

Ispitivanje odnosa sadržaja ukupnih proteina i albumina iz jetre pastrmke (*Salmo trutta*) i azotnih jedinjenja u vodi

Ispitivane su koncentracije albumina i ukupnih proteina u jetrama ribe pastrmke, iz reke i ribnjaka, kao i koncentracije nitrata i neproteinskog azota uzoraka vode iz reke i ribnjaka. Koncentracije albumina su određivane u serumu sa bromkrezolzelenim, koncentracije ukupnih proteina određivane su Biuretskom metodom, dok su koncentracije nitrata određivanje spektrofotometrijski sa natrijum-salicilatom i koncentracija azota su određivane po Kjeldahl metodi. Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između koncentracija ukupnih proteina ovih uzoraka u jetrama riba i nitrata u vodi, dok statistički značajna razlika nije prisutna između koncentracija albumina u jetrama ribe i koncentracija neproteinskog azota u vodi. Kod riba gajenih u ribnjaku dolazi do smanjene koncentracije ukupnih proteina u jetri, što za posledicu može imati smanjenje hranljive vrednosti.

Uvod

Meso ribe predstavlja značajan, a u mnogim zemljama sveta i dominantan izvor proteina (od 15 do 24 procenata). Procenjuje se da se blizu 15 procenata potreba za životinjskim proteinima u svetu podmiruje potrošnjom ribe. Stručnjaci, naročito, preporučuju korišćenje ribe i plodova voda u ishrani ljudi zbog povoljnog sadržaja proteina, minerala, vitamina, a posebno esencijalnih masnih kiselina u mesu ribe, za koje je dokazano da pogoduju u prevenciji mnogobrojnih oboljenja (Baltić *et al.* 2009). Meso ribe odlikuje se visokom biološkom vrednošću, a prednost

u odnosu na crveno meso jeste, laka svarljivost. Prema tome, ribu mogu jesti čak i bolesnici i zbog toga u mnogim zemljama riblje meso svrstavaju u dijetetsku namirnicu. RIBE koje su gajene u ribnjacima imaju manju biološku vrednost, od riba koje su gajene u rekama, što u stvari predstavlja odnos količine azota u belančevini koji je telo iskoristilo i količine azota koji je apsorbovan kroz aminokiseline u sistemu za varenje. Pretpostavlja se da će ukupni broj proteina i albumina u jetri ribe zavisi od koncentracije nitrata i neproteinskog azota u vodi koja je stanište ribe. Neposredni cilj projekta je određivanje koncentracije ukupnih proteina i albumina iz jetre ribe i koncentracije nitrata i neproteinskog azota iz uzoraka riba gajenih u reci i ribnjaku.

Materijal i metode

Nakon žrtvovanja i disekcije jetri riba, jetre su homogenizovane, a potom su određene i koncentracije albumina i ukupnih proteina u tim uzorcima.

Homogenizacija jetri

Napravljeno je po osam grupa za ribnjak i reku. Jednu grupu su sačinjavale dve jetre. Ceo postupak homogenizacije je rađen na ledu, i homogenizacija je vršena u fosfatnom puferu (pH = 7.4), tako što je za 1 g jetre uzimano 4 mL pufera. Tako dobijeni uzorci su centrifugirani (10 min. na 10 000 obrtaja), a potom izdvojeni supernatanti.

Određivanje koncentracije ukupnih proteina, Biuretskom metodom. Metoda zasniva se na osobini peptidne veze da u jako alkalnoj sredini gradi ljubičasti kompleks sa Cu(II) koji ima apsorpcione maksimume na 545 nm, i na 260 nm. Intenzitet boje, pod određenim eksperimentalnim uslovima, proporcionalan je koncentraciji peptidnih veza, odnosno proteina.

Anka Jevremović (1993), Arilje, Trg Bratstva i jedinstva 1, učenica 2. razreda gimnazije Srđ „Sveti Ahilije” Arilje,

MENTOR: Vedrana Savić, studentkinja Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

U 0.5 mL rastvora (koji sadrži približno 3 mg proteina), tj. uzorka, dodato je 2.5 mL Biuretskog reagensa. Po grupi su bila tri ponavljanja (24 ponavljanja za reku i 24 ponavljanja za ribnjak). Koncentracija proteina je određena na osnovu standardne prave koja je pripremljena pomoću albumina poznate koncentracije (5 mg/mL). Napravljen je rastvor 0.9 % rastvora natrijum-hlorida, kao i Biuret reagensa.

Nakon 20-30 min. merena je apsorbancija na 540 nm u svakoj probi. Merenje se vrši naspram fiziološkog rastvora kao slepe probe. Uzorci su pre merenja centrifugirani 10 min. na 10000 obrtaja.

