

1 Kwasowa hydroliza skrobi

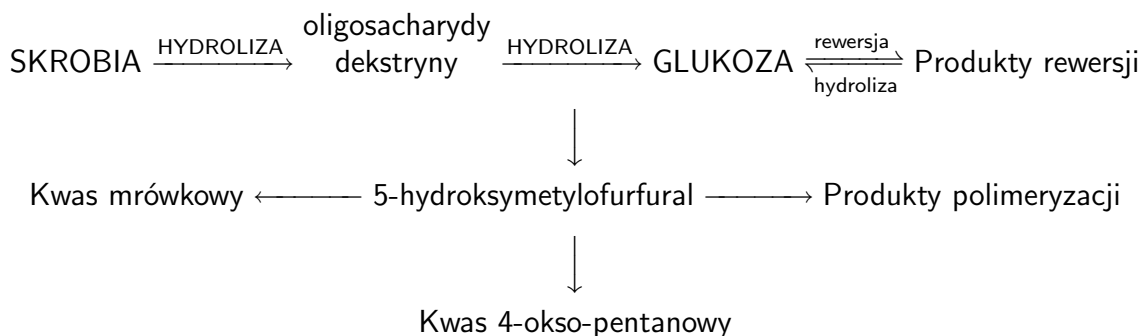
1.1 Wstęp

Skrobia, jako w pełni odtwarzalny materiał biologiczny zyskuje coraz większe znaczenie przemysłowe, i to zarówno w szeroko rozumianej technologii żywności i żywienia jak i w tzw. zastosowaniach nieżywnościowych. Stosunkowo niewielkie zastosowanie (ok. 3%) ma tzw. skrobia natywna, wydzielona z materiału pochodzenia roślinnego i nie poddana żadnym dodatkowym modyfikacjom. Pozostała część otrzymywanego materiału jest przetwarzana różnymi metodami:

- fizycznymi,
- chemicznymi,
- biologicznymi
- na drodze kombinacji kilku procesów (na przykład hydroliza kwasowo-enzymatyczna).

Skrobia, jako biopolimer zbudowany z powtarzających się jednostek glukozowych ulega, podobnie jak dwucukry i inne oligosacharydy, reakcjom hydrolizy. Pod nazwą tą rozumie się rozpad wiązania glikozydowego w środowisku wodnym w obecności katalizatorów kwasowych (hydroliza kwasowa) lub enzymatycznych (hydroliza enzymatyczna), połączony dodatkowo z przyłączeniem cząsteczki wody do każdego zhydrolizowanego wiązania. Reakcja hydrolizy kwasowej skrobi prowadzi do jej depolimeryzacji z utworzeniem D-glukozy oraz wytworzeniem szerokiej grupy produktów pośrednich zawierających więcej niż jedną cząsteczkę glukozy (disacharydy np. maltoza, dekstryny itp.). Bardziej podatny na proces hydrolizy jest polimer nierozgałęziony, a więc amyloza.

Proces hydrolizy jest reakcją stopniową. W jej pierwszym etapie zachodzi rozpad wiązań wodorowych pomiędzy poszczególnymi łańcuchami polimeru połączony ze wstępną depolimeryzacją. Powoduje to zwiększenie rozpuszczalności polimeru, a co za tym idzie, znaczne obniżenie lepkości. Zainicjowany w ten sposób proces zaczyna przebiegać coraz szybciej z wytworzeniem produktów pośrednich o zróżnicowanej długości łańcuchów czyli dekstryn. Wielkość oraz morfologia dekstryn wynika przede wszystkim z faktu, że procesowi hydrolizy ulegają zarówno



Rysunek 1: Reakcje chemiczne zachodzące w trakcie kwasowej hydrolizy skrobi.

