Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea

ELIKAGAIEN KIMIKA ETA BIOKIMIKA:

LABORATEGIKO PRAKTIKEN GIDALIBURUA

Egileak

ENCARNACIÓN GOICOECHEA OSÉS
MARÍA JOSÉ MANZANOS ARNAIZ
BÁRBARA NIEVA ECHEVARRÍA

EUSKARA, KULTURA ETA NAZIOARTEKOTZEAREN ARLOKO ERREKTOREORDETZA

Argitalpen honek UPV/EHUko Euskara, Kultura eta Nazioartekotzearen arloko Errektoreordetzaren laguntza izan du

ISSN 2603-8900

Laborategiko praktiken gidaliburuaren testuingurua

Elikagaien Kimika eta Biokimika irakasgaia Giza Nutrizioko eta Dietetikako Graduko nahitaezko ikasgaia da, zeinak 6 ECTS kreditu baititu eta 1. mailan ikasten baita. Farmaziako eta Giza Nutrizioko eta Dietetikako Gradu Bikoitzaren ikasleek 2. mailan ikasten dute irakasgai hau. Irakasgai honen edukiak oso estu lotuta daude Graduko honako bi irakasgai hauekin: «Bromatologia» eta «Sukaldaritza Teknologia eta Elikagaien Prozesatzea» (2. mailakoak).

Elikagaiek konposizio kimiko eta biokimiko oso konplexua dute, osagai kimiko eta biokimiko ugari identifikatzen zaizkie; hala nola, ura, karbohidratoak, lipidoak, proteinak, bitaminak eta mineralak, pigmentuak eta elikagaien aroma eta zaporearen substantzia-erantzuleak, besteak beste. Hori dela eta, ikasgaiaren helburu orokorra da ikasleek elikagai-osagaien estruktura kimikoa, propietate fisiko-kimikoak eta funtzionaltasuna ikastea. Era berean, elikagaien elaborazio- eta kontserbazio-prozesuetan zehar gerta daitezkeen erreakzio kimiko nagusiak eta horiek osagaietan duten eragina ere aztertzen dira. Lortuko diren oinarrizko ezagutza horiek funtsezkoak dira elikagaien prozesatzeak propietate nutrizionaletan eta sentsorialetan eragiten dituen aldaketak ulertzeko eta aurreikusi ahal izateko. Izan ere, elikagaiak eta osasunaren arteko erlazioa kontuan izanda, etorkizuneko dietista-nutrizionistarentzat ezinbestekoa da elikagaien kalitate nutrizionala eta sentsoriala baldintzatuko duten aldaketak aurreikustea, kasu bakoitzean ahalik eta dieta egokiena diseinatzeko.

Laborategiko praktikei dagokienez, zenbait elikagai-osagairen propietate eta jokaera batzuk aztertzen dira teknika analitiko desberdinei esker.

AURKIBIDEA

Orrialde-zenbakia

1. PRAKTIKA: OLIO JANGARRIEN KARAKTERIZAZIOA 1
1.1. Sarrera 1
1.2. Helburuak 5
1.3. Prozedura esperimentala 6
1.3.1. Olio baten gantz-azidoen erauzketa 6
1.3.2. Olio baten gantz-azidoen batez besteko pisu molekularraren determinazioa 11
1.3.3. Zenbait olio jangarriren errefrakzio-indizearen neurketa 13
1.4. Emaitzak eta erantzun behar diren galderak.....15
1.5. Bibliografia.....17

2. PRAKTIKA: ARRAUTZA-ZURINGOKO PROTEINEN AZTERKETA.....18
2.1. Sarrera 18
2.2. Helburuak 21
2.3. Prozedura esperimentala 22
2.3.1. Arrautza-zuringoko proteinen bereizketa: indar ionikoaren bidezko hauspeatzea 22
2.3.2. Proteinen kalibrazio-zuzenaren prestaketa.....25
2.3.3. Bereizitako arrautza-zuringoko proteinen kuantifikazioa 30
2.4. Emaitzak eta erantzun behar diren galderak.....33
2.5. Bibliografia.....36

3. PRAKTIKA: ZIAZERBETAKO KLOROFILEN EGONKORTASUN TERMIKOA ..37
3.1. Sarrera 37
3.2. Helburuak 42
3.3. Prozedura esperimentala 43
3.3.1. Ziazerben aurre-prestaketa eta tratamendu termikoa 43
3.3.2. Klorofilen eta horien deribatuen (feofitinak) erauzketa.....44
3.3.3. Klorofilen eta horien deribatuen (feofitinak) kuantifikazioa 46
3.4. Emaitzak eta erantzun behar diren galderak.....48
3.5. Bibliografia.....51

1. PRAKTIKA:
OLIO JANGARRIEN KARAKTERIZAZIOA

1.1. Sarrera

Olio jangarrien osagai nagusiak lipidoak dira. Lipidoak honela definitzen dira: «*hidrosolugarriak ez diren konposatuak eta disolbatzaile ez-polarretan (hexanoa, kloroformoa, pentanoa, eter etilikoa, eta abar) solugarriak direnak*». Oso egitura kimiko desberdinak erakusten dituzte, zeinak bi talde handitan sailkatzen baitira:

1. Lipido saponifikagarriak, zeinen egituran azilo talde (esterifikatutako gantz-azido) bat, bi edo hiru baitaude. Esate baterako, mono-, di- eta triglizeridoak eta fosfolipidoak. Olioetan dauden lipidoen artean ugarienak dira, bereziki triglizeridoak (~% 99,8).

2. Lipido ez-saponifikagarriak, zeinen egituran azilo talderik ez baitago. Olioetan kantitate baxuetan daude (~% 0,2-1,5).

Lipidoek ezinbesteko funtzioak betetzen dituzte. Hau da, batzuek elikagaiei trinkotasuna ematen diete edota elikagaien propietate sentsorialetan eragina izan dezakete, hala nola usainean eta testuran. Gainera, propietate nutritibo interesgarriak ere izan ditzakete; adibidez, lipido saponifikagarrietan gantz-azido esentzialak aurki daitezke. Hori dela eta, ezinbestekoa da olio jangarriak karakterizatzea, eta praktika honetan hainbat olioren gantz-azidoen batez besteko pisu molekularra eta errefrakzio-indizea (EI) zehazten dira.

Elikagai-lipido saponifikagarrien azilo taldeak (gantz-azidoak)

Gantzak, olioak eta haien eratorriak hainbat gantz-azidoren iturriak dira. Gantz-azidoak asegabetasun-mailaren (**1.1. irudia**) edo kate alifatikoaren luzeraren arabera (**1.2. irudia**) sailkatu ohi dira.

gantz-azido aseak
(lotura bikoitzik gabe)

(4:0) butirikoa
(6:0) kaproikoa
(8:0) kaprilikoa
(10:0) kaprikoa
(12:0) laurikoa
(14:0) miristikoa
(16:0) palmitikoa
(18:0) estearikoa
(20:0) arakidikoa
(22:0) behenikoa
(24:0) lignozerikoa

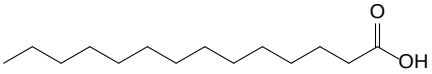
gantz-azido asegabeak
(lotura bikoitzak)

monoasegabeak
(1 lotura bikoitz)

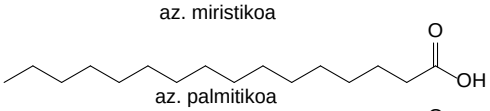
(16:1) palmitoleikoa
(18:1) oleikoa
(18:1) elaidikoa
(18:1) bazenikoa
(20:1) gadoleikoa
(22:1) eruzikoa

poliasegabeak
(2-6 lotura bikoitz)

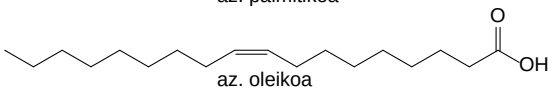
(18:2) linoleikoa
(18:3) α-linolenikoa
(18:3) γ-linolenikoa
(20:4) arakidonikoa
(20:5) eikosapentaenoikoa
(22:6) dokosahexaenoikoa



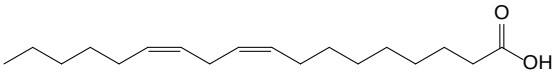
az. miristikoa



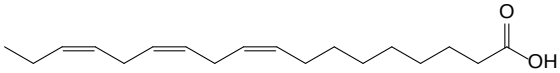
az. palmitikoa



az. oleikoa



az. linoleikoa



az. α-linoleikoa

1.1. irudia. Elikagai-lipidoen gantz-azidoen asegabetasun-mailaren araberako sailkapen estrukturala.

kate motza daukaten gantz-azidoak
(4 - 10 C atomo)

(4:0) butirikoa
(6:0) kaproikoa
(8:0) kaprilikoa
(10:0) kaprikoa

kate ertaina daukaten gantz-azidoak
(12 - 14 C atomo)

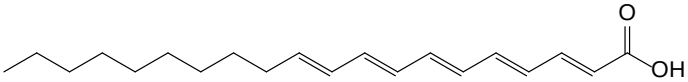
(12:0) laurikoa
(14:0) miristikoa

kate luzea daukaten gantz-azidoak
(16 - 18 C atomo)

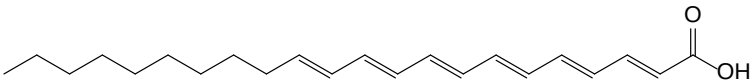
(16:0) palmitikoa
(16:1) palmitoleikoa
(18:0) estearikoa
(18:1) oleikoa
(18:1) elaidikoa
(18:1) bazenikoa
(18:2) linoleikoa
(18:3) α-linolenikoa
(18:3) γ-linolenikoa

kate oso luzea daukaten gantz-azidoak
(20 - 24 C atomo)

(20:0) arakidikoa
(20:1) gadoleikoa
(20:4) arakidonikoa
(20:5) eikosapentaenoikoa
(22:0) behenikoa
(22:1) eruzikoa
(22:6) dokosahexaenoikoa
(24:0) lignozerikoa



az. eikosapentaenoikoa (EPA)



az. dokosahexaenoikoa (DHA)

1.2. irudia. Elikagai-lipidoen gantz-azidoen kate alifatikoaren luzeraren araberako sailkapen estrukturala.

Olio eta gantz jangarrien konposizioa

Landare-jatorriko olio mota asko daude. Haien artean ekilore-olioa asko erabiltzen da hainbat elikagai prestatzerakoan. *Helianthus annuus* L. hazietatik ekoizten da, eta aberatsa da gantz-azido poliasegabeetan, batez ere azido linoleikotan. Aipatu behar da badagoela salgai azido oleiko proportzio altuko ekilore-olioa (> % 75 azido oleiko), genetikoki eraldatutako ekilore-hazietatik erauzita. Oliba-olioa oliba (*Olea europaea* L.) fruituaren mesokarpo ehunetik erauzten da. Olio mota hori oso zabala da: alde batetik, oliba-olio «birjinak» daude («extra-birjina», «birjina» eta «birjina arrunta»), olibetatik prozedura mekanikoen bidez bakarrik erauzita eta hainbat ezaugarri kimiko eta organoleptiko estandarizatu legez bete behar dituztenak, eta, bestetik, oliba-olio «finduak», fintze-prozesu baten bidez lortutakoak. Nahiz eta haien konposizioa aldakorra izan, oro har olio horietan azido oleikoa nagusitzen da (% 55-83). Soja-olioa soja-lekaletik (*Glycine max*) lortzen da, eta oso aberatsa da gantz-azido poliasegabeetan, hain zuzen ere azido linoleikotan (% 48-59) eta linolenikotan (% 4,5-11).

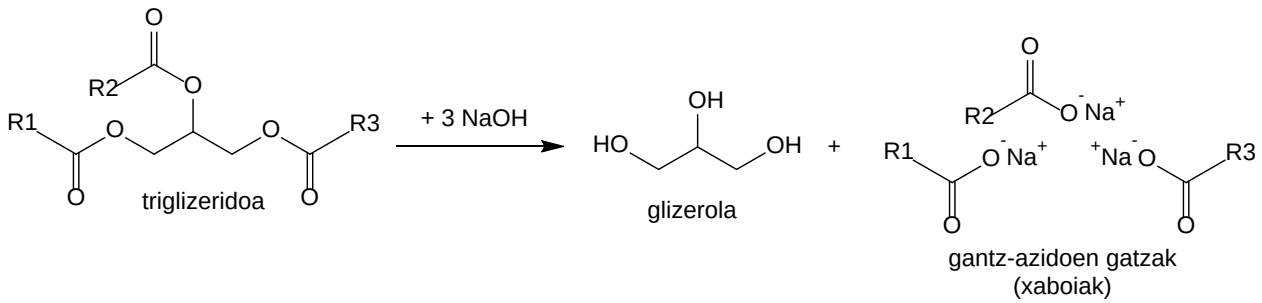
Aurrekoekin konparatuz, arrain-olioen gantz-azidoen konposizioa nahiko ezberdina da. Olio horiek gantz-azido mota ugari dituzte, eta aipatzekoak dira oso kate luzeko gantz-azido poliasegabeak (eikosapentaenoikoa eta dokosahexaenoikoa). Arrain-olioen artean ezagunena bakailao-gibelaren olioa da. Azkenik, badaude animalia-jatorriko beste hainbat gantz jangarri eta zenbait eratorri (adibidez, gurina), lehen aipatutako olioekin erkatuta, gantz-azido aseetan eduki handiagoa dutenak. Gantz horietan karbono atomo kopuru bakoitiko gantz-azido, *trans* gantz-azido eta gantz-azido konjugatuen kantitate txikiak aurki daitezke.

