



Chemia żywności
Katedra Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie nr 2

**Węglowodany w żywności: struktura, właściwości,
odróżnianie cukrów prostych od złożonych, właściwości
redukujące cukrów prostych**

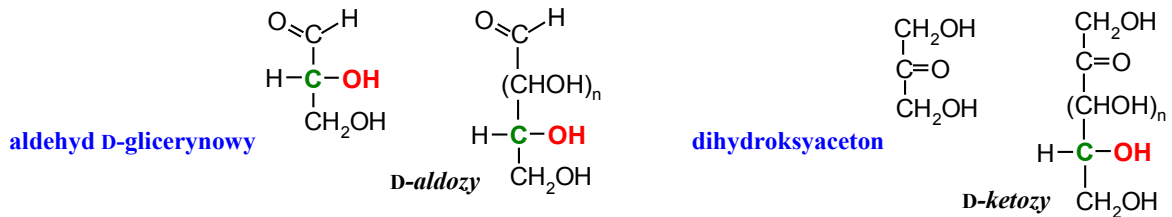
Chemia żywności

Gdańsk, 2016

2. Węglowodany w żywności: struktura, właściwości, odróżnianie cukrów prostych od złożonych, właściwości redukujące cukrów prostych

1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Węglowodany, popularnie zwane cukrami lub sacharydami, pod względem chemicznym zaliczane są do grupy polihydroksyaldehydów lub polihydroksyketonów, bądź też pochodnych tych związków. Związkami o najmniejszej masie cząsteczkowej, które spełniają tę definicję to aldehyd glicerynowy i dihydroksyaceton.



Cukry występują w każdym żywym organizmie, zarówno roślinnym, jak i zwierzęcym.

1. 1. Struktura i właściwości fizykochemiczne węglowodanów

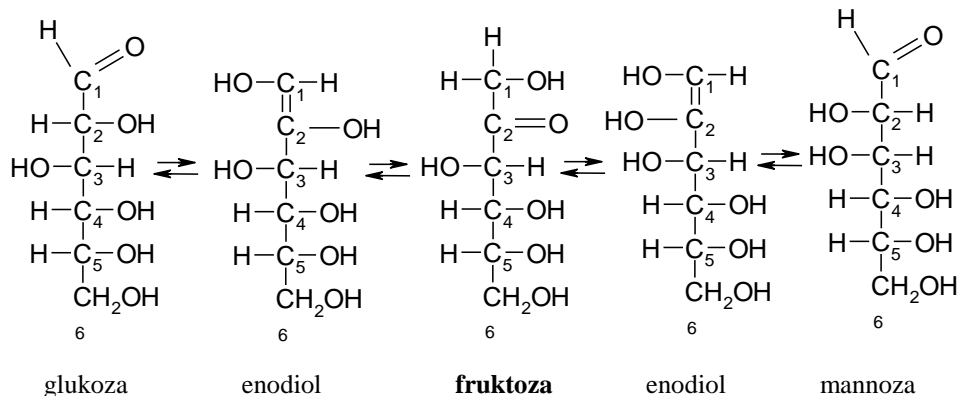
Struktura i właściwości fizykochemiczne sacharydów opisane są w pozycji 2 i 3 spisu literatury.

1.1.1. Własności redukujące cukrów

Do występowania właściwości redukujących cukrów konieczna jest wolna (niezablokowana) grupa aldehydowa lub ketonowa w cząsteczce cukru.

Wszystkie cukry proste redukują wodorotlenki metali (próba Trommera, próba z odczynnikiem Fehlinga) lub tlenki metali (próba Tollensa).

Fruktoza, mimo że nie zawiera grupy aldehydowej daje pozytywny wynik reakcji Tollensa, Trommera i Fehlinga, ponieważ w środowisku zasadowym ulega *enolizacji* do aldoz.



