

**BROİLER CİVCİVLERİNDE YEMDEKİ YAĞ KALİTESİ VE VİTAMİN E
ORANI GÖZ ÖNÜNDE TUTULARAK PENTAN ÜRETİMİNİN CANLI
HAYVAN (İN VİVO) VE BARSAK İÇERİĞİNDE BELİRLENMESİ¹**

Berrin Salmanoğlu² H.P. Sallmann³ H. Fuhrmann⁴

**Pentane production of broiler chickens (In-vivo and in the intestinal chyme) under influence
of feed fat quality and vitamin E supply)**

Summary: *In this study, the mechanism of pentane formation in broiler chickens fed on feed containing artificially prepared oxidized fat (at level of 10 %) was investigated.*

The broiler chickens were placed in a closed system and the pentane in the exhaled air concentrated and measured using gas chromatography. Similar pentane gas formed in vitro in the intestine contents was also determined quantitatively using the same method. In order to prevent the bacterial production of pentane various antibiotics (Gentamycin, Monensin, Clindamycin) were used in vivo and in vitro.

In experiments four groups of twelve one-day-old broiler chickens were used. Two of the groups were fed with fresh fat (Peroxide number 1), the other two groups were fed with oxidized fat (Peroxide number: 400). At the same time different levels of vitamin E (20 ppm to 100 ppm) were included in the feed containing the same amount of fat.

The results showed that lipid-peroxides ingested with the feed in poultry are not degraded by bacteria but are converted spontaneously secondary products, (e.g, pentane).

1 Bu çalışma, aynı başlıklı doktora tezinden özetlenmiştir.

2 Dr, Araş. Gör., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara

3 Prof. Dr., Hannover Veteriner Yüksek Okulu, Fizyolojik Biyokimya Enstitüsü,
Hannover.

4 Dr., Hannover Veteriner Yüksek Okulu, Fizyolojik Biyokimya Enstitüsü.

Özet: *Bu çalışma suni olarak okside edilmiş yağ ile hazırlanan (oran % 10) yemlerle beslenen broiler civcivleri üzerinde pentanın oluşum mekanizması incelendi:*

Kapalı sisteme yerleştirilen broiler civcivlerinin solunum havasındaki pentan yoğunlaştırılarak ve daha sonra da barsak içeriğinde (in vitro) üretilen pentan gaz kromatografisi ile kantitatif olarak saptandı. Pentanın bakteriyel üretilme olasılığını ortadan kaldırmak için çeşitli antibiyotikler (Gentamicin, Monensin, Clindamicin) in vivo ve in vitro kullanıldı.

Deneylerde herbiri 12 tane bir günlük broiler civcivi içeren dört farklı grup kullanıldı. Gruplardan ikisi taze (Peroksid sayısı = 1), diğer ikisi de okside edilmiş yağ (Peroksid sayısı: 400) ile beslenirken, aynı yağ içeren yemlerde farklı vitamin E düzeyleri uygulandı (20 ppm ve 100 ppm).

Deneylerden elde edilen sonuçlara göre; kanatlılarda yemlerle alınan lipid-peroksidler aracılığı ile değil, aksine kendiliğinden ikincil ürünlere (pentan.gibi) ayrıştığı kanısına varıldı.

Giriş

Gelişen modern tıp sayesinde artık insan ve hayvanlarda görülen akut enfeksiyöz hastalıkların hemen hemen tamamı kontrol altına alınabilmişse de, henüz etyolojisi bile tam açıklık kazanmamış enfeksiyöz olmayan metabolik hastalıkların daha geniş kapsamlı olarak araştırılması gerekmektedir. Uzun süredir yapılagelmekte olan temel araştırmalarda, serbest radikallerin hücre membranlarının bütünlüğünü bozduğu ve yakından ilgili olduğunu ortaya çıkarmıştır (8, 10).

Veteriner Hekimlik ve hayvansal ürünler yönünden bu olayın önemi, özellikle beslenmeye bağlı olarak peroksidatif ve antioksidatif sistemler arası dengenin bozulması sonucu pek çok evcil hayvanlarda bilinen hastalıkların ortaya çıkmasından dolayıdır.

Vitamin E ve selenyum gibi antioksidatif maddelerin yemle içim altındaki miktarlarda alınması kanatlılarda besinsel ensefalomalesi (1, 12), enksudatif diatez (12, 14), kas dejenerasyonları (9, 12), pankreas fibrozu (15)'na neden olur.

