

YUMURTA KOLESTEROLÜNÜN KOLORİMETRİK VE ENZİMATİK YÖNTEMLE BELİRLENMESİ

ARZU YİĞİT¹ MELTEM ŞİRELİ² TAMER ÇAVUŞ³ BAHİRİ EMRE⁴

Determination of egg cholesterol by using colorimetric and enzymatic methods.

Summary: *This study was carried out to determine the cholesterol values in egg-yolk of commercial Hisex-Brown chicken.*

In this study the eggs taken from 57 weeks of chicken were used. The egg yolks were separated after boiling the total of 30 eggs for 5 min. The each of egg yolk was weighed as one gram and than they were homogenized and extracted. The cholesterol values of extractions were determined by colorimetric and enzymatic methods.

The cholesterol values of egg yolk measured with colorimetric method (16.51 ± 2.54 mg/g) were slightly higher than the values, measured with enzymatic method (14.64 ± 2.92 mg/g). The correlation ($r = 0.7965$) was found between the each of two methods in cholesterol values determined from the same extracts ($p < 0.001$).

Key words: Egg, cholesterol, colorimetric method, enzymatic method.

Özet: *Araştırma Hisex Brown ırkı ticari yumurtacı melez tavukların yumurta sarılarında kolesterol değerlerinin belirlenmesi amacıyla yapıldı.*

Çalışmada 57 haftalık yumurtacı tavukların yumurtaları kullanıldı. Toplam 30 adet yumurta 5 dakika kaynatıldıktan sonra sarıları ayrıldı. Her bir yumurta sarısından birer gram tartıldıktan sonra homojenize edildi ve özütleri çıkarıldı. Bu özütlerin kolorimetrik ve enzimatik yöntemle kolesterol değerleri belirlendi.

Kolorimetrik yöntemle ölçülen yumurta sarısının kolesterol değeri (16.51 ± 2.54 mg/g), enzimatik yöntemle ölçülen kolesterol değerinden (14.64 ± 2.92 mg) biraz yüksek bulundu ($p < 0.001$). Her iki yöntemle aynı özütlerden belirlenen kolesterol değerleri arasında korelasyon ($r = 0.7965$) bulundu ($p < 0.001$).

Anahtar Kelimeler: Yumurta, kolesterol, kolorimetrik metod, enzimatik metod.

Giriş

Yumurta sarısı lipidinin bileşimi trigliserit, fosfolipit ve kolesterolden oluşur (17). Bir yumurtadaki kolesterol miktarı toplam 215-298 mg arasında değişir (1,10). Amerikan Kalp Derneğinin bildirimlerinde

insanların günde 300 mg'dan fazla kolesterol tüketmemeleri gerektiği önerilmektedir (5). Günlük tüketim sınırlarının üzerinde uzun süre kolesterol alınması ile kanın toplam kolesterol derişiminin artmasına bağlı sterolün koroner arterlerde birikerek atherosklerotik kalp hastalıklarına yol açtığı görüşü, yumurta

¹ Yrd. Doç. Dr., K.Ü. Veteriner Fakültesi, Fiziyojji Anabilim Dalı, Kırıkkale.

² Dr., Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Fiziyojji Anabilim Dalı, Dışkapı-Ankara.

³ Dr., Milli Eğitim Bakanlığı, Sağlık Eğitim Merkezi, Ankara.

⁴ Prof. Dr. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Fiziyojji Anabilim Dalı, Dışkapı-Ankara.

tüketiminin azalmasına neden olmaktadır (10,13). Bu amaçla kalp ve damar rahatsızlıklarından korunmak için düşük kolesterolü yumurtaların üretimine yönelik çalışmalar bulunmaktadır (5,18).

Kolesterol miktarını ölçebilmek için ise değişik yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar arasında kolorimetrik, kromatografik ve enzimatik yöntemler sayılabilir (6,15,16,23). Kolesterolün kolorimetrik yolla belirlenmesinde kullanılan en yaygın yöntemlerden biri Zlatkis ve ark.(23)' nın geliştirdiği, demir klorür ile kolesterolün tepkimesini içeren yöntemdir. Bir araştırmada bu yöntemin çoklu doymamış yağ asitlerinin varlığından dolayı kolesterol ölçümünde yaklaşık bir değer verdiği bildirilmiştir (21).

Kolorimetrik yöntemlerden biri olan ve kolesterolün kloroformdaki eriyiğinin asetik anhidr ve H₂SO₄ ile renk vermesi esasına dayanan Liebermann-Buchard tepkimesi (22), Schönheimer ve Sperry (16) tarafından da kullanılmış, ancak renk oluşumunun ve şiddetinin ayraçların nemliliğine göre değişebilmesinden dolayı uygulamada bazı sakıncalar doğurduğu adı geçen araştırmacılar (16) tarafından bildirilmiştir.

