

GIDALARDA TOPLAM VE İNDİRGEN ŞEKER TAYİNİ (LANE-EYNON METODU)

Karbonhidratlar gıdaların yapısını oluşturan temel bileşenlerdendir ve beslenme açısından asıl enerji kaynağı (özellikle nişasta, mono ve disakkaritler) konumundadırlar. Karbonhidratlar ayrıca gıdaların tat, aroma, viskozite, tekstür, su tutma kapasitesi, esmerleşme özellikleri üzerinde etkilidir ve bu nedenlerle gıdalarda bulunan karbonhidrat miktarının belirlenmesi önem arz eder.

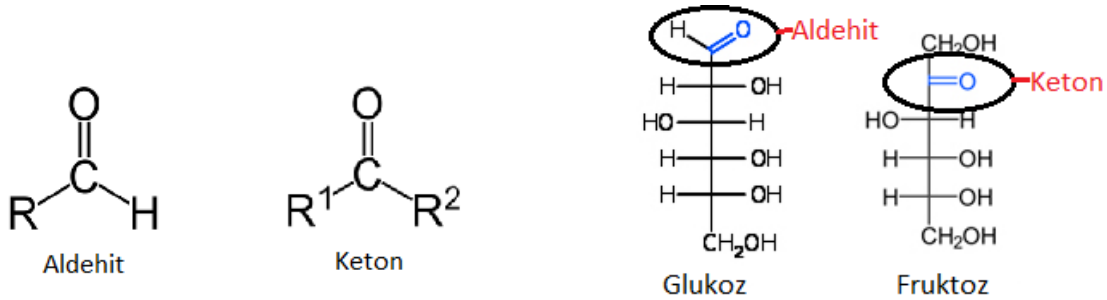
Gıdalarda şeker tayinleri, aşağıdaki nedenlerden dolayı yapılmaktadır:

- Gıdaların bileşiminde bulunan toplam şeker ve invert şeker miktarını tespit etmek
- Prosese (üretimin işlemlerine) yön vermek
- İçeriklerinde sahip oldukları enerji miktarını bulabilmek
- Standarda uygun olup olmadığını saptamak

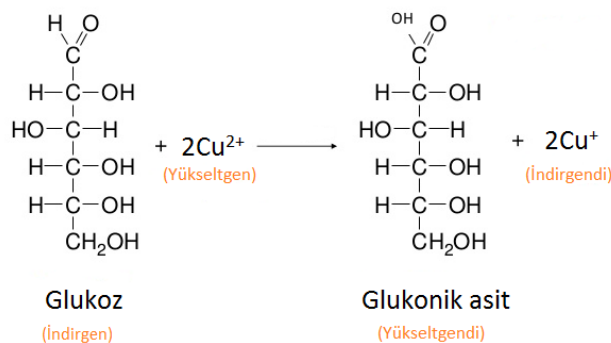
Bitkisel gıdalardan olan meyvelerin katı maddesinin büyük bir kısmını şeker oluşturur ve meyvelerdeki şekerin genel olarak büyük çoğunluğunu monosakkaritler (özellikle glukoz ve fruktoz) oluşturur. Bunun yanında yapıda değişken miktarlarda disakkaritlerde (özellikle sakkaroz) yer almaktadır. Meyve –sebze ve ürünlerinde herhangi bir yöntemle saptanan monosakkaritler ve sakkarozun toplamı, o gıdanın toplam şeker içeriğini verir.

Gıdalarda farklı şeker tayin yöntemleri (kimyasal, kromatografik, enzimatik, spektroskopik) bulunmaktadır ve bu yöntemler arasında kimyasal şeker tayin yöntemleri pratik, hızlı, düşük maliyetli olması açısından tercih edilebilmektedir.

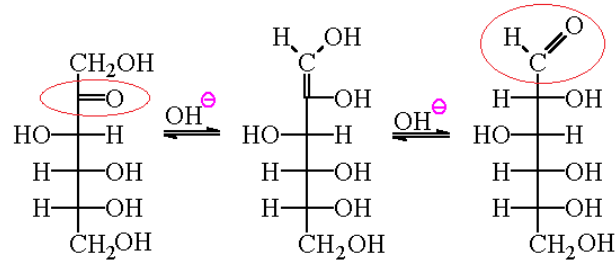
Kimyasal şeker tayin yöntemlerinde genel olarak şekerlerin indirgen özelliğinden faydalanılır.