Et tavukları ve sığır besiciliğinde gerkesinim duyulan enerjiyi karşılamak üzere yemlerle % 10'a varan düzeyde yağ kullanılır. Bozul-

maya karşı bir önlem alınmamış veya uzun süre depolanmamışsa yağ ve yemlerde oksidatif değişimlerin meydana geleceği ortadadır. peroksidasyona uğramış yağlarla beslenenlerde intermedier oksidatif ve peroksidatif metabolizma arasındaki denge bozulacağından autoksidasyon olaylarını başlatır.

Materyal ve Metod

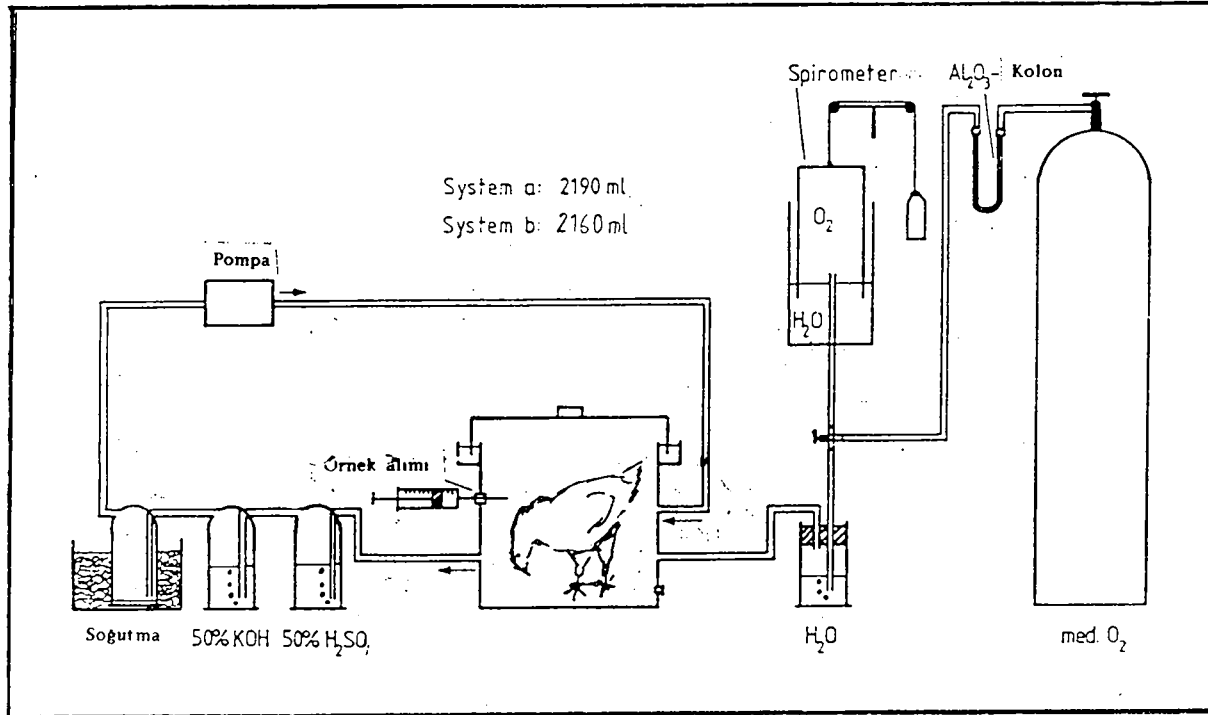
Lipid peroksidasyon olayında parametrelerin tesbiti hassas ve spesifik olmayan yöntemler nedeniyle sorun olmuştur. İlk defa DUMELIN ve TAPPEL (3) ayrıca DILLARD ve ark. (2) tarafından uygulanan yöntemle gerekli duyarlılık sağlanmıştır. Bu araştırmacıların saptanmasına göre etan W-3, pentan W-6 yağ asitlerini içeren yağların peroksidasyonu sonucu açığa çıkan hidrokarbonlar olduğundan ve bunların in-vivo olarak kapalı bir sisteme konulan deney hayvanının solunum havasında saptanmasının mümkün olduğunu ispat etmişlerdir.

