomie 1,5 - 2 litrów wody. Odpowiednie nawodnienie jest niezbędnym czynnikiem do utrzymania równowagi w organizmie. Jednak podkreślić należy, że szacowane zapotrzebowanie na wodę może być zróżnicowane u poszczególnych osób ze względu na wiek, aktywność fizyczną, sytuację osobistą, a także warunki pogodowe.

Woda pitna nie jest czystym związkiem chemicznym, jak woda destylowana. Zawartość pewnych ilości rozpuszczonych substancji stałych i niektórych niezbędnych pierwiastków jest konieczna dla zdrowia. Skupienie się jedynie na badaniach mikrobiologicznych i toksykologicznych jest niewystarczające i powinno zostać rozszerzone o niektóre składniki mineralne.

Skład mineralny wód powierzchniowych i podziemnych jest zróżnicowany i uzależniony od wysokości nad poziomem morza, topografii, warunków hydrologicznych i biologicznych. Na przestrzeni ostatnich lat obserwuje się wzrost spożycia butelkowanej wody mineralnej. Tendencja ta ma charakter ogólnoświatowy i często związana jest z rosnącymi obawami o jakość wody, a także z poszukiwaniem zdrowszego stylu życia i lepszego samopoczucia. Analiza jakości wody pitnej jest przeprowadzana na podstawie wyników badań fizykochemicznych i mikrobiologicznych. We właściwościach fizykochemicznych wód butelkowanych mogą występować różnice w zależności od składu źródeł wody, zastosowanych procedur uzdatniania i procedur oczyszczania oraz czynników środowiskowych. Dodatkowo zmiany w składzie chemicznym wody mogą być efektem warunków i czasu przechowywania i transportu.

Zgodnie z obowiązującym w Polsce rozporządzeniem Ministra Zdrowia (Dz.U. 2011 nr 85 poz. 466) w sprawie naturalnych wód mineralnych, wód źródłanych i wód pitnych, zgodnym z przepisami Unii Europejskiej (No.

2009/54/EC), naturalne wody mineralne wyróżniają się spośród innych wód butelkowanych stabilnością składu mineralnego, a także stabilnością właściwości mineralnych o znaczeniu fizjologicznym, mającymi korzystny wpływ na zdrowie człowieka.

Woda mineralna zawsze zawiera różne minerały oraz pierwiastki śladowe. Związki mineralne są niezbędne człowiekowi do odżywiania, wzrostu, podtrzymywania funkcji organizmu oraz dobrego samopoczucia. Woda zawiera szereg makro – i mikroelementów, w tym Ca, K, Mg, Na, P i S, oraz Co, Cr, Cu, Fe, I, Mn, Mo, Se, V i Zn, które są uważane za niezbędne dla wielu funkcji życiowych. Woda naturalna nie ma żadnej kaloryczności, nie zawiera również cukru ani sztucznych składników. Wśród najważniejszych makroelementów występujących w wodach mineralnych należy wymienić wapń oraz magnez. Wapń ma uznaną rolę w rozwoju kości, regulacji skurczów mięśni i aktywności mięśnia sercowego. Pełni również funkcje w procesach krzepnięcia krwi, przekazywania impulsów nerwowych oraz regulacji przepuszczalności komórek. Wapń jest kationem, który może być połączony z różnymi anionami (wodorowęglan, siarczan), które to nadają wodom mineralnym specyficzne właściwości. Dodatkowo stwierdzono, że biodostępność wapnia jest porównywalna z wód mineralnych oraz produktów mlecznych lub preparatów farmaceutycznych. Europejska Agencja Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) uznała, że oświadczenie zdrowotne dotyczące wapnia pozwala stwierdzić, że wody mineralne zasobne w Ca mogą być spożywane jako "żywność funkcjonalna". Wody mineralne z wysoką koncentracją wapnia (powyżej 150 mg/l) są zalecane dla młodzieży, kobiet w ciąży, osób niespożywających produktów mlecznych, mężczyzn w podeszłym wieku.

Drugim niezwykle ważnym makroelementem, wchodzącym w skład wód mineralnych, jest magnez. Mineral ten pełni ważną rolę w tworzeniu kości, aktywności nerwowej i mięśniowej, a także metabolizmie lipidów i syntezie białek. Magnez, podobnie jak wapń, może być połączony z innymi minerałami. Wody mineralne, zawierające siarczan magnezu, wykazują udowodnione działanie w poprawie pracy jelit. Wyniki wielu badań wskazują, że w populacji europejskiej wysokie stężenie magnezu w wodzie pitnej (powyżej 50 mg/l) może przyczyniać się do zmniejszania ryzyka śmiertelności z powodu choroby wieńcowej serca.

Do najbardziej popularnych metod analitycznych oznaczania zawartości wapnia i magnezu w wodach mineralnych należy metoda miareczkowania kompleksometrycznego. Jest ona wykorzystywana do oznaczania całkowitej zawartości wapnia i magnezu. Może posłużyć również do wyznaczenia twardości całkowitej wody słodkiej (przy uwzględnieniu odpowiednich

rozcieńczeń roztworów), ponieważ za miarę twardości wody uznawana jest łączna zawartość jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} . W omawianej metodzie analitycznej cząsteczka EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy) tworzy kompleks z jonami wapnia i magnezu. Jako wskaźnik wykorzystywany jest niebieski barwnik czerń eriochromowa T. Barwnik ten również tworzy kompleks z wymienionymi jonami, czego efektem jest jego zmiana koloru z niebieskiej na różową. Utworzony kompleks wskaźnik - jon metalu jest mniej stabilny niż kompleks kwas etylenodiaminotetraoctowy - jon metalu. Roztwór próbki, zawierający jony wapnia i magnezu ulega reakcji z nadmiarem EDTA. Dodany wskaźnik pozostaje niebieski, ze względu na fakt, że wszystkie obecne jony Ca^{2+} i Mg^{2+} są skompleksowane z kwasem etylenodiaminotetraoctowym. Kolejne miareczkowanie następuje z wykorzystaniem roztworu chlorku magnezu. Roztwór ten tworzy kompleks z nadmiarem cząsteczek kwasu etylenodiaminotetraoctowego aż do punktu końcowego (cały nadmiar EDTA zostanie skompleksowany). Natomiast jony Mg^{2+} w roztworze MgCl_2 zaczynają wówczas tworzyć kompleksy z czernią eriochromową T, zmieniając jej kolor z niebieskiej na różową.

7.2. Część praktyczna

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości wybranych jonów - wapniowego (Ca^{2+}) oraz magnezowego (Mg^{2+}) w naturalnych butelkowanych wodach mineralnych.

Analizowane produkty spożywcze

- wody mineralne butelkowane

Odczynniki chemiczne

- mianowany roztwór Na_2EDTA o stężeniu 0,01 mol/l
- mureksyd
- 1 M roztwór NaOH
- czerń eriochromowa T
- bufor amonowy o pH 10



Rys. 13. Wskaźniki do oznaczeń kompleksometrycznych

Szkło laboratoryjne, sprzęt i akcesoria

- kolba miarowa o pojemności 100 ml
- biureta
- pipety szklane
- cylinder miarowy
- kolba Erlenmeyera

7.2.1. Oznaczanie jonów wapnia

Przygotowanie próbki

Otrzymaną od Prowadzącego w kolbie miarowej (o pojemności 100 ml) próbkę dopełnić wodą destylowaną do kreski i dokładnie wymieszać. Biuretę napełnić titrantem (pilnując, aby nie powstały w niej żadne pęcherzyki powietrza). Pipetą przenieść 20 ml rozcieńczonej próbki do kolby Erlenmeyera, dodać 10 ml 1M roztworu NaOH i 50 ml wody. Następnie dodać szpatułką szczyptę mieszaniny mureksydu z chlorkiem sodu (trituracja 1000 mg mureksydu z 20g NaCl cz.d.a.).

Oznaczenie właściwe

Przygotowaną próbkę miareczkować mianowanym roztworem soli sodowej EDTA do zmiany zabarwienia z różowego na fioletkowe. Otrzymany wynik zanotować, a następnie wykonać drugie oraz trzecie miareczkowanie (powtórzenie).

Obliczenia

Korzystając z wartości średniej obliczyć zawartość jonów wapnia w otrzymanej próbce w gramach. Zawartość jonów wapnia obliczyć według wzoru:

$$Ca = c \times V \times M$$

gdzie:

c – stężenie molowe EDTA [mol/l],

V – objętość EDTA [l],

M – masa molowa wapnia [g/mol]

7.2.2. Oznaczanie jonów magnezu**Przygotowanie próbki**

Otrzymaną od Prowadzącego w kolbie miarowej o objętości 100 ml próbkę dopełnić wodą destylowaną do kreski i dokładnie wymieszać. Pipetą przenieść 20 ml rozcieńczonej próbki do kolby Erlenmeyera, dodać 2 ml roztworu mieszaniny buforowej o pH 10 i 50 ml wody. Szpatułką dodać szczyptę mieszaniny czerni eriochromowej T z chlorkiem sodu (trituracja 100 mg wskaźnika z 20 g NaCl cz.d.a.).

Oznaczenie właściwe

Miareczkować mianowanym roztworem soli sodowej EDTA do zmiany zabarwienia z różowo-fioletowego na niebieskie. Otrzymany wynik zanotować, a następnie wykonać drugie i trzecie miareczkowanie.

Obliczenia

Korzystając z wartości średniej obliczyć zawartość jonów magnezu w otrzymanej próbce, korzystając ze wzoru:

$$Mg = c \times (V_1 - V_2) \times M$$

gdzie:

c – stężenie EDTA [mol/l],

V₁ – objętość EDTA zużyta na miareczkowanie sumy jonów wapnia i magnezu [l],

V₂ – objętość EDTA zużyta na miareczkowanie zawartości wapnia [l],

M – masa molowa magnezu [mol/g].

8. Ocena kwasowości produktów spożywczych jako wskaźnika ich świeżości i autentyczności

8.1. Wstęp teoretyczny

Chemia i analiza żywności definiują dwa powiązane ze sobą pojęcia, dotyczące kwasowości tj. pH i kwasowość miareczkowa. Do każdego rodzaju kwasowości przypisana jest inna metoda analityczna, a każda z tych wielkości ma swój własny, specyficzny wpływ na jakość żywności. Kwasowość miareczkowa określana również jako kwasowość ogólna, wskazuje całkowite stężenie kwasów w żywności. Wyznaczana jest poprzez miareczkowanie kwasów w produktach spożywczych przy użyciu zasady. Dowiedziono, że kwasowość miareczkowa stanowi bardziej przydatny wskaźnik wpływu zawartości kwasu na smak żywności niż wartość pH. Natomiast należy podkreślić, że wartość kwasowości ogólnej nie daje pełnego obrazu o produktach spożywczych, szczególnie pod kątem ich stanu mikrobiologicznego. Możliwość rozwoju drobnoustrojów w produkcie spożywczym jest uzależniona w dużo większym stopniu od stężenia wolnych jonów hydroniowych niż od całkowitego stężenia kwasów. W związku z tym w analizie żywności istnieje potrzeba ilościowego określania stężenia tych wolnych jonów, co związane jest z drugim rodzajem kwasowości jakim jest pH, określane również jako kwasowość czynna. W produktach spożywczych pH nie zależy jedynie od rodzaju i stężenia obecnych kwasów, ale także od stężenia zjonizowanych odpowiedników kwasów (tzn. ich sprzężonych zasad).

Jak już wspomniano kwasowość miareczkowa określa całkowite stężenie kwasów w surowcach i produktach spożywczych. Do grupy kwasów spożywczych zalicza się najczęściej kwasy organiczne, takie jak kwas cytrynowy, jabłkowy, mlekowy, winowy czy octowy. Podkreślić należy jednak, że kwasy nieorganiczne (fosforowy, węglowy), bardzo często pełnią bardzo ważną, a nawet dominującą funkcję w zakwaszaniu żywności. Obecność kwasów organicznych w produktach spożywczych jest determinantem wielu ich cech sensorycznych i atrybutów jakościowych. Smak, barwa (antocyjany i inne barwniki wykazują odmienną barwę w zależności od odczynu środowiska), stabilność mikrobiologiczna (wrażliwość mikroorganizmów na pH), oraz jakość przechowalnicza (chemiczna wrażliwości składników produktów na pH) są efektem koncentracji kwasów organicznych w żywności. Kwasy organiczne

mogą być naturalnie obecne w żywności. Jednakże mogą również powstawać podczas fermentacji lub mogą być dodawane do żywności celowo (jako środek konserwujący).

Procedury określania kwasowości są jednymi z podstawowych analiz, którym poddaje się produkty spożywcze. Kwasowość odgrywa kluczową rolę w zapewnieniu, że żywność dostarczana konsumentom, spełnia wymagania dotyczące m.in. takich cech, jak wygląd, konsystencja, smak, czy też zawartość składników odżywczych. Ocena kwasowości ma również ogromne znaczenie dla zapewnienia, że produkty spełniają wymagania przepisów prawnych i nie stanowią zagrożenia dla bezpieczeństwa lub zdrowia konsumentów. Generalnie uznaje się, że zawartość kwasów jest ważną cechą produktów spożywczych i napojów, a analizy tego wskaźnika są ważne w całym łańcuchu wartości w przetwórstwie żywności (kryterium określania świeżości i składu surowych składników oraz łatwo psującej się żywności). Ocena kwasowości miareczkowej jest źródłem szczegółowych wskazówek, dotyczących niektórych łatwo psujących się produktów (np. mleko, olej, soki owocowe). Na podstawie wyników badań kwasowości miareczkowej można na przykład stwierdzić, że mleko z podwyższoną zawartością kwasu mlekowego może być skażone bakteriami. Natomiast odnotowanie obecności kwasu winowego lub jabłkowego w sokach mieszanych wskazuje na obecność pewnych rodzajów owoców, co może być informacją o ich możliwym zafałszowaniu (metoda HPLC).

W dalszym etapie, analizy kwasowości produktów, takich jak świeże soki, mogą być niezwykle cennym elementem informacyjnym, który pomoże w spełnieniu wymagań, dotyczących oznakowania żywności, a także w zapobieganiu reakcjom alergicznym i innym formom chorób dietozależnych.

Kwasowość ogólną w produktach spożywczych oznacza się miareczkując znaną ilość próbki za pomocą titranta wraz z czujnikiem lub wskaźnikiem (np. fenoloftaleina), które określają punkt końcowy miareczkowania. W praktyce laboratoryjnej wykorzystuje się miareczkowanie kwasowo-zasadowe, miareczkowanie redoks i miareczkowanie kolorymetryczne. W miareczkowaniu kwasowo-zasadowym wykorzystuje się czujniki pH do oznaczania ilości titranta niezbędnego do reakcji z kwasem jabłkowym, winowym, cytrynowym, octowym i innymi kwasami organicznymi obecnymi w owocach, sokach, przyprawach na bazie octu i winie. Można ją określić poprzez miareczkowanie próbki silną zasadą, która neutralizuje kwas obecny w próbce. Objętość użytego titranta, wraz z normalnością zasady i objętością (lub masą) próbki, jest wykorzystywana do obliczenia kwasowości miareczkowej, wyrażonej w przeliczeniu na dominujący kwas organiczny.

Kwasowość potencjalna ma swoje jednostki i może być wyrażana jako stężenie molowe (liczba moli kwasu w 1000 ml roztworu), w procentach masowych (liczba gramów kwasu w 100 g roztworu) oraz w procentach mieszanych (liczba gramów kwasu w 100 ml roztworu).

Kwasowość można wyrażać również za pomocą tzw. jednostek umownych. Wśród nich wyróżnia się stopnie Delbrücka (odpowiadają liczbie ml roztworu NaOH o stężeniu 1 mol/l zużytego na zobojętnienie 20 ml roztworu kwasu), stopnie Soxhleta-Henkla (odpowiadają liczbie ml roztworu NaOH o stężeniu 0,25 mol/l zużytego na zobojętnienie kwasów obecnych w 100 ml roztworu) oraz stopnie kwasowości (liczba ml roztworu NaOH o stężeniu 1 mol/l zużyta na zobojętnienie kwasów zawartych w 100 g produktu).

Jakość mleka jest ważnym zagadnieniem dla jego producentów i przetwórców, ponieważ wpływa ona na wykorzystanie produktu końcowego. Jest ona określana na podstawie koncentracji tłuszczu, białka, całkowitej zawartości suchej masy, liczby bakterii oraz liczby komórek somatycznych, a także kwasowości miareczkowej. Bazując na wynikach pomiarów kwasowości można stwierdzić czy mleko jest świeże, nakwaszone czy zafalszowane. Generalnie ujmując wraz ze wzrostem poziomu kwasu mlekowego wzrastają wartości uzyskane podczas miareczkowania. Obecność kwasu mlekowego ulega zwiększeniu w mleku przez działalność bakterii, które przekształcają cukier. Jednocześnie należy pamiętać, że mleko ma silną zdolność buforowania dzięki zawartości białek, odpornych na zmiany zawartości kwasów lub zasad, co również wpływa na kwasowość mleka.

Mąka to produkt spożywczy, który jest powszechnie wykorzystywany w codziennym życiu do produkcji wyrobów, takich jak takich jak chleb, makaron, herbatniki itp. Na rynku istnieje wiele różnych typów mąki, które różnią się w zależności od rodzaju użytego ziarna (pszenica, kukurydza, ryż, owies itp.), różnej mieszanki części ziarna (T00, T0, ziarno z całej pszenicy itp.) celu wykorzystania (makaron, uniwersalne zastosowanie, chleb, itp.). Mąki charakteryzują się odczynem kwaśnym, co wynika przede wszystkim z obecności kwaśnych fosforanów magnezu oraz potasu i wapnia. Ocena kwasowości miareczkowej mąk jest ważnym wskaźnikiem ich jakości i przydatności. W trakcie przechowywania następować może wzrost poziomu kwasowości, wynikający z działalności rodzimych enzymów, prowadzącej do rozkładu związków fosforanowych, lipidów i białek. Efektem tego jest zwiększenie koncentracji substancji kwaśnych, (m.in. kwas fosforowy, kwasy tłuszczowe, aminokwasy). Biorąc pod uwagę aspekt jakościowy, najbardziej niekorzystny jest wzrost kwasowości wywołwany poprzez rozkład tłuszczów.

8.2. Część praktyczna

Celem ćwiczenia jest oznaczenie kwasowości ogólnej w wybranych produktach spożywczych dla wskazania ich świeżości bądź zafałszowania.

Analizowane produkty spożywcze

- sok owocowy
- twaróg
- piwo
- mąka

Odczynniki chemiczne

- 0,1 M roztwór NaOH
- 0,25 M roztwór NaOH
- 1% alkoholowy roztwór fenoloftaleiny
- 2% alkoholowy roztwór fenoloftaleiny
- papierek wskaźnikowy uniwersalny z barwną skalą wzorców

Szkło laboratoryjne, sprzęt i akcesoria

- cylinder miarowy
- kolba miarowa o pojemności 250 ml
- kolba stożkowa o pojemności 250 ml
- zlewka
- pipety szklane
- moździerz
- pH-metr
- biureta
- lejek
- bagietka szklana
- sączek

8.2.1. Oznaczenie kwasowości ogólnej w soku owocowym

Oznaczenie polega na zobojętnieniu kwasów obecnych w badanym roztworze przez miareczkowanie roztworem wodorotlenku sodu w obecności fenoloftaleiny jako wskaźnika lub przy zastosowaniu papierka wskaźnikowego.

Przygotowanie próbek

Odmierzyć do zlewki 25 ml badanego soku. Dodać 100 ml wody destylowanej i zagrzać do wrzenia. Następnie roztwór oziębić i przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 250 ml. Dopełnić wodą destylowaną

do kreski, wymieszać i pozostawić na 15 minut. Po tym czasie zawartość kolby przesączyć przez sączek filtracyjny. W otrzymanym przesączu oznaczyć kwasowość ogólną.

Oznaczenie właściwe

Do kolby stożkowej odmierzyć pipetą 20 ml soku, przygotowanego zgodnie z procedurą powyżej. Do soku o jasnym zabarwieniu dodać 3 krople fenoloftaleiny i miareczkować 0,1 M roztworem NaOH do wystąpienia jasnoróżowej barwy. Natomiast roztwory o ciemnym zabarwieniu miareczkować 0,1 M roztworem NaOH wobec papierka wskaźnikowego. Podczas miareczkowania nanosić szklaną bagietką próbkę na papierek wskaźnikowy i porównywać kolor ze skalą barw papierka. Zakończyć miareczkowanie w momencie, kiedy kropla roztworu badanego, naniesiona na papierek będzie miała taki sam kolor, jak barwa na skali odpowiadająca pH 8.

Obliczenia

Kwasowość ogólną (KO) w g/100 ml produktu lub g/100 g produktu obliczyć wg wzoru:

$$KO = \frac{a \times n \times K}{c} \times 100$$

gdzie:

- a – objętość roztworu NaOH zużyta do miareczkowania roztworu badanego, ml ,
- n – molowość roztworu NaOH,
- c – masa lub objętość produktu badanego zawartego w roztworze miareczkowanym, g lub ml (20 ml roztworu odpowiada 2 g produktu)
- K – współczynnik do przeliczania wyniku na odpowiedni kwas w zależności od rodzaju badanego produktu. Kwasowość w produktach z owoców jagodowych i cytrusowych przeliczyć na kwas cytrynowy, K=0,064. Kwasowość w produktach z owoców ziarnkowych i pestkowych przeliczyć na kwas jabłkowy, K=0,067.

Kwasowość ogólną odnieść do odpowiednich norm jej poziomu w sokach. We wniosku sformułować spostrzeżenia na temat świeżości i autentyczności soków.

8.2.2. Oznaczenie kwasowości ogólnej w serach według PN-A-04018:1975

W serach oznacza się kwasowość ogólną, lotną i czynną [pH]. Zgodnie z tą normą kwasowość ogólną serów wyraża się w stopniach Soxhletha-Henkla.

Oznaczenie polega na zobojętnieniu kwasów zawartych w 100 g produktu roztworem 0,25 M NaOH wobec wskaźnika fenoloftaleiny.

Przygotowanie próbki

Odważyć (z dokładnością do 0,01 g) 10 g sera, przenieść ilościowo do moździerza i dokładnie rozetrzeć. W cylindrze miarowym odmierzyć 100 ml wody destylowanej podgrzanej do 40°C i stopniowo dodawać do rozcieranego sera, aż uzyska się jednolitą mieszaninę. Następnie do zawartości moździerza dodać 2 ml 2% roztworu fenoloftaleiny i (nadal w moździerzu) miareczkować 0,25 M roztworem NaOH do wystąpienia jasnorożowego zabarwienia nie znikającego przez 30 sekund.