Monosakkaritler yapılarında aldehit ve keton grupları içerirler. Aldehit grubu kendi elektrolarını başka bir moleküle aktararak o molekülü indirgemeye, bu aktarımın sonucu olarak da kendisi yükseltgenme (oksidasyona uğrama) özelliğine sahiptir. Yükseltgenen aldehit grubu karboksilik asite dönüşür. Aldehit yükseltgenirken elektroları kabul eden molekül indirgenmeye (redüksiyona) uğrar. Yani aldehit grubu indirgeyici olarak davranırken, elektroları kabul eden molekül yükseltgeyici olarak davranır. Bu sebeple basit şekerler gibi yapısında aldehit grubu içeren moleküller indirgendir.



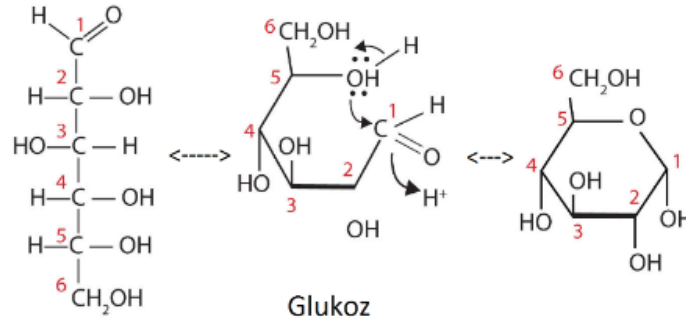
Keton grubu ise kendi halinde indirgen değildir ancak bazik koşullarda (ortama NaOH gibi alkali maddeler eklenmesi halinde) keton grubu bir dizi reaksiyonla aldehit grubuna izomerize olur ve indirgen özellik kazanır.



Fruktoz

Dolayısıyla tüm monosakkaritler aldehit ve keton grubu içermeleri sebebiyle indirgeyicidirler ve indirgen şeker olarak adlandırılırlar.

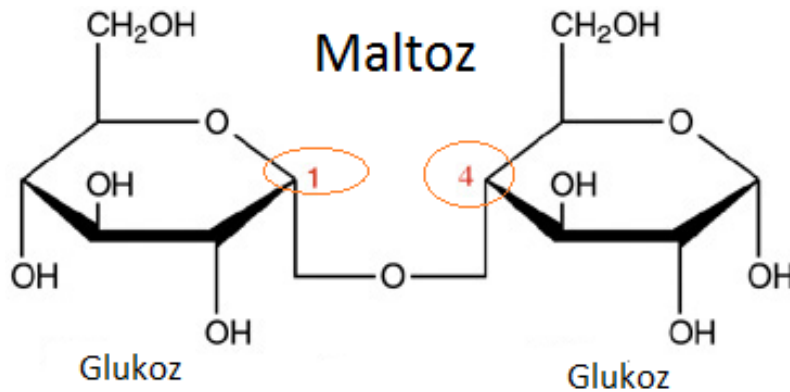
Şekerlerin indirgen özellik gösterebilmeleri için aldehit grubunun serbest olması, aldehit grubunun C, O atomlarının reaksiyona girebilir durumda olması gerekmektedir. Bilindiği üzere sulu çözeltilerinde şekerler çok büyük oranda (> %99) halkasal formda bulunmaktadır. Halkasal formda aldehit grubunun oksijen atomu bağ yaptığı için aldehit grubu indirgeyici özellik gösteremez. Bu sebeple kimyasal analizlerde monosakkaritlerin halka formunun açılabilir olması gereklidir.



Glukoz

Disakkaritler ve oligosakkaritler kendilerini oluşturan monosakkaritlere bağlı olarak indirgen özellik gösterebilirler.