Proces enolizacji

2. Węglowodany w żywności: struktura, właściwości, odróżnianie cukrów prostych od złożonych, właściwości redukujące cukrów prostych

1.1.2. Disacharydy redukujące i nieredukujące. Inwersja sacharozy

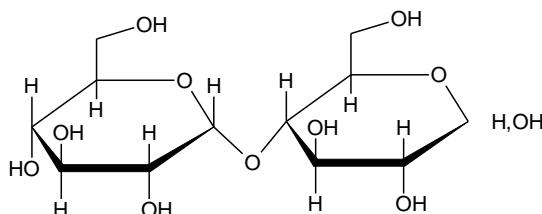
Disacharydy powstają w wyniku polikondensacji między identycznymi monosacharydami lub różnymi cukrami prostymi. Połączenie dwóch monoz polega na wytworzeniu mostka tlenowego powstałego z grupy hydroksylowej przy węglu anomerycznym jednej cząsteczki cukru i z grupy wodorotlenowej drugiej cząsteczki z wydzieleniem wody. W zależności od sposobu połączenia ze sobą cząsteczek monosacharydów rozróżnia się dwucukry redukujące i dwucukry nieredukujące.

Disacharydy redukujące

W cukrach redukujących wiązanie acetalowe dwóch cukrów prostych tworzy się z grupy –OH hemiacetalowej i z grupy –OH niehemiacetalowej. Najczęściej są to wiązania pomiędzy pierwszym atomem węgla jednej cząsteczki, a czwartym atomem węgla drugiej cząsteczki. Czasami tworzy się wiązanie 1,6-glikozydowe. W zależności od położenia grupy –OH hemiacetalowej wyróżnia się wiązania α -1,4; β -1,4; α -1,6; β -1,6-glikozydowe.

Przykładami cukrów redukujących są maltoza, celobioza i laktoza. Wszystkie te cukry mają ten sam wzór sumaryczny $C_{12}H_{22}O_{11}$, jednak zbudowane są z innych monoz.

Maltoza (α -D-glukopiranozylo-1,4-D-glukopiranoza) zbudowana jest z dwóch cząsteczek D-glukopiranozy za pomocą wiązania α -1,4- glikozydowego.



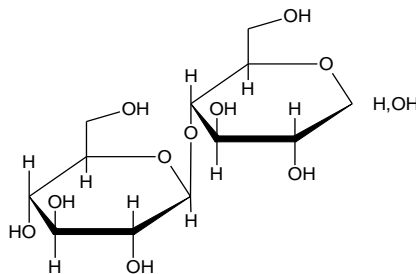
Maltoza

Maltozę można otrzymać jako jeden z produktów częściowej hydrolizy skrobi w wodnym roztworze kwasu. Tworzy się również w jednym z etapów procesu fermentacji skrobi do alkoholu etylowego. Hydroliza skrobi do maltozy jest katalizowana przez diastazę enzym znajdujący się w słodzie (kiełkującym jęczmieniu).

Ponieważ w wiązaniu glikozydowym nie bierze udziału grupa –OH hemiacetalowa drugiej cząsteczki α -D-glukopiranozy, maltoza może przejść w formę aldehydową. W związku z tym maltoza daje pozytywny wynik próby Tollensa, Trommera i Fehlinga. Ulega mutarotacji, podczas której tworzy się mieszanina anomerów α i β .

2. Węglowodany w żywności: struktura, właściwości, odróżnianie cukrów prostych od złożonych, właściwości redukujące cukrów prostych

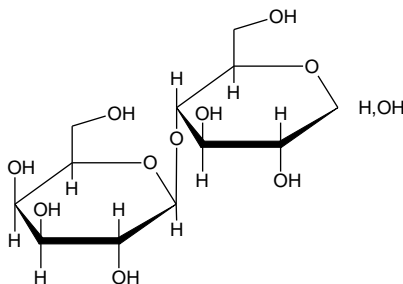
Celobioza (β -D-glukopiranozylo-1,4-D-glukopiranoza) zbudowana jest z dwóch cząsteczek D-glukopiranozy połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym.



Celobioza

Celobioza różni się od maltozy tym, że jednostki D-glukozowe połączone są ze sobą wiązaniem *beta*, a nie wiązaniem *alfa*. Celobioza ulega hydrolizie pod wpływem enzymu emulsyny, dając glukozę. Występuje w produktach enzymatycznej hydrolizy celulozy.

