



Chemia żywności  
**Katedra Analizy Środowiska**

# Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

## Ćwiczenie nr 1

### Wykrywanie białek i cukrów w produktach spożywczych

Chemia żywności

Gdańsk, 2016

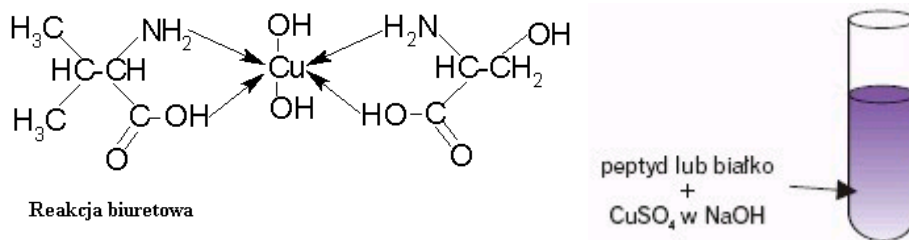
## 1. Wykrywanie białek i cukrów w produktach spożywczych

### 1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Białka i cukry są głównymi składnikami żywności oraz niezbędnymi składnikami pokarmowymi. Zawartość białka i cukrów w produktach spożywczych jest jednym z czynników określających ich wartość odżywczą.

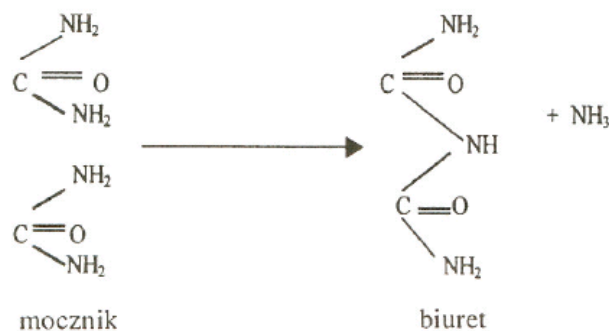
#### 1.1. Metody wykrywania białek

*Metoda biuretowa – wykrywanie wiązania peptydowego*



Wiązania peptydowe obecne w białkach reagują z jonami  $\text{Cu}^{+2}$  w roztworze alkalicznym tworząc barwny produkt, którego absorbancję mierzy się spektrofotometrycznie przy długości fali 546 nm. Winian sodowo-potasowy obecny w odczynniku biuretowym, jest czynnikiem kompleksującym, utrzymującym miedź w roztworze, która w środowisku zasadowym mogłaby się wytrącać w postaci wodorotlenku miedziowego. Intensywność powstałego zabarwienia jest wprost proporcjonalna do ilości wiązań peptydowych i w związku z tym do stężenia oznaczanego białka.

Nazwa reakcji pochodzi od biuretu, związku powstającego w wyniku kondensacji dwóch cząsteczek mocznika, zawierającego w swej cząsteczce wiązania amidowe:

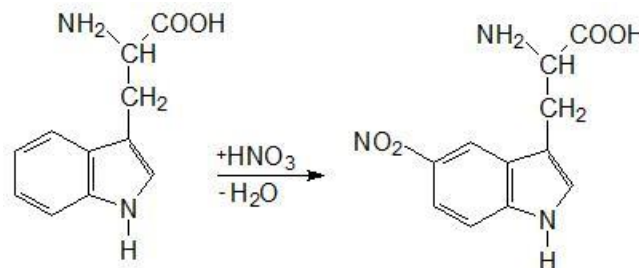


Aminokwasy i dipeptydy nie reagują z odczynnikiem biuretowym, natomiast tripeptydy, oligopeptydy i polipeptydy reagują dając zabarwienie od różowego do czerwono-fioletowego. Metoda biuretowa nie nadaje się do oznaczania białek w obecności soli amonowych, gdyż jon amonu daje również barwne kompleksy z jonami miedzi (II). W reakcji przeszkadza także siarczan (VI) magnezu, ponieważ wytracający się w środowisku nierozpuszczalny wodorotlenek magnezu

## 1. Wykrywanie białek i cukrów w produktach spożywczych

maskuje właściwy odczyn.

