

Food and Health



Food and Health

E- ISSN 2602-2834

Journal abbreviation: **Food Health**

© 2015-2018 ScientificWebJournals (SWJ)

All rights reserved/Bütün hakları saklıdır.

is published in one volume of four issues per year by

www.ScientificWebJournals.com

Contact e-mail: jfhs@scientificwebjournals.com and ozkanozden@scientificwebjournals.com

Aims and Scope

Our journal from 2015-2017 “Journal of Food and Health Science” was published by their names, **will continue in 2018 its mission with the new name "Food and Health"**.



“**Food and Health**” journal will publish peer-reviewed (double blind) articles covering all aspects of **food science and their health effect** in the form of original articles, review articles, and short communications. Our journal will be published quarterly in English or Turkish language. “**Food and Health**” journal will not charge article submission or processing fees.

General topics for publication:

**Food/Seafood/Food Technology/Food Chemistry/Food Microbiology/Food Quality/Food Safety/
Food Contaminant/Food Allergen/Food Packaging/Modified Food/Functional Food /Dietary
Supplements/Nutriton**

Chief Editor:

Prof. Dr. Nuray ERKAN (nurerkan@istanbul.edu.tr)

Istanbul University, Faculty of Aquatic Sciences, Turkey

Co Editor in Chief:

Prof. Dr. Özkan ÖZDEN (ozden@istanbul.edu.tr)

Istanbul University, Faculty of Aquatic Sciences, Turkey

Editorial Board:

Prof. Dr. Ali AYDIN (aliaydin@istanbul.edu.tr)

University of Istanbul, Faculty of Veterinary Medicine,
Food Hygiene and Technology Department, Turkey

Prof. Dr. Bhesh BHANDARI (b.bhandari@uq.edu.au)

University of Queensland, Faculty of Science, Australia

Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR (icakir55@gmail.com)

University of Abant İzzet Baysal, Faculty of Engineering and Architecture,
Department of Food Engineering, Turkey

Prof. Dr. Cem ÇETİN (sporhekimi@gmail.com)

Süleyman Demirel University, Faculty of Medicine, Turkey

Prof. Dr. Frerk FELDHUSEN (Frerk.Feldhusen@lalif.mvnet.de)

Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Rostock, Germany

Prof. Dr. Carsten HARMS (charms@hs-bremerhaven.de)

Applied Univ. Bremerhaven, Bremerhavener Institute of Biological Information Systems, Germany

Prof. Dr. Gürbüz GÜNEŞ (gunesg@itu.edu.tr)

Istanbul Technical University, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering, Department of Food Engineering, Turkey

Prof. Dr. Marcello IRITI (marcello.iriti@unimi.it)

Milan State University, Faculty of Agricultural and Food Sciences, Department of Agricultural and Environmental Sciences, Italy

Prof. Dr. Herbert W. OCKERMAN (ockerman.2@osu.edu)

Ohio State University, Department of Animal and Food Sciences, USA

Prof. Dr. Abdullah ÖKSÜZ (aoksuz@konya.edu.tr)

University of Necmettin Erbakan, Faculty of Health Sciences, Turkey

Prof. Dr. Peter RASPOR (Peter.Raspor@fvz.upr.si)

University of Primorska, Faculty of Health Sciences, Institute for Food, Nutrition and Health, Slovenia

Prof. Dr. Zdzislaw E. SIKORSKI (zdzsikor@pg.gda.pl)

Gdańsk University of Technology, Faculty of Chemistry, Department of Food Chemistry, Technology, and Biotechnology, Poland

Prof. Dr. Krzysztof SURÓWKA (rtsurowk@cyf-kr.edu.pl)
University of Agriculture, Faculty of Food Technology, Poland

Prof. Dr. Petras Rimantas VENKUTONIS (rimas.venskutonis@ktu.lt)
Kaunas University of Technology, Department of Food Science and Technology, Lithuania

Prof. Dr. Aydın YAPAR (ayapar@pau.edu.tr)
University of Pamukkale, Engineering Faculty, Food Engineering Department, Turkey

Assoc. Prof. Dr. Joko Nugroho Wahyu KARYADI (jknugroho@ugm.ac.id)
Gadjah Mada University, Faculty of Agricultural Technology, Indonesia

Dr. Alaa El-Din A. BEKHIT (Aladin.bekhit@otago.ac.nz)
University of Otago, Department of Food Science, New Zealand

Dr. Rene' E SCOTT (rscott@twu.edu)
Texas Woman's University, Nutrition and Food Science, Visiting Professor, USA



Vol. 4 Issue 1 Page 1-79 (2018)

Tablo of Contents/İçerik

COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR BETA LACTOGLOBULIN ISOLATION /
Pages: 1-8

Ezgi Demir Özer, Zübeyde Öner

EFFECTS OF BAKER'S YEAST ADDITION ON SOME PROPERTIES AND PHYTIC ACID
CONTENT OF TARHANA PREPARED WITH DIFFERENT CEREAL AND LEGUME
PRODUCTS/ Pages: 9-18

Nilgün Ertaş

Nigella sativa OIL COULD INDUCE OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF DENTAL PULP
MESENCHYMAL STEM CELLS: CLINICAL NUTRITION FOR DENTISTRY/ Pages: 19-24

Ayşegül Mendi

CHARACTERIZATION OF FLOWER AND COTTON HONEY VOLATILE COMPOUNDS USING
SOLVENT ASSISTED / Pages: 25-36

Ahmet Salih Sönmezdağ

EFFECT OF DISTILLATION TIME ON ESSENTIAL OIL COMPOSITIONS OF BAY LEAF
(Laurus nobilis L.) / Pages: 37-42

Muharrem Gölükçü, Hakuk Tokgoz, Demet Yıldız Turgut

BENEFITS OF FISH CONSUMPTION FOR HEALTHY AND BALANCED NUTRITION DURING
LIFELONG TIME / Pages: 43-62

Abdullah Öksüz, Şenay Burçin Alkan, Havvanur Taşkın, Meryem Ayrancı

ANTIMICROBIALS USED IN ACTIVE PACKAGING FILMS / Pages: 63-79

Sevgin Dıblan, Sevim Kaya



ORIGINAL ARTICLE/ORIJİNAL ÇALIŞMA

FULL PAPER

TAM MAKALE

COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR BETA LACTOGLOBULIN ISOLATION

Ezgi Demir Özer¹ , Zübeyde Öner² 

¹ Niğde Ömer Halisdemir University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Niğde, Turkey

² Süleyman Demirel University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Isparta, Turkey

Received: 09.02.2017

Accepted: 02.07.2017

Published online: 06.11.2017

Corresponding author:

Ezgi Demir Özer, Niğde Ömer Halisdemir University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, 51240, Niğde, Turkey

E-mail: ezgidemirozer@gmail.com

Abstract:

The aim of this study was to introduce a simple, high efficient and less expensive method for isolation of β -Lg from whey. Anion exchange chromatography, pepsin enzyme treatment and ultrafiltration techniques were preferred for isolation process to compare differences. In addition to, centrifuge ultrafiltration techniques were using for the first time for isolation of β -Lg from whey. Physicochemical analysis of whey samples indicated that protein and β -Lg content in whey samples changed from 0.07 to 0.8% and 0.24 to 0.29 g/L, respectively. Treatment with the use of pepsin enzyme, anion exchanges chromatography and ultrafiltration techniques, resulted to β -Lg of 1.43, 6.56 and 43.59 folds respectively. Our results showed that ultrafiltration techniques are rapid and efficient that allows high protein yield and has advantages over other methods since it preserves the native structure of β -Lg. Additionally, when the enzymatic hydrolysis was used together with ultrafiltration technique, it was found efficient and pure than the enzymatic hydrolysis together with dialyse membrane. Also this study concluded that pepsin enzyme treatment and anion exchange chromatography are economic methods but they are not efficient enough and very time consuming. However isolation efficiency can be increased the use of isolation methods together.

Keywords: Beta lactoglobulin, Whey, Ultrafiltration, Anion exchange chromatography, Pepsin enzyme

FOOD and HEALTH

E-ISSN: 2602-2834

4(1), 1-8 (2018) doi: 10.3153/JFHS18001

© 2015-2018 ScientificWebJournals (SWJ)

Introduction

Whey is obtained as a by-product during cheese making and it has recognized as a valuable food ingredient with important nutritional and functional properties in the last decades. However, because it's low concentration of milk constituents (5-6% dry matter), whey has commonly considered waste or animal feed by providing amino acids required by the young animal (Aich et al., 2015). It consists of lactose, protein, minerals and organic acids (Morr & Ha, 1993). Whey proteins which are a diverse mixture of true proteins, peptides and non-protein (NPN) components, is a defined as the components that are soluble at pH 4.6 in their native form (Fox, 2003). Furthermore, whey is an important source of beta lactoglobulin (β -Lg), alfa lactoalbumin (α -La), bovine serum albumin (BSA) and immunoglobulins (Ig) (Yerlikaya, Kınık, & Akbulut, 2010). The most abundant whey protein is β -lactoglobulin (β -Lg), which consists of approximately 50-60% of whey proteins and 12% of the total proteins in milk (Outinen, 2010).

β -Lg is a small, soluble and globular protein that is a dimer at the normal pH of bovine milk with a molecular weight of 36 kDa and is a single chain polypeptide of 18 kDa comprising of 162 amino acid residues (Aich et al., 2015). Essential amino acids such as threonine, valine, isoleucine, leucine, tryptophan and lysine are composed % 45.68 of total amino acid composition of β -Lg (Young, 1994). β -Lg is a rich source of cysteine which is an essential amino acid for the synthesis of glutathione (Karagözlü & Bayarer, 2004). Five genetic variants of bovine and four genetic variants ovine β -Lg of which the phenotypes A and B are most predominant have been discovered. β -Lg exists in the solution as a dimer, with an effective molecular mass of about 36.6 kDa at the normal pH of milk (6.5 - 6.7) (Hernández-Ledesma, Recio, & Amigo, 2008). Furthermore, β -Lg is an important source of biologically active peptides. These peptides are inactive with the sequence of the precursor protein. But they can be released through 'in vivo' or 'in vitro' enzymatic proteolysis. These peptides also play important roles in the human health such as antihypertensive, antioxidant and in antimicrobial activities. Its opioid-like features gives it the ability to decrease body-cholesterol levels (Hernández-Ledesma et al., 2008).

β -Lg is involved with the transfer of passive immunity and the binding of retinol and fatty acids (De Wit, 1998; Yerlikaya et al., 2010). They have

been shown to have inhibitory activity against angiotensin converting enzyme (ACE) when deriving various peptides of β -Lg derived from proteolytic digestion. β -Lg can be used as an ingredient in the formulation of modern foods and beverages because of its high nutritional and functional value (Chatterton, Smithers, Roupas, & Brodkorb, 2006). Recently, researchers have shown interests in the bioactivities of β -Lg peptides. These peptides are inactive within the sequence of parent protein, and become activated once released during gastrointestinal digestion or during food processing. Bioactive peptides may act as regulatory compounds with hormone-like activity when they are released in the body (Hernández-Ledesma et al., 2008). As well as known its high value as a food ingredient and its technofunctional properties, it can be a significant health risk in patients allergic to milk (Stojadinovic et al., 2012). Also, there has been an increased interest in recent years in ways to isolation and purification of β -Lg at laboratory and industrial-scale.

Some studies have been made to isolate this protein because of its superior nutritional and functional properties. Some methods have been used for isolation, such as the salting-out procedure, selective solubility in the presence of 3% w/w trichloroacetic acid (TCA), separation by ion-exchange chromatography, utilizing the differences in thermal stability in acidic conditions. (Bhattacharjee, Bhattacharjee, & Datta, 2006; Cheang & Zydney, 2003; Kinekawa & Kitabatake, 1996).

The aim of the present study was to investigate the isolation of β -lg from whey by using ultrafiltration process, pepsin enzyme treatment and anion exchange chromatography. In addition, the centrifugal ultrafiltration technique was used for the first time for β -lg isolation from whey in this study. These techniques compare the isolated β -lg retained purity degree, yield of isolate and native properties in terms of the different isolation techniques.

Materials and Methods

Fresh whey which was obtained from white cheese manufacturing process using pasteurized bovine milk was provide from the local dairy producer for each of three replications on separate production days. Three isolation methods which are ultrafiltration techniques, pepsin enzyme hy-

drolysis and anion exchange column chromatography were used for isolation of β -Lg. Ultrafiltration techniques were carried out on flat membrane ultrafiltration (Vivaflow 200 PES, Sartorius, Germany) and centrifugal ultrafiltration units (Vivaspin 15R, Sartorius, Germany). Anion exchange chromatography technique was performed by anion-exchange spin column (Vivapure Q mini H column, Sartorius, Germany) and 2-(Diethylamino)ethyl-Sephadex (DEAE) A-50 (Sigma Aldrich, USA). Porcine pepsin enzyme (0.8 IU/mg; Merck, USA) was used for pepsin enzyme treatment.

Physicochemical Analysis

Physicochemical properties of whey which are acidity (SH, pH), fat, protein, dry matter contents and β -Lg contents were determined (Lieske, Konrad, & Faber, 1997). Before the isolation process of β -Lg from whey, all whey samples centrifuged at 15333 x g, 4°C for 15 min as a pretreatment procedure to remove fat and particulates (Lozano, Giraldo, & Romero, 2008). β -Lg content of whey in the beginning of isolation process and differences between protein content and effectiveness of isolation techniques were measured by using high-performance liquid chromatography (HPLC) (Shimadzu LC-20AT, Japan) which was performed on a Zorbax 300SB-C18 4.6 x 250mm (Agilent, USA) with a diode array detector.

Isolation of β -Lg by Ultrafiltration Techniques

Ultrafiltration methods were performed with flat membrane ultrafiltration and centrifugal ultrafiltration units. Flat membrane systems were Vivaflow 200 Poly(ether sulfones) (PES) (Sartorius Sedium). β -Lg of whey protein concentrate was pre-treated by fractionation of protein using two-stage ultrafiltration (UF) with 30 kDa and 10 kDa molecular weight cut-off (MWCO) (Bhattacharjee et al., 2006). After pre-treatment, whey samples were heated at 42°C to improve the effectiveness of separation. This temperature was chosen to prevent the present proteins from being denatured. Whey samples were filtered on 30 kDa MWCO ultrafiltration systems and separated into retentate and filtrate (Filtrate-I). Then, these filtrate and retentate were filtered on 10 kDa MWCO ultrafiltration systems (Filtrate-II and retentate, respectively). Separation process with ultrafiltration systems was carried out under 2 bar pressure.

Centrifugal ultrafiltration units (Vivaspin 15R) were performed at 4000 x g, 15°C for 30 min

(Sigma 3K30). The amount and purity of β -Lg isolates were analyzed at 214 nm by HPLC. Samples were taken from the last concentrate isolates for the determination of protein profiles by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-Page) (Laemmli, 1970).

Isolation of β -Lg by Anion Exchange Chromatography

The method used by Lozano et al. (2008) were modified and used for the isolation of β -Lg by anion exchange chromatography. The pH of free particulates was adjusted to 3.0 using concentrated phosphoric acid (85%, H₃PO₄, Sigma, Germany). Then, precipitation was performed with 50% ammonium sulfate at 4°C to obtain highly enriched fraction of β -Lg and precipitate was obtained by centrifugation at 15330xg, 4°C for 15 min. The obtained precipitate was dissolved in phosphate buffered saline (PBS) solution at the pH of 3.0. Precipitations were obtained from 50% salt. Then, samples were dialyzed using a 12-14 kDa cut off Spectra/Pors membrane against PBS solution pH 7.2. After dialysis, salt was added to 70%. The resultant precipitate was centrifuged at same centrifugation conditions and obtained supernatant which contained high β -lactoglobulin was dialyzed under the same conditions. Finally, obtained product was lyophilized and stored for anion-exchange chromatography.

Anion-exchange chromatography was performed on a column packed with DEAE Sephadex A-50. A 50 milliliters sample, which was reconstituted in distilled water to a final concentration of 1 g/10mL, was added to the column at a flow rate of 0.5mL/min. 18 fractions of β -Lg were collected using 15 mL volumes of 0-0.9 M graduated NaCl. Amount of β -Lg fractions were determined with spectrophotometric analyses (Lieske et al., 1997; Lozano et al., 2008). The amount and purity of β -Lg isolates were determined by HPLC. Samples were taken from the last concentrate isolates for the determination of protein profiles by SDS-Page (Laemmli, 1970).

Isolation of β -Lg by Pepsin Enzyme Treatment

Whey protein is sensitive to pepsin enzyme except β -Lg. Therefore, pepsin enzyme can be used for the isolation of β -Lg from whey (Kinekawa & Kitabatake, 1996). β -Lg was purified from whey by combining pepsin treatment and filtration system. After the pretreatment and preheating (37°C) process, porcine pepsin added to whey (15/100) and the mixture than incubated at pH 2, 37°C for

60 min. The protein fraction was collected by ammonium sulphate (75%) precipitation. After precipitation, the fraction was dialyzed against water using a 20 kDa pore size on the dialyse membrane or filtrated using a 30 kDa pore size on the UF membrane. The amount and purity of β -Lg isolates were determined by HPLC. Samples were taken from the last concentrate isolates for the determination of protein profiles by SDS-Page.

Characterization of Isolated β -Lg by HPLC

The amount and purity of β -Lg were determined by HPLC, as described by Elgar et al. (2000). The column was operated at room temperature (RT) and at a flow-rate of 1 ml/min. The column was equilibrated in 80% of solvent A (0.1%, v/v, TFA in Milli-Q water) and after a sample injection a 1-min isocratic period was applied, followed by a series of linear gradients, to 100% of solvent B (0.09%, v/v, TFA, 90%, v/v) as follows: 1 - 6 min. (20 - 40%), 6 - 16 min (40 - 45%), 16 - 19 min (45 - 50%), 19 - 20 min. (50%), 20 - 23 min (50-70%), and 23 - 24 min. (70 - 100%) . Shimadzu HPLC LC-20AT and DAD detector were used. Isolated samples were calculated via HPLC calibration curves which were made by using β -Lg standards.

Determination of Protein Profiles of Isolated β -Lg

Protein profiles of isolated β -Lg was determined by the sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method were preferred (Laemmli, 1970). A Bio-Rad mini gel electrophoresis device equipped with a power supply (Power Pac 3000 - Bio-Rad Laboratories Ltd., Hemel Hemstead, UK) was used to perform SDS page of whey samples and whey isolates. Discontinuous electrophoresis was conducted with 12% stacking gel and 5% running gel. Samples were dissolved in a sample buffer solution (50 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 2% sodium dodecyl sulphate, 1.5% β -mercaptoethanol and 0.1% bromphenol blue, pH 6.8) and boiled at 100°C for 5 min. Gel was stained with Coomassie blue R-250 in methanol-acetic acid-water (4.5:1:4.5, v/v/v) and the excess dye was removed with the same ratio of methanol-acetic acid-water without dye and monitored using a gel-imaging system (Biolab Uvitec BTS-20M) connected to computer. Sigma SDS7 was used as protein marker. The molecular weight of each protein band was matched to known standard proteins (Şanlıdere Açoğlu, 2013).

Statistical Methods

The entire experiments were replicated three times. The statistical evaluation of the results was performed using the SPSS 18.0.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). The generated data were analyzed by analysis of variance (ANOVA). Differences among mean values were established using the Tukey's HSD test ($p < 0.05$).

Results and Discussion

Gross composition of bovine whey was as follows (mean \pm standard variation); 95.70% \pm 0.11 water, 4.93% \pm 0.95 total solids, 0.21% \pm 0.01 lactic acid, 0.77% \pm 0.02 protein, 0.47% \pm 0.12 fat and 0.43% \pm 0.12 ash. Chemical composition of whey used in this study was in accordance with previous studies (Lieske et al., 1997; Tunçtürk, Andiç, & Ocak, 2010). pH of whey was 5.51 \pm 0.11 and β -Lg content was 0.38 \pm 0.04 g/L. Some researchers have indicated that heat treatment could be effective on content of β -Lg. Because the heat treatment when is above 70°C, β -Lg undergoes an irreversible polymerization (Reddy, Kella, & Kinsella, 1988). Similarly, Outinen (2010) has reported that high temperature heat treatment of cheese milk significantly decreased β -Lg content of whey (Outinen, 2010). Furthermore some researcher have reported that pretreatment of milk such as homogenization and pressure can be affect chemical properties of whey (Jang & Swaisgood, 1990).

Isolated β -Lg by flat and centrifugal ultrafiltration technique are presented in table 1. The high molecular weight proteins such as BSA, immunoglobulin and lactoferrin were removed by 30 kDa ultrafiltration system. Bhattacharjee et al. (2006) have reported similar finding.

Table 1. β -lg concentration for flat (A) and centrifugal (B) ultrafiltration system

	β -lg Concentration (mg/mL)	
	Flat Ultrafiltration	Centrifugal Ultrafiltration
Whey	0.38 ^a	0.38 ^a
Filtrate-I	14.31 ^a	7.94 ^b
Filtrate-II	15.78 ^a	9.18 ^b
Retant	0.08 ^a	0.04 ^a

a,b (\rightarrow) Different letters within a row are significantly different.

The result of the peak area calculations showed that centrifugal ultrafiltration units have low concentration of β -Lg than flat system. Because the centrifugal ultrafiltration units used for the final sample concentration, the serum proteins were

separated from β -lg by centrifugal ultrafiltration units.

Enzymatic hydrolysis can be used for isolation and purification of milk proteins. Caseins are highly digestible by proteases compared to whey protein and may be selectively digested by proteases converting them to low-molecular-weight fractions that can be sieved out through membrane filters (Guo, Fox, Flynn, & Kindstedt, 1995). Whey proteins are hydrolyzed by pepsin enzyme, except β -Lg. Because β -Lg is fairly resistant to digestion due to their globular structure and have different susceptibility to digestion by pepsin. The purification of β -Lg from contaminating proteins which are α -La and BSA was based on the selective hydrolysis by pepsin at 37 °C and pH 2. β -lactoglobulin is resistant to peptic digestion, but the enzymic hydrolysis of contaminating proteins, α -lactalbumin and traces of serum albumin occurs in these conditions (Sannier, Bordenave, & Piot,

2000). Therefore, the enzymatic hydrolysis technique was used together with ultrafiltration technique in order to remove α -lactalbumin and traces of serum albumin.

When the enzymatic hydrolysis was used together with ultrafiltration technique, it was found efficient (1.43 fold) and pure than the enzymatic hydrolysis together with dialyse membrane (1.32 fold).

The last isolation method was anion exchange chromatography via vivapure Q Mini H column. After anion exchange chromatography, eighteen fractions were collected at the end of column as the elution occurs and all collected fractions analysed by HPLC. According to HPLC analysis, it was determined that the third fraction has α -La and β -Lg. At a later stage, α -La and β -Lg contained in third fraction was separated from each other by using the Vivapure Q Mini H column to obtain pure β -Lg (Figure 1).

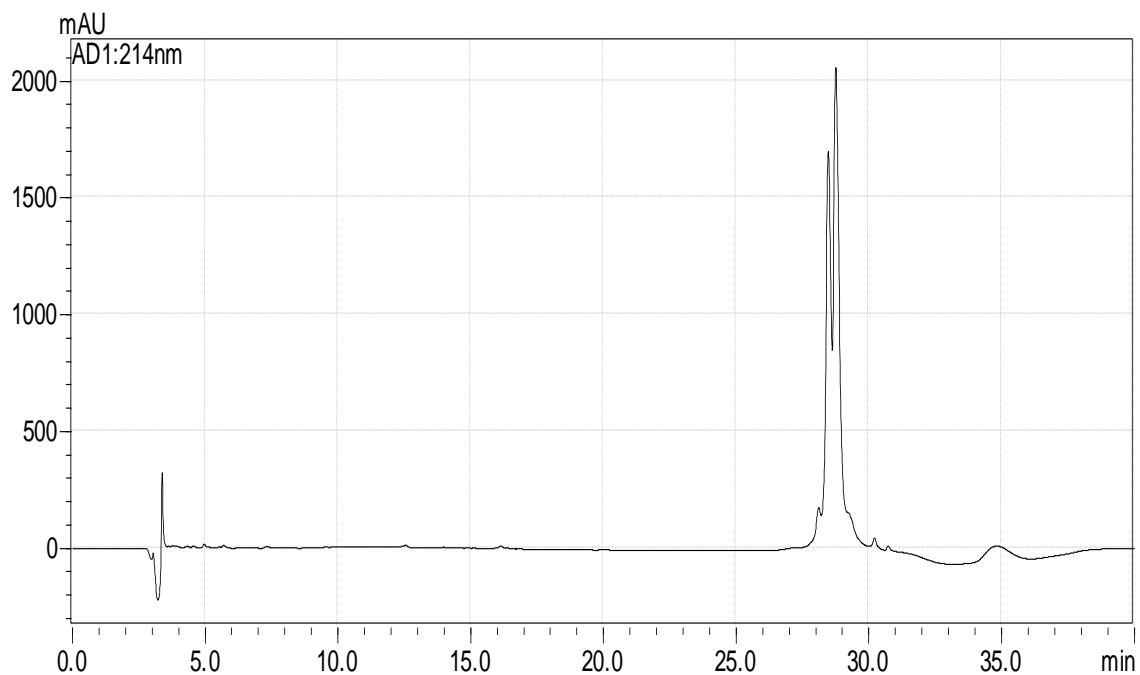
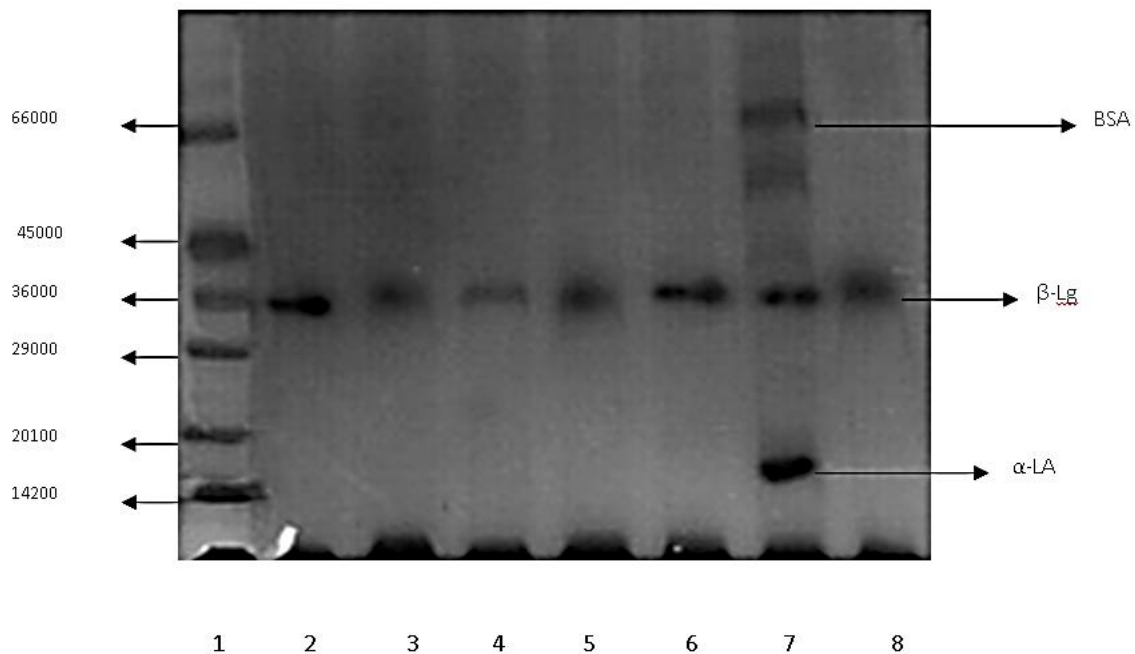


Figure 1. Chromatogram using Vivapure Q Mini H column

Consequently β -Lg isolated was obtained 1.43, 6.56 and 43.59 fold respectively by pepsin enzyme, anion exchange chromatography treatment and ultrafiltration techniques (Table 2). Standard curves of β -Lg were obtained by using LC Solution Software which is analysis program of HPLC. β -Lg amount of all process samples were calculated using these curves. We can say ultrafiltration technique is more effective (43.59 fold) than other isolation techniques. Cheang and Zydney (2003, 2004) were able to obtain 100-fold purification and greater than 90% recovery of β -Lg from a binary mixture with α -La by ultrafiltration techniques. Recently isolation of α -La from sweet whey was achieved through a novel approach involving membrane filtrations and a triptych treatment (Bottomley, 1991). Bottomley (1991) de-

scribed a two-stage membrane process for obtaining concentrates enriched in whey protein. The separation principle is differences in molecular weight of proteins and a likely challenge is lack of adequate selectivity for the separation of β -Lg and α -La due to the very similar molecular weight of these proteins (Cheang & Zydney, 2003; Fox, 2003; Muller, Chaufer, Merin, & Daufin, 2003). Ye and others were obtained 1260 mg α -La, 1290 mg β -Lg B and 2280 mg β -Lg A from 1 liter rennet whey using ion exchange chromatography (Ye, Yoshida, & Ng, 2000).

All isolate and whey samples are analyzed by SDS-PAGE (Figure 2). The second band has a biggest area as a calculation. Optic densitometers of SDS-PAGE band is calculated by 1.45 ImageJ (Table 3).



1: Marker, 2: Retante which was obtained filtrate 1 used as a sample for 10000MWCO, 3: Filtrate obtained after 30000 MWCO (Filtrate 1.), 4: After dialysis step is in Application of Pepsin enzyme, 5: After ultrafiltration step is in application of Pepsin enzyme, 6: The fraction of anion exchange chromatography, 7: Whey sample, 8: Standard of β -Lg.

Figure 2. SDS Page Bands

Table 2. β -Lg purification rate results after HPLC analyses (g/L-p<0,05)

	β -lg Concentration in Final Volume (g/L)	Fold Purificaiton
Whey	0.389 \pm 0.015	1
Pepsin enzyme treatment with ultrafiltration	0.557 \pm 0.04 ^c	1.43
Anion exchange chromatography	2.552 \pm 0.025 ^b	6.56
Ultrafiltration	16.958 \pm 1.275 ^a	43.59

Table 3. Optic densitometers results of SDS PAGE

Techniques	Area	%
Marker	270	8.38
Retante which was obtained filtrate 1 used as a sample for 10000MWCO	545	16.92
Filtrate obtained after 30000 MWCO (Filtrate I.)	384	11.92
The Pepsin enzyme treatment combined with dialysis	341	10.59
The Pepsin enzyme treatment combined with ultrafiltration technique	418	12.98
The fraction of anion exchange chromatography	504	15.65
Whey sample	325	10.09
Standard of β -Lg	434	13.47
Total area	3221	

We can obtain denser β -Lg all techniques, as shown in Figure 2. But ultrafiltration techniques have good yield and purity according to HPLC profile analysis results (Table 2). Our results showed that ultrafiltration techniques are rapid and efficient that allows high protein yield and has advantages over other methods since it preserves the native structure of beta lactoglobulin. Also our ultrafiltration techniques could remove BSA, however the whey sample had BSA band. Our result is agreement with Bhattacharjee et al. (2006). They showed that proteins which have high molecular weight like BSA, immunoglobulin and lactoferrin were removed on first step (30 kDa).

Conclusion

This study concluded that pepsin enzyme treatment and anion exchange chromatography are not efficient enough and very time consuming although these are economic methods. However, ultrafiltration techniques have provided higher purity and yield for isolation of β -Lg. Furthermore, β -Lg doesn't denaturate and contains any contaminants such as other proteins or salts by ultrafiltration techniques. This research suggests that ultrafiltration techniques could be applied on high purity and yield of β -Lg isolation. Therefore further investigation is needed to large scale isolation process.

Acknowledgements

This work was sponsored by Scientific Research Projects, with Coordination from Süleyman Demirel University. The project number is 2727-YL-11.

References

Aich, R., Batabyal, S. & Joardar, S.N. (2015). Isolation and purification of beta-lactoglobulin from cow milk. *Veterinary World*, 8, 621-624.

Bhattacharjee, S., Bhattacharjee, C. & Datta, S. (2006). Studies on the fractionation of β -lactoglobulin from casein whey using ultrafiltration and ion-exchange membrane chromatography. *Journal of Membrane Science*, 275(1), 141-150.

Bottomley, R. (1991). Process for obtaining concentrates having a high α -lactalbumin content from whey. US Patent, Patent number: 5,008, 376.

Chatterton, D.E., Smithers, G., Roupas, P. & Brodkorb, A. (2006). Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin—Technological implications for processing. *International Dairy Journal*, 16(11), 1229-1240.

Cheang, B., & Zydney, A. L. (2003). Separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin using membrane ultrafiltration. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(2), 201-209.

Cheang, B., & Zydney, A. L. (2004). A two-stage ultrafiltration process for fractionation of whey protein isolate. *Journal of Membrane Science*, 231(1), 159-167.

De Wit, J. (1998). Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*, 81(3), 597-608.

Elgar, D.F., Norris, C.S., Ayers, J.S., Pritchard, M., Otter, D.E., & Palmano, K.P. (2000). Simultaneous separation and quantitation of the major bovine whey proteins including proteose peptone and caseinomacropptide by reversed-phase high-performance liquid chromatography on polystyrene-divinylbenzene. *Journal of Chromatography A*, 878(2), 183-196.

- Fox, P. (2003). Milk proteins: general and historical aspects *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins* (pp. 1-48): Springer. ISBN 978-1-4419-8602-3
- Guo, M., Fox, P., Flynn, A., & Kindstedt, P. (1995). Susceptibility of β -Lactoglobulin and Sodium Caseinate to Proteolysis by Pepsin and Trypsin. *Journal of Dairy Science*, 78(11), 2336-2344.
- Hernández-Ledesma, B., Recio, I., & Amigo, L. (2008). β -Lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids*, 35(2), 257-265.
- Jang, H.D., & Swaisgood, H.E. (1990). Disulfide bond formation between thermally denatured β -lactoglobulin and κ -casein in casein micelles. *Journal of Dairy Science*, 73(4), 900-904.
- Karagözü, C., & Bayarer, M. (2004). Peyniraltı suyu proteinlerinin fonksiyonel özellikleri ve sağlık üzerine etkileri. *Ege Üniv. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 41, 197-207.
- Kinekawa, Y.-I., & Kitabatake, N. (1996). Purification of β -Lactoglobulin from Whey Protein Concentrate by Pepsin Treatment. *Journal of Dairy Science*, 79(3), 350-356.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lieske, B., Konrad, G., & Faber, W. (1997). A new spectrophotometric assay for native β -lactoglobulin in raw and processed bovine milk. *International Dairy Journal*, 7(12), 805-812.
- Lozano, J.M., Giraldo, G.I., & Romero, C. M. (2008). An improved method for isolation of β -lactoglobulin. *International Dairy Journal*, 18(1), 55-63.
- Morr, C., & Ha, E. (1993). Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 33(6), 431-476.
- Muller, A., Chaufer, B., Merin, U., & Daufin, G. (2003). Purification of alpha-lactalbumin from a prepurified acid whey: Ultrafiltration or precipitation. *Le Lait*, 83(6), 439-451.
- Outinen, M. (2010). Effect of pre-treatment of cheese milk on the composition and characteristics of whey and whey products. TTK Dissertation 212, Aalto University, p. 44. ISBN 978-9-5260-3006-7
- Reddy, I.M., Kella, N.K., & Kinsella, J.E. (1988). Structural and conformational basis of the resistance of beta-lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(4), 737-741.
- Sannier, F., Bordenave, S., & Piot, J. (2000). Purification of goat β -lactoglobulin from whey by an ultrafiltration membrane enzymic reactor. *Journal of Dairy Research*, 67(01), 43-51.
- Şanlıdere Aloğlu, H. (2013). The effect of various heat treatments on the antioxidant capacity of milk before and after simulated gastrointestinal digestion. *International Journal of Dairy Technology*, 66(2), 170-174.
- Stojadinovic, M., Burazer, L., Ercili-Cura, D., Sancho, A., Buchert, J., Velickovica T.C. & Stanic-Vucinica, D. (2012). One-step method for isolation and purification of native β -lactoglobulin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 1432-1440
- Tunçtürk, Y., Andiç, S., & Ocak, E. (2010). Homojenizasyon ve pastörizasyonun Beyaz Peynir ve Peyniraltı Suyu Bileşimine Etkisi. *Gıda/The Journal of Food*, 35(5), 339-345.
- Ye, X., Yoshida, S., & Ng, T. (2000). Isolation of lactoperoxidase, lactoferrin, α -lactalbumin, β -lactoglobulin B and β -lactoglobulin A from bovine rennet whey using ion exchange chromatography. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32(11), 1143-1150.
- Yerlikaya, O., Kınık, Ö., & Akbulut, N. (2010). Peyniraltı Suyunun Fonksiyonel Özellikleri ve Peyniraltı Suyu Kullanılarak Üretilen Yeni Nesil Süt Ürünleri. *Gıda/The Journal of Food*, 35(4), 289-296.
- Young, V. R. (1994). Adult amino acid requirements: the case for a major revision in current recommendations. *The Journal of Nutrition*, 124(8 Suppl), 1517S-1523S.



ORIGINAL ARTICLE/ORIJİNAL ÇALIŞMA

FULL PAPER

TAM MAKALE

EFFECTS OF BAKER'S YEAST ADDITION ON SOME PROPERTIES AND PHYTIC ACID CONTENT OF TARHANA PREPARED WITH DIFFERENT CEREAL AND LEGUME PRODUCTS

Nilgün Ertaş 

Necmettin Erbakan University, Faculty of Engineering and Architecture, Department of Food Engineering, Koycegiz Campus, Konya, Turkey

Received: 06.04.2017

Accepted: 06.07.2017

Published online: 06.11.2017

Corresponding author:

Nilgün Ertaş, Necmettin Erbakan University, Faculty of Engineering and Architecture, Department of Food Engineering, Koycegiz Campus, 42090, Konya, Turkey

E-mail: nertas@konva.edu.tr, dr.nilgunertas@gmail.com

Abstract:

Fermentation is an important process for improvement of functional properties of food product. It is also one of the most effective methods for reducing phytic acid content. Tarhana production contains 7 day fermentation by yoghurt bacteria with and without bakers' yeast. In this study, wheat flour used in tarhana preparation was replaced with different cereal flours (barley, rye and oat), legume flours (chickpea, common bean and lentil) and cereal bran (rye, oat and barley) at 50%, 50% and 25% levels, respectively. All types of flour and bran addition increased the ash and mineral content compared to the control, and the highest ash, calcium, iron, magnesium and zinc content was determined with rye flour addition. After fermentation process, the lowest phytic acid content was found with 50 % barley flour addition. The mean of phytic acid loss after fermentation changed between 90.91% and 94.31% and the lowest phytic acid losses were found with oat and rye bran addition. Tarhana samples produced with yeast had higher mean values for mineral matter, total phenolic content and antioxidant capacity on the other hand gave less appreciation by the panelists. According to general acceptability; the most popular tarhana samples after control was rye flour tarhana sample.