Laktoza (β -D-galaktopiranozylo-1,4-D-glukopiranoza) zbudowana jest z β -D-galaktopiranozy i D-glukopiranozy połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym.



Laktoza

Laktoza stanowi około 5% mleka krowiego, a także ludzkiego. Do celów handlowych otrzymuje się laktozę jako produkt uboczny przy produkcji sera, gdyż jej obecność stwierdzono w serwatce-wodnym roztworze pozostałym po koagulacji białek zawartych w mleku. Mleko kwaśnieje wówczas, gdy laktoza przekształca się w kwas mlekowy (o smaku kwaśnym, tak jak inne kwasy) pod wpływem działania bakterii (np. *Lactobacillus bulgaricus*).

Roztwory laktozy posiadają właściwości redukujące, wykazują mutarotację, ale odmiana β jest lepiej rozpuszczalna w wodzie od α -laktozy.

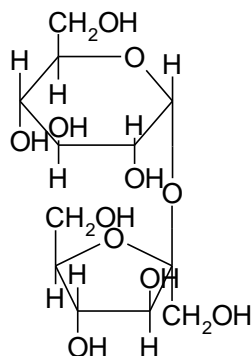
Disacharydy nieredukujące

W przypadku połączenia się dwóch grup $-OH$ hemiacetalowych obu cukrów prostych, nie jest możliwe przejście do formy łańcuchowej. Nie wytwarza się wolna grupa aldehydowa lub ketonowa i taki dwucukier nie wykazuje właściwości redukujących. Cukry takie posiadają wiązania acetalowe

2. Węglowodany w żywności: struktura, właściwości, odróżnianie cukrów prostych od złożonych, właściwości redukujące cukrów prostych

między pierwszymi węglami aldoz lub pierwszym węglem aldozy a drugim ketozy.

Sacharoza (α -D-glukopiranozylo-1,2- β -D-fruktofuranaza) – zbudowana jest z α -D-glukopiranozy i β -D-fruktofuranozy połączone wiązaniem 1,2-glikozydowym.



Sacharoza

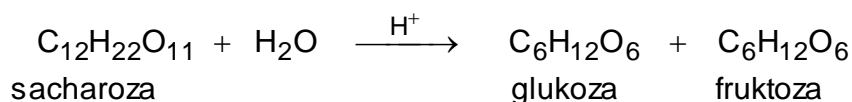
Sacharoza jest zwyczajnym cukrem stołowym, otrzymywanym z trzciny cukrowej lub buraków cukrowych. Ze wszystkich związków organicznych, produkowanych w stanie czystym, jest ona wytwarzana w największych ilościach.

Sacharoza nie redukuje odczynnika Tollensa, Trommera ani Fehlinga, nie jest ona cukrem redukującym i pod tym względem różni się od wyżej wymienionych disacharydów. Ponadto nie tworzy osazonu, nie istnieje w odmianach anomerycznych i nie wykazuje mutarotacji w roztworze. Oznacza to, że sacharoza nie zawiera „wolnej” grupy aldehydowej ani ketonowej.

Trehaloza – (α -D-glukopiranozylo-1,1- α -D-glukopiranoza) zbudowana jest z dwóch cząsteczek α -D-glukopiranozy za pomocą wiązania 1,1- glikozydowego. Występuje w drożdżach i grzybach; jest podstawowym cukrem w chemolimfie owadów. Nie wykazuje własności redukujących i nie tworzy osazonów.