**Próba ksantoproteinowa - wykrywanie ugrupowania aromatycznego w aminokwasach obecnych w białku**



Aminokwasy zawierające pierścień aromatyczny (fenyloalanina, tyrozyna i tryptofan) pod wpływem stęż.  $\text{HNO}_3$  ulegają nitrowaniu, w wyniku czego powstają pochodne nitrowe o barwie żółtej. Po zalkalizowaniu, związki nitrowe słabo dysocjują i barwa roztworu zmienia się na pomarańczową. Próbę tę dają również inne związki aromatyczne, jak fenol, benzen itp.

## **Reakcje wykorzystywane do wykrywania wybranych aminokwasów i białek**

### **Reakcja Libermanna**

Reakcją charakterystyczną (służącą do identyfikacji) glikoprotein jest tzw. reakcja Libermanna. W trakcie jej przebiegu, podczas ogrzewania ze stężonym roztworem  $\text{HCl}$  dochodzi do hydrolizy białka, zaś z cukrów (jednocześnie) powstają pochodne furfuralowe. Te z kolei, z uwolnionymi w czasie hydrolizy fenolami, dają fioletowo zabarwione połączenia.

### **Wykrywanie siarki cystyny i cysteiny w aminokwasach**



Aminokwasy, które w swojej budowie zawierają grupy siarkowe  $-\text{SH}$  lub  $-\text{S-S-}$  występujące w stanie wolnym lub związanym w białkach (tzw. aminokwasy siarkowe), podczas ogrzewania w środowisku silnie alkalicznym, ulegają przekształceniu do kwasu pirogronowego. Wtedy też dochodzi do uwolnienia siarki w postaci jonów siarczkowych. Następnie, jony te reagują z jonami ołowiu(II), w wyniku czego powstaje czarny osad ( $\text{PbS}$ ). Dodatkowym produktem powstającym

## 1. Wykrywanie białek i cukrów w produktach spożywczych

w czasie tej reakcji jest amoniak. Należy zaznaczyć, że metionina nie daje dodatniego wyniku tej reakcji.

### **Reakcja cystynowa**

W trakcie ogrzewania białek z ługiem dochodzi do ich hydrolizy, zaś zawarta w cystynie i cysteinie siarka ulega uwolnieniu w postaci jonów siarczkowych, które to z jonami  $Pb^{2+}$  dają czarny osad  $PbS$ . Metionina (inny aminokwas siarkowy) nie daje dodatniego wyniku przedstawionej reakcji.

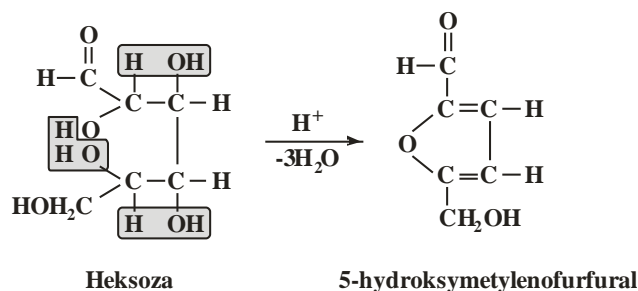
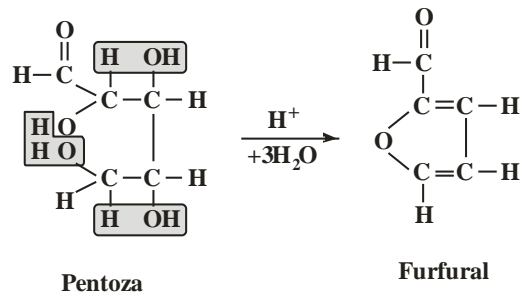
### **Reakcja z nitroprusydkiem sodu- wykrywanie grup tiolowych w cysteinie**

Związki, które zawierają w swej budowie ugrupowania tiolowe, tj. SH, w reakcji z nitroprusydem sodu tworzą kompleksowe połączenia, o czerwono-fioletowym zabarwieniu.