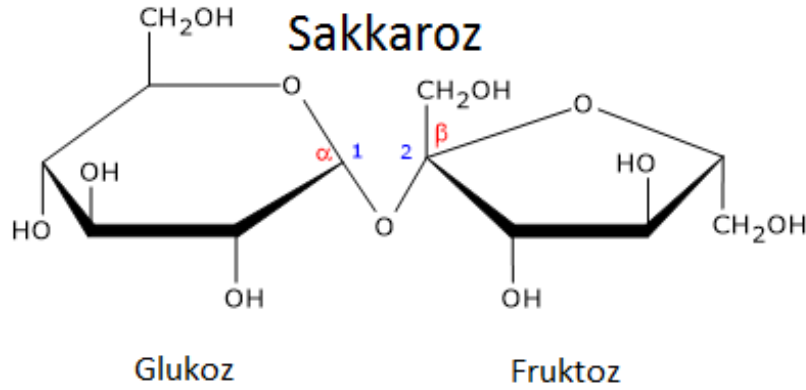
Örneğin maltoz, $\alpha(1\rightarrow4)$ bağıyla birbirine bağlanmış 2 adet glukozdan oluşmaktadır. Glukozda aldehit grubu 1. C atomunda bulunmaktadır. Dolayısıyla indirgeyici özellik 1. C atomu ve buna bağlı olan O atomunun serbest olup olmamasına bağlıdır.



Maltozda ilk glukozun 1. C atomu ile diğer glukozun 4. C atomu birbiri ile glikozidik bağ yaparak maltozu oluştururlar. İlk glukozun 1. C atomu diğer glukoz ile glikosidik bağ yaptığı için halka yapısı açılmaz ve aldehit

grubu açığa çıkamaz. Dolayısıyla indirgen özellik gösteremez. Ancak diğer glukozda 1. C atomu boştaadır. Bu sebeple halka yapısı açılabilir ve aldehit grubu açığa çıkabilir. Dolayısıyla indirgen özellik gösterebilir.

Sakkaroz ise glukoz ve fruktozun α -1, β -2 bağıyla bağlanması sonucu oluşur. Glukozda aldehit grubu 1. C atomunda, fruktozda keton grubu 2. C atomundadır. Sakkarozda glukozun 1. C atomu ve fruktozun 2. C atomu birbiri ile glikozidik bağ yaparak sakkarozu oluştururlar. Hem glukozdaki aldehit hemde fruktozdaki keton gruplarının bağlı olduğu C atomları birbiriyle bağ yaptığı için erişilemez durumdadır. Bu durumda ne glukoz ne fruktoz indirgen özellik gösteremez. Dolayısıyla sakkaroz indirgen değildir. Bu nedenle kimyasal yöntemlerle şeker tayininde sakkaroz önce inversiyona uğrattılır (sakkaroz kendisini oluşturan glukoz ve fruktoza parçalanır, ortaya çıkan glukoz-fruktoz karışımına invert şeker denir) ve ortamda bulunan diğer glikoz ve fruktozla birlikte indirgen şeker olarak tayin edilir.

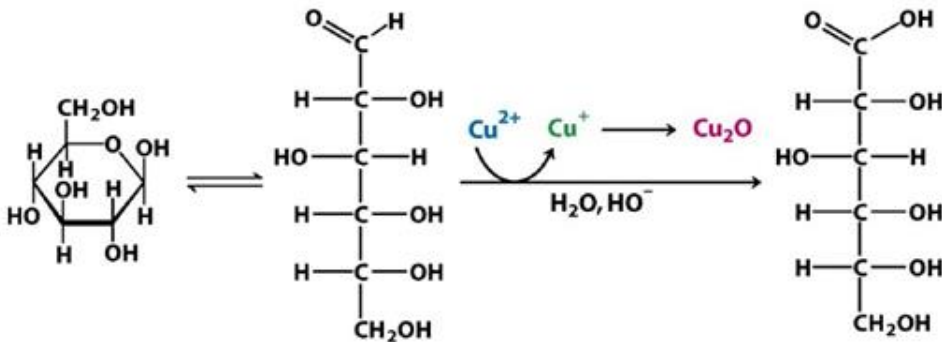


Şeker tayini için değişik kimyasal yöntemler bulunmakla birlikte Lane-Eynon metodu pratik ve kolay olması açısından sıklıkla tercih edilmektedir.

