

**T.C.**  
**PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**MODİFİYE ATMOSFERDE PAKETLENEREK DEPOLANAN  
BESİYERİ VE YARI-KURUTULMUŞ KIRMIZIBİBERLERDE  
*Aspergillus flavus* GELİŞİMİ VE AFLATOKSİN OLUŞUMU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**UFUK GÖKÇE AYRANCI**

**DENİZLİ, MAYIS - 2019**

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**



**MODİFİYE ATMOSFERDE PAKETLENEREK DEPOLANAN  
BESİYERİ VE YARI-KURUTULMUŞ KIRMIZIBİBERLERDE  
*Aspergillus flavus* GELİŞİMİ VE AFLATOKSİN OLUŞUMU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**UFUK GÖKÇE AYRANCI**

**DENİZLİ, MAYIS - 2019**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Ufuk Gökçe AYRANCI tarafından hazırlanan “Modifiye Atmosferde Paketlenerek Depolanan Besiyeri ve Yarı-kurutulmuş Kırmızıbiberlerde *Aspergillus flavus* Gelişimi ve Aflatoksin Oluşumu” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 31.05.2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman

Doç. Dr. Hakan KARACA

Üye

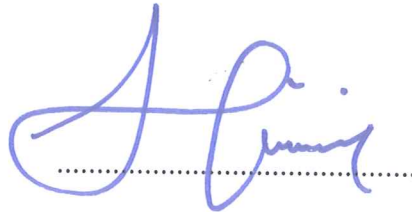
Prof. Dr. Sebahattin NAS

Üye

Prof. Dr. Yusuf YILMAZ



Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 12/06/2019 tarih ve 24/11... sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Prof. Dr. Uğur YÜCEL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2017 FEBE 031 no'lu proje ile desteklenmiştir.**

**Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.**

**Ufuk Gökçe AYRANCI**



## ÖZET

### MODİFİYE ATMOSFERDE PAKETLENEREK DEPOLANAN BESİYERİ VE YARI-KURUTULMUŞ KIRMIZIBİBERLERDE *Aspergillus flavus* GELİŞİMİ VE AFLATOKSİN OLUŞUMU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

UFUK GÖKÇE AYRANCI

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. HAKAN KARACA)

DENİZLİ, MAYIS - 2019

Bu çalışmada, modifiye atmosferde paketlenmenin (MAP) aflatoksin üreticisi *Aspergillus flavus* küfünün gelişimi ve aflatoksin üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, yarı kurutulmuş kırmızıbiber örnekleri ve farklı pH değerlerine (3.5, 5.6, 7.0 ve 9.0) ayarlanmış potato dextrose agar (PDA) besiyerleri *A. flavus* küfü ile inoküle edilmiş ve farklı gaz atmosferleri (%100 N<sub>2</sub>, %70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub> ve %100 CO<sub>2</sub>) altında paketlenmiştir. 25°C'deki 8 günlük inkübasyon süresince küf gelişimi izlenmiş ve inkübasyon sonunda üretilen aflatoksin seviyeleri belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarla *A. flavus* küfünün en hızlı pH 9.0'da geliştiği, aflatoksin üretiminin ise en çok pH 5.6'ya ayarlanmış besiyerinde gerçekleştiği görülmüştür. MAP uygulaması sonucu, paket içerisindeki O<sub>2</sub> gazının azalması nedeniyle, aerob bir mikroorganizma olan *A. flavus* küfünün gelişiminde yavaşlamanın meydana geldiği tespit edilmiştir. Kırmızıbiberlerde *A. flavus* küfünün gelişimini inhibe etmede %70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub> atmosferi %100 N<sub>2</sub> gazına göre daha etkili bulunmuş (p<0.05), ancak üretilen aflatoksin miktarları incelendiğinde bu iki gaz kompozisyonu arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark tespit edilmemiştir (p>0.05). Hem besiyeri ortamında hem de kırmızıbiber örneklerinde, küf gelişimini ve aflatoksin üretimini inhibe etmede en etkin MAP uygulamasının %100 CO<sub>2</sub> atmosferi olduğu saptanmıştır. Bu bulgular, MAP uygulamasının özellikle de yüksek CO<sub>2</sub> gaz karışımlarının birçok gıdada sorunlara yol açan *A. flavus* küfünün gelişimi ve toksin üretimi üzerine etkili olabileceğini ortaya koymuştur.