Inwersja sacharozy

Reakcja inwersji sacharozy jest reakcją hydrolizy dwucukru na dwa monocukry: glukozę i fruktozę



W środowisku kwaśnym sacharoza ulega hydrolizie. Postęp tej reakcji mierzy się ilością cukrów redukujących (glukozy + fruktozy) pojawiających się w czasie jej trwania. Hydrolizie towarzyszy zmiana znaku skręcalności z dodatniego na ujemny i dlatego proces ten nazywa się często inwersją sacharozy, a otrzymana lewoskrętna mieszanina D-glukozy i D-fruktozy nosi nazwę cukru

2. Węglowodany w żywności: struktura, właściwości, odróżnianie cukrów prostych od złożonych, właściwości redukujące cukrów prostych

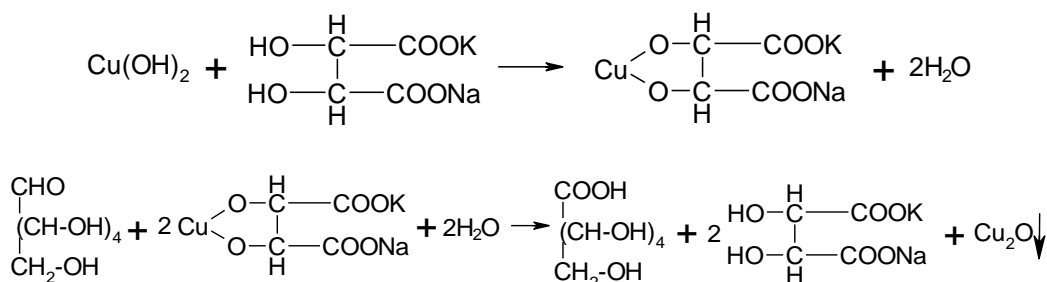
inwertowanego (miód zawiera głównie cukier inwertowany; inwertazy dostarczają pszczoły). Podczas gdy sacharoza wykazuje skręcalność właściwą $+66,5^\circ$, a D-glukoza $+52,7^\circ$, D-fruktoza ma dużą ujemną skręcalność właściwą $-92,4^\circ$ i dlatego średnia wartość skręcalności właściwej mieszaniny jest ujemna. Ze względu na przeciwne znaki skręcalności D-glukozy i D-fruktozy oraz istotne znaczenie tych cukrów jako składników sacharozy, D-glukozę nazywa się powszechnie *dekstrozą*, a D-fruktozę *lewulozą*.

1.2. Odróżnianie cukrów redukujących od nieredukujących

Próba Fehlinga

Reakcja z odczynnikiem Fehlinga jest charakterystyczna wyłącznie dla aldehydów alifatycznych. Jeśli w badanej próbce obecna jest glukoza, niebieski siarczan miedziowy (II) zawarty w odczynniku jest redukowany do tlenku miedziowego (I), który wypada z roztworu w postaci żółtego czy czerwonego osadu.

Odczynnik Fehlinga składa się z dwóch oddzielnie przygotowanych i przechowywanych roztworów. Fehling I jest zakwaszonym roztworem wodnym siarczanu miedzi(II). Fehling II zawiera wodorotlenek sodu i winian sodowo-potasowy. Oba płyny miesza się bezpośrednio przed użyciem w równych objętościach otrzymując klarowny, lazurowy roztwór związku kompleksowego wodorotlenku miedzi(II) z winianem sodowo-potasowym, co zapobiega wytrącaniu się osadu $\text{Cu}(\text{OH})_2$ i maskowaniu końcowego produktu reakcji - czerwonego osadu Cu_2O . Dodany aldehyd ulega utlenieniu oddając elektrony, których akceptorem jest dwuwartościowa miedź. Kompleks miedzi z winianem po ogrzaniu rozpada się i powstaje czerwony osad tlenku miedzi(I).



Próba Trommera

Próbie redukcyjną $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{1+}$ można wykonać także bez stosowania soli Seignetta (związku solubilizującego $\text{Cu}(\text{OH})_2$), gdyż sam cukier posiada kilka grup hydroksylowych, które mogą w podobny sposób solubilizować wodorotlenek miedzi. W próbie Trommera ważne jest dodanie tylko nieznacznej ilości roztworu CuSO_4 , aby nie przekroczyć molekularnego stosunku cukier:

2. Węglowodany w żywności: struktura, właściwości, odróżnianie cukrów prostych od złożonych, właściwości redukujące cukrów prostych

$\text{Cu}(\text{OH})_2$ (1:1) i wtedy otrzymuje się efekt próby identyczny, jak w próbie Fehlinga. Jeśli jednak roztwór CuSO_4 zostanie dodany w nadmiarze, to po ogrzaniu otrzymuje się czarny osad CuO , który będzie maskował powstały równolegle czerwony osad Cu_2O .