Određivanje albumina u serumu sa bromkrezolzelenim. Albumini se svojim aminogrupama vezuju sa molekulima indikatora bromkrezolzelenim (BSG, bromcresolgreen).

Napravljen je (0.04 mmol/L, pH = 3.8) pufirani rastvor BSG-a koji je sadržao: 94.5 mL, 1 mol/L glicina, 5.5 mL 1 mol/L HCl i 2 mL BSG-a i ova tri reagensa su pomešana sa 800 mL destilovane vode. Tako napravljen reagens se čuvao na +4°C, u tamnoj boci. Standardna prava za albumine je pravijena od sedam koncentracija (20, 30, 40, 50, 60, 70 i 80 mg/mL), a za svaku koncentraciju su vršena po tri ponavljanja. Pipetirano je po 2 mL BSG reagensa (4 puta razblaženog) i 10 µL uzorka, za standardu pravu, dok je za koncentracije albumina u uzorcima pipetirano 16 µL uzorka i 2 mL BSG reagensa 4 puta razblaženog. Nakon pipetiranja, sadržaj se promućkao i u roku od 60 s apsorbancija se merila na 637 nm, bez centrifugiranja.

Napomena: Reakcija indikatora sa albuminima nije specifična, jer vremenom reaguju i globulini, ali sporije. Zato je važno da se fotometriira što brže, pošto se uzorak doda reagensu, a najkasnije u roku od jednog minuta (dok su ovi uzorci pipetirani u roku od 30-45 s). Koncentracije albumina su određivane u osam grupa, po pet ponavljanja po grupi svake.

Određivanje nitrata (Spektrofotometrijski sa natrijum-salicilatom). Nitrati su određivani spektrofotometrijskom metodom sa natrijum salicilatom. U pet Petrijevih šolja je odmereno po 20 mL osnovog rastvora nitrata (koncentracija 20, 10, 4, 2 i 1 µg/mL u destilovanoj vodi), dok se uz standarde spremila i slepa proba koja je sadržala 20 mL destilovane vode i 0.25 mL, 0.1 M natrijum-salicilata. Pored standardne prave, spremljeni su uzorci vode iz reke i ribnjaka, četiri ponavljanja za reku i tri ponavljanja za ribnjak, i ona su sadržala po 20 mL uzorka vode i 0.25 mL, 0.1 M natrijum-salicilata. Onda su sve Petrijeve šolje

stavljene u sušnicu, do uparavanja sadržaja, na 100°C. Nakon sat i po vremena, uzorci su ohlađeni. Nakon toga u svaki je dodato po 2 mL koncentrovane sumporne kiseline, a nakon 10 min. 15 mL destilovane vode i 15 mL rastvora NaOH-Senjetove soli, pri čemu se razvila žuta boja. Posle 10 min. jačina boje je bila konstantna, i apsorbancija je merena na 420 nm. Za izračunavanje koncentracije nitrata, vršena su četiri ponavljanja za reku, i tri ponavljanja za ribnjak.

Određivanje azota po Kjeldahlu. Napravljeni su 23% rastvor NaOH (200 mL) i 8.54 M HCl (300 mL). Prvo je istitrovana HCl sa nekoliko kapi metil-orandža, natrijum-hidroksidom, odmereno je tri puta po 15 mL HCl, i polako titrovano sa NaOH (uz postepeno dodavanje metil-oranža), dok indikator nije promenio boju iz roze u žutu. Tako je srednja vrednost zapremina istitrovanog NaOH iznosila 15.13 mL. Zatim je u destilacioni balon sipano po 200 mL uzorka (posebno su se vršili procesi za različite sredine), 3 granule cinka, a čašu u koju je bio uronjen levak, drugi kraj aparature, niz kondezator, sipano je 50 mL HCl (8.54 M). U balon sa uzorkom vode, stavljeno je 30 mL NaOH, i nakon toga se smeša zagrevala, do ključanja, dok amonijak nije počeo da prolazi kroz kondezator i uliva se u čašu sa HCl. Kada se otprilike napunila čaša do zapremine od 150 mL, prekinuto je zagrevanje (od 200 mL uzorka, dobijeno 100mL amonijaka + HCl). Nakon što se sve ohladilo istitrovano je NH₃ + HCl sa NaOH tri puta po 15 mL je odmereno uz metil-oranž i srednja zapremina za reku iznosila je 3.53 mL, dok je za ribnjak iznosila 3.57 mL. Dobijeni azot je preračunat po obrascu:

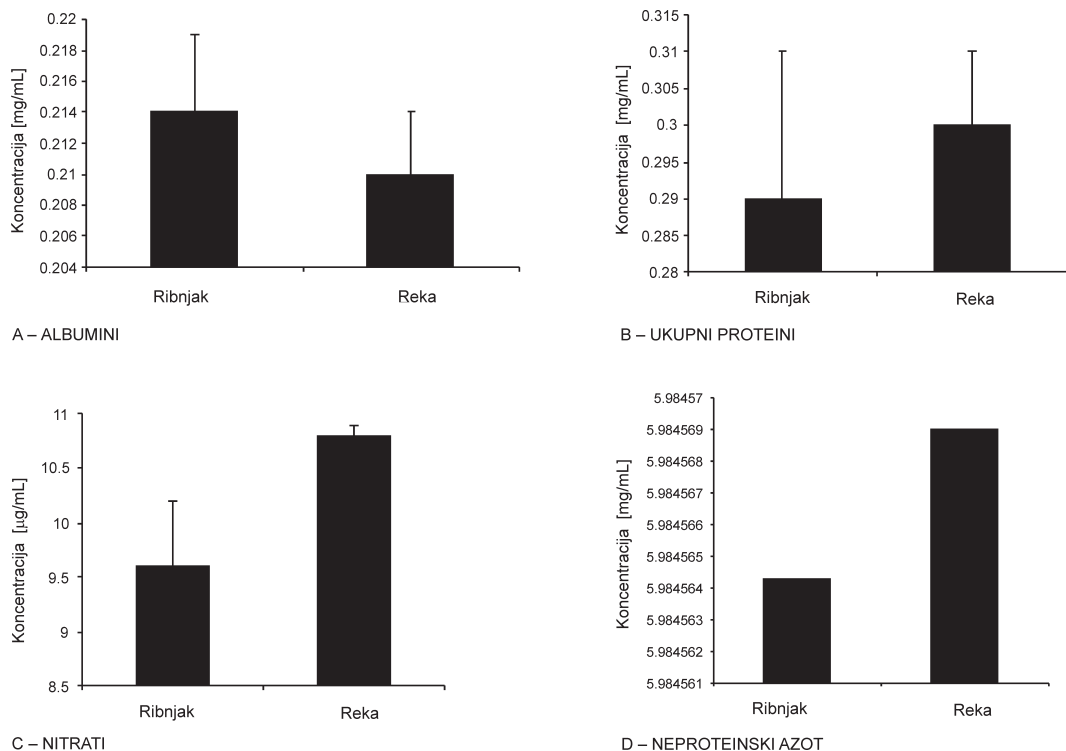
$$N = [(50 \times N_{\text{HCl}} - V \times N_{\text{NaOH}}) / 1000] \times 14.008.$$

Za izračunavanje koncentracije azota, uzeta je jedna grupa, sa po tri ponavljanja (za reku i za ribnjak).

Statistička analiza. Sve statistička preračunavanja i grafici su pravljeni u programu Microsoft Office Excel 2003, a statistički značajna razlika je procenjena t-testom.

Rezultati i diskusija

Koncentracije albumina, ukupnih proteina i nitrata su određene na osnovu prethodno napravljenih standardnih prava. Koncentracije albumina u uzorcima riba iz ribnjaka su iznosile 0.214±0.005, a za



Slika 1. Koncentracije albumina (A), ukupnih proteina (B), nitrata (C) i neproteinskog azota (D)

Figure 1. Concentrations of albumin (A), total protein (B), nitrates (C) and nonprotein nitrogen (D), in the pond (left) and river (right)

uzorke iz reke koncentracije su iznosile 0.210 ± 0.004 (slika 1A). Srednje vrednosti koncentracija ukupnih proteina u uzorcima riba iz ribnjaka su iznosile 0.29 ± 0.02 , dok su srednje vrednosti koncentracija za uzorke riba iz reke iznosile 0.30 ± 0.01 (slika 1B). Srednje vrednosti koncentracija nitrata u uzorcima vode iz ribnjaka su iznosile 9.6 ± 0.6 , a srednje vrednosti koncentracije za uzorke vode iz reke su iznosile 10.8 ± 0.1 (slika 1C). U reci je bilo 5.9845690 a u ribnjaku 5.9845643 mol/L azota (slika 1D).

Dobijeni rezultati su pokazali da postoji statistički značajna razlika između koncentracija ukupnih proteina ovih uzoraka u jetrama riba i nitrata u vodi, dok statistički značajna razlika nije prisutna između koncentracija albumina u jetrama ribe i koncentracija neproteinskog azota u vodi.