cząsteczki amylozy jak i amylopektyny. W miarę wzrostu stężenia glukozy w mieszaninie reakcyjnej, pod wpływem kationów wodorowych, zaczynają zachodzić także różnego rodzaju reakcje wtórne i uboczne, niekorzystnie wpływające na proces hydrolizy. Wśród nich niewątpliwie najważniejsze to rewर्सja oraz tworzenie 5-hydroksymetylofurfuralu wraz z produktami jego rozkładu lub polimeryzacji (Rysunek 1). Szybkość procesu hydrolizy zależna jest przede wszystkim od stężenia czynnika katalizującego (kwasu) oraz temperatury procesu. Prawdopodobnie czynnikiem wpływającym na globalną szybkość hydrolizy jest też budowa, a szczególnie wielkość ziarenek skrobiowych.

1.2 Mechanizm procesu hydrolizy kwasowej

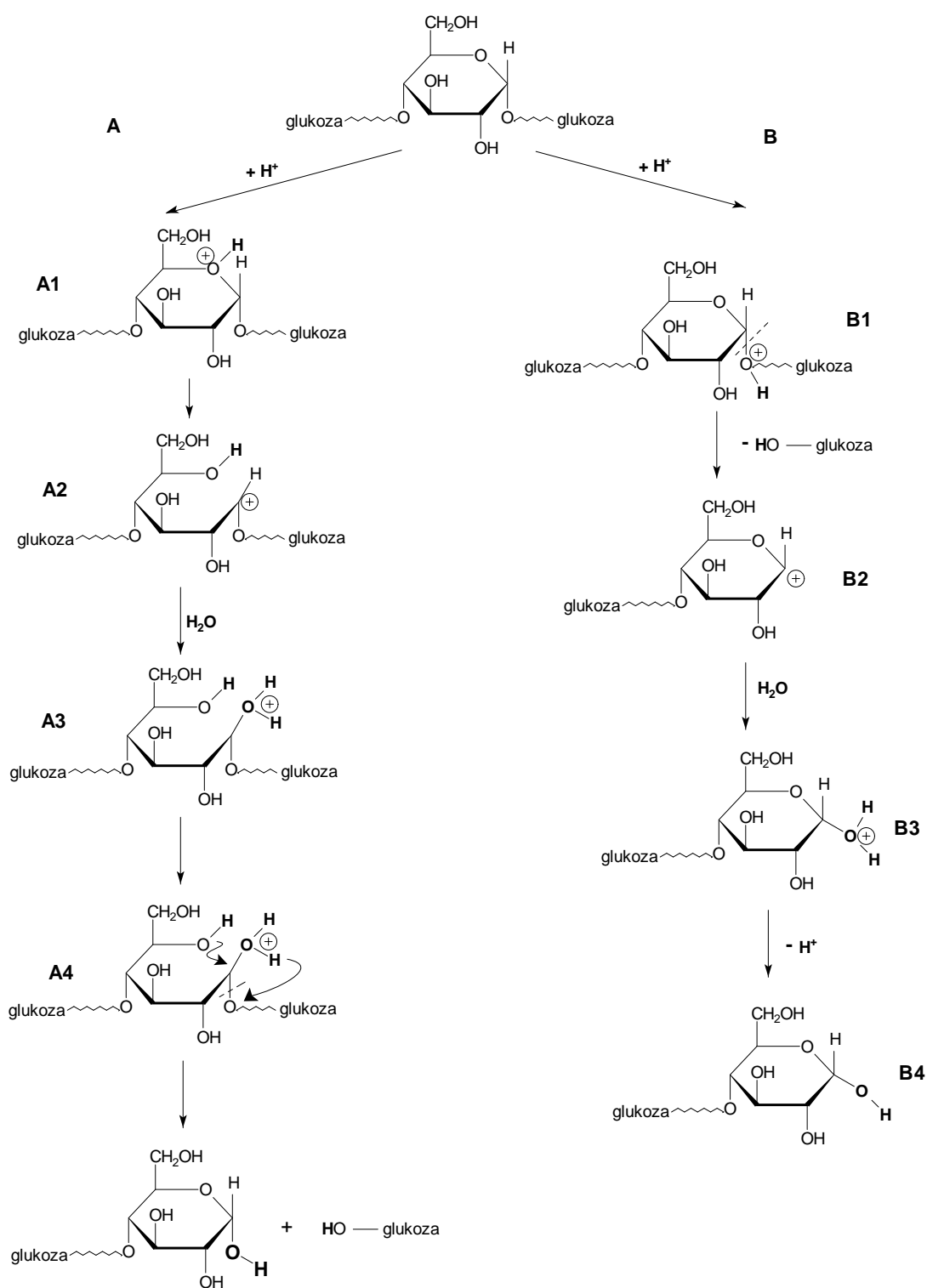
W sensie samego mechanizmu reakcji chemicznej proces hydrolizy przebiega dwutorowo (Rysunek 2):