Keywords: Tarhana, Cereal, Legume, Flour, Bran, Phytic acid, Mineral

FOOD and HEALTH

E-ISSN: 2602-2834

4(1), 9-18 (2018) doi: 10.3153/JFHS18002

© 2015-2018 ScientificWebJournals (SWJ)

Introduction

Traditional food is gaining popularity in recent years, due to the depending on changes in consumers' lifestyles, new flavours, new products, safe food, less processed food and foods contain less additives that consumer demand at the national and international market. Tarhana is the traditional soup consumed in Turkey.

Tarhana is fermented cereal product that contains generally wheat flour, yoghurt, different vegetables and spices. Also, tarhana is a suitable product for enrichment, for this reason buckwheat (Bilgiçli, 2009), barley flour (Erkan et al., 2006), steel-cut oats and oat flour (Kilci and Goçmen, 2014a, 2014b, Değirmencioglu et al., 2016), soy bean (Öner et al., 1993), chickpea and lentil (Özbilgin, 1983) rye, maize and soy bean flour (Köse and Çağındı, 2002), wheat germ/bran (Bilgiçli and Ibanoglu, 2007) oat bran and chelating agents (Ekholm et al., 2003), wheat bran (Çelik et al. 2010), ground tench flesh (Erdem et al., 2014), phytase sources (Bilgiçli et al., 2006), soy yoghurt (Koca et al., 2002), whey concentrates (Ertaş et al., 2009), lupin yoghurt (Ertaş et al., 2014), tomato seed (Işık and Yapar 2017), cherry laurel (Temiz and Tarakçı, 2017), baker's yeast (Çelik et al., 2005) and rose hip (Levent et al., 2013) have been used in tarhana production.

Phytic acid, commonly found in cereals and legumes forms insoluble complexes with many minerals which necessary for the body at physiological pH, and reduces their bioavailability. In reducing the amount of phytic acid; many physical, chemical and biochemical methods such as grinding, fermentation, cooking under pressure, germination, soaking and the addition of phytase enzyme can be used (Liang et al., 2008). A method or combination of several different methods may be possible for use depending on structure and manufacturing process of each product.

Fermentation develops the nutritional and sensory characteristics of the food and also it reduces the amount of phytic acid. In fermented cereal products, phytase enzyme from microorganisms in natural flora of flour and/or bakers' yeast provide the breakdown of phytic acid. Moreover decreasing the acidity of the medium increases phytic acid breakdown during fermentation (Lopez et al., 1983).

The aim of this study was to determine the effect of phytic acid rich materials and baker's yeast on

some quality properties and phytic acid content of tarhana.

Materials and Methods

Materials

Commercial white wheat flour with a crude protein content of 12.52 % (Nx5.7, w/w, dry basis) was used in tarhana production. Commercial full-fat (8.43 %) strained yoghurt (with 7.87% protein) made of cow's milk was used to prepare tarhana. Bakers' yeast (*Saccharomyces cerevisiae*, press form), onions, tomato paste (22% total dry solids), red pepper (powder form) and salt were purchased from local markets in Konya, Turkey. Before use, onion was peeled and chopped finely. Cereal flours (barley, rye and oat), legume flours (chickpea, common bean and lentil) and cereal bran (rye, oat and barley) were obtained Sağlık Agriculture Mill in Konya, Turkey.

Preparation of tarhana samples

Tarhana samples prepared at laboratory conditions with the formula contained; wheat flour (400g), yoghurt (160g), tomato paste (40g), chopped onions (20g), red pepper (8g), table salt (4g) and with and without bakers' yeast (10g). These ingredients were mixed with 100 ml distilled water using a KitchenAid mixer for 5 min at the highest speed. Twenty different tarhana formulations with two replication were prepared (Table 1). Flours of cereal (oat, rye and barley), and legume flours (chickpea, common bean and lentil) were replaced with wheat flour at the level of 50% (w/w), brans of cereals (oat, rye and barley) were replaced with wheat flour at the level of 25% (w/w). And also tarhana samples were prepared with (2.5%) and without bakers' yeast. After mixing, the tarhana dough was incubated at 30 °C for 72 h, and the fermented dough samples were dried at 55 °C for 48 h in drier (Nüve FN- 500). The dried tarhana dough samples were ground into granulated form in a hammer mill equipped with 1 mm opening screen.

Colour measurement

Dried and ground tarhana samples were used to determine to colour properties. Konica Minolta Chroma Meter (Model CR-400, Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japan) was used to measure colour properties. Colour of the samples was evaluated by measuring the L* a* and b* values with illuminate D63 as reference. From a* and b* val-

ues, the hue angle ($\tan^{-1} b^*/a^*$) and saturation index ($((a^{*2}+b^{*2})^{1/2})$) were calculated. Triplicate readings were taken from each tarhana sample.

Analytical methods

The moisture content (AACC method 44-12) and ash content (AACC method 08-01) were determined according to standart methods (AACC, 1990).

Nutritional analysis

Phytic acid content was measured by a colorimetric method according to Haugh and Lantzsch (1983) at 72 hours of tarhana fermentation. A standard curve was prepared using sodium phytate solution. Determinations were conducted in triplicate. The phytic acid loss as percentage during fermentation was calculated by the following formula.

$$\text{Phytic acid Loss (\%)} = \frac{(\text{Amount of phytic acid in tarhana dough initially} - \text{Amount of phytic acid in tarhana after fermentation})}{\text{Amount of phytic acid in tarhana dough initially}} \times 100 \quad (1)$$

Table 1. Experimental design of tarhana samples

Bakers' Yeast (%)	Flour Blends
0	Wheat flour (Control)
	Oat flour (%50)
	Rye flour (%50)
	Barley flour (%50)
	Chickpea flour (%50)
	Common bean flour (%50)
	Lentil flour (%50)
	Oat bran (%25)
	Rye bran (%25)
	Barley bran (%25)
2.5	Wheat flour (Control)
	Oat flour (%50)
	Rye flour (%50)
	Barley flour (%50)
	Chickpea flour (%50)
	Common bean flour (%50)
	Lentil flour (%50)
	Oat bran (%25)
	Rye bran (%25)
	Barley bran (%25)

Results and Discussion

The statistical significance levels of factors in this study were given in Table 2. According to the table of variance analysis, while bakers' yeast came out to be significant for phytic acid content, phytic acid loss, total phenolic content, antioxidant capacity, all minerals, taste and overall acceptability scores, flour blend came out to be significant for all parameters except odor scores.

Colour properties

Colour properties of tarhana samples are given in Table 3. The L* value gives a measure of the lightness of the product colour. The redness and yellowness are denoted by a* and b* values, respectively. L*, a*, b* saturation index and hue angle

values did not change according to bakers' yeast addition. The effect of different cereal and legume flours and brans on colour properties of tarhana were significantly different (p<0.05). The measured values of the colour parameters of tarhana samples varied in as ranged between 67.59 and 74.43 for lightness, 4.57 to 9.82 for redness, 25.67 to 32.63 for yellowness, 26.08 to 33.81 for saturation index and 73.11 to 79.89 for hue angle. Rye flour addition in to the tarhana formulation gave the lowest redness, yellowness and saturation index and the highest hue angle values. Bilgiçli (2009) stated that L* and b* values of tarhana decreased and redness values increased with increasing buckwheat addition. Esimek (2010) reported colour values of which commercial tarhana and collected from different locations in Turkey were

determined as ranging between 60.6 - 85.6 for L*, 0.0 - 19.2 for a*, and 7.3 - 30.4 for yellowness. Similar results have been reported by Erkan *et al.* (2006) with wheat and barley flour tarhana. Also Bilgiçli and İbanoğlu (2007) determined the lightness values decreased and redness and yellowness values increased with wheat germ and wheat bran addition in tarhana according to control sample.

Chemical properties

Crude ash and mineral content of tarhana samples were given in Table 4. Addition of bakers' yeast in tarhana formulation did not significant effect ($p>0.05$) on the ash content of tarhana samples. The highest ash content was obtained with rye flour substituted tarhana, and the lowest ash content was found in control tarhana. Tarhana containing cereal bran had lower ash content than that of containing legume flour due to low level use of bran (25%) according to legume flour (50%).

Table 2. Statistical Significance level

	L*	a*	b*	Saturation index	Hue angle	Phytic acid content	Phytic acid loss	Total phenolic content	Antioxidant capacity (DPPH)
Bakers' yeast addition (A)	ns	ns	ns	ns	Ns	**	**	**	**
Flour blend (B)	**	**	**	**	**	**	**	**	**
AxB	**	**	ns	ns	**	ns	ns	**	**
	Crude ash	Calcium	Iron	Potassium	Magnesium	Phosphorus	Zinc		
Bakers' yeast addition (A)	Ns	**	**	**	**	**	**	*	
Flour blend (B)	**	**	**	**	**	**	**	**	**
AxB	**	**	**	**	**	**	**	**	**
	Taste	Odor	Colour	Grittiness	Sourness	Overall Acceptability			
Bakers' yeast addition (A)	**	ns	ns	ns	ns	*			
Flour blend (B)	**	ns	**	**	*	**			
AxB	Ns	ns	ns	ns	ns	ns			

ns: ($p > 0.05$), *: ($p < 0.05$), **: ($p < 0.01$)

Table 3. Colour values of tarhana samples substituted with phytic acid rich flours¹

	Colour values				
	L*	a*	b*	Saturation index	Hue angle
Bakers' yeast (%0)	71.72 A	7.62 A	30.30 A	31.27 A	76.05 A
Bakers' yeast (%2.5)	71.28 A	7.92 A	30.29 A	31.32 A	75.46 A
Wheat flour	74.43 ^a	8.53 ^{bc}	32.63 ^a	33.73 ^a	75.34 ^{de}
Oat flour	70.60 ^{cd}	6.27 ^d	27.33 ^d	28.04 ^e	77.08 ^{bc}
Rye flour	70.92 ^{cd}	4.57 ^e	25.67 ^e	26.08 ^f	79.89 ^a
Barley flour	72.77 ^{abc}	6.30 ^d	27.63 ^d	28.34 ^e	77.17 ^b
Chickpea flour	70.32 ^d	9.08 ^{ab}	31.75 ^{ab}	33.02 ^{ab}	74.04 ^{ef}
Common bean flour	67.59 ^e	9.31 ^{ab}	32.13 ^a	33.46 ^{ab}	73.83 ^f
Lentil flour	70.29 ^d	9.82 ^a	32.35 ^a	33.81 ^a	73.11 ^f
Oat bran	71.86 ^{bcd}	7.90 ^c	30.72 ^c	31.72 ^d	75.62 ^{cd}
Rye bran	72.07 ^{abcd}	8.10 ^c	31.03 ^{bc}	32.07 ^{cd}	75.38 ^{de}
Barley bran	74.18 ^{ab}	7.84 ^c	31.73 ^{ab}	32.69 ^{bc}	76.12 ^{bcd}

¹ Means with different superscripts in the same column are significantly different.

Minerals play a pivotal role in many functions such as bone health, blood pressure, healthy teeth, cell protection, heart rate, muscle function in the body. Tarhana is rich in minerals with its ingredients used in production like as calcium from yogurt, iron from wheat flour, magnesium from tomato paste and chili, zinc from yeast, and potassium from tomato paste, red pepper, yeast and onion (Bilgiçli *et al.*, 2006).

In this research, addition of bakers' yeast had significant effect on the calcium, iron, potassium magnesium, phosphorus ($p < 0.01$) and zinc contents ($p < 0.05$) of the samples and different cereal and legume flours and brans had significant effect ($p < 0.01$) on the calcium, iron, potassium, magnesium, phosphorus and zinc contents of the samples. Calcium, iron and potassium contents in tarhana samples were determined as mg/100 g; 58.98 - 214.09; 2.84 - 16.14; 399.82 - 940.79. Addition of yeast in tarhana formulation resulted an increase in calcium, iron and potassium contents in tarhana samples. The highest calcium, iron and potassium contents were found in tarhana samples containing 50% rye flour (214.09 mg/100g), 50% rye flour (16.14 mg/100g) and 50% common bean flour (940.79 mg/100g), respectively. As previously mentioned, partially lower mineral content of tarhana containing cereal bran than legume flours due mainly to low level use of bran (25%) according to legume flour (50%). Dry matter loss as carbohydrates during long fermentation process may cause this proportional increase in mineral content.

Similar results have been determined by some researchers (Yücecan *et al.*, 1988; Erbaş *et al.*, 2005; Bilgiçli *et al.*, 2006; Esimek, 2010). The Recommended Dietary Allowances (RDAs) are 130 mg of magnesium, 800 mg of calcium, 500 mg of phosphorus and 5 mg of zinc for 4-8 years old children. When 100g (dry matter) tarhana containing 50% rye flour were consumed 26.8 % of RDA for calcium, 125.9% of RDA for magnesium, 69.8 % of RDA for phosphorus, and 64.4 % of RDA for zinc were taken by the children.

Nutritional evaluation

Phytic acid or its salts, the phytate, are found in plants. Phytic acid has been considered to be an anti-nutritional factor due to its chelates with important minerals such as calcium, magnesium, iron, zinc, and protein (Rickard and Thompson, 1997). There are various studies in the literature for increment of phytic acid in raw material or end product. Soaking, autoclaving (Mubarak *et*

al., 2005; Shimelis and Rakshit, 2007), cooking (Attia *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2008), dehulling, sprouting, extrusion (Alonso *et al.*, (2000), fermentation and heat treatment reduce the phytic acid content (Özkaya *et al.*, 2004).

In present study, phytic acid loss of tarhana after 72nd hours of fermentation was affected by yeast addition and cereal and legume flours and brans statistically ($p < 0.01$). Phytic acid content of tarhana samples with (2.5%) and without (0 %) yeast were 28.18 and 35.45 after 72 hours, respectively (Table 5). Phytic acid loss of tarhana samples with and without yeast addition were 93.92 and 92.36%, respectively. Phytic acid losses of with and without yeast fermented tarhana sample by natural microbial flora are very close together. Fermentation process is a very important method to reduce the amount of phytic acid (Marfo *et al.*, 1990). In general, long fermentation time and yeast addition increases the degradation of phytate. However, the lactic acid fermentation of tarhana without yeast was provided very high rate of phytic acid loss (Lopez *et al.*, 1983). The environment pH is a very important factor for degradation phytic acid (Fretzdorff and Brümmer 1992). Due to the high pH drops during fermentation tarhana samples loss of phytic acid was observed. The highest phytic acid content at 72nd hours tarhana samples were determined with 25 % oat bran (39.80 mg/100g) and 25 % rye bran (42.16 mg/100g) addition. The lowest phytic acid loss was also obtained with same tarhana samples.

Phenolic compounds have antioxidant activity in many plants, grains and other cereal products. Phenolic compounds such as flavonoids, tannins and isoflavonoids are located in legumes (Pekşen and Artık, 2005), and particularly located the outer bran layer of the grain (Adom and Liu, 2002). Total phenolic content and antioxidant capacity of tarhana samples are given in Table 6. The amounts of total phenolic were determined ranged between 2661 and 4960 mg GAE /100g in tarhana samples. Addition of yeast to tarhana caused an increase in phenolic content. The highest amount of total phenolic was obtained with 50 % oat flour addition (4960 mg GAE/100g); and the lowest were obtained with 50 % common bean flour (2661 mg GAE/100g) addition in tarhana. It is known that the linear regressions were indicated between total phenolic content and antioxidant activity by a lot of researchers. Foods that phenolic contents are high have high antioxidant effects. Antioxidant activity values determined according to DPPH method of tarhana samples ranged between 20.81

and 28.06 %. Addition of yeast to tarhana caused an increase in antioxidant activity. The antioxidant activity of the bakers' yeast comes from bioactive compounds which can serve as antioxidants, for example glutathione, Maillard reaction products

and sulfur-containing amino acids (Sommer, 1996; Stephen and Jamieson, 1996). 25 % barley bran (28.06%) and 50 % rye flour (27.86%) addition in tarhana showed the highest antioxidant activity.

Table 4. Crude ash (%) and mineral content (mg/100g) of tarhana samples substituted with phytic acid rich flours¹

	Crude ash	Calcium	Iron	Potassium	Magnesium	Phosphorus	Zinc
Bakers' yeast (%0)	1,87 A	87,51 B	4,71 B	600,97 B	86,13 B	328,81 B	2,14 B
Bakers' yeast (%2.5)	1,92 A	90,52 A	5,18 A	654,91 A	88,70 A	352,91 A	2,50 A
Wheat flour	1,26 ^f	58,98 ^f	2,84 ^d	399,82 ^f	48,50 ^h	254,57 ^g	1,37 ^d
Oat flour	1,68 ^e	66,70 ^{de}	3,69 ^c	502,52 ^e	77,54 ^f	345,45 ^{cde}	2,92 ^{ab}
Rye flour	2,54 ^a	214,09 ^a	16,14 ^a	622,15 ^c	136,91 ^a	348,87 ^{bcd}	3,22 ^a
Barley flour	1,80 ^d	69,33 ^d	3,74 ^c	585,67 ^{cd}	82,31 ^e	331,02 ^{def}	1,81 ^d
Chickpea flour	2,01 ^c	96,48 ^c	4,12 ^b	821,20 ^b	97,13 ^c	367,41 ^{abc}	3,05 ^{ab}
Common bean flour	2,42 ^b	123,15 ^b	3,70 ^c	940,79 ^a	113,23 ^b	371,81 ^a	2,00 ^{cd}
Lentil flour	2,08 ^c	63,23 ^e	4,34 ^b	799,27 ^b	73,53 ^g	374,93 ^a	2,75 ^{ab}
Oat bran	1,81 ^d	65,91 ^{de}	3,64 ^c	559,78 ^d	87,49 ^d	369,85 ^{ab}	2,49 ^{bc}
Rye bran	1,65 ^e	69,08 ^d	3,70 ^c	543,54 ^{de}	85,09 ^{de}	321,22 ^f	1,79 ^d
Barley bran	1,68 ^e	63,21 ^e	3,53 ^c	504,66 ^e	48,50 ^g	254,57 ^{ef}	1,37 ^d

¹ Means with different superscripts in the same column are significantly different.

Table 5. Phytic acid content and phytic acid loss of tarhana samples substituted with phytic acid rich flours¹

	Phytic acid content (mg/100g)	Phytic acid loss after fermentation (%)
Bakers' yeast (%0)	35,45 A	92,36 B
Bakers' yeast (%2.5)	28,18 B	93,92 A
Wheat flour	30,41 ^{bcd}	93,45 ^{abc}
Oat flour	30,75 ^{bcd}	93,37 ^{abc}
Rye flour	27,36 ^{cd}	94,10 ^{ab}
Barley flour	26,41 ^d	94,31 ^a
Chickpea flour	28,21 ^{cd}	93,92 ^{ab}
Common bean flour	31,42 ^{bc}	93,23 ^{bc}
Lentil flour	28,68 ^{bcd}	93,82 ^{abc}
Oat bran	39,80 ^a	91,42 ^d
Rye bran	42,16 ^a	90,91 ^d
Barley bran	32,94 ^b	92,90 ^c

¹ Means with different superscripts in the same column are significantly different.

Table 6. Total phenolic content and antioxidant capacity of tarhana samples substituted with phytic acid rich flours¹

	Total phenolic content (mg GAE/100g)	Antioxidant capacity (DPPH) (%)
Bakers' yeast (%0)	2760 B	23.18 B
Bakers' yeast (%2.5)	4108 A	25.51 A
Wheat flour	2837 ^{de}	20.81 ^e
Oat flour	4960 ^a	24.52 ^c
Rye flour	4126 ^b	27.86 ^a
Barley flour	3531 ^{bcd}	26.45 ^b
Chickpea flour	3268 ^{cde}	22.59 ^d
Common bean flour	2661 ^e	22.67 ^d
Lentil flour	3072 ^{cde}	21.21 ^e
Oat bran	3252 ^{cde}	26.65 ^b
Rye bran	2853 ^{de}	22.59 ^d
Barley bran	3780 ^{bc}	28.06 ^a

¹ Means with different superscripts in the same column are significantly different.

Sensory properties

Sensory properties of tarhana samples are given in Table 7. Tarhana soups prepared from different legume and cereal flours and brans varied significantly ($p < 0.01$) in terms of taste, colour, grittiness and overall acceptability. Range of scores regarding taste, colour and grittiness were 2.69-4.31; 3.40-4.68; and 3.00-4.43 respectively.

The most admired tarhana samples regarding to taste was control and 50% rye flour added tarhana, and the most dislike tarhana samples was chosen 50% chickpea flour added tarhana by the panelists. The sensory panel resulted in that tarhana soups with rye flour and rye bran substituting of flour in the formulation were most liked according to colour properties. Common bean flour addition caused a decrease in the scores for grittiness, while addition of oat flour did not affect this attribute and gave similar grittiness properties like control. Addition of lentil flour to tarhana formulation was found to improve sourness of tarhana and gave similar scores like control. The highest score for overall acceptability was observed with wheat flour (control tarhana), and the lentil flour added tarhana samples as shown in Table 6.

Conclusion

Different legume and cereal flours and brans were used to produce fortified tarhana samples. Flours of legumes and cereal and brans of cereal were phytic acid rich materials. For reduce the phytic

acid content and increase the bioavailability of minerals, tarhana fermentation process with and without yeast addition to tarhana formula is aimed. Bakers' yeast addition gave higher phytic acids loss than tarhana without bakers' yeast. After 72 hours tarhana fermentation process, the highest phytic acid loss was determined with 50 % barley flour addition, and the lowest phytic acid content was also found with 50 % barley flour addition.

Some nutritional changes such as mineral elements, phenolic contents, occurred in tarhana samples with cereal and legume flour and cereal bran addition. Functional properties were affected with changed tarhana formulation. Addition of yeast into tarhana caused an increase in phenolic content and antioxidant activity. 25 % barley bran and 50 % rye flour addition in tarhana showed the highest antioxidant activity. According to sensorial properties; the most popular tarhana samples except the control, was rye flour tarhana sample with bakers' yeast. Further investigations are needed for the assessment of their fermentative microbial flora and fermentation conditions.

Acknowledgement

We are grateful to the Commission for the Scientific Research Projects (BAP: 151219002) at Necmettin Erbakan University for supporting and funding this research study.

Table 7. Sensorial properties of tarhana samples substituted with phytic acid rich flours¹

	Taste	Odor	Colour	Grittiness	Sourness	Overall Acceptability
Bakers' yeast (%0)	3.85 A	3.99 A	4.09 A	3.76 A	3.78 A	3.89 A
Bakers' yeast (%2.5)	3.21 B	3.80 A	4.09 A	3.71 A	3.91 A	3.74 B
Wheat flour	4.31 ^a	4.43 ^a	4.43 ^{ab}	4.43 ^a	4.20 ^a	4.36 ^a
Oat flour	3.59 ^{cde}	3.93 ^{ab}	4.20 ^{ab}	4.40 ^a	4.00 ^{abcd}	4.02 ^{bc}
Rye flour	4.23 ^{ab}	4.25 ^a	4.68 ^a	3.83 ^{bcd}	3.60 ^{bcd}	4.12 ^{ab}
Barley flour	3.40 ^{cde}	4.20 ^a	3.95 ^{bc}	4.03 ^{ab}	3.55 ^{cd}	3.83 ^{cd}
Chickpea flour	2.69 ^f	3.45 ^b	3.53 ^c	3.55 ^{cde}	3.75 ^{abcd}	3.39 ^f
Common bean flour	3.00 ^{ef}	3.80 ^{ab}	3.53 ^c	3.00 ^f	4.08 ^{ab}	3.48 ^{ef}
Lentil flour	3.68 ^{bed}	4.05 ^{ab}	3.40 ^c	3.90 ^{bc}	4.18 ^a	3.84 ^{cd}
Oat bran	3.83 ^{abc}	3.53 ^b	4.18 ^{ab}	3.43 ^{def}	4.05 ^{abc}	3.80 ^{cd}
Rye bran	3.38 ^{cde}	3.80 ^{ab}	4.58 ^a	3.38 ^{ef}	3.53 ^d	3.73 ^{de}
Barley bran	3.20 ^{def}	3.50 ^b	4.43 ^{ab}	3.41 ^{def}	3.50 ^d	3.61 ^{def}

¹ Means with different superscripts in the same column are significantly different.

References

- AACC (1990). Approved methods of the American Association of Cereal Chemists (8th ed.). St. Paul, MN.
- Adom, K.K. & Liu, R.H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6182-6187.
- Alonso, R., Aguirre, A. & Marzo, F. (2000). Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chemistry*, 68, 159-165.
- Attia, R. S., El-Tabey Shehata, A. M., Aman, M. E. & Hamza, M. A. (1994). Effect of cooking and decortication on the physical properties, the chemical composition and the nutritive value of chickpea (*Cicer arietinum L.*). *Food Chemistry*, 50(2), 125-131.
- Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E., and Sapirstein, H. D. (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal Chemistry*, 82, 390-393.
- Bilgiçli, N. (2009). Effect of buckwheat flour on chemical and functional properties of tarhana. *LWT - Food Science and Technology* 42, 514-518.
- Bilgiçli, N., Elgün, A. & Türker, S. (2006). Effects of various phytase source on phytic acid content, mineral extractability and protein digestibility of tarhana. *Food Chemistry*, 98(2), 329-337.
- Bilgiçli, N. & İbanoğlu, Ş. (2007). Effect of wheat germ and wheat bran on the fermentation activity, phytic acid content and colour of tarhana, a wheat flour-yoghurt mixture. *Journal of Food Engineering*, 78(2), 681-686.
- Bubert, H. & Hagenah, W.D. (1987). Detection and measurement. In P. W.J.M. Boumans (Ed.), *Inductively coupled plasma emission spectroscopy*. New York: Wiley Interscience.
- Çelik, I., Isik, F., Simsek, Ö. & Gürsoy, O. (2005). The effects of the addition of baker's yeast on the functional properties and quality of Tarhana, a traditional fermented food. *Czech Journal of Food Science*, 23, 190-195.
- Çelik, I., Isik, F. & Yılmaz, Y. (2010). Chemical, rheological and sensory properties of tarhana with wheat bran as a functional constituent. *Akademik Gıda*, 8(3), 11-17.
- Değirmencioğlu, N., Gürbüz, O., Herken E.N. and Yıldız, A.Y. (2016). The impact of drying techniques on phenolic compound, total phenolic content and antioxidant capacity of oat flour tarhana. *Food Chemistry*, 194, 587-594.
- Ekholm, P., Virkki, L., Ylinen, M. & Johansson L. (2003). The effect of phytic acid and some natural chelating agents on the solubility of mineral elements in oat bran. *Food Chemistry*, 80, 165-170.
- Erbaş, M., Certel, M. & Uslu, M.K. (2005). Microbiological and chemical properties of Tarhana during fermentation and storage as wet-sensorial properties of Tarhana soup. *LWT Food Science and Technology*, 38(4), 409-416.
- Erdem, E., Yapar, A. & Sarıçoban, C. (2014). Effect of ground tench (*Tinca tinca L.*, 1758) flesh substitution on physico-chemical, the free amino acids and microbial changes and sensory properties of tarhana. *Journal of Selçuk University Natural and Applied Science*, 3(2), 10-27.
- Erkan, H., Çelik, S., Bilgi, B. & Köksel, H. (2006). A new approach for the utilization of barley in food products: Barley tarhana. *Food Chemistry*, 97, 12-18.
- Ertaş, N., Bilgiçli, N., Özcan, S. & Sarı, Ş. (2014). Influence of lupin (*Lupinus albus L.*) yoghurt on mineral content and functional properties of tarhana. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 6(4), 395-401.
- Ertaş, N., Sert, D., Demir, M.K. & Elgün, A. (2009). Effect of whey concentrates addition on the chemical, nutritional and sensory properties of tarhana (a Turkish fermented cereal-based food). *Food Science and Technology Research*, 15(1), 51-58.
- Esimek, H. (2010). Determination of dietary fiber content and antioxidant properties of Tarhana, İnönü University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, M.Sc. Thesis, pp. 57.
- Fretzdorff, B. & Brümmer, J.M. (1992). Reduction of phytic acid during breadmaking of whole-meal bread. *Cereal Chemistry*, 69(3), 266-270.

- Gao, L., Wang, S., Oomah, B.D. & Mazza, G. (2002). Wheat Quality: Antioxidant Activity of Wheat Millstreams, in: *Wheat Quality Elucidation*, eds. P. Ng and C. W. Wrigley, AACC International: St. Paul, MN., 219-233.
- Gyamfi, M.A., M. Yonamine & Aniya, Y. (1999). Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally - induced liver injuries. *General Pharmacology the Vascular System*, 32, 661-667.
- Haugh, W. & Lantzsch, H.J. (1983). Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereals product. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 34, 1423-1426.
- Işık, F. & Yapar, A. (2017). Effect of tomato seed supplementation on chemical and nutritional properties of tarhana, *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(2), 667-674.
- Kilci, A. & Gocmen, D. (2014a). Changes in antioxidant activity and phenolic acid composition of tarhana with steel-cut oats. *Food Chemistry*, 145, 777-783.
- Kilci, A. & Gocmen, D. (2014b). Phenolic acid composition, antioxidant activity and phenolic content of tarhana supplemented with oat flour. *Food Chemistry*, 151, 547-553.
- Koca, A., Yazıcı, F. & Anıl, M. (2002). Utilization of soy yoghurt in tarhana production. *European Food Research and Technology*, 215(4), 293-297.
- Köse, E. & Çağındı, Ö.S. (2002). An investigation into the use of different flours in Tarhana. *International Journal of Food Science & Technology*, 37(2), 219-222.
- Levent, H., Bilgiçli, N., Cavuldak Algan Ö. & Ertaş, N. (2013). Effect of rose hip on physical and sensory properties of tarhana, a fermented wheat flour-yoghurt product, In: 1st International Probiotic and Functional Food Congress, April 11-13, 2013, Antalya, Turkey, pp. 33.
- Liang, J., Han, B., Nout, M.J.R. & Hamer, R.J. (2008). Effects of soaking, germination and fermentation on phytic acid, total and in vitro soluble zinc in brown rice. *Food Chemistry*, 10(4), 821-828.
- Lopez, Y., Gordon, D.T. & Field, M.L. (1983). Release of phosphours from phytate by natural lactic acid fermentation. *Journal of Food Science*, 43(3), 935-954.
- Marfo, E.K., Simpson, B.K., Iodwn, J.S. & Oke, O.L. (1990). Effect of local food processing on phytate level in cassava, cocoyam, yam, maize, sorghum, rice, cowpea and soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(7), 1580-1585.
- Mubarak, A.E. (2005). Nutritional composition and antinutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional process. *Food Chemistry*, 89, 489-495.
- Öner, M.D., Tekin, A.R. & Erdem, T. (1993). The use of soybeans in the traditional fermented food-tarhana. *LWT-Food Science and Technology*, 26(4), 371-372.
- Özbilgin, S., (1983). The chemical and biological evaluation of tarhana supplements with chickpea and lentil, PhD Thesis. Ithaca, USA: Cornell University.
- Özkaya, B. (2004). The effect of variety and extraction on the amount of phytic acid in bread. Ankara University Scientific Research Projects, Project No: 2002-07-11-064. Ankara.
- Pekşen, E. & Artık, C. (2005). Antibesinsel maddeler ve yemeklik tane baklagillerin besleyici değerleri. *Journal of Faculty of of Agriculture OMU*, 20(2), 110-120.
- Rickard, E.S. & Thompson, L.U. (1997). Interactions and effects of phytic acid, Antinutrients and Phytochemicals in Food, *American Chemical Society*, pp. 294-313, Washington D.C.
- Shimelis, E.A. & Rakshit, S.K. (2007). Effect of processing on antinutrients and in vitro protein digestibility of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in East Africa. *Food Chemistry*, 103, 161-172.
- Sommer, R. (1996). Yeast autolysate. The 9th International Symposium on Yeasts, August 1996, Sydney.
- Stephen, D.W. & Jamieson, D.J. (1996). Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 141, 207-212.
- Temiz, H. & Tarakçı, Z. (2017). Composition of volatile aromatic compounds and minerals

- of tarhana enriched with cherry laurel (*Laurocerasus officinalis*). *Journal of Food Science and Technology*, 54(3), 735-742.
- Wang, N., Hatcher, D.W. & Gawalko, E.J. (2008). Effect of variety and processing on nutrients and certain antinutrients in field peas (*Pisum sativum*). *Food Chemistry*, 111, 132-138.
- Yücecan, S., Kayakırlmaz, K., Başoğlu, S. & Tayfur, M., (1988). Tarhananın besin değeri üzerine bir araştırma, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 45(1), 47-51.



ORIGINAL ARTICLE/ORIJİNAL ÇALIŞMA

FULL PAPER

TAM MAKALE

***Nigella sativa* OIL COULD INDUCE OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF DENTAL PULP MESENCHYMAL STEM CELLS: CLINICAL NUTRITION FOR DENTISTRY**

Ayşegül Mendi 

Gazi University Faculty of Dentistry, Department of Medical Microbiology, Emek Ankara, Turkey

Received: 20.03.2017

Accepted: 13.08.2017

Published online: 06.11.2017

Corresponding author:

Ayşegül Mendi, Gazi University Faculty of Dentistry, Department of Medical Microbiology, Emek Ankara, Turkey

E-mail: aysegulmendi@gmail.com

Abstract:

A natural agent that, promotes osteogenic differentiation of dental pulp mesenchymal stem cells (DP-MSCs) could achieve success in regeneration during healing and may also prevent bone resorption and improve regeneration. We aimed to demonstrate that a *Nigella sativa* oil could induce differentiation of DP-MSCs. DP-MSCs were isolated from 3. molars and identified with flow cytometer. Osteogenic differentiation was conducted, and calcium granules were showed by typical Alizarin Red dyeing and calcium concentration were determined by DICA 500. Identification results showed that the cells are mesenchymal stem cells. Alizarin Red dyeing signed the calcium granules and DICA 500 showed that calcium concentrations were higher than the Control Group. This preliminary study shows for the first time the inductive potential of *N. sativa* oil for osteogenic differentiation in DP-MSCs. The mechanism should be investigated in further studies.

Keywords: Dental pulp mesenchymal stem cells, *Nigella sativa*, Osteogenic differentiation, Dexamethosone

FOOD and HEALTH

E-ISSN: 2602-2834

4(1), 19-24 (2018) doi: 10.3153/JFHS18003

© 2015-2018 ScientificWebJournals (SWJ)

Introduction

Dental pulp mesenchymal stem cells (DP-MSCs) are a type of mesenchymal stem cell (MSCs) found in the cell-rich zone of the pulp tissue of teeth. DP-MSCs have a strong self-renewal ability and the potential for multi-directional differentiation, which gives them great therapeutic potential for repairing damaged and/or defective tissue (Gronthos, 2000).

The presence and maintenance of alveolar bone is tooth dependent. After tooth extraction, the alveolar bone is slowly resorbed down to the body of the jaw bones. In cases of complete tooth loss, there is progressive bone resorption, which can result in extensive atrophy of the jaw bones and lead to major clinical challenges for implant placement and the construction of dental prostheses (Hoiruchi, 1999). Even without therapeutic intervention, the periodontium can exhibit a significant capacity for regeneration. However, such endogenous activity has limited capacity for periodontal regeneration. In addition, the impairment of bone formation increases in patients with osteoporosis and diabetes mellitus and related conditions (Egermann, 2005). We hypothesize that a natural agent that maintains MSCs viability, promotes osteogenic differentiation could achieve success in regeneration during healing and may also prevent bone resorption and improve regeneration. Among natural products, the seeds and oil from *N. sativa* have attracted the interest of medical scientists as an annual herbaceous plant with black seeds. *N. sativa* is commonly known as black seeds, black cumin, black caraway seed, and Habbatul barakat, belongs to Ranunculaceae family and grows in countries bordering the Mediterranean Sea, Pakistan and India (Ali and Blunden, 2003).

The beneficial effects attributed to *N. sativa* are related to their antioxidant, antidiabetic, antihistaminic, antiepileptic, antibacterial, antitumor properties (Ali and Blunden, 2003; Kaleem et al, 2006; Kanter et al., 2006; Mabrouk et al., 2002). Furthermore, numerous studies have shown that seeds and oil from this plant are characterized by a very low de-

gree of toxicity (Ali and Blunden, 2003). Thymoquinone (TQ) is the major biologically active compound of *N. sativa* which is the active ingredient for antitumor and antiinflammatory effects (Gali-Muhtasib et al., 2005). On the other hand, TQ was shown for anabolic effects on MC3T3-E1 cells for osteogenic differentiation (Wirries et al., 2013).

Based on the aforementioned reported scientific data and considering the fact that in some cases herbal extracts and/or their oil are showing more potency than the purified components (Seeram et al., 2004, 2005), the present study was undertaken to investigate the osteogenic inductive potential of *N. sativa* oil on dental pulp mesenchymal stem cells. The study suggests that the *N. sativa* oil could be used for alternative clinical nutrition or as a mouthwash after dental treatments.

Materials and Methods

Isolation and Culture of DP-MSCs

Human dental pulp tissue was obtained from patients (15-20 years of age, n=5) who were undergoing extraction of their third molars for orthodontic reasons at the Department of Oral and Maxillofacial Surgery, University of Gazi, Ankara. All patients provided informed consent (Ethics Commit. Rep. No: G.Ü. B30.2. GÜN 0.21.71.00). After the tooth surfaces were disinfected, the teeth were mechanically fractured, and the dental pulp was gently isolated with forceps. The pulp tissue was rinsed in α -MEM supplemented with 2 nM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin and 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen) (hereafter referred to as the MSC culture medium), after which it was minced into fragments of 1 to 2 mm³. The tissue fragments were cultured in T75 Nunc plates in the MSC culture medium at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The culture media was changed every 2 to 3 days, and the cell cultures were monitored regularly with an inverted microscope (Olympus CKX41, Tokyo, Japan). Upon reaching 70-80% confluence, the cells were harvested with 0.05% Trypsin/EDTA (Sigma, Taufkirchen Germany) and sub-cultured for further experiments.

Immunophenotypic Analysis

The culture-expanded adherent cells were analysed by flow cytometry (BD FACSAria, USA). The antibody panel included CD29- FITC (e-bioscience, USA); CD73-PE (BD, USA), CD 90-PE (BD, USA), CD44-PE (e-bioscience, USA) as mesenchymal stromal markers, as well as their isotype controls. CD45-FITC (BD, USA); CD14-PE (BD, USA); and CD34-FITC (BD USA) were used as haematopoietic markers to exclude cells of haematopoietic origin. The relative frequencies of the cells that expressed the respective surface markers were analysed using FACS Diva software 6.0.0 (BD) by acquiring 10,000 events for each sample.

Effect of N. sativa oil on DP-MSCs Osteogenic Differentiation

N. sativa oil was purchased from market in Ankara, Turkey. A concentration of 1% was prepared in osteogenic and adipogenic differentiation media (Pittenger et al., 1999). The images of differentiation were obtained at 21 day with a CKX41

digital imaging microscope (Olympus, Tokyo, Japan). The calcium ion concentration in the differentiation medium was measured using a QuantiChrom calcium assay kit according to the manufacturer's instructions (DICA 500, BioAssay Systems, Hayward, USA).