Bu çalışma her biri bir günlük 12 civcivden oluşan 4 grup üzerinde yürütüldü. Bu gruplardan ikisi okside edilmiş yağ diğer ikisinde taze yağ ile beslendi. Her bir farklı yağ grubunda biri normal vitamin E ihtiyacı olan 20 ppm, diğeri 100 ppm olmak üzere değişik vitamin E miktarları uygulanan alt gruplara ayrıldı.

In vivo pentan ölçümü

Sekiz günlük civcivlerin kursağına antibiyotik solüsyonları sabah ve akşam olmak üzere günde iki defa uygulandı. Dokuzuncu günde de sabah saat 8 de ve akşam saat 20 de aynı uygulama tekrarlandıktan sonra, 10'cu günün sabah saat 8 de yapılan uygulamasının ardından denemelerde ölçümlere başlandı. Kontrol hayvanlarında antibiyotik yerine serum fizyolojik direkt kursağına verildi.

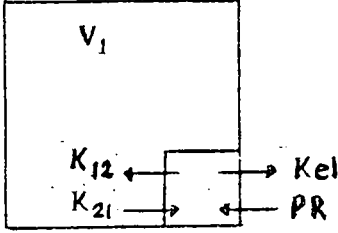
İçine civcivin yerleştirildiği 14 cm yarıçapında 11,2 cm yüksekliğindeki saydam pvc silindirdeki deliklerden birisi, ölçüm esnasında gerekli oksijeni sağlayan siporometre ile irtibatı sağlar, diğer ikisi sisteme eklenen ve sürekli hava sirkülasyonu gerçekleştiren pompa giriş çıkışını sağlar. Sirküle edilen hava asit filtresinde (% 50 H₂ SO₄) NH₃ den, % 50 KOH içinden geçerken de CO₂ den arındırılır. Bu surette 1,5 saate varan deney süresince, hayvanın yaşamı devam ettirilir (Şekil 1).



Şekil 1. Solunum havasında (in vivo) pentan ölçümü yapmak için kurulan sistem
Figur 1. Apparatus set up to measure pentane in expired air (in vivo)

In vivo pentanın hesaplanması

Kapalı sistemde pentan hesaplanırken, solunan havadaki pentanın organizmadaki metabolizmasında göz önüne alınmalıdır. Bu nedenle FILSER ve BOLT'un (5) geliştirdiği model kullanıldı (Şekil 2).



Figur 2. There are two systems, the living organism (CP2) and its surroundings (CP1). The interaction between the gaseous phases of the two systems is given in the equation below.

Şekil 2. Burada bir canlı organizma (CP2) diğeri organizmanın bulunduğu çevre (CP1) olmak üzere iki farklı kompartman söz konusudur. Her iki kompartmanın gaz fazı içindeki ilişkileri aşağıdaki denklemlerle açıklanır.

$$Y_t = C1e^{t1} \cdot t + C2e^{t2} \cdot t + PR \cdot K21 \cdot V1^{-1} \cdot K12^{-1} \cdot Kel^{-1}$$

Y_t = Farklı zaman dilimlerdeki pentan konsantrasyonu

$C1, C2$ = e- Fonksiyonunun kesim noktaları

$t1, t2$ = e- Fonksiyonunun eksponenti

$K12, K21, Kel$ = Hız konstantları

$V1$ = Hayvanın içinde bulunduğu silindirin hacmi-hayvanın hacmi

Pr = Pentan üretim oranı

In vitro pentan ölçümü .

Barsak içeriği olarak, kursaktan başlayıp bezli ve kaslı mide dahil tüm ince barsak ve kloaka hariç kalın barsak içeriği bir homojenizasyon tüpünde toplandı. Homojenize edilen içerik, başka bir homojenizasyon tüpüne eşit olarak paylaştırıldı. Birine antibiyotik çözeltisi diğerine serum fizyolojik konularak tekrar homojenize edildi.

Bu arada 40° C su banyosu yerleştirilmiş 6,7 ml hacmindeki küçük cam şişeciklere 40 ul olmak üzere dağıtıldı ve hemen kapakları kapatılarak çalkalanmak sureti ile 40 dakika inkube edildi. Süre sonunda, şişelerin üst kısmından 1 ml hava, gaz sızdırmaz bir enjektörle alınıp gaz kromatografiye verildi.