- **Ścieżka A:**

Protonowanie tlenu pierścienia glukopiranozowego (A1) powoduje jego rozpad z wytworzeniem karbokationu na węglu C-1 (A2). W takiej sytuacji do karbokationu przyłącza się cząsteczka wody (A3). Przesunięcie ładunków w obrębie otrzymanego kompleksu (A4) powoduje, z jednej strony, ponowne zamknięcie pierścienia, a z drugiej odszczerpienie, zarówno kationu wodorowego, jak i cząsteczki glukozy (lub fragmentu łańcucha polimerowego w zależności od lokalizacji procesu w cząsteczce polimeru).

- **Ścieżka B:**

Reakcja rozpoczyna się protonowaniem mostkowego atomu tlenu przy wiązaniu α -1,4-



Rysunek 2: Mechanizm hydrolizy kwasowej skrobi.

glikozydowym (B1). Przeniesienie ładunku na ten atom umożliwia rozerwanie wiązania glikozydowego i rozszczepienie łańcucha polimeru na dwa krótsze, lub odszczepienie cząsteczki glukozy, jeśli reakcja ma miejsce na końcu łańcucha. Po rozpadzie łańcucha na pozostałej jego części odtworzony zostaje karbokation (B2) umożliwiający w kolejnym etapie przyłączenie cząsteczki wody (B3). Odszczepienie od tak utworzonego kationu jonu H^+ umożliwia wytworzenie na węglu C-1 stabilnej i trwałej grupy hydroksylowej (B4).

1.3 Analityczne metody kontroli procesu hydrolizy

Proces kwasowej hydrolizy skrobi powoduje zmniejszenie masy cząsteczkowej, lepkości oraz przede wszystkim struktury chemicznej węglowodanów w próbce poddanej tej przemianie. Wykorzystując zmiany tych właściwości, można kontrolować przebieg hydrolizy na kilka sposobów:

- **Badanie zmian redukcyjności:** Zarówno amyloza jak i amylopektyna zawierają niewielkie ilości wolnych grup hydroksylowych o charakterze półacetalowym (jedna wolna grupa na pojedynczą makrocząsteczkę). Produkty całkowitej hydrolizy cząsteczki skrobi składają się tylko i wyłącznie z cząsteczek glukozy, z których każda posiada wolną grupę półacetalową podatną na reakcje redoks.

Jeśli więc, na przykład, cząsteczka skrobi wykazuje stopień polimeryzacji 500 (składa się z 500 jednostek anhydroglukozowych) to po całkowitej hydrolizie w środowisku reakcyjnym znajdzie się 500 wolnych cząsteczek glukozy, a więc 500 wolnych grup hydroksylowych o charakterze półacetalowym. W przypadku hydrolizy niecałkowitej zachodzącej do stadium dekstryn liczba grup półacetalowych będzie mieścić się w zakresie 1-500, w zależności od stopnia hydrolizy (scukrzenia).