Obliczanie wyników

Kwasowość sera podać w stopniach Soxhleeta-Henkla (°SH) Wynik obliczyć według wzoru:

$$X = a \times 10$$

gdzie:

x – kwasowość sera w stopniach Soxhleeta-Henkla,

a – objętość 0,25 M roztworu NaOH zużyta do miareczkowania próbki sera (ml).

Odnieść uzyskane wyniki dla dopuszczalnych poziomów kwasowości dla serów. Kwasowość w stopniach SH dla twarożku chudego wynosi do 80, dla twarożku tłustego do 75, dla twarogu kwaskowatego chudego do 120, a dla twarogu kwaskowatego półtłustego do 100.

8.2.3. Oznaczanie kwasowości ogólnej piwa

Przygotowanie próbki

Próbkę piwa należy odgazować, doprowadzając ją do temperatury 20°C, przelać do kolby i przykryć. Następnie wytrząsać tak długo, aż w momencie odchylenia nie będzie wyczuwalny gaz.

Oznaczenie właściwe

Do zlewki o pojemności 250 ml, odmierzyć 50 ml odgazowanego piwa. Następnie zanurzyć w cieczy elektrodę pH-metru i ciągle mieszając miareczkować roztworem NaOH o stężeniu 0,1 M do chwili, kiedy pH-metr wskaże pH 8.

Obliczenia

Wynik, w ml roztworu NaOH na 100 ml piwa (KP) obliczyć według wzoru:

$$KP = \frac{a \times 2 \times m}{10}$$

gdzie:

a – objętość NaOH o stężeniu 0,1 M zużytego do miareczkowania

m – współczynnik przeliczeniowy na ścisłe miano 0,1 M NaOH

2 – przeliczenie wyniku miareczkowania próbki na 100 ml.

Uzyskane wyniki odnieść do dopuszczalnych poziomów kwasowości piwa. Kwasowość w piwie powinna mieścić się w zakresie 4,3 – 4,6.

8.2.4. Oznaczanie kwasowości mąki w zawiesinie

Oznaczenie właściwe

Odważyć (z dokładnością do 0,01 g) 5 g mąki i przenieść do kolby stożkowej o pojemności 250 ml. W cylindrze miarowym odmierzyć 100 ml zimnej wody destylowanej i stopniowo dodawać (porcjami po około 10 ml) do kolby z mąką. W celu rozbicia tworzących się grudek mąki, zawartość kolby mieszać dokładnie szklaną bagietką. Uzyskaną zawiesinę starannie wymieszać i odstawić na 5 minut. Następnie dodać 3 krople roztworu fenoloftaleiny i miareczkować 0,1 M roztworem NaOH do wystąpienia trwałego słabo różowego zabarwienia. Oznaczenie wykonać trzykrotnie.

Obliczenia

Kwasowość mąki (KM) w stopniach obliczyć według wzoru:

$$KM = 20 \times a \times n$$

gdzie:

a – objętość roztworu 0,1 M NaOH zużytego do miareczkowania (ml)

n – molowość NaOH

20 – współczynnik do przeliczania kwasowości w stopniach kwasowości

Uzyskane wyniki odnieść do danych literaturowych (rodzaj mąki, wpływ czasu i warunków przechowywania na kwasowość mąki).

Tabela 3. Wymagania jakościowe dla wybranych przetworów zbożowych

Rodzaj mąki	Kwasowość mąki w zawiesinie (w stopniach kwasowości)
Mąka pszenna tortowa, typ 450	do 3,5
Mąka pszenna wrocławska, typ 500	do 3,5
Mąka pszenna krupczatka, typ 500	do 3
Mąka pszenna sitkowa, typ 1400	do 7
Mąka pszenna razowa, typ 2000	do 8
Mąka żytnia jasna, typ 580	do 5
Mąka żytnia, typ 800	do 6
Mąka żytnia razowa, typ 2000	do 8

Mąki wysoko-wyciągowe i razowe wykazują wyższą kwasowość niż nisko-wyciągowe. Kwasowość mąki żytniej jest wyższa niż pszennej o tym samym wyciągu.

9. Oznaczanie stężenia witaminy C w produktach owocowych i warzywnych techniką spektrofotometryczną

9.1. Wstęp teoretyczny

Sformułowanie witamina C określa wszystkie związki, wykazujące równoważną aktywność biologiczną do kwasu L-askorbinowego (także produktów jego utleniania jak kwas dehydroaskorbinowy, izomerów jak kwas izoaskorbinowy, estrów jak palmitynian askorbylu oraz form syntetycznych takich jak 6-deoksy-L-AA, 2-fosforan-L-AA). Witamina ta, rozpuszczalna w wodzie, jest jedną z najważniejszych dla zdrowia człowieka, ze względu na wysoką aktywność antyoksydacyjną. W organizmach żywych pełni ona wiele ról, uczestniczy m.in. w wielu procesach biochemicznych (wchłanianie żelaza, synteza kolagenu i hormonów) oraz w neutralizacji wolnych rodników, tworzących się w wyniku metabolizmu komórkowego. Dodatkowo witamina C zapobiega starzeniu się, powstawaniu zaćmy, ma działanie prewencyjne w przypadku miażdżycy, nowotworów i chorób układu krążenia. Natomiast w przemyśle spożywczym wykorzystywana jest jako dodatek, zapobiegający utlenianiu produktów żywnościowych. Człowiek nie jest w stanie jej syntetyzować, dlatego musi być dostarczana z dietą (naturalna obecność w większości owoców i warzyw). Zalecane dawki żywieniowe określone są na poziomie 75 mg/dobę dla dorosłych kobiet i 90 mg/dobę dla mężczyzn.

Kwas L-askorbinowy jest wrażliwy na działanie wielu czynników. Ulega szybkiemu utlenianiu do DHA. Procesy utleniania są indukowane przez ekspozycję na wysoką temperaturę i pH, światło, obecność tlenu lub metali (jony żelaza (III), srebra, miedzi (II)) oraz działanie enzymatyczne. Równowaga pomiędzy formami kwasu askorbinowego L-AA i DHAA jest determinowana przez pochodzenie surowców roślinnych (w tym odmiany), metody uprawy, stopień dojrzałości) oraz obróbkę i przechowywanie owoców i warzyw po zbiorze.

Podkreślić należy, że kwas L-askorbinowy jest odwracalnie utleniany do postaci kwasu L-dehydroaskorbinowego. DHA również wykazuje aktywność biologiczną. Natomiast w efekcie dalszego utleniania wytwarza się kwas diketogulonowy, który nie wykazuje żadnej funkcji biologicznej. Ze względu na

fakt, iż kwas L-dehydroaskorbinowy może być stosunkowo łatwo przekształcony w kwas L-askorbinowy w organizmie człowieka, ogromne znaczenie ma pomiar poziomu obu form w owocach i warzywach, co pokaże pełny obraz aktywności witaminy C. W związku z możliwością degradacji kwasu askorbinowego w zależności od warunków przechowywania, przygotowania próbki czy też ekstrakcji, ogromne znaczenie ma przestrzeganie procedur metod analitycznych, wykorzystywanych do oznaczania witaminy C w produktach spożywczych. Tylko takie podejście pozwoli na uzyskanie wiarygodnych wyników, przydatnych w kontroli jakości surowców i produktów żywnościowych.

Kwas askorbinowy jest powszechnie wykorzystywany w przemyśle spożywczym. Po pierwsze jako źródło witaminy C lub jako antyoksydant. Jednakże szybko może on ulegać degradacji m.in. w napojach o kwaśnym pH, w których może dodatkowo przyspieszać degradację antocyjanów, co w konsekwencji prowadzi do utraty koloru.

Zastosowanie kwasu askorbinowego jest istotne, zwłaszcza w działalności produkcyjnej w zakresie wytwarzania mięsa mielonego oraz wędlin. W tych produktach kwas askorbinowy zapobiega utlenianiu i odbarwieniu produktu podczas przechowywania, w związku z tym opóźnia pojawienie się nieprawidłowego zabarwienia, które mogłoby być nieakceptowane przez konsumentów, jednak nie jest związane ze zmianą organoleptyczną produktu. Zastosowanie kwasu askorbinowego w produktach mięsnych, z dodatkiem azotynów ma duże znaczenie dla aktywności redukcji, zależnej od nitrozmetamyoglobiny Fe (III) przekształcanej w nitrozmetamyoglobinę Fe (II), która utrzymuje barwę produktu na pożądanym poziomie. Dodatkowo, kwas askorbinowy zapobiega powstawaniu nitrozoamin.

Zaproponowano wiele analitycznych metod ilościowego oznaczania kwasu askorbinowego. Wykorzystuje się m.in. elektroforezę kapilarną, elektrochemię, chromatografię cieczową, fluorescencję i chemiluminescencję (CL). Popularne są również metoda kolorymetryczna, metoda miareczkowa, metoda enzymatyczna, analiza metodą wtrysku przepływowego (FIA) oraz wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC). Chromatografia cieczowa i elektroforeza kapilarna, są odpowiednie do rozdzielania kwasu L-askorbinowego, kwasu L-dehydroaskorbinowego i kwasu D-izoaskorbinowego, a stosowane wraz z detektorami UV-vis, fluorescencyjnymi lub elektrochemicznymi są selektywnymi i czułymi metodami do ilościowego oznaczania kwasu L-askorbinowego i jego izomerów w złożonych matrycach biologicznych produktów spożywczych. Jak dotąd chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS) jest najrzadziej wykorzystywana do

analizy koncentracji witaminy C w porównaniu z jej wykorzystaniem w badaniach innych witamin rozpuszczalnych w wodzie. Jednakże metody te są często czasochłonne i wykorzystują kosztowne odczynniki i materiały, a ponadto wykrywanie często wymaga skomplikowanej i kosztownej aparatury. Metody spektrofotometryczne i kolorymetryczne mają wyjątkowe zalety na tle pozostałych procedur, takie jak prostota i szybkość wykonania oraz niska kosztocłonność. Dodatkowo mogą być stosowane w przypadku analizy produktów spożywczych o silnym zabarwieniu. Spektrofotometryczne oznaczanie kwasu askorbinowego metodą Folina-Ciocalteu opiera się na fakcie, że w obecności kwasu askorbinowego, kwas fosfomolibdenowy (VII) jest redukowany do mieszaniny niższych tlenków molibdenu–błękitu molibdenowego. Wykorzystywany odczynnik podlega również specyficznej redukcji przez kwas askorbinowy przy pH w zakresie od 1 do 7. Pomiaru absorbancji dokonuje się przy długości fali 750 nm względem próby ślepej (kwas TCA – trichlorooctowy). Natomiast zawartość witaminy C odczytuje się z wcześniej przygotowanej krzywej wzorcowej dla kwasu askorbinowego.

9.2. Część praktyczna

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości witaminy C w wybranych produktach spożywczych (świeżych oraz przechowywanych) techniką spektrofotometryczną (metodą Folina).

Analizowane produkty spożywcze

- cytryna
- czarna porzeczka
- kiwi
- truskawki
- owoce dzikiej róży
- korzeń pietruszki

Odczynniki chemiczne

- kwas askorbinowy czda
- 10% kwas trichlorooctowy TCA
- odczynnik Folina-Ciocalteu

Szkło laboratoryjne, sprzęt i akcesoria

- waga analityczna
- spektrofotometr UV-3100PC
- wirówka laboratoryjna
- homogenizator

- pipety automatyczne

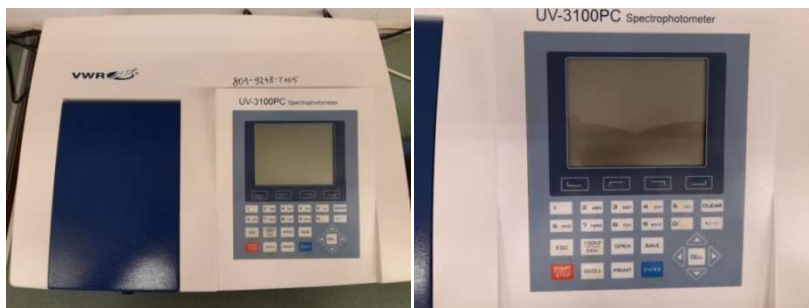
Przygotowanie krzywej wzorcowej

Przygotować krzywą wzorcową poprzez wykonanie szeregu rozcieńczeń roztworu wzorcowego kwasu askorbinowego o stężeniu 0,1 mg/ml według tabeli 4:

Tabela 4. Przygotowanie roztworów do wykonania krzywej wzorcowej - schemat

Rodzaj odczynnika	Stężenie kwasu askorbinowego ($\mu\text{g/ml}$)					
	0	2,5	5	12,5	25	35
R-r wzorcowy (ml)	0	0,05	0,1	0,25	0,5	0,7
10 % TCA (ml)	2,0	1,95	1,9	1,75	1,5	1,3

Do przygotowanych prób dodać po 0,2 ml odczynnika Folina i natychmiast po dodaniu energicznie zamieszać. Zmierzyć absorbancję na spektrofotometrze, roztworów (sześciu przygotowanych zgodnie ze schematem w tabeli 3) przy długości fali 750 nm (rys. 14). Wykreślić krzywą wzorcową na papierze milimetrowym (zależność wartości absorbancji od stężenia kwasu askorbinowego).



Rys. 14. Spektrofotometr VWR UV-vis. Legenda panelu sterowania: GOTO λ – ustawianie długości fali; 0ABS- ustawianie dla pomiaru absorbancji próby ślepej.

Przygotowanie próbki

Odważyć 1 g próbki, dodać 1 ml 10% TCA, a następnie homogenizować przez 5 minut (rys. 15). Próbki do analiz oznaczyć na probówkach wirowniczych (numer bądź nazwa produktu spożywczego). Osad odwirować przy prędkości 3000.



Rys. 15. Homogenizator laboratoryjny do przygotowania próbek

Oznaczenie właściwe

Pobrać 0,2-0,5 ml supernatantu z odwirowanego materiału badawczego. Objętość prób uzupełnić do 2 ml 10% TCA, a następnie dodać 0,2 ml odczynnika Folina i energicznie zamieszać. Absorbancję mierzyć przy długości fali 750 nm względem próby zerowej. Odczytać koncentrację kwasu askorbinowego w badany materiale, bazując na przygotowanej wcześniej krzywej wzorcowej. Wyniki przedstawić w tabeli 5. Należy uwzględnić, że krzywą wzorcową przygotowano dla stężenia kwasu askorbinowego, wyrażonego w $\mu\text{g/ml}$. Natomiast zawartość w produkcie oceniano dla 1 g próbki. Wynik wyrazić w $\text{mg}/100\text{g}$ produktu. Wyznaczyć jaka ilość analizowanego produktu, pokryje dzienne zapotrzebowanie dorosłego człowieka na witaminę C (dla kobiet lub dla mężczyzn). Dodatkowo we wnioskach umieścić informacje, na temat wpływu przechowywania na poziom witaminy C w analizowanych produktach.

Tabela 5. Zestawienie uzyskanych wyników analiz badawczych

Badany materiał	Zawartość wit. C w badanym materiale [mg/100g]	Ilość produktu spożywczego, który zaspokajałby dzienne zapotrzebowanie dorosłego człowieka na wit C [g]

10. Analiza błonnika pokarmowego - oznaczanie włókna obojętno-detergentowego w surowcach roślinnych

10.1. Wstęp teoretyczny

Panel ds. definicji błonnika pokarmowego powołany przez National Academy of Science w 2002 r. zdefiniował błonnik pokarmowy jako składający się z niestrawnych węglowodanów i ligniny, które są naturalne i nienaruszone w roślinach, błonnik funkcjonalny składający się z wyizolowanych, niestrawnych węglowodanów, które mają korzystne efekty fizjologiczne u ludzi oraz błonnik całkowity jako sumę błonnika pokarmowego i błonnika funkcjonalnego.

Głównym źródłem błonnika w diecie są zboża oraz owoce i warzywa. Obecnie dodaje się go także w postaci oczyszczonej do preparatów lub produktów spożywczych. Funkcje błonnika pokarmowego w prewencji i leczeniu wielu chorób zostały bardzo dobrze udokumentowane. Aktualnie szacuje się, że spożycie błonnika pokarmowego w krajach zachodnich kształtuje się na poziomie 16,3-43,4 g na osobę dziennie. Bazując na zaleceniach, przeciętne dzienne zapotrzebowanie na błonnik pokarmowy wynosi 25 g dla kobiet poniżej 50. roku życia, 21 g dla kobiet powyżej 50. roku życia, 38 g dla mężczyzn poniżej 50. roku życia i 30 g dla mężczyzn powyżej 50. roku życia. W ostatnich latach obserwuje się znaczny niedobór błonnika pokarmowego w diecie ludzi, co dotyczy głównie krajów rozwiniętych. Od połowy lat 60. ubiegłego wieku widoczny jest stały wzrost zainteresowania błonnikiem pokarmowym. Wykazano, że poszczególne składniki błonnika pokarmowego wiążą wiele substancji, w tym cholesterol i kwasy żołądkowe. Celuloza i lignina mają dużą zdolność wiązania metali. Z kolei frakcje NDF (neutralno-detergentowa) i ADF (kwaśno-detergentowa) działają na poziomie fizjologicznym, poprawiając strawność, dostępność składników mineralnych, a ponadto wpływają na szereg interakcji między składnikami pokarmowymi. Właściwości hemicelulozy również mogą odgrywać istotną rolę w fizjologii człowieka. Ta frakcja błonnika jest w znacznym stopniu degradowana w okrężnicy i zwiększa produkcję stolca. Jednak jej najważniejszą funkcją jest zdolność do wiązania jonów i zatrzymywania wody. Na korzystne działanie frakcji błonnika wskazują badania, w których wykazano, że suplementacja diety

maksymalnymi tolerowanymi ilościami pektyn, celulozy lub ligniny wiąże się z istotnymi zmianami poziomu cholesterolu w surowicy krwi u osób zdrowych.

Wzbogacanie żywności błonnikiem przynosi wiele różnych rodzajów korzyści, w tym motywację dla konsumentów do spożywania zwiększonych ilości błonnika pokarmowego, co jest zalecane przez dietetyków. Dodatkowo suplementacja błonnikiem zmienia właściwości technologiczne surowców i produktów spożywczych, co obecnie wydaje się bardzo interesujące dla producentów żywności. W związku z wieloma pozytywnymi aspektami, zarówno wartość odżywcza, jak i właściwości technologiczne błonnika pokarmowego, mają niezwykle znaczenie dla potencjalnego rozwoju szerokiej gamy produktów spożywczych, wzbogacanych błonnikiem (pieczywo, przekąski, sosy, napoje, płatki śniadaniowe, ciastka, produkty mleczne, produktów mięsne).

Zaproponowano wiele różnych systemów klasyfikacji składników błonnika pokarmowego. Przyjęte podziały bazowały na podstawie ich roli w roślinie, rodzaju polisacharydu, ich symulowanej rozpuszczalności w przewodzie pokarmowym, miejsca trawienia oraz produktów trawienia i klasyfikacji fizjologicznej. Obecnie najbardziej przyjętą klasyfikacją błonnika pokarmowego jest podział składników diety na podstawie ich rozpuszczalności w buforze o określonym pH i/lub ich zdolności do fermentacji w systemie *in vitro* z wykorzystaniem wodnego roztworu enzymów, reprezentatywnych dla enzymów ludzkiego przewodu pokarmowego. Przyjmując te kategorie błonnik pokarmowy występuje w dwóch kategoriach jako błonnik nierozpuszczalny w wodzie tj. niepodlegający fermentacji (celuloza, hemiceluloza, lignina) oraz błonnik rozpuszczalny w wodzie/ dobrze podlegający fermentacji (pektyny, gumy i śluzy).

Jednak podkreślić należy, że różne rodzaje błonnika pokarmowego mają nie tylko odmienną strukturę i skład chemiczny. Różnice te bowiem mają ogromne znaczenie żywieniowe i technologiczne. Pomimo szeregu wspomnianych korzyści, wynikających ze spożywania błonnika pokarmowego, istnieją doniesienia na temat jego roli w upośledzaniu wchłaniania związków mineralnych i pierwiastków śladowych w jelicie cienkim ze względu na działanie wiążące i/lub sekwestrujące.

W technologii żywności fizykochemiczne właściwości błonnika pokarmowego mogą być modyfikowane poprzez obróbkę: chemiczną, enzymatyczną, mechaniczną (rozdrabnianie), termiczną lub termomechaniczną (ekstruzja, ekstruzja gotowana, kontrolowana dekompresja natychmiastowa), w celu poprawy jego funkcjonalności w produktach spożywczych. Złożoność

blonnika pokarmowego jest efektem charakteru chemicznego i stopnia polimeryzacji, poszczególnych jego składników. W związku z tym badania ilościowe tego składnika w produktach spożywczych, opierają się na zastosowaniu wielu różnych metod analitycznych, które umożliwiają dokładne oszacowanie jego składu w żywności i jej produktach ubocznych. Ogólnie przyjęto podział metod oznaczania blonnika pokarmowego na trzy kategorie. Wśród nich znajdują się metody nieenzymatyczno-grawimetryczne, enzymatyczno-grawimetryczne oraz enzymatyczno-chemiczne. Do ostatniej grupy należą procedury enzymatyczno-kolorymetryczne i enzymatyczno-chromatograficzne (GLC/ HPLC). Na przestrzeni ostatnich lat stwierdzono, że najczęściej stosowanymi metodami oceny poziomu blonnika pokarmowego są metoda enzymatyczno-grawimetryczna (zgodna z AOAC) oraz metoda enzymatyczno-chemiczna, metoda Van Soesta.

Metoda oznaczania NDF według Van Soesta została opracowana w celu rozdzielenia suchej masy produktów na frakcję rozpuszczalną, która jest łatwo trawiona i frakcję włóknistą, która jest trawiona powoli i niekompletnie. W surowcach roślinnych w skład NDF wchodzi hemicelulozy, celulozy i ligniny, ale również niewielkie koncentracje białka i popiołu. Dlatego też w metodzie Van Soesta oznaczania NDF, siarczan sodu został włączony do procedury analitycznej (zmniejszenie zanieczyszczenia włókna białkiem). W metodzie tej wykorzystuje się rozpuszczanie skrobi, podczas ekstrakcji neutralnym detergentem, przy użyciu stabilnego termicznie enzymu α -amylazy. Firma Ankom opracowała metodę opartą na ekstrakcji próbek w workach filtracyjnych przy użyciu komory ciśnieniowej, która jest obecnie powszechnie wykorzystywana do oceny zawartości włókna i jego frakcji w produktach spożywczych.

10.2. Część praktyczna

Celem ćwiczenia jest przeprowadzenie oznaczania zawartości włókna obojętno-detergentowego w próbkach produktów spożywczych z wykorzystaniem woreczków filtracyjnych.