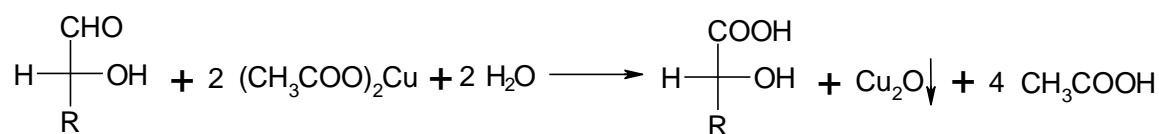
Próba Benedicta

W próbie tej wykorzystuje się właściwości redukujące niektórych cukrów wynikające z obecności wolnych grup karbonylowych. Ma to miejsce w przypadku wszystkich monosacharydów oraz tych dwucukrów, których grupy karbonylowe nie są zablokowane. Odczynnik Benedicta składa się z soli miedzi CuSO_4 , czynnika alkalizującego Na_2CO_3 oraz cytrynianu sodu. Środowisko zasadowe sprzyja otwarciu pierścienia cukrowca, a cytrynian zapobiega wypadaniu w wodzie wodorotlenku miedzi (II). W obecności cytrynianu tworzy się rozpuszczalny kompleks miedziowy, który ulega rozpadowi z wytworzeniem nierozpuszczalnego osadu tlenku miedzi (I). Osad ten posiada zabarwienie w zależności od wielkości jego cząstek. Najdrobniejsze cząsteczki dają barwę zielonożółtą, większe - pomarańczową, a największe - czerwoną. Na podstawie barwy wytworzonego osadu można ocenić orientacyjnie stężenie cukru w badanej próbce.

Barwa i osad	Przybliżona zawartość cukru [%]
zielona, bez osadu	0,1-0,3
zielona, osad	0,5
żółtozielona, osad	1
pomarańczowa, osad	1,5
czerwona, osad	> 2

Próba Benedicta należy do najbardziej specyficznych i czułych prób redukcyjnych na cukrowce. Jest to próba bardziej swoista od próby Fehlinga, gdyż związki redukujące odczynnik Fehlinga, jak: chloroform, kreatynina i kwas moczowy, nie redukują odczynnika Benedicta. Czułość próby jest dość duża. Już 0,1% stężenie cukrowca powoduje zmianę barwy z niebieskiej na zieloną. **Zielone zabarwienie jest wynikiem nakładania się pomarańczowej barwy zawiesiny Cu_2O z niebieskim zabarwieniem odczynnika.**

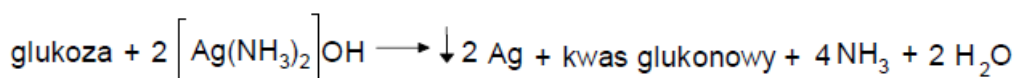
Próba Barfoeda



2. Węglowodany w żywności: struktura, właściwości, odróżnianie cukrów prostych od złożonych, właściwości redukujące cukrów prostych

Próba ta jest modyfikacją reakcji Benedicta. Redukcję jonów miedziowych prowadzi się bowiem w środowisku lekko kwaśnym (rozcieńczony kwas mlekowy lub octowy). Reakcja ta przebiega znacznie wolniej niż w środowisku zasadowym i jej szybkość jest różna dla cukrów prostych i dwucukrów redukujących. Grupa karbonylowa dwucukrów jest mało reaktywna i związki te ujawniają swój charakter redukujący dopiero po dłuższym ogrzewaniu (15 min.), gdy zajdzie ich hydroliza.

Próba Tollensa (próba lustra srebrowego)



Odczynnik Tollensa stanowi roztwór wodorotlenku diaminasrebra, który przygotowuje się bezpośrednio przed użyciem w czystej, dokładnie odtłuszczonej probówce.