Results and Discussion

Identification of MSCs

The common MSC markers (CD29, CD73, CD44, and CD90) were constitutively positive (>95%) and the hematopoietic markers (CD14, CD34, and CD45) were negative (>95) in all samples tested, indicating a mesenchymal origin of the cells (Figure 1). Interestingly we found two subpopulations in the flow cytometer analysis suggesting that dental pulp has multiple stem cell niches. This result was found in compliance with Pisciotat et al (2015) showing the heterogeneity of the stem cell population residing within the human dental pulp, particularly its peculiar embryological origin, might explain the existence of two different subpopulations. Of course in further studies, subpopulations would be sorted and analyzed.

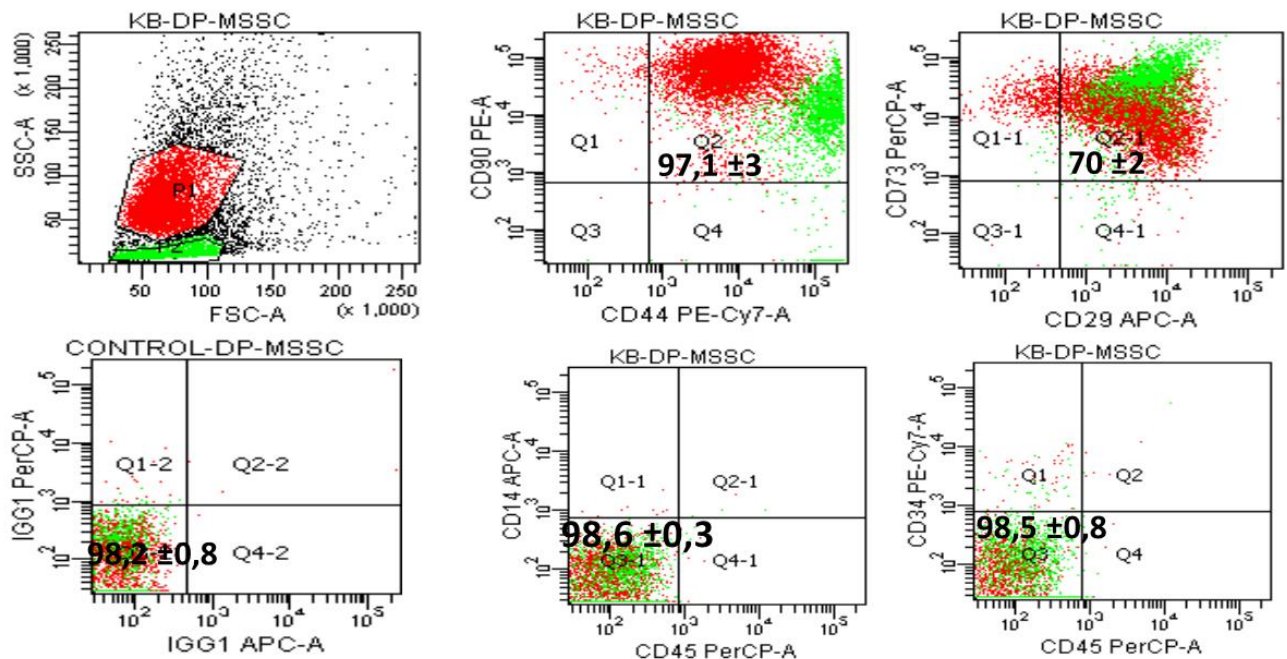


Figure 1. Surface markers of DP-MSCs. The cells were positive for CD90, CD44, CD29 and CD73 (the mesenchymal stem cell markers) and negative for CD14, CD45, and CD34 (the hematopoietic stem cell markers).

Differentiation Assays of MSCs

The characteristics features of the cells were studied. (Figure 2). Approximately 20% of the cells became rounder; however, no lipid droplets were observed in DP-MSCs for adipogenic differentiation. In contrast to adipogenic differentiation, the DP-MSCs underwent rapid osteogenic differentiation. Calcium granules similar to bone nodules were seen in *N. sativa* treated group. We also determined the calcium concentration (Figure 3).

The osteogenic differentiation potentials of DP-MSCs *in vitro* and *in vivo* have been well documented in a variety of studies (Gronthos et al., 2000; D'aquino et al., 2007). Adipogenic differentiation was not seen in DP-MSCs. Our findings were agree with those of Gronthos et al (2000) who expanded DP-MSCs from single-cell clones and demonstrated that they exhibited osteogenic differentiation and did not form lipid-laden adipocytes. *N. sativa* treated cells showed increased osteogenic differentiation. Calcium granules were

clear and compact which was a sign of well differentiation.

In dentistry, *N. sativa* showed a lowered caries score and plaque index (Shaker et al., 2014). Studies comparing the oil or TQ exhibited that *N. sativa* essential oil has more strong activity against *Streptococcus mitis*, *Staphylococcus mutans* than the pure TQ (Harzallah et al., 2011). The *N. sativa* oil was found effective in inhibiting the adherence of *S. mutans* to the tooth surface at 10% concentration (Abd-Awn et al., 2012) that we used for osteogenic differentiation assays. Also the oral administration of TQ helped in periodontal disease prevention as it diminishes alveolar bone resorption (Özdemir et al., 2012). This is the first study showing dental pulp mesenchymal stem cell osteogenic differentiation with *N. sativa*. Of course there should be further studies investigating the mechanism of increased differentiation. Nevertheless the obtained data suggest that *N. sativa* oil could be used as an alternative agent for dental bone regeneration studies.

DENTAL PULP MSCs

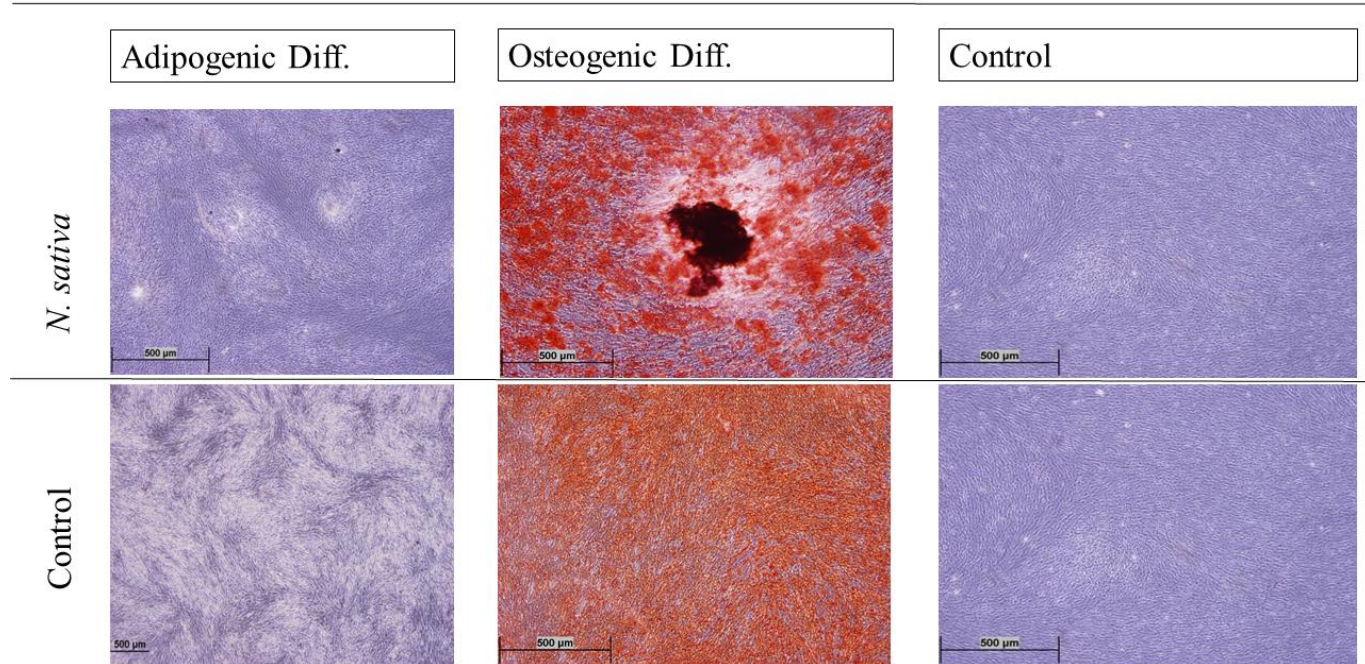


Figure 2. Differentiation potential of DP-MSCs is shown as Control Group. Adipogenic differentiation was not shown in DP-MSCs in both Control and *N. sativa* Group. Osteogenic differentiation was typically observed in Control Group with calcium granules and extracellular matrix. Calcium granules are seen as black nodules in *N. sativa* Group and the extracellular matrix was dyed red. (4x, Olympos CKX41, Tokyo, Japan).

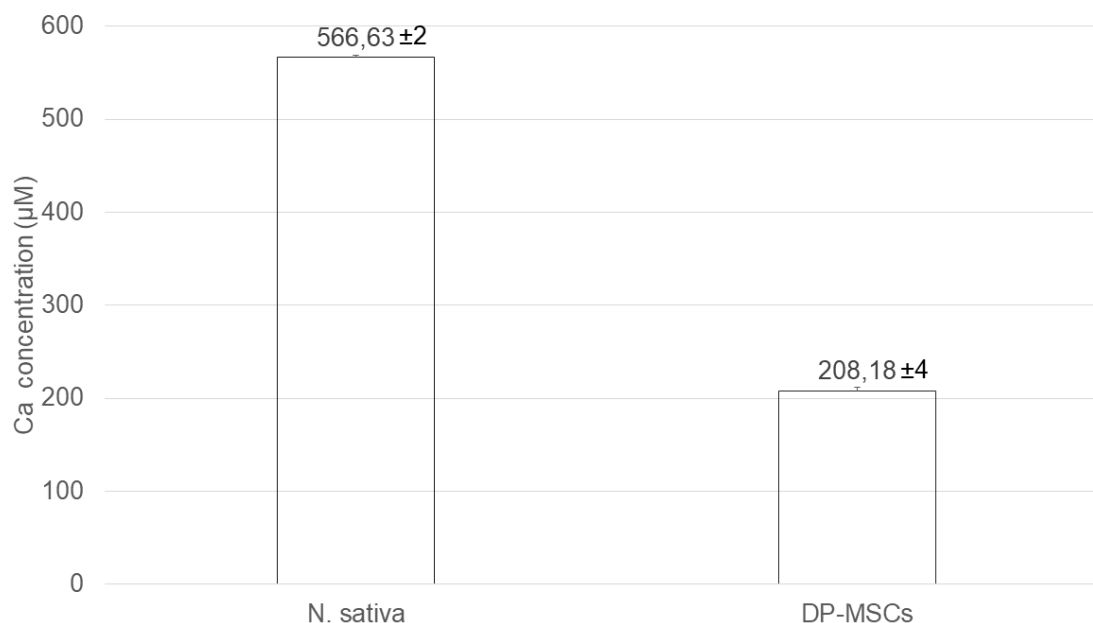


Figure 3. Calcium concentration of DP-MSCs was detected by Quantichrome calcium assay Kit. Calcium concentration was found increased in DP-MSCs treated with *N. sativa*.

Conclusion

There are number of people suffering from implant failure and/or reduced alveolar bone regeneration etc. There is consequently a growing need for therapies that provide a balance between bone resorption and bone formation and of course, increasing the strength of bone and having least side effects. Therefore, a closer look for plant based agents is needed. Here, *N. sativa* could be used safely after dental treatments as an adjunct therapy. Besides immunotherapy and antioxidant studies animal models with mesenchymal stem cells should be used to test the effects on periodontal regeneration especially.

Acknowledgement

This study was supported by the Turkish Scientific and Technological Research Council (TUBITAK), Project no: SBAG 113S448. I specially thank to Prof. Dr. Derviş Yılmaz for assistance and encouragement in dental research studies.

Conflict of Interests

Author declare that there is no conflict of interests.

References

- Abd-Awn, B., Al-Dhafer, Z. & Al-Dafaai, R. (2012). The effect of black seed oil extracts on mutans streptococci in comparison to chlorhexidine gluconate (in vitro). *Journal of Baghdad College of Dentistry*, 24, 126-131.
- Ali, B.H. & Blunden, G. (2003). Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother. Res.* 17, 299-305.
- Kirui, P.K., Cameron, J., Benghuzzi, H.A., Tucci, M., Patel, R., Adah, F. & Russell, G. (2004). Effects of sustained delivery of thymoquinone on bone healing of male rats. *Biomedical Science Instrumentation*, 40, 111-116.
- D'aquino, R., Graziano, A., Sampaolesi, M., Laino, G., Pirozzi, G., De Rosa, A. & Pappaccio, G. (2007). Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death & Differentiation*. 14, 1162–1171.
- Egermann, M., Goldhahn, J. & Schneider, E. (2005). Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos International*, 16(suppl2), 129-138.

- Gali-Muhtasib, H., Roessner, A. & Schneider-Stock, R. (2005). Thymoquinone: a promising anti-cancer drug from natural sources. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38, 1249-1253.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G. & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Science*, 97, 13625-13630.
- Harzallah, H., Kouidhi, B., Flamini, G., Bakhrouf, A. & Mahjoub, T. (2011). Chemical composition, antimicrobial potential against cariogenic bacteria and cytotoxic activity of Tunisian *Nigella sativa* essential oil and thymoquinone. *Food Chemistry*, 129, 1469-1474.
- Hoiruchi, K., Amizuka, N., Takeshita, S., Takamatsu, H., Katsuura, M., Ozawa, H., Toyama, Y., Bonewald, L.F. & Kudo, A. (1999). Identification and characterization of a novel protein, perostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *Journal of Bone & Mineral Research*, 14, 1239-1249.
- Kaleem, M., Kirmani, D., Asif, M., Ahmed, Q., Bano, B. (2006). Biochemical effects of *Nigella sativa* L. seeds in diabetic rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 44, 745-748.
- Kanter, M., Coşkun, O. & Uysal, H. (2006). The antioxidative and antihistaminic effect of *Nigella sativa* and its major constituent, thymoquinone on ethanol-induced gastric mucosal damage. *Archives of Toxicology*, 80, 217-224.
- Mabrouk, G.M., Moselhy, S.S., Zohny, S.F., Ali, E.M., Helal, T.E., Amin, A.A. & Khalifa, A.A. (2002). Inhibition of methylnitrosourea (MNU) induced oxidative stress and carcinogenesis by orally administered bee honey and *Nigella* grains in Sprague Dawley rats. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 21, 341-346.
- Pisciotta, A., Carnevale G., Meloni, S., Ricio, M., Biasi, S.D., Gibellini, L., Ferrari, A., Bruzzesi, G. & de Pol, A. (2015). Human dental pulp stem cells (hDPSCs): isolation, enrichment and comparative differentiation of two sub-populations. *BMC Developmental Biology*, 15, 14-16
- Wirries, A., Schubert, A.K., Zimmermann, R., Jabari, S., Ruchholtz, S. & El-Najjar, N. (2013). Thymoquinone accelerates osteoblast differentiation and activates bone morphogenetic protein-2 and ERK pathway. *International Immunopharmacology*, 15(2), 381-386.
- Ozdemir, H., Kara, M.I., Erciyas, K., Ozer, H. & Ay, S. (2012). Preventive effects of thymoquinone in a rat periodontitis model: a morphometric and histopathological study. *Journal of Periodontal Research*, 47, 74-80.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 1168-1170.
- Shaker, A. & Al-Wafi, H. (2014). Benefits of thymoquinone, a *Nigella sativa* extract in preventing dental caries initiation and improving gingival health. *ProQuest LLC*, 72.



ORIGINAL ARTICLE/ORİJİNAL ÇALIŞMA

FULL PAPER

TAM MAKALE

ÇİÇEK VE PAMUK BALLARINDAKİ UÇUCU BİLEŞİKLERİN ÇÖZGEN YARDIMI İLE AROMA EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ KULLANILARAK KARAKTERİZASYONU

Ahmet Salih Sönmezdağ 

Gaziantep Üniversitesi, Güzel Sanatlar Fakültesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü, Gaziantep, Türkiye

Received: 09.04.2017

Accepted: 13.08.2017

Published online: 07.11.2017

Corresponding author:

Ahmet Salih Sönmezdağ, Gaziantep Üniversitesi, Güzel Sanatlar Fakültesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü, Gaziantep, Türkiye

E-mail: sonmezdag@gantep.edu.tr

Öz:

Bu çalışmada, Gaziantep ilinde üretilen çiçek ve pamuk ballarının aroma maddeleri bileşimi, gaz kromatografisi-kütle spektrofotometresi (GC-MS) yardımı ile incelenmiştir. Ballardaki aroma maddeleri, Türkiye’de ilk defa çözgen yardımı ile aroma ekstraksiyon sistemi (SAFE) ve diklorometan çözgeni kullanılarak ekstrakte edilmiştir. SAFE ekstraksiyon yöntemi, aroma maddeleri analizi sırasında istenmeyen yan ürün oluşumunu engellediği için son yıllarda öne çıkan bir yöntemdir. Elde edilen sonuçlara göre, çiçek ve pamuk ballarında sırası ile 36 ve 33 aroma bileşiği belirlenmiş ve toplam miktarları 2043 µg/kg ve 1901 µg/kg olarak tespit edilmiştir. Ballarda miktar olarak öne çıkan kimyasal aroma grupları, asitler ve alkoller olurken bu grupları ketonlar, aldehytlar, terpenler ve laktonlar takip etmiştir. Ayrıca, çalışmada tespit edilen feniletal alkol ve sinamaldehyt bileşiklerinin pamuk balları için biyoişaretleyici aroma maddeleri oldukları da düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Çiçek balı, Pamuk balı, SAFE, Aroma bileşikleri

Abstract:

CHARACTERIZATION OF FLOWER AND COTTON HONEY VOLATILE COMPOUNDS USING SOLVENT ASSISTED FLAVOR EVAPORATION

In the present study, the composition of aroma compounds of flower and cotton honey from Gaziantep province investigated by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Aroma compounds of honey extracted using solvent-assisted flavor evaporation (SAFE) with dichloromethane for the first time in Turkey. The SAFE extraction method is a prominent method in recent years because it prevents the formation of unwanted by-products during the analysis of aroma compounds. As consequences of results, respectively 36 and 33 aromatic compounds identified and the total concentration of volatile compounds detected 2043 µg/kg and 1901 µg/kg in flower and cotton honey, respectively. Of all aroma compounds detected in the samples, acids, and alcohols were present at the highest level, followed by ketones, aldehydes, terpenes and lactones. Furthermore, phenylethyl alcohol and cinnamaldehyde identified in the study, considered to be main aroma markers of cotton honey.

Keywords: Flower honey, Cotton honey, SAFE, Aroma compound

FOOD and HEALTH

E-ISSN: 2602-2834

4(1), 25-36 (2018) doi: 10.3153/JFHS18004

© 2015-2018 ScientificWebJournals (SWJ)

Giriş

Bal kendine has aroması olan ve organoleptik öneme sahip besleyici bir üründür. Günümüzde bal tüketimine olan ilgi, sahip olduğu yüksek enerji içeriği ve yapısında bulunan biyoaktif bileşikler nedeni ile giderek artmaktadır. Bu artışta tüketicinin tercihini etkileyen en önemli özelliklerin başında ürünün tadı ve aroması gelmektedir. Balın tadı, yapısının %80'ini oluşturan şeker, ayrıca asit ve yakıcılık veren bileşikler sayesinde oluşmaktadır (Tananaki vd., 2009). Aroması ise, oldukça düşük bir konsantrasyondadır ve farklı kimyasal gruplara dahil olan birçok aroma maddesi tarafından oluşturulmaktadır. Balın genel yapısını oluşturan aroma maddeleri monoterpenler, C₁₃ norisoprenoidler, seskiterpenoidler, benzen türevleri, alkoller, esterler, yağ asitleri, ketonlar ve aldehitlerdir. Bu aroma maddeleri, elde edildiği nektar kaynağına, botanik orijinine, arının yaşına, bala uygulanan ısı işleme, toplama prosesine, depolama koşullarına, mikrobiyal ve çevresel faktörlere bağlı olarak önemli ölçüde değişmektedir (Zhou vd., 2002; Tananaki vd., 2009; Amtmann, 2010).

Önceki çalışmalarda, ballarda bulunan aroma maddeleri tayini, çözgen ekstraksiyonu (Darcy vd., 1997), simultane buharlı distilasyon/ekstraksiyon (Alissandrakis vd., 2005), katı faz ekstraksiyon (Castro-Vazquez vd. 2003), statik tepe boşluğu (Rowland vd. 1995), katı faz dinamik ekstraksiyon (Ampuero vd., 2004), katı faz mikroekstraksiyon (Alissandrakis vd., 2007; Senyuva vd., 2009) ve mikro-skala simultane distilasyon/ekstraksiyon (Castro-Vazquez vd., 2007) teknikleri ile gaz kromatografisi cihazı kullanılarak yapılmıştır.

SAFE yöntemi (çözgen yardımı ile aroma ekstraksiyon sistemi) son yıllarda aroma ekstraksiyonunda kullanılan en gelişmiş yöntemlerden biridir. Bu sistemde, aroma maddeleri örnekte yüksek vakum (10⁻³ Pa) altında ve düşük sıcaklıkta (sıvı nitrojen altında) ekstrakte edilmektedir (Engel vd., 1999). Bu sayede aroma maddelerin ekstraksiyonu sırasında veya ürünün ısıtılmasıyla oluşan aromatik değişimlerin önüne geçilebilmektedir. Ruisinger ve Schieberle (2012) çalışmalarda SAFE metodunun ballarda da oldukça etkili bir ekstraksiyon metodu olduğunu bildirmiştir.

Bu çalışmada, 2015 yılı çiçek ve pamuk ballarında bulunan aroma maddeleri SAFE sistemi ile ekstrakte edilip, gaz kromatografisi (GC) ve kütle spektrofotometresi (MS) yardımı ile belirlenmiştir.

Materyal ve Metot

Materyal

Çalışmada, 2015 yılında Gaziantep ilinden elde edilen multifloral çiçek ve pamuk balları kullanılmıştır. Örnekler yerel üretim yapan firmadan temin edilmiş ve örneklerin botanik orijini firma tarafından yapılan polen analizi ile tespit edilmiştir. Yapılan analizlerde, pamuk balında *Gossypium hirsutum* L. polen oranının %60'dan az olmadığı, multifloral balın ise Gaziantep bölgesinde yetişen bitkilerin polenlerinden elde edildiği tespit edilmiştir. Bal örnekleri tek dönemde (Eylül ayı), her bir çeşitten üç örnek (2 kg) olmak üzere hasat edilmiş ve bütün örnekler süzme işlemi uygulandıktan sonra ısı işlem uygulanmadan aroma maddeleri analizine kadar 4°C' de depolanmıştır.

Kimyasallar

Analizlerde Millipore Q (Millipore Corp., Saint-Quentin, Fransa) saf su cihazı ile elde edilen deiyonize su kullanılmıştır. Aroma analizinde kullanılan standart maddeler Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA) firmasından temin edilmiştir.

Aroma Maddelerinin Ekstraksiyonu ve Analizi

SAFE ekstraksiyon yöntemi, aroma maddeleri analizi sırasında istenmeyen yan ürün oluşumunu engellediği için son yıllarda tercih edilen bir yöntemdir (Engel vd., 1999). SAFE sistemi, sıvı nitrojen yardımı ile soğutulan iki bölümden (atık ve ürün) (Şekil 1 no 1, 2) oluşmaktadır ve sisteme aroma maddeleri ekstraksiyonu sırasında yüksek vakum (10⁻³ Pa) uygulaması yapılmaktadır (no 3). Aroma maddelerinin ekstraksiyonunda 40 g bal örneği kullanılmış ve ekstraksiyon işlemi üç kez tekrarlanmıştır. Örneğe iç standart olarak 5 µl 4-nonanol ve 80 ml diklorometan çözgeni ilave edilmiştir. Oluşturulan karışım 500 ml'lik erlene koyulmuş ve 4°C'de 30 dakika azot gazı altında karıştırılmıştır. Aroma maddeleri ekstraksiyonu sırasında Şekil 1'deki düzeneğin sol üst bölümündeki cam hazneye bal örnekleri ve çözgen karışımı ilave edilmiştir (no:4). Sonra, SAFE aparatının sağ altında bulunan hazneye yüksek vakum altında aroma maddelerini içeren çözgen çok yavaş bir şekilde alınmıştır (no 2). Bu hazne çözgenin hemen yoğunlaşması için sıvı azot ile soğutulmuş (no: 5) ve bu şekilde aroma maddesi kayıpları engellenmiştir. Ayırma işlemi tamamlandıktan sonra ürünün bulunduğu tüp oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek donmuş ekstrakt çözündürülmüştür. Daha sonra ekstrakt, Vigreux konsantrator ile

45°C' de 0,5 ml kalıncaya kadar konsantre edilmiştir. Konsantre edilen ekstrakt doğrudan GC-FID ve GC-MS sistemlerine enjekte edilmiş ve aroma maddeleri belirlenmiştir.

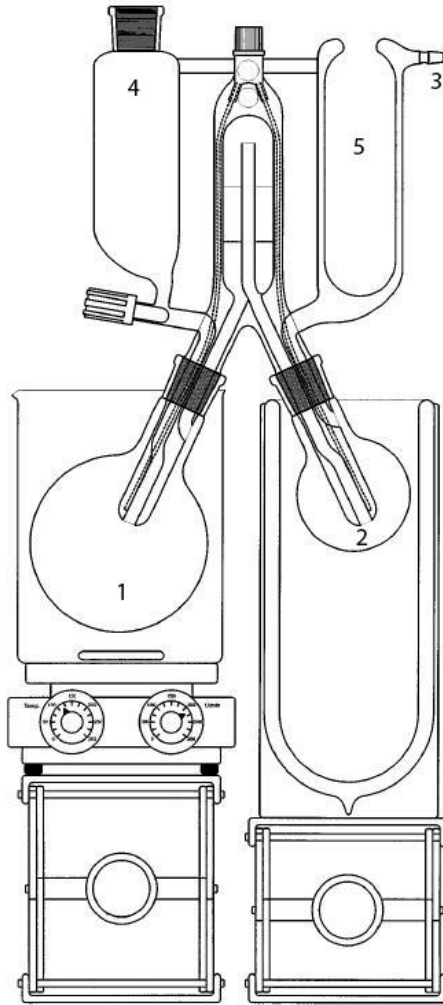
GC-MS Koşulları

Aroma maddelerinin miktarı ve tanımlanmasında "Agilent 6890N" marka GC ve buna bağlı "Agilent 5975B" MS kullanılmıştır. Aroma maddelerinin ayrımı DB-Wax kolon (30 m x 0.25mm i.d.x 0.5 µm, J&W Scientific-Folsom, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 40°C'de 10 dakika bekletildikten sonra her bir dakikada 4 °C artırılarak 220 °C'ye ayarlanmıştır. Taşıyıcı gaz olarak Helyum kullanılmıştır. Helyumun akış

hızı 3 ml/dakikadır. Piklerin tanısı, standardı bulunan bileşikler için standart madde enjekte edilerek, standardı olmayan bileşikler için kütle spektrumunun bilgisayar hafızasındaki kütle spektrumlarıyla (Wiley 7.0, Nist ve Flavor 2L) karşılaştırılarak yapılmıştır. Piklerin tanısından sonra aroma maddelerinin konsantrasyonları iç standart (konsantrasyon: 43,27 mg L⁻¹) yöntemiyle hesaplanmıştır.

Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

Çalışma sonucunda elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilirken SPSS (versiyon 22.0) programı kullanılmıştır.



Şekil 1. Çözgen yardımı ile aroma ekstraksiyon düzeneği (SAFE)

Bulgular ve Tartışma


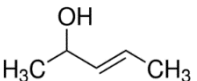
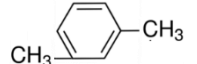

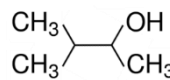
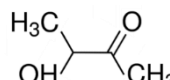
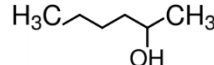

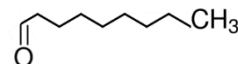
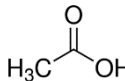
Bal örneklerinde bulunan aroma maddeleri ve bu maddelerin alıkonma indisleri Tablo 1’de verilmiştir. Aroma maddelerinin tanımlanmasında, alıkonma indis değerleri, kütle spektrometresi kütüphanesi ve aroma maddelerinin standart bileşikleri kullanılmıştır. Tablo 1’ de görüldüğü üzere çiçek balı örneğinde 36, pamuk balı örneğinde 33 aroma maddesi belirlenmiştir. Aroma maddelerinin toplam miktarı ise çiçek balı ve pamuk balında sırası ile 2043 µg/kg ve 1901 µg/kg olarak tespit edilmiştir.

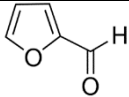
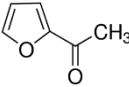
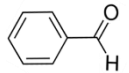
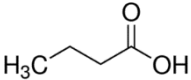
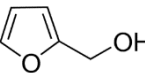
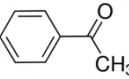
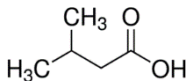

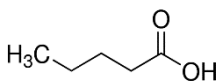
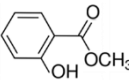
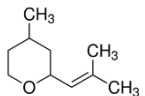
Çalışmada, bal örneklerinde tespit edilen aroma maddelerinin büyük kısmını aromatik alkol bileşiklerinin oluşturduğu belirlenmiştir. Aromatik alkol bileşikleri balın güçlü aromatik işaretleyicilerindendir (Alissandrakis vd., 2005). Bu çalışmada, çiçek balı örneğinde 11 adet alkol bileşiği tespit edilmiş ve miktarı 573 µg/kg olarak belirlenirken, pamuk balında 9 adet alkol bileşiği tespit edilmiş olup, toplam miktarı 1106 µg/kg’dır. Örneklerde bulunan aromatik alkol bileşiklerinin toplam miktarları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Bal örneklerinde öne çıkan alkol bileşiği feniletıl alkoldür. Bu bileşik çiçek balında 171 µg/kg, pamuk balı örneğinde ise 744 µg/kg olarak tespit edilmiştir ve toplam aroma maddelerinin sırasıyla %8-39’luk kısmını oluşturmaktadır. Önceki çalışmalarda feniletıl alkol bileşiği, çam, nektar, biberiye ve kekik gibi kaynaklardan elde edilen birçok bal türünde tespit edilmiş olup miktarı toplam aroma maddelerinin %1.84-10’u kadar olduğu tespit edilmiştir (Alissandrakis vd., 2007; Castro-Vazquez vd., 2007; Pontes vd., 2007; Karabagias vd., 2014). Özellikle pamuk balında bu bileşiğin yüzde oranının literatürle kıyaslandığında yüksek olduğu gözlemlenmektedir. Vazquez vd. (2007) bu bileşiğin ballara çiçeksi, gülsü kokular kazandırdığını bildirmişlerdir. Bu aromatik bileşik gıda, parfüm ve kozmetik sanayinde sahip olduğu gülsü kokular nedeniyle oldukça talep görmektedir. Ayrıca, Yunanistan’da üretilen pamuk ballarının aroma maddelerinin incelendiği çalışmada ise feniletıl alkol bileşiğinin, majör bileşikler arasında yer aldığı belirlenmiştir (Alissandrakis vd., 2005). Çalışmamızda feniletıl alkol bileşiği pamuk balı için önemli bir işaretleyici aroma maddesi olduğu düşünülmektedir. 2-Hekzanol ve benzen metanol bal örneklerinde öne çıkan diğer aromatik alkol bileşikleridir. Önceki çalışmalarda, bu iki bileşiğin farklı bal çeşitlerinde de tespit edildiği gözlemlenmiştir (Soria vd.,

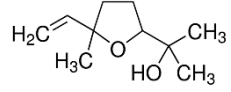
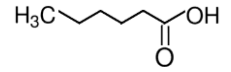
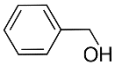
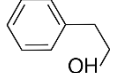
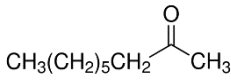
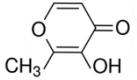
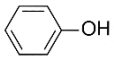
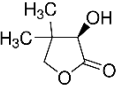
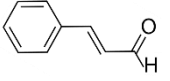
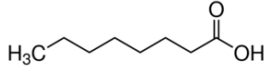
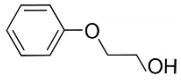
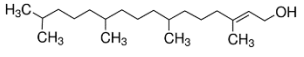
2009; Moreira 2010; Karabagias vd., 2014). Moreira ve ark. (2010) benzen metanol bileşiğinin ballara yeşil, çimen kokusu kazandırdığını tespit etmişlerdir.

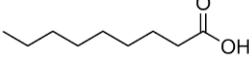
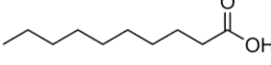
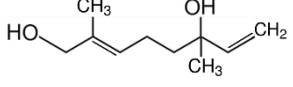
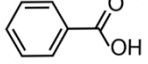
Bal örneklerinde öne çıkan diğer grup aromatik asit bileşikleridir. Bu bileşiklerinin toplam miktarı çiçek balı örneğinde 638 µg/kg iken, pamuk balında 245 µg/kg olarak tespit edilmiştir. Aromatik asit bileşiklerinin toplam miktarları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Önceki çalışmalarda, asit bileşiklerinin balların aroma karakterizasyonunu önemli bir şekilde etkilediği tespit edilmiştir (Plutowska vd., 2011). Asit bileşikleri içerisinde, benzoik asit (228 µg/kg) bileşiği, çiçek balında en yüksek konsantrasyona sahip aromatik asit bileşiği olarak tespit edilirken, pamuk balında nonanoik asit (68.1 µg/kg) bileşiği öne çıkmıştır. Bu bileşikler toplam aroma maddelerinin sırası ile %13-3’ünü oluşturmaktadır. Moreira ve ark. (2002), kaju ve kroton bitkisinden elde edilen ballar üzerine yaptıkları çalışmada, aroma ekstrakt dilüsyon analizi yöntemini kullanmış ve her iki bal çeşidinde de benzoik asit bileşiğini tespit etmiştir. Ayrıca çalışmada, benzoik asit bileşiğinin ballara hoş, tatlı koku kazandırdığı belirlenmiştir. Aynı araştırmacılar, yapmış olduğu başka bir çalışmada ise benzoik asit bileşiğinin genel bal aromasına pozitif katkı sağladığını bildirmişlerdir (Moreira vd., 2010). Bu bileşik çam, biberiye, lavanta, peygamberçiçeği, kaju, kroton ve kekik bitkilerinden elde edilen bal örneklerinde de tespit edilmiş olup, miktarı toplam aroma maddelerinin %0.3-1.53’ü kadardır. (Castro-Vazquez vd., 2003; Alissandrakis vd., 2007; Jerkovic ve Marjanovic, 2010; Plutowska vd., 2011, Silici, 2011). Nonanoik asit bileşiği, örneklerimizde tespit edilen önemli aromatik asit bileşiklerindedir. Bu bileşik, *Erica arborea* bal çeşidinin kimyasal işaretleyicilerinden bir tanesi olarak tespit edilmiştir. (Jerkovic vd., 2009). İzovalerik asit ve hegzadekanoik asit bileşikleri bal örneklerinde bulunan diğer aromatik asitlerdir. İzovalerik asit balların genel aromasına negatif etkide bulunan bir bileşiktir (Moreira vd., 2010). Bu bileşik, ballarda ayak kokusu veren kötü koku bileşiklerinin arasında yer almaktadır. Önceki çalışmalarda, hegzadekanoik asit bileşiği *Hedysarum coronarium* L. bitkisinden elde edilen balların aromatik yapısını oluşturan önemli alifatik bileşiklerinden bir tanesi olarak tanımlanmıştır (Jerkovic vd., 2010).

Tablo 1. Çiçek ve pamuk balları aroma maddeleri bileşimi

No	LRI	Kimyasal Formül	Molekül Formülü	CAS Numarası	Aroma Maddeleri	Konsantrasyon (µg/kg)		F	Tanımlama
						Çiçek	Pamuk		
1	1137	C ₈ H ₁₀		106-42-3	<i>p</i> -Ksilen	11.9±0.22	-		LRI, MS, Std
2	1182	C ₅ H ₁₀ O		3899-34-1	3-Penten-2-ol	79.4±2.78	73.9±0.6	ö.d.	LRI, MS, Std
3	1206	C ₈ H ₁₀		108-38-3	<i>m</i> -Ksilen	12.0±0.45	5.79±0.12	*	LRI, MS, Std
4	1243	C ₈ H ₁₈ O		111-87-5	1-Oktanöl	9.71±0.03	35.8±1.18	*	LRI, MS, Std
5	1261	C ₅ H ₁₂ O		6032-29-7	3-Metil-2-bütenöl	27.7±0.39	-		LRI, MS, Tent
6	1272	C ₄ H ₈ O ₂		513-86-0	Asetoin	85.6±3.85	68.2±2.56	*	LRI, MS, Std
7	1300	C ₆ H ₁₄ O		626-93-7	2-Hekzanöl	77.9±3.75	66.8±2.4	ö.d.	LRI, MS, Std
8	1372	C ₆ H ₁₄ O ₂		111-76-2	2-Bütoksietanol	2.28±0.00	11.7±0.51	*	LRI, MS, Std
9	1398	C ₉ H ₁₈ O		124-19-6	Nonanal	6.54±0.11	11.9±0.55	*	LRI, MS, Std
10	1414	C ₂ H ₄ O ₂		64-19-7	Asetik asit	15.9±0.79	10.0±0.25	*	LRI, MS, Std

11	1420	C ₅ H ₄ O ₂		98-01-1	Furfural	72.7±3.21	73.1±3.55	ö.d.	LRI, MS, Std
12	1468	C ₆ H ₆ O ₂		1192-62-7	2-Asetil furan	77.9±3.28	9.75±0.15	*	LRI, MS, Tent
13	1493	C ₇ H ₆ O		100-52-7	Benzaldehit	30.4±0.21	20.1±0.77	*	LRI, MS, Std
14	1501	C ₄ H ₈ O ₂		107-92-6	Bütirik asit	21.3±0.82	12.9±0.63	*	LRI, MS, Std
15	1515	C ₅ H ₆ O ₂		98-00-0	Furfuril alkol	73.4±1.76	36.4±1.29	*	LRI, MS, Std
16	1521	C ₈ H ₈ O		98-86-2	Asetofenon	19.8±0.88	-		LRI, MS, Tent
17	1563	C ₅ H ₁₀ O ₂		503-74-2	İzovalerik asit	76.4±2.98	62.7±2.82	ö.d.	LRI, MS, Std
18	1598	C ₉ H ₂₀ O		28473-21-4	1-Nonanol	12.3±0.08	11.2±0.33	ö.d.	LRI, MS, Std
19	1615	C ₅ H ₁₀ O ₂		109-52-4	Pentanoik asit	17.6±0.39	6.81±0.12	*	LRI, MS, Std
20	1659	C ₈ H ₈ O ₃		119-36-8	Metil salisiklat	7.20±0.03	4.19±0.07	*	LRI, MS, Std
21	1712	C ₁₀ H ₁₈ O		16409-43-1	Rozoksit	250±8.14	2.81±0.01	*	LRI, MS, Tent

22	1748	C ₁₀ H ₁₈ O ₂		60047-17-8	Linalol oksit	38.1±1.03	4.21±0.02	*	LRI, MS, Std
23	1863	C ₆ H ₁₂ O ₂		142-62-1	Hekzanoik asit	48.1±2.06	32.1±1.08	*	LRI, MS, Tent
24	1877	C ₇ H ₈ O		100-51-6	Benzen metanol	72.3±2.86	115±5.1	*	LRI, MS, Tent
25	1899	C ₈ H ₁₀ O		60-12-8	Feniletıl alkol	171±5.22	744±11.00	*	LRI, MS, Std
26	1943	C ₉ H ₁₈ O		821-55-6	2-Nonanon	22.5±0.85	-		LRI, MS, Std
27	1985	C ₆ H ₆ O ₃		118-71-8	Maltol	17.5±0.52	25.6±1.21	ö.d.	LRI, MS, Std
28	2002	C ₆ H ₅ OH		18-95-2	Fenol	16.9±0.54	17.4±0.63	ö.d.	LRI, MS, Std
29	2028	C ₆ H ₁₀ O ₃		599-04-02	Pentolakton	66.1±3.24	73.3±2.21	ö.d.	LRI, MS, Std
30	2039	C ₉ H ₈ O		104-55-2	Sinnamaldehit	-	219.8±1.14		LRI, MS, Tent
31	2050	C ₈ H ₁₆ O ₂		124-07-2	Oktanoik asit	60.8±2.34	21.6±0.41	*	LRI, MS, Std
32	2089	C ₈ H ₁₀ O ₂		122-99-6	2-Fenoksi ethanol	19.5±0.92	-		LRI, MS, Tent
33	2148	C ₂₀ H ₄₀ O		7541-49-3	Piytol	28.0±1.33	11.5±0.34	*	LRI, MS, Std

34	2202	C ₉ H ₁₈ O ₂		112-05-0	Nonanoik asit	88.5±3.74	68.1±3.19	*	LRI, MS, Std
35	2293	C ₁₀ H ₂₀ O ₂		334-48-05	Dekanoik asit	81.4±3.78	6.27±0.05	*	LRI, MS, Std
36	2351	C ₁₀ H ₁₈ O ₂		64142-78-5	8-Hidroksi linalol	96.7±4.77	12.8±0.13	*	LRI, MS, Tent
37	2444	C ₇ H ₆ O ₂		65-85-0	Benzoik asit	228±6.36	25.3±0.67	*	LRI, MS, Std
Genel Toplam						2043	1901	ö.d.	