**ANAHTAR KELİMELER:** Modifiye Atmosferde Paketleme, *Aspergillus flavus*, Aflatoksin, pH, Kırmızıbiber

## ABSTRACT

### **AN INVESTIGATION OF THE EFFECT OF MODIFIED ATMOSPHERE PACKAGING APPLICATION ON GROWTH AND AFLATOXIN PRODUCTION OF *Aspergillus flavus***

MSC THESIS

UFUK GOKCE AYRANCI

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

FOOD ENGINEERING

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. HAKAN KARACA)

DENİZLİ, May 2019

In this study, the effect of modified atmosphere packaging (MAP) on growth and aflatoxin production of toxigenic *Aspergillus flavus* was investigated. For this purpose, semi-dried red peppers and potato dextrose agar (PDA) media with different pH values (3.5, 5.6, 7.0 and 9.0) were inoculated with *A. flavus* and packaged under different gas atmospheres (100% N<sub>2</sub>, 70% N<sub>2</sub> + 30% CO<sub>2</sub> and 100% CO<sub>2</sub>). Mold growth was monitored during incubation at 25°C for 8 days and the aflatoxin levels produced were determined at the end of incubation. The highest growth rate was observed in the medium at pH 9.0 and the highest toxin production was observed in the medium at pH 5.6. As a result of MAP application, due to the decrease in the concentration of oxygen in the package, a slowdown in the growth of *A. flavus* -an aerobic microorganism- occurred. It was found that 70% N<sub>2</sub> + 30% CO<sub>2</sub> atmosphere was more effective than %100 N<sub>2</sub> gas in inhibiting the growth of *A. flavus* in red peppers; however, there was an insignificant difference between these two gas compositions in terms of the aflatoxin production of the mold ( $p>0.05$ ). In both PDA and red pepper, 100% CO<sub>2</sub> gas atmosphere was the most effective MAP application in inhibiting the growth and aflatoxin production of *A. flavus*. These results revealed that MAP applications, especially gas mixtures with high concentrations of CO<sub>2</sub>, could have a potential to be used for inhibiting the growth and toxin production of *A. flavus*, which is a problematic microorganism for many food products.

**KEYWORDS:** Modified Atmosphere Packaging, *Aspergillus flavus*, Aflatoxin, pH, Red pepper

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ .....	vi
SEMBOL LİSTESİ.....	vii
ÖNSÖZ.....	viii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Tezin Amacı .....	2
1.2 Literatür Özeti .....	2
1.2.1 Küfler ve Mikotoksinler.....	2
1.2.1.1 Küfler .....	2
1.2.1.2 Mikotoksinler .....	3
1.2.1.2.1 Aflatoksinler .....	5
1.2.2 Modifiye Atmosferde Paketleme İşlemi .....	10
1.2.2.1 Pasif Modifikasyon .....	11
1.2.2.2 Aktif Modifikasyon.....	12
1.2.2.3 Modifiye Atmosferde Paketleme Tekniğinin Gıda Maddeleri Üzerine Etkisi .....	15
<b>2. YÖNTEM.....</b>	<b>20</b>
2.1 <i>Aspergillus flavus</i> küfünün Gelişme Koşulları, Muhafazası ve Gelişim Takibinin Yapılması.....	20
2.2 Örneklerin Modifiye Atmosfer Altında Paketlenmesi .....	20
2.2.1 Paketleme Materyalinin Belirlenmesi.....	21
2.2.2 Paket İçi Gaz Atmosferi Bileşiminin Belirlenmesi.....	22
2.3 <i>Aspergillus flavus</i> Küfünün Farklı Ortamlardaki Gelişiminin Takibi .....	22
2.3.1 PDA Besiyeri Ortamında <i>Aspergillus flavus</i> Küfünün Gelişiminin Takibi .....	23
2.3.1.1 <i>Aspergillus flavus</i> Spor Süspansiyonunun Hazırlanması .....	23
2.3.1.2 Besiyeri Ortamının Modifiye Atmosfer için Hazırlanması .....	23
2.3.2 Kırmızıbiberde <i>Aspergillus flavus</i> Küfünün Gelişiminin Takibi ..	25
2.3.2.1 Kırmızıbiberin Modifiye Atmosfer Paketleme için Hazırlanması.....	25
2.4 Aflatoksin Analizleri .....	27
2.4.1 Aflatoksin Standart Çözeltilisinin Hazırlanması.....	28
2.4.2 Ekstraksiyon, Temizleme ve Enjeksiyon.....	30
2.5 Aflatoksin Analizlerinde Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırının (LOQ) Belirlenmesi .....	31
2.6 İstatistik Analiz.....	32
<b>3. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>33</b>