Analizowane produkty spożywcze

- nasiona fasoli
- nasiona soi

Odczynniki chemiczne

- Neutral Detergent (ND) Solution, firmy ANKOM (przygotowanie zgodnie z instrukcją na opakowaniu)

-
- glikol trójetylowy
 - alfa-amylaza
 - siarczan sodu bezwodny
 - aceton

Szkło laboratoryjne, sprzęt i akcesoria

- waga analityczna
- suszarka laboratoryjna Binder
- aparat ANKOM
- woreczki filtracyjne
- zgrzewarka
- zatrzymujące wilgoć opakowanie ANKOM
- mazak do napisów na woreczkach odporny na rozpuszczalnik i kwasy
- młynek laboratoryjny
- pipeta o pojemności 5 ml
- cylinder miarowy o pojemności 10 ml
- zlewka o pojemności 250 ml

Przygotowanie próbki

Zmilić próbki nasion w młynku (rys. 16), zgodnie z instrukcją Prowadzącego. (próbki zbyt drobno zmielone mogą wydostawać się z woreczków filtracyjnych).

Zważyć 3 puste woreczki, aby wyznaczyć korekcję dla pustego woreczka (C_1). Następnie zważyć i zapisać masę każdego pustego woreczka filtracyjnego (W_1). Każdy woreczek musi być oznaczony dla identyfikacji próbki (napisy umieszcza się na środku woreczka mazakiem).

Po wytarowaniu wagi należy umieścić w woreczku filtracyjnym próbkę w ilości 0,45 – 0,50 g oraz zapisać masę każdej z próbek (W_2). Następnie należy zgrzać woreczek za pomocą zgrzewarki, w odległości 4 mm od jego górnej krawędzi (rys. 17).



Rys. 16. Młynek laboratoryjny do mielenia nasion roślin bobowatych



Rys. 17. Zgrzewarka do woreczków filtracyjnych

Oznaczenie właściwe

Sporządzić roztwór (pod nadzorem Prowadzącego, w maskach przeciwpyłowych z zaworkiem FFP1) obojętno-detergentowy (zgodnie z instrukcją na opakowaniu i w przeliczeniu 1 lub 2 litry wody destylowanej). Dodać 10 ml glikolu trójetylowego. Sprawdzić pH roztworu (powinno mieścić się w zakresie od 6,9 do 7,1). Kolejny etap to umieszczenie 3 woreczków na każdej z 8 tac w urządzeniu ANKOM (maksymalna liczba woreczków przy jednym oznaczeniu to 24). Włożyć tacki na metalowy pręt. Każda taca powinna być odwrócona o 120 stopni w stosunku do tacy znajdującej się poniżej (rys. 18). Umieść 9 pustą tacę na górze. Umieścić wąż odprowadzający w odpływie.

Włączyć aparat, otworzyć pokrywę i wstawić mieszalnik z tackami i woreczkami. Umieścić ciężarek na górnej, ostatniej, pustej tacy.

Jeżeli analizie będą poddawane 24 woreczki z próbkami, należy dodać 1900-2000 ml roztworu ND w temperaturze pokojowej do naczynia analizatora włókna. Jeżeli do oznaczeń przeznaczonych będzie mniej niż 20 próbek (woreczków filtracyjnych), dodać należy 1000 ml roztworu ND. Następnie należy dodać 10 g (0,5 g na 50 ml roztworu ND) siarczynu sodowego i 4,0 ml alfa-amylazy do roztworu w analizatorze. Po zamknięciu pokrywy urządzenia włącza się na jego panelu przyciski mieszania i ogrzewania. Zegar na panelu ustawia się na 75 minut. Kiedy ekstrakcja zakończy się (sygnalizacja dźwiękowa z panelu sterowania), wyłącza się mieszanie i ogrzewanie.



Rys. 18. Urządzenie Ankom do pomiarów zawartości włókna wraz z tacami, na których umieszcza się woreczki filtracyjne

Należy otworzyć zawór spustowy. Kolejny etap to zamknięcie zaworu spustowego, po którym można otworzyć pokrywę. Następnie dodaje się 1900-2000 ml wody o temperaturze 70-90°C do płukania i 4 ml alfa-amylazy do pierwszego i drugiego płukania. Włączyć mieszanie przez 5 minut. Łącznie wykonać trzeba trzy płukania. Po zakończeniu ekstrakcji NDF i płukaniu wyjmuje się próbki, usuwa nadmiar wody i umieszcza woreczki na około 3-5 minut w zlewce z acetonem. Po tym czasie wyjmuje się woreczki z acetonu, wysusza na powietrzu (kratka z suszarki), a następnie należy wysuszyć je całkowicie w suszarce w temperaturze 102°C przez około 2 godziny (uzgodnienie z Prowadzącym). Woreczki po suszeniu umieścić w opakowaniu ANKOM (Rys. 19).



Rys. 19. Opakowanie do przechowywania woreczków filtracyjnych po suszeniu (przed ważeniem)

Zważyć woreczki (W_3), a uzyskane wyniki zapisać w tabeli 6 z odpowiednimi kodowaniami dla woreczków filtracyjnych.

Tabela 6. Zestawienie wyników do oznaczania NDF w nasionach roślin bobowatych

Nr próby/oznaczenie z woreczka	Masa woreczka W_1	Masa próby W_2	Masa wysuszonego woreczka z włóknem po ekstrakcji W_3

Należy wyznaczyć tzw. korekcję na pusty woreczek C_1 . Jest to stosunek końcowej masy wysuszonego w suszarce (pustego) woreczka do masy pustego woreczka (wyznaczonej na początku analizy).

Obliczenia

Dokonać obliczeń zgodnie z następującym wzorem:

$$\% NDF = \frac{100 \times [W_3 - (W_1 \times C_1)]}{W_2}$$

gdzie:

W_1 – masa wytarowanego woreczka

W_2 – masa próbki

W_3 – masa wysuszonego woreczka po procesie ekstrakcji

C_1 – Korekcja na pusty woreczek

11. Oznaczanie likopenu w świeżych pomidorach i przetworach pomidorowych

11.1. Wstęp teoretyczny

Pomidory są jednym z najpopularniejszych produktów w diecie człowieka na całym świecie. Są źródłem składników odżywczych, takich jak potas, witaminy i karotenoidy, w których dominuje likopen. Wśród całej gamy związków funkcjonalnych, występujących w pomidorach, likopen jest jednym z najważniejszych, ze względu na jego udział w zmniejszaniu ryzyka chorób układu krążenia oraz działanie przeciwnowotworowe. Chemicznie likopen jest karotenoidem rozpuszczalnym w lipidach. Określany jest także jako prekursor β -karotenu, jednak ma co najmniej dwukrotnie większą od niego zdolność przeciwutleniającą (11 sprzężonych i 2 niesprężone wiązania podwójne). Pod względem strukturalnym likopen jest tetra terpenem, zbudowanym z ośmiu jednostek izoprenowych, składających się wyłącznie z C i H (zawiera 13 wiązań podwójnych). Zawartość likopenu stanowi około 80-90% całkowitej zawartości karotenoidów w dojrzałych pomidorach. Generalnie likopen charakteryzuje się najwyższą aktywnością przeciwutleniającą i zdolnością do wygaszania tlenu singletowego spośród wszystkich karotenoidów pokarmowych. Przetworzone produkty pomidorowe (soki, zupy, sosy, ketchupy) zawierają najwyższe koncentracje biodostępnego likopenu w porównaniu do świeżych pomidorów. Zalecenia, dotyczące optymalnego dla zdrowia człowieka dziennego spożycia likopenu mieszczą się w zakresie od 3,35 do 4,82 mg.

Pomidory i produkty pomidorowe są głównym źródłem likopenu w diecie człowieka. Niepożądana degradacja likopenu może wpływać nie tylko na jakość sensoryczną produktów, ale także na obniżenie korzyści zdrowotnych, jakie przynosi dla organizmu człowieka żywność na bazie pomidorów. Likopen w świeżych pomidorach występuje przede wszystkim w konfiguracji *trans*. Najważniejszymi przyczynami degradacji, tego biologicznie aktywnego związku w pomidorach podczas przetwarzania, są izomeryzacja i utlenianie. Podczas izomeryzacji izomery *trans* przekształcane są w izomery *cis*. Dane literaturowe wskazują, że określenie stopnia izomeryzacji likopenu podczas przetwarzania mogłoby stanowić miarę potencjalnych korzyści zdrowotnych żywności na bazie pomidorów. Przetwarzanie termiczne pomidorów związane jest na ogół z pewnymi stratami likopenu w produktach końcowych.

Oddziaływanie wysokiej temperatury prowadzi do izomeryzacji form all-trans do cis, a ilość tych izomerów zwiększa się wraz ze wzrostem temperatury i czasu przetwarzania. Jednak w żywności na bazie pomidorów, zarówno mrożonej, jak i sterylizowanej termicznie, obserwuje się doskonałą stabilność likopenu przez cały okres przechowywania.

Biodostępność likopenu determinowana jest wieloma czynnikami. Absorpcja izomerów cis z żywności jest wyższa niż izomerów all-trans. Zatem biodostępność likopenu z przetworzonych produktów pomidorowych jest wyższa niż ze świeżych pomidorów. Dodatkowo skład i struktura żywności są czynnikiem wpływającym na biodostępność likopenu, ponieważ mogą oddziaływać na uwalnianie likopenu z matrycy tkankowej owocu pomidora. Zatem przetwarzanie świeżych pomidorów zwiększa biodostępność likopenu ze względu na fakt rozbicia ścian komórkowych, co z kolei prowadzi do osłabienia siły wiązania między likopenem a matrycą tkankową. Wzrost świadomości konsumentów i zwiększone w związku z tym zapotrzebowanie na zdrowe produkty żywnościowe stwarza aktualnie nową możliwość rozwoju żywności bogatej w likopen jako nowej żywności funkcjonalnej.

Wśród nowoczesnych metod oznaczania zawartości likopenu wymienić należy wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), związaną ze skomplikowaną analizą chemiczną, w której wykorzystuje się mieszaninę rozpuszczalników do rozpuszczania barwników, aby zapobiec ich utlenianiu podczas ekstrakcji. Ta procedura analityczna określana jest nie tylko jako pracochłonna, kosztowna i czasochłonna, ale wymaga także wykorzystywania toksycznych rozpuszczalników. Dlatego zaproponowano kilka szybkich metod analizy likopenu w pomidorach i ich przetworach. Wśród nich znajdują się procedury z wykorzystaniem kolorymetru/spektrofotometru, spektrometru bliskiej podczerwieni (NIR) lub spektrometru UV-Vis.

Obecnie obserwuje się duże zainteresowanie ilościowym oznaczaniem likopenu. W metodach spektrofotometrycznych ilościowej oceny likopenu w produktach spożywczych wykorzystywane są rozpuszczalniki organiczne do ekstrakcji i rozpuszczania tego związku. Ekstrakcja jest najczęściej wykorzystywaną metodą pozyskiwania karotenoidów z roślin. Idealna metoda szacowania jego koncentracji powinna być szybka, czuła, selektywna, tania i przyjazna dla środowiska. Spektrometria UV-Vis jest tradycyjną metodą analizy z powodzeniem stosowaną do ilościowego oznaczania karotenoidów, ponieważ jest niedroga i szybka w porównaniu z technikami chromatograficznymi. Obecnie istnieje tendencja do stosowania metod szybkich i niedrogich, ale zapewniających dokładne wyniki.

Spektrofotometryczne oznaczenie ilościowe likopenu przeprowadza się najczęściej metodą zaproponowaną przez Fish i in.(2002). Procedura ekstrakcji prowadzona jest z wykorzystaniem acetonu, zawierającego BHT (butylohydroksytoluen) oraz heksanu. Po oddzieleniu faz mierzona jest absorbancja fazy heksanowej przy długości fali 503 nm wobec heksanu, jako próby ślepej.

11.2. Część praktyczna

Celem ćwiczenia jest oznaczanie likopenu w pomidorach świeżych oraz przetworach pomidorowych w aspekcie wpływu obróbki na koncentrację tego bioaktywnego związku.

Analizowane produkty spożywcze

- pomidory
- sok/sos pomidorowy

Odczynniki chemiczne

- 0,05% (w/v) roztwór butylowanego hydroksytolenu (BHT) w acetonie
- 95% etanol
- heksan

Szkło laboratoryjne, sprzęt i akcesoria

- waga analityczna
- pipety
- cylinder miarowy
- próbówki wirownicze
- wirówka laboratoryjna
- homogenizator laboratoryjny
- spektrofotometr UV-vis
- homogenizator laboratoryjny

Przygotowanie próbek

Pomidory poddać homogenizacji (rys. 20). Odczekać aż znikną pęcherze powietrza.



Rys. 20. Homogenizator laboratoryjny do przygotowania próbek z pomidorów

Do próbki wirowniczej odważyć 0,6 g homogenizowanych pomidorów (do drugiej próbki 0,6 g soku/sosu) i dodać 5 ml 0,05% (w/v) butylowanego hydroksytoluenu (BHT) w acetonie, 5 ml 95% etanolu oraz 10 ml heksanu. Następnie próbki odwirować przy 320 obr/min przez 15 minut w temperaturze 4°C (rys. 21).

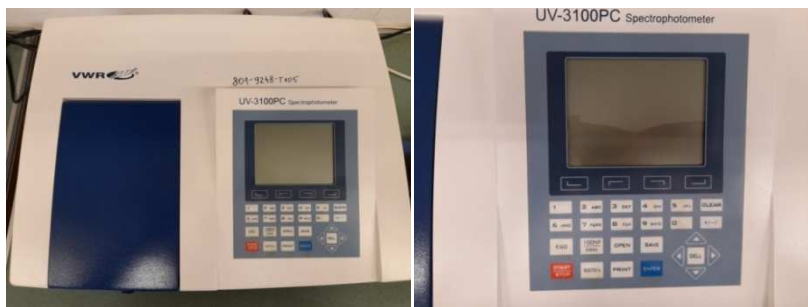


Rys. 21. Wirówka laboratoryjna MPW wraz ze stojakiem na próbki wirownicze – sposób umieszczenia próbek wirowniczych w rotorze wirówki

Po wirowaniu dodać 3 ml wody destylowanej. Następnie mieszać zawartość przez 5 minut i pozostawić w temperaturze pokojowej, aby umożliwić rozdział faz (wyraźne warstwy polarne i niepolarne). Do pomiarów spektrofotometrycznych pobrać ostrożnie górną warstwę.

Oznaczenie właściwe

Pobrane próbki umieścić w kuwetach kwarcowych. Absorbancję zmierzyć na spektrofotometrze UV-vis przy długości fali 503 nm (rys. 22). Jako próbę ślepą zastosować heksan. Dokonać trzykrotnych pomiarów dla każdej z próbek.



Rys. 22. Spektrofotometr VWR UV-vis. Legenda panelu sterowania: GOTO λ – ustawianie długości fali; 0ABS- ustawianie dla pomiaru absorbancji próby ślepej.

Obliczenia

Obliczyć stężenie likopenu (L) na podstawie wzoru, wyliczając jego zawartość w mg/kg produktu:

$$L = \frac{A_{503} \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon \times L}$$

gdzie:

MW - masa cząsteczkowa likopenu (536,9 g/mol)

DF - współczynnik rozcieńczenia

L - długość drogi (cm)

E - molowy współczynnik ekstynkcji dla likopenu (172,000 mol/l/cm).

We wnioskach sformułować wpływ obróbki termicznej oraz przetwarzania pomidorów na poziom likopenu w produktach.

12. Ilościowa i jakościowa ocena barwników roślinnych w zależności od pH środowiska

12.1. Wstęp teoretyczny

W ostatnich latach obserwuje się wzrastające zainteresowanie konsumentów żywnością minimalnie przetworzoną, w tym warzywami liściastymi. Coraz więcej uprawia się warzyw liściastych, które są powszechnie wykorzystywane do różnego rodzaju sałatek. Dowiedziono, że świeże warzywa liściaste są ważnym składnikiem diety, który zyskał miano składnika żywności funkcjonalnej, ze względu na fakt dostarczania witamin, związków mineralnych i związków biologicznie aktywnych. Warzywa liściaste są także bogatym źródłem kilku rodzajów barwników fotosyntetycznych. Barwniki fotosyntetyczne uznawane są za substancje o bardzo zróżnicowanej budowie chemicznej. Mogą występować w postaci barwników porfiryńowych (chlorofil a, b i c), karotenoidów, antocyjanów i flawonów. Całkowita pula barwników w warzywach liściastych obejmuje chlorofil a i b (grupa metylowa w chlorofilu a jest zastąpiona cząsteczką aldehydową w chlorofilu b) i karotenoidy, które są niezbędnymi elementami procesu fotosyntezy. Stężenie barwników w warzywach jest zróżnicowane gatunkowo i odmianowo. Może również zależeć od procesów i przemian fizjologicznych w roślinach oraz czynników środowiskowych.

Obecność barwników w warzywach jest odpowiedzialna za zabarwienie żywności, które jest jednym z atrybutów jakości sensorycznej produktów spożywczych. Dodatkowo wykazano, że poziomy chlorofilu i karotenoidów są powiązane z potencjałem fotosyntetycznym roślin, co z kolei może być informacją obrazującą stan fizjologiczny rośliny. Stężenie barwników w warzywach liściastych jest niezwykle ważne, nie tylko z punktu widzenia zabarwienia surowców roślinnych i funkcji fizjologicznych, ale również z powodu ich uznanej roli dla zdrowia człowieka. Karotenoidy i chlorofile wykazują szerokie spektrum działania prewencyjnego w zapobieganiu różnym chorobom cywilizacyjnym, powiązanim ze stresem oksydacyjnym (nowotwory, choroby sercowo-naczyniowe). Organizm człowieka nie ma możliwości syntezy wymienionych substancji, dlatego powinny być one dostarczane wraz z dietą. W ostatnim czasie zainteresowanie barwnikami w roślinach jadalnych wzrasta, ze względu na powszechniejsze wykorzystanie

związków naturalnych w produkcji żywności. Związane jest to z Dyrektywą Wspólnoty Europejskiej, w której wskazuje się przewagę związków naturalnych nad związkami syntetycznymi.

Chlorofil jest związkiem o barwie zielonej, występującym w liściach i zielonych łodygach roślin. Jest mieszaniną związków a i b, różniących się rozpuszczalnością w rozpuszczalnikach organicznych i odmiennością widm elektronowych w zakresie widzialnym. W przemyśle spożywczym chlorofil uznawany jest za naturalny dodatek do żywności, zaspokajający rosnące preferencje konsumentów, dotyczące naturalnej żywności. Chlorofil a charakteryzuje się intensywnie niebiesko-zielonym kolorem. Natomiast chlorofil b ma kolor matowożółto-zielony. Strukturalnie barwnik ten wykazuje podobieństwo do hemoglobiny. Chlorofil i jego pochodne, przyjmowane przez organizm człowieka wraz z dietą, wykazują działanie przeciwutleniające i antymutagenne. Dodatkowo barwnik ten wspomaga usuwanie z organizmu metali ciężkich.

Oprócz różnych rodzajów chlorofilu, barwnikami naturalnymi o korzystnym działaniu biologicznym są karotenoidy, które wykazują aktywność przeciwutleniającą. Dostarczanie organizmowi karotenoidów, pochodzących z warzyw i owoców, zmniejsza ryzyko zachorowania na nowotwory.

Udowodniony korzystny efekt spożywania naturalnych barwników na zdrowie człowieka spowodował wzrost zainteresowania tymi substancjami w aspekcie możliwości produkcji suplementów diety czy nutraceutyków.

Identyfikacja i oznaczanie ilościowe barwników roślinnych jest uzależnione od wielu czynników, przy czym największe znaczenie ma sposób przygotowania próbki, rodzaj odczynnika ekstrakcyjnego oraz metoda. Do najpowszechniej wykorzystywanych procedur ilościowego oznaczania barwników należą metody kolorymetryczne lub wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC).

Podkreślić należy, że właściwości absorpcyjne barwników ułatwiają ich jakościową i ilościową analizę. Istotą najprostszych procedur oznaczania spektrofotometrycznego barwników roślinnych jest ich ekstrakcja, a następnie pomiar absorbancji przy wykorzystaniu spektrofotometru UV-vis. Oznaczenia spektrofotometryczne wymagają rozwiązywania równań, w których nieznane stężenie barwnika jest modelowane jako funkcja zmierzonej absorbancji przy długościach fali szczytowej, specyficznych dla barwnika. Metody te mogą być stosowane do ilościowego oznaczania chlorofilu, karotenoidów ogółem, feofityn po zakwaszeniu. Badania, choć proste do

wykonania, zależą w dużej mierze od zastosowanego równania empirycznego. W przypadku, gdy do ekstrakcji wykorzystywany jest aceton, pomiary dla chlorofilu a dokonuje się przy długości fali 663 i 645 nm, dla chlorofilu b 645 i 663 nm, dla całkowitej zawartości chlorofilu przy 645 i 663 nm, natomiast dla karotenoidów 480 i 510 nm

Chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych (RP-HPLC) jest obecnie szeroko stosowaną techniką chromatograficzną do profilowania bioaktywnych fitochemikaliów, takich jak chlorofile i karotenoidy w roślinach. Większość procedur separacji prowadzona jest za pomocą chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych w warunkach bezwodnych tj. bez obecności wody w fazie ruchomej lub ze stałą niewielką ilością wody na poziomie 4%. Obecnie alternatywą dla rozdzielania tego typu związków niepolarnych, która uzyskała uznanie badawcze, jest chromatografia w układzie faz odwróconych z nadkrytycznym eluentem (RP-SFC). Dwutlenek węgla, jako rozpuszczalnik organiczny stosowany w tej technice jest uznawany za ekologiczny i ekonomiczny czynnik. Dodatkowo może być mieszany z wieloma innymi rozpuszczalnikami (modyfikatorami) w celu dopasowania polarności fazy ruchomej, co skutkować może poprawą wydajności rozdzielania barwników.

12.2. Część praktyczna

Celem ćwiczenia jest zbadanie wpływu pH na barwę produktów spożywczych oraz ilościowe oznaczenie barwników.