Allain ve ark. (2) ile Sale ve ark. (15)' nin kan kolesterolünün ölçülmesi amacıyla geliştirdiği enzimatik yöntem, Jiang ve ark. (8) tarafından yumurta kolesterolünün ölçülmesi için uyarlanmıştır. Enzimatik yöntem kolesterol esterlerini, kolesteril ester hidrolaz ile serbest kolesterole hidrolize etmesi, kolesterol oksidaz ile serbest kolesterolün oksidasyonunu katalize ederek kolesten-3-on ile hidrojen peroksit oluşturması ve oluşan hidrojen peroksiti de fenol yada horse radish peroksidaz varlığında p-hidroksifenil asetik asit ile tepkimeye sokarak floresans bir ürün oluşturması ve absorbansının ölçülmesi esasına dayanır (5,7).

Yumurta sarısının kolesterol değerinin ölçümüne yönelik geliştirilen metotlara ait ortalama bir gram yumurta sarısı kolesterol değerleri 9.21-22.8 mg/g arasında

değişmektedir (12,19). Jiang ve ark. (8), White Leghorn ırkı yumurtacı tavukların yumurta kolesterol değerini koloretimik yöntemle 14.6 mg/g, enzimatik yöntemle 12.3 mg/g olarak bildirirlerken, aynı özütlerden HPLC yöntemiyle bu değer 11.7 mg/g olarak belirlenmiştir. Beyer ve ark. (3), yine White Leghorn ırkı yumurtacı tavuklarda HPLC yöntemiyle yumurta kolesterol değerini 11.7 mg/g olarak bildirilmişlerdir. Yine aynı araştırmacıların farklı ırk yumurtacı tavuklarda yaptıkları bir başka çalışmada (4) - ise , kolorimetrik yöntemle bu değer 16.01 mg/g olarak bildirilmiştir.

Kolesterol miktarı ölçümüyle ilgili pek çok metod bulunmaktadır. Bu metotlardan kolorimetrik ve enzimatik metotlar kullanılarak Hisex-Brown ırkı yumurtacı tavukların yumurta kolesterol miktarının tayini amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu araştırmada 57 haftalık Hisex Brown ticari yumurtacı melez ırkı tavuktan alınan 30 yumurta kullanıldı. Yumurtalar beş dakika pişirildikten sonra sarıları ayrıldı. Yumurta sarıları homojenize edilerek birer gram tartıldı ve özütleri çıkarıldı (20). Aynı özütten kolorimetrik (23) ve enzimatik (Biosub-chol-cholesterol, CHOD-PAP, 57299 Burbach, Germany) (14) yöntemle kolesterol değerleri ölçüldü. Her iki yöntemle elde edilen değerler arasında student-t testi ile değer farklılıkları belirlendi ve korrelasyon analizi yapılarak aralarındaki ilişkinin yönü ve gücü incelendi (9). Sonuçların değerlendirilmesinde MS Windows için SPSS 5.0 paket programından yararlanıldı.

Bulgular

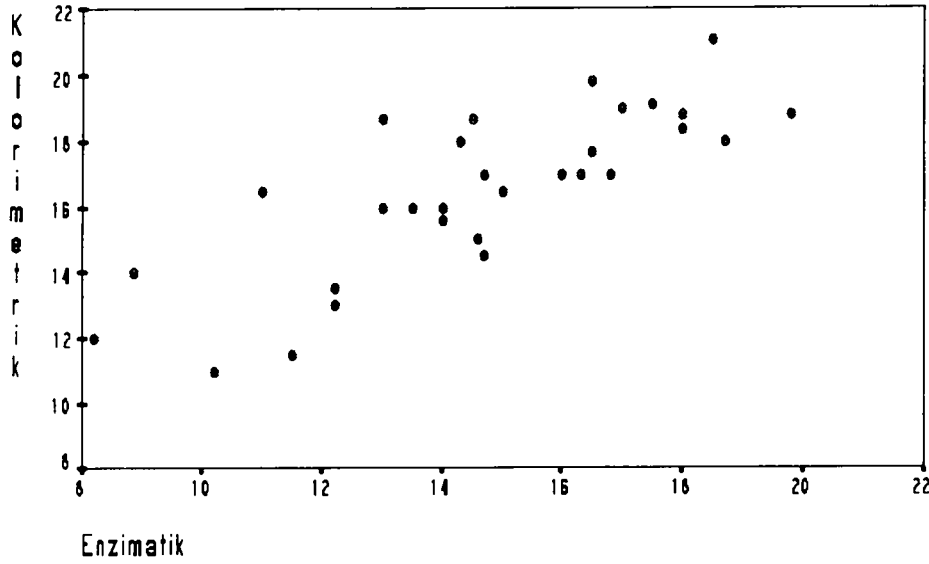
Kolorimetrik ve enzimatik yöntemle ölçülen bir gram yumurta sarılarının kolesterol değerleri tablo 1' de verildi.