W celu ujednoczenia pomiaru redukcyjności wprowadza się tzw. równoważnik glukozowy (ang. Dextrose Equivalent; DE) jako ilość wiązań glikozydowych, które uległy hydrolizie (oznaczonych na drodze określenia zmian redukcyjności) do całkowitej ilości wiązań glikozydowych obecnych w 100g materiału (skrobi) wyjściowego, co ilustruje Równanie 1. Dla uproszczenia zależność tą oblicza się najczęściej korzystając z Równania 2.

$$DE = \frac{w.h.}{w.c} \cdot 100\% \quad (1)$$

$$DE = \frac{m.g.}{s.m.s} \cdot 100\% \quad (2)$$

gdzie:

- w.h. - ilość zhydrolizowanych wiązań glikozydowych,
- w.c. - całkowita ilość wiązań glikozydowych obecna w skrobi wyjściowej,
- m.g. - masa glukozy określona na podstawie redukcijności hydrolizatu,
- s.m.s. - masa skrobi poddana hydrolizie w przeliczeniu na suchą masę.

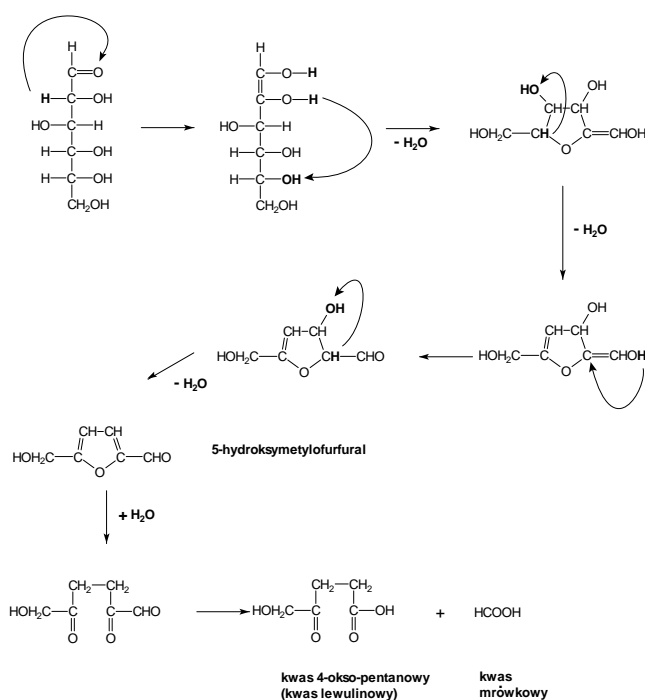
Oznaczenie ilości substancji redukujących z reguły bazuje na zastosowaniu zasadowego roztworu soli miedzi (II) jako środka utleniającego. Różnice pomiędzy poszczególnymi metodami wynikają zaś głównie z ilościowego oznaczenia wytrąconego po reakcji Cu_2O .

- **Próba jodowa:** Oznaczenie z zastosowaniem próby jodowej wynika ze zdolności do tworzenia przez skrobię różnobarwnych kompleksów z jodem, w zależności od stopnia jej polimeryzacji. W początkowej fazie hydrolizy związki wysokocząsteczkowe (tzw. amylodekstryny) barwią roztwór jodu na niebieskofioletowo. Głębsza hydroliza, a więc wytworzenie produktów o niższej masie cząsteczkowej (tzw. erytrodekstryny), daje kompleksy barwy czerwonej. Końcowe produkty hydrolizy, tzw. achrodekstryny oraz maltodekstryny, nie dają barwnych reakcji z jodem podobnie jak sama glukoza.
- **Badania zmian rozpuszczalności w alkoholu:** Badania tego typu opierają się na wzrastającej, wraz z postępem hydrolizy, rozpuszczalności produktów rozpadu. Podczas gdy skrobia niezhydrolizowana wykazuje w roztworach alkoholowych zmętnienie oraz wypadanie z roztworu, to produkty jej rozkładu są lepiej rozpuszczalne w alkoholu (mniejsze zmętnienie) lub tak, jak to jest w przypadku glukozy i większości oligosacharydów, są w tym rozpuszczalniku całkowicie rozpuszczalne.
- **Badania skęcalności właściwej:** Rozpuszczona skrobia wykazuje skęcalność właściwą $+200^\circ$, podczas gdy czysta glukoza w roztworze skęca płaszczyznę światła spolaryzowanego o kąt $+52,5^\circ$. Powstające w trakcie hydrolizy pośrednie produkty rozkładu skrobi wykazują również pośrednią wartość skęcalności, co umożliwia polarymetryczne monitorowanie procesu hydrolizy.