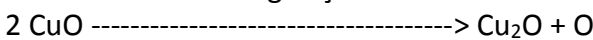
Lane-Eynon Metodu ile Şeker Tayini

Yöntemin Prensibi

Alkali ortamda ve kaynama sıcaklığında indirgen şekerlerin Fehling çözeltisinde bulunan bakır-2-oksidi (CuO) suda çözünmeyen bakır-1-okside (Cu_2O) indirgemesi esasına dayanır.



indirgen şeker



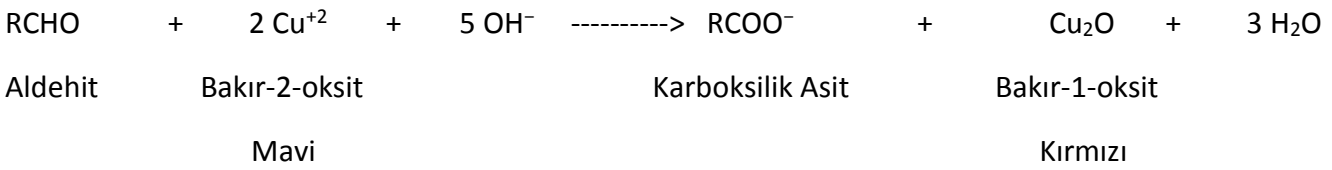
CuO yükseltgendir yani indirgen özellik gösteren moleküllerden elektron alarak indirgenir ve diğer molekülü yükseltger. CuO koyu renkli bir maddedir ve indirgendiği zaman kiremit kırmızı renkli Cu_2O oluşur. Renk değişimi takip edilerek indirgenip indirgenmediği kolayca belirlenebilir. Bu özelliği sayesinde CuO , şeker analizlerinde sıkça kullanılmaktadır.

İndirgen şeker analizinde şekerler CuO ile karıştırılırlar, şekerler adehit grupları sayesinde CuO ile reaksiyona girerek bakırı indirgerler ve adehit grupları karboksilik asite yükseltgenirler. CuO nun indirgenmesi sonucunda Cu₂O ortaya çıkar ve ortamın rengi değişerek kiremit rengine kayar. Bu renk oluşuyorsa bakırın indirgendiği ve dolayısıyla analiz edilen şekerin indirgen olduğu şeklinde yorum yapılır.

Ancak bu reaksiyonların gerçekleşebilmesi için sıcaklığın yüksek olması (kaynama sıcaklığı) gerekmektedir. Ayrıca früktoz gibi keton grubuna sahip olan şekerlerin test edilebilmesi için ortamın bazik olması gereklidir.

Lane-Eynon metodunda indirgenme reaksiyonlarını gerçekleştirebilmek için Fehling çözeltisi kullanılmaktadır. Fehling çözeltisi, Fehling A ve Fehling B olarak iki ayrı çözelti karıştırılarak elde edilir. Fehling A, Cu kaynağı olarak CuSO₄ içerir. Fehling B ise ortamı bazik hale getirecek olan NaOH ve reaksiyona girebilecek olan aktif Cu⁺² oluşumunu sağlayacak olan potasyum sodyum tartarat (KNaC₄H₄O₆·4H₂O) içerir.

Fehling çözeltisi içerisine indirgen şeker karıştırılıp kaynatıldığı zaman kabaca şu reaksiyon gerçekleşir:



Kullanılan Kimyasallar/Malzemeler

- Fehling A çözeltisi: 34,64 g CuSO₄·5H₂O damıtık suda çözündürülerek 500 ml'ye tamamlanır. Filtre edildikten sonra renkli şişede saklanır.
- Fehling B çözeltisi: 173 g KNaC₄H₄O₆·4H₂O (potasyum sodyum tartarat) ve 50 g NaOH ile birlikte damıtık suda çözündürülür. 500 ml'ye tamamlanır. 2 gün bekletildikten sonra filtre edilir.
- 4 N NaOH çözeltisi: 40 g NaOH su ile 200 ml'ye tamamlanır.
- %1'lik sulu metilen mavisini çözeltisi: 1 g metilen mavisini saf suda çözündürülür ve saf su ile 100 ml'ye tamamlanır. indikatör olarak görev yapar.
- Stok invert şeker çözeltisi: 9.5 g saf sakkaroz 1 L' lik ölçü balonunda yaklaşık 80 mL su ile çözündürülür. Üzerine 5 mL yoğun HCl eklenir ve oda sıcaklığında en az 3 gün bekletildikten sonra balon çizgisine kadar tamamlanır.
- Standart invert şeker çözeltisi: Stok invert şeker çözeltisinden 50 ml alınır ve fenolftalein eşliğinde 4 N NaOH ile nötrleştirildikten sonra 250 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti 1 mL' sinde 2 mg invert şeker içerir.
- Isıtma düzeneği (bek alevi veya ısıtıcı), büret