Zaključak

Ovim istraživanjem pokazano je da su koncentracije proteina u jetrama riba zavisne od koncentracije nitrata u vodi gde je riba gajena. Povećanje koncentracije proteina u jetri ribe ne ide na račun povećanja koncentracija albumina, već drugih proteinskih molekula jetre. Ukupna količina azota, neproteinske prirode, koja je detektovana u vodi ne korelira sa koncentracijama ni albumina ni ukupnih proteina u jetrama riba. Kod riba gajenih u ribnjaku dolazi do smanjene koncentracije ukupnih proteina u jetri, što za posledicu može imati smanjenje hranljive vrednosti, za šta su potrebna detaljnija istraživanja.

Zahvalnost. Zahvaljujem se svojoj mentorki Vedrani Savić, studentkinji Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, na pomoći i podršci pri realizaciji ovog rada, kao i mr Milošu Rokiću, Institut za fiziologiju Akademije nauka Češke republike, na pruženoj stručnoj pomoći.

Literatura

- Baltić Ž. M., Kilibarda N., Dimitrijević M. 2009. *Činioci od značaja za održivost ribe i odabranih proizvoda od ribe u prometu*. Beograd: Institut za higijenu i tehnologiju mesa
- Pachon H., Stoltzfus R. J., Glahn R. P. 2008. Homogenization, lyophilization or acid-extraction of meat products improves iron uptake from cereal–meat product combinations in an in vitro digestion/Caco-2 cell model. *British Journal of Nutrition*, **101**: 816.
- Rocha M. J., Rocha E., Resende A. D., Lobo-da-Cunha A. 2003. Measurement of peroxisomal enzyme activities in the liver of brown trout (*Salmo trutta*), using spectrophotometric methods, *BMC Biochemistry*, **4**: 6.
- Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu. 1990. *Voda za piće – standardne metode za ispitivanje higijenske ispravnosti*. Beograd: Privredni pregled, str. 33-34.
- Štraus B. 1988. *Medicinska biokemija*. Zagreb: Jugoslavenska medicinska naklada

Anka Jevremović

Relation of Total Protein and Albumin Content in Trout (*Salmo trutta*) Liver and Nitrogen Compound Content in Water

Fish meat is characterized by high biological value and its advantage over red meat is easy digestibility. Therefore, fish can be eaten even by patients and in many country fish meat is classified as dietary food.

The immediate objective of this research is to determine the concentrations of total proteins and albumin in the liver of fish and the concentrations of

nitrate and nonprotein nitrogen in samples from fish reared in a river and a pond.

The first homogenization of the liver was performed in a phosphate buffer (pH = 7.4). After this, four stages were made: concentrations of albumin (in serum with bromocresolgreen) and total protein (Biuret method) from the liver of fish, and concentrations of nitrates and nonprotein nitrogen. The concentration of albumin was done in a buffer solution (BSG – bromocresolgreen) by adding 16 µL of the sample and 2 mL of BSG (4x diluted). After that, within 60 seconds, absorbency was measured at 637 nm. The concentration of total protein was determined by adding 2.5 mL of Biuret reagent into 0.5 mL of solution (containing approximately 3 mg of protein). After 20-30 minutes absorbency was measured at 540 nm. The concentration of nitrogen from the water was determined in the following way: the samples contained 20 mL samples of water and 0.25 mL, 0.1 M sodium-salicylate (river and pond). After evaporation, 2 mL of concentrated sulfuric acid was added, and after 10 minutes distilled water and solution of NaOH was added. Later, yellow color developed. Absorbency was measured at 420 nm. The concentrations of nonprotein nitrogen were determined by titration (with a solution of NaOH), with the help of methyl-orange. The amount of nitrogen is expressed with the form:

$$N = [(50 \times N_{\text{HCl}} - V \times N_{\text{NaOH}}) / 1000] \times 14.008.$$

It was found that the concentrations of albumin in the liver from the pond were 0.214±0.005, and from the river 0.210±0.004, and the concentrations of total protein in the liver from the pond were 0.29±0.02, and from the river 0.30±0.01. The concentrations of nitrates from the pond were 9.6±0.6, and from the river 10.8±0.1. In the river there was 5.9845690 mol/L of nitrogen, and in the pond there was 5.9845643 mol/L of nitrogen. This research has shown that the concentrations of total protein in the liver of fish depend on the concentrations of nitrates in the river where the fish has grown. The results showed that there is a statistically significant difference between the samples of concentrations of total protein from the fish liver, and between concentrations of nitrates from the water. In fish reared in ponds there is a reduction of the concentrations of total protein from fish liver, which may result in a decrease in nutritional value.