Analizowane produkty spożywcze

- burak czerwony
- kapusta czerwona
- liście szpinaku
- liście pietruszki, kopru, selera

Odczynniki chemiczne

- kwas solny (HCl 6 M)
- roztwór NaOH 2 lub 4 M
- kwas octowy o stężeniu > 80%
- 80% aceton
- węglan wapnia CaCO₃

Szkło laboratoryjne, sprzęt i akcesoria

- pipety szklane

-
- probówki szklane
 - zlewki o pojemności 400 ml
 - cylinder miarowy
 - probówki wirownicze
 - uniwersalne papierki wskaźnikowe pH 0-14
 - nóż, deska
 - kuchenka elektryczna
 - sitka
 - morderz
 - piasek
 - kolba miarowa o pojemności 25 ml
 - waga laboratoryjna
 - lejek Schotta
 - spektrofotometr UV-vis
 - kuwety szklane do spektrofotometru

12.2.1. Ocena wpływu pH środowiska na barwniki w żywności

Przygotowanie próbki

Pokroić 50 g liści czerwonej kapusty na drobne fragmenty (wymiarów około 1 cm)/ lub pokroić 50 g buraka w drobną kostkę (o wymiarach około 0,5 cm), umieścić w zlewce na 400 ml i zalać 100 ml wody destylowanej (liście kapusty powinny być całkowicie zanurzone w wodzie), i gotować na kuchenke elektrycznej przez około 10 minut. Następnie zlać ekstrakt do zlewki i ostudzić do temperatury pokojowej.

Oznaczenie właściwe

Do pięciu probówek przenieś po 5 ml ekstraktu z kapusty/buraka, a do szóstej probówki przenieś 7 ml ekstraktu (próbka kontrolna). Do pierwszych pięciu probówek z ekstraktami dodać po 2 ml kolejno: wody destylowanej, wody wodociągowej (kranowej), roztworu kwasu solnego 6 M, kwasu octowego >80%, roztworu wodorotlenku sodu 2 lub 4 M. Zmierzyć pH otrzymanych roztworów za pomocą papierka wskaźnikowego. Porównać roztwory we wszystkich probówkach i opisać zaobserwowane zmiany barwy. Wyniki zestawień w tabeli 7.

Tabela 7. Zestawienie barwy ekstraktów w zależności od pH środowiska

Rodzaj próbki	pH (-)	Opis barwy
Ekstrakt z kapusty czerwonej		
Ekstrakt (kontrola)		
Ekstrakt z wodą destylowaną		
Ekstrakt z wodą wodociągową		
Ekstrakt z kwasem solnym		
Ekstrakt z kwasem octowym		
Ekstrakt z wodorotlenkiem sodu		
Ekstrakt z buraka czerwonego		
Ekstrakt (kontrola)		
Ekstrakt z wodą destylowaną		
Ekstrakt z wodą wodociągową		
Ekstrakt z kwasem solnym		
Ekstrakt z kwasem octowym		
Ekstrakt z wodorotlenkiem sodu		

Wyjaśnić zaobserwowane zmiany barwy pod wpływem pH.

12.2.2. Ilościowe oznaczenie barwników asymilacyjnych

Przygotowanie próbki

Rozetrzeć dokładnie 0,5 g liści produktu przygotowanego na stole laboratoryjnym (szpinak, pietruszka, itd.) w moździerzu z 0,5 ml 80% acetonu, szczyptą CaCO₃ i odrobiną piasku. Następnie przenieść ilościowo na lejek Schotta i przesączyć pod obniżonym ciśnieniem. Moździerz i pozostałość na filtrze dokładnie przemywać małymi porcjami acetonu i sączyć. Przesącz przenieść do kolby miarowej o pojemności 25 ml i uzupełnić acetonem do kreski. Otrzymany ekstrakt barwników rozcieńczyć 80% acetonem według wskazań prowadzącego, tak aby wartości absorpcji mieściły się w zakresie 0,1-0,6.

Oznaczenie właściwe

Zmierzyć na spektrofotometrze UV-vis (rys. 23) absorbancję przy długościach fal 646, 663 i 470 nm, stosując 80% roztwór acetonu jako próbę odniesienia.

13. Ocena barwy i jakości olejów w zależności od czasu przechowywania i obróbki termicznej

13.1. Wstęp teoretyczny

Lipidy są jednym z podstawowych składników żywności. Uznawane są za główne źródło energii, a także dostarczają niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT). Pełnią one istotną rolę w kształtowaniu cech żywności, takich jak smak, konsystencja czy wygląd. Do grupy lipidów zaliczane są oleje jadalne. Zawierają w swym składzie niezwykle cenne nienasycone kwasy tłuszczowe, które stanowią nie tylko ważny element zdrowego odżywiania, ale również w znacznym stopniu determinują transport składników odżywczych w organizmie. Pod względem chemicznym oleje roślinne zawierają 97% triglicerydów, 2% fosfolipidów oraz różne węglowodory. Z punktu widzenia chemii żywności, analiza lipidów w produktach spożywczych powinna uwzględniać całkowite stężenie lipidów, rodzaj obecnych lipidów, właściwości fizykochemiczne (krystalizacja, temperatura topnienia, temperatura dymienia, reologia, gęstość i kolor), a także strukturalną organizację lipidów w żywności.

Lipidy w olejach roślinnych mogą ulegać wielu niekorzystnym przemianom, określanym mianem jęlczenia. Oksydacyjna degradacja olejów ma największe znaczenie. Proces utleniania lipidów prowadzi do strat składników odżywczych, skrócenia okresu przydatności do spożycia i powstawania niepożądanych cech sensorycznych. W utlenionych olejach kumulują się również wtórne produkty utleniania, do których należą ketony i aldehydy, a to prowadzi do potencjalnych efektów toksycznych czy też rakotwórczych. Przemiany, jakim podlegają tłuszcze związane mogą być z obróbką termiczną, jakiej są poddawane. Smażenie jest najbardziej powszechnym termicznym procesem, nadającym pożądany smak i jakość żywności. Wielokrotne wykorzystywanie i ogrzewanie oleju prowadzi do powstawania niepożądanych związków chemicznych, które negatywnie oddziałują na jakość żywności i zdrowie konsumentów. Podczas podgrzewania oleju zachodzi szereg reakcji chemicznych, m.in. hydroliza, utlenianie i polimeryzacja, prowadzących do degradacji oleju. W efekcie obróbki termicznej zawarte w olejach kwasy tłuszczowe ulegają przekształceniu do karbonylu i nadtlenku, których obecność w żywności może powodować raka jelita grubego, miażdżycę i problemy z sercem. Smażenie wywołuje reakcje

chemiczne, których przebieg zależny jest od wielu czynników, w tym temperatury i czasu smażenia, jakości oleju, jego konwersji i stabilności oksydacyjnej. Intensywność reakcji chemicznych podczas smażenia (utlenianie, hydroliza, cyklizacja, polimeryzacja, reakcja Millarda) zależą też od składu chemicznego żywności poddawanej tej obróbce. Sam mechanizm utleniania w wysokich temperaturach jest analogiczny do autoutleniania podczas przechowywania oleju, jedynie tempo procesu jest przyspieszone.

Zatem monitorowanie jakości olejów spożywczych, szczególnie poddawanych procesowi smażenia jest niezbędne dla uniknięcia szkodliwego wpływu oleju na zdrowie człowieka

Opracowano szereg metod, umożliwiających określenie stopnia utlenienia lipidów w żywności. Chromatografia jest uznawana za najbardziej miarodajną metodę monitorowania utleniania lipidów, ponieważ szczegółowo informuje o profilu kwasów tłuszczowych obecnych w lipidach. Jednak należy do metod czasochłonnych i kosztownych. Wśród innych metod wymienić należy ocenę poboru tlenu. Technika ta jest przykładem pomiaru zmniejszenia stężenia reagentów. Wykorzystuje się także analizę nadtlenków, które są pierwszorzędowymi produktami reakcji, powstającymi w początkowych etapach utleniania, a zatem stanowią wskaźnik postępu utleniania lipidów. Jedną z najczęściej stosowanych metod oznaczania liczby nadtlenkowej, wykorzystuje zdolność nadtlenków do uwalniania jodu z jodku potasu. Wielu informacji na temat wpływu obróbki termicznej na jakość oleju dostarcza pomiar barwy. Zmiany barwy w olejach podczas smażenia są najbardziej zauważalną reakcją degradacji oleju. Przyczyny reakcji tworzenia barwników w oleju oraz czynniki wpływające na te reakcje nadal nie są dobrze poznane i wyjaśnione. Wiadomo jednak, że skład chemiczny żywności, w tym zawartość produktów białkowych powodują najszybsze ciemnienie i termooksydacyjny rozkład oleju do smażenia. Rozpad ten jest stymulowany także obecnością glukozy i aminokwasów. Ocena barwy olejów może być wykonywana wieloma technikami. Do szeroko wykorzystywanych metod należy analiza barwy metodą spektrofotometryczną. Zasada metody oparta jest na pomiarze absorbancji olejów (rozpuszczonych w rozpuszczalnikach organicznych np. w n-heksanie), przy dwóch długościach fali (dla barwników karotenoidowych $\lambda=442$ nm, a dla barwników chlorofilowych $\lambda=668$ nm).

13.2. Część praktyczna

Celem ćwiczenia jest oznaczenie naturalnej barwy olejów w aspekcie surowca, wykorzystanego do tłoczenia oraz wpływu obróbki termicznej na ten parametr jakości.

Analizowane produkty spożywcze

- oleje roślinne

Odczynniki chemiczne

- n-heksan
- mieszanina alkoholowo-eterowa (1 : 1)
- 1% roztwór fenoloftaleiny
- 0,1 N roztwór wodorotlenku potasu
- chloroform
- kwas octowy
- nasycony roztwór jodku potasu
- 0,5% wodna zawiesina skrobi
- 0,002 N roztwór tiosiarczuanu sodu

Szkło laboratoryjne, sprzęt i akcesoria

- próbówki szklane z korkiem
- cylinder miarowy
- zlewki o pojemności 25 ml
- kolba stożkowa o pojemności 250 ml
- kuchnia mikrofalowa
- suszarka laboratoryjna
- kuchenka elektryczna
- spektrofotometr UV-vis
- waga laboratoryjna
- cylinder miarowy
- biureta
- kolba stożkowa z korkiem na szlif o pojemności 250 ml
- pipety szklane

13.2.1. Oznaczenie barwy olejów

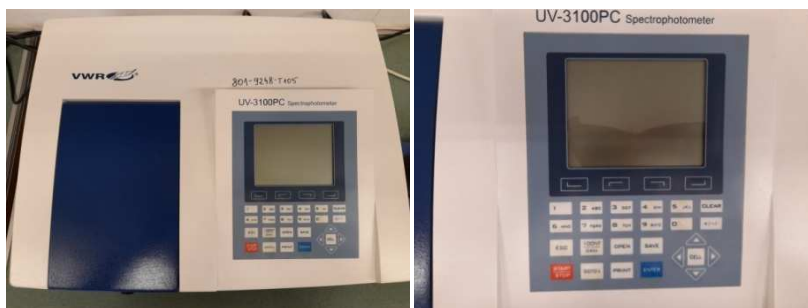
Metoda polega na pomiarze absorpcji próbek olejów roślinnych po ich rozcieńczeniu, przy dwóch długościach fal w zakresie widzialnym: dla grupy barwników karotenoidowych $\lambda=442$ nm, dla grupy barwników chlorofilowych $\lambda=668$ nm.

Przygotowanie próbek

Do probówek szklanych odmierzyć po 1 ml analizowanych olejów (probówki opisać) i dodać 10 ml n-heksanu (do każdej probówki). Probówki zamknąć korkiem, dokładnie wymieszać ich zawartość. Tak przygotowane próbki będą wykorzystane do pomiaru absorbancji w zakresie charakterystycznym dla karotenoidów. Następnie do kolejnych probówek szklanych odmierzyć po 3 ml ocenianych olejów i dodać po 3 ml n-heksanu. Probówki zamknąć korkiem i dokładnie wymieszać ich zawartość. Tak rozcieńczone próbki olejów wykorzystać do pomiarów absorbancji w zakresie charakterystycznym dla chlorofilów.

Oznaczenie właściwe

Przygotowane rozcieńczone próbki olejów przelać do kuwet spektrofotometrycznych. Dokonać trzykrotnego pomiaru absorbancji (rys. 24). Dla pierwszego zestawu próbek (rozcieńczenie 1:10) pomiar wykonać na spektrofotometrze przy długości fali $\lambda=442$ nm wobec n-heksanu, jako próby zerowej. Dla drugiego zestawu próbek (3:3) pomiary absorbancji przeprowadzić przy długości fali $\lambda=668$ nm wobec heksanu, jako odniesienia.



Rys. 24. Spektrofotometr VWR UV-vis. Legenda panelu sterowania: GOTO λ – ustawianie długości fali; 0ABS- ustawianie dla pomiaru absorbancji próby ślepej.

Obliczenia

Barwę obliczono ze wzoru:

$$B = 1000 \times (A_{442} + A_{668})$$

gdzie:

A_{442} – uśredniona wartość absorbancji barwników karotenoidowych,

A_{668} – uśredniona wartość absorbancji barwników chlorofilowych,

1000 – współczynnik przeliczeniowy.

13.2.2. Ocena wpływu obróbki termicznej na barwę olejów

Przygotowanie próbek

Do sześciu zlewek o pojemności 25 ml (podpisać zlewki w celu identyfikacji) odmierzyć po 5 ml ocenianych olejów. Olej w pierwszej zlewce potraktować jako próbkę kontrolną, natomiast oleje w pięciu pozostałych zlewkach poddać następującym obróbkom (rys. 25):

- krótkotrwałe ogrzewanie mikrofalowe – wstawić zlewkę do kuchenki mikrofalowej, ustawić moc na 900 W i ogrzewać przez 1 minutę,
- długotrwałe ogrzewanie mikrofalowe – wstawić zlewkę do kuchenki mikrofalowej, ustawić moc na 900 W i ogrzewać przez 5 minutę,
- krótkotrwałe suszenie – wstawić zlewkę do suszarki laboratoryjnej nagrzananej do temperatury 100°C i ogrzewać przez 10 minut,
- długotrwałe suszenie – wstawić zlewkę do suszarki nagrzananej do temperatury 100°C i ogrzewać olej przez 45 minut,
- smażenie – ustawić zlewkę na nagrzananej płycie kuchenki elektrycznej (ustawienie 6) i ogrzewać przez 10 minut.

Oznaczenie właściwe

Wykonać oznaczenia dla barwy olejów zgodnie z procedurą opisaną powyżej dla dwóch długości fal.

Obliczenia

Obliczyć barwę olejów, korzystając ze wzoru podanego w procedurze dla badania olejów według PN-A-86934:1995. Porównać oleje we wszystkich zlewkach i opisać zaobserwowane zmiany barwy. Wyniki zestawić w postaci tabeli 9.



Rys. 25. Suszarka laboratoryjna i kuchnia mikrofalowa do obróbki termicznej olejów

Tabela 9. Zestawienie barwy olejów w zależności od obróbki termicznej

Rodzaj próbki	Opis barwy	Absorbancja (-)		Obliczenie barwy
		Barwniki chlorofilowe	Barwniki karotenoidowe	
Olej 1				
Nieogrzewany (kontrolna)				
Mikrofalowany 1min				
Mikrofalowany 5 min				
Suszony 10 min				
Suszony 45 min				
Smażony 10 min				
Olej 2				
Nieogrzewany (kontrolna)				
Mikrofalowany 1min				
Mikrofalowany 5 min				
Suszony 10 min				
Suszony 45 min				
Smażony 10 min				

13.2.3. Oznaczanie jakości olejów – Ocena liczby kwasowej

Liczba kwasowa jest miarą zawartości wolnych kwasów tłuszczowych, czyli określa stopień hydrolizy tłuszczu. Zasada metody polega na rozpuszczeniu próbki oleju w mieszaninie rozpuszczalników i miareczkowaniu roztworem wodorotlenku potasu.

Przygotowanie próbek

Wykorzystać próbki olejów poddawanych obróbce termicznej oraz próbkę oleju świeżego. Do oznaczeń przeznaczyć olej 1 i olej 2: nieogrzewany (kontrola), mikrofalowany przez 1 min, mikrofalowany przez 5 min, suszony

przez 10 min, suszony przez 45 min oraz smażony przez 10 min. **Uwaga: Nie rozcieńczać próbek n-heksanem.**

Oznaczenie właściwe

Do kolby stożkowej o pojemności 250 ml pobrać 5-10 g oleju z dokładnością do 0,01g. Dodać 10 ml mieszaniny alkoholowo-eterowej (1:1) i wymieszać zawartość kolby. Dodać 2-3 krople roztworu fenoloftaleiny. Miareczkować 0,1 N roztworem wodorotlenku potasu do momentu pojawienia się jasnorożowego zabarwienia utrzymującego się przez 1 minutę. Wykonać trzy powtórzenia oznaczenia.

Obliczenia

Dokonać obliczeń liczby kwasowej zgodnie z podanym wzorem:

$$LK = \frac{56,1 \times a \times c}{m}$$

gdzie:

LK – wartość liczby kwasowej wyrażona w mg KOH/g oleju,

a – objętość 0,1 N roztworu wodorotlenku potasu zużyta do miareczkowania wyrażona w ml,

c – stężenie roztworu KOH (0,1N)

m – masa oleju wyrażona w g.

Uzyskane wyniki umieścić w tabeli 10.

Tabela 10. Zestawienie wartości liczb kwasowych dla olejów poddawanych obróbce termicznej

Rodzaj próbki	Liczba kwasowa LK			
Olej 1				
Nieogrzewany (kontrolna)				
Mikrofalowany 1min				
Mikrofalowany 5 min				
Suszony 10 min				
Suszony 45 min				
Smażony 10 min				
Olej 2				
Nieogrzewany (kontrolna)				
Mikrofalowany 1min				
Mikrofalowany 5 min				
Suszony 10 min				
Suszony 45 min				
Smażony 10 min				

Uzyskane wyniki odnieść do maksymalnych dopuszczalnych wartości liczby kwasowej w wybranych olejach (dla prób kontrolnych). Dla oleju sojowego liczba maksymalna wynosi 5, dla oleju słonecznikowego - 6, rzepakowego - 4, palmowego i kokosowego – 12, dla oliwy z oliwek 6,6 (rafin. 0,6). Ocenić wpływ obróbki termicznej na liczbę kwasową olejów.

13.2.4. Oznaczanie jakości olejów – Ocena liczby nadtlenkowej

Liczba nadtlenkowa jest miarą zawartości nadtlenków i traktowana jest jako wskaźnik stopnia utlenienia (zjełczenia) tłuszczu. Zasada metody polega poddaniu próbki analitycznej, znajdującej się w roztworze kwasu octowego i chloroformu, działaniu roztworu jodku potasu, a następnie miareczkowaniu wydzielonego jodu mianowanym roztworem tiosiarczanu sodu.

Przygotowanie próbek

Wykorzystać próbki olejów poddawanych obróbce termicznej oraz próbkę oleju świeżego. Do oznaczeń przeznaczyć olej 1 i olej 2: nieogrzewany (kontrola), mikrofalowany przez 1min, mikrofalowany przez 5 min, suszony przez 10 min, suszony przez 45 min oraz smażony przez 10 min. **Uwaga: Nie rozcieńczać próbek n-heksanem.**

Oznaczenie właściwe

Do kolby stożkowej ze szlifem pobrać 5-10 g oleju z dokładnością do 0,01 g. Dodać 5 ml chloroformu i wymieszać zawartość kolby do całkowitego rozpuszczenia zawartości. Dodać 7,5 ml kwasu octowego i 0,5 ml nasyconego roztworu jodku potasu. Niezwłocznie zamknąć kolbę korkiem i mieszać zawartość kolby przez 1 minutę. Pozostawić w ciemności na 5 minut. Po upływie 5 minut dodać około 37,5 ml wody destylowanej, opłukując starannie korek. Dodać 2-3 krople roztworu skrobi i wymieszać (pojawi się niebieskoszare zabarwienie). Miareczkować 0,002 N roztworem tiosiarczanu sodu do odbarwienia zawartości kolby. Wykonać trzy równoległe oznaczenia. Wykonać także próbę ślepa, postępując w sposób opisany powyżej, ale nie pobierając do kolby oleju.

Obliczenia

Wykonać obliczenia liczby nadtlencowej badanych olejów zgodnie ze wzorem:

$$LN = \frac{(V_1 - V_0) \times c}{m} \times 1000$$

gdzie:

LN – liczba nadtlencowa [mEqO₂/kg oleju]

V₁ – objętość roztworu tiosiarczanu sodu zużyta do miareczkowania próbki oleju [ml],

V₀ – objętość roztworu tiosiarczanu sodu zużyta do miareczkowania próby ślepej [ml],

c – stężenie roztworu tiosiarczanu sodu [mol/l]

m – masa oleju [g].

Uzyskane wyniki umieścić w tabeli 11.

Tabela 11. Zestawienie wartości liczb nadtlenkowych dla olejów poddawanych obróbce termicznej

Rodzaj próbki	Liczba nadtlenkowa LN			
Olej 1				
Nieogrzewany (kontrolna)				
Mikrofalowany 1 min				
Mikrofalowany 5 min				
Suszony 10 min				
Suszony 45 min				
Smażony 10 min				
Olej 2				
Nieogrzewany (kontrolna)				
Mikrofalowany 1 min				
Mikrofalowany 5 min				
Suszony 10 min				
Suszony 45 min				
Smażony 10 min				

Uzyskane wyniki odnieść do maksymalnych dopuszczalnych wartości liczby nadtlenkowej w wybranych olejach (dla prób kontrolnych). Maksymalna wartość liczby nadtlenkowej dla oleju sojowego, słonecznikowego, rzepakowego, palmowego i kokosowego wynosi 5. Natomiast dla oliwy z oliwek - 20. Ocenić wpływ obróbki termicznej na liczbę nadtlenkową olejów.