Analizin Yapılışı

İndirgen şeker analizinde öncelikle **Faktör (F) Tayini** yapılır. Faktör (F) tayini için;

- Standart invert şeker çözeltisi bürete doldurulur
- 5 mL Fehling A, 5 mL Fehling B ve 25 mL saf su karıştırılarak Fehling çözeltisi hazırlanır.
- Fehling çözeltisi ısıtıcı veya bek alevi ile kaynatılır.
- Kaynama başlayınca 2 dakika süre tutulur ve 2 dk sonunda Fehling çözeltisine birkaç damla metilen mavisini damlatılır. Fehling çözeltisi koyu mavi renk alır.
- Fehling çözeltisi zaman kaybetmeden standart invert şeker çözeltisi ile titre edilir.
- Titrasyon esnasında Fehling çözeltisi kaynama sıcaklığında olmalıdır ve titrasyon işlemi 1 dakika içerisinde bitirilmelidir.
- Kiremit kırmızı renk elde edilince titrasyon bitirilir.
- Büretten, harcanan standart invert şeker çözeltisi miktarı tespit edilir ve faktör hesaplanır.

Titrasyonun başlangıcında Fehling çözeltisi, metilen mavisi içermesi sebebiyle koyu mavi renktedir. Fehling çözeltisine invert şeker ilave edildiğinde, şekerin bakır-2-oksiti indirgeyerek bakır-1-oksit oluşturması sebebiyle ortamda kırmızı renk belirmeye başlar. Ancak metilen mavisinin rengi baskın olduğu için ortam rengi hala koyu mavidir. Titrasyon, Fehling çözeltisinde bulunan bakır-2-oksitin tamamı bakır-1-oksite indirgenene kadar devam eder. Ortamda bakır-2-oksit olduğu sürece eklenen indirgen şeker bakır-2-oksit ile reaksiyona girer. Bakır-2-oksit tükendiğinde ise şekerler metilen mavisi ile reaksiyona girmeye başlar. Metilen mavisi indirgenen bir maddedir, indirgendiği zaman koyu mavi rengini kaybeder ve renksiz hale gelir. Şekerler metilen mavisini indirgemeye başladığı anda koyu mavi renk kaybolur ve ortam kiremit kırmızı renk alır. Bu renk gözlemlendiği zaman titrasyonun bittiği anlaşılır çünkü şekerler bakır-2-oksitin tamamını indirgemıştır ve artık metilen mavisini indirgemeye başlamıştır.

- Faktörü daha hassas tespit edebilmek için ikinci bir titrasyon daha yapılır.

Titrasyonu 1 dakikada tamamlamak gerektiği için ilk denemede standart şeker çözeltisini Fehling çözeltisi üzerine hızlı şekilde eklemek gerekir. Bu durumda Fehling çözeltisinin sıcaklığı kaynama sıcaklığının altına düşebilir ve sonuç hatalı olabilir. İkinci denemede, ilk denemede harcanan standart şeker çözeltisinin birkaç mL eksiği titrasyon öncesi Fehling çözeltisi ile karıştırılır. Bu sayede titrasyon aşamasında harcanacak standart çözelti miktarı azaltılmış olur. Ve titrasyona başlandığında standart şeker çözeltisi erlene çok daha yavaş şekilde (damla damla) eklenebilir.

- İlk titrasyonda harcanan standart çözeltinin birkaç mL eksiği Fehling çözeltisine eklenir ve aynı işlemler tekrarlanarak harcanan standart çözelti miktarı tespit edilir.

Faktör (F) = V x S

V: Titrasyonda harcanan standart şeker çözeltisi miktarı (mL)

- İkinci denemede titrasyon öncesi Fehling çözeltisine eklenen standart şeker çözeltisi + ikinci titrasyonda harcanan standart şeker çözeltisi

S: Standart şeker çözeltisinin konsantrasyonu (mg / mL)

Örneğin; faktör tayini için 2 mg / mL konsantrasyonda standart şeker çözeltisi kullanılmışsa ve titrasyon öncesi Fehling çözeltisine eklenen standart şeker çözeltisi 25 mL ise ve titrasyonda 2,8 mL standart şeker çözeltisi harcanmışsa;

$$V = 25 + 2,8 = 27,8 \text{ mL}, \quad S = 2 \text{ mg / mL}, \quad F = 27,8 \text{ (mL)} \times 2 \text{ (mg/mL)} = 55,6 \text{ mg}, \quad F = 55,6 \text{ mg}$$

