

KARBOHİDRATLARIN KALİTATİF TAYİNİ

Karbohidratlar, yeryüzünde en bol bulunan biyomoleküllerdir. Karbohidratlar, polihidroksi aldehitler veya ketonlardır. Tümü olmasa da karbohidratların çoğu $(CH_2O)_n$ kapalı formülüne sahiptir, bazıları da azot, kükürt, fosfor içerir.

Karbohidratlar üç ana sınıfa ayrılır; monosakkaritler, oligosakkaritler ve polisakkaritler.

2.1. **Monosakkaritler:** veya basit şekerler, tek polihidroksi aldehit veya keton birimi içerirler. Doğada en bol bulunan monosakkarit altı karbonlu bir şeker olan **D-glukoz**'dur. Dört veya daha fazla karbonlu monosakkaritler halkalı yapıya dönüşme eğilimindedirler. Monosakkaritler renksiz, suda ve polar çözücülerde çözünebilen kristal yapıya katılardır. Çoğu tatlıdır.

Sulu çözültide iskeleti beş veya daha fazla sayıda karbon atomu içeren tüm monosakkaritler halkalı yapı oluştururlar. Bu halkalı yapıların oluşumu alkoller ile aldehit veya keton grupları arasındaki genel bir tepkimenin sonucudur. Bu tepkime sonucu ilave bir asimetric karbon içeren ve bu nedenle iki stereoisomerik yapı oluşturabilen **yarı asetal** ve **yarı ketal** olarak adlandırılan türevler meydana gelir. Böylece α ve β olarak iki stereoisomerin oluşturduğu molekül içi bir yarı asetal oluşur. Altı üyeli halkalı bileşikler pirana benzediğinden bunlar **piranoz** olarak adlandırılır. Sadece beş ya da daha fazla karbon atomuna sahip aldozlar, piranoz halkaları oluşturabilirler.

Oligosakkaritler glikozit bağları olarak adlandırılan özel bağlarla bağlanmış kısa zincirli monosakkarit birimlerini içerir. En bol bulunanları iki monosakkarit birimli **disakkaritlerdir**.

Maltoz, laktoz ve sükroz gibi disakkaritler, bir şekerin bir hidroksil grubu ile diğerinin anomerik karbonunun tepkimeye girmesi sonucu oluşan bir **O-glikozit bağı** ile kovalent olarak birbirlerine bağlanmış iki monosakkarit içerirler. Bu tepkime, bir yarı asetal (glukopiranoz gibi) ve bir alkolden (ikinci şeker molekülünün bir hidroksil grubu) bir asetal oluşumunu gösterir ve sonuçta glikozit olarak adlandırılan bir bileşik oluşur. Glikozit bağları, asitle kolayca hidroliz olurken bazla yıkıma dirençlidirler. Bu yüzden disakkaritler serbest monosakkarit bileşenlerini verecek şekilde asit ile kaynatılarak hidrolizlenebilirler.

Sükroz (çay şekeri), glukoz ve fruktozdan oluşan bir disakkarittir. Bitkiler tarafından üretilirken, hayvanlar tarafından üretilmezler. Maltoz ve laktozun aksine sükroz serbest anomerik karbon içermez; her iki monosakkaritin anomerik karbonları glikozit bağında yer

alırlar. Bu nedenle **sükroz indirgen olmayan bir şekerdir**. Sükrozun kısaltılmış adı ya $\text{Glc}(\alpha\rightarrow2\beta)\text{Fru}$ ya da $\text{Fru}(\beta2\leftrightarrow1\alpha)\text{Glc}'$ dur. Sükroz, fotosentezin en önemli ara ürünüdür. Çoğu bitkilerde yapraklardan gövdenin diğer bölgelerine taşınan şekerin başlıca biçimidir.