14. Wpływ procesów termicznych na zawartość tiocyjanianów w warzywach

14.1. Wstęp teoretyczny

Obecnie odnotowuje się rosnące spożycie warzyw z rodzaju *Brassica*. Do tej grupy należą m.in. brokuły, jarmuż, rzepa, brukselka, kapusta pekińska i kalafior. Zwiększony udział tych warzyw w diecie związany jest z różnymi działaniami prozdrowotnymi, które przypisywane są ponad 100 różnorodnym związkom nazywanym glukozynolanami. Popularność warzyw kapustnych (krzyżowych) w diecie wzrasta, chociażby ze względu na fakt, że ich spożywanie wiąże się ze zmniejszonym ryzykiem zachorowania na raka. Jednak pojawiają się doniesienia na temat możliwego niekorzystnego wpływu spożywania warzyw kapustnych na czynność tarczycy, co wiąże się przekształceniami glukozynolanów w tiocyjaniany. Tiocyjaniany są bowiem kompetycyjnymi inhibitorami jodu i hamują jego gromadzenie w tarczycy, co może prowadzić do zmniejszenia produkcji hormonów tarczycy. Glukozynolan należy do wtórnych metabolitów roślin, odpowiedzialnych za ostry i gorzki smak. Obecnie zidentyfikowano ponad 120 glukozynolanów u 16 rodzin roślin, w tym Brassicaceae. Chemicznie związki te mają postać glukozy połączonej z organicznymi anionami, zawierającymi siarkę. Mogą one ulegać hydrolizie przez roślinny enzym mirozynazę. W komórkach roślinnych glukozynolany zgromadzone są w innych obszarach od mirozynazy. Natomiast po ich uszkodzeniu glukozynolan jest hydrolizowany przez enzymy. W efekcie tej reakcji enzymatycznej powstają różnego rodzaju produkty uboczne, co jest uzależnione od specyfiki rośliny, podstawników w łańcuchu bocznym, pH samej komórki oraz koncentracji żelaza w komórce. Do produktów rozkładu glukozynolanów zaliczane są izotiocyjanian, nityl, tiocyjanian, epitonietyl i oksazolidyneton. Związki te mają zróżnicowaną aktywność biologiczną i wywołują działania niepożądane. Wśród tych efektów ubocznych wymienia się zahamowanie wzrostu i przerost wątroby, nerek lub tarczycy. Jednak największe działania niepożądane związane są ze zmianą metabolizmu hormonów tarczycy. Niedobór jodu, może pogłębiać się po spożyciu glukozynolanów z warzyw krzyżowych, a także tiocyjanianu, metabolizowanego z glukozydów cyjanogennych, występujących w żywności. Problem ze spożywaniem warzyw kapustnych wynika przede wszystkim z faktu przemian, zawartych w nich glukozynolanów. Efektem tych przemian jest wytwarzanie izotiocyjanianów, z których część ulega natychmiastowemu rozpadowi, uwalniając trwale naładowany jon tiocyjanianowy. Jednak wiele

badania wskazuje, że produkty degradacji glukozynolanów przez mirozynazę mają istotne działanie przeciwnowotworowe. Do takich związków należą niskocząsteczkowe alifatyczne izotiocyjaniiny, izotiocyjaniiny fenylu, oraz dwa produkty degradacji glukozynolanów indolowych, indolo-3-karbinol i diindolylometan.

Obecnie w przemyśle spożywczym wzrosło zainteresowanie naturalnymi produktami roślinnymi jako środkami przeciwdrobnoustrojowymi do zastosowań w utrwalaniu żywności. Izotiocyjaniiny są substancjami lotnymi, które wykazują działanie hamujące na rozwój różnych mikroorganizmów patogennych. Stosowanie allilu ITC (AITC) zostało już zatwierdzone w Japonii do konserwacji żywności (związek stosowany do utrwalania żywności musi mieć udokumentowane naturalne roślinne źródło pochodzenia), ale istnieje niewiele informacji na temat działania przeciwbakteryjnego innych izotiocyjaniinów. Związki te są również obecne w żywności z dodatkiem przypraw wykonanych z warzyw Brassicaceae, najczęściej musztardy, chrzanu lub wasabi. Obecnie właściwości izotiocyjaniinów jako związków przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych i przeciwnowotworowych doprowadziły do zwiększenia zainteresowania naukowców w tworzeniu nowych dodatków do żywności i suplementów diety.

Jednakże pomimo rozwoju metod wysokosprawnej chromatografii cieczowej o wysokiej wydajności i spektrometrii mas do pomiaru produktów hydrolizy glukozynolanów w osoczu ludzkim, nie stworzono wytycznych, dotyczących bezpieczeństwa spożywania warzyw kapustnych. W metodach analitycznych, do oznaczania koncentracji tiocyjaniinów w żywności pochodzenia roślinnego, zastosowanie mają metody kolorymetryczne. Wykorzystuje się zależność możliwości ekstrakcji tiocyjaniinów z próbek przy wykorzystaniu kwasu trichlorooctowego (TCA). Następnie przeprowadzana jest reakcja z jonami żelaza. W kwaśnym środowisku TCA powstaje intensywnie czerwone zabarwienie w wyniku tworzenia się kompleksów od $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ do $\text{Fe}(\text{SCN})_6^{3-}$. Intensywność tego zabarwienia oznacza się spektrofotometrycznie, przy wykorzystaniu krzywej wzorcowej dla roztworu podstawowego jonów SCN^- .

14.2. Część praktyczna

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości tiocyjaniinów w wybranych warzywach oraz wykazanie wpływu ogrzewania w środowisku wodnym na zachowanie tych związków w produkcie.

Analizowane produkty spożywcze

- kapusta biała
- brokuł
- cebula
- brukselka

Odczynniki chemiczne

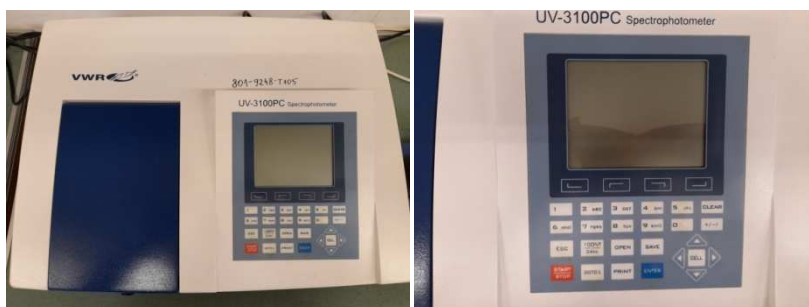
- 5% roztwór kwasu trichlorooctowego (TCA)
- roztwór azotan(V) żelaza(III) (rozpuścić 80g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2 \times 9\text{H}_2\text{O}$ (404 g/mol) w 250 ml 2M kwasu azotowego (V), uzupełnić wodą do 500 ml)
- roztwór A – roztwór podstawowy jonów SCN^- (rozpuścić 16,7 mg rodanku potasu (97 g/mol) w 100 ml 5% kwasu trichlorooctowego)

Szklano laboratoryjne, sprzęt i akcesoria

- sprzęt do rozdrabniania warzyw (deska, nóż)
- zlewka o pojemności 150 ml
- moździerz porcelanowy o pojemności 100 ml z tłuczkiem (pistelem)
- cylinder miarowy o pojemności 50 ml
- lejek średni i mały
- kolbka stożkowa o pojemności 100 ml ze szlifem
- filtry strzykawkowe wraz ze strzykawkami o pojemności 5 ml
- probówki szklane wraz ze statywem
- pipety szklane
- probówki wirownicze
- bibuła filtracyjna
- waga laboratoryjna
- płyta grzejna
- spektrofotometr UV-vis
- kuwety spektrofotometryczne

Wykonanie krzywej wzorcowej

10 ml roztworu A rozcieńczyć 5% roztworem TCA do 100 ml, uzyskując w ten sposób roztwór wzorcowy B, którego 1 ml zawiera 10 μg jonów SNC^- . Z tego roztworu przygotować krzywą wzorcową (kalibracyjną) według schematu podanego w tabeli 12. Pobierać pipetą do kolejnych probówek od 0 do 5 ml roztworu wzorcowego B i uzupełniać do 5 ml 5% TCA.



Rys. 26. Spektrofotometr VWR UV-vis. Legenda panelu sterowania: GOTO λ – ustawianie długości fali; 0ABS- ustawianie dla pomiaru absorpcji próby ślepej.

Tabela 12. Sposób przygotowania roztworów wzorcowych przeznaczonych do wykreślenia krzywej wzorcowej

Roztwór B (ml)	5% roztwór TCA (ml)	Roztwór azotanu (V) żelaza (III) (ml)	stężenie ($\mu\text{g/ml}$)
0	5	5	0 (ślepa)
1	4	5	2
2	3	5	4
3	2	5	6
4	1	5	8
5	0	5	10

Po przygotowaniu roztworów wzorcowych zmierzyć absorbancję trzykrotnie, wobec próby ślepej odczynnikowej przy długości fali 470 nm (rys. 26). Uzyskane wyniki zapisać w tabeli 13.

Tabela 13. Wyniki pomiaru absorbancji przygotowanych roztworów wzorcowych (zgodnie z tabelą powyżej)

Stężenie (µg/ml)	A ₁ pierwszy pomiar absorbancji	A ₂ drugi pomiar absorbancji	A ₃ trzeci pomiar absorbancji	\bar{A} wartość średnia
0 (ślepa)				
2				
4				
6				
8				
10				

Na podstawie odnotowanych wyników badań wykreślić na papierze milimetrowym krzywą kalibracyjną – zależność absorbancji od stężenia.

Przygotowanie próbek

Z jednorodnej, rozdrobnionej próby badanego materiału przygotować dwie naważki po 5 g. Jedną z nich przenieść do zlewki o pojemności 150 ml, dodać 50 ml wody i ogrzewać, utrzymując w niewielkim wrzeniu przez 10 minut.

Następnie surowy i gotowany (po odlaniu wody) materiał rozetrzeć dokładnie w moździerzu porcelanowym, przenieść ilościowo do kolb stożkowych ze szlifem o pojemności 100 ml, dodając po 45 ml 5% kwasu trichlorooctowego (TCA) i wytrząsać przez 10 minut. Próbkę przenieść do probówek wirowniczych (pamiętać o dokładnym naważeniu) i odwirować przy 3000 obr/min przez 10 minut. Po wirowaniu, przesączyć przez sączek twardy.

Z każdego przesącza (po dokładnym wymieszaniu) pobrać po 2 ml do 2 probówek. Do jednej dodać 2 ml wody (ślepa próba), a do drugiej – 2 ml roztworu Fe(NO₃)₂ (od tego momentu przetrzymywać próby bez dostępu światła). Dodatkowo należy przygotować próbę ślepa odczynnikową, biorąc 2 ml wody i 2 ml azotanu (V) żelaza (III).

Oznaczenie właściwe

W przygotowanych próbkach zmierzyć absorbancję na spektrofotometrze UV-vis wobec wody destylowanej przy długości fali 470 nm w czasie nie dłuższym niż 5 min od dodania azotanu (V) żelaza (III). Kolejność dokonywania pomiarów: próba ślepa, próba ślepa odczynnikowa i próby właściwe – najpierw próbka surowa, a potem po gotowaniu.

Obliczenia

Stężenie tiocyjanianów w badanych próbkach odczytać ze wcześniej wykreślonej krzywej wzorcowej, pomniejszając uzyskaną absorbancję o wartości odpowiednich prób – ślepej i odczynnikowej. Wynik przeliczyć na pobraną naważkę i następnie na 100 g produktu. Ocenić wpływ obróbki termicznej surowców roślinnych na koncentracje tiocyjanianów.

15. Oznaczanie lepkości roztworów skrobi w zależności od temperatury i stężenia z wykorzystaniem reometru oscylacyjnego

15.1. Wstęp teoretyczny

Reologia jest nauką na badaniem deformacji i przepływu materii w odpowiedzi na przyłożone naprężenie lub odkształcenie. Materiały można sklasyfikować jako newtonowskie lub nienewtonowskie. W przypadku większości produktów spożywczych stwierdzono, że wykazują one właściwości nienewtonowskich układów lepkosprężystych. Dla tych produktów ważne jest badanie lepkości, która jest jedną z właściwości reologicznych materiału. Trudności w wyznaczaniu tego parametru wynikają przede wszystkim z faktu, iż żywność należy do złożonych układów, w których o lepkości najczęściej decyduje obecność wielu składników, a nie konkretnego pojedynczego. Istotne zmiany lepkości związane są nie tylko ze składem żywności, ale również ze sposobem i warunkami pomiarowymi. Na ten parametr wpływają bowiem m.in. temperatura, stężenie, czas pomiaru, masa cząsteczkowa, stopień rozdrobnienia materiału czy wartość pH. Jednym z najważniejszych surowców w przemyśle spożywczym są mąki. Różne mąki, wykorzystywane w recepturze wypieku chleba, będą determinowały odmienne właściwości fizykochemiczne, funkcjonalne i sensoryczne gotowego produktu. Zatem na cechy jakości pieczywa z różnych rodzajów mąk wpływają właściwości funkcjonalne i reologiczne mąk, wykorzystanych w recepturze. Właściwości funkcjonalne mąki są związane z gęstością, zdolnością pęcznienia, wskaźnikiem absorpcji wody, wskaźnikiem rozpuszczalności w wodzie, zdolnością absorpcji tłuszczu, aktywnością emulgującą i zdolnością spieniania. Natomiast właściwości reologiczne są związane m.in. z lepkością szczytową, lepkością rozkładu, lepkością końcową czy też lepkością zwrotną. Wyniki badań wskazują, że wśród mąk zbożowych, jedynie mąka pszenna ma zdolność do tworzenia trójwymiarowego lepkosprężystego ciasta po zmieszaniu z wodą. Jednak podkreślić należy, że ciasta z mąk pszennych nie mogą być określane jedynie jako stężona zawiesina granulek skrobi w uwodnionej matrycy glutenowej. Skrobia jest bowiem w stanie utworzyć ciągłą sieć cząsteczek wraz z wielocząsteczkową siecią uwodnionego glutenu. Właśnie frakcja skrobiowa jest w dużym stopniu odpowiedzialna za nieliniowe zachowanie lepkosprężyste ciast mącznych. Jednak udział tych dwóch niezależnych sieci reologicznych w ciastach stwarza trudności w jednoznacznym stwierdzeniu i wskazaniu wzajemnych oddziaływań pomiędzy skrobią i glutenem. Chociaż badania

reologiczne mąk i ciast są od dawna wykonywane w praktyce laboratoryjnej, nadal istnieje znaczne ograniczenie zrozumienia powiązań badanych właściwości z jakością wypieków. Może to wynikać z faktu, że ciasto pszenne jest uważane za prawdopodobnie najbardziej dynamiczny i skomplikowany system reologiczny. Jest to układ lepko-sprężysty, który wykazuje właściwości ścinająco-rozciągliwe i tiksotropowe, co jest konsekwencją złożonej struktury ciasta (granulki skrobi otoczone przez trójwymiarową sieć białek).

Dla technologów zbóż reologia jest cennym narzędziem w ocenie jakości mąk, a pomiary reologiczne w całym łańcuchu przetwórczym wykorzystywane są w celu monitorowania właściwości mechanicznych, struktury molekularnej i składu, przewidywania zachowania się materiałów podczas przetwarzania i przewidywania jakości gotowego produktu. W praktyce laboratoryjnej wykorzystuje się wiele metod badawczych dla pomiaru właściwości reologicznych. Metody te klasyfikuje się jako empiryczne (opisowe, imitacyjne) i podstawowe (fundamentalne). Bazując na empirycznych parametrach reologicznych można określić optymalną jakość mąki dla określonego celu. Techniki empiryczne stosowane do kontroli jakości ciasta są powszechnie uznawane za metody standardowe. Wśród metod reologicznych, powszechnie wykorzystywanych w kontroli jakości żywności, analizy reologiczne ciasta są uznawane za najprawdopodobniej najbardziej zróżnicowane.

W ostatnim czasie obserwuje się nowe pomysły na mieszanie różnych mąk do wypieku, w celach fortyfikacyjnych, dla poprawy efektywności kosztowej, ze względu również na pojawiające się problemy z łańcuchem dostaw mąki pszennej a także zwiększenie preferencji klientów, dotyczących prozdrowotnych właściwości mąk niezbożowych. W takich właśnie przypadkach, tworzenia nowych mieszanek wypiekowych, niezbędne są badania właściwości reologicznych mąk i ciast. Ze względu na rozwój żywności wygodnej, bardzo często przemysł spożywczy ma do czynienia z gotowanymi zawiesinami mąki zbożowej, takimi jak sosy, zupy, kaszki, proszki błyskawiczne oraz mąki i skrobie modyfikowane do produkcji żywności specjalnego przeznaczenia. W efekcie dyspersji mąki zbożowej lub też skrobi w wodzie, utworzona zostaje zawiesina, której właściwości reologiczne, w tym lepkość, uzależnione są w dużej mierze od rodzaju i składu zboża, stężenia rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych substancji stałych, obróbki cieplnej oraz temperatury pomiaru.

W pomiarach cech reologicznych żywności wykorzystywane są wiskozymetry i reometry. Należą one do urządzeń, służących do pomiaru przepływu i odkształcenia ścinającego materiałów. Najczęściej wykorzystuje się reometry kapilarne i reometry rotacyjne. Reometr kapilarny uznawany jest za

najodpowiedniejszy do pomiarów lepkości przy ścinaniu z zastosowaniem odpowiednich dla procesu technologicznego prędkości ścinania, lepkości po rozciągnięciu oraz lepkości zależnej od ciśnienia. Reometry rotacyjne określane są za odpowiednie do pomiarów bardzo niskich prędkości ścinania / lepkości, określania zmian właściwości strukturalnych poprzez pomiary oscylacyjne o niskiej amplitudzie i kontrolowanym odkształceniu oraz związanych z nimi badań, takich jak analiza granicy plastyczności i pełzania / powrotu pełzania. W przypadku pomiarów rotacyjnych urządzenia pracują w dwóch możliwych trybach pomiarowych tj. kontrolowane naprężenie lub kontrolowana prędkość. Natomiast pomiary oscylacyjne polegają na przyłożeniu do materiału sinusoidalnej, oscylującej fali naprężenia i pomiarze wytworzonej fali odkształcenia.

15.2. Część praktyczna

Celem ćwiczenia jest oznaczenie lepkości roztworów skrobiowych o różnych stężeniach i w różnych temperaturach, dla określenia wpływu tych czynników na kleikowanie skrobi.

Analizowane produkty spożywcze

- skrobia ziemniaczana

Szkło laboratoryjne, sprzęt i akcesoria

- kolby Erlenmeyera o pojemności 250 ml
- bagietki szklane
- waga laboratoryjna
- cylinder miarowy
- łaźnia wodna
- wiskozymetr Visco Tester VT7 z wrzecionami

Przygotowanie próbek

Przygotować 250 ml roztworów skrobiowych o stężeniach 3, 6 oraz 9% (po 3 roztwory o każdym stężeniu). W tym celu naważyć odpowiednią ilość skrobi i rozpuścić w 250 ml wody. Przygotowane roztwory podpisać dla identyfikacji próbek. Następnie roztwory umieścić w łaźni wodnej (rys. 27) i ciągle mieszając ogrzewać do temperatury 65, 80 i 95°C (pomiar za pomocą termometru, umieszczonego obok łaźni wodnej).



Rys. 27. Łażnia wodna do przygotowania roztworów skrobi

Oznaczenie właściwe

Zmierzyć lepkość roztworów o różnych stężeniach przy użyciu aparatu Visco-Tester VT7 (rys. 28, pod nadzorem Prowadzącego).



Rys. 28. Aparat Visco-Tester VT7 wraz z wrzecionami do pomiarów lepkości roztworów

Obliczenia

Odczytane z wyświetlacza aparatu wyniku umieścić w tabeli 14.

Tabela 14. Zestawienie pomiarów lepkości roztworów skrobiowych

Stężenie kleiku (%)	Lepkość w temperaturze 65 ⁰ C	Lepkość w temperaturze 80 ⁰ C	Lepkość w temperaturze 95 ⁰ C
3			
6			
9			

Wyniki przedstawić jako wykres zmienności lepkości w funkcji stężenia skrobi w mieszaninie (oddzielne wykresy dla trzech temperatur).

16. Pytania na zaliczenie teoretyczne, weryfikujące wiedzę studentów

- [1] W jakiej postaci mogą występować barwniki fotosyntetyczne?
- [2] Co to jest chlorofil i w jakich formach może występować w żywności?
- [3] Jakie są metody oznaczania barwników fotosyntetycznych w żywności?
- [4] Istota spektrofotometrycznego pomiaru barwników fotosyntetycznych w żywności.
- [5] Z punktu widzenia chemii żywności, na czym polega analiza lipidów w produktach spożywczych?
- [6] Na czym polega oksydacyjna degradacja olejów?
- [7] Jakie reakcje chemiczne zachodzą w olejach podczas ogrzewania?
- [8] Jakie są metody, umożliwiające określenie stopnia utlenienia lipidów w żywności?
- [9] O jakich cechach żywności decyduje obecność kwasów w produktach?
- [10] Jakie są rodzaje kwasowości produktów spożywczych?
- [11] Od czego zależy pH produktów spożywczych?
- [12] Jakie są metody pomiaru kwasowości produktów spożywczych?
- [13] Co to są antocyjany?
- [14] W jaki sposób antocyjany wykorzystywane są w przemyśle spożywczym?
- [15] W jakim celu określa się poziom antocyjanów w produktach rolnospożywczych?
- [16] Jakie metody wykorzystywane są do oznaczania zawartości antocyjanów w żywności?
- [17] Co to są białka i jaki mają przeciętny skład chemiczny?
- [18] Czym są białka pełnowartościowe?
- [19] Jakie są metody ilościowych oznaczeń białka w produktach spożywczych?
- [20] Jakie są metody jakościowego oznaczania białka w żywności?
- [21] Do jakiej grupy chemicznej zaliczane są flawonoidy?
- [22] Wykorzystanie flawonoidów w produkcji żywności.
- [23] Podział flawonoidów ze względu na ich budowę chemiczną.
- [24] Metody oznaczania flawonoidów w produktach spożywczych.
- [25] Jakie właściwości reologiczne wykazują produkty spożywcze?
- [26] Jakie czynniki wpływają na lepkość produktów spożywczych?
- [27] Z czego wynikają trudności w badaniach reologicznych mąk i ciast?
- [28] Metody pomiaru cech reologicznych produktów spożywczych.

-
- [29] Co to jest likopen?
- [30] Czym jest likopen pod względem strukturalnym?
- [31] Przyczyny degradacji likopenu.
- [32] Metody oznaczania likopenu w żywności.
- [33] Co określa sformułowanie witamina C?
- [34] Wykorzystanie witaminy C/kwasu askorbinowego w przemyśle spożywczym.
- [35] Zastosowanie kwasu askorbinowego w wytwarzaniu mięsa mielonego oraz wędlin.
- [36] Metody oznaczania kwasu askorbinowego w żywności.
- [37] Definicja błonnika pokarmowego.
- [38] System klasyfikacji składników błonnika pokarmowego.
- [39] W jaki sposób fizykochemiczne właściwości błonnika pokarmowego mogą być modyfikowane?
- [40] Metody oznaczania błonnika pokarmowego w żywności.
- [41] W jakim celu określa się rodzaj i stężenie węglowodanów w żywności?
- [42] Podział węglowodanów ze względu na ich budowę chemiczną.
- [43] Które węglowodany zaliczane są do grupy cukrów redukujących?
- [44] Metody oznaczania węglowodanów w produktach spożywczych.
- [45] Różnice pomiędzy skrobią typu A i B.
- [46] Znaczenie skrobi w produktach spożywczych.
- [47] Wykorzystanie skrobi w przemyśle spożywczym.
- [48] Metody oznaczania skrobi w produktach spożywczych.
- [49] Od czego zależy skład mineralny wód powierzchniowych i podziemnych?
- [50] Od czego zależą właściwości fizykochemiczne wód butelkowanych?
- [51] Znaczenie wapnia i magnezu w wodach mineralnych dla zdrowia człowieka.
- [52] Metody oznaczania koncentracji wapnia i magnezu w odach mineralnych.
- [53] Co to są tiocyjaniany?
- [54] Przemiany glukozyolanów w produktach spożywczych.
- [55] Wykorzystanie izotiocyjaniatów w przemyśle spożywczym.
- [56] Jakie są metody oznaczania koncentracji tiocyjaniatów w żywności pochodzenia roślinnego?
- [57] Co to są polifenole?
- [58] Podział związków fenolowych ze względu na ich budowę chemiczną.
- [59] Jakie kwasy fenolowe występują w produktach spożywczych?
- [60] Metody oznaczania związków fenolowych w żywności.