Gıda Örneğinin Analize Hazırlanması

Şeker tayini yapılacak örnek homojen olmalıdır. Taze meyve, sebzeler, konserve, reçel ve marmelat gibi gıdalar parçalanarak/ezilerek/karıştırılarak (gerekirse su ilavesiyle) homojen hale getirilir. Kurutulmuş gıdalar ılık su ile rehidre edilir ve homojen hale getirilir. Toz gıdalar ısıtılmış saf su ile karıştırılır ve analize alınır. Hazırlık aşamasında su eklenmişse eklenen su miktarı hesaplamaya katılmalıdır. Sıvı gıdalar ise doğrudan analize alınır.

Örnek ne olursa olsun, analize hazır hale getirilmiş son halinde **1-3 mg /ml şeker** bulunacak şekilde seyreltme yapılması gerekir.

Şeker tayininde analiz edilecek örneğin nötral ve berrak olması gerekir. Özellikle meyve suları içerdikleri çeşitli maddeler (örn. fenolik maddeler) sebebiyle doğrudan analize alınamazlar. Analiz edilecek örnekte bulunan, şeker harici indirgen özellik gösteren maddeler veya örnekteki şekerin indirgeme özelliğini etkileyecek maddelerin uzaklaştırılması gerekir. Bu sebeple analiz öncesinde meyve suları Carrez çözeltileri ile **durultulur**.

Durultma için;

- 25 mL meyve suyu örneği 250 mL lik balon joje içerisine alınır, 100 mL kadar saf su ilave edilir.
- Üzerine 5 mL Carrez I ve 5 mL Carrez II eklenerek karıştırılır.
- Balon çizgisine kadar saf su eklenir ve 30 dakika beklenir.
- 25 mL örnek 250 mL' ye sulandırıldığı için 10 kat seyreltilmiş olur.
- Süre sonunda filtre edilerek berrak meyve suyu elde edilir.

Örneğin Analizi

Meyve suyu örneği durultulduktan sonra analize alınır. Faktör tayininde yapılan işlemler tekrar edilir.

- Meyve suyu örneği bürete doldurulur.
- Fehling çözeltisi hazırlanır ve kaynatılır.
- 2 dakika süre tutulur ve Fehling çözeltisine birkaç damla metilen mavisi damlatılır, titrasyona başlanır.
- Kiremit kırmızı renk elde edilince titrasyon bitirilir ve harcanan meyve suyu miktarı belirlenir.

İndirgen Şeker Miktarının Hesaplanması

$$\text{İndirgen şeker miktarı (mg/mL)} = \frac{F \times \text{Seyreltme miktarı}}{V}$$

F: Faktör

V: Titrasyonda harcanan meyve suyu miktarı

Seyreltme miktarı= 250 / 25 = 10 (25 mL örnek durultma aşamasında 250 mL' ye seyreltilmiş ise)

Örneğin; durultma aşamasında 25 mL alınan meyve suyu örneği 250 mL' ye seyreltilmiş ise ve titrasyonda 7 mL meyve suyu harcanmış ise ve faktör 55,6 olarak bulunmuş ise;

$$\text{Seyreltme} = 250/25=10, \quad F= 55,6 \text{ mg}, \quad V= 7 \text{ mL},$$

$$\text{Meyve suyu örneğinin indirgen şeker miktarı} = \frac{55,6 \text{ mg} \times 10}{7 \text{ mL}}$$

$$\text{Meyve suyu örneğinin indirgen şeker miktarı} = 79,42 \text{ mg/mL}, \quad 79,42 \text{ (mg/mL)} = 79,42 \text{ (g/L)} = 7,942 \text{ (g/100 mL)} = \% 7,942$$

Buna göre meyve suyu örneğinin litresinde 79,42 gram indirgen şeker, 100 mL' sinde 7,942 gram indirgen şeker bulunmaktadır.

Toplam Şeker Tayini

Meyvedeki toplam şekerin bir kısmını sakkaroz oluşturmaktadır. Ancak, sakkaroz indirgen özellik göstermediği için Fehling çözeltisindeki bakırı indirgeyemez ve dolayısıyla Lane-Eynon yöntemiyle belirlenemez. Sakkarozun bu yöntemle belirlenebilmesi için önce kendisini oluşturan glukoz ve früktoza parçalanması gerekmektedir. Toplam şeker tayininde meyve suyu örneği önce asit ile muamele edilerek örnekte bulunan sakkaroz parçalanır. Daha sonra indirgen şeker tayini yapılır. Elde edilen sonuç toplam şeker miktarını verir.