Her iki yöntemle elde edilen değerler arasındaki ilişki (korelasyon) istatistiksel açıdan önemli ($r=0.7965$, $p<0.001$) bulundu (Şekil1).

Tablo1:Kolorimetrik ve enzimatik yöntemle ölçülen yumurta sarısı kolesterol değerleri (mg/g) (n = 30).
Table1:The cholesterol values of egg yolks, determined with colorimetric and enzymatic method (mg/g) (n=30)

Yöntem	X ± SD	Değişim Sınırı
Kolorimetrik	16.51* ± 2.54	11.00 - 21.10
Enzimatik	14.64* ± 2.92	8.20 - 19.00

* p< 0.001



Şekil1: Kolorimetrik ve enzimatik yöntemle bir gram yumurta sarısında yumurta kolesterol değerleri (r = 0.7965, p< 0.001) (n = 30, mg/g).

Figure 1: The egg cholesterol values in one gram of egg yolk, measured with colorimetric and enzymatic method (r = 0.7965, p< 0.001) (n = 30, mg/g).

Tartışma ve Sonuç

Araştırmada kolorimetrik ve enzimatik yöntemler kullanılarak Hisex-Brown ırkı yumurtacı tavukların yumurta kolesterol değerleri belirlenmiştir. Bulunan değerler bazı literatürlerde (12,19) belirtilen genel sınırlar dahilinde bulunmuştur. Araştırmada her iki yöntemle belirlenen ortalama kolesterol değerleri Jiang ve ark. (8) tarafından aynı yöntemlerle elde ettikleri değerlerden ve Beyer ve ark. (3)' nın HPLC yöntemiyle elde ettikleri değerlerden biraz yüksek bulunmuştur. Bu farklılık çalışmada kullanılan yumurtanın alındığı haftanın değişikliğinden veya ırkın farklı olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Nitekim bahsi geçen araştırmacılar (3,8) çalışmalarında White Leghorn ırkı yumurtacı tavuklar kullanmışlardır. Bu ırkın diğer ırklara oranla

en düşük yumurta kolesterolüne sahip olduğuna ait bildirim de bulunmaktadır (11).

Bu çalışmada her iki yöntemle elde edilen ortalama kolesterol değerleri arasındaki fark (p<0.001), kolorimetrik yöntemin uygulanması esnasında yumurta sarısının özütünde bulunan trigliseritler ile serbest yağ asitlerinin renk oluşumunu etkilemelerine bağlanabildiği gibi, yine yöntemin uygulama ortamındaki ısı, nem gibi faktörlerin sonucu değiştirebildiğine ait bildirimlerle de açıklanabilir (6,21,22). Ayrıca bu yöntemle kolesterolün belirlenmesinde birçok asit içerikli kimyasal maddenin kullanılması tekniğin uygulanmasını güçleştirirken (5), kısıtlı laboratuvar koşullarında dahi kullanılabilmesi güncelliğini devam ettirmektedir. Bu yönetime alternatif olarak geliştirilen enzimatik yöntemin ise işlem

süresinin kısa oluşu ve uygulanma koşullarının daha sağlıklı olması günümüzde kullanım sıklığını arttırmaktadır (2). Araştırmada kullanılan kolorimetrik ve enzimatik yöntemle elde edilen kolesterol değerlerine ait korelasyon sayısının $r = 0.7965$ ve $p < 0.001$ her iki metodun da kullanılabilirliğini göstermektedir.

Bu araştırmada Hisex-Brown ırkı yumurtacı tavukların yumurta sarılarında kolesterol miktarı kolorimetrik ve enzimatik yöntem kullanılarak belirlenmiş, elde edilen sonuç diğer yumurtacı ırklara ait literatür verilerini destekler nitelikte bulunmuştur.