17. Literatura

Abang Zaidel D.N., Chin N.L., Yusof Y.A., *A Review on Rheological Properties and Measurements of Dough and Gluten*, "Journal of Applied Sciences" 2010, vol. 10, No. 20.

Abdulkarim S.M., Long K., Lai O.M., Muhammad S.K.S., Ghazali H.M., *Frying quality and stability of high-oleic Moringa oleifera seed oil in comparison with other vegetable oils*, "Food Chemistry" 2007, vol. 105, No 4, s. 1382-1389.

Abong G.O., Okoth M.W., Karuri E.G., Kabira J.N., Mathooko F.M., (2012). *Levels of reducing sugars in eight Kenyan potato cultivars as influenced by stage of maturity and storage conditions*, "Journal of Animal & Plant Sciences" 2009, vol. 2, No 2, s. 76 – 84.

Adsule P.G., *Simplified extraction procedure in the rapid spectrophotometric method for lycopene estimation in tomato*, "Journal of Food Science and Technology" 1979, No 16, s. 216-216.

Agarwal A., Shen H., Agarwal S., Rao A.V., *Lycopene content of tomato products: its stability, bioavailability and in vivo antioxidant properties*, "Journal of Medicinal Food" 2001, vol. 4, No 1, s. 9-15.

Alda L.M., Gogoasa I., Bordean D.M., Gergen I., Alda S., Moldovan C., Nita, L., *Lycopene content of tomatoes and tomato products*, "Journal of Agroalimentary Processes and Technologies" 2009, vol 15, No 4, s. 540-542.

Alonso-Salces R.M., Barranco A., Corta E., Berrueta L.A., Gallo B., Vicente F., *A validated solid-liquid extraction method for the HPLC determination of polyphenols in apple tissues*, "Talanta" 2005, vol. 65, No 3, s. 654–662.

Alqarni A.S., Owayss A.A., Mahmoud A.A., Hannan M.A., *Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia*, "Journal of Saudi Chemical Society" 2014, vol. 18, No 5, s. 618-625.

Amin M.N.G., Pebruwantoro D., Pralebda S.A., Hasan M.N., Zakariya Subekti S., Pramono H., Alamsjah M.A., *Functional and rheological properties of mixed flour from mangrove fruit of bruguiera gymnorrhiza flour and wheat flour*, „Food Research" 2021, vol. 5, No 1, s. 167-173.

Analiza żywności. Wybrane metody oznaczeń jakościowych i ilościowych składników żywności, red. M. Nogala-Kałużka, Wydawnictwo UP w Poznaniu, Poznań 2005.

Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals, red. Z. Xu, L.R. Howard, Wiley, Oxford 2012.

Anita F.P., Abraham P., *Clinical Dietetics and Nutrition*, Oxford University Press, New Delhi 2006.

Anthon G., Barrett, D.M., *Standardization of a rapid spectrophotometric method for lycopene analysis*, "Acta Horticulturae" 2007, No 758, s. 111–128.

Aruoma O., *Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and diseases*, "Journal of the American Oil Chemists' Society" 1998, No 75, s. 199–212.

Arya S.P., Mahajan M., Jain P., *Non-spectrophotometric methods for the determination of Vitamin C*, "Analytica Chimica Acta" 2000, vol. 417, No 1, s. 1-14.

Avdeef A., Berger C.M., Brownell C., *pH-Metric Solubility. 2: Correlation Between the Acid-Base Titration and the Saturation Shake-Flask Solubility-pH Methods*, "Pharmaceutical Research" 2000, No 17, s. 85–89.

Baba A., Ereeş F.S., Hiçsönmez Ü., Çam S., Özdilek H.G., *An assessment of the quality of various bottled mineral water marketed in Turkey*, "Environmental Monitoring and Assessment" 2008, vol. 139, No 1, s. 277-285.

Badania jakości produktów spożywczych, red. M. Krelowska-Kułas, Państw. Wydaw. Ekonomiczne, Warszawa, 1993.

Baer D.J., Rumpler W.V., Miles C.W., Fahey Jr, G.C., *Dietary fiber decreases the metabolizable energy content and nutrient digestibility of mixed diets fed to humans*, "The Journal of Nutrition" 1997, vol. 127, No 4, s. 579-586.

Baig A., Zubair, M., Hussain Sumrra, S., Faizan Nazar M., Nadeem Zafar, M., Jabeen, K., Bilal Hassan, M., Rashid, U., *Heating effect on quality characteristics of mixed canola cooking oils*, "BMC Chemistry" 2022, vol. 16, No 1.

Balentine D.A., Dwyer J.T., Erdman J.W., Jr., Ferruzzi M.G., Gaine P.C., Harnly J.M., Kwik-Urbe C.L., *Recommendations on reporting requirements for flavonoids in research*, "The American Journal of Clinical Nutrition" 2015, vol 101, No 6, s. 1113–1125.

Beerh O.P., Siddappa G.S., *A rapid spectrophotometric method for the detection and estimation of adulterants in tomato ketchup*, "Food Technology" 1959, vol. 13, No 7, s. 414-418.

Bener M., Akyüz E., Şen F.B., Başkan K.S., Tütem E., Apak M.R., *A simple automated microplate method for determining reducing sugars in food extracts and synthetic serum using cupric-neocuproine as reductant*, "Turkish Journal of Chemistry" 2018, vol. 42, No 3, s. 794-807.

Beutler H.O., *Enzymatische Bestimmung von Stärke in Lebensmitteln mit Hilfe der Hexokinase-Methode*, "Starch-Stärke" 1978, vol. 30, No 9, s. 309-312.

Bharti V.K., Giri A., Kumar K., Leong Y.H., Samin A.S.M., Majid M.I.A., *Evaluation of physico-chemical parameters and minerals status of different water sources at high altitude*, "Annals of Environmental Science and Toxicology" 2017, vol. 2, No 1, s. 010-018.

Bhattacharya S., Bhattacharya S., *Rheology of cooked debranned maize flour suspension*, "Journal of Food Engineering" 1996, vol. 27, No 1, s. 97-105.

Biswas A.K., Sahoo J., Chatl M.K., *A simple UV-VIS spectrophotometric method for determination of β -carotene content in raw carrot, sweet potato and supplemented chicken meat nuggets*, "Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology" 2011, No 44, s. 1809–1813.

Bloksma A.H., *Dough structure, dough rheology, and baking quality*, "Cereal Foods World" 1990, No 35, s. 237-244.

Bohm F., Edge R., Truscott T.G., *Interactions of dietary carotenoids with singlet oxygen (1O_2) and free radicals: potential effects for human health*, "Acta Biochimica Polonica" 2012, vol. 59, No 1, s. 27-30.

Böhmer H., Müller H., Resch K.L., *Calcium supplementation with calcium-rich mineral waters: a systematic review and meta-analysis of its bioavailability*, "Osteoporosis International" 2000, vol. 1, No 11, s. 938-943.

Bonnesen C., Stephensen P.U., Andersen O., Sorensen H., Vang O., (1999). *Modulation of cytochrome P-450 and glutathione S-transferase isoform expression in vivo by intact and degraded indolyl glucosinolates*, "Nutrition and Cancer" 1999, vol. 33, No 2, s. 178-187.

Bothe G., Co A., Auinger A., *Efficacy and safety of a natural mineral water rich in magnesium and sulphate for bowel function: a double-blind, randomized, placebo-controlled study*, "European Journal Of Nutrition" 2017, vol. 56, No 2, s. 491-499.

Braniša J., Jenisová Z., Porubská M., Jomová K., Valko M., *Spectrophotometric determination of chlorophylls and carotenoids. An effect of sonication and sample processing*, "Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences" 2021, No 3, s. 61-64.

Brennan C.S., Suter M., Luethi T., Matia-Merino L. Qvortrup J., *The relationship between wheat flour and starch pasting properties and starch hydrolysis: effect of non-starch polysaccharides in a starch gel system*, “Starch-Starke” 2008, No 60, s. 23–33.

Brouillard R., *The in vivo expression of anthocyanin colour in plants*, “Phytochemistry” 1983, No 22, s. 1311–1323.

Burton A.C., Cornhill J.F., *Correlation of cancer death rates with altitude and with the quality of water supply of the 100 largest cities in the United States*, “Journal of Toxicology and Environmental Health” 1977, vol. 3, No 3, s. 465–478.

Burton R.F., *Ionic regulation and water balance*, “The Mollusca-Physiology” 1983, s. 293–350.

Cai Z., Li K., Jun Lee W., Reaney M.T.J., Zhang N., Wang Y., *Recent progress in the thermal treatment of oilseeds and oil oxidative stability: A review*, “Fundamental Research”, 2021, No 1, s. 767–784.

Camara M., Torrecilla J.S., Caceres J.O., Sanchez Mata M.C., Fernandez-Ruiz, V., *Neural network analysis of spectroscopic data of lycopene and β -carotene content in food samples compared to HPLC-UV-Vis*, “Journal of Agricultural and Food Chemistry” 2010, vol. 58, No 1, s. 72–75.

Canene-Adams K., Campbell J.K., Zaripheh S., Jeffery E.H., Erdman Jr, J.W., *The tomato as a functional food*, “The Journal of Nutrition” 2005, vol. 135, No 5, s. 1226–1230.

Carr A.C., Vissers M.C., *Synthetic or food-derived vitamin C—are they equally bioavailable?*, “Nutrients” 2013, vol. 5, No 11, s. 4284–4304.

Castro-Alves V.C., Cordenunsi B.R., *Total soluble phenolic compounds quantification is not as simple as it seems*, “Food Analytical Methods” 2015, vol. 8, No 4, s. 873–884.

Chandra S., Singh S., Kumari D., *Evaluation of functional properties of composite flours and sensorial attributes of composite flour biscuits*, “Journal of Food Science and Technology” 2015, No 52, s. 3681–3688.

Chen L., Stacewicz-Sapuntzakis M., Duncan C., Sharifi R., Ghosh L., van Breemen R., Bowen P.E., *Oxidative DNA damage in prostate cancer patients consuming tomato sauce-based entrees as a wholefood intervention*, “Journal of the National Cancer Institute” 2001, No 93, s. 1872–1879.

Chiste R.C., Mercadante A.Z., *Identification and quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian fruit*

Caryocar villosum, "Journal of Agricultural and Food Chemistry" 2012, No 60, s. 5884–5892.

Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. Biochemistry, biophysics, functions and applications, red. B. Grimm, Springer Netherlands, Dordrecht 2006.

Choe E., Min D., *Chemistry of deep-fat frying oils*, "Journal of Food Science" 2007, vol. 72, No 5, s. 77–86.

Clarke D.B., *Glucosinolates, structures and analysis in food*, "Analytical methods" 2010, vol. 2, No 4, s. 310-325.

Clément A., Bacon R., Sirois S., Dorais, M., *Mature-ripe tomato spectral classification according to lycopene content and fruit type by visible, NIR reflectance and intrinsic fluorescence*, "Quality Assurance and Safety of Crops & Foods" 2015, vol. 7, No 5, s. 747-756.

Clément A., Dorais M., Vernon M., *Nondestructive measurement of fresh tomato lycopene content and other physicochemical characteristics using visible-NIR spectroscopy*, "Journal Agricultural Food Chemical" 2008, vol. 56, No 21, s. 9813–9818.

Cole R.A., *Isothiocyanates, nitriles and thiocyanates as products of autolysis of glucosinolates in cruciferae*, "Phytochemistry" 1976, No 15, s. 759–762.

Copeland L., Blazek J., Salman H., Tang M.C., *Form and functionality of starch*, "Food Hydrocolloids" 2009, vol. 23, No 6, s. 1527-1534.

D'Archivio M., Filesi C., Vari R., Scazzocchio B., Masella R., *Bioavailability of the polyphenols: status and controversies*, "International Journal Of Molecular Sciences" 2010, vol. 11, No 4, s. 1321-1342.

da Silva P.M., Gauche C., Gonzaga L.V., Costa A.C.O., Fett R., *Honey: Chemical composition, stability and authenticity*, "Food Chemistry" 2016, No 196, s. 309-323.

Davey M.W., van Montagu M., Inzé D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N., Benzie I.J.J., Strain J.J., Favell D., Fletcher J., *Plant l-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing*, "Journal of the Science of Food and Agriculture" 2000, No 80, s. 825–860.

Davis A.R., Fish W.W., Perkins-Veazie P., *A rapid hexane-free method for analyzing lycopene content in watermelon*, "Journal of Food Science" 2003, vol. 68, No 1, s. 328–332.

Davis A.R., Fish W.W., Perkins-Veazie P., *A rapid spectrophotometric method for analyzing lycopene content in tomato and tomato products*, "Postharvest Biology and Technology" 2003, vol. 8, No 3, s. 425-430.

De Araújo A.D., Oliveira F.G.S., Lacerda F.F., da Silva C.E.S., dos Santos B.S., Bezerra-Filho C.M., Ramos B.A., Harand W., da Silva N.H., Paiva P.M.G., Almeida J.R.G.S., Silva M.V., Correia, M.T.S., *Phytochemical screening, in vitro antioxidant, photoprotective and themolytic activities of ethyl acetate extracts of the fruits and branches from Spondias tuberosa (umbu)*, "Research, Society and Development" 2021, vol 10, No 1, s. e38610111825.

De Groot A.P., Willems M.I., De Vost R.H., *Effects of high levels of Brussels sprouts in the diet of rats*, "Food and Chemical Toxicology" 1991, No 29, s. 829–837.

de Souza Portugal, D., e Silva, C. R., Machado, D. V., de Lima, L. A., & da Silva-Filho E.V., *Evaluation of the Quality of Drinking Mineral Waters Commercialized in Niterói Municipality-RJ*, "Anuário do Instituto de Geociências" 2019, vol. 42, No 2, s. 299-308.

Degner S.C., Papoutsis A.J., Selmin O., Romagnolo D.F., *Targeting of aryl hydrocarbon receptor-mediated activation of cyclooxygenase-2 expression by the indole-3-carbinol metabolite 3, 3'-diindolylmethane in breast cancer cells*, "The Journal of Nutrition" 2009, vol. 139, No 1, s. 26-32.

Del Rio D., Rodriguez-Mateos A., Spencer J.P., Tognolini M., Borges G., Crozier A., *Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases*. "Antioxidants & Redox Signaling" 2013, No 18, s. 1818–1892.

Delaquis P.J., Sholberg P.L., *Antimicrobial activity of gaseous allyl isothiocyanate*, "Journal of Food Protection" 1997, No 60, s. 943.

Deutsch E., Montanari P., Mallez C., *Isothermal study of the flow at the junction between an auxiliary line and primary circuit of pressurised water reactors*, "Journal Of Hydraulic Research" 1997, vol. 35, No 6, s. 799-812.

Deutsch J.C., *Dehydroascorbic acid*, "Journal of Chromatography A" 2000, No 881, s. 299-307.

Dhingra D., Michael M., Rajput H., Patil, R.T., *Dietary fibre in foods: a review*, "Journal of Food Science and Technology" 2012, vol. 49, No 3, s. 255-266.

Di Mascio P., Kaiser S.P., Sies H., *Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher*, "Archives of Biochemistry and Biophysics" 1989, No 274, s. 532-538.

Dikeman Ch.L., Fahey G.C. Jr., *Viscosity as related to dietary fibre. A review*, "Critical Reviews in Food Science and Nutrition" 2006, No 46, s. 649-663.

Dimascio P., Kaiser S., Sies H., *Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher*, "Archives of Biochemistry and Biophysics" 1989, No 274, s. 532-538.

Dobraszczyk B.J., Morgenstern M.P., *Rheology and the Breadmaking Process*, "Journal of Cereal Science" 2003, vol. 38, No. 3, s. 229-245.

Dolunay S., Gulnur K.K., Gulsah G., Mahmure U.O., *Determination of anthocyanins in some vegetables and fruits by derivative spectrophotometric method*, "Reviews in Analytical Chemistry" 2008, vol. 27, No 4, s. 235-246.

Drzazga B., *Analiza techniczna w przemyśle spożywczym – część ogólna*, WSiP, Warszawa, 1999.

Dufour V., Stahl M., Baysse C., *The antibacterial properties of isothiocyanates*, "Microbiology" 2015, vol. 161, No 2, s. 229-243.

Duthie G.G., Gardner P.T., Kyle J.A.M., *Plant polyphenols: are they the new magic bullet?*, "Proceedings of the Nutrition Society" 2003, vol. 62., No 3, s.599-603.

Dutta S., Halder S., *A colourful food palette: health benefits and Beyond*, "International Journal of Current Research" 2021, vol. 13, No 03, s. 16596-16600.

Edmunds W.M., Smedley P.L., *Groundwater geochemistry and health: an overview*, "Geological Society" 1996, vol. 113, No 1, s. 91-105.

Ee K.Y., Eng M.K., Lee M.L., *Physicochemical, thermal and rheological properties of commercial wheat flours and corresponding starches*, "Food Science and Technology" 2020, No 40, s. 51-59.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), *Calcium and contribution to the normal development of bones: evaluation of a health claim pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006*, "EFSA Journal" 2016, vol. 14, No 10, s. 4587.

Elleuch M., Bedigian D., Roiseux O., Besbes S., Blecker C., Attia H., *Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review*, "Food Chemistry" 2011, vol. 124, No 2, s. 411-421.

Englyst H.N., Quigley M.E., Hudson G.J., *Determination of dietary fibre as non-starch polysaccharides with gas-liquid chromatographic, high-*

performance liquid chromatographic or spectrophotometric measurement of constituent segars, "Analyst" 1994, vol. 119, No 7, s. 1497-1509.

Ergun E., Demirata B., Gumus G., Apak R., *Simultaneous determination of chlorophyll a and chlorophyll b by derivative spectrophotometry*, "Analytical and Bioanalytical Chemistry" 2004, vol. 379, No 5-6, s. 803-811.

Everette J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker R.B., *Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin- Ciocalteu reagent*, "Journal Of Agricultural And Food Chemistry" 2010, vol. 58, No 14, s. 8139-8144.

Fahey J.W., Zalcmann A.T., Talalay P., *The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants*, "Phytochemistry" 2001, No 56, s. 5-51.

Felker P., Bunch R., Leung A.M., *Concentrations of thiocyanate and goitrin in human plasma, their precursor concentrations in brassica vegetables, and associated potential risk for hypothyroidism*, "Nutrition reviews" 2016, vol. 74, No 4, s. 248-258.

Fernandes A.J., Ferreira M.R., Randau K.P., de Souza T.P., Soares L.A., *Total flavonoids content in the raw material and aqueous extractives from Bauhinia monandra Kurz (Caesalpiniaceae)*, "Scientific World Journal" 2012, No 23462.

Ferreira G., Mertens D.R., *Measuring detergent fibre and insoluble protein in corn silage using crucibles or filter bags*, "Animal Feed Science and Technology" 2007, vol. 13, No 3-4, s. 335-340.

Ferruzzi M.G., Bohm V., Courtney P.D., Schwartz S.J., *Antioxidant and Antimutagenic Activity of Dietary Chlorophyll Derivatives Determined by Radical Scavenging and Bacterial Reverse Mutagenesis*, "Assays Journal of Food Science" 2002, vol. 67, No 7, s. 2589-259.

Fish W.W., Perkins-Veazie P., Collins J.K., *A quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents*, "Journal of Food Composition and Analysis" 2002, vol. 15, No 3, s. 309-317.

Forschungsanstalten V.D.L.U.U., *Methodenbuch Band III-Die Chemische Untersuchung Von Futtermitteln*. Mikrowellenbeheizter Druckaufschluss. Darmstadt: VDLUFA-Verlag 1997.

Fox J.D., Robyt J.F., *Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader*, "Analytical Biochemistry" 1991, vol. 195, No 1, s. 93-96.

Fuleki T., Francis F.J., *Quantitative methods for anthocyanins 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice*, "Journal of Food Science" 1968, No 33, s. 78-83.

Functional Food - Improve Health through Adequate Food, red. M.C. Hueda, InTech, Rijeka, Croatia 2017.

Future of Flour – A Compendium of Flour Improvement, red. L. Popper, W. Schäfer, W. Freund, Verlag Agrimedia, Clenze 2006.

Gamon J.A., Surfus J.S., *Assessing leaf pigment content with a reflectometer*, "New Phytologist" 1999, No 43, s. 105–117.

Gao N., Budhraj A., Cheng S., Liu E.H., Chen J., Yang Z., Shi X., *Phenethyl isothiocyanate exhibits antileukemic activity in vitro and in vivo by inactivation of Akt and activation of JNK pathways*, "Cell death & disease" 2011, vol. 2, No 4, 140-141.

Gatarska A., Tonska E., Ciborska J., *Natural mineral bottled waters available on the polish market as a source of minerals for the consumers. Part 1. Calcium and magnesium*, "Roczniki Państwowego Zakładu Higieny" 2016, vol. 67, No 1.

Gérard V., Ay E., Graff B., Morlet-Savary F., Galopin C., Mutilangi W., Lalevée J., *Ascorbic acid derivatives as potential substitutes for ascorbic acid to reduce color degradation of drinks containing ascorbic acid and anthocyanins from natural extracts*, "Journal Of Agricultural And Food Chemistry" 2019, vol. 67, No 43, s. 12061-12071.

Gerits L.R., Pareyt B. Delcour J.A., *Wheat starch swelling, gelatinization and pasting: Effects of enzymatic modification of wheat endogenous lipids*, "LWT - Food Science and Technology" 2015, vol. 63, No 1, s. 361-366.

Ghaly A.E., MacDonald K.N., *Drying of poultry manure for use as animal feed*, "American Journal of Agricultural and Biological Sciences" 2012, vol. 7, No 3, s. 239-254.

Ghatak B., Ali S.B., Debabhuti N., Sharma P., Ghosh A., Tudu B., Bhattacharya N., *Discrimination of tomatoes based on lycopene using cyclic voltammetry*, "Sensor Letters" 2017, vol. 15, No 10, s. 827–836.