## **1.2. Metody wykrywania sacharydów**

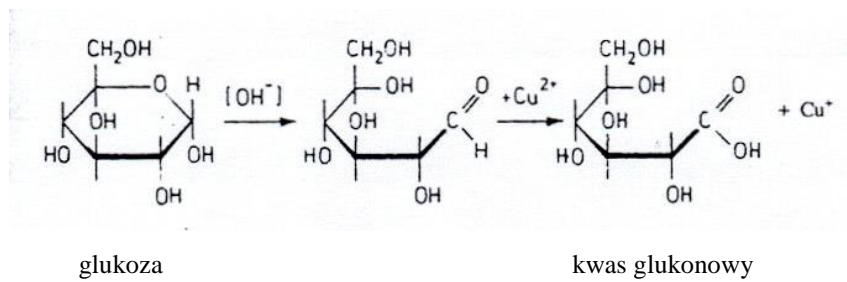
Metody identyfikacji cukrów oparte są na ich właściwościach:

- ✓ Heksozy i pentozy pod wpływem stężonych kwasów **ulegają odwodnieniu** do cyklicznych aldehydów – **hydroksymetylofurfuralu** lub **furfuralu**, które następnie ulegają kondensacji z fenolami lub aminami dając barwne pochodne:

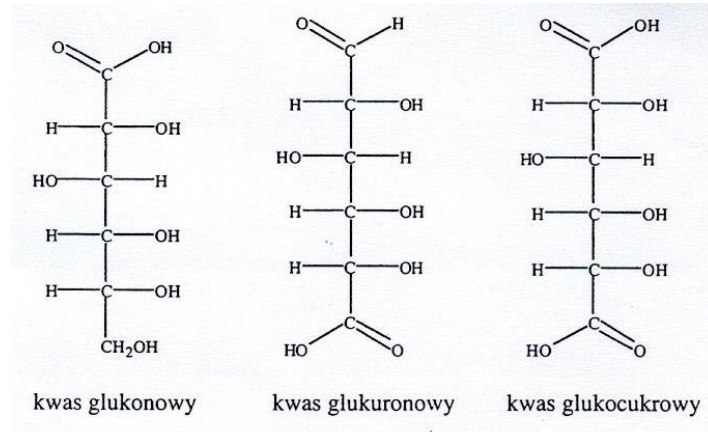


- ✓ W **środowisku zasadowym** łańcuchowe formy cukrów z wolną grupą aldehydową wykazują **właściwości redukcyjne**, przy czym same **utleniają się do kwasów**:

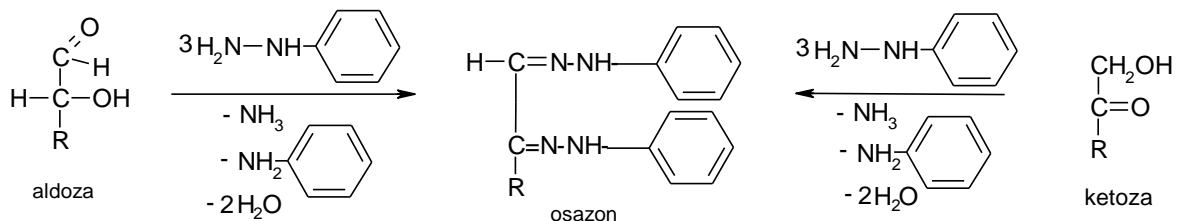
## 1. Wykrywanie białek i cukrów w produktach spożywczych



- ✓ Produktami **utlenienia cukrów** są : kwasy onowe, kwasy uronowe i kwasy cukrowe:



- ✓ Cukry z **wolną grupą karbonylową** reagują również z **fenylohydrazyną** tworząc **osazony** wykazujące charakterystyczną dla danego cukru postać krystaliczną oraz temperaturę topnienia.