Olio jangarrien karakterizazioa

a) Gantz-azidoen batez besteko pisu molekularraren determinazioa

Olio bat karakterizatzeko aukera bat da bere gantz-azidoen batez besteko pisu molekularra determinatzea. Horretarako, lipido saponifikagarrietatik, batez ere

triglizeridoetatik, gantz-azidoak erauzi behar dira saponifikazio-erreakzioari esker (**1.3. irudia**). Ingurune alkalinoan azilo taldeak hidrolizatzen dira, eta askatutako gantz-azidoek basearekin (NaOH-arekin) erreakzionatuko dute xaboiak emateko (gatz sodikoak). Ondoren, hidrolisi azidoaren bidez, sortutako gatzetatik gantz-azidoak aska daitezke.



$[C_3H_5\,(OOC\,.\,R)_3 + 3\,NaOH \rightarrow C_3H_5\,(OH)_3 + 3\,NaOOC\,.\,R]$

1.3. irudia. Triglizeridoen saponifikazio-erreakzioa ingurune basikoan.

b) Errefrakzio-indizea

Olioen karakterizazio fisikoa ere posiblea da, adibidez errefrakzio-indizearen (EI) bidez. Neurketa hori argiak airean (hutsean) duen abiaduraren eta olioan zehar duen abiaduraren arteko erlazioa da. Olio baten EI balioak erlazioa dauka olioaren konposaketarekin eta purutasunarekin, lipidoen azilotaldeen konposizioaren mendekoa baita. Parametro hori oso erraza da neurtzen, eta adibidez erabilgarria da identitate ezezaguneko olioak azkar sailkatzeko, olioen zenbait gantz-azidoren edukia estimatzeko, eta baita elikagai-produktuetan lipidoen adulterazio posibleak detektatzeko ere. Laburbilduz, EI balioa zehaztuz, edozein olio motaren gaineko informazio erabilgarria lor daiteke.

1.1. taulan gantz-azido puru eta triglizerido sinple batzuen EI balioak erakusten dira (Bailey, 1979). Faktore guztien artean aipatzekoak dira, besteak beste, gantz-azidoen kate alifatikoaren luzera eta lotura bikoitzen kopurua: hau da, zenbat eta kate alifatiko luzeagoa eta asegabetasun-maila altuagoa izan, orduan eta EI balio handiagoa. Era berean, olioaren oxidazio-mailak ere eragina izan dezake EI balioan.

1.1. taula. Gantz-azido eta triglizerido sinple batzuen errefrakzio-indizea (60 ºC-an).

Gantz-azidoak	EI
kaprikoa (10:0)	1,4012
kapilikoa (8:0)	1,4125
kaproikoa (6:0)	1,4210
laurikoa (12:0)	1,4267
miristikoa (14:0)	1,4310
palmitikoa (16:0)	1,4347
estearikoa (18:0)	1,4375
oleikoa (18:1 *cis* 9)	1,4449
elaidikoa (18:1 *trans* 9)	1,4430
linoleikoa (18:2 *cis* 9,12)	1,4550
linolenikoa (18:3 *cis* 9,12,15)	1,4640

Triglizerido sinpleak	EI
trikaproina	1,4370
trilaurina	1,4402
trimiristina	1,4428
tripalmitina	1,4452
triestearina	1,4471
trioleina	1,4548
trilinoleina	1,4645
trilinolenina	1,4741

1.2. Helburuak

Praktika honen helburu nagusiak honako hauek dira:

- Ekilore-olio baten gantz-azidoak erauztea saponifikazio-erreakzio baten bidez, eta erauzketaren etekina kalkulatzea.
- Ekilore-olioaren gantz-azidoen batez besteko pisu molekularra zehaztea.
- Hainbat olio jangarriren errefrazio-indizeak neurtzea, eta, ondorioz, haien konposaketarekin erlazioak ezartzea.
- Olio jangarrien gaineko legediak ezarritako errefrakzio-indize tarteak bilatzea, eta laborategian neurtutakoekin erkatzea.
- Lortutako datu esperimentalak eta kalkulatutako amaierako emaitzak intrepretatzea, iturri bibliografiko fidagarrietan oinarrituz.

1.3. Prozedura esperimentala

1.3.1. Olio baten gantz-azidoen erauzketa

LAGINAK

- Ekilore-olioa

ERREAKTIBOAK

- Etanola (% 95)
- Sodio hidroxidoa (% 40)
- Azido klorhidrikoa (% 10)
- Ur destilatua

EKIPOAK

- Balantza granatarioa (ziurgabetasuna ± 0,1 g)
- Laborategiko kanpaia
- 2 x berogailu-plaka

MATERIALAK

-1 x 250 mL-ko matraze biribil
- 1 x 25 eta 1 x 250 mL-ko probeta
- 1 x 150 mL-ko Erlenmeyer matraze
- 4 x 3 eta 4 x 5 cm-ko diametroko inbutu
- 1 x errefluxuko hoztaile
- 1 x 500 eta 1 x 1000 mL-ko beroarekiko erresistenteak diren hauspeakin ontzi
- 1 x 20 cm-ko beirazko hagatxo
- 1 x 50 mL-ko hauspeakin-ontzi
- 0,5 - 5,0 pH-aren adierazlea
- Beroarekiko erresistenteak diren eskularruak
- Laborategiko trapuak
- 1 x 500 mL-ko dekantazio-inbutua eta euskarriak
- Pasteur pipetak eta gomazko tetinak

PROZEDURA

Atal honetan azaltzen den gantz-azidoen erauzketa osoa laborategiko kanpai barruan egin behar da. Gainera, derrigorrezkoa da laborategiko betaurrekoak erabiltzea.

1. Balantza granatarioan 15 g ekilore-olio pisatu 250 mL-ko matraze biribilean eta *Pasteur* pipeta erabiliz.

2. Probeta erabiliz, gehitu matrazean 150 mL etanol % 95 eta 15 mL sodio hidroxido % 40.

3. Saponifikazio-erreakzioa egiteko, **1.4. irudian** ikusten den muntaia antolatu behar da:
   - 1L-ko hauspeakin-ontzi bat txorrotako urez bete.
   - Hauspeakin-ontzia berogailu-plaka txikian jarri ura berotu arte (urak irakin behar du, baina ez gehiegi).
   - Matrazea ur berotan sartu, eta egokitu errefluxuko hoztailearekin.
   - Ireki pixka bat errefluxuko hoztailearen ur-giltza, erreakzioan zehar ur-isuri txikia mantentzeko.
   - Matrazea horrela berotu behar da 30 minutuz.

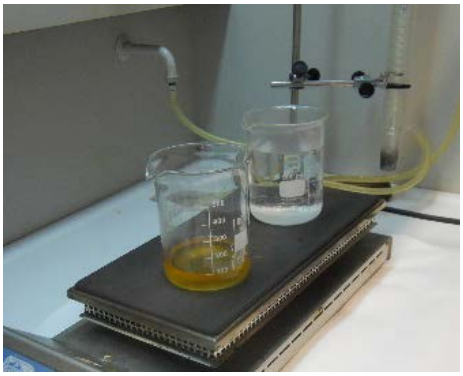
   Oharra: erreakzioan zehar muntaia etengabe zaindu behar da; bitartean, hasi egiten praktika honetako 1.3.3. atala.

1.4. irudia. Ekilore-olioaren saponifikazio-erreakzioa eragiteko muntaia.

4. Erreakzio-denbora (30 min) igaro ondoren, matrazea muntaiatik kendu, eskularru erresistenteak erabiliz.

5. Bero dagoen bitartean, eta laginean hauspeakinik osatu gabe, eraman sortutako gantz-azidoen sodio-xaboien soluzioa 500 mL-ko hauspeakin-ontzira.

6. Kanpai barruan, eta berogailu-plakaren gainean, soluzioa konzentratzeko asmoz laginaren alkohola lurrundu 50-100 mL-ko bolumena lortu arte (**1.5. irudia**). Aldi berean, gehitu 300 mL ur destilatu beste 500 mL-ko hauspeakin-ontzi batera, eta jarri berotzen berogailu-plakan.



1.5. irudia. Ingurune-soluziotik etanolaren lurrunketa eta ur destilatuaren beroketa.

7. Lortutako gantz-azidoen soluzio kontzentratua berogailu-plakatik kendu.

8. Soluzio kontzentratuari 300 mL ur destilatu bero (irakin gabe) gehitu, eta jarraitu laginaren erreakzio-ingurunea beroan mantentzen hauspeakinik osatzea ekiditeko.

9. Soluzioa azidotu pH oso azidoa lortu arte (1 edo 2 balioak). Horretarako, 25 mL-ko probeta erabiliz, gehitu pixkanaka-pixkanaka azido klorhidrikoa % 10, eta kontrolatu pH-a 0,5-5,0 pH-adierazlea erabiliz (**1.6.a irudia**). Idatzi gehitutako bolumena. Azidifikazioak gantz-azidoen xaboien (sodio gatzen) hidrolisia eragiten du, eta, ondorioz, gantz-azido askeen agregatuak (zurixkak eta erdisolidoak) sortzen dira.

10. Gantz-azido askeen agregatu horiek orain likidotu behar dira irabiaketaren bidez. Horretarako, jarri ontzia berogailu-plakaren gainean eskularruak erabiliz; leunki berotu (irakin gabe) eta etengabe irabiatu, beirazko hagatxoa erabiliz. Goialdean, geruza likido mehea, transluzidoa eta kolore horixkakoa sortuko da (**1.6.b irudia**).

a) b)

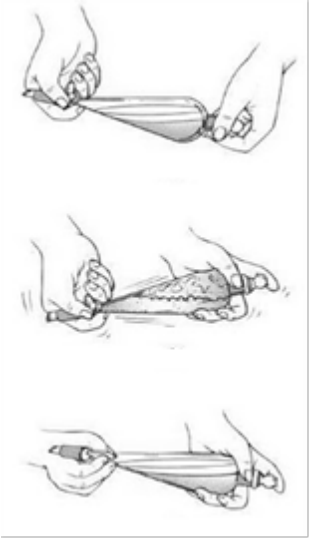
1.6. irudia: a) Ingurunea azidotzea eta b) gantz-azidoen estraktua likidotzea.

11. Sortutako bi faseak (urtsua eta koipetsua, gantz-azidoak dituena) bereizi behar dira, 500 mL-ko dekantazio-inbutua erabiliz (begiratu **1.7. irudia,** eta irakurri dagozkion argibideak).

1.7. irudia. Ekilore-olioaren gantz-azidoen soluzioa bereiztea, eta segidako uraz garbiketa-urratsak.

Dekantazio-inbutuaren erabilera egokiari buruzko argibideak

Dekantazio-inbutua bi eskuekin maneiatu behar da. Batekin tapoiari eusten zaio hatz erakuslearekin finkatzeko, eta bestearekin giltza maneiatzen da:

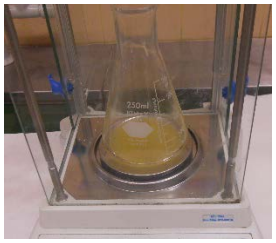


- Inbutua buruz behera jarri, eta giltza ireki barruko presioa askatzeko.
- Giltza itxi, eta 1-2 segundoz leunki irabiatu (kontuz ibili nahasketa atera ez dadin). Jarraian, giltza berriro ireki.
- Barruko presioa askatzen denean, tapoia eta giltza berriro finkatu eta indarrez irabiatu. Barruko presioa askatu giltzaren bidez (kontuz ibili nahasketa atera ez dadin).
- Giltza berriro itxi, eta euskarrian utzi geldirik posizio bertikalean (oharra: inbutuaren azpian jarri hauspeakin-ontzi bat).

12. Behin beheko fasea baztertuta, errepikatu ur beroarekin egindako garbiketa. Hau da, dekantazio-inbutura gehitu 150 mL ur destilatu bero; inbutua astindu, minutu batzuk utzi geldirik, eta dekantatu fase urtsua.

13. Ur destilatu beroarekin garbitze-prozedura hori errepikatu azken aldiz, fase koipetsutik azido klorhidrikoa guztiz kentzeko.

14. Azkenik, inbutuan geratuko den fase koipetsu garbia (gantz-azidoen estraktua) pisatu 150 mL-ko Erlenmeyer matraze batean, zeinarekin aldez aurretik balantza analitikoan tara zehaztu baita (**1.8. irudia**).



1.8 irudia. Erauzitako gantz-azidoen azken estraktua.

Estraktu koipetsuaren kantitatea (g)	

1.3.2. Olioaren gantz-azidoen batez besteko pisu molekularraren determinazioa

LAGINAK

- Ekilore-olioaren gantz-azidoen estraktua

ERREAKTIBOAK

- Etanola (% 95)
- Sodio hidroxidoa (1N)
- Fenoftaleina (etanol % 1 disoluzioan)
- Ur destilatua

MATERIALA

- 3 x 150 mL-ko Erlenmeyer
- 1 x 1 eta 1 x 5 mL-ko pipeta
- 1 x 25 mL-ko probeta
- 1 x 25 mL-ko bureta (+ euskarriak)
- *Pasteur* pipetak (+ gomazko tetinak)

EKIPOAK

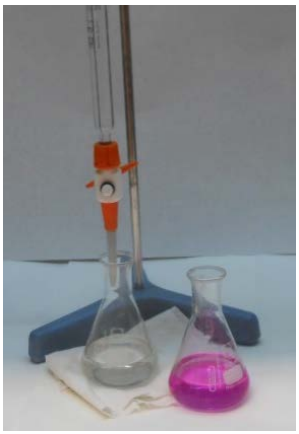
- Balantza granatarioa (ziurgabetasuna ± 0,1 g)

PROZEDURA

1. *Pasteur* pipeta erabiliz, balantza granatarioan 1 g estraktu pisatu 150 mL-ko Erlenmeyer batean.