In vitro pentan hesabı

$$\frac{PP \times V}{PS \times EW} \times 100 \frac{P\text{-mol pentan}}{100 \text{ mg}}$$

PP = Gaz kromotografide ölçülen peak düzeyi

V = İnkubasyon yapıldığı şişenin hacmi

PS = Standardın peak düzeyi

EW = Örneğin ağırlığı

Kullanılan antibiyotikler ve dozları:

Gentamisin sülfat = 0,16 mg/ml

Monensin = 0,8 ml/ml

Clindamycin HCl = 12 mg/100 g canlı ağırlık

Bulgular

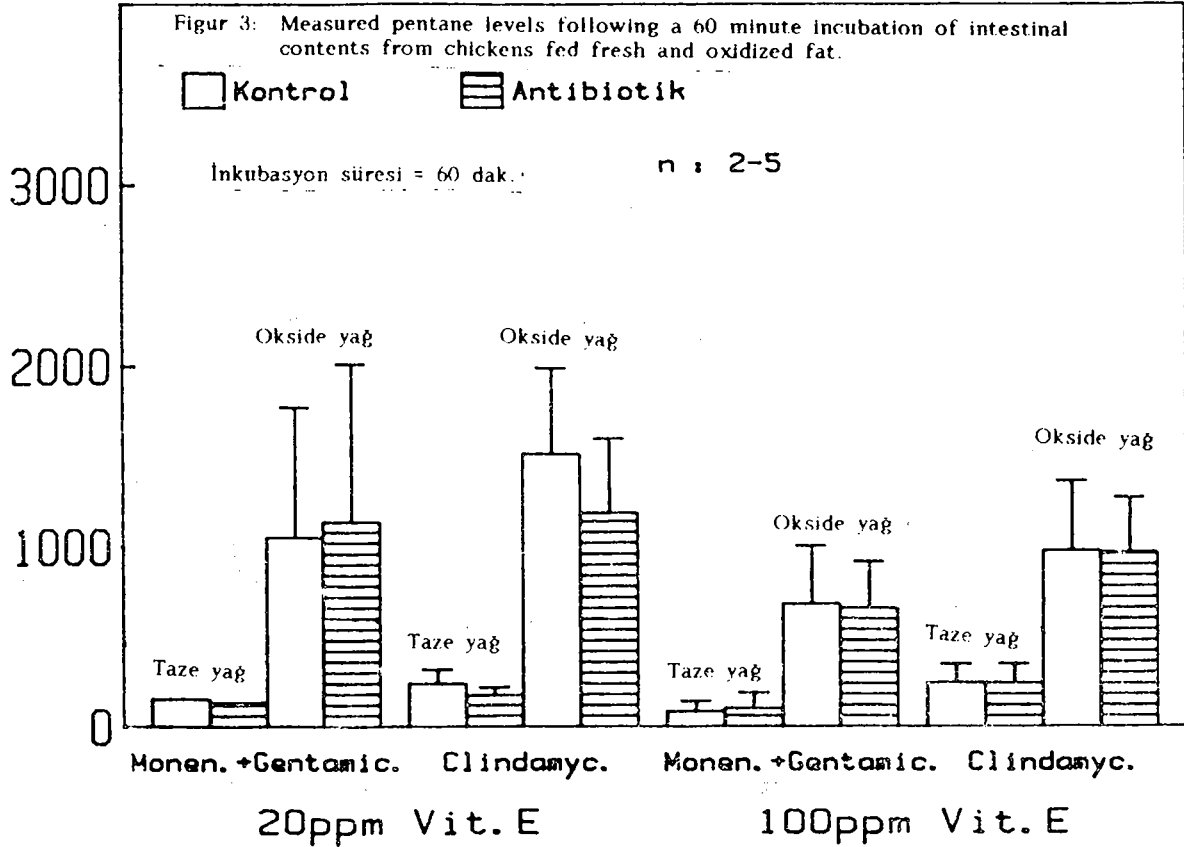
In vitro pentan ölçüm sonuçları:

Yemlerinde okside yağ bulunan civcivlerin barsak içeriğinde, yemle taze yağ alanlara göre % 86,2 oranında daha fazla pentan üretimi saptanmıştır. Bu durum, birbirinden farklı olan üç ayrı inkubasyon süresinde de aynıdır (60 dak., 180 dak., 270 dak.). Kullanılan antibiyotik ve kombinasyonlarının pentan üretimini inhibe edici etkisine hiçbir inkubasyon periyodunda rastlanılmamıştır. Üç faktörlü varyans analizinde (6) (yağ kalitesi, vitamin E oranı ve antibiyotik etkisi göz önünde tutuldu) yağ faktörünün pentan üretimini çok kuvvetli olarak etkilediği ($p < 0,001$) saptanmıştır. Vitamin E'nin pentan üretimini inhibe edici etkisi ilk 60 dakikada belirgin olarak ($p < 0,01$) görülmüşken 180 dakikada bu etki zayıflamış ($p < 0,05$) ve 270 dakikada inkubasyon sonunda da tamamen ortadan kalkmıştır. Varyans analizi ile karşılaştırılan ortalama değerler aşağıda verilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. 60, 180 ve 270 dakikalarda ölçülen pentan miktarının yağ kalitesi ve vitaxin E miktarları göz önünde tutularak değerlendirilmesi.

| | Taze yağ | n | Önemli | Okside yağ | n | Önemli |
|---|----------------------|----------|------------|------------------------|----------|------------|
| 60 dak. 20 ppm Vit. E 100 ppm Vit. E | 188± 67 179± 113 | 14 14 | $p < 0,05$ | 1236± 594 781± 331 | 18 20 | $p < 0,01$ |
| 180 dak. 20 ppm Vit. E 100 ppm Vit. E | 324± 207 257± 157 | 14 14 | $p < 0,05$ | 1889± 716 1326± 582 | 18 20 | $p < 0,05$ |
| 270 dak. 20 ppm Vit. E 100 ppm Vit. E | 446± 260 260± 174 | 14 16 | $p < 0,05$ | 2088± 581 1783± 706 | 18 20 | $p < 0,05$ |

pmol Pentan x 100mg Homogenat



Şekil 3. İn vitro pentan ölçümünde 60 dakikalık barsak içeriğinin inkubasyonu sonucu taze ve okside yem yiyen civcivlerde ölçülen pentan miktarı.

In vivo pentan ölçüm sonuçları:

60 dakika süre ile kapalı sistemde tutulan broiler'in solunum havasında yapılan pentan ölçümünde tablo 2'de görüldüğü gibi pentan üretiminde bir inhibisyon yerine, aksine kontrol grubuna göre biraz daha yüksek üretim söz konusudur. Bunun yanısıra okside yemle beslenenlerde taze yem alanlara göre *in vitro* çalışmada olduğu gibi 4-6 kat daha fazla pentan üretimi olduğu açıkça ortadadır.

Tablo 2.

| | Taze yem 20 ppm Vit. E | | Okside yem 20 ppm Vit. E | | Taze yem 100 ppm Vit. E | | Okside yem 100 ppm Vit. E | |
|--------|---------------------------|------|-----------------------------|------|----------------------------|------|------------------------------|------|
| | X | ± | X | ± | X | ± | X | ± |
| Kontr. | 12.2 | 7.1 | 77.8 | 30.6 | 12.5 | 10.8 | 68.2 | 11.8 |
| Clind. | 20.1 | 11.0 | 128.7 | 50.5 | 7.8 | 0.6 | 109.7 | 54.6 |