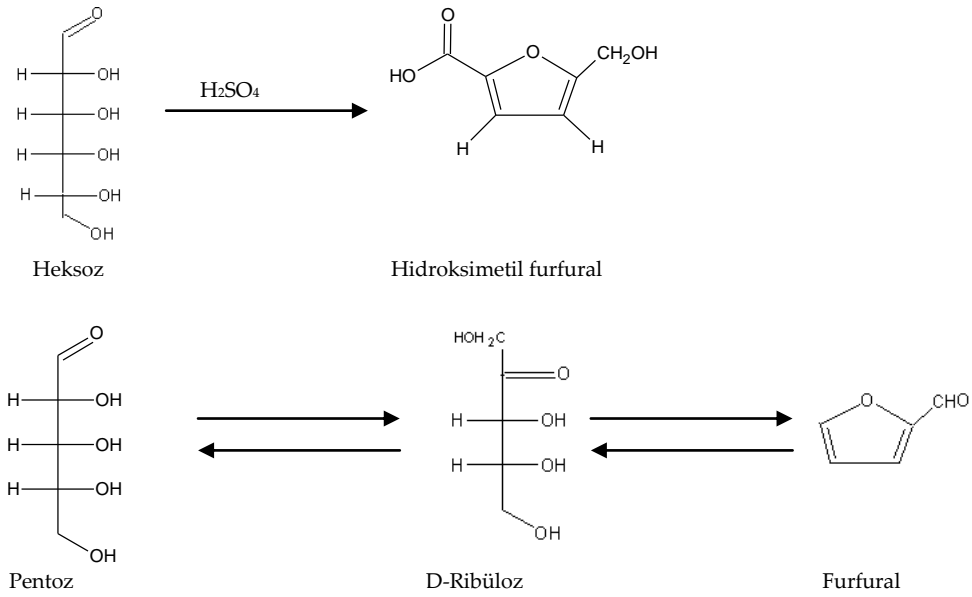
Polisakkaritler, 20 veya daha fazla sayıda monosakkarit birimi içeren şeker polimerleridir, bazıları yüzlerce ya da binlerce birime sahiptir. Selüloz gibi bazı polisakkaritler doğrusal zincirli; glikojen gibi diğerleri ise dallanmış zincirlidir. Glikojen ve selülozun her ikisi de tekrarlayan D-glukoz birimleri içerir fakat bunlar glikozit bağı türü açısından farklıdır ve bu nedenle çok farklı özelliklere ve biyolojik rollere sahiptirler.

En önemli depo polisakkaritleri, bitki hücrelerinde nişasta ve hayvan hücrelerinde glikojendir. Her iki polisakkarit hücre içi büyük kümeler veya tanecikler şeklinde meydana gelir. Nişasta ve glikojen molekülleri su ile hidrojen bağı yapabilen hidroksil grupları içerdikleri için yoğun olarak hidratlanmışlardır. Çoğu bitki hücresi fotosentez ile nişasta oluşturma yeteneğine sahiptir ve nişasta depoları özellikle patates gibi yumru köklerde ve tohumlarda bulunur.

2.1. Deneysel Çalışmalar

Karbohidratlar İçin Genel Testler

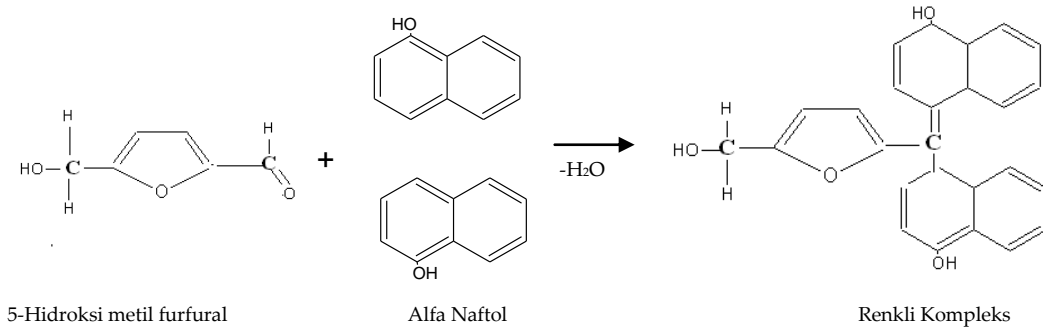
Karbohidratlar seyreltik asitlere karşı dayanıklıdır ancak kuvvetli asitler karbohidratlardaki glikozit bağı parçalar ve monosakkaritleri ortaya çıkarır. Monosakkaritler ise asidik ortamda dehidrasyona uğrayarak, furfural ve türevlerini meydana getirirler. Karbohidratların renk reaksiyonları furfural ve türevlerinin naftol, rezorsin, orsin gibi fenolik maddelerle renkli kompleksler verme özelliğine dayanır.



Şekil 2.7. Karbohidratların asitlerle hidrolizi sonucunda furfural oluşumu

Deney 2.1. Molisch Testi: Karbohidratlar için genel bir testdir. Amino şekerler, şeker alkolleri ve karboksilik asitler hariç bütün karbohidratlar için kullanılabilir.