2. Probeta erabiliz, 50 mL etanol (% 95) gehitu, irabiatu eta estraktua disolbatu.

3. Soluzioa baloratu sodio hidroxidoarekin (1N), non aldez aurretik 4-5 tanta fenoftaleina gehitu baitzaizkio adierazle gisa. 25 mL-ko bureta erabili baloratzailerako. Balorazioan zehar, buretaren giltza esku batekin maneiatzen den bitartean, bestearekin Erlenmeyerra poliki-poliki irabiatu, nahasketa homogeneoa lortzeko. Balorazioa bukatutzat ematen da adierazlearen kolorea aldatzean denean; hau da, koloregabea izatetik kolore arrosa iraunkorra (30 segundo) izatera pasatzen da (**1.9. irudia**).



1.9. irudia. Ekilore-olioaren gantz-azidoen soluzioaren azido-base balorazioa.

4. Balorazioa gutxienez bi aldiz egin, eta, oso balio desberdinak lortzen badira, beste balorazio-entsaio bat egin. Baloratzaile-bolumenaren datuak hartu.

	1. neurketa	2. neurketa	3. neurketa
NaOH 1N (mL)			

1.3.3. Olio jangarri desberdinen errefrakzio-indizearen neurketa

LAGINAK

- Ekilore-olioa
- Oleiko askoko ekilore-olioa
- Oliba-olio birjina
- Soja-olioa
- Bakailaoaren gibel-olioa
- Olio/gantz batzuen nahasketa

MATERIALAK

- *Pasteur* pipetak (+ gomazko tetinak)
- 1 x 100 mL-ko hauspeakin-ontzi
- Ur destilatua

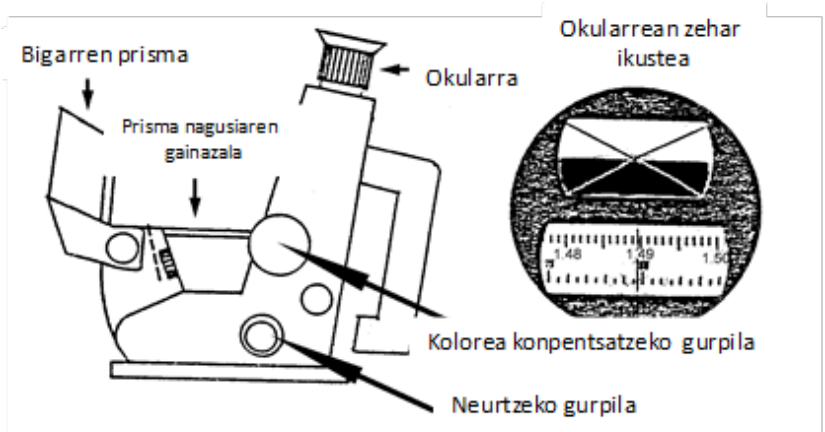
EKIPOAK

- *Abbe* errefraktometroa

PROZEDURA

1. Piztu *Abbe* errefraktometroa.

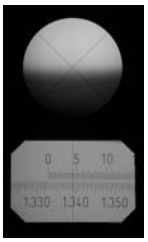
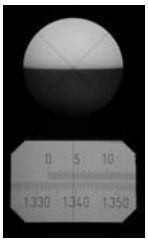
2. Honako argibide-irudi hau jarraitu, errefraktometro-ekipoaren zatiak ondo ezagutzeko.



1.10. irudia. *Abbe* errefraktometroaren zatien irudikapena.

3. Neurtzen hasi baino lehen, egiaztatu errefrakzio-indizearen kalibrazioa laborategiko giro-tenperaturan. Horretarako, doitu *Abbe* errefraktometroaren eskala honako jarraibide hauek jarraituz (begiratu **1.2. taula**).

1.2. taula. *Abbe* errefraktometroaren doitzea egiteko gida.

1	*Pasteur* pipeta erabiliz, bi tanta ur destilatu jarri errefraktometroko prisma nagusiaren gainazalean.
2	Kontu handiz itxi bigarren prisma.
3	Okularrean zehar behatu.
4	Kolorea konpentsatzeko gurpila biratu, okularrean zehar «mugatzeko lerroa» agertu arte (oharra: ikuseremuan banalerro zehatza agertu behar da, bi alde (alde argia eta alde iluna) mugatzen dituena).
5	Neurtzeko gurpila biratu, «mugatzeko lerroa» bi zuzenen elkarbidean era egokian lerrotu arte (begira beheko irudia).   lerrokadura desegokia — lerrokadura egokia
6	Orain, eskalan uraren errefrakzio-indizearen balioa irakur daiteke. Ziurtatu balio hori bat datorrela uraren errefrakzio-indize teorikoarekin (begiratu **1.3. taula**).
7	Egiaztapen honek errefraktometroa ongi doituta dagoela adierazten du.

1.3. taula. Ur destilatuaren errefrakzio-indizearen (EI) aldagarritasuna, tenperaturaren aldaketaren arabera.

T (ºC)	EI	T (ºC)	EI	T (ºC)	EI
10	1,33369	**21**	1,33290	**31**	1,33182
11	1,33364	**22**	1,33280	**32**	1,33170
12	1,33358	**23**	1,33271	**33**	1,33157
13	1,33352	**24**	1,33261	**34**	1,33144
14	1,33346	**25**	1,33250	**35**	1,33131
15	1,33339	**26**	1,33240	**36**	1,33117
16	1,33331	**27**	1,33229	**37**	1,33104
17	1,33324	**28**	1,33217	**38**	1,33090
18	1,33316	**29**	1,33206	**39**	1,33075
19	1,33307	**30**	1,33194	**40**	1,33061
20	1,33299				

4. Era berean, neurtu olio bakoitzaren errefrakzio-indizeak. Oharrak:
   - Laginen (olioak) artean, errefraktometroko prisma nagusiaren gainazala ur destilatuz hezetutako paperarekin garbitu.
   - Gutxienez 5 dezimal hartu errefrakzio-indizeak adierazteko.
   - Neurketaren tenperatura hartu.
   - Neurketak, gutxienez, bi aldiz egin behar dira.

5. Bete beheko **1.4. taula** errefrakzio-indizeen balioekin.

1.4. taula. Laginen neurtutako errefrakzio-indizeak.

	Errefrakzio-indizeak (EI)		
LAGINAK	1. neurketa	2. neurketa	3. neurketa
Ekilore-olioa			
Oleiko askoko ekilore-olioa			
Oliba-olio birjina			
Soja-olioa			
Bakailaoaren gibel-olioa			
Nahasketa			

1.4. Emaitzak eta erantzun behar diren galderak

1. Kalkulatu ekilore-oliotik erauzitako gantz-azidoen portzentajea (g gantz-azido/100 g olio). Azaldu eta arrazoitu ateratako emaitza espero denarekin hurbiltzen den ala ez.

2. Azido-base balorazioen datu esperimentalekin, kalkulatu ekilore-oliotik erauzitako gantz-azidoen batez besteko pisu molekularra (Pm) honako unitate honetan: g/mol. Horretarako, erabili honako azido-basearen balorazio-espresio orokor hauek:

- Base baliokideen kopurua = Azido baliokideen kopurua
- $B_{NaOH} \times N_{NaOH} = B_{azidoak} \times N_{azidoak}$

non B= bolumena eta N= normalitatea baitira

- Gantz-azidoen kasuan, Pisu baliokidea (Pb) = Pisu molekularra (Pm)

Eman batez besteko balioa ± desbideratze estandarra (oharra: adierazi amaierako emaitza bi dezimalekin).

3. Bilatu ekilore-olioaren konposaketari buruzko informazioa, eta aztertu haien lipidoen azilo talde nagusiak zein diren, bakoitzaren pisu molekularra eta portzentajea gantz-aziloen eduki osoan. Datu horiek kontuan izanda, kalkulatu teorikoki ekilore-olioaren gantz-azidoen batez besteko pisu molekularraren balioa (Pm) (bete beheko **1.5. taula**). Erkatu datu teorikoa praktikan kalkulatutako batez besteko pisu molekularraren balioarekin, emaitza guztiak interpretatuz.

1.5. taula. Ekilore-olioaren lipidoen azilo taldeak.

Ekilore-olioaren azilo taldeak (gantz-azidoak)	**Pm (g/mol)**	**Portzentajea**
(…)		
Ekilore-olioaren lipidoen gantz-azidoen batez besteko Pm teorikoa		

4. Neurtutako olio-laginen errefrakzio-indizeekin, bete **1.6. taula**, balio baxuenetatik altuenetara ordenatuz. Lagin bakoitzerako, adierazi azken emaitza honela: batez besteko balioa ± desbideratze estandarra (oharra: adierazi amaierako emaitza bost dezimalekin).

1.6. taula. Olio-laginen neurtutako errefrakzio-indizeak.

	Errefrakzio-indizeak (EI)		
Olio mota	1. neurketa	2. neurketa	BB ± DE
(…)			

Laburdurak: BB: batez bestekoa; DE: desbideratze estandarra.

5. Bilatu praktikan aztertutako olio jangarrien errefrakzio-indize balioei buruzko informazioa, eta erantzun honako galdera hauek, kontsultatutako iturri bibliografikoak aipatuz:
   - Ba al dago erlaziorik neurtutako olio bakoitzaren errefrakzio-indizearen (EI) balioaren eta dagokion olioaren konposaketaren artean? Azaldu.
   - Zein konposaketa mota dauka olio/gantz batzuen nahasketak, bere errefrakzio-indize balioa ikusita?
   - Legislazioaren arabera, zer errefrakzio-indize balio eduki behar dute ekilore eta oleiko askoko ekilore-olioek, oliba-olio birjinak eta soja-olioak?
   - Praktika honetan neurtutako EI balioak legezko mugetan al daude? Ez bada hala, eman balizko zergatiak.

1.5. Bibliografia

Bailey, A. E. (1979). Aceites y grasas industriales. Reverté.

Belitz, H. D., Grosch, W. & Schieberle, P. (2009). Chapter 3: Lipids (158-247). Chapter 14: Edible fats and oils (640-669). *Food Chemistry*. 4th, Springer.

Cheung, P. C. K. & Mehta, B. M (arg.). (2015). Chapter 13: Chemical composition of fat and oil products (365-402). *Handbook of Food Chemistry.* Springer.

De Koning, A. J. (1994). The Relationship between the Refractive Index of Fish Oils and their Content of Eicosapentaenoic Acid (EPA), Docosahexaenoic Acid (DHA) and Total Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA). Fett/Lipid, 96, 352-356.

2. PRAKTIKA:
ARRAUTZA-ZURINGOKO PROTEINEN AZTERKETA

2.1. Sarrera

Praktika honetan, arrautza-zuringoaren proteinak aztertuko dira. Horretarako, laburbilduz, lehenik, haien disolbagarritasunaren arabera, bi zatitan bereiziko dira indar ionikoaren bidezko hauspeatzearen bidez. Prozedura horretan proteinen prezipitazio selektiboa eragiten da, amonio-sulfatoaren kantitate gero eta handiagoak gehitzearen ondorioz. Oso prozedura erabilia da hainbat proteina bereizteko elikagaietan eta beste lagin biologiko batzuetan. Bigarrenik, bereizitako proteinak Lowry metodoari esker kuantifikatuko dira, ultramore-ikusgarri espektrofotometria (UV-Vis) eta kanpo-kalibrazio metodoa erabiliz.

Lowry metodo kolorimetrikoak elikagai edo lagin biologiko batean dauden proteinak kuantifikatzen ditu, Biuret erreakzioan oinarrituta (Lowry eta kol., 1951). Biuret erreakzioan, ingurune alkalinoan Cu^{+2}-aren eta lotura peptidikoen -NH taldeen arteko loturaz konposatu koloredunak sortzen dira. Erreakzio horretan sortutako kolorea nabarmentzeko eta sentikortasuna handitzeko, Folin-Ciocalteau izeneko erreaktiboa gehitzen da. Azken hori proteinetara lotzen da, eta pixkanaka proteinen tirosina eta triptofano aminoazidoen eraginez erreduzitzen da, konposatuaren kolorea horitik urdinera aldatzen delarik. Kolorazioaren intentsitatea (absorbantzia) UV-Vis espektrofotometriaren bidez neurtzen da, eta laginean dagoen proteina kantitatearekiko (lotura peptidikoekiko) zuzenki proportzionala da.

Lowry metodo hori aplikatuko zaie arrautza-zuringoaren proteinen bi zatiei eta kalibrazio-zuzena prestatzeko erabiliko diren proteina-patroi disoluzioei. Kalibrazio-zuzen hori behar da **kanpo-kalibrazio metodo**rako. Laburbilduz, kanpo-kalibrazioan analito baten hasierako disoluzio estandarrak edo patroiak prestatzen dira, ziurtatutako purutasuna duen patroi solidoa pisatzetik abiatuz (kasu honetan, behi-albumina). Disoluzio horretatik, kontzentrazio ezaguneko

disoluzio estandarrak edo patroiak prestatzen dira (kasu honetan, P1, P2, P3, P4, P5 eta P6 izenekoak). Disoluzio-patroien absorbantzia neurtu baino lehen, analitorik ez duen lagina (hau da, lagin «zuri» edo «kontrol» bat) erabili behar da espektrofotometroa kalibratzeko (absorbantzia= 0,000). Ondoren, disoluzio-patroien absorbantzia-balioak neurtu behar dira, eta horien eta kontzentrazioaren arteko erlazio matematikoa lortu. Azkenik, arrautza-zuringoaren proteinen bi zatiek emandako seinalea ekuazioan ordezkatuz, azken horien kontzentrazioa kalkulatuko da.

Ultramore-ikusgarri (UV-Vis) espektrofotometriaren oinarri teorikoa eta aplikazio kuantitatiboa

UV-Vis espektrofotometria da konposatu-disoluzio baten kontzentrazioa determinatzeko balio duen teknika analitikoa. Teknika hori molekulek duten UV-ikusgarri erradiazioak xurgatzeko gaitasunean oinarritzen da. Xurgatutako erradiazioen **uhin-luzerak** eta absortzio-eraginkortasuna molekularen egituraren eta ingurune-baldintzen menpe daude.