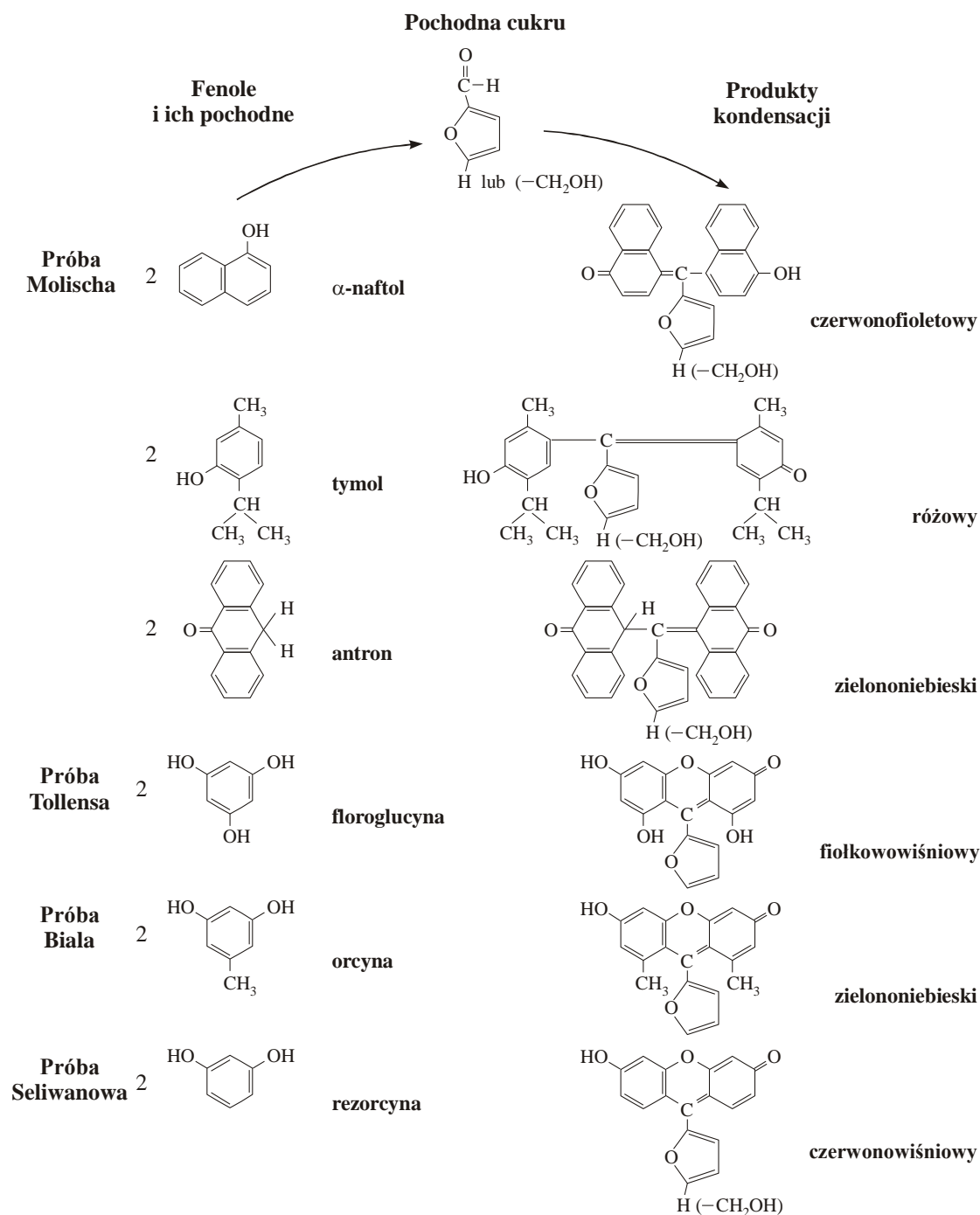
- ✓ Polisacharydy wykazują zdolność **adsorbowania cząsteczek jodu** ( $J_2$ ), w wyniku czego powstają barwne kompleksy o różnym zabarwieniu (granatowe, brunatne, czerwono fioletowe)