Deneyin prensibi: Asitli ortamda oluşan furfural ve türevleri α -naftol ile renkli bir kompleks oluşturur.



Şekil 2.8. Karbohidratların asitli ortamda hidrolizi ile oluşan furfural ve türevleri α -naftol ile renkli bir kompleks oluşturması

Deneyin yapılışı: 2 mL meyve suyuna 1-2 damla Molisch ayracı eklenerek karıştırılır. 2 mL der. H_2SO_4 bulunan tüpe (30° eğimli) bu çözelti eklenir ve karıştırılmadan beklenir. Karbohidrat varlığında iki çözeltinin birleştiği yerde renk değişimi gözlenir.

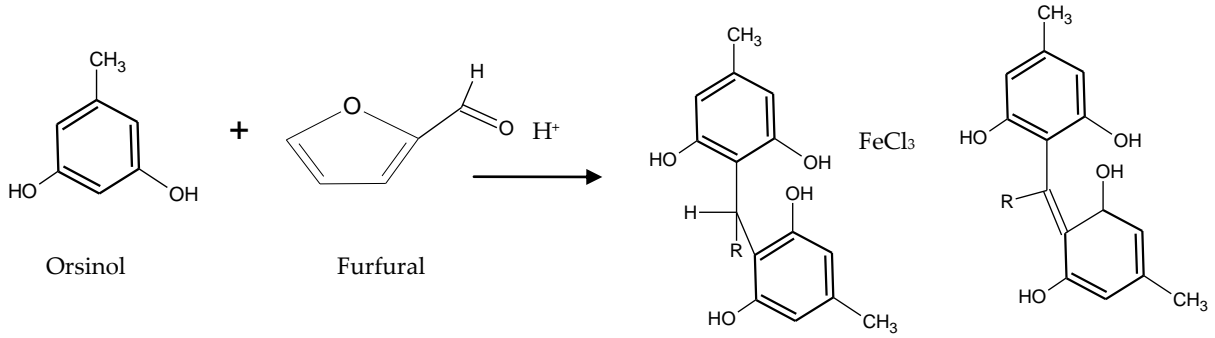
Çözeltiler:

Molisch ayracı : Alfa naftolün alkol içerisindeki %5' lik çözeltisi taze olarak hazırlanmalıdır.

Deney 2.2. Bial Testi

Bu test pentozlar için spesifiktir.

Deneyin prensibi: Pentozlar der. HCl ile ısıtıldıklarında oluşan furfuraller demir iyonlarının varlığında orsinol ile mavi-yeşil kondenzasyon ürünü oluştururlar.



Şekil 2.9. Pentozların asitli ortamda hidrolizi ile oluşan furfurallerin orsinol ile renkli bir kompleks oluşturması

Deneyin yapılışı: 1 mL riboz çözeltisine 3 mL Bial reaktifi eklenerek karıştırılır ve su banyosunda kaynatılır. Sonuçta yeşil renkli bir çözelti gözlenir.

Çözeltiler:

Riboz: 1 g kas (et) 20 mL 1 N PCA içerisinde kaynatılır ve süzülür.

BİAL reaktifi: 100 mL %30 HCl, 0.2 g orsin ve 4 damla %10 FeCl₃ ile hazırlanır.

Deney 2.3 Seliwanoff Testi

Bu test ketozlar için spesifiktir.

Deneyin prensibi: Ketozlar der. HCl ile aldozlardan daha hızlı reaksiyon vererek hidroksimetilfurfural türevini oluşturur. Hidroksimetilfurfural ise rezorsin ile kırmızı renki bir kompleks oluşturur.

Deneyin yapılışı: 2 mL Seliwanoff reaktifi üzerine 1-2 damla meyve suyu eklenerek karıştırılır ve su banyosunda kaynatılır. Ketozların varlığında renk değişimi gözlenir.

Çözeltiler:

Seliwanoff reaktifi: 50 mg rezorsin alkolde çözülür ve üzerine 100 mL 1:1 oranında seyreltilmiş HCl ilave edilir.

İndirgen Şekerlere Ait Deneysel Çalışmalar

Deney 2.4 Metilen Mavisini Testi

Deneyin prensibi: Serbest aldehit ya da keton grubuna sahip monosakkaritler ve yarı asetal ya da yarı ketal grubuna sahip karbohidratlar, bazik ortamda ısıtıldıklarında **yükseltgenerek karboksilik asitleri** oluştururken ortamda bulunan metilen mavisini de indirgeyerek mavi rengin kaybolmasına neden olurlar. Mavi rengin kaybolması çözeltideki karbohidratın yükseltgenmiş olduğunu gösterir.