Giovannucci E., *Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: Review of the epidemiologic literature*, "Journal National Cancer Institute" 1999, No 91, s. 317–331.

Gonçalves C., Rodriguez-Jasso R.M., Gomes N., Teixeira J.A., Belo I., *Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates*, “Analytical Methods” 2010, vol. 2, No 12, s. 2046-2048.

Gopi S., Varmaa K., George R.A., *Short Review on the Medicinal Properties of Chlorophyll Juice*, “Asian Journal of Pharmaceutical Technology & Innovation” 2014, vol. 2, No 9, s. 89-94.

Gorinstein S., Caspi A., Libman E., Leontowicz M., Tahsma Z., Katrich E., Jastrzebski Z., Trakhtenberg S., *Bioactivity of Beer and its influence on human metabolism*, “International Journal of Food Sciences and Nutrition” 2007, No 58, s. 94–107.

Gorissen S.H.M., Crombag J.J.R., Senden J.M.G., Waterval W.A.H., Bierau J., Verdijk L.B., van Loon L.J.C., *Protein content and amino acid composition of commercially available plant-based protein isolates*, “Amino Acids” 2018, vol, 50, No 12, s. 1685-1695.

Gozalli N., Nafi A., *Characteristics of Import and Local (Anjasmoro and Baluran varieties) Soybean Flour by Blanching and Non-Blanching Treatment*, “Jurnal Agroteknologi” 2015, vol. 9, No 2, s. 191–200.

Green C.J., *Fibre in enteral nutrition*, “Clinical Nutrition” 2001, No 20, s. 23-39.

Gronbaek M., Deis A., Sorensen T.I., Becker U., Schnohr P., Jensen G., *Mortality associated with moderate intakes of wine*, “Beer and spirits Journal” 1995, No 310, s.1165–1169.

Grosso G., Micek A., Godos J., Pajak A., Sciacca S., Galvano F., Giovannucci E.L., *Dietary flavonoid and lignan intake and mortality in prospective cohort studies: Systematic review and dose-response meta-analysis*, “American Journal of Epidemiology” 2017, No 185, s. 1304–1316.

Guillon F., Champ M., *Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology*, “Food Research International” 2000, vol. 33, No 3-4, s. 233-245.

Gupta N., Jain S.K., *Storage behavior of mango as affected by post harvest application of plant extracts and storage conditions*, “Journal Of Food Science And Technology” 2014, vol. 51, No. 10, s. 2499-2507.

Hadnađev M., Dapčević Hadnađev T., Šimurina O., Filipčev B., *Empirical and Fundamental Rheological Properties of Wheat Flour Dough as Affected by Different Climatic Conditions*, “Journal of Agricultural Science and Technology” 2013, No 15, s. 1381-1391.

Halkier B.A., Gershenzon J., *Biology and biochemistry of glucosinolates*, "Annual Review of Plant Biology" 2006, No 57, s. 303–333.

Han H., Kwon H., *Estimated dietary intake of thiocyanate from Brassicaceae family in Korean diet*, "Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A" 2009, vol. 72, No 21-22, s. 1380-1387.

Hayes M., *Measuring Protein Content in Food: An Overview of Methods*, "Foods" 2020, vol. 23, No 9(10), s. 1340.

He J., Santos-Buelga C., Mateus N., De Freitas V., *Isolation and quantification of oligomeric pyranoanthocyanin-flavanol pigments from red wines by combination of column chromatographic techniques*, "Journal of Chromatography A" 2006, No 1134, s. 215–225.

Hem J.D., *Redox processes at surfaces of manganese oxide and their effects on aqueous metal ions*, "Chemical Geology" 1978, vol. 21, No 3-4, s. 199-218.

Hernández Y., Lobo M.G., González M., *Determination of vitamin C in tropical fruits: A comparative evaluation of methods*, "Food Chemistry" 2006, vol. 96, No 4, s. 654-664.

Hill R., *Rapeseed meal in the diet of ruminants*, "Nutrition Abstracts and Reviews" 1991, No 61, s. 139–155

Hillman L.C., Peters S.G., Fisher C.A., Pomare E.W., *The effects of the fiber components pectin, cellulose and lignin on serum cholesterol levels*, "The American Journal of Clinical Nutrition" 1985, vol. 42, No 2, s. 207-213.

Hong V., Wrolstad R., *Characterization of anthocyanin-containing colorants and fruit juices by HPLC/photodiode array detection*, "Journal Of Agricultural And Food Chemistry" 1990, No 38, s. 698-708.

Huang D., Ou B., Prior R.L., *The chemistry behind antioxidant capacity assays*, "Journal Of Agricultural And Food Chemistry" 2005, vol. 53, No 6, s. 1841-1856.

Iwe M.O., Onyeukwu U. Agiriga A.N., *Proximate, functional and pasting properties of FARO 44 rice, African yam bean and brown cowpea seeds composite flour*, "Cogent Food and Agriculture" 2016, No 2.

James A.O., Akaranta O., *Inhibition of Zinc in Hydrochloric acid solution by Red Onion Skin Acetone extract*, "Research Journal of Chemical Sciences" 2011, vol. 1, No 1, s. 31–37.

Jariyah J., Widjanarko S., Yunianta Estiasih T., Sopade P., *Pasting properties mixtures of mangrove fruit flour (Sonneratia caseolaris) and starches*, "International Food Research Journal" 2014, vol. 21, No 6, s. 2161-2167.

Jeffrey S., Humphrey G., *New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton*, "Biochemie und Physiologie der Pflanzen" 1975, No 167, s. 191-194.

Jenkins D.J., Kendall C.W., Ransom T.P., *Dietary fiber, the evolution of the human diet and coronary heart disease*, "Nutrition Research" 1998, vol. 18, No 4, s. 633-652.

Jezierny D., Mosenthin R., Sauer N., Schwadorf K., Rosenfelder-Kuon P., *Methodological impact of starch determination on starch content and ileal digestibility of starch in grain legumes for growing pigs*, "Journal of Animal Science and Biotechnology" 2017, vol. 8, No 1, s. 1-8.

Jiang L., He P., Chen J., Liu Y., Liu D., Qin G., Tan N., *Magnesium levels in drinking water and coronary heart disease mortality risk: a meta-analysis*, "Nutrients" 2016, vol. 8, No 1, s. 5.

Jiménez-Escrig A., Sánchez-Muniz F.J., *Dietary fibre from edible seaweeds: Chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism*, "Nutrition Research" 2000, vol. 20, No 4, s. 585-598.

Johnson A.R., Carlson E.E., *Collision-Induced Dissociation Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Natural Product Structure Elucidation*, "Analytical Chemistry" 2015, No 87, s. 10668-10678.

Jonsson A.L., Roberts, M.A., Kiappes, J.L., Scott, K.A., *Essential chemistry for biochemists*, "Essays in Biochemistry" 2017, No 61(4), s. 401-427.

Kallithraka S., Mohdalya A.A.A., Makris D.P., Kefalas P., 2005, *Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (Vitis vinifera sp.): association with antiradical activity*, "Journal of Food Composition and Analysis" 2005, No 18, s. 375-386.

Kamei H., Kojima T., Hasegawa M., Koide T., Umeda T., Yukawa T., Terabe K., *Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro*, "Cancer Investigations" 1995, vol. 13, No 6, s. 590-594.

Karaivanova M., Drenska D., Ovcharov R., *A modification of the toxic effects of platinum complexes with antocyanins*, "Eksp Med Morfol." 1990, vol. 29, No 2, s. 19-24.

Khan A.K., Kousar S., Tungmunnithum D., Hano C., Abbasi B.H., Anjum S., *Nano-Elicitation as an Effective and Emerging Strategy for In Vitro Production*

of Industrially Important Flavonoids, "Applied Science" 2021, vol. 11, No 1694.

Khatkar B.S. Schofield J.D., *Dynamic rheology of wheat flour dough. II. Assessment of dough strength and bread-making quality*, "Journal of the Science of Food and Agriculture" 2002, No 82, s. 823-826.

Khetarpaul N., Goyal R., *Effect of composite flour fortification to wheat flour on the quality characteristics of unleavened bread*, "British Food Journal" 2009, No 111, s. 554-564.

Kim M.J., Kim H., *Anticancer effect of lycopene in gastric carcinogenesis*, "Journal Cancer Prevention" 2015, vol. 20, No 2, s. 92-96.

Kimura M., Rodriguez-Amaya D.B., *Carotenoid composition of hydroponic leafy vegetables*, "Journal of Agricultural and Food Chemistry" 2003, No 51, s. 2603-2607.

Klepacka M., *Analiza żywności*, SGGW, Warszawa, 2003.

Kmieciak W., Lisiewska Z., Jaworska G., *Effect of storage conditions on the technological value of dill (*Anethum graveolens* L.)*, "Folia Horticulturea" 2001, No 13, s. 33-43.

Kozisek F., *Regulations for calcium, magnesium or hardness in drinking water in the European Union member states*, "Regulatory Toxicology and Pharmacology" 2020, vol. 112, No 104589.

Kozma- Kovacs E.K., Sarkany P., *Spectrophotometric analysis of fruits and fruits containing anthocyanins*, "Groupe Polyphenols Bulletin de Liaison" 1986.

Krebs, H.A., *The Sheffield Experiment on the vitamin C requirement of human adults*, "Proceedings of the Nutrition Society" 1953, No 12, s. 237-246.

Kucuk O., Sarkar F.H., Sakr W., Djuric Z., Pollak M.N., Khachik F., Wood D. P., Jr., *Phase II randomized clinical trial of lycopene supplementation before radical prostatectomy*, "Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: a Publication of the American Association for Cancer Research" 2001, No 10, s. 861-868.

Kumirska J., Gołębiowski M., Paszkiewicz M., Bychowska A., *Analiza żywności, skrypt elektroniczny dla studentów Ochrony Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego*, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2010.

Lamaison J.L.C., Carnet A., *Teneurs en principaux flavonoids des fleurs de Crataegus monogyna Jacq et de Crataegus laevigata (Poiret D. C) en fonction de la vegetation*, "Pharmaceutica Acta Helvetiae" 1990, No 65, s. 315-320.

Larsen E., Christensen L.P., *Simple saponification method for the quantitative determination of carotenoids in green vegetables*, "Journal of Agricultural and Food Chemistry" 2005, No 53, s. 6598–6602.

Leclerc H., Moreau, A., *Microbiological safety of natural mineral water*, "FEMS Microbiology Reviews" 2002, vol. 26, No 2, s. 207-222.

Lee S.K., Kader A.A., *Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops*, "Postharvest Biology and Technology" 2000, vol. 20, No 3, s. 207-220.

Lefebvre T., Talbi A., Atwi-Ghaddar S., Destandau E., Lesellier E., *Development of an analytical method for chlorophyll pigments separation by reversed-phase supercritical fluid chromatography*, "Journal of Chromatography A" 2020, No 1612.

Lempereur I., Rouau X., Abecassis J., *Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (Triticum durum L.) grain and its milling fractions*, "Journal of Cereal Science" 1997, vol. 25, No 2, s. 103-110.

Lethbridge A., Canada Rój E., Dobrzyńska-Inger A., Grzęda K., Kostrzewa D., *Determining the color of bio-oils from berry seeds obtained through supercritical extraction using UV-Vis spectrophotometry*, "Chemik" 2011, vol. 65, No 9, s. 859-866.

Li R. W., Li C., Wang T.T., *Transcriptomic alterations in human prostate cancer cell LNCaP tumor xenograft modulated by dietary phenethyl isothiocyanate*, "Molecular Carcinogenesis" 2013, vol. 52, No 6, s. 426-437.

Lietti A, Cristoni A, Picci M., *Studies on Vaccinium myrtillus anthocyanosides. I. Vasoprotective and antiinflammatory activity*, "Arzneimittelforschung" 1976, vol 26, No 5, s. 829-832.

Lin M., Shi Z. Francis F.J., *A Simple Method of Analysis for Tradescantia Anthocyanins*, "Journal of Food Science" 1992, No 57, s. 766-767.

Liu Y.T., Perera C.O., Suresh V., *Comparison of three chosen vegetables with others from South East Asia for their lutein and zeaxanthin content*, "Food Chemistry" 2007, No 101, s. 1533–1539.

Lobit P., Soing P., Génard M., Habib R., *Theoretical analysis of relationships between composition, pH, and titratable acidity of peach fruit*, "Journal of Plant Nutrition" 2002, vol. 25, No 12, s. 2775-2792.

Lozada-Ramírez J.D., Ortega-Regules A.E., Hernández L.R., de Parrodi C.A., *Spectroscopic and Spectrometric Applications for the Identification of Bioactive Compounds from Vegetal Extracts*, "Applied Sciences" 2021, No 11, s. 30-39.

López-Moreno M., Garcés-Rimón M., Miguel M., *Antinutrients: Lectins, goitrogens, phytates and oxalates, friends or foe?*, "Journal of Functional Foods" 2022, No 89.

Luccia B.H., Kunkel M.E., *In vitro availability of calcium from sources of cellulose, methylcellulose, and psyllium*, "Food Chemistry" 2002, vol. 77, No 2, s. 139-146.

Luo C., Zou X., Li Y., Sun C., Jiang Y., Wu Z., *Determination of flavonoids in propolis-rich functional foods by reversed phase high performance liquid chromatography with diode array detection*, "Food Chemistry" 2011, No 127, s. 314-320.

Lupton J.R., Fahey G.C., Jenkins D.A., Marlett J.A., Slavin J.L., Story J.A., Trumbo P., *Dietary Reference Intakes. Proposed definition of dietary fiber. A report of the Panel on the Definition of Dietary Fiber and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine*, National Academies Press., Washington 2001.

Mabry T.J., Markhama K.R., Thomas M.B., *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer, Berlin 1970.

Mæhre H.K., Dalheim L., Edvinsen G.K., Elvevoll E.O., Jensen I.J., *Protein Determination-Method Matters*, "Foods" 2018, vol. 1, No 1., s. 5.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L., *Polyphenols: food sources and bioavailability*, "The American Journal of Clinical Nutrition" 2004, vo. 79, No 5, s.727-747.

Mantoura R.F.C., Llewellyn C.A., *The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography*, "Analytica Chimica Acta" 1983, No 151, s. 297-314.

Martins R.C., Silva C.L.M., *Kinetics of frozen stored green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) quality changes: Texture, vitamin C, reducing sugars, and starch*, "Journal of Food Science" 2003, vol. 68, No 7, s. 2232-2237.

Mazur L., Gubsky S., Dorohovych A., Labazov M., *Antioxidant properties of candy caramel with plant extracts*, „Ukrainian Food Journal: 2018, vol. 7, No 1, s. 7-21.

McFeeters R.F., *A manual method for reducing sugar determinations with 2, 2'-bicinchoninate reagent*, “Analytical Biochemistry” 1980, vol. 103, No 2, s. 302-306.

Melander C., Andersson E., Axelsson S., Gorton L., *Determination of reducing ends with flow injection analysis with amperometric detection: application to enzyme-hydrolysed methyl cellulose*, “Analytical And Bioanalytical Chemistry” 2007, vol. 387, No 7, s. 2585-2593.

Menon L., Majumdar S.D. Ravi U., *Development and analysis of composite flour bread*, “Journal of Food Science and Technology” 2015, No 52, s. 4156-4165.

Methods in enzymology. Plant cell membranes, red. R., Douce, L. Packer, Academic Press, New York 1987.

Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T. C., *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer*, “Pharmacological reviews” 2000, vol. 52, No 4, s. 673-751.

Mihayo I.Z., Mkoma S.L., *Chemical water quality of bottled drinking water brands marketed in Mwanza city*, “Tanzania. Research Journal of Chemical Sciences” 2012, vol. 2, No 7, s. 21-26.

Miller K.A. Hosoney R.C., *Dynamic Rheological Properties of Wheat Starch-Gluten Doughs*, “Cereal Chemistry” 1999, No 76, s. 105-109.

Min D.B., Jeffrey M.B., *Lipid oxidation of edible oil*, “Food Science and Technology” 2002, 335–364.

Moore Jr P.A., Daniel T.C., Gilmour J.T., Shreve B.R., Edwards D.R., Wood B.H., *Decreasing metal runoff from poultry litter with aluminum sulfate*, “American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America” 1998, vol 27, No 1, s. 92-99.

Mueller B.A., Newton K., Holly E.A., Preston-Martin S., *Residential water source and the risk of childhood brain tumors*, “Environmental Health Perspectives” 2001, vol. 109, No 6, s. 551-556.

Muhammad D.R.A., Tuenter E., Patria G.D., Foubert K., Pieters L., Dewettinck, K., *Phytochemical composition and antioxidant activity of Cinnamomum burmannii Blume extracts and their potential application in white chocolate*, “Food Chemistry” 2021, vol. 340, No 127983.

Nadarajah D., Han J.H., Holley R.A., *Use of mustard flour to inactivate Escherichia coli O157:H7 in ground beef under nitrogen flushed packaging*, "International Journal of Food Microbiology" 2005, No 99, s. 257–267.

Nahhar A., Siong K.K., *Study on natural rubber absorption of selected actinides*. "Materials Science and Engineering" 2019, vol. 555, No 1, s. 012015.

Nardini M., *Phenolic compounds in food: Characterization and health benefits*, "Molecules" 2022, vol. 27, No 3, s. 783.

Nawirska-Olszanska A., Kucharska A., Sokol-Letowska A., *Dietary fibre fractions in cornelian cherry fruit (Cornus mas L.)*, "Zywnosc Nauka Technologia Jakosc" 2010, vol. 17, No 2, s. 95-103.

Negrulescu A., Patrulea V., Mincea M.M., Ionascu C., Vlad-Oros B.A., Ostafe V., *Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating*, "Journal of the Brazilian Chemical Society" 2012, No 23, s. 2176-2182.

Nelson N., *A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose*, "Journal of Biological Chemistry" 1944, vol. 153, No 2, s. 375-380.

Newman R.M., Hanscom Z., Kerfoot W.C., *The watercress glucosinolate-myrosinase system: A feeding deterrent to caddisflies, snails and amphipods*, "Oecologia" 1992, No 92, s. 1–7.

Niizu P.Y., Rodriguez-Amaya D.B., *New data on the carotenoid composition of raw salad vegetables*, "Journal of Food Composition and Analysis" 2005, No 18, s. 739–749.

Nijveldt R.J., van Nood E., van Hoorn D.E.C., Boelens P.G., van Norren K., van Leeuwen P.A.M., *Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications*, "The American Journal of Clinical Nutrition" 2001, vol 74, No 4, s. 418–425.

Nishikimi M., Fukuyama R., Minoshima S., Shimizu N., Yagi, K., *Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonolactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man*, "Journal of Biological Chemistry" 1994, No 269, s. 13685–13688.

Nonomura Y., Igarashi S., Yoshioka N., Inoue H., *Spectroscopic properties of chlorophylls and their derivatives. Influence of molecular structure on the electronic state*, "Chemical Physics" 1997, vol. 220, No 1-2, s. 155-166.

Okoronkwo Nnenna I., Kalu Mba C., Nnorom I.C., *Estimation of Protein Content and Amino Acid Compositions in Selected Plant Samples Using UV-Vis*

Spectrophotometric Method, “American Journal of Food Science and Health” 2017, vol. 3, No 3, s. 41–46.

Omaye S.T., Schaus E.E., Kutnink M.A., Hawkes W.C., *Measurement of vitamin C in blood components by high-performance liquid chromatography. Implication in assessing vitamin C status*, “Annals of the New York Academy of Sciences” 1987, No 498, s. 389–401.

Park J.T., Johnson M.J. (1949). *A submicrodetermination of glucose*, “Journal of Biological Chemistry” 1949, No 181, s. 149-151.

Pedro A.M., Ferreira, M.M., *Nondestructive determination of solids and carotenoids in tomato products by near-infrared spectroscopy and multivariate calibration*, “Analytical Chemistry” 2005, No 77, s. 2505– 2511.

Pereira G.A., Arruda H.S., Pastore G.M., *Modification and validation of Folin-Ciocalteu assay for faster and safer analysis of total phenolic content in food Samales*, “REBRAPA-Brazilian Journal of Food Research” 2018, vol. 9, No 1, s. 125-140.

Pérez S., Bertoft E., *The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: A comprehensive review*, “Starch” 2010, vol. 62, No 8, s. 389-420.

Petersen A., Wang C., Crocoll C., Halkier B.A., *Biotechnological approaches in glucosinolate production*, “Journal of Integrative Plant Biology” 2018, vol. 60, No 12, s. 1231-1248.

Petrofsky K.E., Hoseney R.C., *Rheological properties of dough made with starch and gluten from several sources*, “Cereal Chemistry” 1995, No 72, s. 53-58.

Petry R.D., Ortega G.G., Silva W.B., *Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behavior of the aluminium chloride--flavonoid complex*, “Pharmazie” 2001, vol 56, No 6, s. 465-70.

Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods, red. R.F.C. Mantoura, S.W. Jeffrey S.W., S.W Wright, UNESCO Publishing, Paris 1997.

Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet, red. A. Crozier, M.N. Clifford, H. Ashihara, Blackwell Publishing, Oxford 2006

Popescu M., Iancu P., Pleșu V., Bîldea C.S., Todasca C.M., *Different spectrophotometric methods for simultaneous quantification of lycopene and β -carotene from a binary mixture*, "LWT" 2022, No 160.

Prajapati R., Chandra S., Samsher N.C., Singh G.R. Kumar S., *Effect of incorporation of flours on the functional properties of composite flours*, "South Asian Journal of Food Technology and Environment" 2015, No 1, s. 233-241.

Prodanov M.P., Domínguez J.A., Blázquez I., Salinas M.R., Alonso G.L., *Some aspects of the quantitative/qualitative assessment of commercial anthocyanin-rich extracts*, "Food Chemistry" 2005, vol. 90, No 4, s. 585-596.

Prosky L., Asp N.G., Furda I., Devries J.W., Schweizer T.F., Harland B.F., *Determination of total dietary fiber in foods, food products, and total diets: interlaboratory study*, "Journal of the Association of Official Analytical Chemists" 1984, vol. 67, No 6, s. 1044-1052.

Przewodnik do ćwiczeń z chemii żywności, red. B. Baraniak, Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Lublinie, Lublin 2006

Pulido R., Hernandez-Garcia M., Saura-Calixto F., *Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet*, "European Journal of Clinical Nutrition – Nature" 2003, No 57, s. 1275–1282.

Quattrini S., Pampaloni B., Brandi M.L., *Natural mineral waters: chemical characteristics and health effects*, "Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism" 2016, vol. 13, No 3, s. 173.

Rajput R.D., Patil R.P., *The Comparative Study on Spectrophotometric Analysis of Chlorophyll and Carotenoids Pigments from Non Leguminous Fodder Crops*, "International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology" 2017, vol. 4, No 7.