LRI : Linear alıkonma indeksi DB-WAX kapılar kolon üzerinde hesaplanmıştır; Konsantrasyon: µg/kg olarak 3 farklı enjeksiyon sonuçları ortalamasıdır; Tanımlama: LRI (Linear alıkonma indeksi), MS (Kütle spektrometresi kütüphanesi), Std (Standart kimyasal madde), MS tent.(MS ile tentatif tanımlama); Aroma maddelerinin standart sapma değerleri % 5'in altındadır.

Çiçek balında 4 adet keton bileşiği belirlenmiş olup toplam miktarı 378 µg/kg, pamuk balında ise 2 adet keton bileşiği belirlenmiş olup toplam miktarı 71 µg/kg olarak tespit edilmiştir. Keton bileşiklerinin ballarda düşük konsantrasyonlarda olduğu ve bu bileşiklerin miktarının depolama sureğine bağlı olarak azaldığı bildirilmiştir (Morrison ve Boyd, 1992). Asetoin bileşiği iki bal çeşidinde de ortak olarak tespit edilmiştir. Bu bileşik, Polonya, Danimarka, Almanya, İtalya, Fransa, Hollanda, İspanya, Portekiz ve İngiltere’de yetiştiriciliği yapılan ballar üzerine yapılan araştırmalarda da belirlenmiştir (Radovic vd., 2001; Plutowska vd., 2011). Çiçek ballarında tespit edilen diğer keton bileşikleri ise asetofenon, rozoksit ve 2-nonanol bileşikleridir. Alissandrakis vd. (2007) Yunanistan’ının farklı bölgelerinde yetiştiriciliği yapılan kekik ballarında asetofenon bileşiğinin bölgesel bir biyoişaretleyici olduğu belirlemişlerdir.

Benzaldehit, furfural ve nonanal bileşikleri çiçek ve pamuk ballarında ortak olarak belirlenen aldehit bileşikleri iken, sinmaldehit bileşiği sadece pamuk balında belirlenmiştir. Bu bileşikler sahip oldukları düşük koku eşik değerlerinden dolayı, düşük konsantrasyonlarda bile aromaya katkıları önemli düzeydedir. Benzaldehit ballarda bulunan ana aroma maddelerinden bir tanesidir ve ballara karakteristik “bal” aroması kazandırmaktadır (Kus vd., 2013; Karabagias vd., 2014). Bu bileşik narenciye, kambara, okaliptüs, devedikeni gibi birçok bal çeşidinde belirlenmiştir (Moreira vd., 2005; Castro-Vazquez vd., 2006; Castro-Vazquez vd., 2007; Bianchi vd., 2011). Benzaldehit, genellikle linalol bileşiğinin parçalanması ile oluşmaktadır (Castro-Vazquez vd., 2007). Sinmaldehit bileşiğinin konsantrasyonu pamuk balında 218 µg/kg olarak tespit edilmiştir. Alissandrakis vd. (2005) sinmaldehit bileşiğinin pamuk balını karakterize eden ana aroma maddelerinden olduğunu bildirmişlerdir ve bu bileşiğin miktarını 20-216 µg/kg olarak tespit etmişlerdir. Benzer şekilde yaptığımız çalışmada da bu bileşik, pamuk ballarını karakterize eden en önemli bileşiklerden bir tanesi olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda belirlenen benzen bileşiklerinden *m*-ksilen her iki bal çeşidinde de belirlenirken, *p*-ksilen bileşiği sadece çiçek balı çeşidinde belirlenmiştir. Benzen bileşiklerinin toplam miktarı çiçek balı örneklerinde daha yüksek bulunmuştur. Bu bileşikler, bal aroması üzerine yapılan önceki çalışmada da tanımlanmıştır (Tananaki vd., 2007; Pino, 2012). Wardencki vd. (2009) GC-MS olfak-

tometri yöntemi ile farklı bal çeşitlerinin kalite değerlendirmelerini yapmışlardır. Araştırmacılar, ksilen grubu bileşiklerin ballarda düşük kaliteye yol açan bileşiklerden olduğunu belirlemişlerdir.

Linalol oksit ve 8-hidroksi linalol bal örneklerinde belirlenen terpen bileşikleridir. Terpen bileşiklerinin toplam miktarı çiçek balında (135 µg/kg), pamuk balına (17.0 µg/kg) göre daha yüksek bulunmuştur. Bitkilerin terpen bileşiklerini üretme sebeplerinin; tozlaşmayı ve zararlı hayvanlardan korunmayı sağlamak olduğu öne sürülmektedir. Bu bileşikler, bitki polenlerinden gelen ve bitkiyi andıran hoş çiçek aromasına sahiptir ve özellikle çiçek ballarında bulunmaktadır (Castro-Vazquez vd., 2003). Terpen bileşiklerinden 8-hidroksi linalol bileşiği, sahip olduğu yüksek konsantrasyonlarla öne çıkan linalol türevi olmuştur. Bu bileşiğin, katı faz mikro ekstraksiyon yöntemi uygulanarak belirlenen Yunan narenciye ballarındaki karakteristik aroma maddelerinden biri olduğu belirlenmiştir (Plutowska vd., 2011). Ayrıca bu bileşik, ballarda yapılan diğer çalışmalarda da farklı araştırmacılar tarafından da tespit edilmiştir (Alissandrakis vd., 2007; Bianchi vd., 2011).

Bal örneklerinde furan bileşiği olarak sadece 2-asetil furan belirlenmiştir. Bu bileşiğin miktarı çiçek balında (77.9 µg/kg), pamuk balına (9.75 µg/kg) göre daha yüksek bulunmuştur. Literatür incelendiğinde, bu bileşiğinin ballara “bademsi” bir koku kazandırdığı bildirilmiştir (Pino, 2012). Bu bileşik yine ballar üzerine yapılan çeşitli çalışmalarda da tespit edilmiştir (Jerkovic ve Marijanovic, 2010; Speziale vd., 2010; Verzera vd., 2014). Piran bileşikleri balda, ısıtma işlem uygulanması veya depolama sırasında oluşan bileşiklerdir. Bu bileşikler, Maillard reaksiyonu veya Strecker bozulması sırasında oluşan yan ürünlerden bir tanesidir (Escriche vd., 2009). Bal örneklerinde piran bileşiği miktarı pamuk balında (25.6 µg/kg), çiçek balına (17.5 µg/kg) göre daha yüksek bulunmuştur. Örneklerde, maltol tespit edilen tek piran bileşiğidir. Önceki çalışmalarda maltol bileşiğinin, karabuğday balında yanık-şeker benzeri aromadan sorumlu olduğu bildirilmiştir. (Zhou vd., 2002). Fenol bal örneklerinde belirlenen tek uçucu fenol bileşiğidir. Bu bileşiğin toplam miktarı 17.4 µg/kg ile çiçek balında, 16.9 µg/kg olarak tespit edilen pamuk balından daha yüksektir. Çalışmamızda tespit edilen uçucu fenol bileşiği farklı ballarda da tanımlanmıştır (Moreira vd., 2002; Odeh vd., 2007). Ester bileşiği olarak bal örneklerinde rozoksit belirlenmiştir. Bu bileşiğin toplam miktarı çiçek balında 7.20 µg/kg olarak belirlenirken,

pamuk balında 4.18 µg/kg bulunmuştur. Bu bileşik, sıcak yüzey katı faz mikro ekstraksiyon yönteminin ballardaki uygulamalarını incelemek için yapılan çalışmada da tespit edilmiştir (Plutowska vd., 2011). Pantolakton bileşiği bal örneklerinde tespit edilen tek lakton bileşiğidir. Bu bileşik çiçek ve pamuk ballarında sırası ile 66.1 µg/kg ve 73.3 µg/kg bulunmuştur. Castro-Vazquez vd. (2014), lakton bileşiklerinin lavanta ballarında işaretleyici aroma maddeleri olduğunu belirlemiştir. Ayrıca başka bir çalışmada ise, pantolakton bileşiğinin Maillard reaksiyonu yan ürünlerinden biri olabileceği vurgulanmıştır (Castro-Vazquez vd., 2006).

Sonuç

Bu çalışma, Gaziantep ilinden elde edilen çiçek ve pamuk ballarının aroma maddeleri bileşimlerini belirlemek amacıyla ele alınmıştır. Elde edilen bulgular sonucunda çiçek balında 36, pamuk balında ise 33 adet aroma bileşiği belirlenmiştir. Çiçek ve pamuk ballarında bulunan aroma maddeleri miktarı sırası ile 2043 µg/kg ve 1901 µg/kg olarak tespit edilmiştir. Ballarda miktar olarak en fazla bulunan aroma maddeleri asitler ve alkoller olurken bu bileşikler ketonlar, aldehitler, benzenler ve esterler takip etmiştir. Ayrıca, çalışmada tespit edilen feniletal alkol ve sinamaldehit bileşiklerinin pamuk balları için biyoişaretleyici aroma maddeleri oldukları düşünülmektedir.

Kaynaklar

Alissandrakis, E., Kibaris, A.C., Tarantilis, P.A., Harizanis, P.C. & Polissiou M. (2005). Flavour compounds of Greek cotton honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1444-1452.

Alissandrakis, E., Tarantilis, P.A., Harizanis, P.C. & Polissiou, M. (2005). Evaluation of four isolation techniques for honey aroma compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 91-97.

Alissandrakis, E., Tarantilis, P.A., Harizanis, P.C. & Polissiou M. (2007). Aroma investigation of unifloral Greek citrus honey using solid phase microextraction coupled to gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Food Chemistry*, 100, 396-404.

Ampuero, S., Bogdanov, S. & Bosset. J.O. (2004). Classification of unifloral honeys with an MS-based electronic nose using different sampling modes: SHS, SPME and INDEX. *European Food Research and Technology*, 218, 198-207.

Amtmann, M. (2010). The chemical relationship between the scent features of goldenrod (*Solidago canadensis* L.) flower and its unifloral honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 122-129.

Bianchi, F., Mangia, A., Mattarozzi, M. & Musci, M. (2011). Characterization of the volatile profile of thistle honey using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 129, 1030-1036.

Castro-Vazquez, L., Diaz-Maroto, M.C. & Perez-Coello, M.S. (2006). Volatile composition and contribution to the aroma of Spanish honeydew honeys. Identification of a new chemical marker. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4809-4813.

Castro-Vazquez, L., Diaz-Maroto., M.C. & Perez-Coello, M.S. (2007). Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys. *Food Chemistry*, 103, 601-606.

Castro-Vazquez, L., Leon-Ruiz, V., Alanon, M.E., Pérez-Coello, M.S. & Gonzalez-Porto, A.V. (2014). Floral origin markers for authenticating lavandin honey (*Lavandula angustifolia x latifolia*). Discrimination from lavender honey (*Lavandula latifolia*). *Food Control*, 37, 362-370.

Castro-Vazquez, L., Pirez-Coello, M.S. & Cabezudo, M.D. (2003). Analysis of volatile compounds of rosemary honey comparison of different extraction techniques. *Chromatographia*, 57, 227-233.

Darcy, B.R., Rintoul, G.B., Rowland, C.Y. & Blackman, A.J. (1997). Composition of Australian honey extractives. 1. Norisoprenoids, monoterpenes, and other natural volatiles from blue gum (*Eucalyptus leucoxylon*) and yellow box (*Eucalyptus melliodora*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1834-1843.

Escriche, I., Visquert, M., Juan-Borras, M. & Fito, P. (2009). Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. *Food Chemistry*, 112, 329-338.

Engel, W., Bahr, W. & Schieberle, P. (1999). Solvent assisted flavour evaporation a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex

- food matrices. *European Food Research and Technology*, 209, 237-41.
- Jerkovic, I. & Marijanovic Z. (2010). Volatile composition screening of *Salix* spp. nectar honey: benzenecarboxylic acids, norisoprenoids, terpenes, and others. *Chemistry & Biodiversity*, 7, 2309-2325.
- Jerkovic, I., Tuberoso, C.I.G., Marijanovic, Z., Jelic, M. & Kasum, A. (2009). Headspace, volatile and semi-volatile patterns of *Paliurus spina-christi* unifloral honey as markers of botanical origin. *Food Chemistry*, 112, 239-245.
- Karabagias, I.K, Badeka, A., Kontakos, S. & Karabournioti, S. (2014). Characterization and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters, and chemometrics. *Food Chemistry*, 146 548-557.
- Kus, M.K., Jerkovic, I., Tuberoso, C.I.G. & Sario M. (2013). The volatile profiles of a rare apple (*Malus domestica* BORKH.) honey: shikimic acid-pathway derivatives, terpenes, and others. *Chemistry & Biodiversity*, 10, 1638-1652.
- Moreira, R.F.A. & DeMaria, C.A.B. (2005). Investigation of the aroma compounds from headspace and aqueous solution from the cambara (*Gochnatia Velutina*) honey. *Flavour and Fragrance Journal*, 20, 13-17.
- Moreira, R.F.A., DeMaria, C.A.B., Pietroluongo, R.F.A. & Trugo, L.C. (2010). Chemical changes in the volatile fractions of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. *Food Chemistry*, 121, 697-704.
- Moreira, R.F.A., Trugo, L.C., Pietroluongo, M. & DeMaria, C.A.B. (2002). Flavor composition of cashew (*Anacardium occidentale*) and marmeleiro (*Croton* Species) honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7616-7621.
- Morrison, R.T. & Boyd RN. (1992). Organic chemistry (1st ed.). Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall International, Inc. (p. 657).
- Odeh, I., Abu-Lafi, S., Dewik, H., Al-Najjar, I., Imam, A., Dembitsky, V.M. & Hanus LO. (2007). A variety of volatile compounds as markers in Palestinian honey from *Thymus capitatus*, *Thymelaea hirsuta*, and *Tolpis virgata*. *Food Chemistry*, 101, 1393-1397.
- Pino, J.A. (2012) Analysis of odour-active compounds of black mangrove (*Avicennia germinans* L.) honey by solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry. *International Journal of Food Science & Technology*, 47, 1688-1694.
- Plutowska, B., Chmiel, T., Dymerski, T. & Wardencki W. (2011). A headspace solid-phase microextraction method development and its application in the determination of volatiles in honeys by gas chromatography. *Food Chemistry*, 126, 1288-1298.
- Pontes, M., Marques, & J.C. Camara, J.S. (2007). Screening of Volatile composition from Portuguese multifloral honeys using headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, 74, 91-103.
- Radovic, B., Careri, M., Mangia, A., Musci, M., Gerboles, M., & Anklam, E. (2001). Contribution of dynamic headspace GC-MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. *Food Chemistry*, 72(4), 511-520.
- Rowland, C.Y., Blackman, A.J., Darcy, B. & Rintoul, G.B. (1995). Comparison of organic extractives found in leatherwood (*Eucryphia lucida*) honey and leatherwood flowers and leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 753-763.
- Ruisinger, B. & Schieberle, P. (2012). Characterization of the key aroma compounds in rape honey by means of the molecular sensory science concept. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(17), 4186-4194.
- Senyuva, H.Z., Gilbert, J., Sibel, S., Charlton, A., Cansu, D. & Neslihan G. (2009). Profiling Turkish honeys to determine authenticity using physical and chemical characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3911-3919.
- Silici, S. (2011). Determination of volatile compounds of pine honeys. *Turkish Journal of Biology*, 35, 641-645.
- Soria, A.C., Sanz, J. & Martinez-Castro, I. (2009). SPME Followed by GC-MS: A powerful technique for qualitative analysis of honey

- volatiles. *European Food Research and Technology*, 228, 579-590.
- Speziale, M., Vazquez-Araujo, L., Mincione, A. & Carbonell-Barrachina, A.A. (2010). volatile composition and descriptive sensory analysis of Italian vanilla *torrone*. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 1586-1593.
- Tananaki, C., Gounari, S. & Thrasyvoulou, A. (2009). The effect of smoke on the volatile characteristics of honey. *Journal of Apicultural Research*, 48 (2), 142-144.
- Tananaki, C., Thrasyvoulou, A., Giraudel, J.L. & Montury M. (2007). Determination of volatile characteristics of Greek and Turkish pine honey samples and their classification by using kohonen self organising maps. *Food Chemistry*, 101, 1687-1693.
- Verzera, A., Tripodi, G., Condurso, C., Dima, G. & Marra A. (2014). Chiral volatile compounds for the determination of orange honey authenticity. *Food Control*, 39, 237-243.
- Wardencki, W., Chmiel, T., Dymerski, T., Bieznacka, P. & Plutowska, B. (2009). Application of gas chromatography, mass spectrometry and olfactometry for quality assessment of selected food products. *Ecological Chemistry and Engineering*, 16 (3), 287-300.
- Zhou, Q., Wintersteen, C.L. & Cadwallader, K.R. (2002). Identification and quantification of aroma-active components that contribute to the distinct malty flavor of buckwheat honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2016-2021.

DEFNE (*Laurus nobilis*) UÇUCU YAĞ BİLEŞİMİ ÜZERİNE DİSTİLASYON SÜRESİNİN ETKİSİ

Muharrem Gölükçü , Haluk Tokgöz , Demet Yıldız Turgut 

Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Antalya, Türkiye

Received: 04.04.2017

Accepted: 02.07.2017

Published online: 07.11.2017

Corresponding author:

Muharrem Gölükçü, Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Demircikara Mah. Paşakavakları Cad. No: 11 07100 Muratpaşa/Antalya, Türkiye

E-mail: muharrem.golukcu@tarim.gov.tr

Öz:

Önemli tıbbi-aromatik bitkilerden birisi olan defnenin yaprakları baharat olarak kullanılmasının yanında uçucu yağ üretiminde de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Defne uçucu yağının kalitesi bileşimi ile doğrudan ilişkilidir. Uçucu yağ bileşimi, kullanılan materyalin tür veya çeşidi olmak üzere, yetiştirildiği bölge, hasat zamanı, uygulanan proses gibi değişik faktörlerden etkilenebilmektedir. Çalışma kapsamında hidro-distilasyon süresinin defne uçucu yağ bileşimi üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla beş farklı distilasyon süresinin (10, 20, 30, 60 ve 120 dakika) etkisi incelenmiştir. Araştırma bulguları distilasyon süresinin defne uçucu yağ bileşiminde oldukça etkili olduğunu göstermiştir. Defne yaprak uçucu yağının en önemli bileşeni olan 1,8-sineol uygulama süresine bağlı olarak %57.7-79.4 aralığında değişim göstermiştir. Bulgular distilasyon süresi dikkate alınarak pazar talebi ve uygulama alanına göre farklı bileşimlere sahip defne yaprak uçucu yağı üretilebileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Defne, *Laurus nobilis*, Distilasyon süresi, Uçucu yağ bileşimi

Abstract:

EFFECT OF DISTILLATION TIME ON ESSENTIAL OIL COMPOSITIONS OF BAY LEAF (*Laurus nobilis* L.)

Bay leaf is an important medicinal and aromatic plant. It is used as spice and also in essential oil production. Leaf essential oil quality is related with its composition. Its composition could be affected from plant species or cultivar, growing area, harvesting time, processing methods. In this study, the effect of hydro-distillation time on essential composition of bay leaf was investigated. For this purpose, essential oil composition of bay leaf was determined during five different distillation periods (10, 20, 30, 60 and 120 minutes). The research findings showed that significant differences were observed in essential oil composition with respect to distillation time. Main component of bay leaf essential oil is 1,8-cineole and ranged between 57.7-79.4% according to distillation time. Results showed that it is possible to produce varied composition bay leaf essential oil by taking in consideration distillation time.

Keywords: Bay leaf, *Laurus nobilis*, Distillation time, Essential oil composition

Giriş

Ülkemizin önemli tıbbi-aromatik bitkilerinden birisi olan defne (*Laurus nobilis* L.) herdem yeşil, çalı veya ağaç formunda bulunabilmektedir. Dünya üretiminin yaklaşık %90'ı ülkemizde bulunmakta olan defne, özellikle Akdeniz Bölgesi'nde oldukça yaygındır (Erden, 2005).

Defne yaprakları baharat olarak kullanılmasının yanında uçucu yağ üretiminde de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Acar, 1985; Polat vd, 2009). Defne yaprak uçucu yağı gıda endüstrisinde koruyucu ve aroma verici olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında defne yapraklarında elde edilen uçucu yağ melanom inhibisyonunda, eklem ve kas ağrılarını gidermede, kozmetik ürünlerde koruyucu olarak, sindirim sistemi ve cilt problemlerinin tedavilerinde, aromaterapide, masaj ürünlerinde, böcek kovucu olarak da kullanılmaktadır (Kaurinovic vd, 2010; Marques vd, 2016). Defne yaprağı başta genotip olmak üzere, yetiştirildiği bölge, hasat zamanı gibi faktörlere göre değişiklik gösterebilmekte olup, %0.20 ile %2.51 aralığında uçucu yağ içermektedir (Acar, 1985; Quijano ve Pino, 2007). Defne yaprak uçucu yağının bileşimi, kaliteyi belirleyen önemli kriterlerinin başında gelmektedir. Uçucu yağ bileşiminde; 1,8-sineol, sabinen, α -terpinil asetat, α -pinen, β -pinen gibi bileşenler önemli yer tutmaktadır (Fiorini vd 1997, Bouzouita vd 2001, Karadeniz, 2001; Dadalıoğlu ve Evrendilek, 2004; Özcan ve Chalchat, 2005; Sangun vd, 2007; Derwich vd 2009). Uçucu yağ miktar ve bileşimi, bitki tür ve çeşidi, hasat zamanı, yetiştiği bölge, kurutma şekli, üretim yöntemi, depolama yöntemi ve süresi gibi parametrelere göre farklılıklar gösterebilmektedir (Diaz-Maroto vd 2002, Sangun vd 2007, Şekeroğlu vd 2007, Başer ve Buchbauer, 2010, Tuğrul Ay vd 2011, Sellami vd 2011). Üretim yöntemi olarak da, distilasyon metodu, cihaz dizayn şekli, cihaz üretim materyali, ham maddenin durumu, distilasyon süresi, hammadde yükleme şekli, çalışma parametreleri, ekstraksiyon tankının durumu gibi faktörlere göre farklılıklar gösterebilmektedir (Carreda vd 2002, Flamini vd 2007, Handa vd 2008, Başer ve Buchbauer, 2010, Ozek 2012, Cannon vd 2013). Nitekim bazı tıbbi ve aromatik bitkilerden uçucu yağ üretiminde distilasyon süresine bağlı olarak farklı kompozisyonlara sahip ürünler elde edilebileceği belirtilmektedir (Cannon vd 2013). Kekik uçucu yağı üzerine yapılan bir çalışmada farklı distilasyon süresi uygulamaları ile baskın bileşen olan karvakrolde %62.60 ile %86.40 gibi ge-

niş bir aralığa sahip ürün portföyü oluşturulabileceği tespit edilmiştir (Toker vd 2017). Lavanta üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada da distilasyon süresini dikkate alarak lavanta uçucu yağının hakim bileşenleri olan linalol asetat ve sineol oranlarında sırasıyla %6.37-34.52, %15.0-37.8 aralıklarında ürünler oluşturulabileceği ortaya konulmuştur (Zheljazkov vd 2013a). Rezene üzerine yapılan bir diğer çalışmada da 1.25-160 dakika aralığında 8 farklı distilasyon süresi uygulaması ile oransal olarak en yüksek düzeyde bulunan trans-anetol oranında %32.6-59.4 gibi geniş bir aralığa sahip alternatif ürünler üretilebileceği sonucuna ulaşılmıştır (Zheljazkov vd 2013b). Dünya üretiminde oldukça önemli bir konuma sahip ülkemizde defne yaprak uçucu yağ bileşimi üzerine distilasyon süresinin etkisini ortaya koyan bir çalışmaya rastlanılamamıştır.

Araştırmanın amacı hidro-distilasyon yöntemi ile uçucu yağ üretiminde; farklı distilasyon sürelerinin defne yaprak uçucu yağ verim ve bileşimi üzerine olan etkisini ortaya koymaktır.

Materyal ve Metot

Araştırmada materyal olarak taze (*Laurus nobilis* L.) defne yaprağı kullanılmıştır. Örnekler 26.01.2016 tarihinde Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Aksu biriminde yer alan defne ağaçlarından alınmıştır. Örnekler hasat edildikten sonra analiz edilmek üzere Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Tıbbi Aromatik Bitkiler Merkezi laboratuvarına sevk edilmiştir.

Örneklerin uçucu yağ miktarları Clevenger cihazında hidro-distilasyon yöntemi ile belirlenmiştir (Anonim, 2011). Distilasyon taze örneklerde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, distilasyon öncesi ortalama 0.5 cm boyutlarında olacak şekilde parçalama işlemine tabi tutulmuş 20 g örnek kullanılmıştır. Distilasyon süreleri; 0-10 dakika, 0-20 dakika, 0-30 dakika, 0-60 dakika, 0-120 dakika olacak şekilde ayarlanmıştır. Belirlenen distilasyon süreleri kaynamaya başlama noktası dikkate alınarak verilmiştir.

Farklı distilasyon süreleri sonucu elde edilen defne yaprak uçucu yağlarının bileşen analizi FID-GC/MS (Gaz kromatografisi (Agilent 7890A)-kütle detektör (Agilent 5975C)) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla kapiler kolon (HP Innovax Capillary; 60.0 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) kullanılmış ve Özek vd (2010) tarafından kullanılan metot referans alınmıştır. Öncelikle uçucu yağ

örnekleri analiz edilmek üzere 1:50 oranında hekzan ile seyreltme işlemine tabi tutulmuştur. Kromatografik analizde mobil faz olarak 0.8 mL/dk akış hızında helyum gazı kullanılmıştır. Hekzan ile seyreltilmiş uçucu yağlar cihaza 1 µL olarak 1:40 split oranı ile verilmiştir. Cihaz enjeksiyon bloğu sıcaklığı 250°C'ye ayarlanmıştır. Uçucu yağ bileşen ayrımını gerçekleştirmek üzere kolon sıcaklık programı 60°C (10 dakika), 60°C'den 220°C'ye 4°C/dakika ve 220°C (10 dakika) olacak şekilde ayarlanmıştır. Kütle detektörü için tarama aralığı (m/z) 35-450 amu ve iyonizasyon için 70 eV kullanılmıştır. Örneklerin uçucu yağın bileşenlerinin teşhisinde Wiley7n, Oil Adams ve Nist05 kütüphanelerinin verileri esas alınmıştır. Elde edilen bileşenlerin yüzdeleri FID dedektör kullanılarak, tanımlaması ise MS dedektör kullanılarak yapılmıştır.

Araştırma tesadüf parselleri deneme düzeninde üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Uçucu yağ bileşen analizleri ise her tekerrürde iki enjeksiyon şeklinde yapılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler SAS paket programı kullanılarak Duncan Çoklu Karşılaştırma testine tabi tutulmuştur. Elde edilen istatistik veriler ortalama±standart hata şeklinde sunulmuştur.

Bulgular ve Tartışma

Çalışma kapsamında uygulanan beş farklı distilasyon süresi sonucu elde edilen uçucu yağ oranları ve bu verilerin toplam uçucu yağ miktarına oranları (verim) Çizelge 1'de verilmiştir. Araştırma bulguları distilasyon süresine bağlı olarak elde edilen uçucu yağ oranlarında önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir. Toplam uçucu yağın ilk on dakikalık distilasyon süresinde yarıdan fazlasının elde edildiğini göstermektedir. Bu veriler distilasyon süresinin ilerleyen aşamalarında eşit zaman aralığı için elde edilen uçucu yağ miktarında oransal bir azalma olduğu göstermektedir. Nitekim, ilk 30 dakikalık sürede bitkisel materyalde bulunan uçucu yağın %80'i, ikinci 30 dakikalık sürede ise toplam uçucu yağın %20'si distilasyon yoluyla alınmıştır. Distilasyonun son aşaması olan 60-120 dakikalık aralıkta ise toplam uçucu yağ miktarında oransal olarak herhangi bir artış olmamıştır. Yapılan bir çalışmada defne yapraklarının hasat dönemi ve sürgün yaşına göre uçucu yağ miktarında %0.68-2.51 gibi önemli farklılıklar olduğu bildirilmektedir. Genç sürgünlerin yaşlı sürgünlere, kış aylarında temin edilenlerinde yaz aylarında temin edilenlere oranla daha yüksek oranda uçucu yağ içerdiği bildirilmektedir (Acar, 1985). Ülkemizde farklı bölgelerden toplanan defne örneklerinin

yaprak uçucu yağ miktarının da %0.4-4.45 aralığında dağılım gösterdiği tespit edilmiştir (Karık vd 2015). Bulgularımız literatür değerleri ile benzerlik göstermektedir. Distilasyon süresinin uçucu yağ verim ve bileşimine etkisini belirlemek amacıyla kekik yağı üzerine yapılan bir çalışmada da 10 dakikalık bir sürede uçucu yağın %53.19'unun alındığı rapor edilmiştir (Toker vd 2017). Bu anlamda da bulgularımız literatür bulguları ile benzerlik göstermektedir.

Araştırma kapsamında farklı sürelerde elde edilen uçucu yağların bileşen analizleri de gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2). Elde edilen veriler örneklerin uçucu yağ bileşen konsantrasyonları arasında da süreye bağlı olarak önemli farklılıklar olduğunu ortaya koymaktadır. Örneklerin tamamında defne uçucu yağ bileşiminin oransal olarak en önemli kısmını 1,8-sineol oluşturmaktadır. Okaliptüs (Başer vd 1998), biberiye (Takayama vd 2016), adaçayı (Bernotiene vd 2007) gibi bazı bitkisel kaynaklarda da önemli oranda 1,8-sineol bulunduğu bildirilmektedir. Ökalyptol olarak da bilinen 1,8-sineol gıda, kozmetik, ilaç gibi birçok üründe farklı amaçlarla kullanılmaktadır. Defne yaprak uçucu yağ örneklerinin 1,8-sineol içerikleri %57.7-79.4 gibi geniş bir aralıkta dağılım göstermektedir. Distilasyonun ilk 10 dakikalık periyodunda elde edilen uçucu yağın bileşiminde bulunan 1,8-sineol oranı %79.4 ile en yüksek düzeydedir. Bu süreçteki uçucu yağ oranının %57 olduğu göz önüne alındığında toplam üründe bulunan 1,8-sineol'ün %61.6'sının bu aşamada elde edileceği görülecektir. İlk 20 dakikalık distilasyon uygulaması sonucunda elde edilen üründe ise 1,8-sineol oranı %71.8'e düşmüştür. İlerleyen aşamalarda bu oran daha da azalarak %60'lar seviyesine kadar inmektedir. Bu bileşende olduğu gibi *trans*-sabinen hidrat, *cis*-sabinen hidrat, pinokarvon ve *trans*-pinokarveol oranlarında da distilasyon süresindeki artışla birlikte bir azalma meydana gelmiştir. Yapılan bir çalışmada defne yaprak uçucu yağında 1,8-sineol içeriğinin %43.37-59.94 aralığında dağılım gösterdiği bildirilmektedir (Karadeniz 2001). Karık vd (2015) tarafından yapılan çalışmada da örneğin alındığı bölgeye göre defne yaprak uçucu yağ bileşiminde önemli farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada 1,8-sineol oranının %36.93-66.90 aralığında olduğu saptanmıştır. Bir diğer çalışmada da bu bileşenin oranının %57.8 olduğu tespit edilmiştir (Ozek, 2012). Dadaloğlu ve Evrendilek (2004) tarafından yapılan çalışmada da defne yaprak uçucu yağında 1,8-sineol oranı %60.72 olarak bildirilmiş-

tir. Araştırma bulgularımız üzerinden değerlendirme yapıldığında 120 dakikalık distilasyon uygulaması sonucu elde edilen uçucu yağın bileşiminde tespit edilen 1,8-sineol oranı ile Ozek (2012) ve Dadaloğlu ve Evrendilek (2004) değerlerinin benzerlik gösterdiği görülecektir. Ancak Karadeniz (2001) ve Karık vd (2015) tarafından

yapılan çalışmalarda olduğu gibi özellikle hasat zamanı ve örnek temin yerine göre defne yaprak uçucu yağı bileşiminde önemli varyasyonlar oluşabilmektedir. Elde edilen ürünlerdeki bu farklılık distilasyon süresini dikkate alarak giderilebileceği düşünülmektedir.

Tablo 1. Distilasyon sürelerine göre elde edilen uçucu yağ oranları (ortalama±standart hata).

Table 1. Essential oil content with respect to distillation time (mean±standard error).

Distilasyon süresi (dakika)	Uçucu yağ miktarı (%)	Verim (%)
0-10	1.00 ^c ±0.038	57
0-20	1.25 ^b ±0.046	71
0-30	1.40 ^b ±0.064	80
0-60	1.75 ^a ±0.052	100
0-120	1.75 ^a ±0.069	100

Aynı sütundaki farklı harfler ortalamalar arasında P<0.05 seviyesinde fark olduğunu göstermektedir.

Tablo 2. Distilasyon sürelerine göre elde edilen uçucu yağların bileşen oranları (% , ortalama±standart hata).

Table 2. Essential oil composition of the volatile oil with respect to distillation time (% , mean±standard error).

	RT	0-10 dak	0-20 dak	0-30 dak	0-60 dak	0-120 dak
α -pinen	12,58	1.45 ^d ±0.049	2.77 ^c ±0.095	3.28 ^b ±0.055	4.59 ^a ±0.118	4.59 ^a ±0.162
β -pinen	16,32	1.71 ^d ±0.090	2.75 ^c ±0.072	3.21 ^b ±0.046	4.16 ^a ±0.107	4.21 ^a ±0.092
Sabinen	16,91	6.04 ^d ±0.058	9.41 ^c ±0.150	10.5 ^b ±0.113	12.6 ^a ±0.193	12.7 ^a ±0.124
Limonen	20,45	te	0.95 ^b ±0.075	0.84 ^b ±0.072	1.14 ^a ±0.055	1.14 ^a ±0.026
1,8-sineol	20,96	79.4 ^a ±0.456	71.8 ^b ±0.938	64.9 ^c ±0.624	61.4 ^d ±0.214	57.7 ^e ±0.915
<i>p</i> -simen	23,61	te	te	te	te	0.70±0.029
<i>trans</i> -sabinen hidrat	30,85	1.22 ^a ±0.055	0.96 ^b ±0.066	0.98 ^b ±0.078	0.91 ^b ±0.066	0.82 ^b ±0.035
Linalool	33,42	0.43 ^{ab} ±0.026	0.52 ^a ±0.038	0.44 ^{ab} ±0.017	te	0.41 ^b ±0.049
<i>cis</i> -sabinen hidrat	33,69	1.01 ^a ±0.064	0.81 ^{bc} ±0.035	0.89 ^{ab} ±0.035	te	0.72 ^c ±0.043
Pinokarvon	34,80	0.63 ^a ±0.017	0.45 ^b ±0.038	0.43 ^b ±0.052	te	0.35 ^b ±0.055
Terpinen-4-ol	35,52	1.40 ^b ±0.101	1.38 ^b ±0.064	1.58 ^{ab} ±0.052	1.69 ^a ±0.032	1.66 ^a ±0.095
<i>trans</i> -pinokarveol	37,20	0.61 ^a ±0.046	0.44 ^b ±0.046	0.48 ^b ±0.009	te	0.41 ^b ±0.046
α -terpineol	38,27	0.52 ^a ±0.026	0.46 ^a ±0.049	0.57 ^a ±0.015	te	0.51 ^a ±0.049
α -terpinil asetat	38,39	5.00 ^d ±0.167	6.53 ^c ±0.098	9.80 ^b ±0.061	11.5 ^a ±0.049	11.8 ^a ±0.162
Metil öjenol	46,71	te	te	1.04 ^{ab} ±0.075	0.96 ^b ±0.078	1.22 ^a ±0.066
Tanımlanamayan	-	0.58±0.038	0.75±0.055	1.02±0.064	1.05±0.069	1.11±0.026

RT: Alıkonma zamanı (Retention time, dakika), te: tespit edilemedi.

Her satırdaki farklı harfler ortalamalar arasında P<0.05 seviyesinde fark olduğunu göstermektedir.