Deneyin yapılışı: Deney tüpüne 5 mL su, 1 damla metilen mavisini (%0,1) konulur ve 2 damla 2 N NaOH ilave edilir. Çözelti su banyosunda ısıtıldıktan sonra üzerine 4-5 damla glukoz çözeltisi (%2) ilave edilir. Isıtma sonunda çözeltinin mavi rengi kaybolur. Ancak tüp çalkalanırsa yeniden mavi renk oluşur. Aynı deneyi çay şekeri ile yaparak sonucu değerlendiriniz.

Deney 2.5 Osazon Testi

Deneyin prensibi: Serbest aldehit veya keton grubuna sahip tüm şekerler fenil hidrazinle ısıtıldıklarında belirli erime noktaları ve şekilleri olan osazon adı verilen sarı renkli kristaller oluştururlar. Glukoz, fruktoz ve mannoz aynı osazonu verirken, sakkaroz ve polisakkaritler vermez.

Monosakkaritin 1. ve 2. karbon atomlarına fenil hidrazinin bağlanmasıyla karakteristik kristalli osazonlar oluşur. Glukoz, fruktoz ve mannoz sarı renkli ekin demeti görünümünde aynı osazon kristallerini oluşturur.

Galaktozun oluşturduğu osazon kristalleri ise koyu sarı renkte at kestanesi görünümündedir.

Deneyin yapılışı: Deney tüpüne 5 mL şeker çözeltisi (%2 glukoz) konularak üzerine 10 damla glasiyel asetik asit, 3 damla fenil hidrazin ve 1 spatül ucu sodyum asetat ilave edilir. Çözelti karıştırıldıktan sonra su banyosunda 30 dk kaynatılır. Soğutma sonrasında oluşan kristaller mikroskop altında incelenir.

Deney 2.6 Benedikt Testi

Deneyin prensibi: İndirgen şekerler Benedikt reaktifi ile ısıtıldığında, şekerin türüne ve miktarına bağlı olarak farklı renk reaksiyonları verirler.

Deneyin yapılışı: Soğan ve patates ayrı ayrı rendelenir ve suları sıkılarak tüplere alınır. Aşağıda tabloda verilen işlemler sırasıyla uygulanır.

Tüp 1	Tüp 2	Tüp 3	Tüp 4	Tüp 5	Tüp 6
0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
Su	Soğan suyu	Patates suyu	Glukoz	Sükroz	Nişasta
1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL
Benedikt	Benedikt	Benedikt	Benedikt	Benedikt	Benedikt
5 dk. kaynatılır ve meydana gelen renk değişiklikleri yorumlanır.					

Kalitatif Benedikt Çözeltisinin Hazırlanışı:

17.3 g sodyum sitrat, 10 g susuz sodyum karbonat (Na_2CO_3) ve 1.73 g bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 100 mL destile suda çözülerek hazırlanır.

Deney 2.6 Disakkaritlerin ve Polisakkaritlerin Kimyasal Hidrolizleri

Deneyin prensibi: Disakkaritler ve polisakkaritler, vücudumuzda enzimatik reaksiyonlar sonucunda ya da endüstride kimyasal olarak asitlerin (HCl, H_2SO_4 vb.) sulu çözeltileri kullanılarak kendilerini oluşturan monosakkaritlerine hidroliz olabilirler.

Deney 2.6.1 Sükrozun Hidrolizi

Deneyin yapılışı: 5 mL %5'lik sükroz çözeltisine, 0.5 mL %10'luk hidroklorik asit çözeltisi eklenir kaynamakta olan suyun içerisinde yarım saat bekletilir. Çözelti soğutulduktan sonra elde edilen çözeltilerden 0.5 mL alınarak **Benedikt testi (bkz.Deney 2.6)** uygulanır. **Sükrozun hidroliz ürünlerini ve benedikt testi ile oluşturdukları renkleri yazınız ve testin sonucunu daha önceki hidroliz olmamış sükroz deneyinden elde edilen sonuçla karşılaştırınız.**

1. Süzkroz	Hidroliz olmadan	Benedikt testi (bkz.Deney 2.6)	Sonuç ve Nedeni?
2. 10 mL Süzkroz	Kaynatılır %10 HCl ile hidroliz edilir	Kaynayan çözeltilerden 1 mL alınır	Benedikt testi (bkz.Deney 2.6) Sonuç ve Nedeni?