3.1 Farklı Paketleme Materyallerinin Paket İçi Gaz Bileşimine Etkisi .....	33
3.1.1 <i>Aspergillus flavus</i> Küfü ile İnoküle Edilip MAP Tekniğiyle Paketlenen PDA Besiyerlerinde Paket İçi Gaz Bileşimi Değişimi .....	35
3.1.2 <i>Aspergillus flavus</i> Küfü ile İnoküle Edilip MAP Tekniğiyle Paketlenen Kırmızıbiberlerde Paket İçi Gaz Bileşimi Değişimi.....	36
3.2 <i>Aspergillus flavus</i> Küfüne Modifiye Atmosferde Paketleme Uygulamasının Küf Gelişimi Üzerine Etkisi.....	37
3.2.1 PDA Besiyerinde <i>Aspergillus flavus</i> Küfünün Gelişimi.....	37
3.2.2 Kırmızıbiberlerde <i>Aspergillus flavus</i> Küfünün Gelişimi .....	41
3.3 Modifiye Atmosferde Paketleme Uygulamasının <i>Aspergillus flavus</i> Küfünün Aflatoksin Üretimi Üzerine Etkisi.....	42
3.3.1 PDA Besiyeri Örneklerinde Aflatoksin Üretimi.....	42
3.3.2 Kırmızıbiber Örneklerinde Aflatoksin Üretimi .....	47
<b>4. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>49</b>
<b>5. KAYNAKLAR.....</b>	<b>51</b>
<b>6. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>60</b>

# ŞEKİL LİSTESİ

## Sayfa

Şekil 1.1: 2009-2016 yılları arasında Gıda ve Yem Alarm Sisteminde bildirilen Türkiye kaynaklı tehlikelerin dağılımı .....	5
Şekil 1.2: Aflatoksin B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> , M <sub>1</sub> ve M <sub>2</sub> 'nin kimyasal yapıları .....	6
Şekil 1.3: Elektron mikroskobundan elde edilmiş resimler, <i>A. flavus</i> ve <i>A. parasiticus</i> .....	7
Şekil 2.1: Paketlemede kullanılan cihaz ve gaz tüpleri .....	21
Şekil 2.2: Paket içi gaz atmosferinin belirlenmesinde kullanılan cihaz .....	22
Şekil 2.3: Kapak kısmına delikler açılmış petri kutusu .....	24
Şekil 2.4: AFPA besiyerinde gözlemlenen tipik <i>A. flavus</i> küf kolonileri .....	27
Şekil 2.5: İçerisinde aflatoksin B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> ve G <sub>2</sub> 'yi bulunduran standart çözeltiye ait kromatogram .....	29
Şekil 2.6: Aflatoksin kalibrasyon eğrileri a) Aflatoksin B <sub>1</sub> için çizilen kalibrasyon eğrisi, b) Aflatoksin B <sub>2</sub> için çizilen kalibrasyon eğrisi, c) Aflatoksin G <sub>1</sub> için çizilen kalibrasyon eğrisi, d) Aflatoksin G <sub>2</sub> için çizilen kalibrasyon eğrisi .....	30
Şekil 3.1: Farklı pH değerlerine sahip besiyerlerinde farklı gaz atmosferlerinin etkisi .....	40
Şekil 3.2: Kırmızıbiberlerde 8 günlük inkübasyon sonucunda farklı gaz kompozisyonlarının <i>A. flavus</i> küfünün gelişimine etkisi .....	41
Şekil 3.3: Kırmızıbiber örneklerine inoküle edilen <i>A. flavus</i> küfünün gelişimi üzerine MAP'ın etkisinin AFPA besiyeri sayım sonuçları .....	41
Şekil 3.4: %70 N <sub>2</sub> + %30 CO <sub>2</sub> atmosferinde paketlenmiş pH 5.6 PDA besiyerinde aflatoksin B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> ve G <sub>2</sub> 'nin kromatogram görüntüsü .....	42
Şekil 3.5: pH'sı 3.5'a ayarlanmış PDA besiyerinde farklı gaz atmosferlerinde paketlemenin üretilen aflatoksin B <sub>1</sub> miktarı üzerine etkisi .....	43
Şekil 3.6: pH'sı 5.6'a ayarlanmış PDA besiyerinde farklı gaz atmosferlerinde paketlemenin üretilen aflatoksin B <sub>1</sub> miktarı üzerine etkisi .....	43
Şekil 3.7: pH'sı 7.0'a ayarlanmış PDA besiyerinde farklı gaz atmosferlerinde paketlemenin üretilen aflatoksin B <sub>1</sub> miktarı üzerine etkisi .....	43
Şekil 3.8: pH'sı 9.0'a ayarlanmış PDA besiyerinde farklı gaz atmosferlerinde paketlemenin üretilen aflatoksin B <sub>1</sub> miktarı üzerine etkisi .....	44
Şekil 3.9: Kırmızıbiberde farklı gaz atmosferlerinde paketlemenin üretilen aflatoksin B <sub>1</sub> miktarı üzerine etkisi .....	47