UV-Vis espektrofotometro bat erabiliz, irradiantzia jakin bateko (Po) argi monokromatikoa (uhin-luzera zehatzekoa) konposatu kimikoaren (kromoforoa) disoluzio batean zehar pasarazten da. Kromoforo horrek erradiazioaren zati bat baino ez du xurgatuko, gainerakoa pasatzen utziz (P). Irradiantziari dagokionez, honako ekuazio hau Po = Px+P betetzen da. Beraz, prozedura horretan, erradiazioaren intentsitatea jaitsi egiten da, eta jaitsera hori kuantifika daiteke, hainbat magnitude erabiliz.

Transmitantzia (T) da lagina zeharkatzen duen argiaren frakzioa, ekipoko detektorera iristen dena. Absorbantziak (A), berriz, kromoforoak xurgatutako argiaren kantitatea adierazten du, eta, logikoa denez, transmitantziarekin erlazionatuta dago:

$$A = 1/\log T = -\log T = -\log(Po/P)$$

Era berean, absorbantzia kromoforoaren kontzentrazioarekin proportzionalki erlazionatuta dago. **Lambert-Beer legea**k adierazten duenez, argi

monokromatikoaren absorbantzia modu linealean erlazionatuta dago erradiazioaren bidearen luzera edo bide optikoarekin (*l*) eta kromoforoaren kontzentrazioarekin (k):

$$A = \varepsilon * k * l$$

non,

ε = «absortibitate molarra» (M^{-1} x cm^{-1}), zeina kromoforoaren ezaugarria baita

l = «bide optikoa» edo espektrofotometroaren kubetaren zabalera (cm)

k = kromoforoaren kontzentrazioa (mol/L)

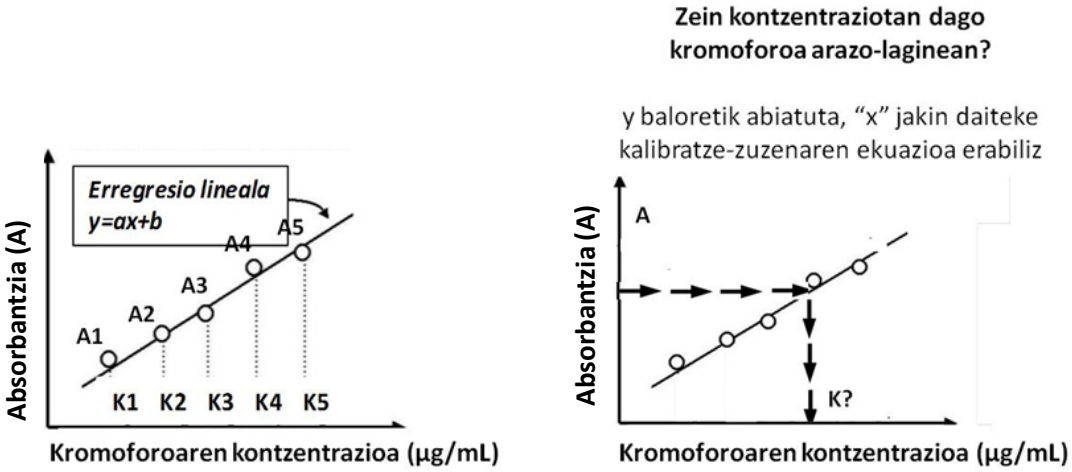
Hala ere, Lambert-Beer legeak zenbait muga ditu, eta ekuazio hori argi monokromatikoekin (uhin-luzera λ jakin batean) eta molekulen disoluzio diluituekin (< 0,01 M) bakarrik betetzen da.

Lambert-Beer legea betetzen denean, kromoforoaren kontzentrazioaren aurreko absorbantziaren irudikapen grafikoa zuzen bati egokitzen zaio (y = ax + b); zuzen horren malda (a) $\varepsilon * l$ izanez. Hori dela eta, UV-Vis-espektrofotometriaren aplikazio praktiko interesgarrienetako bat da zenbait molekularen determinazio kuantitatiboa, Lambert-Beerren ekuazioan oinarrituta.

Absortzio molekularreko espektroskopia bidezko kromoforo bat zehazteko, kalibrazio-etapa bat egin behar da aurretik. Etapa horretan, kromoforoa kontzentrazio ezagunean duten zenbait laginen (*patroi-disoluzio* deituak) absorbantzia neurtzen da. Ondoren, patroi-disoluzioen absorbantziak arazo-laginenekin alderatuko dira, azken horiek duten kromoforoaren kontzentrazioa kalkulatzeko. Horretaz gain, lagin zuri bat prestatzen da, zeinak erreaktibo guztiak eta disolbatzaileak baititu (kromoforoa izan ezik). Lagin zuria erreferentziatzat hartuko da, eta beste laginen absorbantzia zuzentzeko balioko du, bere absorbantzia balio nuluan jarriz. Metodo horri *kanpo-kalibrazio* deitzen zaio.

Kalibrazioa egiteko, patroien absorbantzia balioak (A1, A2, A3…) dagozkien kromoforoaren kontzentrazio ezagunen aurrean (K1, K2, K3…) irudikatzen dira grafikoki. Gauzak horrela, kalibratze-zuzen bat lor daiteke, betiere Lambert-Beer

legea betetzen bada (kromoforoaren kontzentrazio-tarte aplikagarria). Kalibrazio-zuzena onargarria da determinazio-koefizientea (R^2) 0,98tik gora denean. Izan ere, grafikoan ateratzen diren puntuekin erregresio lineala egiten da, karratu minimoen metodoaren bitartez. Kalibratze-zuzenaren ekuazioa erabiliz (y = ax + b, non y laginaren absorbantzia baita eta x kromoforoaren kontzentrazioa), edozein arazo-laginetan kromoforoaren kontzentrazioa determina daiteke, behin espektrofotometroan bere absorbantzia neurtuta (begiratu **2.1. irudia**).



2.1. irudia. Patroi-disoluzioetatik abiatutako kalibrazio-zuzenaren metodoa.

2.2. Helburuak

Praktika honen helburu nagusiak honako hauek dira:

- Arrautza-zuringoko proteinak bereiztea, indar ionikoaren bidezko hauspeatzearen bidez.
- Bereizitako proteinak kuantifikatzea Lowry metodoari esker (kanpo-kalibrazio metodoa eta UV-Vis espektrofotometria erabiliz).
- Lortutako datu esperimentalak eta kalkulatutako amaierako emaitzak intrepretatzea, iturri bibliografiko fidagarrietan oinarrituz.

2.3. Prozedura esperimentala

2.3.1. Arrautza-zuringoko proteinen bereizketa: indar ionikoaren bidezko hauspeatzea

LAGINAK

- 2 arrautza gordin

ERREAKTIBOAK

- Amonio sulfatoa
- Sodio kloruroa (% 0,9)
- Ur destilatua

MATERIALAK

- 2 x 25 eta 100 mL-ko probeta
- 2 x 5 eta 10 mL-ko pipeta
- 50 eta 100 mL-ko hauspeakin-ontziak
- *Pasteur* pipetak
- Erloju-beirak
- 3 eta 5 cm-ko diametroko inbutu konikoak
- 10 mL-ko zentrifugatzaileko plastikozko hodiak
- Hodientzako tentegailua
- Metalezko mikroespatula

EKIPOAK

- Hodientzako irabiagailua
- Zentrifugatzailea
- Balantza granatarioa (ziurgabetasuna ± 0,1 g)
- Balantza analitikoa (ziurgabetasuna ± 0,0001 g)

PROZEDURA

1. Hartu arrautza, apurtu oskola, eta bota arrautza-zuringoa 50 mL-ko hauspeakin-ontzi batera. Mikroespatula baten laguntzaz, nahastu zuringoa leunki, esekidura homogeneoa lortu arte. Hau izango da A lagina.

2. Hartu beste arrautza eta errepikatu prozedura osoa, B lagina lortzeko. Hemendik aurrera, prozedura bera jarraituko da bi laginekin aldi berean.

3. *Pasteur* pipeta baten laguntzaz, balantza analitikoan esekidura horren 5 g pisatu 25 mL-ko probeta batean.

4. Ur destilatuarekin, arrasean jarri 10 mL-ra.

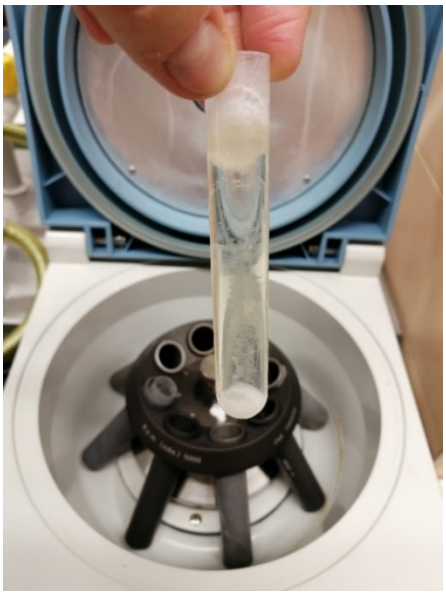
5. Eraman esekidura 10 mL-ko zentrifugatzaileko plastikozko hodi batera. Estali hodia tapoiarekin, eta homogeneizatu edukia hodientzako irabiagailuan.

6. Pisatu 1,50 g amonio sulfato erloju-beira batean.

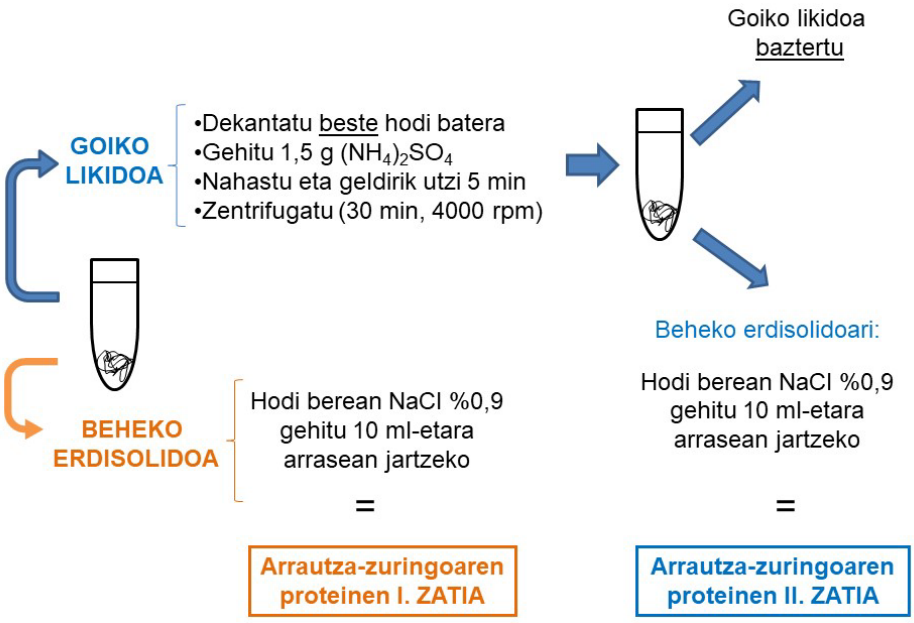
7. Mikroespatula baten laguntzaz, kontu handiz gehitu esekidurara 1,50 g amonio sulfato. Nahastu leunki, eta geldirik utzi gutxienez 5 minutuz.

8. Zentrifugatu esekidura estalkirik gabe giro-tenperaturan 30 minutuz 4000 bira minutukoetan (rpm). Kontuan hartu zentrifugatzailearen errotorean hodi bat bestearen parean egon behar dela, pisuaren oreka bermatu ahal izateko (Oharra: itxaronaldi honetan, hasi praktikaren 2.3.2. atala).

9. Zentrifugatu ondoren, hodian bi fase egongo dira: goiko likidoa eta beheko erdisolidoa edo hauspeakina (begiratu **2.2. irudia**). Hemendik aurrera, jarraituko den prozedura **2.3. irudian** azaltzen da laburki.



2.2. irudia. Zentrifugatu ondoren ateratako arrautza-zuringoko bi fase.



2.3. irudia. Zentrifugatu ondoren arrautza-proteinak bereizteko jarraitu behar den prozedura eskematikoa.

10. Dekantazioaren bidez, bereizi goiko likidoa beste 10 mL-ko zentrifugatzaileko hodi batean (agian mikroespatula baten laguntza beharko da, beheko erdisolidoa ere ez dekantatzeko). Utzi hodientzako tentegailuan.

11. Beheko erdisolidoari sodio kloruroa % 0,9 gehitu, 10 mL-ra arrasean jartzeko. Erdisolido hori ahalik eta gehien disolbatu, mikroespatula eta hodien irabiagailuaren laguntzaz. Disoluzio hori arrautza-zuringoko **proteinen lehenengo ZATIA (I)** izango da. Utzi I. zati hori hodientzako tentegailuan ondorengo kuantifikaziorako (2.3.3. atalean azaltzen da).

12. Pisatu 1,50 g amonio sulfato erloju-beira batean, eta gehitu kontu handiz bereizitako goiko likidoa zegoen hodira. Ahalik eta gehien disolbatu, mikroespatula eta hodien irabiagailuaren laguntzaz. Geldirik utzi gutxienez 5 minutuz.

13. Zentrifugatu esekidura estalkirik gabe giro-tenperaturan 30 minutuz 4000 bira minutukoetan (rpm). Kontuan hartu zentrifugatzailearen errotorean hodi bat bestearen parean egon behar dela, pisuaren oreka bermatu ahal izateko.