Do dokładnie odtłuszczonej probówki odmierza się 1 ml 0,1 M roztworu AgNO_3 i wkrapla ostrożnie 2 M roztwór amoniaku $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Najpierw powstaje zmętnienie i osad AgOH , który po dodaniu dalszych kropli roztworu amoniaku rozpuszcza się wskutek powstania związku kompleksowego $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$. Do przyrządzonego w ten sposób odczynnika dodaje się 8 kropli badanego roztworu (glukozy lub laktozy), miesza i ogrzewa na wrzącej łaźni wodnej lub w płomieniu palnika. Po pewnym czasie na ściankach probówki wydziela się metaliczne srebro w postaci lustra.

2. WYKONANIE ĆWICZENIA

2.1. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z wybranymi reakcjami umożliwiającymi odróżnienie cukrów prostych od cukrów złożonych oraz służącymi do potwierdzania występowania właściwości redukujących cukrów prostych.

2.2. Wykonanie ćwiczenia [1]

Odczynnik chemiczne:

- Odczynnik Barfoeda (octan miedzi (II) $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ w rozcieńczonym kwasie octowym lub mlekowym)

- Roztwory potrzebne do sporządzenia odczynnika Tollensa:

1% roztworu azotanu (V) srebra,

2. Węglowodany w żywności: struktura, właściwości, odróżnianie cukrów prostych od złożonych, właściwości redukujące cukrów prostych

10% roztworu wodorotlenku sodu;

15% roztworu wodnego amoniaku

- Roztwory potrzebne do sporządzenia odczynnika Fehlinga:

Roztwór I – rozcieńczony roztwór wodny CuSO_4 – (rozpuścić w wodzie destylowanej 34,65 g krystalicznego $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ i uzupełnić w kolbie miarowej do 500 ml);

Roztwór II – alkaliczny roztwór wodny wianianu sodowo-potasowego (rozpuścić w wodzie 173 g wianianu sodu i potasu i 15 g NaOH, uzupełnić w kolbie miarowej do 500 ml); Odczynnik Fehlinga przygotowuje się bezpośrednio przed użyciem przez zmieszanie równych objętości roztworów I i II:

- 10% roztwór glukozy

- 10 % roztwór sacharozy

- 10% roztwór maltozy lub celobiozy

- 2% roztwór CuSO_4

- 2 M NaOH

Sprzęt i akcesoria:

- Probówki bez korka 16 x

- Łapa do probówek

- Pipeta 1 ml x 7

- Pipeta 2 ml x 2

- Pipeta 5 ml x 3

- Zlewka 2 x

- Wrząca łaźnia wodna

2.2.1. Odróżnianie cukrów złożonych od prostych

Próba Barfoeda

Do 1 ml badanego roztworu cukru dodać 2 ml odczynnika Barfoeda i ogrzewać we wrzącej łaźni wodnej przez 3 minuty. Jeżeli po tym czasie nie wytrącił się osad probówkę ponownie umieścić na łaźni wodnej i ogrzewać kolejnych 12 minut. Wykonać próbę dla a) 1 ml 10% roztworu glukozy, b) 10% roztworu maltozy .

Pojawienie się czerwonego osadu Cu_2O w próbie po 3 min. ogrzewania potwierdza obecność monosacharydu, a gdy powstaje on po kilkunastu minutach dowodzi obecności disacharydu redukującego.

2. Węglowodany w żywności: struktura, właściwości, odróżnianie cukrów prostych od złożonych, właściwości redukujące cukrów prostych

Uwaga: Cukry proste reagują szybciej. Żaden cukier złożony w tych warunkach (3 min) nie daje pozytywnej reakcji, bowiem wolna grupa karbonylowa w dwucukrach wykazuje małą reaktywność. Dopiero po dłuższym ogrzewaniu (15 min.), gdy zajdzie hydroliza disacharydu związki te ujawniają swój charakter redukujący.