Bunun yanında distilasyon süresindeki ilerlemeyle birlikte bazı bileşenlerin oranında da istatistiksel olarak önemli düzeyde artışlar meydana gelmiştir. Bu anlamda oransal olarak en yüksek artış 3.2 kat ile α -pinen ve 2.5 kat ile β -pinen'de olmuştur. Bu iki bileşeni sırasıyla α -terpinil asetat ve sabinen takip etmiştir. Bunun yanında limonen, terpinen-4-ol, metil öjenol ve *p*-simen oranlarında da kısmi artışlar olmuştur. Linalool ve α -terpineol gibi bazı bileşenlerin oranlarında ise belirgin bir yönde değişim gözlenmemiştir. Bu değişimler üzerine her bir bileşenin kaynama noktası, polarite gibi parametreler etkin olabilmektedir (Handa vd

2008). Elde edilen veriler her bir bileşen için distilasyon süresinin farklı düzeyde ve yönde etkisinin olabileceğini göstermektedir.

Sonuç

Farklı amaçlarla doğadan ve kültürel üretimle temin edilen bitkisel hammaddelerin bileşimleri, başta tür, çeşit ve genotip olmak üzere, bitkinin yaşı, kullanılan kısmı, hasat zamanı, hasat şekli, kurutma yöntemi gibi faktörlerden önemli oranda etkilenebilmektedir. Ancak genel olarak önemli ekonomik pazarlar standart özelliklere sahip ürünler talep etmektedir. Uçucu yağ pazarında da bu durum söz konusudur. Araştırma kapsamında bu anlamda distilasyon süresinden bu anlamda yarar-

lanılıp yararlanılamayacağı araştırılmıştır. Bulgular distilasyon süresi dikkate alınarak pazar talebi ve uygulama alanına göre farklı bileşimlere sahip defne yaprak uçucu yağı üretilebileceğini ortaya koymuştur. Bu veriler bu anlamda ürün çeşitliliği oluşturulabileceğini de göstermektedir. Bu anlamda distilasyonun ilk aşamasında alınan uçucu yağın 1,8-cineol açısından zengin olduğu görülmüştür. Elde edilen veriler uçucu yağ üretiminde her bir bitkisel materyal ve üretim sistemi için distilasyon süresinde bir optimizasyon işleminin faydalı olabileceğini göstermektedir.

Kaynaklar

Acar, İ. (1985). *Defne (Laurus nobilis L.) yaprağı ve yaprak eterik yağının üretilmesi ve değerlendirilmesi*. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları, Teknik Bülten Serisi No: 186. 89 s. Ankara.

Anonim, (2011). TSE EN ISO 6571-Baharatlar, Çeşniler ve Tıbbi Bitkiler - Uçucu Yağ Muhtevasının Tayini (hidrodistilasyon yöntemi). Türk Standartları Enstitüsü, Ankara.

Başer, K.H.C. & Buchbauer, G. (2010). *Handbook of essential oils: science technology and applications*. CRC Press, New York, 975 pp. ISBN: 978-1-4200-6315-8.

Başer, K.H., Gülbaba, A.G., Azcan, N., Kara, M., Kırmıner, N. & Kürkçüoğlu M. (1998). *Türkiye'de yetiştirilen bazı okaliptüs (Eucalyptus) türlerinin uçucu yağ verim ve bileşimlerinin ve üretim teknolojilerinin belirlenmesi*. Tarsus: Doğu Akdeniz 160 Ormancılık Araştırma Müdürlüğü, Çevre ve Orman Bakanlığı Yayın No: 84, DOA Yayın No:11, Teknik Bülten No:7.

Bernotiene, G., Nivinskiene, O., Butkiene, R., & Mockute, D. (2007). Essential oil composition variability in sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemija*, 18(4), 38-43.

Bouzouita, N., Nafti, A., Chaabouni, M.M., Lognay, G.C., Marlier, M., Zghoulli, S. & Thonart, P. (2001). Chemical composition of *Laurus nobilis* oil from Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 13, 116-117.

Cannon, J.B., Cantrell, C.L., Astatkie, T. & Zheljazkov, V.D. (2013). Modification of yield and composition of essential oils by distillation time. *Industrial Crops and Products*, 41, 214-220.

Caredda, A., Marongiu, B., Porcedda, S. & Soro, C. (2002). Supercritical carbon dioxide extraction and characterization of *Laurus nobilis* essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1492-1496

Dadalıoğlu, I. & Evrendilek, G.A. (2004). Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8255-8260.

Derwich, E., Benziane, Z., & Boukir, A. (2009). Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4), 3818-3824.

Diaz-Maroto, M.C., Perez-Coello, M.S., & Cabezudo, M.D. (2002). Effect of drying method on the volatiles in bay leaf (*Laurus nobilis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4520-4524.

Erden, Ü. (2005). *Akdeniz Defnesi (Laurus nobilis L.)'nde Mevsimsel Varyabilite Ve Optimal Kurutma Yöntemlerinin Araştırılması*. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, 47 s. Adana.

Fiorini, C., Fouraste, I., David, B., & Bessiere, J. (1997). Composition of the flower, leaf and stem essential oils from *Laurus nobilis*. *Flavour and Fragrance Journal*, 12(2), 91-93.

Flamini, G., Tebano, M., Cioni, P.L., Ceccarini, L., Ricci, A.S. & Longo, I. (2007). Comparison between the conventional method of extraction of essential oil of *Laurus nobilis* L. and a novel method which uses microwaves applied in situ, without resorting to an oven. *Journal of Chromatography A*, 1143, 36-40.

Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G. & Rakesh, D.D. (2008). *Extraction technologies for medicinal and aromatic plants*. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, 260 pp. Trieste, Italy.

Karadeniz, H. (2001). *Hatay Bölgesi defne yaprağı ve meyvası uçucu yağının özelliklerinin belirlenmesi*. Mustafa Kemal Üniversitesi,

- Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 89 s. Hatay.
- Karık, Ü., Çiçek, F., Oğur, E., Tutar, M. & Ayas, F. (2015). Türkiye defne (*Laurus nobilis* L.) popülasyonlarının uçucu yağ bileşenleri. *Anadolu*, 25(1), 1-16.
- Kaurinovic, B., Popovic, M. & Vlasisavljevic, S. (2010). In vitro and in vivo effects of *Laurus nobilis* L. leaf extracts. *Molecules*, 15, 3378-3390.
- Marques, A., Teixeira, B. & Nunes, M.L. (2016). *Bay laurel (Laurus nobilis) oils*. Chapter 26, p: 239- 246. (Editor, Preedy, V.R.: Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety, Academic Press, 896 pp. London, UK.
- Ozek, T. (2012). Distillation parameters for pilot plant production of *Laurus nobilis* essential oil. *Records of Natural Products*, 6, 135-143.
- Özcan, M. & Chalchat, J.C. (2005). Effect of different locations on the chemical composition of essential oils of laurel (*Laurus nobilis* L.) leaves growing wild in Turkey. *Journal of Medicinal Food*, 8, 408-411.
- Özek, G., Demirci, F., Özek, T., Tabanca, N., Wedge, D.E., Khan, S.I., Başer, K.H.C., Duran, A. & Hamzaoglu, E. (2010). Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of volatiles obtained by four different techniques from *Salvia rosifolia* Sm., and evaluation for biological activity. *Journal of Chromatography A*, 1217, 741-748.
- Polat, S., Gülbaba, A.G. & Tüfekçi, S. (2009). *Defne (Laurus nobilis L.) alanlarında en uygun yaprak işletme şekli ve maliyetlerinin belirlenmesi (Tarsus Örneği)*. Çevre ve Orman Bakanlığı Yayın no: 391. 55 s.
- Quijano, C.E. & Pino, J.A. (2007). Characterization of the leaf essential oil from laurel (*Laurus nobilis* L.) grown in Colombia. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 38, 371-374.
- Sangun, M.K., Aydın, E., Timur, M., Karadeniz, H., Çaliskan, M. & Ozkan, A. (2007). Comparison of chemical composition of the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves and fruits from different regions of Hatay. *Journal of Environmental Biology*, 28(4), 731-733.
- Sellami, I.H., Wannas, W.A., Bettaieb, I., Berrima, S., Chahed, T., Marzouk, B. & Limam, F. (2011). Qualitative and quantitative changes in the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves as affected by different drying methods. *Food Chemistry*, 126, 691-697
- Şekeroğlu, N., Özgüven, M. & Erden, U. (2007). Effects of the drying temperature on essential oil content of bay leaf (*Laurus nobilis* L.) harvested at different times. *International Symposium on Medicinal and Nutraceutical Plants*, 756: 315-320
- Takayama, C., de Faria, F.M., de Almeida, A.C.A., Dunder, R.J., Manzo, L.P., Socca, E.A.R., Batista, L.M., Salvador, M.J., Souza-Brito, A.R.M. & Luiz-Ferreira, A. (2016). Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(8), 677-681.
- Toker, R., Gölükcü, M. & Tokgöz, H. (2017). Effects of distillation times on essential oil compositions of *Origanum minutiflorum* O. Schwarz Et. And P.H. Davis. *Journal of Essential Oil Research*, 29(4), 330-335.
- Tuğrul Ay, S., Gölükcü, M., Toker, R. & Turgut, K. (2011). Farklı yüksekliğin ve uygulamaların defne bitkisinin kalite özellikleri üzerine etkilerinin belirlenmesi. *IX. Tarla Bitkileri Kongresi*, 2. Cilt (Endüstri Bitkileri ve Biyoteknoloji), s: 1398-1403.
- Zheljazkov, V.D., Cantrell, C.L., Astatkie, T. & Jeliaskova, E. (2013a). Distillation time effects on lavender essential oil yield and composition. *Journal of Oleo Science*, 62, 195–199.
- Zheljazkov, V.D., Horgan, T., Astatkie, T. & Schlegel, V. (2013b). Distillation time modifies essential oil yield, composition, and antioxidant capacity of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill). *Journal of Oleo Science*, 62, 665–672.



REVIEW ARTICLE

DERLEME MAKALESİ

YAŞAM BOYU SAĞLIKLI VE DENGELİ BESLENME İÇİN BALIK TÜKETİMİNİN ÖNEMİ

Abdullah Öksüz^{ORCID}, Şenay Burçin Alkan^{ORCID}, Havvanur Taşkın^{ORCID}, Meryem Ayrancı^{ORCID}

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Konya, Türkiye

Received: 19.06.2017

Accepted: 17.10.2017

Published online: 22.11.2017

Corresponding author:

Abdullah Öksüz, 15 Temmuz Yerleşkesi, Meram Yeni Yol, Kürden Mahallesi Kasım Halife Sokak Meram, Konya, Türkiye

E-mail: aoksuz@konya.edu.tr

Öz:

Balık, yaşamın her döneminde sağlığın korunması ve gelişmesine katkıda bulunan bir besindir. İyi kalitede protein, uzun zincirli çoklu doymamış n-3 yağ asitleri (n-3 LCPUFA), D vitamini, iyot gibi besin öğelerini içermesi nedeniyle balıkçetin düzenli ve yeterli miktarda tüketimi önerilmektedir. Özellikle fetüsün bilişsel ve görsel gelişimi için gerekli olan dokosaheksaenoik asit (DHA) gebelik döneminde annenin balık tüketimine bağlıdır. Yaşamın ilk döneminde bebek için en iyi besin olan anne sütünün DHA içeriği de büyüme ve gelişimin tamamlanması açısından önemlidir. Çocukluk çağında düzenli balık tüketim alışkanlığı kazandırılmasının kronik hastalıkların önlenmesine katkıda bulunduğu bildirilmektedir. Yetişkinlik ve yaşlılık döneminde de balık tüketimi sağlığın korunması için yeterli ve dengeli bir diyetin vazgeçilmez bir parçasıdır. Genel olarak haftada iki porsiyon yağlı balık tüketimi önerilmektedir. Ancak balıkta doğal olarak bulunan ve balığın avlandığı/yetiştirildiği su kaynaklarından balığa geçen metilcıva (MeHg) ve dioksin benzeri bileşikler sağlığı olumsuz etkilemektedir. MeHg'nin özellikle fetüs ve yeni doğan için nörotoksik olduğu bildirilmektedir. MeHg içeriği yüksek olan ceylan palamutu *Scorpaenopsis commerson* (Lacepède, 1800), köpek balığı, kılıç balığı, irigöz ton balıklarının tüketilmemesi önerilmektedir. Yarar risk analizi yapıldığında balık tüketiminin yararlarının daha ağır bastığı bildirilmektedir, yaşamın her döneminde düzenli olarak balık tüketimi optimal beslenme için önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Balık tüketimi, Omega-3 yağasitleri, Optimal beslenme

Abstract:

BENEFITS OF FISH CONSUMPTION FOR HEALTHY AND BALANCED NUTRITION DURING LIFELONG TIME

Seafood contributes significant nutrient to maintain and development of health in every stage of human life. Regular and adequate fish consumption is recommended in terms of its high quality protein, long chain polyunsaturated n-3 fatty acids (LC-PUFA n-3), vitamin D, and essential macro and microelements minerals such as phosphorus, zinc iodine etc. contents. DHA is necessary for foetus cognitive and visual development, and rely on mother's fish consumption. DHA content of human milk, the best source for infant in the first period of life, and it is vital in terms of growth and development completion. It's reported that gaining regular fish consumption habit in childhood help to protect some of chronic diseases. Seafood is an indispensable part of adequate and balanced diet for adults and elderly people. Generally, it's advised to consume at least two servings' oily fish per week. However, methyl mercury and dioxin-like compounds, which aren't naturally present in fish, have negative effects but they can accumulate in fish because of their polluted environment. It is well-known phenomenon that methyl mercury has neurotoxic effect especially on foetus and new-borns. Consumption of fish species containing high methyl mercury such as marlin, shark, swordfish, and big eyed tuna should be limited. However, considering risk/benefit balance, fish consumption has more advantages because it's positive health contribution. In every stage of life, fish consumption is essential for optimal nutrition.

Keywords: Fish consumption, Omega-3 fatty acids, Optimal nutrition

FOOD and HEALTH
E-ISSN: 2602-2834

4(1): 43-62 (2018) doi: 10.3153/JFHS18006

© 2015-2018 ScientificWebJournals (SWJ)

Giriş

Beslenme, çevreyle insanların ilişkisini belirleyen önemli faktörlerden birisidir. İnsanın tükettiği olduğu besin, onun davranışını, düşünme şeklini, iş verimini, neslinin devamını ve en önemlisi de sağlığını önemli derecede etkiler. Tüketilen besinlerin metabolik gereksinimleri karşılaması ve vücudun çalışması için gerekli enerji ve besin öğelerini yeterli miktarda sağlaması optimal beslenme olarak tanımlanmaktadır. Minimum hastalık riski ve maksimum sağlığın hedeflendiği optimal beslenme için bireylerin farklı besin gruplarından yeterli ve dengeli bir şekilde beslenmeleri önerilir. Bu besin grupları dört ana başlık altında toplanıp; et, süt, tahıl ve sebze-meyve grubu olarak bilinir. Et grubu içerisinde karasal hayvanların etleri (büyükbaş ve küçükbaş hayvan), kanatlı etleri, av hayvanlarının etleri ve büyük bir çeşitlilik arzeden su ürünlerinden balık, kabuklu ve yumuşakçaların etleri sayılabilir. Su ürünleri içerisinde balık kaliteli ve biyolojik değeri yüksek bir besindir; pek çok ülkede önemli bir istihdam, gelir ve besin kaynağıdır. Avcılık yolu ile 2014'te 93.4 milyon ton, yetiştiricilikle ise 73.8 milyon ton balık elde edilmiştir. İçsularından 11.9 milyon ton balık avlanmıştır. Elde edilen balıkların 146.3 milyon tonu insan tüketimi için, 20.9 milyon tonu ise gıda dışında kullanılmıştır. Dünya genelinde balık bireylerin hayvansal protein alımının %17'sini ve bazı ülkelerde ise %25'ini oluşturur. Toplam protein alımının ise %6.7'lik dilimini oluşturmaktadır. 150 g balık eti yetişkin bir bireyin günlük protein gereksiniminin %60'ını karşılamaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde yıllık balık tüketimi 1961-2013 yılları arasında 5.2 kg/kişi'den 18.8 kg/kişi'ye, gelir düzeyi düşük ülkelerde ise 3.5 kg/kişi'den 7.6 kg/kişi'e yükselmiştir. 2013 verilerine göre gelişmiş ülkelerde yıllık kişi başı tüketilen balık miktarı 26.8 kg'dır. Dünyada balığın besin olarak tüketimi yıllık ortalama 20.1 kg/kişidir. Bu verilere sucul bitkiler dahil edilmemiştir (FAO, 2016).

Türkiye'de 2015'te avcılık yoluyla 431 bin ton, yetiştiricilikle ise 240 bin ton balık elde edilmiştir. 2000-2015 yılları arasında ülkemizde balık tüketim miktarı incelendiğinde dalgalanmalar olduğu gözlemlenmektedir. 2000 yılında kişi başına tüketilen balık miktarı 8.0 kg iken 2015'te 6.1 kg olduğu tespit edilmiştir (TÜİK, 2016). Bu miktarın gelişmekte olan ve gelişmiş ülkelerde tüketilen balık miktarının çok daha altında olduğu görülmektedir.

Balık, protein, uzun zincirli çoklu doymamış n-3 yağ asitleri (LC-PUFA), vitamin ve mineral içeriğinden dolayı önemli bir besindir; bireyler yaşamın her döneminde tüketebilir. Balık eti genellikle %15-20 oranında protein içermektedir. Bu oran balık türüne göre değişiklik göstermektedir. Bazı türlerde %15'ten az, bazı türlerde ise %20'den fazla olabilmektedir (Murray & Burt, 1969). Balık proteininin sindirilebilirliği yüksektir. Metionin ve lizin başta olmak üzere diğer elzem amino asitleri de içermektedir. Bu özelliklerinden dolayı balık eti yüksek biyoyararlanıma sahiptir (Tacon & M. Metian, 2013).

Balıklar yağ içeriğine göre 4 grupta incelenmektedir: yağsız balıklar (yağ içeriği <%2): mezgit, kömür balığı; düşük yağlı balıklar (yağ içeriği %2-4): dil balığı, pisi balığı, kızıl kaya balığı; orta yağlı balıklar (yağ içeriği %4-8): doğal salmon; yüksek yağlı balıklar (yağ içeriği %8-20): sardalya, uskumru, kültür salmonu (Ackman, 1994). Balık, özellikle uzun zincirli çoklu doymamış n-3 yağ asitleri olan eikosapentaenoik asit (C_{20:5} n-3 EPA) ve dokosaheksaenoik asit (C_{22:6} n-3, DHA) açısından önemli bir kaynaktır. Beslenmede n-6 ve n-3 yağ asitlerinin oranı inflamatuvarı önlemek için oldukça önemlidir. Diyetle alınan uzun zincirli çoklu doymamış n-6 yağ asidi olan linoleik asit (C_{18:2} n-6 LA) organizmada araşidonik aside (C_{20:4} n-6 AA) dönüşmektedir. AA, inflamatuvara neden olan prostaglandin-2, tromboksan-2 ve lökotrien-4 serilerinin artışına neden olur. EPA'dan sentezlenen prostaglandin-3, tromboksan-3 ve lökotrien-5 serilerinin ise oluşan bu inflamatuvarı önleyici etkisi vardır (Grosso et al., 2014). Paleolitik çağda n-6/n-3 oranı 1:1 iken, günümüzde batı tipi beslenme nedeniyle bu oran 20:1'e kadar çıkmaktadır. Yağ asitlerinden n-6/n-3 oranının artışı, inflamasyonla ilgili olan kardiyovasküler hastalıklar, obezite, diyabet gibi sağlık sorunlarının artışına da neden olmaktadır (Simopoulos, 2016).

Balık mikro besin öğeleri açısından zengin bir besindir. Bununla birlikte mikro besin ögesi kompozisyonu balığın tür ve beslenmesine göre farklılıklar göstermektedir. Yağlı balıkların A vitamini (retinol) ve D vitamini içeriği yüksektir. Yağda çözünen diğer bir vitamin olan E vitamini (tokoferol) balıklarda yüksek miktarda bulunmasına rağmen büyük bir bölümü yağların oksidasyonunu önlemek amacıyla kullanıldığı için balık tüketimiyle alınan E vitamini miktarı düşüktür (Ariño, Beltrán, Herrera, & Roncalés, 2013).

Balıketi B₁ (tiyamin), B₂ (riboflavin), B₃ (niasin), B₆ (pidoksin) ve özellikle B₁₂ (kobalamin) vitaminleri açısından zengin bir kaynaktır (Gil & Gil, 2015).

Mineral bakımından da zengin olan balıketi fosfor, selenyum, potasyum, iyot, çinko, demir ve magnezyum içeriği açısından önemli bir besindir (Ariño et al., 2013). Bütün halde konserve edilen balıkların tüketimi ise günlük kalsiyum alımına önemli katkılar sağlamaktadır. Taze balığın sodyum içeriği düşüktür ancak tütsüleme, salamura ve surimi (kıyma haline getirilen balık fileto ların önce suyla sonra da tuzlu suyla yıkanarak şekil verilip pişirilmesiyle elde edilir) gibi işlemler balığın sodyum içeriğini artırmaktadır (Alasalvar, 2011).

Ulusal Gıda Kompozisyonu Veri Tabanı'nda (TürKomp) yer alan balık türlerinin enerji, makro ve mikro besin ögesi kompozisyonu Tablo 1'de verilmiştir (TürKomp, 2014).

Dünya'da 2 milyar bireyde (özellikle doğurganlık çağı ve laktasyon dönemindeki kadınlar, çocuklar) demir, iyot, A vitamini ve çinko gibi mikro besin öğelerinin yetersizliği görüldüğü bildirilmektedir (Tacon & Metian, 2013). Balık mikro besin öğeleri yetersizliklerini önlemede kullanılabilir uygun bir besindir.

Balıkta bulunan besin öğelerinin biyoyararlılığını etkileyen bazı faktörler (kültür, alışkanlıklar, balığın yanlış pişirilmesi vb.) vardır. Örneğin bazı ülkelerde balığın alkol ile birlikte tüketilmesi bu biyoyararlılığı olumsuz yönde etkileyen faktörler arasındadır. Alkolün hem besin ögesi emilimini hem de diyet kalitesini olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir (Schroeder & Higgins, 2016). Bu durum uzun dönemde besin öğeleri eksikliklerine bağlı klinik bulguların ortaya çıkmasına neden olacaktır. Özellikle folat, demir, B₁₂ ve B₆ vitamininin yetersizliğine bağlı anemi görülebilmektedir (Halsted & Medici, 2013). Ayrıca alkol bireyin yalnızca beden sağlığını değil aynı zamanda zihin sağlığını ve sosyal çevresini de etkileyerek yaşam kalitesini olumsuz etkileyebilmektedir.

Bu derleme bireyin tamamlayıcı besin alımına başlamasından itibaren yaşamın her döneminde pek çok makro ve mikro besin ögesini bünyesinde bulunduran balık tüketimin insan beslenmesindeki önemi ve sağlık üzerine etkisi irdelenecektir.

Gebelik Döneminde Balık Tüketimi

Gebelik dönemi kadın sağlığı için hassas bir süreçtir. Bu dönemde yeterli ve dengeli beslenme

anne ve fetüs sağlığı açısından oldukça önemlidir. Fetüsün büyüme ve gelişmesi annenin beslenmesine bağlıdır. Gebelik döneminde bireyin yeterli enerji, karbonhidrat, protein, yağ, posa, vitamin ve mineral alımı önemlidir. Bununla birlikte yapılan çalışmalar spesifik besin öğelerinin fetüs sağlığına etkisini vurgulamaktadır. Bu besin öğelerinden biri de n-3 uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleridir (PUFA). Omega-3 yağ asitleri, özellikle DHA; fetüsün retina ve beyin hücrelerinin yapı taşıdır. Hücre membranının yağ asidi kompozisyonu, gen ekspresyonu ve doku farklılaşması yoluyla çoğu hücrenin stabilitesini, geçirgenliğini ve fonksiyonunu etkilemektedir. Bu nedenle gebelik döneminde yeterli miktarda n-3 yağ asidi alımının bebeğin optimal bilişsel, göz ve beyin gelişimi için önemli olduğu vurgulanmaktadır. Diyetle n-3 PUFA'nın en iyi kaynağı balık ve diğer deniz ürünleridir. Bununla birlikte balıkta bulunan D vitamini, iyot, demir ve kolin gibi mikro besin öğeleri de fetüsün motor ve bilişsel gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Starling, Charlton, McMahon, & Lucas, 2015).

Balık gebelik döneminde ve sonrasında anne ve bebek için bir çok besleyici özelliğe sahiptir ancak her canlı gibi balık ve diğer deniz canlıları da yaşadıkları çevreden bağımsız değildir. Çevrede doğal olarak bulunan veya endüstriyel faaliyet nedeniyle oluşan metaller, poliklorlu bifeniller (PCB), dioksinler, diğer poliklorlu bileşikler bu canlıların bünyesinde birikebilir (Bosch, O'Neill, Sigge, Kerwath, & Hoffman, 2016). Belirli düzeyde organik cıva içeren bazı balık türlerinin fazla tüketiminin fetüs gelişiminde olumsuz etkilere neden olması gebelerde balık tüketiminin dezavantajı olarak değerlendirilebilir (; Dovydaitis, 2008). İnsanlar için en zararlı çevresel cıva formlarından olan metilcıva (MeHg), su ortamında yaşayan anaerobik organizmalar aracılığıyla inorganik cıvadan dönüştürülür (Clarkson & Magos, 2006). MeHg yağda çözünür özelliği ile plasenta bariyerini kolayca geçebildiğinden fetüs için risk oluşturabilmektedir (McKean et al., 2015). Doğum öncesinde annenin balık tüketimiyle küçük miktarlarda MeHg'ya maruziyeti ile doğum sonrası nörogelişim arasında ilişki hakkında belirsizlik olmasına rağmen Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) gebelik sırasında balık tüketiminin özellikle yüksek seviyelerde MeHg içerenlerin sınırlandırılmasını tavsiye etmektedir (Food & Administration, 2004). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tolere edilebilir günlük cıva miktarını 2.5 µg/g olarak önermiştir (Marques et al., 2013).

Gebelik Döneminde Balık Tüketimi Önerileri

Son yıllarda yaşam tarzının değişmesi ile beslenmede de değişiklikler olmuştur. Doymuş hayvansal yağ tüketimi artmış ve doymamış yağ (bitki ve deniz ürünleri yağları) tüketimi ise azalmıştır. Yağ tüketiminin toplam enerji alımına katkısının 6-12 aylık bebeklerde %40 ve 2-3 yaş çocuklarda ise %35-40 olması önerilmektedir. Bununla birlikte doymuş yağın toplam enerji alımına katkısının %10'un altında, trans yağın katkısının ise %1-2'nin altında olması gerektiği vurgulanmaktadır. Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) ve DSÖ, gebelik sırasında n-3 PUFA'nın yeterli alımına ek olarak günlük DHA alımının yaklaşık 100-200 mg kadar artırılmasını tavsiye etmektedir. Ayrıca günlük DHA alımının doğurganlık çağındaki kadınlarda ve gebelerde 200 mg/gün olması tavsiye edilmektedir. Doğurganlık çağındaki kadınların ve gebelerin, yağlı balık ve konserve ton balığını, yüksek seviyede cıva ve diğer kontaminantları içerebileceği için haftada 2 porsiyondan fazla tüketmemeleri önerilmektedir. Balık tüketimi ve alınan kontaminantların sağlık üzerine etkisini inceleyen bir derlemede, yarar-zarar dengesi açısından balık tüketiminin sağlığa olan yararlarının, MeHg, dioksin ve PCB'nin neden olduğu riskten daha fazla olduğu sonucuna varılmışlar (Mozaffarian & Rimm, 2006). FDA balıkları üç gruba ayırmış ve tüketim önerilerinde bulunmuştur (Tablo 2).

ABD'de doğurganlık dönemindeki kadınların yaklaşık %10'unda cıva seviyesi, kanda önerilen değer olan 5.8 µg Hg/L'dan ya da saçta önerilen değer olan 1.2 µg Hg/g'dan daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Mahaffey, Clickner, & Bodurow, 2004). Bazı uzmanlar zararlara karşı maksimum korumayı sağlamak için kanda eşik değeri 3.5 µg Hg/L 'dan daha az olması gerektiğini bildirmektedir (Mahaffey, Clickner, & Jeffries, 2009). MeHg'nin nörotoksik etki göstermesi ve düşük miktarının bile gelişmekte olan beyni etkilemesi nedeniyle, FDA ve Çevre Koruma Ajansı (EPA), gebe kadınların balık tüketimlerini sınırlandırmaları ve daha düşük cıva seviyesine sahip balık türlerini tercih etmeleriyle ilgili öneriler yayınlamıştır. Bu öneriden sonra gebe kadınların ve diğer ABD'li yetişkinlerin daha az balık tükettiği bildirilmektedir. (Oken et al., 2003).

Fetüsün beyin gelişimi için elzem olan n-3 yağ asitleri içermesi nedeniyle gebelik döneminde balık tüketimi önemlidir (Koren & Bend, 2010). Gebe-lerin EPA ve DHA ile desteklenmesinin fetüsün bağışıklık sisteminin gelişmesinde etkili olacağı düşünülmektedir. Son çalışmalarda, gebe kadınların balık ve su ürünlerinde bulunan iyot ve n-3 yağ asitlerinin önemini yeterli düzeyde bilmediklerini belirtilmektedir (R. Emmett, Akkersdyk, Yeatman, & Meyer, 2013). Bu durum doğurganlık çağındaki kadınlara gebelikte balık tüketimi ve yararları ile ilgili beslenme eğitiminin verilmesi gerektiğini göstermektedir. 2009-2010 yılları arasında haftada 2 porsiyon balık tüketen Boston bölgesinde yaşayan 22 gebe kadımla yapılan bir çalışmada gebe kadınların 10'u balığın cıva içerebileceğini, 16'sı ise cıvanın tehlikeli olduğunu ve nörolojik gelişimi etkileyebileceğini belirtmiştir. Kadınlar, güvenilir olarak tüketebilecekleri balıkların türü ve ne kadar tüketebilecekleri konularında eğer tavsiye almış olsalardı bu durumda daha fazla balık tüketebileceklerini bildirmişlerdir. (Bloomingdale et al., 2010).

Gebelik sırasında su ürünleri tüketiminin riskleri ve yararları hakkında çeşitli öneriler yayınlanmıştır, fakat su ürünlerinin farklı türlerinin sağlık üzerine etkileri bilinmemektedir. Balık ve kabuklu su ürünlerinin yağ asidi, kimyasal kirletici ve toksin içerikleri farklı olabilmektedir. Dikkate alınmayan bu farklılıklar, balık ve diğer su ürünleri tüketiminin anne ve fetüs sağlığı üzerine etkisinin tam olarak anlaşılmasına neden olmaktadır (Guldner et al., 2007).

Balığın kirleticiler içermesi akla ilk olarak balık yağı desteği kullanımını getirmektedir. Ancak randomize kontrollü çalışmaların yer aldığı sistematik derlemelerde gebelikte besin desteği olarak alınan n-3 PUFA'nın bilişsel gelişim, doğum ağırlığı, gestasyonel diyabet ve preeklampsi üzerine çok az etkisinin olduğu ya da hiç etkisinin olmadığını göstermektedir. Ancak n-3 desteğinin gebelik süresini uzatmada ve prematüre doğum riskini azaltmada yararlı olduğu bildirilmektedir (Ho et al., 2016).

Table 1. Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı'nda (TürKomp) yer alan balık türlerinin yaklaşık 1 porsiyonunun (150 g) enerji, makro ve mikro besin öğeleri kompozisyonu (TürKomp, 2014)

Table 1. Energy, macro and micro nutrients compositions of fish species (1 portion, 150 g) in the National Food Composition Database (TürKomp, 2014)

Enerji, makro ve mikro besin öğeleri	Enerji (kkal)	Protein (g)	Yağ (g)	EPA (g)	DHA (g)	B ₆ vitamini (mg)	B ₁₂ vitamini (mcg)	Retinol (mcg)	D-3 vitamini (mcg)	Fosfor (mg)	Kalsiyum (mg)	Çinko (mg)	Selenyum (mcg)	Demir (mg)	İyot (mcg)
Alabalık (Gökkuşluğu, yetiştirme)	182	28.17	7.69	0.209	0.724	0.527	6.02	46	7.2	459	41	1.78	25.6	1.08	19.65
Çipura (yetiştirme)	195	28.59	8.97	0.327	0.370	0.767	4.37	39	38.9	402	36	0.55	19.8	0.37	17.21
Levrek (yetiştirme)	192	29.22	8.33	0.375	0.714	0.607	5.60	119	5.7	324	55	0.81	20.5	0.47	14.91
Palamut	324	30.25	22.60	1.525	3.832	0.550	6.31	54	22.0	350	23	0.74	58.8	1.50	50.55
İstavrit	234	27.93	13.61	0.780	1.829	0.712	11.08	86	19.4	368	158	2.15	46.8	1.23	38.94
Hamsi	296	25.42	21.54	2.574	3.214	0.248	7.25	51	11.7	340	117	2.83	39.6	1.47	16.02
Hamsi, (konserve, ayçiçek yağında)	245	28.31	14.61	0.092	0.170	0.260	3.20	2	2.4	724	822	4.28	70.0	4.11	-
Zargana	188	30.37	7.39	0.334	1.474	0.355	5.17	49	8.7	368	123	2.80	31.2	0.97	24.56
Lüfer	323	26.39	24.16	1.064	2.507	0.682	3.76	72	7.4	294	51	1.17	43.2	0.88	37.83
Barbun	222	25.69	13.30	0.744	0.658	0.605	8.27	31	5.4	332	183	0.89	49.9	1.31	62.83
Kalkan	136	24.67	4.14	0.213	0.607	0.304	2.55	20	2.2	362	47	2.09	56.6	1.38	45.11
Mezgit	105	22.90	1.46	0.062	0.211	0.380	1.96	26	1.9	241	91	0.61	35.1	0.72	29.25
Kefal (sarı kulak)	156	28.55	4.61	0.287	0.281	0.778	5.31	27	1.9	325	27	0.73	21.1	1.75	120.76
Kefal pasifik (Rus kefali)	121	27.79	1.09	0.050	0.043	0.624	5.89	21	-	311	217	7.28	22.4	3.73	44.47
Sardalya (konserve, ayçiçeği yağı)	262	31.03	15.33	0.379	0.886	0.271	2.55	0	5.2	670	809	3.16	71.3	3.91	-
Ton balığı (konserve, ayçiçek yağı)	260	31.22	15.03	0.034	0.070	0.022	2.82	0	1.7	270	15	0.70	65.8	1.65	-

Tablo 2. FDA'in doğurganlık çağındaki ve gebe kadınlar için balık tüketim önerileri (FDA, 2017)

Table 2. Advices of FDA about fish consumption for child-bearing and pregnant women (FDA, 2017)

Haftada 2-3 porsiyon* tüketilebilen bazı balık türleri
Hamsi, Atlantik Uskumru, Deniz Levreği, Mezgit, Morina, Berlam, Pisi Balığı, Sardalya, Tirsi, Kefal, Kolyos, Tatlı Su Levreği, Dil Balığı, Salmon, Vatoz, Dil Balığı, Tilapia, Alabalık, Bakalyaro
Haftada 1 porsiyon* tüketilebilen bazı balık türleri
Orfoz, Lagos, Mercan, Ton Balığı
Cıva içeriği çok yüksek olan ve tüketilmesi önerilmeyen balık türleri
Ceylan, Köpek Balığı, Kılıç Balığı, İrigöz Ton Balığı
*1 porsiyonun yaklaşık 114 g olduğu belirtilmiştir.

Laktasyon Döneminde Balık Tüketimi

Kendi fizyolojik gereksinimlerini karşılamak, vücuttaki besin depolarını dengede tutmak ve anne sütü için gereken enerji ve besin öğelerini karşılamak, emziren annenin beslenmesinin temelini oluşturmaktadır. Emziliklik döneminde anne sütünün besin ögesi kompozisyonu, annenin beslenmesinden etkilenmektedir (Elmacioğlu, 2008).

Anne Sütünün n-3 PUFA Açısından Önemi

Anne sütü, yaşamın ilk döneminde bebeğin büyüme ve gelişmesi için gerekli enerji ve besin öğelerini içermektedir. Bebeğin görme keskinliğini ve zeka düzeyini artıran DHA'nın en iyi kaynağı anne sütüdür (Quinn & Kuzawa, 2012). Anne sütünün DHA düzeyi annenin beslenmesine bağlı olarak değişkenlik göstermekte olup toplam yağ asidinin %0.1-1'ini oluşturduğu bildirilmektedir (Brenna et al., 2007). Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde güçlü bir kanıt olmamasına rağmen anne sütünün DHA içeriğinin en az %0.3 olması gerektiği vurgulanmaktadır (Jackson & Harris, 2016).

Danimarka Ulusal Doğum Kohortu verilerinin % 30'u değerlendirilerek, gebelik döneminin 6.-12. haftalarında ilk doktor kontrolü yapılmış kadınlar balık tüketimlerine göre üç gruba ayrılmıştır: 0 g/hafta, 1-2 porsiyon/hafta (1-340 g/hafta) ve ≥ 3 porsiyon/hafta (>340 g/hafta). Kadınlar tarafından en sık tüketilen balıklar morina, yaldızlı pisi

balığı, somon, ringa ve orkinos olarak belirlenmiş (Danimarka Besin İzleme Programı'na göre bu türlerin ortalama cıva içeriği 0.034 ppm ile 0.049 ppm arasındadır.). Çalışma popülasyonunda toplam tüketilen su ürünlerinin %85'ini bu balık türleri oluşturmaktadır. Daha fazla balık tüketen annelerin bebeklerinin doğum ağırlığı daha yüksek bulunmuş ve bu anneler bebeklerini daha uzun süre emzirmiştir. Çocukların motor, sosyal ya da bilişsel ve toplam gelişim puanları da annenin balık tüketimine göre değişmiştir. Daha az balık tüketen annelerin bebekleriyle karşılaştırıldığında, fazla balık tüketen annelerin bebeklerinin 18. aydaki gelişim puanlarının daha yüksek olduğu bulunmuştur (Oken et al., 2008).

Doğum sonrası depresyon anne sağlığı ve çocuğun bilişsel ve duygusal gelişimi üzerine olumsuz etkilere neden olabilmektedir. PUFA alımının depresyon üzerine yararlı etkilere sahip olduğu düşünülmektedir. Hibbeln tarafından yapılan bir çapraz ulusal ekolojik çalışmada doğum sonrası depresyon prevalansının, anne sütündeki DHA içeriği ve su ürünleri tüketimiyle negatif ilişkili olduğu gösterilmiştir (Strøm, Mortensen, Halldorsson, Thorsdottir, & Olsen, 2009).

Laktasyon Döneminde Balık Tüketim Önerileri

Bebeğin optimal büyüme ve gelişmesi için laktasyon döneminde annenin haftada 1-2 porsiyon yağlı balık tüketmesinin yeterli miktarda DHA ve EPA sağlayacağı belirtilmektedir (McCann & Ames, 2005). Gebelikte olduğu gibi cıva içeriği yüksek olan kral uskumru, kılıç balığı, köpek balığı ve derin deniz balıklarının tüketilmemesi önerilmektedir (Carlson, 2009).