14. Zentrifugatu ondoren lortutako goiko likidoa dekantazioaren bidez baztertu. Eta beheko erdisolidoari sodio kloruroa % 0,9 gehitu 10 mL-ra arrasean jartzeko. Ahalik eta gehien disolbatu, mikroespatula eta hodien irabiagailuaren laguntzaz. Disoluzio hori arrautza-zuringoko **proteinen bigarren ZATIA (II)** izango da. Utzi II. zati hori hodientzako tentegailuan ondorengo kuantifikaziorako (2.3.3. atalean azaltzen da).

    Oharra: behin proteinen kalibrazio-zuzena prestatuta, 2.3.2. atalean azaltzen den bezala, posible izango da arrautza-zuringoko proteinen I. eta II. zatiak kuantifikatzea (begiratu 2.3.3. atala).

2.3.2. Proteinen kalibrazio-zuzenaren prestaketa

MATERIALAK

- 12 x 50 mL-ko beirazko hodi
- 1 x hodientzako tentegailua
- 2 x 1, 5, 10, 25 eta 50 mL-ko pipeta
- 12 x 100 mL-ko matraze aforatu
- 3 x espektrofotometrorako plastikozko kubeta

EKIPOAK

- Ur-bainu termostatikoa
- Hodientzako irabiagailua
- Termometroa
- Ultramore-ikusgarri (UV-Vis) espektrofotometroa

ERREAKTIBOAK

- Proteina patroi-disoluzioa: 75 mg behi-albumina/ 100 mL sodio kloruroa % 0,9

- Sodio kloruroa %0,9

- Lowry A erreaktiboa: sodio karbonatoa % 2 (sodio hidroxido 0,1 N disoluzioan)

- Lowry B erreaktiboa: $CuSO_4.5\ H_2O$ % 0,5 (sodio tartratoa %1 disoluzioan)

- Folin-Ciocalteu erreaktiboa: ur-disoluzioan Na_2WO_4, Na_2MoO_4, H_3PO_4, HCl, H_2SO_4 eta Br_2

PROZEDURA

1. **Proteina patroi-disoluzioen prestaketa (P1 - P6).** Hartu sei 100 mL-ko matraze aforatu, eta identifikatu errotuladore iraunkorraz: P1, P2, P3, P4, P5 eta P6. Behi-albumina proteina disoluzioa (75 mg/100 mL) patroi moduan erabiliz, P1 - P6 disoluzioetan honako kontzentrazio hauek lortu behar dira:

7,5 ug/mL, 37,5 ug/mL, 75 ug/mL, 150 ug/mL, 225 ug/mL eta 375 ug/mL, hurrenez hurren. Kontzentrazio horiek lortzeko, gehitu matraze bakoitzean dagozkion behi-albumina patroi-disoluzioaren bolumena (begiratu **2.1. taula**) eta sodio kloruroarekin (% 0,9) 100 mL-ra arrasean jarri. **2.4. irudian** patroi-disoluzioen matrazeak ikus daitezke, prestatu ondoren. Tapa jarri matrazean, eta irabiatu eskuz, disoluzio homogeneoak lortzeko.

2.1. taula. Proteina patroi-disoluzioak (P1 - P6) prestatzeko gehitu behar diren behi-albumina patroi-disoluzioaren bolumenak.

	P1	**P2**	**P3**	**P4**	**P5**	**P6**
Lortu beharreko kontzentrazioa (µg/mL)	**7,5**	**37,5**	**75**	**150**	**225**	**375**
Gehitu beharreko bolumena	1 mL	5 mL	10 mL	20 mL	30 mL	50 mL

2.4. irudia. Prestatutako P1, P2, P3, P4, P5 eta P6 proteina patroi-disoluzioak.

2. Hartu sei 50 mL-ko beirazko hodi, eta identifikatu errotuladore iraunkorraz (P1, P2, P3, P4, P5 eta P6). Ipini hodientzako tentegailuan, eta gehitu hodi bakoitzari, ordena honi jarraituz:
   - 1 mL dagokion proteina patroi-disoluzio (P1, P2, P3, P4, P5 edo P6).
   - 5 mL Lowry A erreaktibo.
   - 1 mL Lowry B erreaktibo.

   Hodientzako irabiagailuaren laguntzaz, poliki-poliki homogeneizatu hodi

guztien edukia.

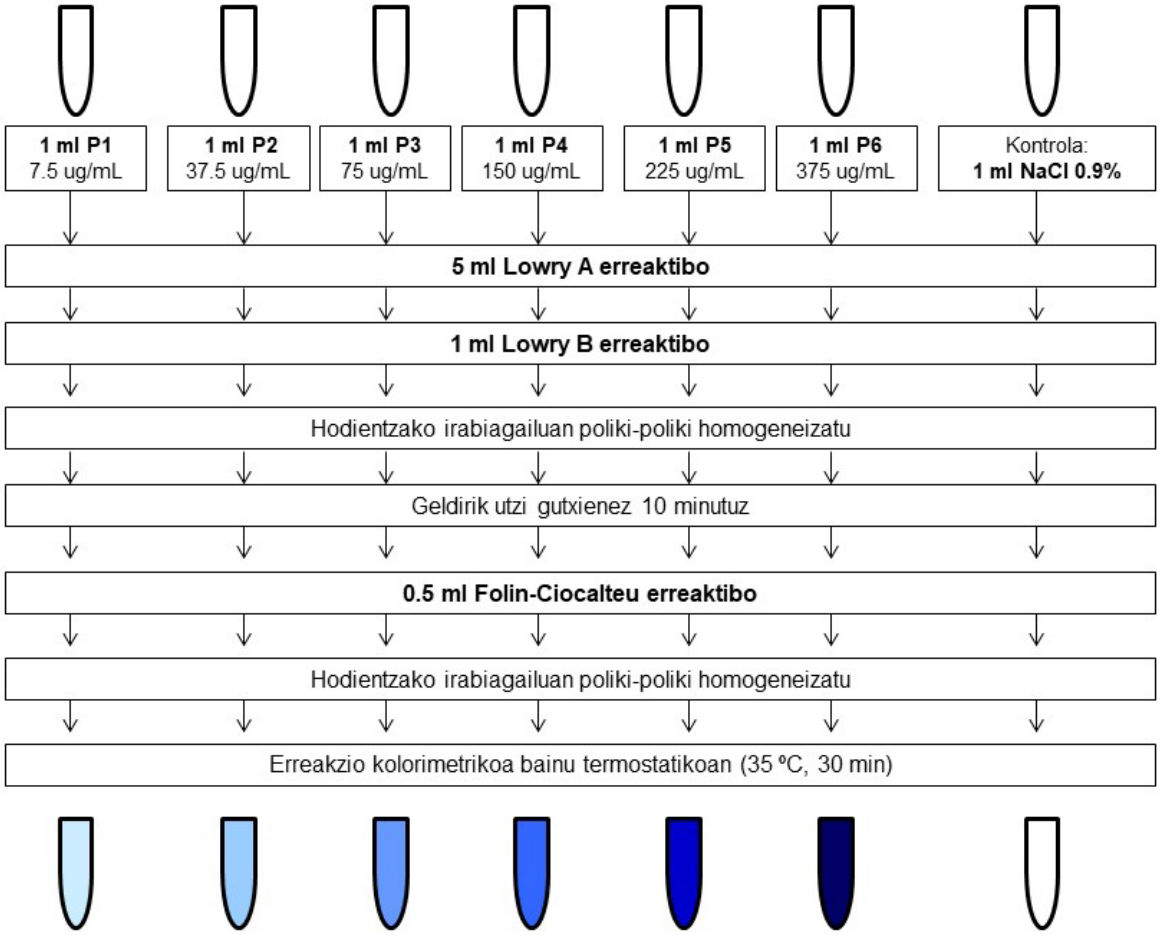
3. **Kontrol disoluzioaren prestaketa.** Hartu 50 mL-ko beirazko hodi bat, eta identifikatu errotuladore iraunkorraz (K)**.** Ipini hodientzako tentegailuan, eta gehitu ordena honi jarraituz:
    - 1 mL sodio kloruro % 0,9.
    - 5 mL Lowry A erreaktibo.
    - 1 mL Lowry B erreaktibo.

    Hodientzako irabiagailuaren laguntzaz, homogeneizatu poliki-poliki.

4. Geldirik utzi zazpi saio-hodiak, gutxienez 10 minutuz (P1-P6 eta K).

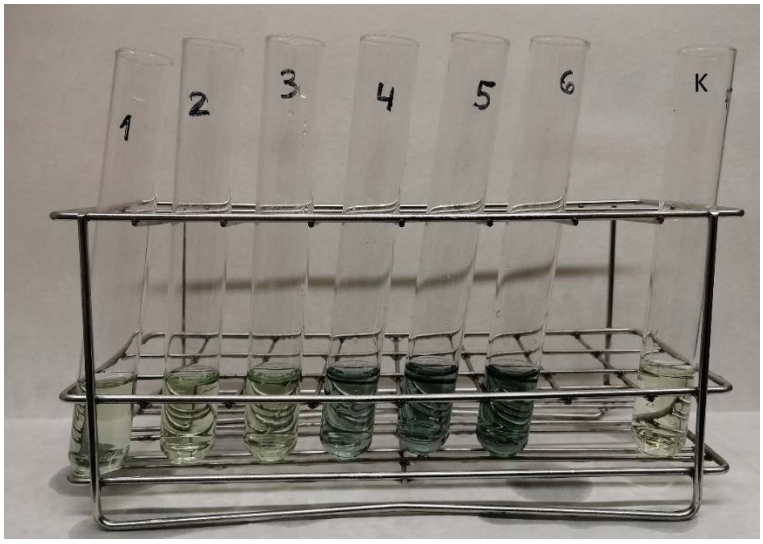
5. Ondoren, **gehitu** hodi bakoitzari **0,5 mL** Folin-Ciocalteu **erreaktibo**. Hodientzako irabiagailuaren laguntzaz, homogeneizatu poliki-poliki.

6. Jarri zazpi hodiak tentegailuan, eta sartu tentegailua 35 ºC-an dagoen **ur-bainu termostatikoan.** Han **30 minutuz egon behar dira**, erreakzio kolorimetrikoa gerta dadin. **Kolore urdina** agertzeak erreakzioa egoki doala adierazten du. **2.5. irudian** laburtzen da zazpi hodiekin jarraitu den prozedura kalibrazio-zuzena prestatzeko.



2.5. irudia. Proteina patroi-disoluzio (P1, P2, P3, P4, P5 eta P6) eta kontrol (K) disoluzioekin jarraitu den prozedura, erreakzio kolorimetrikoa lortzeko (Lowry metodoa proteinak kuantifikatzeko).

7. Hodietan erreakzio kolorimetrikoa eman ondoren, homogeneizatu irabiagailuan poliki-poliki. **2.6. irudia**n homogeneizatutako hodiak ikusten dira**.**



2.6. irudia. Lowry metodoa jarraitu ondoren lortutako proteina patroi-laginak (P1-P6) eta kontrola (K). Hodietan zenbat eta proteina-kontzentrazio altuagoa izan, orduan eta kolore urdinagoa sortuko da.

8. Neurtu proteina patroi-laginen (P1 - P6) absorbantzia (A) UV-Vis espektrofotometroan (500 nm-ko uhin-luzeran). Horretarako, lehenengo kontrol-hodiarekin ekipoaren kalibrazioa egin behar da (bere absorbantzia-balioa 0 izango da, lagin honetan proteinarik ez dagoelako). Ondoren, neurtu P1-P6 laginen absorbantzia, beti proteina-kontzentrazio txikitik (P1) kontzentrazio handiagora (P6). Ordena hori jarraituz gero, ez da beharrezkoa espektrofotometroaren kubeta garbitzea laginen artean. Lagin bakoitzeko bi neurketa egin behar dira (lehenik, neurri-serie oso bat, eta, gero, bigarren serie bat). Idatzi absorbantzia-balioak **2.2. taulan.**

2.2. taula. Proteina patroi-laginen (P1 - P6) absorbantzia-balioak 500 nm-ko uhin-luzeran neurtuta, UV-Vis espektrofotometroaren bidez.

	Kontrola	**P1** 7,5 ug/mL	**P2** 37,5 ug/mL	**P3** 75 ug/mL	**P4** 150 ug/mL	**P5** 225 ug/mL	**P6** 375 ug/mL
Absorbantzia 1. neurketa							
Absorbantzia 2. neurketa							
Absorbantzia Batez bestekoa							

2.3.3. Bereizitako arrautza-zuringoko proteinen kuantifikazioa

LAGINAK, MATERIALAK, ERREAKTIBOAK ETA EKIPOAK

- 2.3.1. atalean lortutako A eta B arrautza-zuringoen proteinen lehenengo eta bigarren zatiak (I eta II).
- 2.3.2. atalean erabilitako material bera.

PROZEDURA

1. Hartu A eta B arrautza-zuringoen proteinen I. eta II. zatiak (2.3.1 atalean lortutako lau laginak), eta homogeneizatu leunki hodien irabiagailuaren bidez. Ondorengo kuantifikazio egokia egin ahal izateko, funtsezkoa da laginak ahalik eta homogeneoenak izatea.

2. Diluitu arrautza-zuringoaren proteinen I. eta II. zatiak (1:100). Horretarako:

   - Hartu lau 100 mL-ko matraze aforatu.
   - Identifikatu errotuladore iraunkorraz (adibidez, «I. zatia A», «I. zatia B», «II. zatia A» eta «II. zatia B»).
   - Gehitu matraze bakoitzera 1 mL zati bakoitzetik.
   - Sodio kloruroarekin (% 0,9) 100 mL-ra arrasean jarri.
   - Tapa jarri matrazean, eta irabiatu eskuz, disoluzio homogeneoa lortzeko.

3. Hartu lau 50 mL-ko beirazko hodi, eta identifikatu errotuladore iraunkorraz (adibidez, «I. zatia A», «I. zatia B», «II. zatia A» eta «II. zatia B»). Ipini hodientzako tentegailuan, eta gehitu hodi bakoitzari, ordena honi jarraituz:

   - 1 mL dagokion arrautza-zuringoaren proteinen zatia (1:100 diluzioa).
   - 5 mL Lowry A erreaktibo.
   - 1 mL Lowry B erreaktibo.