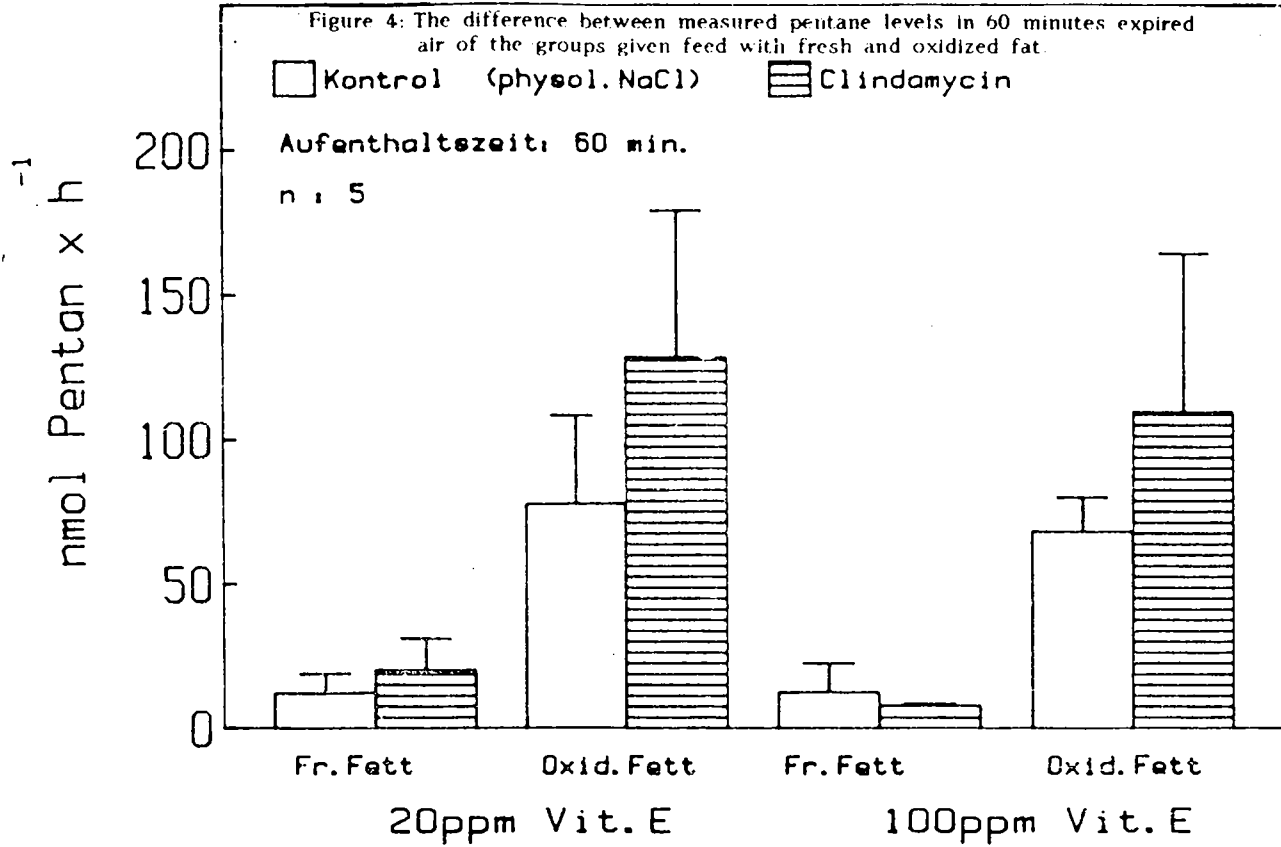
Üç faktörlü varyans analizinde (yağ, vitamin E ve antibiyotik) sadece 60 dakika değerlerinde değil, 30 ve 90 dakikalık ölçümlerde de yağ faktörünün pentan üretimi üzerine istatistiki olarak oldukça yüksek oranda etkilediği ($p < 0,001$) saptanmıştır. Antibiyotik faktörü üretim üzerine zayıf etkilidir ($p < 0,05$), fakat bu da beklendiği gibi pentan miktarını azaltıcı yönde değil aksine artırıcı yöndedir.

Varyans analizinde vitamin E'nin ölçüm parametreleri üzerine hiç bir etkisi saptanmamıştır. Fakat ortalama değerler göz önüne alınırsa vitamin E'nin pentan üretimini azaltıcı yönde etkisi görülür.

Barsak florasını oluşturan bakteri popülasyonu üzerine kullanılan antibiyotiklerin etkisi:

Kullanılan antibiyotiklerin barsak florasına etkisini saptamak için pek çok ekim işlemi yapıldı. Tablo 3'de bu antibiyotiklerin bakteri sayısındaki azalmalar verilmiştir.

Monensin-Gentamicin kombinasyonunda barsak florasının bakteri sayısında 10^3 — 10^6 arasında azalma saptanmıştır. Bu kombinasyonun 10 katına çıkartılan yüksek dozlarında bakteri sayısında daha büyük bir azalma görülmemiştir. Clindamycin yalnız başına uygulandığında azalma 10^1 — 10^3 arasındadır.