Deney 2.6.2 Nişastanın Hidrolizi

5 mL %0.1 nişasta çözeltilisine, 0.5 mL der.HCl çözeltilisi ekleyerek, kaynamakta olan suyun içerisinde yarım saat bekletilir ve elde edilen çözeltiliden 0.5 mL alınır ve **Benedikt testi (bkz.Deney 2.6)** uygulanır, diğerk bir kısmına ise **iyot-potasyum iyodür testi** (1 mL deney çözeltilisine 1 damla I₂/KI çözü. damlatılır) uygulanır. Nişastanın **hidroliz ürünlerini ve benedikt testi ile oluşturdukları renkleri yazınız ve testin sonucunu daha önceki hidroliz olmamış nişasta deneyinden elde edilen sonuçla karşılaştırınız.**

1.Nişasta	Hidroliz olmadan	a) Benedikt testi b) I ₂ /KI testi	Benedikt testi (bkz.Deney 2.6) I ₂ /KI testi	Sonuç ve Nedeni?
2. Nişasta	Kaynatılır %10 HCl ile hidroliz edilir	Hidroliz Çözeltilisinden 1'er mL alınır	Benedikt testi (bkz.Deney 2.6) I ₂ /KI testi	Sonuç ve Nedeni?

Çözeltiler:

I₂/KI çözeltilisi: 0.3 g I₂ ve 1.5 g KI 100 mL saf suda çözümlenerek hazırlanır.

Deney 2.7 Nişastanın α-amilaz ile Hidrolizi

Deneyin prensibi: Nişasta (bkz. Bölüm 2) idrar veya tükürükte bulunan α-amilaz ile hidroliz edildiğinde, nişasta molekülündeki α-1,4 bağları parçalanır ve glukoz, maltoz ve dekstrinler meydana gelir. Bu ürünlerden dekstrinler, nişasta glukozu kadar hidrolizlenmeden önce oluşan kısa molekülü ürünlerdir. Dekstrinlerin çözünürlüğü yüksektir ve yoğun şurup kıvamında olup gıdalarda viskozite arttırıcı, dolgu maddesi olarak kullanılırlar. Nişastanın hidrolizi sırasında oluşan dekstrinler, iyotla verdikleri renklere göre birbirinden ayrılabilirler. Nişasta iyot ilavesi ile mavi bir renk kazanır. Bu renk, nişasta molekülü parçalanarak küçüldükçe kırmızıya döner. Bu dönüşüm aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Hidroliz Aşaması	İyotla Oluşan Renk
Nişasta	Mavi
Amilo dekstrin	Mor menekşe
Eritro dekstrin	Kırmızı soğan kabuğu
Akro dekstrin	Hafif sarı
Maltoz/Glukoz	Renksiz

Deneyin yapılışı: Nişastanın (%0.1), idrar içerisindeki α -amilaz ile enzimatik hidrolizi için aşağıdaki çalışma yapılacaktır.

Çözeltiler /mL	1	2	3	4	5	6	7	8
α -Amilaz (idrar)	-	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
Distile su	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3
%0.1 Nişasta	2	2	2	2	2	2	2	2

Tüpler karıştırıldıktan sonra 37°C sıcaklıktaki su banyosunda 30 dk bekletilir. Her bir tüpe 5'er mL soğuk su ilave edilerek reaksiyon durdurulur. Her bir tüpe 1'er damla iyot çözeltisi (%1.5 KI ve %0.3 I₂) ilave edilerek oluşan renkler incelenir.

KAYNAKLAR

- (1) Lehninger 2013. Biyokimyanın İlkeleri
- (2) Sayeed A. 2007. Introduction of Plant Constituents and their Tests.
- (3) web.mst.edu/~nercall/documents/chem362/experiments/UNIT4%20Expt1.doc.
- (4) apple.cmu.edu.tw/~a001003/Carbohydrates%20-%20Qualitative%20Tests.htm.
- (5) jarumperak.blogspot.com/2008/03/carbohydrates.html.
- (6) J. Bruckner 1954. Estimation of Monosaccharides by the Orcinol-Sulphuric Acid Reaction.
- (7) <http://www.fatih.edu.tr/~besat/Teaching/Kim355/Deney8.pdf>