- 100 mL' lik balon jojeye 50 mL durultulmuş meyve suyu alınır.
- Üzerine 5 mL derişik (%37lik) HCl yavaşça ilave edilir.
- Balon joje 65 °C'de su banyosunda 5 dakika bekletilir. Bu aşamada sakkaroz inversiyona uğrar.

- Süre sonunda balon joje hızlıca soğutulur.
- Soğutulduktan sonra fenolftaleyn eklenerek 4 N NaOH ile pembe renge kadar titre edilir, nötrlenir.
- Balon joje saf su ile çizgisine kadar doldurulur. Bu aşamada 50 mL meyve suyu 100 mL' ye sulandırıldığı için 2 kat daha seyreltilmiş olur.
- Meyve suyu örneği bürete doldurulur ve aynı işlemler tekrarlanarak titrasyon yapılır.

Toplam Şeker Miktarının Hesaplanması

$$\text{Toplam şeker miktarı (mg/mL)} = \frac{F \times \text{Seyreltme miktarı}}{V}$$

F: Faktör

V: Titrasyonda harcanan meyve suyu miktarı

Seyreltme miktarı= 10 x 2 = 20 (durultma aşamasında 10 kat seyreltilmiş ve inversiyonda 2 kat seyreltilmiş ise)

Örneğin; durultma aşamasında 25 mL alınan meyve suyu örneği 250 mL' ye seyreltilmiş ve daha sonra inversiyona tabi tutmak üzere seyreltilmiş örnekten 50 mL alınıp 100 mL' ye sulandırılmışsa ve toplam şeker analizinde titrasyon aşamasında 11 mL meyve suyu harcanmış ise ve faktör 55,6 olarak bulunmuş ise;

$$\text{Seyreltme} = (250/25) \times (100/50) = 20, \quad F = 55,6 \text{ mg}, \quad V = 11 \text{ mL}, \quad \text{Toplam şeker miktarı (mg/mL)} = \frac{55,6 \text{ mg} \times 20}{11 \text{ mL}}$$

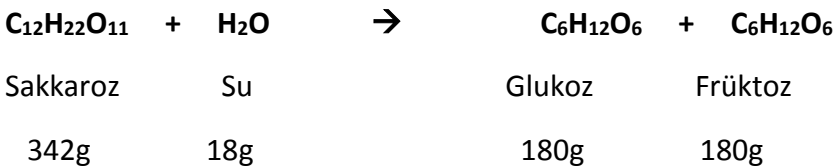
$$\text{Toplam şeker miktarı (mg/mL)} = 101,09 \text{ mg/mL}, \quad 101,09 \text{ (mg/mL)} = 101,09 \text{ (g/L)} = 10,109 \text{ (g/100 mL)} = \% 10,109,$$

Buna göre meyve suyunun toplam şeker içeriği litrede 101,09 gramdır.

Sakkaroz Miktarının Hesaplanması

Toplam şeker, örnekte bulunan indirgen şeker ile sakkarozun toplamından oluşmaktadır. Buna göre; toplam şeker analizi sonucu ile indirgen şeker analizi sonucu arasındaki fark sakkarozdan kaynaklanmaktadır. Toplam şeker analizinde sakkarozun parçalanması sonucu açığa çıkan glukoz ve früktozda tespit edilmektedir.

1 mol Sakkaroz (342 g/mol) parçalanırken yapısına dışarıdan 1 mol su (18 g/mol) alır ve sonuçta 1 mol glukoz (180 g/mol) ile 1 mol früktoz (180 g/mol) açığa çıkar.



360 g invert şeker (glukoz + früktoz), 342 g sakkarozdan meydana gelmektedir. Buna göre 100 g invert şeker, 95 g sakkarozdan meydana gelir. Dolayısı ile invert şeker miktarından sakkaroz miktarını hesaplamak için 0,95 katsayısı kullanılır.

$$\text{İnvert şeker} \times 0,95 = \text{Sakkaroz},$$

$$\text{Sakkaroz} = (\text{Toplam Şeker} - \text{İndirgen Şeker}) \times 0,95$$