Hodientzako irabiagailuaren laguntzaz, homogeneizatu poliki-poliki hodi guztien edukia.

4. Kontrol-disoluzioaren prestaketa: hartu 50 mL-ko beirazko hodi bat, eta identifikatu errotuladore iraunkorraz (K); ipini hodientzako tentegailuan, eta gehitu ordena honi jarraituz:

   - 1 mL sodio kloruro % 0,9.
   - 5 mL Lowry A erreaktibo.
   - 1 mL Lowry B erreaktibo.

   Hodientzako irabiagailuaren laguntzaz, homogeneizatu poliki-poliki.

5. Geldirik utzi bost saio-hodiak, gutxienez 10 minutuz (K eta I. eta II. zatiak).

6. Ondoren, gehitu hodi bakoitzari 0,5 mL Folin-Ciocalteu erreaktibo. Hodientzako irabiagailuaren laguntzaz, homogeneizatu poliki-poliki.

7. Jarri bost hodiak tentegailuan, eta sartu tentegailua 35 ºC-an dagoen ur-bainu termostatikoan. Han 30 minutuz egon behar dira, erreakzio kolorimetrikoa gerta dadin. Kolore urdina agertzeak erreakzioa egoki doala adierazten du. **2.7. irudia**n laburtzen da bost hodiekin jarraitu den prozedura.

2.7. irudia. Arrautzen zuringo-proteinen I. eta II. zatiekin (lau lagin) eta kontrol (K) disoluzioarekin jarraitu den prozedura, erreakzio kolorimetrikoa lortzeko (Lowry metodoa proteinak kuantifikatzeko).

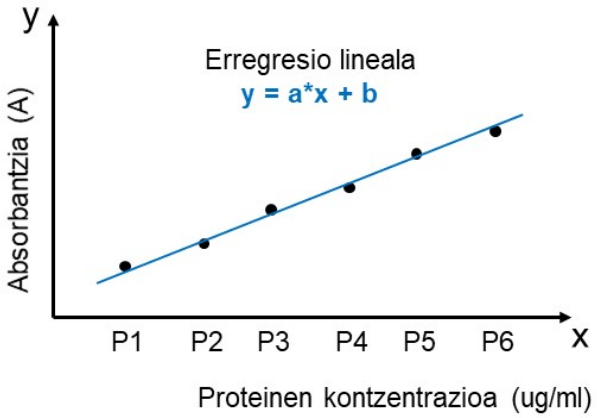
8. Neurtu bi arrautzen zuringo-proteinen I. eta II. zatien absorbantzia (A) UV-Vis espektrofotometroan (500 nm-ko uhin-luzeran). Horretarako, lehenengo kontrol-hodiarekin ekipoaren kalibrazioa egin behar da (bere absorbantzia-balioa 0 izango da, lagin horretan proteinarik ez dagoelako). Ondoren, neurtu lau laginen absorbantzia. Laginen proteina-kontzentrazioa ezezaguna denez, laginen artean ondo garbitu behar da kubeta. Lagin bakoitzeko bi neurketa egin behar dira. Idatzi absorbantzia-balioak **2.3. taulan**.

2.3. taula. Bi arrautza-zuringoko proteinen I. eta II. zatien absorbantzia-balioak 500 nm-ko uhin-luzeran neurtuta, UV-Vis espektrofotometriaren bidez.

		A arrautza		B arrautza	
	Kontrola	**Proteinen I. zatia**	**Proteinen II. zatia**	**Proteinen I. zatia**	**Proteinen II. zatia**
Absorbantzia 1. neurketa					
Absorbantzia 2. neurketa					
Absorbantzia Batez bestekoa					

2.4. Emaitzak eta erantzun behar diren galderak

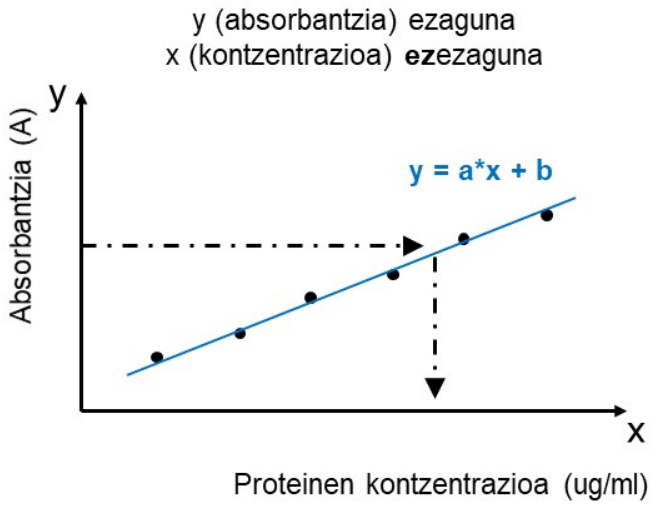
1. Proteina patroi-disoluzioen (P1- P6) kontzentrazio- eta absorbantzia-balioak kontuan hartuta, kalkulatu karratu minimoen bidezko doiketa metodoaz kalibrazio-zuzenaren ekuazioa (y = ax + b), eta irudikatu (begiratu **2.8. irudia**). Horretarako, erabili Excel edo antzeko programa bat. Ekuazioaren R^2 balioa kontuan hartuta, azaldu nola atera den kalibrazio-zuzena.



2.8. irudia. Proteina patroi-disoluzioei esker (P1 - P6) kalkulatu behar den kalibrazio-zuzenaren ekuazioa eta irudikapena.

2. Kalkulatu bi arrautzen I. eta II. zatien proteinen konzentrazioa, kalibrazio-zuzenaren ekuazioa erabiliz (begiratu **2.9. irudia**). Bete beheko **2.4. taula** kontzentrazio-balioekin (azaldu balioak bi dezimalekin, eta eman emaitzak

honako unitate hauetan: µg proteina/mL). Azaldu nola egin diren kalkuluak (horretarako, hartu eredutzat lagin baten datuak).



2.9. irudia. Kalibrazio-zuzenaren ekuazioari esker nola kalkulatu bi arrautza-zuringoen proteinen I. eta II. zatien kontzentrazioa.

2.4. taula. Bi arrautza-zuringoen proteinen I. eta II. zatien kontzentrazioa (ug/mL).

	A arrautza		**B arrautza**		BB ± DE	
	I. zatia	**II. zatia**	**I. zatia**	**II. zatia**	**I. zatia**	**II. zatia**
Proteinen kontzentrazioa (**µg/mL**)						

Laburdurak: BB: batez bestekoa; DE: desbideratze estandarra.

3. Adierazi bi arrautzen I. eta II. zatien proteinen kontzentrazioa unitate hauetan: mg proteina/100 g arrautza-zuringo, horrela agertzen direlako datuak elikagaien konposizio-tauletan. Horretarako, kontuan hartu behar dira praktika honetan zehar egindako diluzio guztiak. Bete beheko **2.5. taula** kontzentrazio-balioekin (bi dezimalekin). Azaldu nola egin dituzuen kalkuluak (horretarako, eredutzat hartu lagin baten datuak).

2.5. taula. Bi arrautza-zuringoko proteinen I. eta II. zatien kontzentrazioa (mg/100 g zuringo).

	A arrautza		**B arrautza**		BB ± DE	
	I. zatia	**II. zatia**	**I. zatia**	**I. zatia**	**II. zatia**	**I. zatia**
Proteinen kontzentrazioa (**mg/100 g zuringo**)						

Laburdurak: BB: batez bestekoa; DE: desbideratze estandarra.

4. Bilatu informazio bibliografikoa arrautza-zuringoaren proteinen konposizioari buruz, eta erantzun galdera hauek:
   - Zein da arrautza-zuringoko proteinen eduki totala (g proteina/100 g arrautza-zuringo)?
   - Zein dira arrautza-zuringoko proteina desberdinen izenak? Eta proteina horiek zein proteina talde osatzen dituzte? Hau da, proteina bakoitza zein zatitan sailkatzen da (I. edo II. zatian)? Bete **2.6. taula**.

2.6. taula. Arrautza-zuringoko proteinen konposizioari buruzko informazio bibliografikoa.

Arrautza-zuringoko proteinen izenak	**Kantitatea**	**Proteina taldea**	**I. edo II. zatikoa?**

   - Erlazionatu informazio bibliografiko hori praktika honetan lortutako emaitza kuantitatiboekin. Bat etortzen ez bada, komentatu balizko zergatiak.

5. Aipatu praktika honen galderak erantzuteko kontsultatutako bibliografia.

2.5. Bibliografia

Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). Chapter 1: Aminoacids, peptides and proteins (8-157), Chapter 11: Eggs (546-562). *Food Chemistry.* Springer.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, *193*(1), 265-75.

3. PRAKTIKA:
ZIAZERBETAKO KLOROFILEN EGONKORTASUN TERMIKOA

3.1. Sarrera

Elikagaien kalitatea alderdi desberdinek baldintzatutakoa da. Segurtasunaz eta konposizio nutrizionalaz gain, ezaugarri organoleptikoek ere garrantzi handia dute elikagaiaren onarpenerako. Gehienetan, elikagaien kolorea da kontsumitzaileek balioztatzen duten lehenengo ezaugarri sentsoriala, elikagaiak hautatzeko orduan erabakigarria izanik. Izan ere, koloreak elikagaiaren freskotasun- edo heldutasun-maila, balio nutritiboa edota zaporea adieraz dezake.

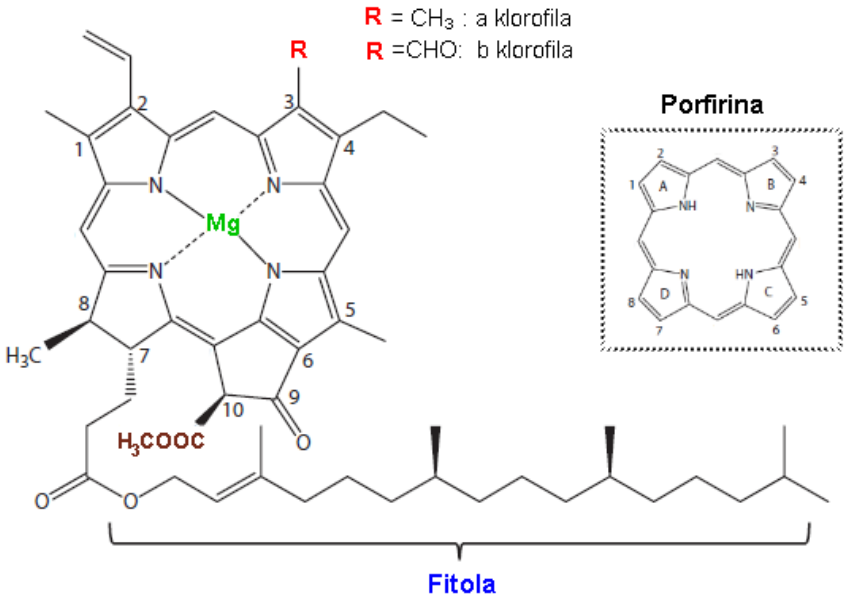
Elikagaien kolorea berezko pigmentuen presentziagatik edota gehitutako koloratzaileengatik agertzen da. Pigmentuei dagokienez, landare- eta animalia-zeluletako eta -ehunetako substantzia naturalak dira, zeinek jatorri eta oso egitura kimiko desberdinak erakusten baitituzte. Hala ere, amankomunean duten ezaugarria da elikagaiei kolorea ematen dietena, begiko erretina estimulatzeko gai diren uhin-luzeretan zenbait energia-kantitate islatzeko edo igortzeko gaitasuna dutelako. Begia sentikorra den energia-tarteari argi ikusgarri esaten zaio (gutxi gorabehera 380 - 770 nm-ko uhin-luzerak). Kolorea emateaz gain, pigmentuek askotan funtzio biologikoren bat ere betetzen dute elikagaietan. Klorofilen kasuan, landareetako kloroplastoetan agertzen da, argi-energia xurgatuz eta energia kimiko bihurtuz; hau da, fotosintesia burutuz.

Landare-jatorriko elikagaien kolore naturala lau pigmentu talderi zor zaie nagusiki: pigmentu tetrapirrolikoak (adib. klorofila berdeak), pigmentu tetraterpenikoak (adib. kolore horiko, laranjako edo gorriko karotenoideak), pigmentu O-heteroziklikoak (adib. kolore horiko, gorriko, urdineko edo moreko antozianinak) eta pigmentu N-heteroziklikoak (kolore gorriko edo horiko betalainak). Klorofilak dira barazki fresko askoren kolore berde distiratsuaren arduradunak, eta kontsumitzaileek hautemandako kalitatea baldintzatzen dute. Hala ere, seneszentzia-, prozesatze- edota biltegiratze-prozesuetan zehar

kolorearen galera gertatzen da, klorofilen egituran gertatutako eraldaketaren ondorioz. Izan ere, zahartzeak, entzimek, azido ahulek, oxigenoak, beroak eta argiak klorofila-molekularen osotasuna eragiten dute.

Klorofilen egitura

Klorofilen egitura orokorra **3.1. irudian** ikus daiteke. Klorofilak dihidroporfirinak dira, lau eraztun pirrolikoz osatuak metino-loturen bidez lotuta. Porfirina eraztunaren barruan magnesio atomo bat agertzen da 2 N atomori lotuta. Horrez gain, porfirinari erantsita, 5. eraztun isozikliko bat (ziklopentanona zehazki) dago. Bost eraztun horiez osatutako egiturari *forbina* deitzen zaio, eta klorofila guztien nukleoa da. Hamar lotura bikoitz dituen egitura planar erresonante hori da eremu ikusgaian energia xurgatzeaz eta islatzeaz arduratzen den kromoforoa.