1.4 Produkty uboczne

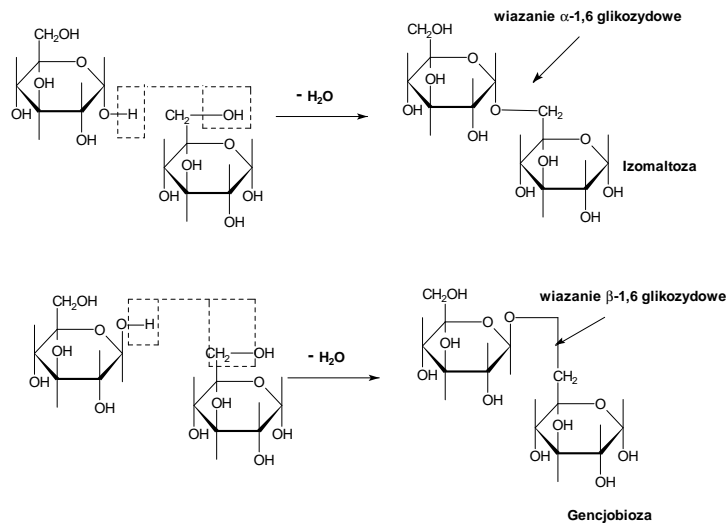
W toku reakcji hydrolizy powstają cząsteczki o coraz niższym stopniu polimeryzacji (małsie cząsteczkowej). Hydroliza tych połączeń zachodzi szybciej niż dla wyjściowego materiału skrobiowego, tak więc po stosunkowo niedługim czasie w mieszaninie reakcyjnej obecne są już znaczne ilości trimerów, dimerów a przede wszystkim glukozy. Fakt ten, implikuje niestety zainicjowanie, już na wstępnym stadium hydrolizy, niepożądanych procesów ubocznych z udziałem glukozy:

- **Rozpad glukozy:** Pod wpływem kationów wodorowych, a więc w środowisku kwaśnym,



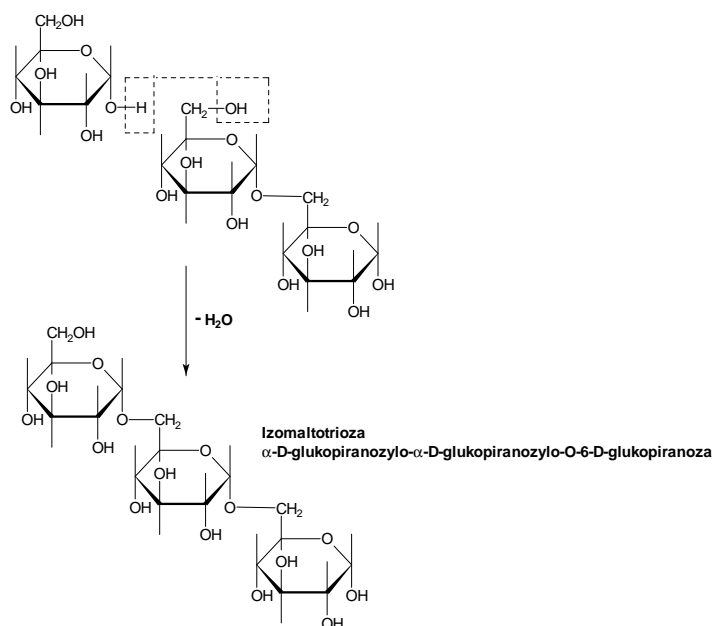
Rysunek 3: Mechanizm reakcji z udziałem 5-hydroksymetylofurfuralu.