2.2.2. Właściwości redukujące cukrów prostych

Próba z odczynnikiem Tollensa (Ag^+ w wodnym roztworze amoniaku) zwana próbą lustra srebrnego

Przygotowanie odczynnika Tollensa

1% roztworu azotanu (V) srebra

10% roztworu wodorotlenku sodu

15% roztworu wodnego amoniaku

Wykonanie: Do dokładnie umytej i odtłuszczonej probówki wlewamy 5 ml roztworu azotanu (V) srebra, dodać jedną kroplę roztworu wodorotlenku sodu, a następnie, stale mieszając, wprowadzić kroplami roztwór amoniaku, aż do momentu rozpuszczenia się powstającego początkowo osadu. Odczynnik przenieść do kolby stożkowej, zamknąć szczelnie korkiem i podpisać kolbę.

Wykonanie próby z odczynnikiem Tollensa: 1 ml odczynnika Tollensa wprowadzić do probówki, dodać 1 ml badanego cukru. Całość dokładnie wymieszać i ogrzewać około 5 minut we wrzącej łaźni wodnej. Osadzenie się wolnego srebra na ściankach probówki w postaci lustra potwierdza obecność cukru redukującego. Wykonać próbę wprowadzając a) 1 ml 10% roztworu glukozy, b) 1 ml 10% roztworu sacharozy, c) 1 ml 10% roztworu maltozy lub celobiozy.

Uwaga: Próbką jest bardzo czuła, może dać wynik dodatni z roztworem sacharozy (dwucukier nieredukujący) skutkiem jej częściowej hydrolizy.

Próba z odczynnikiem Fehlinga

Z odczynnikami Fehlinga reagują zarówno cukry proste, jak i dwucukry o własnościach redukujących.

Wykonanie: Do probówki wprowadzić 0,5 ml roztworu Fehlinga I (rozcieńczony roztwór wodny $CuSO_4$) oraz 0,5 ml roztworu Fehlinga II (alkaliczny roztwór wodny wianianu sodowo-potasowego), wymieszać zawartość i dodać ok. 1 ml badanego cukru. Po doprowadzeniu do wrzenia wypada ceglasty osad Cu_2O , co świadczy o własnościach redukujących cukru. Wykonać próbę wprowadzając a) 1 ml 10% roztworu glukozy, b) 1 ml 10% roztworu sacharozy, c) 1 ml

2. Węglowodany w żywności: struktura, właściwości, odróżnianie cukrów prostych od złożonych, właściwości redukujące cukrów prostych

10% roztworu maltozy lub celobiozy.

Próba z odczynnikiem Trommera

Do około 2 ml badanego cukru dodać 3 krople 2% roztworu CuSO_4 i po dokładnym wymieszaniu wkraplać ostrożnie 2 ml 2 M roztwór NaOH . Następnie roztwór ogrzać do wrzenia. Wytrącenie się ceglastego osadu świadczy o obecności cukru redukującego. Wykonać próbę wprowadzając a) 10% roztworu glukozy, b) 1 ml 10% roztworu sacharozy, c) 1 ml 10% roztworu maltozy lub celobiozy.

3. OPRACOWANIE WYNIKÓW

Sprawozdanie z ćwiczenia powinno zawierać:

- Stronę tytułową
- Cel i zakres ćwiczenia
- Opis wykonania ćwiczenia (zasada oznaczenia, odczynniki, szkło, sprzęt, materiały, wykonanie ćwiczenia)
- Opis obserwacji dotyczący odróżniania cukrów prostych od złożonych.
- Opis obserwacji dotyczących badania właściwości redukujących cukrów prostych (monosacharydów) i cukrów złożonych (disacharydów); wyjaśnienie różnic w ich budowie
- Wnioski

4. LITERATURA

1. Rutkowska Jarosława, Przewodnik do ćwiczeń z chemii żywności. Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 2008.
2. Sikorski Zdzisław E. Chemia Żywności, Wyd. 6, WNT, Warszawa, 2012
3. 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.
4. Kołodziejczyk Aleksander, Naturalne związki organiczne. PWN, Warszawa, 2006.