3.1. irudia. Klorofilen egitura kimiko orokorra.

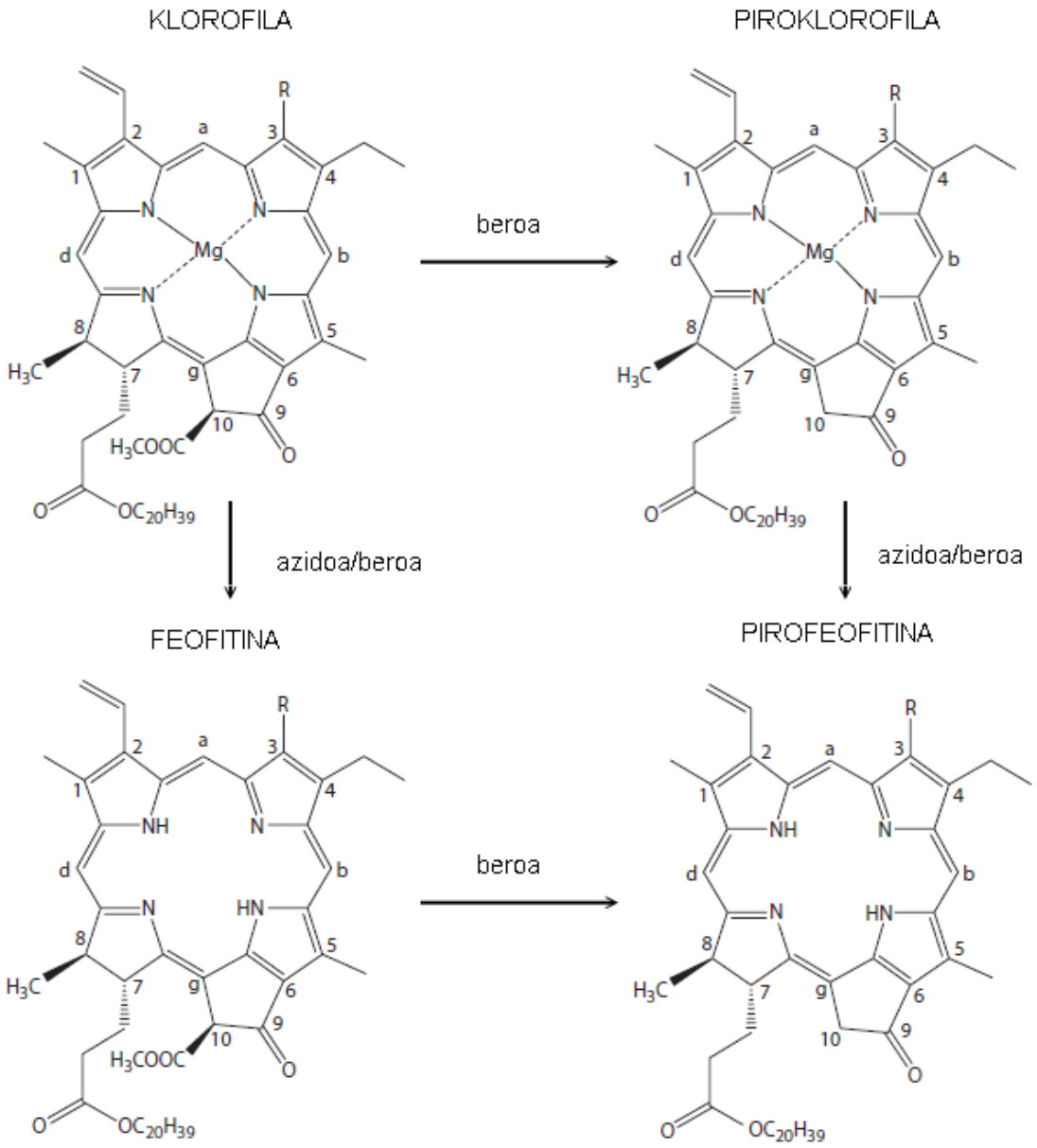
Klorofilak forbinak dituen ordezkatzaileetan bereizten dira. Irudian ikus daitekeen bezala, a klorofilaren kasuan, 3.C atomoari lotutako R taldea metilo talde bat da; b klorofilaren kasuan, berriz, aldehido talde bat. Horrez gain, a eta b klorofilen forbina-eraztunetan beste ordezkatzaile batzuk agertzen dira: binilo talde bat 2.C atomoan, etilo talde bat 4.C atomoan, metilo talde bat 1.,5. eta 8.C atomoetan, eta karboximetilo talde bat 10.C atomoan. Era berean, 7.C atomoan azido

propionikoa ere badute, zeinari 20 karbono atomoko alkohol isoprenoide monoasegabe bat (*fitola* deitua) esterifikatu baitzaio.

Barazki berdeen kolorearen aldaketak, horiek prestatzean

Barazki berdeak prestatzean, zenbait aldaketa gertatzen dira kolorean; izan ere, uretan egosketa-denbora zenbat eta luzeagoa izan, orduan eta nabariagoa da kolore berde distiratsuaren galera. Kolorearen galera hori ez da gertatzen lixibiazio-fenomeno batengatik, pigmentu berde horiek hidrosolugarriak ez direlako. Kolorearen aldaketa klorofilaren egitura molekularrean zenbait aldaketa izatearen ondorioz gertatzen da. Klorofiletatik eratorritako zenbait deribaturen egitura kimikoak ikus daitezke (**3.2. irudia**).

Tenperatura altuek eta azidotzeak feofitinizazio fenomenoa bultzatzen dute; hau da, klorofilako porfirina-egiturak magnesio atomoa galtzen du era itzulezinean. Eraldaketa horrek eragina du porfirinako eraztunen erresonantzian, aldaketa batokromiko batera eramanez: kolore berde distiratsutik kolore berde arre/olibara pasatzen da. Uretan egostean, klorofilak dagokien feofitina bihurtzen dira, beroketaren zein azidotzearen ondorioz. Beroketak kloroplastoetako lipoproteinak desnaturalizatzen ditu, horiei eransita dauden klorofila molekulak aldaketarekiko sentikorrago eginez. Horrez gain, ingurunea azidoago bilakatzen da, feofitinizazioa bultzatuz. Landare-ehuneko osotasuna galtzen da, zelulen barruko azido organikoak askatuz. Era berean, beroak eragindako monosakaridoen degradazioak ingurunea azidifikatzen laguntzen du.



3.2. irudia. Klorofilen zenbait deribaturen egitura kimikoa.

Tenperatura altuak mantentzen badira, pirofeofitinizazioa gertatzen da; hau da, feofitinak dagokien pirofeofitina bihurtzen dira, 5. eraztun isoziklikoko karboximetilo taldea galdu ondoren. Kasu honetan, molekularen kromoforoan ez da eraldaketarik gertatzen. Deribatu horiek tratamendu termikoaren intentsitatearen adierazleak dira, haien presentzia ohikoa izanik esterilizatutako barazki berdeetan.

Askotan, prestatu baino lehen, izoztutako barazki berdeak mikrouhin-labean desizozten dira. Kondizio horietan (ingurune lehorra eta beroa), klorofilek beste eraldaketa bat jasan dezakete: karboximetilo taldearen galera, eta ondorioz piroklorofila bilakatzea. Azken horiek pirofeofitina bihurtuko dira, azidoaren eta beroaren eraginpean (**3.2. irudia**).

Klorofilen eta feofitinen analisia

Pigmentuak analizatzeko, haien propietate fisiko bat, kolorea, azter daiteke. Horretarako, lehenengo pausoa da haien erauzketa gauzatzea. Klorofilen kasuan, horiek karotenoideekin, lipidoekin eta lipoproteinekin ahulki lotuta agertzen dira kloroplastoetan, eta, arrazoi horrengatik, klorofilak erraz erauz daitezke landare-ehun apurtua disolbatzaile organiko egoki batean beratuz. Klorofila liposolugarriak eta fitol-katea duten deribatuak erauzteko, azetona erabili ohi da. Ondoren, pigmentuek duten absortzio-espektro espezifikoaren bitartez identifika daitezke. Hurrengo taulan, a eta b klorofilen eta feofitinen propietate espektralak erakusten dira (**3.1. taula**).

3.1. taula. a eta b klorofilen eta feofitinen propietate espektralak (Vernon, 1960). Balioak % 80 azetonatan estraktuei dagozkie.

a klorofila		**b klorofila**		**a feofitina**		**b feofitina**	
λ (nm)	**ε**	**λ (nm)**	**ε**	**λ (nm)**	**ε**	**λ (nm)**	**ε**
665	90,8	**665**	10,8	**666,5**	56,6	**666**	10,4
649	23,4	**648,5**	52,5	**655**	23,8	**655**	35,7
618	19,6	**600**	14,3	**610**	11,9	**600**	10,7
558	5,57	**558**	7,91	**558**	5,23	**558**	9,48
536	4,78	**536**	6,37	**536**	13,12	**537**	12,95
433	101,5	**460**	148	**505**	15	**527**	14,9
				471	6,3	**436**	181
				409	130,9		

Laburdurak: λ: uhin-luzera; ε: estintzio molekularraren koefizientea.

A eta b klorofilen eta horien deribatuen espektroek bi absortzio-banda estu erakusten dituzte: bata espektro elektromagnetikoko eremu gorrian (600 - 700 nm-ren artean), zeina kolore berdearen erantzulea baita, eta bestea eremu urdinean (400 - 500 nm-ren artean). Azken banda horri *Soret banda* deitzen zaio,

eta porfirina eraztuna duten molekulei dagokie. Eremu gorrian agertzen den banda, berriz, espezifikoki klorofilei dagokie.

Barazki-estraktuko klorofilen eta horietatik eratorritako feofitinen kontzentrazioa UV-Vis espektrofotometriaren bidez determina daiteke. Patroi-disoluzioak erabiliz eta uhin-luzera desberdinetan absorbantziak neurtuz, ekuazio batzuk proposatu dira pigmentu horien kontzentrazioa modu sinple eta azkar batean kalkulatzeko.

% 80ko azetona erauzketa-disolbatzaile bezala erabiliz, Vernon eta lankideek (1960) honako ekuazio hauek proposatu zituzten a eta b klorofilen (a Kl et b Kl) eta dagokien feofitinen (a Ff eta b Ff) kontzentrazioa balioztatzeko, ziazerba-estraktuaren absorbantzia 665 (A_{665}), 649 (A_{649}), 666 (A_{666}) eta 655 (A_{655}) nm-tan neurtu ondoren:

$$a\ Kl\ (mg/L) = 11{,}63 \times A_{665} - 2{,}39 \times A_{649}$$
$$b\ Kl\ (mg/L) = 20{,}11 \times A_{649} - 5{,}18 \times A_{665}$$
$$a\ Ff\ (mg/L) = 20{,}15 \times A_{666} - 5{,}87 \times A_{655}$$
$$b\ Ff\ (mg/L) = 31{,}90 \times A_{655} - 13{,}40 \times A_{666}$$

3.2. Helburuak

Praktika honen helburu nagusiak honako hauek dira:

- Klorofilen egonkortasun termikoa balioztatzea, uretan egosteak ziazerbako pigmentu horien degradazioan duen eragina aztertuz.
- Klorofilaren degradazio-prozesuan sakontzea, horretatik sor daitezkeen molekulak ezagutuz.
- Klorofilen eta haien deribatuen erauzketa eta haien kuantifikazioa gauzatzea UV-Vis espektrofotometriaren bidez.
- Lortutako datu esperimentalak eta kalkulatutako amaierako emaitzak intrepretatzea, iturri bibliografiko fidagarrietan oinarrituz.

3.3. Prozedura esperimentala

3.3.1. Ziazerben aurre-prestaketa eta tratamendu termikoa

LAGINAK

- Ziazerba izoztuak

EKIPOAK

- Balantza granatarioa (ziurgabetasuna ± 0,1 g)
- Mikrouhin-labea
- Berogailu-plaka

MATERIALA

- 2 x laban
- 2 x espatula (zurezko kirtenarekin)
- Lapikoa
- 4 x plater
- Bitsadera
- Aluminiozko papera
- Sukaldeko papera
- Sukaldeko ohola

ZIAZERBEN AURRE-PRESTAKETA

1. Mikrouhin-labean 100 g ziazerba inguru desizoztu.

2. Ziazerben zurtoinak baztertu, eta gorde hosto berdeak, aztertuko diren laginak dira eta.

3. Hostoak zatikatu laban bat erabiliz, lagin-partikularen tamaina homogeneoa lortu arte.

4. Zatitutako hosto gordinak plater batean jarri, eta aluminiozko papera erabiliz estali, lagineko pigmentuak argitik babesteko.

ZIAZERBEN EGOSKETA URETAN

1. Tratamendu termikoak ziazerbetako klorofilen egonkortasunean duen eragina ezagutzeko, erreserbatu zatitutako laginaren zati bat, eta kantitate nahikoa gordin eran gorde ondorengo erauzketak egiteko. Hau da **0. lagina** (= ziazerba gordina). Gainerako lagina ur irakinetan egosiko da.

2. Horretarako, lapikoa urez bete, eta berogailu-plakaren gainean jarri 100 ºC-an berotzeko. Ura irakiten hasten denean, bota gainerako ziazerba zatituak eta utzi egosten.

3. Hamar minutu pasa eta gero (oharra: denbora kontatzen hasten da ura berriro irakiten hasten den momentutik), bitsadera erabiliz, atera lapikotik egositako ziazerben kantitatearen herena, gorde plater batean, eta estali aluminiozko paperaz. Hori izango da **1. lagina** (10 minutuz egositakoa).

4. Utzi gainerako ziazerbak egosten. 25 minutu pasatu eta gero, bitsadera erabiliz, atera lapikotik geratzen den ziazerben erdia, gorde plater batean, eta estali aluminiozko paperaz. Hori izango da **2. lagina** (25 minutuz egositakoa).