podobnie jak ma to miejsce przy głównej reakcji hydrolizy, glukoza ulega przegrupowaniu do 5-hydroksymetylofurfuralu (Rysunek 3). W warunkach reakcji, związek ten może, bądź to ulegać procesom polimeryzacji (z wytworzeniem smolistych trudno usuwalnych związków makrocząsteczkowych) lub dalszej degradacji z wytworzeniem kwasu 4-okso-pentanowego (kwas lewulinowy) oraz toksycznego kwasu mrówkowego. Reakcji powstawania 5-hydroksymetylofurfuralu sprzyja wysoka temperatura (ok. 130°C), niskie pH (a więc pośrednio wysokie stężenie kwasu) oraz wysokie stężenie glukozy.



Rysunek 4: Reakcja rewersji, powstawanie dimerów glukozy

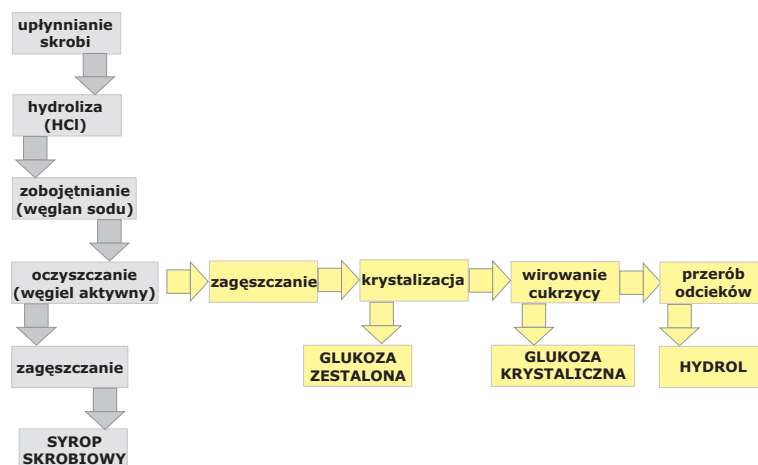
- Rewersja glukozy:** Jony wodorowe katalizować mogą także reakcje kondensacji dwóch (Rysunek 4) lub kilku (Rysunek 5) cząsteczek glukozy. Zjawisko to znane pod nazwą rewersji zachodzi głównie przy większych stężeniach glukozy i w przypadku otrzymywania syropów wysokoscukrzonych jest wysoce niekorzystne. Rewersja może spowodować, że w czasie hydrolizy, prowadzonej na skalę techniczną, wydajność glukozy spada z wartości teoretycznej 110kg ze 100kg skrobi do wartości 90kg. Głównymi oligosacharydami powstającymi w trakcie rewersji są: izomaltoza, gencjobjoza, soforoza, trehaloza i celebjoza. Dodatkowo w procesie tym powstają bardziej odporne na proces hydrolizy wiązania α- i β- 1,6-glikozydowe. W trakcie rewersji powstawać mogą także oligosacharydy, w których jednostki glukozy połączone są wiązaniami 1,1-, 1,2-, 1,3- glikozydowymi.
- Reakcja Maillarda:** Procesowi hydrolizy może towarzyszyć tzw. reakcja Maillarda prowadząca poprzez stadium zasad Schiff'a do barwnych produktów nazywanych melanoamidami. Reakcja Maillarda przebiega między cząsteczką cukru (np. glukozą) oraz aminokwasu. Zwiększona zawartość aminokwasów wynikająca, na przykład z niedokładnego, wstępnego oczyszczenia skrobi, sprzyja temu procesowi, niekorzystnie wpływając na efektywność hydrolizy ze względu na straty glukozy oraz powstawanie trudno usuwalnych barwnych produktów.