Şekil 4. 60 dakikalık solunum havasında ölçülen pentanın taze ve okside yem gruplarındaki farklılığı

Tablo 3. Antibiyotiklerin kullanıldığı ortamda, kontrol grubuna göre koloni sayısında meydana gelen azalmalar.

| MONENSİN — GENTAMİCİN KOMBİNASYONU | | | |
|--------------------------------------|-------------------|--|-------------------|
| Monen. 2 mg / ml — Gent. 0,8 mg / ml | | Monen. 20 mg / ml --- Gent. 0,8 mg / m | |
| BESİ YERLERİ | | BESİ YERLERİ | |
| Eugon | Rogosa | Eugon | Rogosa |
| $6,4 \times 10^1$ | $1,2 \div 10^3$ | $2,4 \times 10^1$ | $2,6 \times 10^9$ |
| $2,8 \times 10^1$ | $1,8 \times 10^5$ | $1,2 \times 10^3$ | $1,0 \times 10^8$ |
| $7,5 \times 10^2$ | $2,3 \times 10^6$ | $1,3 \times 10^1$ | $1,1 \times 10^5$ |
| $8,1 \times 10^1$ | $1,8 \times 10^6$ | $2,4 \times 10^2$ | $1,7 \times 10^3$ |
| $1,3 \times 10^2$ | $2,0 \times 10^4$ | $3,1 \times 10^3$ | $4,0 \times 10^5$ |

CLİNDAMYCİN: 6,8 mg / ml

BESİ YERİ

Eugon

 $4,3 \times 10^3$ $6,5 \times 10^2$ $5,7 \times 10^1$ $8,9 \times 10^1$ $2,6 \times 10^1$

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmadaki amaç okside yemle beslenen broiler civcivlerinde bakteriler tarafından üretildiği ileri sürülen pentan gazının açığa çıkışını antibiyotik kullanarak azaltmak veya durdurmaktır.

Gelmont ve ark. (6) labratuvar sıçanlarında yaptıkları araştırmalarda hem Clindaycin hem de askorbik asit uygulaması ile ölçülen pentan gazında azalma kaydettiklerini bildirmişlerdir. Sıçanlarda denenen bu metodun kanatlı metabolizmasında ne derece uygulanabileceği araştırıldı. Ayrıca clindamycin barsakta üretilen pentan gazı üzerinde gerçekleştirdiği inhibisyon etkisinin, başka antibiyotik kombinasyonları tarafından da oluşturulup oluşturulmadığını denendi.

Taze yemle beslenen civcivlerin barsak içeriğindeki pentan konsantrasyonu oldukça düşük miktarlarda saptandı ve bir saat sonraki konsantrasyonunda relatif oranda sabit kaldı. Buna karşın okside yemle beslenen civcivlerin barsaklarında gittikçe yükselen pentan üretimi görüldü. Eğer pentan üretiminde bakterilerin rolü olsaydı okside yem gruplarında yapılan ölçümlerde de taze yem gruplarında olduğu gibi,

konsantrasyon yükselmesinden sonra bir düzeyde sabit kalması gerekirdi (steady state). Farklı zamanlarda yapılan ölçümler daha çok mevcut olan lipidperoksidlerin kendiliğinden (Spontaneous) parçalandığı düşüncesini desteklemektedir. Bu peroksidlerden sekonder ürünlerin kendiliğinden ortaya çıkışı, birçok bilim adamı tarafından açıklanan ve canlı hücrelerdeki yağların otoksidasyonu ve buna karşı hücre içinde gelişen savunma reaksiyon mekanizmalarının ızahı ile de anlaşılabilir (7, 13).

Mide-barsak kanalının değişik kesimlerinde yapılan pentan gazı ölçümlerinde elde edilen şaşırtıcı bir sonuçta bezli ve kaslı midede en yüksek konsantrasyonun saptandığıdır. Bu sonuç da kendiliğinden parçalanmayı destekler, çünkü yapılmış araştırma verilerine göre mide en az bakteri barındıran sindirim organıdır (12, 13). Mide florasının esasını laktobasiller oluşturur. Bu mikroorganizmaların oksidasyon metabolizmasının son ürünlerinden biri pentan değil, pentil-radikalleridir. Midedeki yüksek pentan konsantrasyonu ortamın düşük pH ve yüksek su oranına bağlanabilir.