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

Tablo 1.1: Türk Gıda Kodeksi tarafından kabul edilen aflatoksin limitleri .....	8
Tablo 1.2: Besiyeri ortamında çeşitli küflerin gelişimi ve mikotoksin üretimi üzerine MAP tekniğinin etkisinin incelendiği bazı çalışmalar.....	16
Tablo 1.3: Bazı gıda maddelerinde çeşitli küflerin gelişimi ve mikotoksin üretimi üzerine MAP tekniğinin etkisinin incelendiği bazı çalışmalar .....	18
Tablo 2.1: Aflatoksin analizlerinin gerçekleştirildiği HPLC cihazının özellikleri ve analizlerdeki kromatografi şartları .....	28
Tablo 3.1: İncelenen farklı ambalaj materyallerine ait gaz ölçüm sonuçları ....	34
Tablo 3.2: Farklı pH'lara sahip PDA besiyeri üzerine inoküle edilmiş <i>A. flavus</i> küfünü içeren paketlerde bulunan gaz kompozisyonunun başlangıç ve 8 gün sonundaki O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> ve N <sub>2</sub> oranları .....	35
Tablo 3.3: Kırmızıbiber üzerine inoküle edilmiş <i>A. flavus</i> küfünü içeren paketlerde bulunan gaz kompozisyonunun başlangıç ve 8 gün sonundaki O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> ve N <sub>2</sub> oranları .....	37
Tablo 3.4: Farklı pH değerlerine sahip PDA besiyerine inoküle edilen <i>A. flavus</i> küfünün gelişimi üzerine MAP'ın inhibisyon etkisi .....	38
Tablo 3.5: Farklı pH değerlerine sahip PDA besiyerine inoküle edilen <i>A. flavus</i> küfünün aflatoksin üretimi üzerine MAP'ın etkisi.....	45
Tablo 3.6: Kırmızıbiber üzerine inoküle edilen <i>A. flavus</i> küfünün aflatoksin üretimi üzerine MAP'ın etkisi .....	47

## SEMBOL LİSTESİ

<b>g</b>	:	Gram
<b>mg</b>	:	Miligram
<b>µg</b>	:	Mikrogram
<b>L</b>	:	Litre
<b>mL</b>	:	Mililitre
<b>µL</b>	:	Mikrolitre
<b>mmol</b>	:	Milimol
<b>M</b>	:	Molar
<b>N</b>	:	Normal
<b>mm</b>	:	Milimetre
<b>cm</b>	:	Santimetre
<b>nm</b>	:	Nanometre
<b>µm</b>	:	Mikrometre
<b>m<sup>2</sup></b>	:	Metrekare
<b>cm<sup>3</sup></b>	:	Santimetreküp
<b>MPa</b>	:	Megapaskal
<b>atm</b>	:	Atmosfer Basıncı
<b>α</b>	:	Alfa
<b>°C</b>	:	Santigrat Derece
<b>a<sub>w</sub></b>	:	Su Aktivitesi
<b>kob</b>	:	Koloni Oluşturan Birim
<b>RH</b>	:	Bağıl Nem