### 1.2.1. Reakcje charakterystyczne

Jak wspomniano, ogrzewanie monosacharydów ze stężonymi kwasami (siarkowym, solnym) powoduje ich odwodnienie. Pentozy przekształcają się w furfural, a heksozy w 5-hydroksymetylenofurfural. Najłatwiej odwodnieniu ulegają pentozy, a wśród heksoz - ketozy. Dwucukry reagują wolniej niż monosacharydy, a szybciej niż wielocukry. Powstające heterocykliczne aldehydy reagując z różnymi fenolami (naftolem, tymolem, rezorcyną) tworzą barwne produkty.

# 1. Wykrywanie białek i cukrów w produktach spożywczych

## Przykłady produktów kondensacji fenoli z furfurałem lub 5-hydroksymetylenofurfurałem



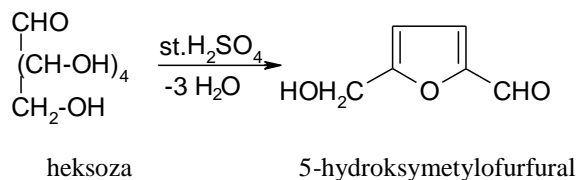
### *Próba Molischa z α-naftolem - - odróżnianie cukrowców od innych związków organicznych*

Jest to najbardziej ogólna reakcja na cukrowce, tak wolne jak i związane. Cukrowce pod wpływem stężonego kwasu siarkowego ulegają odwodnieniu, a produkty odwodnienia (furfural, hydroksymetylofurfural) tworzą z fenolami barwne produkty. **W przypadku kondensacji z α-naftolem jest to produkt o barwie fioletowej.** Ujemny wynik reakcji Molischa wyklucza

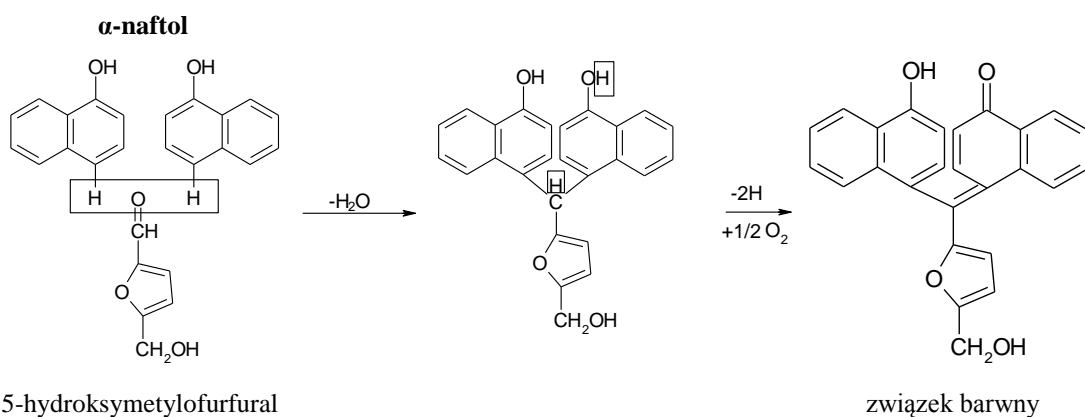
## 1. Wykrywanie białek i cukrów w produktach spożywczych

obecność cukrowca, dodatni zaś nie wystarcza do stwierdzenia jego obecności, gdyż dodatnią reakcję dają także aldehydy, aceton, kwas szczawiowy, cytrynowy.