Çocuklarda Balık Tüketimi

Beslenmenin bir çocuğun sağlığı için gerekli olan makro ve mikro besinleri, vitaminleri ve mineraleri tam ve düzenli olarak sağlamada etkisi büyüktür (Nyankovskyy et al., 2014). Bebeklerde balığın, tamamlayıcı besin olarak 6. aydan sonra, buharda veya fırında pişirilip ayıklanarak çorba, sebze püresi vb. diğer tamamlayıcı besinlerin içine ilave edilerek haftada bir kez verilmesi önerilmektedir.

Türkiye'ye Özgü Beslenme Rehberi'ne göre balık için bir porsiyon miktarı 150 gramdır (TÖBR, 2015). Türkiye Beslenme Rehberi (TÜBER)'nde çocuk ve adolesanlara önerilen balık tüketim porsiyonları Tablo 3'te verilmiştir.

Balık, n-3 PUFA'nın en önemli besin kaynağıdır. Avrupa ülkelerinde yapılmış iki çalışmada, diyetle tüketilen balıktaki n-3 PUFA alımı ile çocuklukta bilişsel düzey ve davranış arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. 584 çocuğun katıldığı bu çalışmalarda balık tüketimi besin tüketim sıklığı ile belirlenmiş ve nörofizyolojik gelişim de nörofizyolojik testler ile değerlendirilmiştir. Herhangi bir nörofizyolojik test ile DHA veya EPA alımı arasında bir ilişki bulunamamıştır. Yağlı balık dahil haftada 2 kez balık tüketen çocukların bilişsel düzeylerinde hiçbir farklılık gözlenmemiştir. Bununla birlikte yağlı balık tüketimiyle sosyal problemler, dikkat problemleri, kurallara uymama problemleri ve agresif davranış problemleri arasında negatif bir ilişki bulunmuştur. Haftada, 1'i yağlı balık olmak üzere 2 kez balık tüketenlerin, hiç tüketmeyenlere göre daha az duygusal ve davranışsal sorun gösterme eğiliminde olduğu bildirilmiştir (Gispert-Llaurado et al., 2016).

Tablo 3. TÜBER'e göre çocuk ve adolesanlarda önerilen balık tüketim porsiyonları

Table 3. Fish consumption recommendations for children and adolescents according to TÜBER

Yaş Grubu	Kız - Erkek (porsiyon/hafta)
2-3 yaş	$\frac{2}{3}$ - 1
4-6 yaş	1-1 $\frac{1}{2}$
7-10 yaş	1 $\frac{1}{2}$ - 2
11-14 yaş	2
15-18 yaş	2

Beslenme alışkanlıkları özellikle çocukların büyüme ve gelişme döneminde çok önemlidir. Çünkü fiziksel ve zihinsel gelişim yaşamın bu döneminde olmaktadır (Arechavala et al., 2016). Çocukluk ve ergenlik döneminde kazanılan alışkanlıklar hayatın diğer aşamalarını da etkilemektedir. (Wang, Bentley, Zhai, & Popkin, 2002).

Umman'da yaşayan çocuklarda balık tüketimi veya balık yağı desteği öncesi ve sonrasındaki yağda çözünebilen besin öğelerinin araştırıldığı bir çalışmada randomize seçilen 3 okuldan 9 ve 10 yaşlarındaki 314 çocuk alınmıştır. Bu okullar deneme grubu olarak balık, balık yağı ve kontrol grubu olarak ayrılmıştır. Balık grubundaki çocuklara okul günlerinde öğle yemeklerinde 12 hafta boyunca 100 g bazı sebzelerle hafif ızgara yapılmış yağlı balık, balık yağı grubundakilere 403 mg DHA ve 53 mg EPA içeren balık yağı kapsülü, kontrol grubuna ise alışılmış her zamanki

besinler verilmiştir. Balık ve balık yağı gruplarında uygulama sonrası serum D vitamini düzeyleri, kontrollere kıyasla yükselmiştir. Umman okul çocuklarında D vitamini eksikliğinin yaygın olduğu fakat bu durumun omega-3 yağ asidi takviyesiyle hafifletilebileceği bildirilmiştir (Al-Ghannami et al., 2016).

Çocukluk ve Adolesan Dönemde Balık Tüketiminin Sağlık Üzerine Etkileri

Ana yemeğin bir bölümünün balık olarak tüketilmesinin genel olarak sağlık üzerinde olumlu etkisinin olduğu düşünülmektedir (Mozaffarian & Rimm, 2006). Bu nedenle Avrupa Halk Sağlığı Kurumu haftada tüketilen tüm ana yemeklerden 2 ya da 3'ünün balık olarak tercih edilmesini tavsiye etmektedir (Altintzoglou et al., 2015). Bununla birlikte pek çok ülkede balık tüketimi yeterli düzeyde değildir (FAO, 2009). Çocuklarda balık ve su ürünlerini tüketmeme nedenlerini tartışan ve onları balık tüketimi konusunda teşvik etmeyi amaçlayan çalışmalar bulunmaktadır (Altintzoglou et al., 2010).

Aileler, çocuklarının balığı sevmeme gibi bazı nedenlerin balık tüketimine engel olduğunu ve bu durumun aile içinde çatışmalarla sonuçlandığını bildirmiştir. Sıklıkla çocuklara tek ana yemek seçeneği servis edilmektedir. Bununla birlikte çocuklara, balığın dahil olduğu 2 çeşit yemek arasından seçim yapma hakkı verildiğinde balığı tercih etme eğilimlerinin artırılabilirliği düşünülmektedir.

Çocuklarda besin seçim imkanının balık tüketimini sevme üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 1.gruptaki (n=76) çocuklara seçme imkanı verilmeden morina ya da salmon içeren balık tabağı sunulmuştur. Diğer gruba ise (n=55) morina ve salmon arasında seçme imkanı verilerek balık tabağı hazırlanmıştır. Sonuç olarak hangi balığı tüketeceğiyle ilgili seçme imkanı verilen çocukların balık tüketimini sevme değerlendirmelerinin pozitif yönde olduğu görülmüştür (Altintzoglou et al., 2015).

Çocuklarda balığa ve kabuklu su ürünlerine karşı başlangıç reaksiyonları 4 ve 6 yaşlarında oluşmaktadır (Ben-Shoshan et al., 2010). Ancak su ürünleri kökenli allerjiler bütün su ürünleri kapsamayıp bir ürüne olan allerji diğerlerine de kapsamayabilir. Uygun şartlarda depolanmayan bazı balıklarda (uskumru, orkinoz vb.) bakteriyel ve enzimatik faaliyetler sonucu üretilen histamine gibi bazı aminler belirli konsantrasyonun üzerinde alındığı takdirde tüketicide allerjik reaksiyona

neden olur. Bu allerji geçici olup süreklilik göstermez. Ancak kişi belli başlı bazı balık türlerine karşı allerjik iken diğer su ürünlerine karşı allerji olmayabilir. Bu durumda en sağlıklı yapılacak iş allerji testi yapılarak bireyin hangi tür balığa karşı allerji olduğunun ortaya konmasıdır. Böylece birey allerji olmadığı diğer balık türlerini rahatlıkla tüketebilir.

Bebeklik ve çocukluk döneminde alerjenlere duyarlılık, alerji ve astım benzeri immün işlev bozukluklarına rağmen erken dönem balık ve n-3 PUFA tüketiminin koruyucu etkisi olduğuna dair bazı kanıtlar bulunmaktadır. Özellikle bebekler ve 2 yaşından küçük çocuklarda günlük DHA alımının 100 mg olması önerilmektedir. Balık yağı takviyesi çalışmaları bebeklik ve erken çocukluk döneminde görme keskinliği ve bilişsel fonksiyon arasında anlamlı pozitif bir korelasyon göstermesine rağmen bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Çocuklardaki dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozuklukları ile ilgili PUFA'nın etkileri henüz net olmayıp mevcut kanıtlar yetersizdir (Kremmyda, Tvřzicka, Stankova, & Zak, 2011).

Yapılan bir çalışmada diyetle alınan D vitamini, n-3, n-6 yağ asitleri ve balık tüketimiyle 8-16 yaşlar arasında ortaya çıkan allerjik rinit (AR) ve allerjik olmayan rinit arasındaki potansiyel ilişkilerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır (Magnusson et al., 2015). Rinit, çocuklukta en yaygın hastalıklardan biridir. Balık, PUFA ve D vitamini alımlarının allerjik hastalıkları etkilediği varsayılmıştır. Bununla birlikte rinitin gelişimiyle bunların bağlantılı olup olmadığı da tam olarak belli değildir. Doğumlarından itibaren 1970 katılımcı bu çalışmaya alınmıştır. Diyet alımıyla ilgili veriler, 8 yaşa kadarki besin sıklığı anketleriyle elde edilmiştir. Rinit tanımı anketlere ve IgE ölçümlerine dayandırılmıştır. Çalışmanın sonunda rinit semptomları prevalansı 8 yaşta % 19 olarak tespit edilmiştir. Düzenli olarak yağlı balık alımının ve n-3 PUFA alımının allerjik olmayan rinitin daha az görülmesi ile ilişkili olduğu ve 8-16 yaşları arasında düzenli yağlı balık tüketimi ve diyetle uzun zincirli n-3 alımının özellikle allerjik olmayan rinit olmak üzere rinit riskini azalttığı bulunmuştur (Magnusson et al., 2015).

Mısırın Nil deltasında yaşayan ve farklı yaşam tarzına sahip 3 topluluk üzerine yapılan bir çalışmada anneler bebeklerini 1. yaştan itibaren balık ile beslemeye başlamaktadır ve bebeklerin balıkla beslenmesinin onların hızlı gelişimini sağladığını düşünmektedirler. Bazı anneler ise

çocuklarının balık kılıçından boğulma öyküleri nedeniyle balık yemeyi reddettiklerinden yakınmışlardır (Eltholth et al., 2015).

Balık tüketiminin kardiyovasküler hastalık riskini azalttığına dair pek çok çalışma bulunmaktadır. Yaşları 9-11 arasında değişen 100 çocukla yapılan bir araştırmada balık tüketen çocuklarda lipid profillerinin kalp damar hastalıklarına karşı koruyucu şekilde oluştuğu gözlenmiştir (Gump et al., 2012).

MeHg'ye maruz kalma önemli bir sağlık sorunudur. Cıva, doğada yaygın olarak bulunan bir kirleticidir ve çeşitli formları mevcuttur. Cıvanın özellikle metillenmiş formu olan MeHg insanlarda nörotoksosite ile ilişkili olup fetüs ve çocuklar üzerinde çok ciddi olumsuz etkileri mevcuttur (Dong et al., 2015). MeHg'nin kaynağı çoğunlukla sucul ortamdır. Kontamine olmuş balık tüketimi, insanların MeHg'ye maruz kalmalarının başlıca çevresel kaynağıdır. Toksik etkilere karşı hassas gruplar içerisinde çocuklar, gebeler ve yaşlılar yer almaktadır. Esas endişe ise yaşamın erken döneminde düşük düzeyde MeHg'ye maruz kalınmasının, kişinin nöro gelişimini olumsuz yönde etkilemesidir. Bundan dolayı gebelerin, çocukların ve doğurganlık çağındaki kadınların mümkün olduğunca MeHg etkisinden korunmaları gelecek neslin sağlığı açısından önem arz etmektedir.

Oklahoma'da yapılan bir çalışmada geçimlerini tatlı su kaynaklarından sağlayan, kırsalda yaşayan düşük gelirli toplumların balık tüketimleri ve MeHg'ye maruz kalmaları arasındaki ilişki incelenmiştir. Buna göre katılımcıların % 35'i ayda 2-3 kez, % 29'u haftada 1 kez, % 20'si ise haftada en az 2-3 kez balık tüketmiştir. Katılımcıların %4'ünün saçlarındaki ortalama cıva düzeyi, ABD'nin doğurganlık çağındaki kadınlar ve çocuklar için önerdiği Çevre Kirliliği Kurumu (EPA) rehberinin belirttiği limitler üzerinde bulunmuştur. (Dong et al., 2015).

Bir başka toksik metal olan kadmiyum (Cd) ise dünya genelinde yaygın çevresel bir kirleticidir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre tolere edilebilir Cd miktarı 7 µg/kg vücut ağırlığı/haftadır. Kadmiyum kabuklu deniz hayvanlarında, sakatatta, bazı tohumlarda ve yabani mantarlarda yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır.

Yetişkinlik ve Yaşlılık Döneminde Balık Tüketimi

Yetişkinlik ve yaşlılık döneminde balık tüketimi ile kardiyovasküler hastalıklar, metabolik sendrom, kanser, depresyon, uyku kalitesi gibi konular arasındaki ilişkinin araştırıldığı görülmektedir.

Kardiyovasküler Hastalıklar (KVH)

Balık tüketiminin kalp sağlığı üzerine olumlu etkisi ilk kez balık tüketimi fazla olan Eskimolarda gözlenmiştir. Daha sonra yapılan büyük epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen veriler haftada 1-2 porsiyon balık tüketiminin günlük yaklaşık 250-500 mg EPA ve DHA sağladığı ve KVH riskini %20-30 azalttığını göstermektedir (Costa, 2007). Bir meta-analizde balık tüketiminin kalp yetmezliği riskini %15 azalttığı sonucuna varılmıştır (Djousse, Akinkuolie, Wu, Ding, & Gaziano, 2012).

Endotel yapının işlevselliğini yeterince yerine getirememesi KVH'ın gelişiminde önemli bir faktördür. Sigara kullanımı, obezite, dislipidemi, hipertansiyon ve tip 2 diyabetin endotel yapının işlevselliğini yitirme riskini artırdığı, buna karşın uzun zincirli çoklu doymamış omega-3 (n-3 PUFA) desteğinin ise lipid metabolizmasını iyileştirerek riski azalttığı belirtilmektedir (Kondo et al., 2014). Balıkta bulunan besin öğelerinin özellikle de n-3 yağ asitlerinin damar direnci, kan basıncı, inflamasyon ve serum lipitlerine etki ederek kalp sağlığını koruduğu vurgulanmaktadır (Galli & Rise, 2009;).

Balık tüketimi ve kalp sağlığıyla ilgili yapılan 17 çalışmayı içeren bir meta-analizde haftada 2-4 porsiyon balık tüketiminin KVH'tan ölüm riskini önlemede haftada 1 porsiyon balık tüketimine göre daha etkili olduğu bulunmuştur. Haftada 5 porsiyondan fazla balık tüketiminin ise riski önlemede etkisinin daha zayıf olduğu, bunun nedeninin ise balığın MeHg içeriğinin olabileceği belirtilmektedir (Zheng et al., 2012).

MeHg balıkta proteine bağlı olarak bulunur. Balığa uygulanan hazırlama ve pişirme işlemleri MeHg içeriğini azaltmamaktadır. Organizmada MeHg kolayca emilebilmekte kan, beyin, ayak tırnağı ve saçta birikmektedir (Clarkson, 2002; NRC, 2000). Cıvanın serbest radikal oluşumuna neden olduğu, glutatyonun antioksidan etkisini önlediği ve lipid peroksidasyonunu artırdığı için kardiyovasküler hastalıklar açısından risk oluşturduğu düşünülmektedir (Virtanen, Rissanen, Voutilainen, & Tuomainen, 2007). Çoğu balıkta

cıva içeriği 0.5 mg/kg'dan düşüktür ancak bazı türdeki büyük ve yaşlı balıklarda (köpek balığı, turna balığı, kılıç balığı, ton balığı gibi) bu düzey 1 mg/kg'a kadar çıkabilmektedir (NRC, 2000).

Metabolik sendrom

Metabolik sendrom, abdominal obezite, dislipidemi, hiperglisemi ve hipertansiyon gibi metabolik anormalliklerin birlikte görüldüğü sağlık sorunudur (Alberti, Zimmet, Shaw, & Group, 2005), kardiyovasküler hastalık riskini 2 kat, tip 2 diyabet riskini ise 5 kat artırmaktadır (Cornier et al., 2008). Yapılan çalışmalar balık tüketen bireylerde tüketmeyenlere göre metabolik sendrom riskinin daha düşük olduğunu göstermektedir (Kouki et al., 2011; Ruidavets et al., 2007;). Ancak balık tüketimi ve metabolik sendrom arasında herhangi bir ilişki bulmayan araştırmalar da vardır (Lai et al., 2013; Pasalic et al., 2011).

Avrupa Kanser Araştırma Çalışması (EPIC)'nda balık tüketiminin bel çevresinde azalma sağlamadığı bulunmuştur (Jakobsen et al., 2012). Ancak randomize kontrollü bir çalışmada 8 hafta boyunca balık tüketen (haftada 3 kez 150 gram yağlı/yağsız balık) veya balık yağı kapsülü kullanan erkek bireylerin bel çevresinde anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir (Thorsdottir et al., 2007). Benzer şekilde metabolik sendromlu 273 bireyde yapılan çalışmada günde 100 g yağsız balık tüketiminin 8 hafta sonunda bel çevresi ve diastolik kan basıncında anlamlı bir azalma sağladığı bulunmuştur (Vazquez et al., 2014).

EPA ve DHA'nın metabolik sendroma karşı koruyucu etkisi olduğu bildirilmektedir (Noel, Newby, Ordovas, & Tucker, 2010). EPA ve DHA'nın yanı sıra balıkta bulunan D vitamini, kalsiyum ve yüksek kalitede proteinin de metabolik sendromu önlemede rolü olabileceği düşünülmektedir (Liu et al., 2005). Bu konuda özellikle balık proteininin yararlı etkileri üzerinde durulmaktadır. Balık proteinin diğer hayvansal proteinlere göre daha kolay sindirilebildiği, elzem aminoasitlerce zengin olduğu ve tokluk hissi sağladığı belirtilmektedir (El Khoury & Anderson, 2013). Hayvan çalışmaları balık proteininin hiperlipidemi ve hiperglisemi üzerine olumlu etkilerinin olabileceğini desteklemektedir (Madani, Louchami, Sener, Malaisse, & Ait Yahia, 2012).

Kanser

Balıkta bulunan n-3 PUFA'nın kanser oluşumunu ve gelişimini önlediğine dair bazı kanıtlar bulunmaktadır (Stephenson et al., 2013). Yağlı

balıklarda bulunan D vitamininin meme, prostat, kolorektum ve over kanserine karşı koruyucu olduğu düşünülmektedir (Garland et al., 2006). Amerika Kanser Araştırma Enstitüsü (AIRC) güçlü bir kanıt olmamakla birlikte balık tüketiminin karaciğer kanserine karşı koruyucu olabileceğini bildirmiştir. AIRC, balık yağının kapsül olarak kullanılmasından ziyade balık tüketimini önermektedir (AIRC, 2015).

Balık tüketimi ve kanserle ilgili çelişkili sonuçların çıktığı çalışmalar da bulunmaktadır. 22.494 kadın bireyin yer aldığı VİTAL çalışmasında (VITamins and Lifestyle) balık tüketimi veya besin desteği ile alınan EPA ve DHA'nın hafif şişman ve obez kadınlarda endometriyal (rahim kanseri) kanser riskini artırdığı, normal vücut ağırlığına sahip kadınlarda ise riski azalttığı sonucuna varılmıştır (Brasky, Neuhaus, Cohn, & White, 2014). Deniz ürünleri tüketimi ve prostat kanser gelişimi arasındaki ilişkinin incelendiği bir meta-analizde 31 çalışmanın 17'sinde herhangi bir ilişki bulunmazken, 6'sında riskin azaldığı, 2'sinde ise riskin arttığı gösterilmiş, geriye kalanlarda ise net bir sonuç elde edilmemiştir (Lovegrove et al., 2015).

Balık tüketimi ve kanser riski arasında ilişkiyi incelerken hazırlama ve pişirme işlemlerinin de önemli olduğu anlaşılmaktadır. Balığın yüksek sıcaklıkta pişirilmesiyle oluşan heterosiklik aminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) deney hayvanlarında kansere neden olduğu gösterilmiştir, bu bileşiklerin insanlar için de zararlı olabileceği vurgulanmıştır (Sugimura, Wakabayashi, Nakagama, & Nagao, 2004). Benzer şekilde epidemiyolojik çalışmalar da yüksek miktarda dumanlanmış ve tuzlanmış balık tüketiminin kolorektal kanser riskini artırdığını göstermiştir (Chiu et al., 2003).

Balık tüketimi ve kanser riski değerlendirilirken ele alınması gereken bir diğer önemli konu çevre kirliliğinin neden olduğu dioksin ve dioksin benzeri bileşiklerdir. Bu bileşiklerin kanser riskini artırdığı, endokrin bozucu, nörotoksik, immunotoksik gibi yan etkilerinin olduğu vurgulanmaktadır. Bu bileşikler lipofilik olup özellikle somon ve ringa gibi yağlı balıklarda bulunmaktadır (Charnley & Doull, 2005). 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-para-dioksin, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından "insanlar için karsinojen" grubuna dâhil edilmiştir (IARC, 2012).

Kanser riskini araştırırken tek bir besinden ziyade toplamda diyet ve yaşam biçiminin göz önüne alınması gerekmektedir (Engeset, Andersen, Hjartaker, & Lund, 2007).

Depresyon

Genetik ve biyolojik risklerin yanı sıra sağlıklı beslenme gibi çevresel faktörlerin de psikiyatrik hastalıklara neden olduğu belirtilmektedir. Yapılan araştırmalar özellikle balık tüketimi ve depresyon arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Balık tüketimi ve depresyon görülme riski arasında negatif ilişkinin olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Li, Liu, & Zhang, 2016; Timonen et al., 2004). Klinik çalışmalarda psikolojik stres gözlemlenen bireylerin plazma ve alyuvar hücre zarının n-3 PUFA içeriğinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Lucas, Dewailly, Blanchet, Gingras, & Holub 2009).

Omega-3 PUFA, nörotransmitterlerin (dopamin, epinefrin, norepinefrin vb.) sentezi, yıkımı, salgılanması, geri alımı vb. gibi biyolojik yollarda görev alır. Nörotransmitterler, duyu ve davranışların düzenlenmesinde görev yapmaktadır. Omega-3 PUFA'nın nöron büyümesi ve varlığını sürdürmesi, beyin hücrelerinin akışkanlığını ve esnekliği, kan akışı ve kan beyin bariyer bütünlüğünü sağlama, nörodejenerasyonu önleme gibi önemli mekanizmalarda rol oynadığı düşünülmektedir (Parletta, Milte, & Meyer, 2013). Omega-3 PUFA'nın antiinflamatuvar özelliğinin de davranışlar üzerinde etkili olduğu belirtilmektedir (Appleton, Rogers, & Ness, 2008). Omega-3 PUFA'nın yanı sıra balıkta yüksek miktarda bulunan tirozinin de depresyonu önlemede yararlı etkilerinin olduğu düşünülmektedir. Tirozin dopamin, epinefrin ve norepinefrinin biyolojik öncüsü olan ve depresyonda yetersizliği belirlenen bir amino asittir (Lang, Beglinger, Schweinfurth, Walter, & Borgwardt, 2015). Tromsø çalışmasından elde edilen sonuçlara göre serum D vitamini düzeyi düşük olan bireylerde depresyon sık görülmektedir (Jorde, Waterloo, Saleh, Haug, & Svartberg, 2006). Bu durum D vitamini kaynağı olan yağlı balık tüketiminin depresyon riskini azalttığına dair bir bulgu olabilir. Amerikan Psikiyatri Birliği (APA) haftada 2 kez balık tüketilmesini önermektedir (Freeman et al., 2006).

Bununla birlikte balık tüketimi/n-3 PUFA alımı ve depresyon arasında herhangi bir ilişki saptanmayan çalışmalar da bulunmaktadır (Albanese et al., 2012). Cochrane derlemesinde n-3 PUFA'nın major depresyon tedavisinde kullanımı için yeterli

kanıtın olmadığı sonucuna varılmıştır (Appleton, Sallis, Perry, Ness, & Churchill, 2016).

Uyku kalitesi

Yağlı balıklarda bulunan EPA ve DHA, bir biyojenik amin olan ve uykunun düzenlenmesini sağlayan serotoninin sekresyonunda önemli rol oynar (Monti, 2011). Ayrıca D vitamininin uykuyu uyandırma döngüsünde yer aldığı bu nedenle balık tüketiminin daha iyi uyku ile ilişkili olduğu belirtilmektedir ve haftada 1-2 kez yağlı balık tüketiminin uyku kalitesini olumlu yönde etkileyeceği bildirilmektedir (Del Brutto et al., 2016).

Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyon (YBMD)

YBMD, 60 yaş üzeri populasyonda en önemli görme kaybı nedenlerindedir (Batioğlu, 2007). Amerika’da yaşlı bireylerde yapılan bir çalışmada haftada iki kez balık tüketiminin YBMD riskini %36 oranında azalttığı gösterilmiştir (Seddon, George, & Rosner, 2006). Benzer şekilde Yaşa Bağlı Göz Hastalıkları Çalışması’nın (AREDS) sonuçları n-3 yağ asidinin YBMD’yi önlediğini desteklemektedir (Sangiovanni et al., 2009). Ancak randomize kontrollü çalışmaların yer aldığı güncel Cochrane derlemesinde diyetle alınan n-3 PUFA’nın YBMD gelişimini önlemediği veya yavaşlatmadığı gösterilmiştir (Lawrenson & Evans, 2015).

Türkiye’de Yetişkin Bireylerin Balık Tüketim Durumu ve Öneriler

Ülkemizin beslenme, sağlık durumu ve sorunlarının araştırıldığı “Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması-2010” (TBSA-2010) verilerine göre 20 yaş ve üzeri yetişkin bireylerin %17.2’sinin haftada 1-2 kez, %14.8’inin ayda 2 kez, %25.6’sının ayda 1 kez balık tükettiği, %39.1’inin ise hiç balık tüketmediği belirlenmiştir (TBSA, 2014).

Türkiye’ye Özgü Besin ve Beslenme Rehberi’nde balığın yüksek omega-3 yağ asidi içeriği nedeniyle haftada en az 2-3 kez (1 porsiyon 150 gram) ızgara, fırın ve buğulama şeklinde pişirilerek tüketilmesi önerilmektedir (TÖBR, 2015).

EPA ve DHA Alım Önerileri

EPA ve DHA alımıyla ilgili her otoritenin farklı önerisi bulunmaktadır. Tablo 4’te bu önerilere yer verilmiştir.

Balık Tüketimi Yarar & Risk Analizi

Balık enerji, protein ve bazı elzem besin öğelerini içermesi nedeniyle sağlıklı beslenmenin önemli bir parçasıdır. Ancak çevresel etmenlerden dolayı balık tüketimi ile ilgili oluşabilecek bazı riskler (özellikle MeHg ve dioksin benzeri bileşikler) yapılan çalışmalarda gösterilmekte, bu durum bireylerde kafa karışıklığına yol açmaktadır. Yarar-risk analizinin iyi değerlendirilip tüketicilerin bilgilendirilmesi oldukça önemlidir. Bu konuda yapılan bir çalışmada haftada 2 porsiyondan fazla (1 porsiyon yaklaşık 150 gram) yağlı balık tüketiminin dioksin benzeri bileşiklere maruziyeti artırdığı ancak MeHg açısından önemli bir sorun oluşturmadığı saptanmıştır (Sioen et al., 2008).

Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), 2010’da yayınladığı raporunda balık tüketiminin ve EPA & DHA alımının koroner kalp hastalık ölüm riskini azalttığına dair güçlü kanıtlar olduğunu, MeHg maruziyetinin ise riski artırdığına dair yeterli kanıt bulunmadığını belirtmektedir. Fazla dioksin maruziyetinin kansere neden olacağı ancak diyetle (balık ve diğer besinler) alınan daha düşük seviyedeki dioksinin kansere neden olduğuna dair yeterli kanıt olmadığı yine FAO tarafından bildirilmektedir (FAO, 2010). EFSA, ülkelerde farklı tür balık tüketildiği için genel bir öneri yapmamaktadır. EFSA, cıva içeriği yüksek balık tüketiminin sınırlandırılması gerektiğini, ayrıca her ülkenin kendi balık tüketimini göz önüne alarak risk değerlendirmesi yapmasını önermektedir (EFSA, 2015).

Balıkla ilgili tüketicileri endişelendiren diğer bir sorun zehirlenme riskidir. Su Ürünleri kökenli toksik enfeksiyonların %30-40’nı histamin zehirlenmesi oluşturur. Histamin zehirlenmesi genellikle vücudunda bol miktarda serbest histidin bulunduran uskumru, ton gibi balıklarda soğuk muhafazanın yeterli yapılmadığı durumlarda ortaya çıkmaktadır. Balığın uygun koşullarda saklanmadığı durumlarda (örneğin; soğuk zincirin kırılması gibi) bakteriyel dekarboksilasyon sonucu bir amino asit olan histidinin histamine dönüşür. Zehirlenmenin belirtileri yüzde kızarıklık, baş ve karın ağrısı ve ishaldir (Feng, Teuber, & Gershwin, 2016). Histamin bakteriler nedeniyle oluşan bir biyolojik amin olmasına rağmen tüketiciler tarafından fark edilememektedir. Yüksek düzeyde histamin içeren bir balık taze gibi görünebilmektedir. Bu nedenle besin güvenliğini sağlamada balıkçılar, işletmeciler, dağıtıcı firmalara ve marketlere büyük görev

düşmektedir (Visciano, Schirone, Tofalo, & Suzzi, 2012). Balıklarda kabul edilebilir histamin limitleri ile ilgili ülkeler arası farklılık olsa da, Avrupa Birliği Komisyonunun histamin ile ilgili (EC) No 2073/2005 sayılı düzenleme ile koymuş olduğu limitler, 23.10.2013 tarihli değişiklik ile bir partiden alınan (n) 9 numunede ortalama (m) 200 mg/kg'nın altında olması ve en fazla 2 numunenin ise (m) 200-(M) 400 mg/kg arası kabul

edilebildiği ve hiçbir numunenin ise 400 mg/kg ve üzeri olamaması istenmektedir. Balık ezme ve soslarında ise histaminin 400 mg/kg altında olması istenmektedir. FDA ise histaminin toksik seviyesini 500 mg/kg olarak kabul etmekte ve histamin ile ilgili yasal sınır 50 mg/kg'ın altındaki değerler kabul edilmektedir.

Tablo 4. Farklı otoritelerin EPA ve DHA alım ve balık tüketim önerileri (Flock, Harris, & Kris-Etherton, 2013; Kris-Etherton, Grieger, & Etherton, 2009)

Table 4. Recommendations of different authorities for EPA and DHA intakes and fish consumption (Flock, Harris, & Kris-Etherton, 2013; P. M. Kris-Etherton, Grieger, & Etherton, 2009)

Kuruluş	Grup	EPA ve DHA Alım Önerileri&Balık Tüketim Önerileri
Amerikan Diyetisyenler Birliği	Yetişkin bireyler	≥500 mg/gün EPA+DHA Haftada 2 porsiyon (1 porsiyon=224 g) yağlı balık tüketimi
Amerikan Kalp Vakfı	Sağlıklı bireyler Koroner kalp hastaları Serum trigliserit düzeyi yüksek hastalar	≥500 mg/gün EPA+DHA (haftada en az 2 gün yağlı balık tüketimi) ~1 g/gün EPA+DHA 2-4 g/gün EPA+DHA
Amerikan Tarım Bakanlığı	Yetişkin bireyler	≥250 mg/gün
Uluslararası Yağ Asitleri ve Lipidler Araştırma Derneği	Yetişkin bireyler Gebe/emzikli kadın	≥500 mg/gün ≥500 mg/gün (DHA alımı: ≥300 mg/gün)
Avrupa Besin Güvenliği Otoritesi	Yetişkin bireyler Gebe/emzikli kadın	≥250 mg/gün ≥250 mg/gün (DHA alımı: 100-200 mg/gün)
Dünya Sağlık Örgütü	Yetişkin bireyler	≥250 mg/gün
Dünya Perinatal Tıp Birliği, Erken Beslenme Akademisi ve Çocuk Sağlığı Vakfı	Gebe/emzikli kadın	≥200 mg/gün DHA

Balık tüketimi sağlık açısından önemlidir ancak temiz olmayan ve endüstriyel kirleticilere maruz kalmış ortamlardan avlanılan balıkların fazla tüketimi nedeniyle organizmaya alınan kurşun, kadmiyum, arsenik ve cıva gibi toksik metaller sağlık açısından risk oluşturabilmektedir. Bu nedenle balıketteindeki metal düzeylerinin takip edilmesi besin güvenliği düzenlemelerine (ve bunun sonucunda tüketicinin korunması) uyumluluğu sağlamak için önemlidir (Bosch et al., 2016).

Sonuç ve Öneriler

Dünya su ürünleri tüketiminin 2016 yılında ortalama kişi başına 20 kg'a ulaştığı bir zamanda Türkiye'deki su ürünleri tüketimi 6.1 kg/kişi (TUIK, 2016) ile dünya ortalamasının çok altında bulunmaktadır. Bu durum göz önünde bulundurularak, balık tüketiminin teşvik edilmesi önem taşımaktadır. Balık diyetin önemli bir parçası olarak görülmeli ve balık tüketiminde dikkat edilmesi gereken konu yarar-risk dengesini gözetmektir. Taze, temiz suların avlanmış balıklar ve izlenebilirliği olan kültür balıklarının tüketimi insan sağlığı açısından bir risk teşkil etmemektedir. Çiğnenmesi ve sindirimi kolay olan balık, katı gıda almaya başlamış bebeklerden yaşlı bireylere kadar toplum bütün kesimlerinin rahatlıkla tüketileceği iyi bir besin olmasının yanı sıra bireylerin beslenmesinde elzem olan iyi kaliteli protein, mineral ve n-3 yağ asitlerini içerir. Düzenli ve yeterli miktarda tüketilen balık aynı zamanda yağda çözünen vitaminlerden A, D, E, K vitamini ve iyot gibi besin öğelerinin alınmasına da katkı sağlamaktadır. Çoğu kuruluş yeterli ve dengeli beslenmenin bir parçası olarak düzenli olarak haftada 2 porsiyon balık tüketimini önermektedir. Yapılan çalışmalar özellikle gebelik ve laktasyon süresince düzenli olarak balık tüketiminin bebeğin görsel ve bilişsel gelişimine önemli katkılarının olduğunu vurgulamaktadır. n-3 yağ asidinin insan sağlığına olumlu etkileri ile ilgili bilimsel kanıtların artmasıyla birlikte balık yağı preparatlarının kullanımı da artmıştır. Ancak balık n-3 yağ asidinin yanı sıra iyi kaliteli protein, vitamin ve mineral kaynağı olduğu için tek başına balık yağı preparatlarını kullanmak yerine balık tüketmek yeterli ve dengeli beslenme açısından daha uygun ve doğrudur. Bu bilgiler ışığında beslenme ve diyet uzmanları topluma balığın beslenme açısından önemini anlatmalı ve bireyleri balık tüketimi için teşvik etmelidir.

Yaşamın her döneminde tüketilebilen bir besin olan balığın metal ve diğer kontaminantları içermesi riski tüketicileri olumsuz etkileyebilmektedir. Bu

nedenle farklı bölgelerde avlanan ve yetiştirilen balık türlerinin metal ve kontaminant içeriği analiz edilmeli, tüketiciler bu konuda bilinçlendirilmelidir.