Ramos R.T.M., Bezerra I.C.F., Ferreira M.R.A., Soares L.A.L., *Spectrophotometric Quantification of Flavonoids in Herbal Material, Crude Extract, and Fractions from Leaves of Eugenia uniflora Linn.*, "Pharmacognosy Research" 2017, vol. 9, No 3, s. 253-260.

Reza R., Singh, G., *Physico-chemical analysis of ground water in Angul-talcher region of Orissa, India*, "Journal of American Science" 2009, vol. 5, No 5, s. 53-58.

Rezaharsamto B., Subroto E., *A review on bioactive peptides derived from various sources of meat and meat by-products*, "International Journal of Scientific & Technology Research" 2019, vol. 8, No 12, s. 3151-3156.

Rice-Evans C., Miller N.J., Paganga G., *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*, "Free Radical Biology and Medicine" 1996, vol. 20, No 7, s. 933-956.

Rienks J., Barbaresco J., Nothlings U., *Association of polyphenol biomarkers with cardiovascular disease and mortality risk: A systematic review and meta-analysis of observational studiem*, "Nutrients" 2017, No9, s. e415.

Rissanen T., Voutilainen S., Nyyssonen K., Salonen J., *Lycopene, atherosclerosis, and coronary heart disease*, "Experimental Biology and Medicine" 2002, No 227, s. 900–907.

Rumsey S.C., Welch R.W., Garraffo H.M., Ge P., Lu S.F., Crossman A.T., Kirk K.L., Levine M., *Specificity of ascorbate analogs for ascorbate transport. Synthesis and detection of [(125)I]6-deoxy-6-iodo-l-ascorbic acid and characterization of its ascorbate-specific transport properties*, "Journal of Biological Chemistry" 1999, No 274, s. 23215–23222.

Sadler G., Davis J., Dezman D., *Rapid extraction of lycopene and β -carotene from reconstituted tomato paste and pink grapefruit homogenates*, "Journal of Food Science" 1990, vol. 55, No 5, s. 1460-1461.

Sánchez-Moreno C., *Compuestos polifenólicos: estructura y clasificación: presencia en alimentos y consumo: biodisponibilidad y metabolism*, "Alimentaria" 2002, No 329. s. 19-28.

Sánchez-Rangel J.C., Benavides J., Heredia J.B., Cisneros-Zevallos L., Jacobo-Velázquez D.A., *The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination*, "Analytical Methods" 2013, vol. 5, No 21, s. 5990-5999.

Sandmann G., *Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants*, "European Journal of Biochemistry" 1994, No 223, s. 7-24.

Sangeetha R.K., Baskaran V., *Carotenoid composition and re tinol equivalent in plants of nutritional and medicinal importance. Efficacy of bcarotene from *Chenopodium album* in retinol-deficient rats*, "Food Chemistry" 2010, No 119, s. 1584–1590.

Sarino A., Perez-Juan P.M., Vicario A., Gonzales J.M., Perez- Coello M.S., *Determination of anthocyanins in red wine using a newly developed method based on Fourier transform infrared spectroscopy* "Food Chemistry" 2007, vol. 104, No. 3, s. 1295–1303.

Sathianathan R.V., Kannapiran A., Govindan J., Periasamy N., *Profiling of fatty acid compositional alterations in edible oils upon heating using gas chromatography*, "Journal of Physical Science" 2014, vol. 25, No 2.

Satterfield M., Brodbelt J.S., *Enhanced Detection of Flavonoids by Metal Complexation and Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, "Analytical Chemistry" 2000, No 72, s. 5898–5906.

Savini I., Rossi A., Pierro C., Avigliano L., Catani M.V., *SVCT1 and SVCT2: Key proteins for vitamin C uptake*, "Amino Acids" 2008, No 34, s. 347–355.

Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C., Jiménez L., *Dietary polyphenols and the prevention of diseases*, "Critical reviews in food science and nutrition" 2005, vol. 45, No 4, s. 287-306.

Scalbert A., Williamson G., *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*, "The Journal of Nutrition" 2000, No 130, s. 2073–2085.

Scalbert A., Williamson G., *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*, "The Journal of Nutrition" 2000, No 130. s. 207-285.

Schmidt K.A., Karen A., Stupar J., Shirley J.E., Adapa S., *Factors affecting titratable acidity in raw milk*, "Dairy Day" 1996, No 2, s. 60-62.

Segura-Campos M., Barbosa-Martín E., Matus-Basto Á., Cabrera-Amaro D., Murguía-Olmedo M., Moguel-Ordo Y., Betancur-Ancona D., *Comparison of chemical and functional properties of Stevia rebaudiana (Bertoni) varieties cultivated in Mexican Southeast*, "American Journal of Plant Sciences" 2014, vol. 5, No 14, 286-293.

Sesso H.D., Liu S., Gaziano J.M., Buring J.E., *Dietary lycopene, tomato-based food products and cardiovascular disease in women*, "The Journal of Nutrition" 2003, No 133, s. 2336–2341.

Shafie B., Cheng S.C., Lee H.H. Yiu P.H., *Characterization and classification of whole-grain rice based on rapid visco analyzer (RVA) pasting profile*, "International Food Research Journal" 2016, vol. 23, No 5, s. 2138–2143.

Shahidi F., Zhong Y., *Lipid oxidation and improving the oxidative stability*, "Chemical Society Reviews" 2010, No 39, s. 4067–4079 .

Shao Y., Lin A.H.M., *Improvement in the quantification of reducing sugars by miniaturizing the Somogyi-Nelson assay using a microtiter plate*, "Food chemistry" 2018, No 240, s. 898-903.

Sharma S.K., Le Maguer M., *Lycopene in tomatoes and tomato pulp fractions*, "Italian Journal of Food Science" 1996, vol. 8, No 2, s. 107-113.

Shehaj A., Marku K., Morina A., Rama A., *Evaluation of quality parameters in some types of wheat flour used for different purposes*, "Journal of Biological Studies" 2022, vol 5, No 1, s. 229-236.

Shevkani K., Singh N., Bajaj R., Kaur A., *Wheat starch production, structure, functionality and applications—a review*, "International Journal of Food Science & Technology" 2017, vol. 52, No 1, s. 38-58.

Shi J., Maguer M.L., *Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing*, "Critical Reviews in Food Science and Nutrition" 2000, vol. 40, No 1, s. 1-42.

Shrestha K., De Meulenaer B., *Effect of seed roasting on canolol, tocopherol, and phospholipid contents, Maillard type reactions, and oxidative stability of mustard and rapeseed oils*, "Journal of Agricultural and Food Chemistry" 2014, vol. 62, No 24, s. 5412-5419.

Sik B., Székelyhidi R., Lakatos E., Kapcsándi V., Ajtony Z., *Analytical procedures for determination of phenolics active herbal ingredients in fortified functional foods: an overview*, "European Food Research and Technology" 2021, s. 1-16.

Singh S.V., Singh K., *Cancer chemoprevention with dietary isothiocyanates mature for clinical translational research*, "Carcinogenesis" 2012, No 33, s. 1833–1842.

Slavin J., *Impact of the proposed definition of dietary fiber on nutrient databases*, "Journal of Food Composition and Analysis" 2003, vol. 16, No 3, s. 287-291.

Soares L.A., Bassani V.L., Ortega G.G., Petrovick P.R., *Total Flavonoid Determination for the Quality Control of Aqueous Extractives from Phyllanthus niruri L.*, "Acta Farmaceutica Bonaerense" 2003, vol. 22, No 3, s. 203-207.

Soest P.V., Wine R.H., *Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents*, "Journal of the Association of Official Analytical Chemists" 1967, vol. 50, No 1, s. 50-55.

Somogyi M., *Detection and quantitative determination of small amounts of glucose in mixtures containing maltose*, "Journal of Biological Chemistry" 1937, vol. 119, No 2, s. 741-747.

Song B., Liu K., Gao Y., Zhao L., Fang H., Li Y., Xu, Y., *Lycopene and risk of cardiovascular diseases: A meta-analysis of observational studies*, "Molecular Nutrition & Food Research" 2017, vol. 61, No 9, s. 160-169.

Sosulski F., Krygier K., Hogge L., *Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours*, "Journal of Agricultural and Food Chemistry" 1982, vol. 30, No 2, s. 337-340.

Sporn M.B., Suh N., *Chemoprevention: An essential approach to controlling cancer*, "Nature Reviews Cancer" 2002, vol. 2, No 7, s. 537-543.

Sramkova Z., Gregova E., Sturdik E., *Chemical composition and nutritional quality of wheat grain*, "Acta Chimica Slovenica" 2009, vol. 2, No 1, s. 115-138.

Steffe J.F., *Rheological methods in food process engineering*, Freeman Press, East Lansing 1996.

Su Q., Rowley K.G., Itsiopoulos C., O'Dea K., *Identification and quantitation of major carotenoids in select components of the Mediterranean diet: Green leafy vegetables, figs and olive oil*, "European Journal of Clinical Nutrition" 2002, No 56, s. 1149-1154.

Subroto E., Qonit M.A.H., *Modification of soy protein for the production of bioactive peptides and their utilization*, "International Journal of Scientific & Technology Research" 2020, vol. 9, No 2, s. 3121-3127.

Subroto, E., Lembong, E., Filianty, F., Indiarso, R., Primalia, G., Kirana Zaenal Putri M.S., Theodora H.C., Junar S. *The Analysis Techniques Of Amino Acid And Protein In Food And Agricultural Products*, "International Journal Of Scientific & Technology Research" 2020, vol. 9, No 10, s. 29-36.

Sumanta N., Haque C.I., Nishika J., Suprakash R., *Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents*, "Research Journal of Chemical Sciences" 2014, vol. 4, No 9, s. 63-69.

Svihus B., Edvardsen D.H., Bedford M.R., Gullord M., *Effect of methods of analysis and heat treatment on viscosity of wheat, barley and Atos*, "Animal Feed Science and Technology" 2000, No 88, s. 1-12.

Szczepaniak W., *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, Warszawa 2002.

Szuvandzsiev P., Helyes L., Lugasi A., Szántó C., Baranowski P., Pék Z., *Estimation of antioxidant components of tomato using VIS-NIR reflectance data by handheld portable spectrometer*, "International Agrophys" 2014, No 28, s. 521-527

Tanaka T., Shnimizu M., Moriwaki H., *Cancer Chemoprevention by Carotenoids*, "Molecules" 2012, vol. 17, No 3, s. 3202-3242.

Thakkar S.V., Allegre K.M., Joshi S.B., Volkin D.B., Middaugh C.R., *An Application of Ultraviolet Spectroscopy to Study Interactions in Proteins Solutions at High Concentrations*, "Journal of Pharmaceutical Sciences" 2012, vol. 101, No 9, s. 3051–3061.

The complex world of polysaccharides, red. D.N. Karunaratne, IntechOpen, Rijeka 2012.

Thebaudin J.Y., Lefebvre A.C., Harrington M., Bourgeois C.M., *Dietary fibres: nutritional and technological interest*, "Trends in Food Science & Technology" 1997, vol. 8, No 2, s. 41–48.

Thomas V.M., Katz R.J., Auld D.A., Petersen C.F., Sauter E.A., Steel E.E., *Nutritional value of expeller rape and safflower oil seeds meals for poultry*, "Poultry Science" 1983, No 62, s. 882–886.

Thrane J.E., Kyle M., Striebel M., Haande S., Grung M., *Spectrophotometric Analysis of Pigments: A Critical Assessment of a High-Throughput Method for Analysis of Algal Pigment Mixtures by Spectral Deconvolution*, "Plos One" 2015, vol. 10, No 9.

Toksykologia żywności. Przewodnik do ćwiczeń, red. A. Brzozowska, Wyd. SGGW, Warszawa 2010.

Tomas-Barberan F.A., Clifford M.N., *Dietary hydroxybenzoic acid derivatives and their possible role in health protection*, "Journal of the Science of Food and Agriculture" 2000, vol. 80, s. 1024–32.

Tor-Agbidye J., Palmer V.S., Sabri M.I., Craig, A.M., Blythe L.L., Spencer P., S., *Dietary deficiency of cystine and methionine in rats alters thiol homeostasis required for cyanide detoxification*, "Journal of Toxicology and Environmental Health A" 1998, No 55, s. 583–595.

Toscano G., Maldini E., *Analysis of the physical and chemical characteristics of vegetable oils as fuel*, "Journal of Agricultural Engineering" 2007, vol. 38, No 3, s. 39–47.

Tripathi M.K., Mishra A.S., *Glucosinolates in animal nutrition: A review*, "Animal Feed Science and Technology" 2007, No 132, s. 1–27.

Tsukaguchi H., Tokui T., Mackenzie B., Berger U.V., Chen X.Z., Wang Y., Brubaker R.F., Hediger M.A., *A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters*, "Nature" 1999, No 399, s. 70–75.

Tungland B.C., Meyer D., *Nondigestible oligo and polysaccharides (dietary fibre): their physiology and role in human health and food*, "Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety" 2002, No 1, s. 73–92.

Uda Y., Kurata T., Arakawa N., *Effects of pH and ferrous ion on the degradation of glucosinolates by myrosinase*, "Agricultural and Biological Chemistry" 1986, No 50, s. 2735–2740.

Udofia P.G., Udouo P.J. Eyen N.O., *Sensory evaluation of wheat-cassava-soybean composite flour (WCS) bread by the mixture experiment design*, "African Journal of Food Science" 2013, vol. 7, No 10, s. 368-374.

Uthayakumaran S., Newberry M., Phan-Thien N., *Small and large strain rheology of wheat gluten*, "Rheologica Acta" 2002, No 41, s. 162–172.

Valorization of food processing by-products, red. M. Chandrasekaran, CRC Press, New York 2012.

Vanderpas J., *Nutritional epidemiology and thyroid hormonemetabolism*, "Annual Review of Nutrition" 2006, No 26, s. 293–322.

Varvara M., Bozzo G., Celano G., Disanto C., Pagliarone C.N., Celano G.V., *The use of ascorbic acid as a food additive: technical-legal issues*, "Italian Journal Of Food Safety" 2016, vol. 5, No 1, s. 4313.

Vaskova H., Buckova M., *Thermal degradation of vegetable oils: spectroscopic measurement and analysis*, "Procedia Engineering" 2015, No 100, s. 630–635.

Vieira S.A., Zhang G., Decker E.A., *Biological implications of lipid oxidation products*, "Journal of the American Oil Chemists' Society" 2017, vol. 94, No 3, s. 339-351.

Vis R.B., Lorenz K., *β -Glucans: Importance in brewing and methods of analysis*, "Lebensm. Wiss. U-Technol" 1997, No 30, s. 331-336.

Vitamin C in Health and Disease, red. L. Packer, J. Fuchs, Marcel Dekker, New York 1997.

Wagner A.E., Terschluesen A.M., Rimbach G., *Health promoting effects of brassica-derived phytochemicals: from chemopreventive and anti-inflammatory activities to epigenetic regulation*, "Oxidative Medicine and Cellular Longevity" 2013, No 2013, s. 1-13.

Wang S., Li C., Copeland L., Niu Q., Wang S., *Starch retrogradation: a comprehensive review*, "Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety" 2015, No 14, s. 568–585.

Watanabe A., Larsson, H., Eliasson A.C., *Effect of physical state of nonpolar lipids on rheology and microstructure of gluten-starch and wheat flour doughs*, "Cereal Chemistry" 2002, No 79, s. 203–209.

Weipert D., *The Benefits of Basic Rheometry in Studying Dough Rheology*, "Cereal Chemistry" 1990, vol. 67, No 4, s. 311-317.

Wide Spectra of Quality Control, red. I. Akyar, IntechOpen, Rijeka 2011.

Winiarska-Mieczan A., Siłtys R., *Evaluation of the content of crude fibre and its fractions in cereal products*, "Bromatologia i Chemia Toksykologiczna" 2009, No 4, s. 1083-1088.

Wolfschoon A.F., Vargas O.L., *Formol titration for the determination of protein in raw and pasteurized milk*, "Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes" 1977, vol. 32, No 192, s. 3-13.

Woolnough J.W., Monro J.A., Brennan C.S. Bird A.R., *Simulating human carbohydrate digestion in vitro: a review of methods and the need for standardisation*, "International Journal of Food Science and Technology" 2008, No 43, s. 2245-2256.

World Health Organization WHO, *Guidelines for drinking-water quality*, World Health Organization, Geneva 2004.

Wu G.Y., Bazer F.W. Dai Z.L., Li D.F., Wang J.J., Wu Z.L., *Amino acid nutrition in animals: Protein synthesis and Beyond*, "Annual Review of Animal Biosciences" 2014, No 2, s. 387-417.

Wybrane zagadnienia z analizy żywności, red. M. Obiedziński, SGGW, Warszawa, 2009.

Xhabiri G.Q., Durmishi N., Idrizi X., *Rheological qualities of dough from mixture of flour and wheat bran and possible correlation between bra bender and mixolab Chopin equipments*, "MOJ Food Processing & Technology" 2016, vol. 2, No 4, s. 121-128.

Xu X., Jin Z., Wang H., Chen X., Wang C., Yu S., *Effect of astaxanthin from Xanthophyllomyces dendrorhous on pigmentation of goldfish, Carassius auratus*, "Journal of the World Aquaculture Society" 2006, No 37, s. 282-288.

Xue L., Yang L., *Deriving leaf chlorophyll content of green-leafy vegetables from hyperspectral reflectance*, "Journal of Photogrammetry and Remote Sensing" 2009, No 64, s. 97-106.

Yang C.S., Landau J.M., Huang M.T., Newmark H.L., *Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds*, "Annual Review of Nutrition" 2001, No 21, s. 381-406.

Yang Y., Song Y., Zheng Q., *Rheological behaviors of doughs reconstituted from wheat gluten and starch*, "Journal of Food Science and Technology" 2011, vol. 48, No 4, s. 489-93.

Ye X., Izawa T., Zhang S., *Rapid determination of lycopene content and fruit grading in tomatoes using a smart device camera*, "Cogent Engineering" 2018, vol. 5, No 1.

Yilmaz Y., *Novel uses of catechins in foods*, "Trends in Food Science & Technology" 2006, vol. 17, No 2, s. 64-71.

Zarzycki P., Sykut-Domanska E., Wilkowicz I., *Ocena lepkości pozornej wodnych zawiesin całoziarnowej mąki owsianej o zróżnicowanej zawartości błonnika pokarmowego*, "Żywność. Nauka. Technologia. Jakość" 2011, vol. 2, No 75, s. 38 – 52.

Zeb A., Ullah F., *Reversed Phase HPLC-DAD Profiling of Carotenoids, Chlorophylls and Phenolic Compounds in Adiantum capillus-veneris Leaves*, "Frontiers in Chemistry" 2017, vol. 5, No 29.

Zhang M., Sun J., Chen P., *Development of a Comprehensive Flavonoid Analysis Computational Tool for Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection-High-Resolution Accurate Mass-Mass Spectrometry Data*, "Analytical Chemistry" 2017, vol. 89(14), s. 7388-7397.

Zhang Y., 2012; *The molecular basis that unifies the metabolism, cellular uptake and chemopreventive activities of dietary isothiocyanates*, "Carcinogenesis" 2012, No 33, s. 2–9.

Zhang Y., Talalay P., Cho C.G., Posner G.H., *A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure*, "Proceedings of the National Academy of Sciences" 1992, vol. 89, No 6, s. 2399-2403.

Žnidarčič D., Ban D., Šircelj H., *Carotenoid and chlorophyll composition of commonly consumed leafy vegetables in Mediterranean countries*, "Food Chemistry" 2011, vol. 129, No 3, s. 1164-1168.

BN-91/8052-01 Oliwy z oliwek.

PN-A-86232:1973 Mleko i przetwory mleczarskie - Sery - Metody badań

PN-A-86906/A1:1995 Surowe oleje roślinne.

PN-A-86908:1986 Tłuszcze roślinne jadalne - Rafinowane oleje roślinne.

PN-A-86934:1995 Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce -
Spektrofotometryczne oznaczanie barwy ogólnej

Dyrektywa 1999/79/WE zmieniająca trzecią dyrektywę Komisji 72/199/EWG z dnia 27 kwietnia 1972 r. ustalającą wspólnotowe metody analiz do celów urzędowej kontroli pasz.

Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2009/54/WE z dnia 18 czerwca 2009 r. w sprawie wydobywania i wprowadzania do obrotu naturalnych wód mineralnych.

Rozporządzenie Komisji (WE) nr 152/2009 z dnia 27 stycznia 2009 r. ustanawiające metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz.

Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 31 marca 2011 r. w sprawie naturalnych wód mineralnych, wód źródlanych i wód stołowych, Dz.U. 2011 nr 85 poz. 466

<http://ecoursesonline.iasri.res.in/mod/page/view.php?id=392>

<http://ecoursesonline.iasri.res.in/mod/page/view.php?id=3925>

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1990:272:0001:0192:EN:PDF>

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:010:0047:0052:EN:PDF>;

<http://opus.uleth.ca/handle/10133/3303>

<http://repository.sustech.edu/handle/123456789/22634>

http://stevegallik.org/pdf/CellBiologyOLM_Exercise01_2012.pdf

http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=1134&typ=html

<http://www.medicinacomplementar.com.br/biblioteca/pdfs/Cancer/ca-4654.pdf>

<http://www.chemia.uni.lodz.pl/kchogin/dydaktyka/toksykologia/PDF/T3.pdf>

https://chemia.ug.edu.pl/sites/default/files/_nodes/strona-chemia/59470/files/chemia_srodowiska_cw_6.pdf

https://chemia.ug.edu.pl/sites/default/files/_nodes/strona-chemia/53088/files/chemia_zywnosci_cwiczenie_9.pdf

<https://ecolebooks.com/v2/unit-5-determination-of-hardness-of-water-using-complexometric-titration-inorganic-chemistry-practicals/>

https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-3-319-45776-5_36.pdf

<https://nap.nationalacademies.org/catalog/1780/drinking-water-and-health-volume-1>

<https://people.umass.edu/~mcclemen/581Carbohydrates.html>

<https://people.umass.edu/~mcclemen/581Carbohydrates.html>

<https://people.umass.edu/~mcclemen/581Lipids.html>

https://www.canterbury.ac.nz/media/documents/science-outreach/magnesium_calcium.pdf

https://www.gammadot.com/index.htm?Theory/What_is_a_Rheometer.htm~mainFrame

<https://www.intechopen.com/chapters/38573>

<https://www.intechopen.com/chapters/38573>

<https://www.mt.com/de/en/home/library/guides/laboratory-division/food-quality-control/acidity-and-acid-content-determination-guide.html>



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Projekt „Dostępna uczelnia - Politechnika Koszalińska”

Numer projektu POWR.03.05.00-00-A018/20

Projekt współfinansowany przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020