W reakcji Molischa heksoza przechodzi w pochodną furfuralu – 5-hydroksymetylo-furfural, a następnie w kwas lewulinowy:



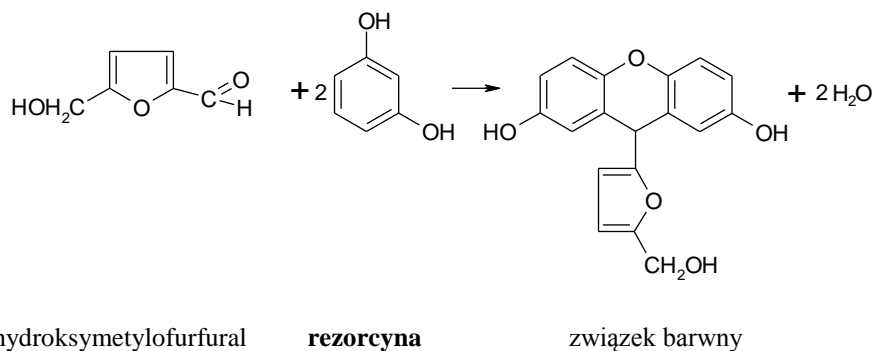
Oba te związki tworzą z  $\alpha$ -naftolem barwne połączenie:



### **Próba Seliwanowa z rezorcyną - odróżnianie ketoz od aldoz**

Pod wpływem kwasu solnego z ketoz i aldoz powstaje hydroksymetylofurfural, który reaguje z rezorcyną, dając barwny związek. Jednakże ketozy znacznie łatwiej ulegają tej reakcji niż aldozy.

**Podczas ogrzewania z rozcieńczonym HCl, w temperaturze 100°C, w ciągu 30 sekund ulegają odwodnieniu wyłącznie ketozy. Powstaje wówczas czerwono-łososiowe zabarwienie.**

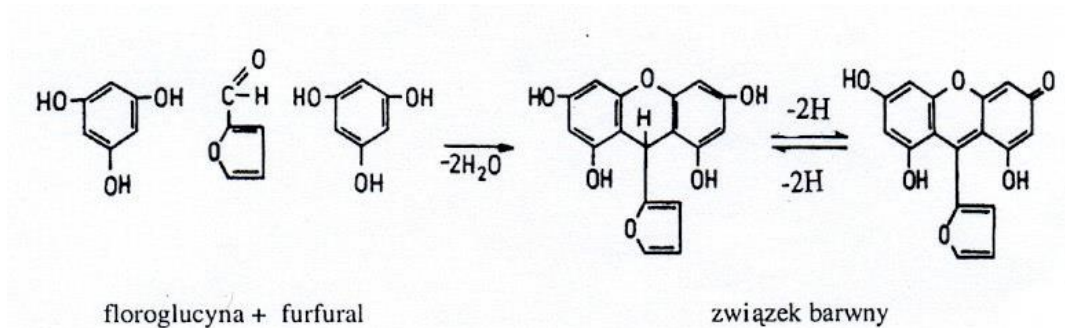


Po dłuższym okresie ogrzewania następuje izomeryzacja aldoz na ketozy i wynik będzie również dodatni.

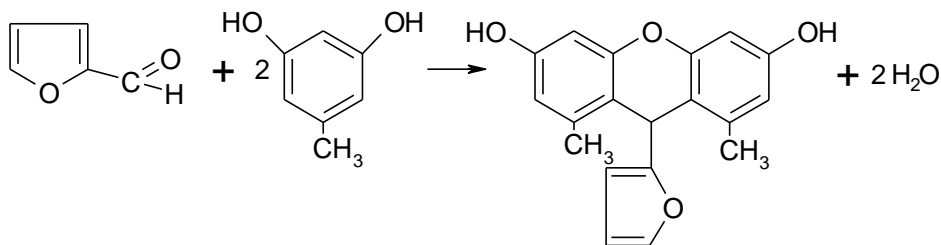
## 1. Wykrywanie białek i cukrów w produktach spożywczych

### **Próba Tollensa z floroglucyną na pentozy**

Wskutek działania kwasu chlorowodorowego na pentozy powstaje furfural, który tworzy z floroglucyną związek o barwie wiśniowej.



### **Próba Biała - odróżnienie pentozy od heksoz**



orcyna

Pod wpływem ogrzewania z kwasem solnym z pentozy powstaje furfural, który reaguje z orcyną tworząc kompleks o **zielonym zabarwieniu**. Natomiast heksozy tworzą z orcyną żółtobrazowy produkt.