5. Behin 35 minutu igarota, atera lapikotik beste erdia, gorde plater batean, eta estali aluminiozko paperaz. Hori izango da **3. lagina** (35 minutuz egositakoa).

6. Lagin bakoitza sukaldeko paperarekin xukatu, eta giro-tenperaturan hozten utzi, pigmentuak erauzi baino lehen.

3.3.2. Klorofilen eta horien deribatuen (feofitinak) erauzketa

LAGINAK

- Ziazerba gordinak (0. lagina)
- Ziazerba egosiak (1., 2., 3. laginak)

EKIPOAK

- UV-Vis espektrofotometroa
- Homogeneizagailua
- Huts-ponpa
- Balantza granatarioa (ziurgabetasuna ± 0,1 g)

MATERIALA

- 4 x 250 mL-ko hauspeakin-ontzi
- 4 x 200 mL-ko matraze aforatu
- 2 x 100 mL-ko probeta
- *Büchner* inbutua
- 250 mL-ko kitasato matrazea
- Iragazpapera
- 4 x erloju-beira
- 4 x 3 eta 4 x 5 cm-ko diametroko inbutu koniko
- 2 x beirazko neurtzeko kubeta

ERREAKTIBOAK

- Azetona (% 80)

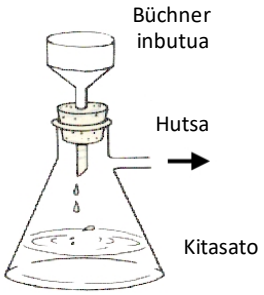
LAGIN MOTA BAKOITZETIK PIGMENTUEN ERAUZKETA

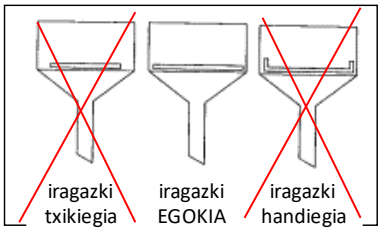
1. Erloju-beiraren gainean, lagin mota bateko 1 g pisatu balantza granatarioan.

2. Jarraian, 250 mL-ko hauspeakin-ontzi batean pisatutakoa bota, eta, probeta erabiliz, 40 mL azetona gehitu.

3. Pigmentuak matraze begetaletik erauzteko, programatu homogeneizagailuaren abiadura 13500 rpm-tan. Behin hori eginda, lagina homogeneizatu hauts disolbaezin bihurtu arte. (Oharra: hondakinak koloregabea / kolore marroi argikoa izan behar du).

4. Lortutako estraktu homogeneoa hutsean iragazi. Horretarako. iragazpaper arrunta, *Büchner* inbutua, 250 mL-ko kitasatoa eta huts-ponpa erabili behar dira, **3.4. irudian** agertzen den bezala. Hutsean egindako iragazketa ondo burutzeko, iragazpapera ondo egokitu behar da (**3.4. irudia**).





3.4. irudia. Pigmentu-estraktuak hutsaren bidez iragazteko materialen antolamendua eta iragazpaperaren gaineko argibideak.

5. Iragazketa bukatzear dagoenean, erauzitako pigmentu guztiak ondo berreskuratzeko, iragazpaperean dagoen hondakin begetalari 50 mL azetona gehitu eta jarraitu iragazten.

6. Errepikatu 5. pausoa.

7. Itzali huts-ponpa.

8. Kitasatoan dagoen soluzioan laginetik erauzitako pigmentuak egongo dira. Beraz, inbutu bat erabiliz, bota kitasatoan dagoen azetona-estraktua 200 mL-ko matraze aforatu batean.

9. Arrasean jarri azetonarekin 200 mL-ra. Jarri tapoia, eta aluminiozko paperez estali matrazea. UV-Vis espektrofotometroan neurketak egin arte, estraktua argitik eta oxigenotik babestua gorde behar da. Gainerako laginetarako, errepikatu prozedura osoa. Hurrengo irudian, denbora desberdinez egositako ziazerben estraktuak ikus daitezke (**3.5. irudia**).

3.5. irudia. 0.- 3. laginei dagozkien azetona-estraktuak.

3.3.3. Klorofilen eta horien deribatuen (feofitinak) kuantifikazioa

Pigmentuak kuantifikatzeko, ultramore-ikusgarri espektrofotometria erabiliko da. Ultramore-ikusgarri espektrofotometroan, lau estraktuen absorbantziak (A) bi aldiz neurtuko dira lau uhin-luzera desberdinetan (λ = 666, 665, 655 eta 649 nm-tan, hurrenez hurren).

Oharrak:

- Espektrofotometroko kubetak oso garbi egon behar dira, hatz-aztarnarik gabe. Hori dela eta, alde opakuetatik hartu behar dira, eta,

espektrofotometroan sartu baino lehen, albo gardenak trapu leun batekin garbitu behar dira (ez erabili papera).

- Uhin-luzera bakoitzean absorbantziak neurtzeko, ekipoa kalibratu behar da. Horretarako, % 80ko azetonaren soluzioa erabiliko da (hau da, absorbantzia zeroan finkatzeko).

- Behin uhin-luzera jakin batean estraktu guztien absorbantziak neurtuta, aldatu uhin-luzera, kalibratu berriro ekipoa, eta neurtu lau estraktuen absorbantzia. Prozedura bera egin 3. eta 4. uhin-luzerekin.

Bete honako taula hau (**3.2. taula**) lortutako datuekin.

3.2. taula. Laginen absorbantzia-balioak uhin-luzera desberdinetan neurtuta, UV-Vis espektrofotometriaren bidez.

		Absorbantzia (A)			
		0. lagina gordina	**1. lagina** 10 min, 100 ºC	**2. lagina** 25 min, 100 ºC	**3. lagina** 35 min, 100 ºC
λ = 666 nm	1. neurketa				
	2. neurketa				
λ = 665 nm	1. neurketa				
	2. neurketa				
λ = 655 nm	1. neurketa				
	2. neurketa				
λ = 649 nm	1. neurketa				
	2. neurketa				

3.4. Emaitzak eta erantzun behar diren galderak

1. Eskuratutako absorbantzia (A_λ) datuekin, estraktu bakoitzeko a eta b klorofilen kontzentrazioak (a eta b Kl) kalkulatu behar dira. Horretarako, honako bi ekuazio hauek erabili behar dira:

$$a\ Kl\ (mg/L) = 11{,}63 \times A_{665} - 2{,}39 \times A_{649}$$
$$b\ Kl\ (mg/L) = 20{,}11 \times A_{649} - 5{,}18 \times A_{665}$$

A_X: X nm-tan neurtutako absorbantzia

Era berean, estraktu guztietarako, a eta b feofitinen kontzentrazioak (a eta b Ff) kalkulatu beste ekuazio hauek aplikatuz:

$$a\ Ff\ (mg/L) = 20{,}15 \times A_{666} - 5{,}87 \times A_{655}$$
$$b\ Ff\ (mg/L) = 31{,}90 \times A_{655} - 13{,}40 \times A_{666}$$

A_X: X nm-tan neurtutako absorbantzia

Kalkulatutako datuekin, bete honako **taula 3.3.** hau (Oharra: aurkeztu datuak bi dezimalekin).

3.3. taula. Azetona-estraktuetako pigmentuen kontzentrazioak, mg/L-tan adierazita.

Kontzentrazioa (mg/L)	**0. lagina**			**1. lagina**		
	1. neurketa	2. neurketa	BB ± DE	1. neurketa	2. neurketa	BB ± DE
a Kl						
b Kl						
a Ff						
b Ff						
Kontzentrazioa (mg/L)	**2. lagina**			**3. lagina**		
	1. neurketa	2. neurketa	BB ± DE	1. neurketa	2. neurketa	BB ± DE
a Kl						
b Kl						
a Ff						
b Ff						

Laburdurak: BB: batez bestekoa; DE: desbideratze estandarra; a Kl: a klorofila; b Kl: b klorofila; a Ff: a feofitina; b Ff: b feofitina.

2. Esperimentuan zehar egindako diluzio eta bolumen-doitze guztiak eta hasierako ziazerba laginaren pisua kontuan hartuta, pigmentuen kontzentrazioa mg pigmentu/100 g ziazerba (pisu hezean) determinatu behar da. Azaldu nola egin diren kalkuluak, eta aurkeztu emaitza guztiak honako **3.4. taula** honetan. (Oharra: aurkeztu datuak bi dezimalekin).

3.4. taula. Azetona-estraktuetako pigmentuen kontzentrazioak, mg/100 g pisu hezean adierazita.

Kontzentrazioa (mg/100 g pisu hezean)	**0. lagina**	**1. lagina**	**2. lagina**	**3. lagina**
a Kl				
b Kl				
a Ff				
b Ff				

Laburdurak: a Kl: a klorofila; b Kl: b klorofila; a Ff: a feofitina; b Ff: b feofitina.

3. Tratamendu termikoan zehar emandako ur-galera kontuan hartuz, adierazi a eta b klorofilen eta a eta b feofitinen kontzentrazioa mg pigmentu/100g ziazerba pisu lehorrean (Oharra: aurkeztu datuak bi dezimalekin). Kalkuluak egiteko, kontuan hartu lagin mota bakoitzari dagokion ur-portzentajea: 0. lagina ~ % 90; 1. lagina ~ % 84,6; 2. lagina ~ % 82,4; 3. lagina ~ % 80,5.

Klorofilen eta feofitinen kontzentrazioaren eboluzioa denboran modu egokiagoan aztertu ahal izateko, balioak pisu hezetik lehorrera pasatzea gomendatzen da. Izan ere, beroketan zehar, ziazerbako hezetasuna murrizten da, denbora pasatu ahala murrizketa nabariagoa izanik. Laginen hezetasunak eragina du pisu hezean adierazitako kontzentrazioetan, zeinak faltsuak diren baieztapenetara eraman baitezake.

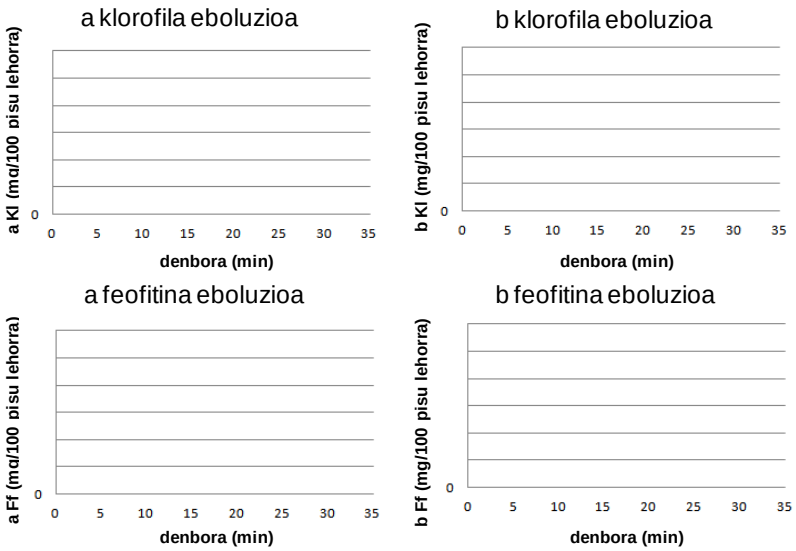
Azaldu nola egin diren kalkuluak, eta aurkeztu emaitza guztiak taula batean (oharra: aurkeztu datuak bi dezimalekin).

3.5. taula. Azetona-estraktuetako pigmentuen kontzentrazioak, mg/100 g pisu lehorrean adierazita.

Kontzentrazioa (mg/100 g pisu lehorrean)	**0. lagina**	**1. lagina**	**2. lagina**	**3. lagina**
a Kl				
b Kl				
a Ff				
b Ff				

Laburdurak: a Kl: a klorofila; b Kl: b klorofila; a Ff: a feofitina; b Ff: b feofitina.

4. Tratamendu termikoan zehar pigmentuen eboluzioa ikusteko, irudikatu grafikoki laginen kontzentrazio-balioak (mg pigmentu/100 g ziazerba pisu lehorrean). Adibidez, antzeko grafikoak egin.



5. Aztertu grafikoak, eta erantzun honako galdera hauek:

- Egosketa-denbora pasatu ahala, zer gertatzen da a eta b klorofilekin? Eta feofitinekin?
- Grafikoetan ikusten den eboluzioa espero den bezalakoa da? Ezetz bada, eman balizko arrazoiak.

6. Komentatu lortutako datuak, eta, iturri bibliografiko fidagarriak kontsultatu ondoren, azaldu uretan tratamendu termikoak nolako aldaketak eragiten dituen landare-jatorriko elikagaietako klorofiletan.

3.5. Bibliografia

Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology, 24*(1), 1.

Association of Official Analytical Chemists, & Association of Official Agricultural Chemists (US). (1980). *Official Methods of Analysis* (13. lib.).

Badui Dergal, S. (2016). *Química de los Alimentos*. Mexiko, Pearson Educación.

Borello, E., Roncucci, D., & Domenici, V. (2021). Study of the evolution of pigments from freshly pressed to 'on-the-shelf' extra-virgin olive oils by means of Near-UV Visible Spectroscopy. *Foods, 10*(8), 1891.

Fennema, O. R., Damodaran, S., & Parkin, K. L. (2017). Chapter 10: Colorants. *Fennema's Food Chemistry* (681-752). CRC Press.

Harris, D. C. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. Reverté.

Mérillon, J. M., & Ramawat, K. G. (arg.). (2019). *Bioactive molecules in food*. Springer.

Schwartz, S. J., & Lorenzo, T. V. (1990). Chlorophylls in foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 29*(1), 1-17.

Vernon, L. P. (1960). Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts. *Analytical Chemistry*, *32*(9), 1144-1150.