Rysunek 5: Rewersja glukozy, trimeryzacja

1.5 Przemysłowy proces hydrolizy skrobi

W praktyce przemysłowej proces hydrolizy kwasowej stosuje się głównie do produkcji syropów skrobiowych i dekstryn (Rysunek 6). Znacznie rzadziej metoda ta służy do produkcji glukozy gdzie wyparta została przez hydrolizę enzymatyczną. Podstawowym surowcem do produkcji syropów jest tzw. krochmal zielony czyli skrobia zawierająca ok. 50% wody. Ze względu na dłuższy okres przechowywania surowca i możliwość zachodzenia procesów gnilnych i fermentacyjnych surowiec oczyszcza się i dezynfekuje. Oczyszczony surowiec poddaje się następnie konwersji w środowisku kwaśnym oraz podwyższonej temperaturze. Po osiągnięciu wymaganej wielkości równoważnika glukozowego proces hydrolizy przerywa się przez zubożenie, a mieszaninę reakcyjną oczyszcza, filtruje i zagęszcza. W zależności od stopnia scukrzenia, a więc wartości równoważnika glukozowego, rozróżnia się syropy: niskoscukrzony (DE 30-38), normalnie scukrzony (DE 38-45), średnioscukrzony (DE 45-50) i wysokoscukrzony (DE 50-55). Podobną metodę można stosować do produkcji glukozy krystalicznej. Reakcję hydrolizy prowadzi się wtedy przy niższym stężeniu mlecza skrobiowego. W przypadku produkcji glukozy reakcję prowadzi się aż do osiągnięcia wartości DE na poziomie 92. W opisywanym procesie, oprócz tzw. glukozy zestalonej oraz glukozy krystalicznej, uzyskuje się także, jako produkt



Rysunek 6: Przemysłowy proces hydrolizy skrobi

odpadowy, hydrol. Wariacją metody kwasowej otrzymywania glukozy jest proces kwasowo-enzymatyczny, w którym po początkowej hydrolizie surowca obniża się temperaturę procesu, zobojętnia mieszaninę reakcyjną oraz dodaje enzym glukoamylazę w celu jej scukrzenia metodą enzymatyczną.

1.6 Ćwiczenia laboratoryjne

1.6.1 Przygotowanie odczynników

- **roztwór HCl:** roztwory o stężeniu 5%, 10%, 15% i 20% (w zależności od grupy) przygotować w ilości po 250ml na grupę używając stężony kwas solny (35%) o gęstości $\rho_{HCl} = 1.18\text{g/ml}$. Obliczenia dotyczące rozcieńczania umieścić w sprawozdaniu!
- **roztwór NaOH:** Roztwór sporządzić w ilości 250ml przy użyciu stałego NaOH. Obliczenia dotyczące rozcieńczania umieścić w sprawozdaniu!
- **roztwór Fehlinga 1:** Odważyć 7g uwodnionego siarczanu (VI) miedzi (II). Rozpuścić w niewielkiej ilości wody destylowanej. Przenieść ilościowo do kolby miarowej na 100ml i dopełnić wodą destylowaną do kreski
- **roztwór Fehlinga 2:** Odważyć 35g winianu sodowo potasowego. Rozpuścić w niewielkiej ilości wody destylowanej (maksymalnie 25ml). Przenieść ilościowo do kolby miarowej na 100ml. Następnie odważyć 10g NaOH, rozpuścić w około 50ml wody destylowanej.

Przenieść ilościowo do kolby miarowej na 100ml. Całość dopełnić wodą destylowaną do kreski

- **roztwór glukozy:** Roztwór sporządzić z odpowiedniej naważki w ilości 100ml przy użyciu glukozy krystalicznej. Obliczenia dotyczące rozcieńczania umieścić w sprawozdaniu!