### **Próba Lugola - wykrywanie polisacharydów**

Reakcja ta pozwala na odróżnienie polisacharydów od innych cukrowców, ponieważ kompleksy z jodem mogą tworzyć tylko cząsteczki o uporządkowanej strukturze i odpowiednio duże. Adsorpcja ma charakter kanałowy, tzn. cząsteczki jodu wchodzą do kanału utworzonego przez spiralnie skręcone łańcuchy skrobi. Cząsteczki jodu w obrębie spirali skrobi tworzą prosty łańcuch, wzdłuż którego mogą przemieszczać się elektrony, co powoduje pochłanianie światła przez cały kompleks. Efekt barwny jest związany z wielkością cząsteczki – im większa cząsteczka polisacharydu tym więcej cząsteczek jodu jest związanych w kompleksie. Amyloza barwi się intensywnie na kolor ciemnoniebieski. Barwa kompleksów jodu z polisacharydami o krótszych łańcuchach zmienia się na fioletowo-czerwoną (amylopektyna) i czerwoną (dekstryny). Glikogen daje kompleks o barwie czerwonej.



## 1. Wykrywanie białek i cukrów w produktach spożywczych

### 2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

#### 2.1. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z wybranymi, charakterystycznymi reakcjami barwnymi służącymi do wykrywania obecności białek oraz cukrów w produktach spożywczych.

#### 2.2. Wykonanie ćwiczenia [1]

##### 2.2.1. Wykrywanie białek – reakcja biuretowa

###### Analizowane produkty spożywcze:

- Mleko skondensowane
- Mleko sojowe
- Żelatyna
- Białko jaja kurzego

###### Odczynniki:

- Rozcieńczony roztwór wodorotlenku sodu (NaOH)
- 10% wodny roztwór siarczanu miedzi (II) (CuSO<sub>4</sub>)

###### Sprzęt i akcesoria:

- 4 Probówki
- Statyw do probówek
- Pipety 2 ml x 4 szt.
- Waga analityczna
- Łopatka do ważenia
- Zlewka 2 x
- Pisak do szkła lub cenki do naklejania

###### Wykonanie:

- W przygotowanych probówkach umieścić próbki badanej żywności (w przypadku cieczy ok. 2 ml, w przypadku ciał stałych ok. 0,2 g)
- Do każdej probówki dodać po ok. 2 ml rozcieńzonego roztworu NaOH
- Zawartość probówek dokładnie wymieszać
- Do każdej badanej mieszaniny wlać po ściance probówki 10 % wodny roztwór CuSO<sub>4</sub>
- Probówki odstawić do statywu. Obserwować zmiany.

Jeśli próbka zawierała białko to na granicy faz (badana mieszanina – roztwór CuSO<sub>4</sub>) pojawi się fioletowe zabarwienie.

## 1. Wykrywanie białek i cukrów w produktach spożywczych

### 2.2.2. Wykrywanie cukrów – reakcja Molischa

#### **Analizowane produkty spożywcze:**

- Jabłko
- Gruszka
- Miód
- Mandarynka
- Mleko
- Ogórek

#### **Odczynniki:**

- Woda destylowana
- 10% Alkoholowy roztwór 2-naftolu
- Stężony kwas siarkowy (VI)

#### **Sprzęt i akcesoria:**

- 14 Probówek
- Statyw do probówek
- Moździerz
- Pipeta do kwasu 2 ml
- Pipety 1 ml do pobierania produktów żywności
- Pipeta 1 ml do wody
- Okulary ochronne
- Pipety Pasteura

#### **Wykonanie:**

- Produkty stałe (np. jabłko, gruszka) kolejno rozdrobnić w moździerzu, a otrzymaną miazgę zalać wodą destylowaną
- Otrzymane roztwory umieścić w probówkach (po około 1 ml)
- Próbkę miodu umieścić w probówce i rozpuścić w około 1 ml wody
- Z cytrusów wycisnąć sok (ok. 1 ml) bezpośrednio do probówek
- W kolejnych probówkach umieścić próbki ciekłych produktów (np. mleko) po ok. 1 ml
- Do tak przygotowanych roztworów badanych substancji dodać po kilka kropli 10% alkoholowego roztworu 2-naftolu
- Do każdej próbki ostrożnie wlać, po ściance probówki ok. 2 ml stężonego kwasu siarkowego (VI), tak aby ciecz nie zmieszały się ze sobą

### 1. Wykrywanie białek i cukrów w produktach spożywczych

- Obserwować zmiany.