Yağ kalitesinin beklendiği gibi pentan üretimi üzerine büyük etkisi varken, kullanılan antibiyotiklerin (Monensin, Gentamisin, Clindamycin) hiçbir inhibe edici etkisi gözlenmemiştir. Monensin, ionofer olarak geniş spektrumlu ve özellikle gram negatif bakterilere karşı etkili olan Gentamicin kombinasyon halinde kullanıldı. Aynı şekilde kullanılan Clindamycin de gram negatif ve aneorob bakterilere etkilidir. Uygulanan antibiyotik, 1-3 saatlik bir inkubasyondan sonra bakteriostatik etkileri ortaya çıkacak ve bakteri metabolizmasını yavaşlatacak şekilde seçildi. Yapılan ekimler sonunda ortaya çıkan koloni sayısı, pentan üretiminde bakterilerin rolü olamayacağı yönündedir.

İn vivo (solunum havasında) yapılan pentan ölçümlerinde daha önce yapılmış çalışma sonuçlarından (4, 11) daha yüksek sonuçlar elde edildi. Çünkü bu çalışma da civcivler, diğer çalışmadaki gibi ölçümlerden önce aç bırakılmadı, aksine normal olarak yem almaya devam ettiler. Diğer araştırmalarda ölçülen pentan büyük oranda endojen olarak üretildiği için membran yapısına girerek etkili olan vitamin E yüksek pentan üretimine engel olmuştur.

Clindamycin'in pentan üretimine Gelmont ve ark. (6) bulduğu sonucun tam aksi olarak, üretimi azaltıcı yönde değil de artırıcı yönde bulunmuştur. Bu da bakteriostatik etki nedeniyle sayıları azalan mikroorganizmaların artık üretilen pentanı metabolize edemedikleri şek-

linde açıklanabilir. Bu araştırmacılar tarafından kabul edilen pentan üretimine bakterilerin katkısı, en azından kanatlı metabolizmasında gerçekleşmediği sonucuna varılabilir.

Kaynaklar

1. **Bartov, I., Bornstein, S.** (1972): *Nutritional factors affeting the occurence of experimental encephalomalacia in chicks.* Poultry Science, 51: 868-876.
2. **Dillard, C.J., Litov, R.E. and Tappel, A.L.,** (1977). *Effects of dietary Vitamin E, selenium and polysaturated fats on in vivo lipid peroxidation in the rat as measured by pentan production.* Lipids, 13: 396-402.
3. **Dumelin, E.E. and Tappel, A.L.,** (1977): *Hydrocarbon gases produced during in vitro peroxidation of polysaturated fatty acids and performed hydroperoxides.* Lipids, 12: 849-900.
4. **Engl, B.** (1988). *Pentanexahalation und antioxidativer Stoffwechsel beim Broiler nach diätetischer Belastung.* vet. Med. Dissertation., Hannover.
5. **Filser, J.G., Bolt, H.M., Mulliwan, H. and Kappus, H.** (1983). *Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues.* Analytical Biochemie, 52: 1-9.
6. **Gelmont, D., Stein, R.A. and Meta, J.F.** (1981). *The bacterial origin of rat breath pentane.* Biochem Biophys. res. Comm., 102: 932-936,
7. **Gray, J.I.** (1978). *Measurement of lipid perioxidation: A rewiev.* J. am. Oil Chem. Soc., 55: 539-546.
8. **Mc. Brien, D.C.H. and Slater, T.F.** (1982). *Free radicals, lipid peroxidation and cancer.* Acedemic press, London, New York, Paris, San Diego, Sidney, Tokyo.
9. **Nelson, J.S.** (1980). *Pathology of vitamin E deficiency.* In **Machlin L.J.N** *Vitamin E,* Dekker Inc., new York, Basel.
10. **Poli, G., Checseman, K.H., Dianzam, M.U. and Slater, T.E.** (1985). *Free radikals in liver injury.* IRL press. Oxford.
11. **Sallmann, H.P., Fuhrmann H. Molnar, S.** (1988). *Pentane exhaaltion of broilers stressed by dietary conditions.* In: **Blackmore, D.J.:** Animal clin. Biochemistry., Cambridge University Press, Cambridge, 353-369.
12. **Sandine, W.E.** (1979). *Roles of lactobacilus in the interstinal tract.* J. Food Protect., 42: 259-262.
13. **Smith, H.W.** (1965). *Lora of the alimentary tract.* J. Path. Bact., 89: 496-513.
14. **Timms, L.** (1986). *Observations on the bacterial flor of the alimentarytract in three age groups of normal chicks.* Br. Vet. 124: 470-477.