1.6.2 Oznaczenie suchej masy

Do wysuszonych do stałej masy i zważonych naczynek wagowych odważyć ok. 0,1g skrobi z dokładnością do 0,0001g. Naczynka z próbkami suszyć w temperaturze 130°C przez 1godz. Następnie przenieść próbkę do eksykatora i po ostygnięciu ponownie zważyć. Z różnicy mas próbki przed i po suszeniu obliczyć zawartość suchej substancji. Wynik przedstawić z dokładnością do 0,1% wraz z analizą statystyczną.

1.6.3 Przeprowadzenie hydrolizy

Na wadze analitycznej odważyć 2,5g skrobi w przeliczeniu na suchą masę (założyć początkową zawartość wody równą 20%, a po określeniu suchej masy uwzględnić odpowiednią poprawkę). Skrobię przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 250cm³ i uzupełnić do kreski wodą destylowaną. Zawiesinę dobrze wymieszać i pobrać z niej 10 próbek po 25cm³ każda. Próbki umieścić w kolbkach Erlenmayera o pojemności 100cm³. Do 9 próbek dodać 12,5cm³ przygotowanego roztworu kwasu solnego (stężenia 5%, 10%, 15% lub 20% w zależności od grupy). Próbką 10 stanowi próbę zerową. Kolbki kolejno umieścić w łaźni wodnej o temperaturze 90°C na czas: 2, 3, 4, 6, 8, 15, 20, 30 i 40min. Po wyjęciu z łaźni, w celu zatrzymania reakcji hydrolizy, kolbki umieszczać w łaźni wodnej wypełnionej zimną wodą. Próbkę zerową (nie zawierającą kwasu) ogrzewać przez okres 40min, schłodzić a po oziębieniu dodać do niej 12,5cm³ kwasu. Ochłodzone próbki natychmiast zobojętnić 30% NaOH (wobec papierka uniwersalnego) i umieścić w kolbach miarowych o pojemności 100cm³. Zawartość kolbek uzupełnić do kreski wodą destylowaną, wymieszać.

1.6.4 Oznaczenie redukcijności hydrolizatu

1.6.5 Wykonanie krzywej wzorcowej

W 10 probówkach odmierzyć 5cm^3 mieszaniny płynów Fehlinga I i II, po czym dodać od 1 do 10cm^3 roztworu glukozy o stężeniu $2,78 \cdot 10^{-3}\text{mol/dm}^3$ i uzupełnić wodą do 25cm^3 . Po wymieszaniu zawartość ogrzewać na wrzącej łaźni wodnej przez 5min i przelać do probówek wirówkowych i odwirować (2min, 5000rpm). Przeprowadzić pomiar spektrofotometryczny, stosując światło o długości fali $\lambda=640\text{nm}$, używając jako odniesienia wody destylowanej. Wykreślić krzywą wzorcową, obliczyć metodą regresji liniowej równanie tej krzywej ($C_{glukozy} = f(Abs.)$) oraz podstawowe parametry statystyczne.

1.6.6 Wykonanie oznaczenia

Z próbek otrzymanych hydrolizatów pobrać do kolbek po 10cm^3 , dodać 5cm^3 mieszaniny płynów Fehlinga I i II i uzupełnić wodą destylowaną do 25cm^3 . Po wymieszaniu zawartość ogrzewać na wrzącej łaźni wodnej przez czas 5min, przenieść do probówek wirówkowych i odwirować (2min, 5000rpm). Przeprowadzić pomiar spektrofotometryczny jak opisano to dla krzywej wzorcowej. Określić zawartość glukozy i na jej podstawie wartość DE dla kolejnych próbek i sporządzić wykres jego wartości w zależności od czasu.

1.6.7 Sprawozdanie

Sprawozdanie powinno zawierać zwięzły opis wykonania ćwiczenia wraz z uwagami, wyniki badań, obliczenia, krzywą wzorcową, wykres zależności DE od czasu. Wszystkie otrzymane dane należy skomentować i wyciągnąć wnioski. Porównać także dynamikę zmian DE w zależności od stężenia użytego kwasu.