Kaynaklar

- Ackman, R. G. (1994). Seafood lipids. In Fereidoon Shahidi & J. R. Botta (Eds.), *Seafoods: Chemistry, Processing, Technology and Quality* (1 ed., pp. 34-48). London: Blackie Academic & Professional.
- AIRC. (2015). Fish and Cancer Risk: 4 Things You Need to Know. Retrieved 01.08.2016, from <http://www.airc.org/enews/2015/04-april/enews-fish-and-cancer.html?referrer=https://www.google.com.tr/>
- Al-Ghannami, S.S., Sedlak, E., Hussein, I.S., Min, Y., Al-Shmmkhi, S. M., Al-Oufi, H. S., Al-Mazroui, A., & Ghebremeskel, K. (2016). Lipid-soluble nutrient status of healthy Omani school children before and after intervention with oily fish meal or re-esterified triacylglycerol fish oil. *Nutrition*, 32(1), 73-78. doi: 10.1016/j.nut.2015.07.014
- Alasalvar, C. (2011). *Handbook of seafood quality, safety and health applications*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- Albanese, E., Lombardo, F.L., Dangour, A.D., Guerra, M., Acosta, D., Huang, Y., Jacob, K. S., Llibre Rodriguez Jde, J., Salas, A., Schonborn, C., Sosa, A.L., Williams, J., Prince, M.J., & Ferri, C.P. (2012). No association between fish intake and depression in over 15,000 older adults from seven low and middle income countries--the 10/66 study. *PLoS one*, 7(6), e38879. doi: 10.1371/journal.pone.0038879
- Alberti, K. G., Zimmet, P., Shaw, J., & Group, I. D. F. E. T. F. C. (2005). The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*, 366(9491), 1059-1062. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67402-8
- Altintzoglou, T., Birch Hansen, K., Valsdottir, T., Øyvind Odland, J., Martinsdóttir, E., Brunsvø, K., & Lutén, J. (2010). Translating barriers into potential improvements: The case of new healthy seafood product development. *Journal of Consumer Marketing*, 27(3), 224-235. doi: 10.1108/07363761011038293

- Altintzoglou, T., Skuland, A.V., Carlehög, M., Sone, I., Heide, M., & Honkanen, P. (2015). Providing a food choice option increases children's liking of fish as part of a meal. *Food Quality and Preference*, 39, 117-123.
- Appleton, K.M., Rogers, P.J., & Ness, A.R. (2008). Is there a role for n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in the regulation of mood and behaviour? A review of the evidence to date from epidemiological studies, clinical studies and intervention trials. *Nutrition Research Reviews*, 21(1), 13-41. doi: 10.1017/s0954422408998620
- Appleton, K.M., Sallis, H.M., Perry, R., Ness, A.R., & Churchill, R. (2016). Omega-3 fatty acids for major depressive disorder in adults: an abridged Cochrane review. *BMJ Open*, 6(3), e010172. doi: 10.1136/bmjopen-2015-010172
- Arechavala, T., Continente, X., Perez-Gimenez, A., Bartoll, X., Sanchez-Martinez, F., & Lopez, M. J. (2016). Food consumption frequency and excess body weight in adolescents in the context of financial crisis in Barcelona (Spain). *Gac Sanit*, 457-463. doi: 10.1016/j.gaceta.2016.03.013
- Ariño, A., Beltrán, J. A., Herrera, A., & Roncalés, P. (2013). Fish and seafood: Nutritional Value *Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition)* (pp. 254-261). Waltham: Academic Press.
- Batioğlu, F. (2007). Yaşa Bağlı Makula Dejeneresansında Klasik Lazer Fotokoagülasyon. *The Journal of Retina Vitreous*, 15, 63-69.
- Ben-Shoshan, M., Harrington, D.W., Soller, L., Fragapane, J., Joseph, L., St Pierre, Y., Godefroy, S.B., Elliott, S.J., & Clarke, A.E. (2010). A population-based study on peanut, tree nut, fish, shellfish, and sesame allergy prevalence in Canada. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(6), 1327-1335. doi: 10.1016/j.jaci.2010.03.015
- Bloomington, A., Guthrie, L.B., Price, S., Wright, R. O., Platek, D., Haines, J., & Oken, E. (2010). A qualitative study of fish consumption during pregnancy. *American Journal of Clinical Nutrition*, 92(5), 1234-1240. doi: 10.3945/ajcn.2010.30070.
- Bosch, A. C., O'Neill, B., Sigge, G. O., Kerwath, S. E., & Hoffman, L. C. (2016). Heavy metals in marine fish meat and consumer health: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(1), 32-48. doi: 10.1002/jsfa.7360
- Brasky, T. M., Neuhouser, M. L., Cohn, D. E., & White, E. (2014). Associations of long-chain omega-3 fatty acids and fish intake with endometrial cancer risk in the VITamins And Lifestyle cohort. *American Journal of Clinical Nutrition*, 99(3), 599-608. doi: 10.3945/ajcn.113.070524
- Brenna, J.T., Varamini, B., Jensen, R.G., Diersen-Schade, D.A., Boettcher, J.A., & Arterburn, L.M. (2007). Docosahexaenoic and arachidonic acid concentrations in human breast milk worldwide. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85(6), 1457-1464.
- Carlson, S.E. (2009). Docosahexaenoic acid supplementation in pregnancy and lactation. *American Journal of Clinical Nutrition*, 89(2), 678-684. doi: 10.3945/ajcn.2008.26811E
- Charnley, G., & Doull, J. (2005). Human exposure to dioxins from food, 1999–2002. *Food and Chemical Toxicology*, 43(5), 671-679.
- Chiu, B.C., Ji, B.T., Dai, Q., Gridley, G., McLaughlin, J.K., Gao, Y.T., Fraumeni, J. F., Jr., & Chow, W. H. (2003). Dietary factors and risk of colon cancer in Shanghai, China. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 12(3), 201-218.
- Clarkson, T. W. (2002). The three modern faces of mercury. *Environmental Health Perspectives*, 110 Suppl 1, 11-23.
- Clarkson, T. W., & Magos, L. (2006). The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 36(8), 609-662.
- Cornier, M.A., Dabelea, D., Hernandez, T.L., Lindstrom, R.C., Steig, A.J., Stob, N.R., Van Pelt, R.E., Wang, H., & Eckel, R.H. (2008). The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*, 29(7), 777-822. doi: 10.1210/er.2008-0024
- Costa, L. (2007). Contaminants in fish: risk-benefit considerations. *Archives of Industrial*

- Hygiene and Toxicology*, 58(3), 367-374. doi: 10.2478/v10004-007-0025-3
- Del Brutto, O. H., Mera, R. M., Ha, J.-e., Gillman, J., Zambrano, M., & Castillo, P. R. (2016). Dietary fish intake and sleep quality: a population-based study. *Sleep Medicine*, 17, 126-128.
- Djousse, L., Akinkuolie, A. O., Wu, J. H., Ding, E. L., & Gaziano, J. M. (2012). Fish consumption, omega-3 fatty acids and risk of heart failure: a meta-analysis. *Clinical Nutrition*, 31(6), 846-853. doi: 10.1016/j.clnu.2012.05.010
- Dong, Z., Jim, R. C., Hatley, E. L., Backus, A. S., Shine, J. P., Spengler, J. D., & Schaidler, L. A. (2015). A longitudinal study of mercury exposure associated with consumption of freshwater fish from a reservoir in rural south central USA. *Environmental Research*, 136, 155-162. doi: 10.1016/j.envres.2014.09.029
- Dovydaitis, T. (2008). Fish consumption during pregnancy: An overview of the risks and benefits. *Journal of Midwifery & Women's Health*, 53(4), 325-330.
- EFSA. (2015). Statement on the benefits of fish/seafood consumption compared to the risks of methylmercury in fish/seafood. *EFSA Journal*, 13(1), 3982. doi: 10.2903/j.efsa.2015.3982
- El Khoury, D., & Anderson, G. H. (2013). Recent advances in dietary proteins and lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 24(3), 207-213. doi: 10.1097/MOL.0b013e3283613bb7
- Elmacioğlu, F. (2008). *Anne ve bebek beslenmesi* (G. Hatipoğlu Ed. 1 ed.). Ankara: Hatiboğlu Yayınları.
- Eltholth, M., Fornace, K., Grace, D., Rushton, J., & Häsler, B. (2015). Characterisation of production, marketing and consumption patterns of farmed tilapia in the Nile Delta of Egypt. *Food Policy*, 51, 131-143. doi:
- Emmett, R., Akkersdyk, S., Yeatman, H., & Meyer, B. J. (2013). Expanding awareness of docosahexaenoic acid during pregnancy. *Nutrients*, 5(4), 1098-1109. doi: 10.3390/nu5041098.
- Engeset, D., Andersen, V., Hjartåker, A., & Lund, E. (2007). Consumption of fish and risk of colon cancer in the Norwegian Women and Cancer (NOWAC) study. *British Journal of Nutrition*, 98(3), 576-582. doi: doi:10.1017/S0007114507721487
- FAO. (2009). The State of World Fisheries and Aquaculture 2008. FAO Fisheries and Aquaculture Department Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome.
- FAO. (2010). Joint FAO/WHO Expert Consultation on the Risks and Benefits of Fish Consumption.
- FAO. (2016). The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. In). Rome.
- FDA. (2017). Advice About Eating Fish What Pregnant Women & Parents Should Know. Retrieved 14.02.2017, from <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/Metals/UCM536321.pdf>
- Feng, C., Teuber, S., & Gershwin, M. E. (2016). Histamine (Scombroid) Fish Poisoning: a Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 50(1), 64-69. doi: 10.1007/s12016-015-8467-x
- Flock, M. R., Harris, W. S., & Kris-Etherton, P. M. (2013). Long-chain omega-3 fatty acids: time to establish a dietary reference intake. *Nutrition Reviews*, 71(10), 692-707. doi: 10.1111/nure.12071
- Food & Administration (2004). What you need to know about mercury in fish and shellfish. *FDA/CFSAN Consumer Advisory*. EPA-823-R-04-005.
- Freeman, M. P., Hibbeln, J. R., Wisner, K. L., Davis, J. M., Mischoulon, D., Peet, M., Keck, P. E., Jr., Marangell, L. B., Richardson, A. J., Lake, J., & Stoll, A. L. (2006). Omega-3 fatty acids: evidence basis for treatment and future research in psychiatry. *Journal of Clinical Psychiatry*, 67(12), 1954-1967.
- Galli, C., & Rise, P. (2009). Fish consumption, omega 3 fatty acids and cardiovascular disease. The science and the clinical trials. *Nutrition and Health*, 20(1), 11-20.
- Garland, C. F., Garland, F. C., Gorham, E. D., Lipkin, M., Newmark, H., Mohr, S. B., & Holick, M. F. (2006). The role of vitamin D

- in cancer prevention. *American Journal of Public Health*, 96(2), 252-261. doi: 10.2105/AJPH.2004.045260
- Gil, A., & Gil, F. (2015). Fish, a Mediterranean source of n-3 PUFA: benefits do not justify limiting consumption. *British Journal of Nutrition*, 113, S58-567. doi: 10.1017/s0007114514003742
- Gispert-Llaurado, M., Perez-Garcia, M., Escribano, J., Closa-Monasterolo, R., Luque, V., Grote, V., Weber, M., Torres-Espinola, F. J., Czech-Kowalska, J., Verduci, E., Martin, F., Piqueras, M. J., Koletzko, B., Decsi, T., Campoy, C., & Emmett, P. M. (2016). Fish consumption in mid-childhood and its relationship to neuropsychological outcomes measured in 7-9 year old children using a NUTRIMENTHE neuropsychological battery. *Clinical Nutrition*. doi: 10.1016/j.clnu.2016.02.008
- Grosso, G., Galvano, F., Marventano, S., Malaguarnera, M., Bucolo, C., Drago, F., & Caraci, F. (2014). Omega-3 fatty acids and depression: scientific evidence and biological mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. doi: 10.1155/2014/313570
- Guldner, L., Monfort, C., Rouget, F., Garlantezec, R., & Cordier, S. (2007). Maternal fish and shellfish intake and pregnancy outcomes: a prospective cohort study in Brittany, France. *Environmental Health*, 6(1), 1.
- Gump, B. B., MacKenzie, J. A., Dumas, A. K., Palmer, C. D., Parsons, P. J., Segu, Z. M., Mechref, Y. S., & Bendinskas, K. G. (2012). Fish consumption, low-level mercury, lipids, and inflammatory markers in children. *Environmental Research*, 112, 204-211. doi: 10.1016/j.envres.2011.10.002
- Halsted, C. H., & Medici, V. (2013). Alcohol: Effects of Consumption on Diet and Nutritional Status A2 - Caballero, Benjamin *Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition)* (pp. 50-56). Waltham: Academic Press.
- Ho, A., Flynn, A. C., & Pasupathy, D. (2016). Nutrition in pregnancy. *Obstetrics, Gynaecology and Reproductive Medicine*, 26(9), 259-264. doi: 10.1016/j.ogrm.2016.06.005
- IARC. (2012). Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–116 Retrieved 01.08.2016, from <https://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsGroupOrder.pdf>
- Jackson, K. H., & Harris, W. S. (2016). Should there be a target level of docosahexaenoic acid in breast milk? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 19(2), 92-96. doi: 10.1097/mco.0000000000000251
- Jakobsen, M. U., Due, K. M., Dethlefsen, C., Halkjaer, J., Holst, C., Forouhi, N. G., Tjonneland, A., Boeing, H., Buijsse, B., Palli, D., Masala, G., Du, H., van der, A. D., Wareham, N. J., Feskens, E. J., Sorensen, T. I., & Overvad, K. (2012). Fish consumption does not prevent increase in waist circumference in European women and men. *British Journal of Nutrition*, 108(5), 924-931. doi: 10.1017/s0007114511006039
- Jarup, L. (2002). Cadmium overload and toxicity. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17 (Suppl 2): 35-39.
- Jorde, R., Waterloo, K., Saleh, F., Haug, E., & Svartberg, J. (2006). Neuropsychological function in relation to serum parathyroid hormone and serum 25-hydroxyvitamin D levels. *Journal of Neurology*, 253(4), 464-470. doi: 10.1007/s00415-005-0027-5
- Kondo, K., Morino, K., Nishio, Y., Kondo, M., Nakao, K., Nakagawa, F., Ishikado, A., Sekine, O., Yoshizaki, T., Kashiwagi, A., Ugi, S., & Maegawa, H. (2014). A fish-based diet intervention improves endothelial function in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus: a randomized crossover trial. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 63(7), 930-940. doi: 10.1016/j.metabol.2014.04.005
- Koren, G., & Bend, J. R. (2010). Fish consumption in pregnancy and fetal risks of methylmercury toxicity. *Canadian Family Physician*, 56(10), 1001-1002.
- Kouki, R., Schwab, U., Hassinen, M., Komulainen, P., Heikkila, H., Lakka, T. A., & Rauramaa, R. (2011). Food consumption, nutrient intake and the risk of having metabolic syndrome: the DR's EXTRA Study. *European Journal of Clinical*

- Nutrition*, 65(3), 368-377. doi: 10.1038/ejcn.2010.262
- Kremmyda, L. S., Tvrzicka, E., Stankova, B., & Ales, Z. (2011). Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease-a review. Part 2: Fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. *Biomedical Papers*, 155(3), 195-218.
- Kris-Etherton, P. M., Grieger, J. A., & Etherton, T. D. (2009). Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81(2-3), 99-104. doi: 10.1016/j.plefa.2009.05.011
- Lai, Y. H., Petrone, A. B., Pankow, J. S., Arnett, D. K., North, K. E., Ellison, R. C., Hunt, S. C., & Djousse, L. (2013). Association of dietary omega-3 fatty acids with prevalence of metabolic syndrome: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Clinical Nutrition*, 32(6), 966-969. doi: 10.1016/j.clnu.2013.05.002
- Lang, U. E., Beglinger, C., Schweinfurth, N., Walter, M., & Borgwardt, S. (2015). Nutritional aspects of depression. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 37(3), 1029-1043. doi: 10.1159/000430229
- Lawrenson, J. G., & Evans, J. R. (2015). Omega 3 fatty acids for preventing or slowing the progression of age-related macular degeneration. *Cochrane Database of Systematic Reviews*(4), Cd010015. doi: 10.1002/14651858.CD010015.pub3
- Li, F., Liu, X., & Zhang, D. (2016). Fish consumption and risk of depression: a meta-analysis. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 70(3), 299-304. doi: 10.1136/jech-2015-206278
- Liu, S., Song, Y., Ford, E. S., Manson, J. E., Buring, J. E., & Ridker, P. M. (2005). Dietary calcium, vitamin D, and the prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and older U.S. women. *Diabetes Care*, 28(12), 2926-2932.
- Lovegrove, C., Ahmed, K., Challacombe, B., Khan, M. S., Popert, R., & Dasgupta, P. (2015). Systematic review of prostate cancer risk and association with consumption of fish and fish-oils: analysis of 495,321 participants. *International Journal of Clinical Practice*, 69(1), 87-105. doi: 10.1111/ijcp.12514
- Lucas, M., Dewailly, E., Blanchet, C., Gingras, S., & Holub, B. J. (2009). Plasma omega-3 and psychological distress among Nunavik Inuit (Canada). *Psychiatry Research*, 167(3), 266-278. doi: 10.1016/j.psychres.2008.04.012
- Madani, Z., Louchami, K., Sener, A., Malaisse, W. J., & Ait Yahia, D. (2012). Dietary sardine protein lowers insulin resistance, leptin and TNF-alpha and beneficially affects adipose tissue oxidative stress in rats with fructose-induced metabolic syndrome. *International Journal of Molecular Medicine*, 29(2), 311-318. doi: 10.3892/ijmm.2011.836
- Magnusson, J., Kull, I., Westman, M., Hakansson, N., Wolk, A., Melen, E., Wickman, M., & Bergstrom, A. (2015). Fish and polyunsaturated fat intake and development of allergic and nonallergic rhinitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(5), 1247-1253. doi: 10.1016/j.jaci.2015.05.030
- Mahaffey, K. R., Clickner, R. P., & Bodurov, C. C. (2004). Blood organic mercury and dietary mercury intake: National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 and 2000. *Environmental Health Perspectives*, 112(5), 562-570.
- Mahaffey, K. R., Clickner, R. P., & Jeffries, R. A. (2009). Adult women's blood mercury concentrations vary regionally in the United States: association with patterns of fish consumption (NHANES 1999-2004). *Environmental Health Perspectives*, 117(1), 47-53. doi: 10.1289/ehp.11674.
- Marques, R. C., Bernardi, J. V., Dórea, J. G., Brandão, K. G., Bueno, L., Leão, R. S., & Malm, O. (2013). Fish consumption during pregnancy, mercury transfer, and birth weight along the Madeira River Basin in Amazonia. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(6), 2150-2163. doi: 10.3390/ijerph10062150
- McCann, J. C., & Ames, B. N. (2005). Is docosahexaenoic acid, an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and

- behavioral tests in humans and animals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 82(2), 281-295.
- McKean, S. J., Bartell, S. M., Hansen, R. L., Barfod, G. H., Green, P. G., & Hertz-Picciotto, I. (2015). Prenatal mercury exposure, autism, and developmental delay, using pharmacokinetic combination of newborn blood concentrations and questionnaire data: A case control study. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 14(1), 62. doi: 10.1186/s12940-015-0045-4
- Monti, J. M. (2011). Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep Medicine Reviews*, 15(4), 269-281. doi: 10.1016/j.smrv.2010.11.003
- Mozaffarian, D., & Rimm, E. B. (2006). Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *Jama*, 296(15), 1885-1899. doi: 10.1001/jama.296.15.1885
- Murray, J., & Burt, J. R. (1969). *The composition of fish*: Torrey Research Station.
- Noel, S. E., Newby, P. K., Ordovas, J. M., & Tucker, K. L. (2010). Adherence to an (n-3) Fatty Acid/Fish Intake Pattern Is Inversely Associated with Metabolic Syndrome among Puerto Rican Adults in the Greater Boston Area. *The Journal of Nutrition*, 140(10), 1846-1854. doi: 10.3945/jn.110.124297
- NRC. (2000). *Toxicological Effects of Methylmercury*. Washington (DC): National Academy Press.
- Nyankovskyy, S., Dobryanskyy, D., Ivakhnenko, O., Iatsula, M., Javorska, M., Shadryn, O., Platonova, O., Zajec, V., Klimenko, V., & Solodovnyk, G. (2014). Dietary habits and nutritional status of children from Ukraine during the first 3 years of life. *Pediatrics Polska*, 89(6), 395-405. doi: 10.1016/j.papo.2014.08.003
- Oken, E., Kleinman, K. P., Berland, W. E., Simon, S. R., Rich-Edwards, J. W., & Gillman, M. W. (2003). Decline in fish consumption among pregnant women after a national mercury advisory. *Obstetrics and Gynecology*, 102(2), 346-351.
- Oken, E., Østerdal, M. L., Gillman, M. W., Knudsen, V. K., Halldorsson, T. I., Strøm, M., Bellinger, D. C., Hadders-Algra, M., Michaelsen, K. F., & Olsen, S. F. (2008). Associations of maternal fish intake during pregnancy and breastfeeding duration with attainment of developmental milestones in early childhood: a study from the Danish National Birth Cohort. *American Journal of Clinical Nutrition*, 88(3), 789-796.
- Parletta, N., Milte, C. M., & Meyer, B. J. (2013). Nutritional modulation of cognitive function and mental health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(5), 725-743. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.01.002
- Pasalic, D., Dodig, S., Corovic, N., Pizent, A., Jurasovic, J., & Pavlovic, M. (2011). High prevalence of metabolic syndrome in an elderly Croatian population - a multicentre study. *Public Health Nutrition*, 14(9), 1650-1657. doi: 10.1017/s1368980010003265
- Quinn, E. A., & Kuzawa, C. W. (2012). A dose-response relationship between fish consumption and human milk DHA content among Filipino women in Cebu City, Philippines. *Acta Paediatrica*, 101(10), 439-445. doi: 10.1111/j.1651-2227.2012.02777.x
- Ruidavets, J. B., Bongard, V., Dallongeville, J., Arveiler, D., Ducimetiere, P., Perret, B., Simon, C., Amouyel, P., & Ferrieres, J. (2007). High consumptions of grain, fish, dairy products and combinations of these are associated with a low prevalence of metabolic syndrome. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 61(9), 810-817. doi: 10.1136/jech.2006.052126
- Sangiovanni, J. P., Agron, E., Meleth, A. D., Reed, G. F., Sperduto, R. D., Clemons, T. E., & Chew, E. Y. (2009). {omega}-3 Long-chain polyunsaturated fatty acid intake and 12-y incidence of neovascular age-related macular degeneration and central geographic atrophy: AREDS report 30, a prospective cohort study from the Age-Related Eye Disease Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 90(6), 1601-1607. doi: 10.3945/ajcn.2009.27594
- Schroeder, R. D., & Higgins, G. E. (2016). You are what you eat: The impact of nutrition on alcohol and drug use. *Substance Use &*

- Misuse*, 1-15. doi: 10.1080/10826084.2016.1212603
- Seddon, J. M., George, S., & Rosner, B. (2006). Cigarette smoking, fish consumption, omega-3 fatty acid intake, and associations with age-related macular degeneration: the US Twin Study of Age-Related Macular Degeneration. *Archives of Ophthalmology*, 124(7), 995-1001. doi: 10.1001/archophth.124.7.995
- Simopoulos, A. P. (2016). An Increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients*, 8(3), 128. doi: 10.3390/nu8030128
- Sioen, I., Leblanc, J. C., Volatier, J. L., De Henauw, S., & Van Camp, J. (2008). Evaluation of the exposure methodology for risk-benefit assessment of seafood consumption. *Chemosphere*, 73(10), 1582-1588.
- Starling, P., Charlton, K., McMahon, A. T., & Lucas, C. (2015). Fish intake during pregnancy and foetal neurodevelopment—A systematic review of the evidence. *Nutrients*, 7(3), 2001-2014. doi: 10.3390/nu7032001.
- Stephenson, J. A., Al-Taani, O., Arshad, A., Morgan, B., Metcalfe, M. S., & Dennison, A. R. (2013). The multifaceted effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on the hallmarks of cancer. *Journal of Lipids*, 2013, 261247. doi: 10.1155/2013/261247
- Strøm, M., Mortensen, E. L., Halldorsson, T. I., Thorsdottir, I., & Olsen, S. F. (2009). Fish and long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid intakes during pregnancy and risk of postpartum depression: a prospective study based on a large national birth cohort. *American Journal of Clinical Nutrition*, 90(1), 149-155. doi: 10.3945/ajcn.2009.27552
- Sugimura, T., Wakabayashi, K., Nakagama, H., & Nagao, M. (2004). Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Science*, 95(4), 290-299.
- Tacon, A. G. J., & Metian, M. (2013). Fish matters: Importance of aquatic foods in human nutrition and global food supply. *Reviews in Fisheries Science*, 21(1), 22-38. doi: 10.1080/10641262.2012.753405
- TBSA. (2014). Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması-2010 Beslenme Durumu ve Alışkanlıklarının Değerlendirilmesi Sonuç Raporu. Retrieved 04.08.2016, from http://www.sagem.gov.tr/TBSA_Beslenme_Yayini.pdf
- Thorsdottir, I., Tomasson, H., Gunnarsdottir, I., Gisladdottir, E., Kiely, M., Parra, M. D., Bandarra, N. M., Schaafsma, G., & Martinez, J. A. (2007). Randomized trial of weight-loss-diets for young adults varying in fish and fish oil content. *International Journal of Obesity*, 31(10), 1560-1566.
- Timonen, M., Horrobin, D., Jokelainen, J., Laitinen, J., Herva, A., & Rasanen, P. (2004). Fish consumption and depression: the Northern Finland 1966 birth cohort study. *Journal of Affective Disorders*, 82(3), 447-452. doi: 10.1016/j.jad.2004.02.002
- TÖBR. (2015). Türkiye'ye Özgü Besin ve Beslenme Rehberi. 30.09.2016, from http://www.bdb.hacettepe.edu.tr/TOBR_kitap.pdf
- TÜİK (2016) Su ürünleri istatistikleri. 19.06.2017, from <http://www.tarim.gov.tr/sgb/Belgeler/SagMenuVeriler/BSGM.pdf>
- TürKomp. (2014). Ulusal Gıda Kompozisyon Veri Tabanı, versiyon 1.0 TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gıda Enstitüsü, Gebze / Kocaeli. from <http://www.turkomp.gov.tr/>
- Vazquez, C., Botella-Carretero, J. I., Corella, D., Fiol, M., Lage, M., Lurbe, E., Richart, C., Fernandez-Real, J. M., Fuentes, F., Ordonez, A., de Cos, A. I., Salas-Salvado, J., Burguera, B., Estruch, R., Ros, E., Pastor, O., & Casanueva, F. F. (2014). White fish reduces cardiovascular risk factors in patients with metabolic syndrome: the WISH-CARE study, a multicenter randomized clinical trial. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases : NMCD*, 24(3), 328-335. doi: 10.1016/j.numecd.2013.09.018
- Virtanen, J. K., Rissanen, T. H., Voutilainen, S., & Tuomainen, T. P. (2007). Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(2), 75-85. doi: 10.1016/j.jnutbio.2006.05.001

Journal abbreviation: **Food Health**

- Visciano, P., Schirone, M., Tofalo, R., & Suzzi, G. (2012). Biogenic amines in raw and processed seafood. *Frontiers in Microbiology*, 3, 188. doi: 10.3389/fmicb.2012.00188
- Wang, Y., Bentley, M. E., Zhai, F., & Popkin, B. M. (2002). Tracking of dietary intake patterns of Chinese from childhood to adolescence over a six-year follow-up period. *Journal of Nutrition*, 132(3), 430-438.
- Zheng, J., Huang, T., Yu, Y., Hu, X., Yang, B., & Li, D. (2012). Fish consumption and CHD mortality: an updated meta-analysis of seventeen cohort studies. *Public Health Nutrition*, 15(4), 725-737. doi: 10.1017/s1368980011002254



REVIEW ARTICLE

DERLEME MAKALESİ

ANTIMICROBIALS USED IN ACTIVE PACKAGING FILMS

Sevgin Dıblan¹ , Sevim Kaya² 

¹ Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Adana Science and Technology University, Adana, Turkey

² Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Gaziantep University, Gaziantep, Turkey

Received: 14.07.2017

Accepted: 17.10.2017

Published online: 22.11.2017

Corresponding author:

Sevgin Dıblan, Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Adana Science and Technology University, Adana, Turkey

E-mail: sdiblan@adanabtu.edu.tr

Abstract:

Active packaging technology is one of the innovative methods for preserving of food products, and antimicrobial packaging films is a major branch and promising application of this technology. In order to control microbial spoilage and also contamination of pathogen onto processed or fresh food, antimicrobial agent(s) is/are incorporated into food packaging structure. Polymer type as a carrier of antimicrobial can be petroleum-based plastic or biopolymer: because of environmental concerns researchers have lean to development of biodegradable antimicrobial films. Antimicrobial substances can be organic acids, parabens, sulfites, nitrites, phosphates, alcohols, antibiotics and bacteriocins. Succeed of antimicrobial film mainly depends on antimicrobial agent selection that antimicrobial should be chosen according to the food type packed, and deteriorative microbial flora of it. This review discussed the recent application of antimicrobial-active films for food protection. Also, their activity mechanisms against microorganisms, the effects of antimicrobials on food quality and of the film properties were presented.

Keywords: Active packaging, Antimicrobial, Food quality, Film properties

FOOD and HEALTH

E-ISSN: 2602-2834

4(1): 63-79 (2018) doi: 10.3153/JFHS18007

© 2015-2018 ScientificWebJournals (SWJ)

Introduction

Food products have different deterioration mechanisms; microbial, biochemical, physical, textural and chemical based on their ingredients, production techniques used, packaging type applied, etc. However, microbial deterioration mechanism is accepted that is dominant over the others. There are various food process technologies to prolong the shelf life of the products such as heat treatment, canning, and dehydration. However, there are certain needs for packaging to protect foods during handling, distribution or storage whatever processes applied since the main focus of food packaging is to protect the product from environmental hazards (for examples, moisture lost or gain, possible dust and insect contact) which may adversely affect its quality.

In recent years, the tendency is to decrease as much as possible amount of chemical used in food products whether they are harmful or not to human body. The consumers demand fresh-like (minimally processed), rich in nutritional value, wholesome and also shelf-stable, and easily prepared foods. According to European Food Safety Authority (EFSA) reports (2011), during 2009, 5550 foodborne outbreaks were reported resulting 46 deaths (Sohaib, Anjum, Arshad, & Rahman, 2016). Additionally, the world population is increasing faster than food supply sources. Yet, it was reported that, in Turkey, the edible food wastes in a single household were 298 kg/year (Pekcan, Köksal, Küçükerdönmez, & Ozel, 2006). Wasting food products (post or pre-harvest), and new marketing trend have led to emerge new technologies in packaging such as modified atmosphere packaging, intelligent and/or active packaging. Active packaging technology containing suitable additives is capable of adsorbing moisture and carbon dioxide or releasing of preservative substances such as antimicrobials or antioxidants (Brennan & Grandison, 2012).

Since the microbial deterioration is mainly responsible for spoiling the foods, packaging films incorporated with antimicrobial agent is one of the promising application areas of active packaging technologies. Antimicrobial agents (such as imazalil, silver or potassium sorbate) can be diffused in small amount from films into the food surface where the most microbial contamination occurs. In this way, the microbial safety and shelf life of food product is significantly improved without using any additives directly by means of dipping,

spraying etc. The direct usage of antimicrobial agents in food system is restricted due to the possible diffusion of agents into food bulks, and concentration of antimicrobials at food surface reduces and eventually, resulting in microbial growth and spoilage at surface. The antimicrobial effectiveness of these agents depends on diffusion of agents into the food surface from packaging material. Antimicrobial effect or microbial inhibition can be achieved by slow diffusion into food surface by a carrier which is a package material. By this way, the diffusion of antimicrobial agent into food core is prevented and the agents diffuse into food surface where the main place for microbial growth is (Teerakarn, Hirt, Acton, Rieck, & Dawson, 2002).

The active packaging researches have deal with antimicrobial effects of antimicrobial agent and diffusion of antimicrobial agent into model system mostly. This review mainly focused on types and activity mechanisms of antimicrobial-active films suggested for food protection and the effects of them on food quality parameters and film properties.

Active Packaging

Active packaging technology can be defined as a packaging technique adds antimicrobial, antioxidants or other quality enhancer agents via coating packaging materials and let the active packaging agent released into the packed food in small amount to ensure the safety of foods. Among various types of active packaging application, the attention in active packaging with antimicrobial substances has been increased considerably (Imran, Klouj, Revol-Junelles, & Desobry, 2014; Mauriello, De Luca, La Stora, Villani, & Ercolini, 2005). Table 1 summarizes the recent active chemicals used in active packaging with the aim of their applications, and lists the possible carrier medium of the agents and applied food products.

The factors that should be considered while choosing antimicrobial agent are antimicrobial spectrum and mode of action of the agent, chemical composition of food and the agent, diffusion kinetics of agents from polymers, the concentration of antimicrobial agents in polymer, polymer type selected and agent, polymer and food interactions. For example nutrient rich media of foods can reduce the activity of silver zeolite, also emulsifier

or fatty acids can affect nisin activity (Appendini & Hotchkiss, 2002).

Types of antimicrobial packaging can be divided into five basic applications (Appendini & Hotchkiss, 2002):

- *Volatile antimicrobial agent addition into sachet and pads:* Chlorine dioxide, ethanol and sulfur dioxide or volatile essential oils are the volatile antimicrobial agents which are often enclosed separately in sachets/pads attached to the internal part of the package. These agents will be vaporizing to the headspace of packaging and vapor-gas form of antimicrobial agent can contact with food products (Sung et al. 2013). Also, because of the ability of oxygen reduction, oxygen absorbers may be in this class. Oxygen absorbers (e.g. iron powder) are able to inhibit the growth of aerobic microorganisms and mold. Moisture absorbers (e.g. silica gels) can also affect the microbial growth due to reduction in water activity.

- *Antimicrobial agents incorporated into polymer:* Antimicrobial agents can be incorporated into polymers such as edible films, LDPE and various polyolefin. Especially in Japan, silver substituted zeolites are widely used with polymers (1-3%) (Appendini & Hotchkiss, 2002). There is another method known as solution-casting method. It includes preparation of a film blend containing antimicrobial agent, then, film can be casted above a suitable and smooth ground. Especially this casting method is used with production of active edible or biodegradable films. Film forming can be done using an extruder also.

- *Coating polymer surfaces with antimicrobials:* If the antimicrobial is heat sensitive, forming methods of active packaging film destructs its activity, the antimicrobial agents can be coated right onto the film material before applying to foods. In this technique, after blending of film solution, casting is done without antimicrobial agent. Then, another solution including antimicrobial is prepared and film will be covered by this solution and dried.

- *Antimicrobials immobilized by ionic or covalent linkages to polymers:* For this type of application there are a lot of required criteria: Polymer should be good properties of elasticity, stretch and conductivity; immobilization technique, non-covalent or covalent, should be selected according to the purpose of antimicrobial packaging system. For instance, if slow antimicrobial release is desired, covalent linkages should be preferred. This is why

covalent linkages are mostly applied in antimicrobial packaging (Goddard & Hotchkiss, 2007). Surface should be modified using a suitable technique in order to attach antimicrobial agent. After this process steps, the releasing rate of the antimicrobials to protect its activity over a time period which is an important parameter, can be controlled.

- *Use of polymers which are inherently antimicrobial:* Polymers that have antimicrobial effects are used such as chitosan or poly-L-lysine. Also, UV-treated nylon films show bactericidal effects.

Properties and Activity Mechanism of Antimicrobials

Antimicrobial agents used in films can be organic acids, metals, antibiotics, bacteriocins, enzymes, chelating agents, spices etc. (Ozdemir & Floros, 2004). Table 1 represents brief information about studies focused on antimicrobial food packaging applications. Since the antimicrobial agent used in active films can be migrated into the food bulks, they should be considered as food additives and must meet the food additives standards (Appendini & Hotchkiss, 2002).

Organic acids

Organic acids are used in food industry as acidulants and antimicrobials widely because of their solubility, flavor, and low toxicity. Organic acids such as sorbic acid, acetic acid, lactic acid and benzoic acids have long usage history in food industry and they are recognized as safe (GRAS) (Cruz-Romero, Murphy, Morris, Cummins, & Kerry, 2013; Sohaib et al., 2016).

Sorbic acid that is an organic acid has been used as antimicrobial agent in food technology in recent years. The direct usage methods of sorbates in foods are varied that are dipping, spraying or dusting. Sorbic acid and its potassium, calcium or sodium salts are called as sorbates. Sorbic acid (pKa = 4.75) is a trans-trans, unsaturated monocarboxylic acid ($\text{CH}_3\text{-CH=CH-CH=CH-COOH}$). This acid has low solubility in water (15 g/ 100 mL) while salt forms are highly soluble in water (58.2 g/ 100 mL at 20°C) (Branen, Davidson, Salminen, & Thorngate, 2001), therefore in food industry sorbates are widely preferred as preservatives.

Some yeast such as *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Torulopsis* and the molds such as *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*,

Fusarium, *Mucor*, and *Penicillium* can be inhibited by sorbates. Also, in literature, antimicrobial activity of sorbic acid has been evaluated against yeast and mold generally (Table 1). However, antibacterial activity has also been observed against some bacteria such as *Staphylococcus*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*.

The mechanism of sorbic acids against microbial growth lethally is partly due to the effects on enzymes such as dehydrogenases. Sorbate can turn the enzymes into the more stable forms such as thiohexenoic acid derivate and inhibit the enzyme activity in microorganism cell (Branen et al., 2001). The efficiency of sorbic acid is dependent on pH of the environment, with increasing pH the efficiency is decreased and after pH 6.5, sorbic acid loses its antimicrobial properties, that is why the pH level is very important for such kind of the films (Perez, Soazo, Balague, Rubiolo, & Verdini, 2014; Rodriguez-Martinez et al., 2016).

It had been reported that sorbic acid is one of least harmful antimicrobial agent used in food product: LD₅₀: 7.4- 10.5 g/kg body weight. Sorbic acid is used as preservatives with different concentrations into various food types such as drinks, dough, cakes, cake mixes, sausages casing.

Sorbic acid and its derivatives can be incorporated into any type of packaging materials (biodegradable or petroleum polymer) by mixing in solution and casting mostly. There are some articles showing application of sorbate containing active packaging films for food protection instead of adding sorbates into food itself: Hauser and Wunderlich (2011) proposed using sorbic acid incorporated packaging films (PVA) to inhibit the growth of contaminated microorganism that are *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Saccharomyces cerevisiae* on the surfaces of Gouda cheese and pork loin (Hauser & Wunderlich, 2011) and they had suggested that antimicrobial film containing sorbic acid is able to prevent and reduce the growing of pathogens on food surfaces. Silveira, Soares, Geraldine, Andrade, and Goncalves (2007) had studied antimicrobial efficiency of potassium sorbate and its migration from active film into pastry dough. They found that there was not any statistical difference between films containing 3 or 7% potassium sorbate with respect to diffusion rate. It had been stated that *Staphylococcus spp.* could not be inhibited while there was 2log reduction in aerobic mesophilic count in dough wrapped with 7% film.

Benzoic acid and its derivate was the first antimicrobial agent approved and permitted by Food and Drug Administration (FDA). This organic acid can be found in many fruit and vegetables naturally. The maximum usage concentration of benzoic acids is between 0.15- 0.25% in many countries (Dobias, Chudackova, Voldrich, & Marek, 2000). Benzoic acid is used for its antimycotic activity. Same as sorbic acid, the salts form of benzoic acid such as sodium benzoate is more soluble in water than benzoic acid itself. Most yeast and molds can be inhibited by benzoic acid (20-2000 µg/mL) (Branen et al., 2001). The inhibition mechanism of microorganisms by benzoic acid has not been clear.

The addition of benzoic acids and its derivate into a polymer matrix such as LDPE can lead to significant changes into polymer film properties such as oxygen, water vapor or carbon dioxide permeability, tensile or sealing strength. On the other hand it was reported that the shelf life of bread and cheese wrapped with LDPE films containing benzoic acid had been improved due to the antifungistic efficiency of benzoic acids (Dobias et al., 2000). Benzoic acids are also effective against bacteria such as *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Escherichia coli* (Cruz-Romero et al., 2013).

Lactic, tartaric, malic, and acetic acids are other organic acids used in food industry. Acetic acids can be lethal for *Salmonella* and its strains, especially with another antimicrobial i.e. combining with carvacrol, acetic acid can inhibit *S. typhimurium* growth on the poultry meat without affecting the flavor (Zhou et al., 2007). Tartaric and malic acids are found in fruits mostly and their antimicrobial capacities are not strong as other organic acids mentioned above. However, some researchers had reported they can suppress the growth of *Salmonella* if just together with under vacuum condition (Sohaib et al., 2016).

Natural Microbial Metabolic Compounds

Food consumer preference tendency has been changing to natural and additive-free food product; therefore scientists have been looking for some natural additives such as essential oil from plants or nisin from bacteria for providing wholesomeness and safety of foods. Bacteriocins are antimicrobial peptides that are metabolic products of different bacterial strains (Sohaib et al., 2016). Among bacteriocins, nisin is one of the most pre-

ferred bacteriocin as an antimicrobial agent. Lactic acid bacteria (LAB) bacteriocins such as nisin are heat-stable small peptides and can be divided basically into two classes: Class I and II. Class I bacteriocins is also called as lantibiotics that contain amino acids such as lanthionine in their structure (Zendo, Nakayama, Fujita, & Sonomoto, 2008). Nisin is a 34 polypeptide bacteriocin, contains dehydroalanine and dehydrobutyrine residues and it is produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Liu & Hansen, 1990).

Nisin has been approved as non-toxic and recognized as E234 by FDA and widely used in food industry. In France, the use of nisin in preservation of cheese was allowed without any limitation (Ripoche, Chollet, Peyrol, & Sebti, 2006). The activity of nisin is against of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* that are gram positive bacteria (Imran et al., 2014; Sebti, Carnet, Blanc, Saurel, & Coma, 2003) and also it can combine with a chelator agent resulting activated against gram negative bacteria (Teerakarn et al., 2002). The cytoplasmic membrane of gram positive bacteria is the target of nisin; this antimicrobial agent causes the pores onto the membrane of microorganism's cell wall resulting in degradation of proton motive force and loss cellular ions, amino acids and ATP. Because of the outer membrane of gram negative bacteria which perform as barrier against hydrophobic solutes and macromolecules, gram negative bacteria is resistant to antimicrobial effects of nisin (Olasupo, Fitzgerald, Gasson, & Narbad, 2003). As mentioned above, nisin has known antibacterial activity against gram positive bacteria and with a chelating agent also against gram negatives. This has been shown by Bhatia and Bharti (2015); they have reported that antibactericidal attacks against gram negative bacteria increased with increasing EDTA concentration into film blend (Table 1).