Obecność czerwono-fioletowego lub niebieskiego pierścienia w miejscu zetknięcia się warstw świadczy o obecności cukru w próbce.

#### **2.2.3. Wykrywanie skrobi – reakcja z jodem w jodku potasu (płyn Lugola)**

**Analizowane produkty spożywcze:**

- Ogórek
- Ziemniak
- Cebula
- Płatki owsiane
- Śmietana
- Mąka ziemniaczana

**Odczynniki:**

- Płyn Lugola 1% lub 5%

**Sprzęt i akcesoria**

- Probówki 8 x
- Nóż
- Moździerz

**Wykonanie:**

- Produkty stałe kolejno rozdrobnić w moździerzu i przenieść do osobnych probówek
- Próbkę ciekłą badanych produktów spożywczych umieścić w osobnych probówkach
- Nakropić na każdą badaną próbkę płyn Lugola
- Obserwować zachodzące zmiany.

Pojawienie się granatowego zabarwienia świadczy o obecności skrobi w próbce.

### **3. OPRACOWANIE WYNIKÓW**

1. Na podstawie obserwacji uzupełnić poniższą tabelę:

Produkt spożywczy	Wykrywanie białek - reakcja biuretowa	
Mleko skondensowane		
Mleko sojowe		
Żelatyna		
Białko jaja kurzego		
	Wykrywanie cukrów / polisacharydów	
	Reakcja Molischa (obecność cukrów)	Reakcja z jodem (obecność polisacharydów)

### 1. Wykrywanie białek i cukrów w produktach spożywczych

Jabłko		
Gruszka		
Miód		
Mandarynka		
Mleko		
Ogórek		
Ziemniak		
Cebula		
Płatki owsiane		
Śmietana		
Mąka ziemniaczana		

2. Wyjaśnić różnice w obserwowanych reakcjach dla poszczególnych produktów spożywczych.
3. Przedstawić równania reakcji odpowiadające wynikom pozytywnym.
4. Przedyskutować uzyskane wyniki; określić, które składniki zawierają analizowane produkty spożywcze.

#### ***Sprawozdanie z ćwiczenia powinno zawierać:***

- Stronę tytułową
- Cel i zakres ćwiczenia
- Opis wykonania ćwiczenia (zasada oznaczenia, odczynniki, szkło, sprzęt, materiały, wykonanie ćwiczenia)
- Otrzymane wyniki (tabela)
- Dyskusję i wnioski

## **4. LITERATURA**

1. Górską Agata, Łobacz Marta, Ćwiczenia laboratoryjne z chemii żywności Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 2009.
2. Koperwas Lidia, Reakcje wykorzystywane do wykrywania wybranych aminokwasów i białek. Dostęp on-line: <http://laboratoria.net/arttykul/14248.html> (dostęp 12.01.2016).
3. Sikorski Zdzisław E. Chemia Żywności, Wyd. 6, WNT, Warszawa, 2012
4. Kumirska Jolanta, Gołębiowski Marek, Paszkiewicz Monika, Bychowska Anna, Analiza żywności, skrypt elektroniczny dla studentów Ochrony Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, 2010, ISBN 978-83-7326-711-4, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2010.
5. Rutkowska Jarosława, Przewodnik do ćwiczeń z chemii żywności. Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 2008.
6. Analiza jakościowa cukrów. Dostęp on-line: <http://www.biol.umk.pl/materialy/os3.pdf> (dostęp 12.01.2016).