Kaynaklar

- Ahn, U.U., Kim, S.M., Shu, S. (1997) *Effect of egg size and strain and age of hens on the solids content of chicken eggs*. Poultry Sci, **76**, 914-919.
- Allain, C.C., Poon, L.S., Chan, C.S.G., Richmond, W., Fu, P.C. (1974) *Enzymatic determination of total serum cholesterol*. Clin Chem, **20**, 470-475.
- Beyer, R.S., Jensen, L.J. (1989) *Research note : Cholesterol content of commercially produced eggs in Georgia*. Poultry Sci, **68**, 1703-1706.
- Beyer, R.S., Jensen, L.J. (1989) *Overestimation of the cholesterol content of eggs*. J Agric Food Chem, **37**, 917-920.
- Beyer, J.S., Jensen, L.S. (1993) *The hypocholesterolemic agent dichloroacetata increase egg cholesterol content of laying hens*. Poultry Sci, **72**, 1063-1069.
- Bohac, C.E., Rhee, K.S., Cross, H.R., Ono, K. (1988) *Assesment of methodologies for colorimetric cholesterol assay of meats*. J Food Sci, **53**, 1642-1644.
- Heider, J.G., Boyett, R.L. (1978) *The picomole determination of free and total cholesterol in cells in culture*. J Lip Res, **19**, 514-518.
- Jiang, Z., Cherian, G., Robinson, F.E., Sim, J.S. (1990) *Effect of feeding cholesterol to laying hens and chicks on cholesterol metabolism in pre and post hatch chicks*. Poultry Sci, **69**, 1694-1701.
- Kutsal, O., Alpan, O., Arpacık, R. (1990) *İstatistik Uygulamaları*. Bizim Büro Basımevi, Ankara.
- Machall, L., Ingr, I., Kalova, J., Jenabek, S. (1994) *The dependance of the hatchability, laying end egg weight on the egg cholesterol level and cholesterol and total lipids concentration in the blood plasma in hens of laying strains*. Archiv für Tierzucht, **37**, 567-575.
- Maurice, D.V., Lightsey, S.F., Hsu, K.T., Gaylard, T.G., Reddy, R.V. (1994) *Cholesterol in eggs from different species of poultry determined by capillary GLC*. Food Chemistry, **50**, 367-372.
- Nix, D.F., Thornton, E.J., Washburn, K.W., Marks, H.L. (1974) *The influence of molting on yolk cholesterol level*. Poultry Sci, **53**, 412-414.
- Oh, S.Y., Miller, L.T. (1985) *Effect of dietary egg on variability of plasma cholesterol levels and lipopr otein cholesterol*. Am J Clin Nut, **42**, 421-431.
- Richmond, W. (1973) *Preparation and properties of a cholesterol oxidase from Nocardia sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum*. Clin Chem, **19**, 1350-1356.
- Sale, F., Marchesini, S., Fishman, P.H., Berra, B. (1984) *A Sensitive enzymatic assay for determination of cholesterol in liquid extracts*. Anal Biochem, **142**, 347-350.
- Schoenheimer, R., Sperry, W.A. (1994) *A micrometod for the determination of free and combined cholesterol*. J Biol Chem, **106**, 765-760.
- Tekinşen, O., Yalçın, S. (1995) *Yumurtanın besin değeri*. Tavuk Yetiştiriciliği ve Hastalıkları. VI. Hayvancılık ve Beslenme Sempozyumu, SÜ Vet Fak Yayın Ünitesi, 159-165, Konya.
- Waldroup, P.W., Ndife, L.I., Hellwig, H.M, Hebert, J.A., Berrio, L. (1986) *Influence of Probuocol on egg yolk cholesterol content and performance of laying hens*. Poultry Sci, **65**, 1949-1954.
- Walshburn, K.W., Nix, D.F. (1974) *Genetic basis of yolk cholesterol content*. Poultry Sci, **53**, 109-115.

20. **Walshburn, K.W., Nix, D.F.** (1974) *A rapid technique for extraction of yolk cholesterol.* Poultry Sci, **53**, 1118-1122.
21. **Weiss, J., Naber, E.C., Johnson, R.M.** (1964) *Effect of dietary fat and other factors on egg cholesterol.* Arch Biochem Biophys, **105**, 521-526.
22. **Yensan, M.** (1982) *Klinik Biyokimya Laboratuvar Çalışmaları.* İÜ Tıp Fak, Rektörlük no:2950, Fakülte no:139, İstanbul.
23. **Zlatkis, A., Zak, B., Boyle, A.J.** (1953) *A new method for the direct determination of serum cholesterol.* J Lab Clin Med, **41**, 486-492.

Yazışma Adresi:

*Dr. Meltem Şireli,
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Fizyoloji Anabilim Dalı, 06110, Dışkapı/ANKARA.*