Nisin solubility is affected with pH changes resulting in antimicrobial activity loss (Liu & Hansen, 1990). It was reported that the solubility is higher at low pH (57 mg/mL at pH 2) and is significantly lower at high pH (0.25 mg/mL at pH 8 to 12). In a study, it was reported that the effectiveness onto the *Micrococcus luteus* and release mechanism of nisin was pH and temperature dependent (Mauriello et al., 2005). Nisin efficiency in food product is related with the diffusion rate of nisin from films into food surface. However, in order to enhance antimicrobial efficiency, some researches

have preferred coating techniques considering nature of nisin. The diffusion of nisin can be affected with possible factors such as nisin concentration, storage conditions, and film types used (edible or biopolymer etc.) (Ripoche et al., 2006).

Natamycin, also known as primaricin or pimarin, is another metabolic product used as preservative in foods and produced by *Streptomyces natalensis*. Natamycin was approved by FDA as GRAS and by European Union as natural preservative as E235 (Bierhalz, da Silva, & Kieckbusch, 2012; Fucinos et al., 2015). Natamycin can inhibit fungal growth and causes cell lyses of binding to cell membrane sterols (Duran et al., 2016). The most popular usage of natamycin is as spray, applied directly over cheese and sausages up to level of 1 mg/dm² (Lantano et al., 2014). In a study, fresh strawberry had been coated using chitosan edible films with natamycin for the purpose to extend shelf life of fruit and it had been reported that compared with uncoated fresh fruits, the shelf life of fresh strawberry had been increased (Duran et al., 2016).

Volatile Substances and Essential Oils

Volatile antimicrobial agent addition into sachet and pads is another application of active packaging technology which gets attention due to no need for contact between food and antimicrobial agent resulting no impact the sensorial properties of food product (Kapetanakou, Agathaggelou, & Skandamis, 2014). The volatile antimicrobial substances can be produced mainly from natural plants such as essential oils or it may be food-grade ethanol.

Essential oils extracted from plants have become popular due to their natural sources such as rosemary, lemongrass, ginger and curcumin extracts and their non-toxicity, inherent antimicrobial and antioxidant activities (Klangmuang & Sothornvit, 2016; O' Callaghan & Kerry, 2014; Takala, Vu, Salmieri, Khan, & Lacroix, 2013; Wang et al., 2017). Herbal oils generally are considered to be replacement of organic acids due to their antibacterial, antifungal and antioxidant properties (Klangmuang & Sothornvit, 2016).

The most important limitation of usage of essential oils to produce active films is their volatility and thermal degradation when incorporated during the mechanical processing of the polymeric films (Mulla et al., 2017). However, Kuorwel, Cran, Sonneveld, Miltz, and Bigger (2013) have impregnated carvacrol, linalool and thymol with

hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) film using both coating and solution- heat pressing techniques. They have reported that diffusion coefficients of heat pressed film much higher than film produced coating techniques. They have concluded that this antimicrobial agents show a potential for use in antimicrobial packaging materials produced using this two methods.

Klangmuang and Sothornvit (2016) had produced antimicrobial active edible films containing Thai essential oil and reported the films were effective against to *E. coli* (gram negative) and *S. aureus* (gram positive) (Table 1). Same as Thai, another effective natural spice on the *E. coli* and *S. aureus* is curcumin which is extracted from *Curcuma longa* and have anti-inflammation, antiviral, and antioxidant activities (Wang et al., 2017).

Food-grade alcohol can be used as antimicrobial sachets into food packaging system. Kapetanakou et al. (2014) had developed an packaging system to observe the effect of some commercial alcoholic beverages (whisky, brandy, tsipouro, raki, and ouzo) vapors on microbial, physicochemical, and sensory profile of pork meat stored in different modified atmosphere packaging (MAP) conditions. It had been reported that vapor action of alcoholic beverages in combination with MAP may offer a promising, antimicrobial packaging application for extending the shelf-life of pork meat (Kapetanakou et al., 2014).

Other Antimicrobial Substances

Metals: Among the antimicrobials used in active packaging technology, silver takes the attention mostly because of its suitable technological properties and broad antimicrobial spectrum. The usage of silver as antimicrobial has gone as far as to the ancient times. The historic source reported that silver spoon used in milk to prolong shelf life (Duncan, 2011). From past to today, the silver application has reached a wide range area. For example, silver has been preferred as antimicrobial agent into water which will be consumed by astronauts and must be stored very long time. Moreover, in 2009, FDA has permitted direct addition of silver nitrate to water if not to exceed 17 µg/kg (Duncan, 2011).

Although there is no evidence for carcinogenic and mutagenic effect of silver, since some researchers claimed that silver can toxic for human cells, alter usual function of mitochondria and accelerate reactive oxygen generation, the usage of silver in food production is in question

(Echegoyen & Nerin, 2013; Kumar & Munstedt, 2005; Song, Li, Lin, Wu, & Chen, 2011). Direct usage of silver or to be in contact with food in some countries is forbidden; EFSA says that silver should be in list of suspicious additives. On the contrary, in USA it is allowed and described as GRAS by FDA (Azlin-Hasim, Cruz-Romero, Morris, Cummins, & Kerry, 2015).

Besides to the other antimicrobials which have antimicrobial activity in specific microorganism classes, silver has broad spectrum and inhibit to unlimited strains of bacteria, fungi, algae and possibly some viruses (Duncan, 2011; Rhim, Wang, & Hong, 2013). Since silver is easily incorporated into many materials, the application to the packaging technology has been expanded in a short time especially in Japan (Duncan, 2011). Silver can be applied to the food industry in three forms; (1) direct addition of silver, (2) the form of silver nitrate (generally direct addition), and (3) the form of silver substituted zeolite. Silver substituted zeolite is mostly preferred for films for the reason that capability of slow release of silver to food surface (Kaba & Duyar, 2008).

The mechanism of silver against the microorganism can be explained via following ways: (1) by means of binding to sulfhydryl or disulfide functional groups on the surface of membrane protein, (2) disturbing DNA replication, (3) oxidative stress through the catalysis of reactive oxygen species formation (Duncan, 2011). However, it has been accepted that the mechanism of silver is mainly based on electrostatic interaction. The negative charge of silver ion can be adsorbed by the microorganism cell membrane and silver inactivate the enzymes in cytoplasm by binding them (Kaba & Duyar, 2008). Silver ions react with thiol group of enzymes and inactivate them, resulting in ending of DNA replication (Matsumura, Yoshikata, Kunisaki, & Tsuchido, 2003).

The effect of silver packaging films on chicken breast meat quality was studied (Matsumura et al., 2003), the meats were wrapped with Ag films (5%-LDPE) and stored at cold condition during storage up to 21 days. It was reported that the migration concentration of Ag on surface was enough to inhibit microorganism and at the same time it was below from maximum limit allowed by legislation (25 mg/kg) for protection of quality of the meat at the end of the storage period.

There are plenty of studies focused on antimicrobial packaging interested in silver especially in

last five years (Table 1). Silver can be incorporated into both biodegradable and petroleum polymer packaging systems. Currently, there are commercial antimicrobial packaging systems with silver for instance AgIon and Noavaron in the packaging marketing.

Copper can destroy microorganisms and viruses; however it is not generally used in active packaging technology since it is regarded as toxic to human body (Rhim, Park, & Ha, 2013). Metal oxides such as titanium dioxide (TiO₂), zinc oxide (ZnO) and magnesium oxide (MgO) are another strong antimicrobial groups and used in food packaging technology because of high stability compared with organic acids. TiO₂ is an inert, non-toxic, inexpensive antimicrobial agent with activity against broad spectrum of microorganism. In order to activate this metallic oxide, ultraviolet as an excitation source is needed therefore the antimicrobial activity and photocatalyst of TiO₂ are enhances with metallic ions such as Fe⁺³, Ag or SnO₂ (Rhim, Park, et al., 2013).

Chitosan: Chitosan is a functional natural polymer that is non-toxic, biodegradable, has antimicrobial properties and is the most abundant carbohydrate in nature after cellulose, its linear polymer chain contains (1-4)-2-acetoamido-2-deoxy-β-D-glucose. The polymer consists of an aminogluco-pyranan of N-acetylglucosamine and glucoside residues. Chitosan is obtained by chitin, which occurs inherently the cuticle of arthropods and endoskeletons of cephalopods. The process steps mostly involve deproteinization, demineralization and chemical deacetylation (Dotto, Buriol, & Pinto, 2014; Dutta, Tripathi, Mehrotra, & Dutta, 2009; El-Saharty & Bary, 2002; Siripatrawan & Noipha, 2012; Yoshida, Bastos, & Franco, 2010).

Because of inherent antimicrobial activity and good film forming ability of chitosan, it has a potential to be used in biodegradable active films (Siripatrawan & Vitchayakitti, 2016). Chitosan has been used as antimicrobial substances in films owing to its effectiveness of inhibiting the growth of not just gram negative but also gram positive bacteria alongside the yeast and molds. The activity of chitosan comes from its positive charge so it affects microorganisms electrostatically: chitosan can incorporate the macromolecules present in cell membrane cause linkages. Ouattara, Simard, Piette, Bégin, and Holley (2000) have prepared the films containing chitosan and observed the its inhibition ability against lactic acid bacteria, *Enter-*

obacteriaceae and *Serratia liquefaciens* inoculated on meats (Ouattara et al., 2000). It had been claimed that while lactic acid bacteria had not been affected, the growth of *Enterobacteriaceae* and *Serratia liquefaciens* had been delayed or completely inhibited. The activity of chitosan is affected by several factors that are pH of medium, molecular weight and the degree of deacetylation of chitosan. For example, at low pH, chitosan is more effective due to “hurdle” effect (Aider, 2010; Dutta et al., 2009). The molecular weight of chitosan is another important factor in terms of antimicrobial effects. The chitosan derivative having low molecular weight is more effective because that chitosan can enter the microbial cell more easily than its high molecule weight derivate (Cruz-Romero et al., 2013; O' Callaghan & Kerry, 2014).

Soysal et al. (2015) had stored chicken drumstick wrapped with multilayer LDPE active films containing chitosan at 5°C during 6 days and they reported that efficiency in inhibiting total aerobic mesophilic bacteria (APC), total coliforms and total molds and yeasts had been evaluated by comparison with control bag (LDPE-polyamide-LDPE). APC counts of samples packed 1.03 log had been lower than those of samples packed in control bags (Soysal et al., 2015). Also, Guo, Jin, Wang, Scullen, and Sommers (2014) have produced poly(-lactic) acid (PLA) films coated chitosan. They have observed that this antimicrobial packaging system can inhibit the growth of *Listeria innocua* from meat surface up to 0.8 log.

Others: There are many different antimicrobial agents used in antimicrobial packaging system such as lauric acid esters, cinnamaldehyde or lysozyme (Table 1). And also antimicrobial agent can be extracted from well-known plants such as green tea extracts. Due to polyphenol content of green tea, it can decelerate growth of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, and *Vibrio cholera* (Siripatrawan & Noipha, 2012). Siripatrawan and Noipha (2012) have reported that edible active film containing green tea extract have successful on microbial growth inhibition and prolonged shelf life of pork sausages.

Table 1. Recent antimicrobial active packaging studies

Antimicrobial Type	Antimicrobial name	Polymer/Carrier	Aim of the incorporation	Applied food system	Target microorganism	Reference
Organic acids	Potassium sorbate	LLDPE	-Diffusion into food simulant -Antimicrobial activity	Food simulant :acetate buffer pH 4.2	Yeasts	Kuplennik et al. (2015)
		Starch-clay composite	-Diffusion into food simulant -Antimicrobial activity	Semisolid agar simulant	<i>Aspergillus niger</i>	Barzegar et al. (2014)
		Chitosan film	-Diffusion into food simulant	Water	--	Yoshida et al. (2010)
		Whey film	-Diffusion into food simulant	Water-glycerol system	--	Ozdemir and Floros (2001)
	Sorbic acid	LDPE	-Antimicrobial activity	Pastry dough	-Aerobic mesophilic count -psychrophilic - <i>Stapylococcus aureus</i> -fungus -yeast	Silveira et al. (2007)
		PVA	Antimicrobial activity	Gouda cheese	- <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Saccharomyces cerevisiae</i> - <i>Escherichia coli</i>	Hauser and Wunderlich (2011)
Bacteriocin	Nisin	HPMC film	Diffusion into food simulant	Agarose gel	--	Sebti et al. (2003)
		-Sodium caseinate -Poly (lactic) acid (PLA) -Chitosan	-Diffusion into food simulant -Antimicrobial activity	Water- ethanol solution	- <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Staphylococcus aureus</i>	Imran et al. (2014)
		PLA	Antimicrobial activity	Deli turkey meat	<i>Listeria innocua</i>	Guo et al. (2014)
		-Corn zein -Wheat gluten	-Diffusion into food simulant -Antimicrobial activity	Water	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Teerakarn et al. (2002)

		Chitosan/PVA	-Diffusion into food simulant -Antimicrobial activity	Water	<i>Staphylococcus aureus</i>	Wang et al. (2015)	
		Starch based film	Antimicrobial activity	--	Gram negative cocci	Bhatia and Bharti (2015)	
		LDPE	-Diffusion into food simulant -Antimicrobial activity	-Water -PBS system	<i>Micrococcus luteus</i>	Mauriello et al. (2005)	
		Poly(butylene adipate-co-terephthalate)	Diffusion into food simulant	Water	--	L. Bastarrachea, Dhawan, Sablani, and Powers (2010)	
Natural oils	Essential	Carvacrol	Starch based	Diffusion into food simulant	Fatty-food simulant	--	Kuorwel et al. (2013)
			LDPE/Clay	Antimicrobial activity	--	<i>-Escherichia coli</i> <i>-Listeria innocua</i> <i>-Alternaria alternata</i>	Shemesh et al. (2015)
			LDPE	Diffusion into food simulant	Food Simulants: class B	--	Campos-Requena, Rivas, Perez, Garrido-Miranda, and Pereira (2015)
		-Linalool -Thymol	Starch based	Diffusion into food simulant	Fatty-food simulant	--	Kuorwel et al. (2013)
		Clove	LLDPE	Antimicrobial activity	Chicken	<i>-Salmonella enterica</i> <i>-Listeria monocytogenes</i>	Mulla et al. (2017)
		-Ginger -Fingerroot -Plai	HPMC	Antimicrobial activity	--	<i>-Staphylococcus aureus</i> <i>- Escherichia coli</i>	Klangmuang and Sothornvit (2016)
		Allyl isothiocyanate	PLA	--	--	--	Kurek et al. (2017)

Food and Health, 4(1): 63-79 (2018)

Journal abbreviation: **Food Health**

	-Rosemary +Asian spices -Rosemary +Italian spices	MC	Antimicrobial activity	Broccoli	- <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Escherichia coli</i> - <i>Salmonella</i>	Takala et al. (2013)
Metals	Silver	-LDPE -PP -polyolefin	--	--	--	Echegoyen and Nerin (2013)
		Composite film types	Antimicrobial activity	--	Gram negative and positive bacteria	Rhim, Wang, et al. (2013)
		Cellulose based	Antimicrobial activity	--	- <i>Escherichia coli</i> - <i>Staphylococcus aureus</i>	de Moura, Mattoso, and Zucolotto (2012)
		LDPE	Antimicrobial activity	Chicken breast	-Total viable count -psychrophilic bacteria - <i>Pseudomonas</i> spp. - <i>Brochothrix thermosphacta</i> -lactic acid bacteria -total coliforms - <i>Escherichia coli</i>	Azlin-Hasim et al. (2015)
		Commercial plastic containers	Diffusion into food simulant	Simulant recommended by European commission 97/48/EC	--	von Goetz et al. (2013)
		PLA	-Diffusion into food simulant -Antimicrobial activity	HNO ₃ solution	<i>Salmonella</i> spp.	Busolo, Fernandez, Ocio, and Lagaron (2010)
		Polyamide	Diffusion into food simulant	--	--	Kumar and Munstedt (2005)
	Silver-zinc	Polyamide	Antimicrobial activity	Chicken and beef sausages	- <i>Salmonella</i> - <i>Pseudomonas</i> - <i>Penicillium</i> - <i>Listeria</i>	Patiño et al. (2014)
		LDPE	Antimicrobial activity	Chicken breast	- <i>Listeria</i> - <i>Pseudomonas</i> - <i>Escherichia coli</i>	Panea, Ripoll, González, Fernández-Cuello, and Albertí (2014)

Food and Health, 4(1): 63-79 (2018)

Journal abbreviation: **Food Health**

	Silver-Titanium dioxide	PLA	-Diffusion into food simulant -Antimicrobial activity	Simulant recommended by European commission 85/572/EEC	- <i>Escherichia coli</i> - <i>Listeria monocytogenes</i>	Li et al. (2017)
Polysaccharide	Chitosan	Pectin based	--	--	--	Lorevice, Otoni, de Moura, and Mattoso (2016)
		PLA	Antimicrobial activity	Turkey meat	<i>Listeria innocue</i>	Guo et al. (2014)
Other antimicrobial agents	Lauric acid ester	PLA	Antimicrobial activity	Turkey meat	<i>Listeria innocue</i>	Guo et al. (2014)
		Chitosan	--	--	- <i>Lactobacillus sakei</i> - <i>Serratia liquefaciens</i> - <i>Enterobacteriaceae</i> -Total LAB	Ouattara et al. (2000)
	Cinnamaldehyde	Chitosan	--	--	<i>Lactobacillus sakei</i> - <i>Serratia liquefaciens</i> - <i>Enterobacteriaceae</i> -Total LAB	Ouattara et al. (2000)
	-Lysozyme -Ethylendiamine-tetraacetate	Starch based film	Antimicrobial activity	--	Gram negative cocci	Bhatia and Bharti (2015)
	Green tea extract	Chitosan	Antimicrobial activity	Pork sausages	-Total viable count -Yeast -Mold	Siripatrawan and Noipha (2012)

Influence of Antimicrobial Substances on Engineering Properties of Films

Assessing engineering features of packaging material is the first step for designing a packaging material for foods. The engineering properties of films are tensile and barrier properties. While tensile values such as tensile strength, elastic modulus and elongation at break are important for measuring durability of polymers under a force, knowing barrier properties of a packaging material such as water vapor and oxygen permeability is crucial in terms of controlling food quality changes during storage. These properties can be affected by addition of antimicrobial which are mainly dependent on the molecular weight of antimicrobial agents, the interaction between polymer and antimicrobials (Bastarrachea, Dhawan, & Sablani, 2011). Synthetic polymers include polyethylene (PE), polypropylene (PP), polystyrene (PS), ethylene-vinyl acetate (EVA), polyvinyl chloride (PVC), polyamide (PA) and polybutyrate (PBAT) have been preferred mostly in antimicrobial active packaging technology along with some cellulose or gelatin based biopolymers.

The changes in mechanical properties after addition of antimicrobial into film blend are mainly dependent on the solubility of antimicrobial into blend. Generally, if antimicrobial agents can incorporate with film matrix well, the tensile strength and elongation at break either remain unchanged or change positively (Clarke et al., 2016; Pires et al., 2008).

Another important factor is the incorporation method of antimicrobial into polymer, such as lamination, blending using different techniques, spraying onto film surface (Bastarrachea et al., 2011). It had been reported that the mechanical properties were not dependent on deposition methods of silver nanoparticles into multilayer PE films via three deposition methods that were lamination and extrusion, blending through sonication and solution-casting method, and spraying (Sanchez-Valdes, Ortega-Ortiz, Valle, Medellin-Rodriguez, & Guedea-Miranda, 2009). Moreover Pires et al. (2008) had stated that the incorporation of antimicrobial compounds, nisin and natamycin, had led to decrease the resistance and elongation of the films and caused changes in their molecular conformation. For example, the addition of nisin into cellulose derivative polymers had affected the elongation at break values adversely and decreased more than four times compared with control films (Pires et al., 2008).

The addition of antimicrobials into film blends may affect the mechanical features in good ways. In a study, commercial antimicrobial combinations containing sodium citrate, sodium metabisulfite, citric, malic acids etc. had been incorporated with gelatin based films and resulted improvement in tensile strength and elongation at break due to interfering of antimicrobials with film cross-linkages (Clarke et al., 2016).

Gas barrier properties is crucial for food packaging technology since insufficient barrier features can lead to acceleration of food spoilage mechanism such as lipid oxidation, microbial growth or/and textural changes (Kashiri et al., 2016). Gas barrier properties can be altered by addition of antimicrobial and it is not always negative. If polymer films incorporated with a hydrophobic antimicrobial agent, water vapor permeability property may decrease which is a desirable result for film production, yet it should not be generalized. On the other hand, antimicrobial substances can create pinhole through film matrix due to its solubility into film blend and cause to increase gas permeability. For example addition of silver to the films can change the physical properties; Rhim, Park, et al. (2013) reported that silver incorporation had led to significant increase in water vapor barrier properties and surface hydrophobicity (Rhim, Wang, et al., 2013). Also, in another research it was notified that the addition of potassium sorbate in films, it has caused to change water permeability and elongation positively but not in tensile strength (Barzegar, Azizi, Barzegar, & Hamidi-Esfahani, 2014) indicating the effect of antimicrobial type used in film on physical properties of films.

Bierhalz, da Silva, de Sousa, Braga, and Kieckbusch (2013) had reported that nisin and natamycin had been added into film matrix resulting in enhancing the water vapor permeability of the films since it might cause micro or macro heterogeneities in polymer structure due to the presence of antimicrobial's (Bierhalz et al., 2013). Unlike tensile properties, it was reported that the loading method of antimicrobial in active packaging films influence the barrier properties of the films. The new loading methods such as immersion or supercritical solvent impregnation help to incorporate especially hydrophobic antimicrobial in film homogeneously resulting good barrier properties of films (Bierhalz et al., 2013).

The final barrier properties of improved films were dependent on type of antimicrobial added

and polymer structure of the film. For designing an antimicrobial active packaging this point was also investigated due improper packaging material with low mechanical property may not be helpful for packaging purposes.

Conclusion

Antimicrobial active packaging technology has gained great interest because of the high potential to inhibit microbial growth without addition a chemical in food system or minimizing concentration of the chemical used for. Up to now, there are plenty of studies revealed that antimicrobial films help to improve of shelf life of food products. In literature, there is a tendency to look for new natural and/or harmless antimicrobial constituent that are more efficient and durable than antimicrobial used currently in active packaging technology such as sorbic acid. Moreover, biopolymers as antimicrobial carrier has also get great interest due to environmental concerns. However there are some limitations to use biopolymers such as degradation rates under various conditions, changes in mechanical properties and potential microbial growth. On the other hand, petroleum-based plastic materials are cheap, convenient and have excellent physicochemical properties that are why plastic materials have been widely used since the middle of twenty century. Therefore, studies must be increased to develop bio-composite for food packaging films with good mechanical, barrier and thermal properties.

During designing antimicrobial active films some analysis such as antimicrobial efficiency, the mechanical and barrier features of films should be performed since even small quantities of corresponding antimicrobial can alter film properties in unpredictable ways. This information is needed to understand practicability of designed film into industrial scale.

References

- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *Lwt-Food Science and Technology*, 43(6), 837-842.
- Appendini, P., & Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(2), 113-126.
- Azlin-Hasim, S., Cruz-Romero, M. C., Morris, M. A., Cummins, E., & Kerry, J. P. (2015). Effects of a combination of antimicrobial silver low density polyethylene nanocomposite films and modified atmosphere packaging on the shelf life of chicken breast fillets. *Food Packaging and Shelf Life*, 4, 26-35.
- Barzegar, H., Azizi, M. H., Barzegar, M., & Hamidi-Esfahani, Z. (2014). Effect of potassium sorbate on antimicrobial and physical properties of starch-clay nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers*, 110, 26-31.
- Bastarrachea, L., Dhawan, S., & Sablani, S. S. (2011). Engineering Properties of Polymeric-Based Antimicrobial Films for Food Packaging: A Review. *Food Engineering Reviews*, 3(2), 79-93.
- Bastarrachea, L., Dhawan, S., Sablani, S. S., & Powers, J. (2010). Release kinetics of nisin from biodegradable poly(butylene adipate-co-terephthalate) films into water. *Journal of Food Engineering*, 100(1), 93-101.
- Bhatia, S., & Bharti, A. (2015). Evaluating the antimicrobial activity of Nisin, Lysozyme and Ethylenediaminetetraacetate incorporated in starch based active food packaging film. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 52(6), 3504-3512.
- Bierhalz, A. C. K., da Silva, M. A., de Sousa, H. C., Braga, M. E. M., & Kieckbusch, T. G. (2013). Influence of natamycin loading methods on the physical characteristics of alginate active films. *The Journal of Supercritical Fluids*, 76, 74-82.
- Bierhalz, A. C. K., da Silva, M. A., & Kieckbusch, T. G. (2012). Natamycin release from alginate/pectin films for food packaging applications. *Journal of Food Engineering*, 110(1), 18-25.
- Branen, A. L., Davidson, P. M., Salminen, S., & Thorngate, J. (2001). *Food additives*: CRC Press.
- Brennan, J. G., & Grandison, A. S. (2012). *Food processing handbook*: John Wiley & Sons.
- Busolo, M. A., Fernandez, P., Ocio, M. J., & Lagaron, J. M. (2010). Novel silver-based nanoclay as an antimicrobial in polylactic acid food packaging coatings. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 27(11), 1617-1626.

- Campos-Requena, V. H., Rivas, B. L., Perez, M. A., Garrido-Miranda, K. A., & Pereira, E. D. (2015). Polymer/clay nanocomposite films as active packaging material: Modeling of antimicrobial release. *European Polymer Journal*, 71, 461-475.
- Clarke, D., Molinaro, S., Tyuftin, A., Bolton, D., Fanning, S., & Kerry, J. P. (2016). Incorporation of commercially-derived antimicrobials into gelatin-based films and assessment of their antimicrobial activity and impact on physical film properties. *Food Control*, 64, 202-211.
- Cruz-Romero, M. C., Murphy, T., Morris, M., Cummins, E., & Kerry, J. P. (2013). Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications. *Food Control*, 34(2), 393-397.
- de Moura, M. R., Mattoso, L. H. C., & Zucolotto, V. (2012). Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging. *Journal of Food Engineering*, 109(3), 520-524.
- Dobias, J., Chudackova, K., Voldrich, M., & Marek, M. (2000). Properties of polyethylene films with incorporated benzoic anhydride and/or ethyl and propyl esters of 4-hydroxybenzoic acid and their suitability for food packaging. *Food Additives and Contaminants*, 17(12), 1047-1053.
- Dotto, G. L., Buriol, C., & Pinto, L. A. A. (2014). Diffusional mass transfer model for the adsorption of food dyes on chitosan films. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(11), 2324-2332.
- Duncan, T. V. (2011). Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363(1), 1-24.
- Duran, M., Aday, M. S., Zorba, N. N. D., Temizkan, R., Buyukcan, M. B., & Caner, C. (2016). Potential of antimicrobial active packaging 'containing natamycin, nisin, pomegranate and grape seed extract in chitosan coating' to extend shelf life of fresh strawberry. *Food and Bioproducts Processing*, 98, 354-363.
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114(4), 1173-1182.
- Echegoyen, Y., & Nerin, C. (2013). Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 16-22.
- El-Saharty, Y. S., & Bary, A. A. (2002). High-performance liquid chromatographic determination of nutraceuticals, glucosamine sulphate and chitosan, in raw materials and dosage forms. *Analytica Chimica Acta*, 462(1), 125-131.
- Fucinos, C., Miguez, M., Cerqueira, M. A., Costa, M. J., Vicente, A. A., Rua, M. L., & Pastrana, L. M. (2015). Functional Characterisation and Antimicrobial Efficiency Assessment of Smart Nanohydrogels Containing Natamycin Incorporated into Polysaccharide-Based Films. *Food and Bioprocess Technology*, 8(7), 1430-1441.
- Guo, M., Jin, T. Z., Wang, L., Scullen, O. J., & Sommers, C. H. (2014). Antimicrobial films and coatings for inactivation of *Listeria innocua* on ready-to-eat deli turkey meat. *Food Control*, 40, 64-70.
- Hauser, C., & Wunderlich, J. (2011). Antimicrobial packaging films with a sorbic acid based coating. *Procedia Food Science*, 1, 197-202.
- Imran, M., Klouj, A., Revol-Junelles, A.-M., & Desobry, S. (2014). Controlled release of nisin from HPMC, sodium caseinate, polylactic acid and chitosan for active packaging applications. *Journal of Food Engineering*, 143, 178-185.
- Kaba, N., & Duyar, H. A. (2008). Antimikrobiyal Paketleme. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 25(2), 181-185.
- Kapetanakou, A. E., Agathagelou, E. I., & Skandamis, P. N. (2014). Storage of pork meat under modified atmospheres containing vapors from commercial alcoholic beverages. *International Journal of Food Microbiology*, 178, 65-75.
- Kashiri, M., Cerisuelo, J. P., Dominguez, I., Lopez-Carballo, G., Hernandez-Munoz, P.,

- & Gavara, R. (2016). Novel antimicrobial zein film for controlled release of lauroyl arginate (LAE). *Food Hydrocolloids*, 61, 547-554.
- Klangmuang, P., & Sothornvit, R. (2016). Barrier properties, mechanical properties and antimicrobial activity of hydroxypropyl methylcellulose-based nanocomposite films incorporated with Thai essential oils. *Food Hydrocolloids*, 61, 609-616.
- Kumar, R., & Munstedt, H. (2005). Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites. *Biomaterials*, 26(14), 2081-2088.
- Kuorwel, K. K., Cran, M. J., Sonneveld, K., Miltz, J., & Bigger, S. W. (2013). Migration of antimicrobial agents from starch-based films into a food simulant. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 432-438.
- Kuplennik, N., Tchoudakov, R., Zelas, Z. B. B., Sadovski, A., Fishman, A., & Narkis, M. (2015). Antimicrobial packaging based on linear low-density polyethylene compounded with potassium sorbate. *Lwt-Food Science and Technology*, 62(1), 278-286.
- Kurek, M., Laridon, Y., Torrieri, E., Guillard, V., Pant, A., Stramm, C., . . . Guillaume, C. (2017). A mathematical model for tailoring antimicrobial packaging material containing encapsulated volatile compounds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 42, 64-72.
- Lantano, C., Alfieri, I., Cavazza, A., Corradini, C., Lorenzi, A., Zucchetto, N., & Montenero, A. (2014). Natamycin based sol-gel antimicrobial coatings on polylactic acid films for food packaging. *Food Chemistry*, 165, 342-347.
- Li, W., Zhang, C., Chi, H., Li, L., Lan, T., Han, P., . . . Qin, Y. (2017). Development of Antimicrobial Packaging Film Made from Poly (Lactic Acid) Incorporating Titanium Dioxide and Silver Nanoparticles. *Molecules*, 22(7).
- Liu, W., & Hansen, J. N. (1990). Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8), 2551-2558.
- Lorevice, M. V., Otoni, C. G., de Moura, M. R., & Mattoso, L. H. C. (2016). Chitosan nanoparticles on the improvement of thermal, barrier, and mechanical properties of high- and low-methyl pectin films. *Food Hydrocolloids*, 52, 732-740.
- Matsumura, Y., Yoshikata, K., Kunisaki, S. i., & Tsuchido, T. (2003). Mode of Bactericidal Action of Silver Zeolite and Its Comparison with That of Silver Nitrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7), 4278-4281.
- Mauriello, G., De Luca, E., La Storia, A., Villani, F., & Ercolini, D. (2005). Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging. *Letters in Applied Microbiology*, 41(6), 464-469.
- Mulla, M., Ahmed, J., Al-Attar, H., Castro-Aguirre, E., Arfat, Y. A., & Auras, R. (2017). Antimicrobial efficacy of clove essential oil infused into chemically modified LLDPE film for chicken meat packaging. *Food Control*, 73, 663-671.
- O' Callaghan, K. A. M., & Kerry, J. P. (2014). Assessment of the antimicrobial activity of potentially active substances (nanoparticled and non-nanoparticled) against cheese-derived microorganisms. *International Journal of Dairy Technology*, 67(4), 483-489.
- Olasupo, N. A., Fitzgerald, D. J., Gasson, M. J., & Narbad, A. (2003). Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Letters in Applied Microbiology*, 37(6), 448-451.
- Ouattara, B., Simard, R. E., Piette, G., Bégin, A., & Holley, R. A. (2000). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1), 139-148.
- Ozdemir, M., & Floros, J. D. (2001). Analysis and modeling of potassium sorbate diffusion through edible whey protein films. *Journal of Food Engineering*, 47(2), 149-155.
- Ozdemir, M., & Floros, J. D. (2004). Active food packaging technologies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(3), 185-193.

- Panea, B., Ripoll, G., González, J., Fernández-Cuello, A., & Albertí, P. (2014). Effect of nanocomposite packaging containing different proportions of ZnO and Ag on chicken breast meat quality. *Journal of Food Engineering*, 123, 104-112.
- Patiño, J. H., Henríquez, L. E., Restrepo, D., Mendoza, M. P., Lantero, M. I., & García, M. A. (2014). Evaluation of polyamide composite casings with silver-zinc crystals for sausages packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 1(1), 3-9.
- Pekcan, G., Köksal, E., Küçükerdönmez, O., & Ozel, H. (2006). Household food wastage in Turkey. *Rome, Italy: FAO*.
- Perez, L. M., Soazo, M. D., Balague, C. E., Rubiolo, A. C., & Verdini, R. A. (2014). Effect of pH on the effectiveness of whey protein/glycerol edible films containing potassium sorbate to control non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ready-to-eat foods. *Food Control*, 37, 298-304.
- Pires, A. C. D., Soares, N. D. F., de Andrade, N. J., do Silva, L. H. M., Camilloto, G. P., & Bernardes, P. C. (2008). Development and Evaluation of Active Packaging for Sliced Mozzarella Preservation. *Packaging Technology and Science*, 21(7), 375-383.
- Rhim, J. W., Park, H. M., & Ha, C. S. (2013). Bio-nanocomposites for food packaging applications. *Progress in Polymer Science*, 38(10-11), 1629-1652.
- Rhim, J. W., Wang, L. F., & Hong, S. I. (2013). Preparation and characterization of agar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 33(2), 327-335.
- Ripoche, A. C., Chollet, E., Peyrol, E., & Sebti, I. (2006). Evaluation of nisin diffusion in a polysaccharide gel: Influence of agarose and fatty content. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 7(1-2), 107-111.
- Rodriguez-Martinez, A. V., Sendon, R., Abad, M. J., Gonzalez-Rodriguez, M. V., Barros-Velazquez, J., Aubourg, S. P., . . . de Quiros, A. R. B. (2016). Migration kinetics of sorbic acid from polylactic acid and seaweed based films into food simulants. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 630-636.
- Sanchez-Valdes, S., Ortega-Ortiz, H., Valle, L. F. R. D., Medellin-Rodriguez, F. J., & Guedea-Miranda, R. (2009). Mechanical and Antimicrobial Properties of Multilayer Films with a Polyethylene/Silver Nanocomposite Layer. *Journal of Applied Polymer Science*, 111(2), 953-962.
- Sebti, I., Carnet, A. R., Blanc, D., Saurel, R., & Coma, V. (2003). Controlled Diffusion of an Antimicrobial Peptide from a Biopolymer Film. *Chemical Engineering Research and Design*, 81(9), 1099-1104.
- Shemesh, R., Krepker, M., Goldman, D., Danin-Poleg, Y., Kashi, Y., Nitzan, N., . . . Segal, E. (2015). Antibacterial and antifungal LDPE films for active packaging. *Polymers for Advanced Technologies*, 26(1), 110-116.
- Silveira, M. F. A., Soares, N. F. F., Geraldine, R. M., Andrade, N. J., & Goncalves, M. P. J. (2007). Antimicrobial efficiency and sorbic acid migration from active films into pastry dough. *Packaging Technology and Science*, 20(4), 287-292.
- Siripatrawan, U., & Noipha, S. (2012). Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 102-108.
- Siripatrawan, U., & Vitchayakitti, W. (2016). Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocolloids*, 61, 695-702.
- Sohaib, M., Anjum, F. M., Arshad, M. S., & Rahman, U. U. (2016). Postharvest intervention technologies for safety enhancement of meat and meat based products; a critical review. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 53(1), 19-30.
- Song, H., Li, B., Lin, Q. B., Wu, H. J., & Chen, Y. (2011). Migration of silver from nanosilver-polyethylene composite packaging into food simulants. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(12), 1758-1762.
- Soysal, C., Bozkurt, H., Dirican, E., Guclu, M., Bozhuyuk, E. D., Uslu, A. E., & Kaya, S. (2015). Effect of antimicrobial packaging on physicochemical and microbial quality of chicken drumsticks. *Food Control*, 54, 294-299.

- Sung, S.-Y., Sin, L. T., Tee, T.-T., Bee, S.-T., Rahmat, A., Rahman, W., Tan, A. C., & Vikhraman, M. (2013). Antimicrobial agents for food packaging applications. *Trends in Food Science & Technology*, 33(2), 110-123.
- Takala, P. N., Vu, K. D., Salmieri, S., Khan, R. A., & Lacroix, M. (2013). Antibacterial effect of biodegradable active packaging on the growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in fresh broccoli stored at 4 degrees C. *LWT-Food Science and Technology*, 53(2), 499-506.
- Teerakarn, A., Hirt, D. E., Acton, J. C., Rieck, J. R., & Dawson, P. L. (2002). Nisin diffusion in protein films: Effects of film type and temperature. *Journal of Food Science*, 67(8), 3019-3025.
- von Goetz, N., Fabricius, L., Glaus, R., Weitbrecht, V., Gunther, D., & Hungerbuhler, K. (2013). Migration of silver from commercial plastic food containers and implications for consumer exposure assessment. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(3), 612-620.
- Wang, H. L., Hao, L. L., Wang, P., Chen, M. M., Jiang, S. W., & Jiang, S. T. (2017). Release kinetics and antibacterial activity of curcumin loaded zein fibers. *Food Hydrocolloids*, 63, 437-446.
- Wang, H. L., Zhang, R., Zhang, H., Jiang, S. W., Liu, H., Sun, M., & Jiang, S. T. (2015). Kinetics and functional effectiveness of nisin loaded antimicrobial packaging film based on chitosan/poly(vinyl alcohol). *Carbohydrate Polymers*, 127, 64-71.
- Yoshida, C. M. P., Bastos, C. E. N., & Franco, T. T. (2010). Modeling of potassium sorbate diffusion through chitosan films. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 584-589.
- Zendo, T., Nakayama, J., Fujita, K., & Sonomoto, K. (2008). Bacteriocin detection by liquid chromatography/mass spectrometry for rapid identification. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2), 499-507.
- Zhou, F., Ji, B. P., Zhang, H., Jiang, H., Yang, Z. W., Li, J. J., Li, J. H., Ren, Y. L., & Yan, W. J. (2007). Synergistic effect of thymol and carvacrol combined with chelators and organic acids against *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Protection*, 70(7), 1704-1709.