## ÖNSÖZ

Çalışma konusunun belirlenmesi, planlanması, yürütülmesi ve sonuçların değerlendirilmesinde kıymetli fikirleriyle bana yol gösteren, beni yönlendiren, kendimi geliştirmeme yardımcı olan ve kendisiyle çalışmaktan onur duyduğum çok değerli hocam sayın Doç. Dr. Hakan Karaca'ya teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmanın yürütülmesinde gerekli olanakları sağlayan Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölüm Başkanlığı'na, değerli fikirlerini benimle paylaşan saygıdeğer hocalarıma, teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca, tez çalışmamı destekleyen üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine katkılarından dolayı teşekkür ediyorum.

Tez çalışmam süresince yan yana çalışma fırsatı bulduğum Cansu Topkaya, Elif Taşdelen, Tülin Yılmaz ve Ünkan Urgancı'ya desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürler. Ayrıca beni daima destekleyen, tecrübelerini paylaşan ve yanımda olan sevgili hocalarım Ezgi Özgören ve Senem Tüfekçi'ye de teşekkür ederim.

Son olarak hayatım boyunca benden maddi ve manevi hiçbir desteği esirgemeyen, her daim yanımda olan beni bu günlere getiren annem Ayfer Ayrancı, babam Mehmet Ayrancı ve ablam Birdesen Öge'ye sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

# 1. GİRİŞ

Aflatoksinler genellikle *Aspergillus flavus* ve *A. parasiticus*'un bazı türleri tarafından üretilen ve son derece toksik mikotoksinlerdendir. Aflatoksinlerin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub> olmak üzere dört türüne gıdalarda sıklıkla rastlanmaktadır (Gourama ve Bullerman 1995). Aflatoksinler, yol açtıkları ekonomik kayıplar ve insan sağlığı üzerindeki muhtemel olumsuz etkileri nedeni ile dikkat çekmektedir. Aflatoksinler yüksek dozlarda akut, sub-letal dozlarda ise kronik toksisite göstermektedir (Özkaya ve Temiz 2003, Aksoy 1990).

*A. flavus*'un karbonhidratça zengin substratlar üzerinde çok geniş sıcaklık aralığında gelişebilmesi, doğada çok çeşitli gıdaların aflatoksinle kontamine olmasına yol açmaktadır. Arpa, fasulye, mısır, pamuk tohumu, pirinç, buğday, yerfıstığı, kakao, antepfıstığı, fındık, pekan cevizi, baharatlar, zeytin, incir, ayçiçeği ve kırmızıbiber gibi birçok üründe aflatoksinlerin doğal olarak bulunabildiği belirlenmiştir (Oruç 2005, Türköz Bakırcı 2014).

Taze veya baharat olarak yaygın şekilde kullanılan kırmızıbiber, *Capsicum annuum* L., aflatoksin sorununun sıklıkla karşılaştığı gıdalardan biridir (Stroka ve diğ. 2000, Inan ve diğ. 2007, Tripathi ve Mishra 2009). Geleneksel olarak, biberler 8-10 gün süre ile güneş altında açık havada kurutulur. Bu uygulama yaygın bir yöntem olmakla birlikte, zaman alıcı olması, toz, toprak, kum parçacıkları ve böceklerle kirlenme ihtimalinin yüksek olması ve hava şartlarına bağlı olması gibi olumsuz durumlara sahiptir. Kurutulmuş biberlerde görülen küflerin büyük bir çoğunluğu bu kurutma yönteminden kaynaklanan sebeplerle bulaşmakta ve uygun şartlar oluşması halinde aflatoksin gibi mikotoksinlerin üretimi gerçekleşebilmektedir (Inan ve diğ. 2007).

*A. flavus*'un gelişmesi ve toksin üretmesi için bazı çevresel koşulların oluşması gerekmektedir. Aflatoksin üretiminde sıcaklık, pH, su aktivitesi ( $a_w$ ), çevrenin bağıl nemi ve atmosferdeki gazlar oldukça önemlidir (Ellis ve diğ. 1994b). *A. flavus*'un zorunlu aerob bir mikroorganizma oluşu (Gourama ve Bullerman 1995) bu küfün ancak ortamdaki oksijen ( $O_2$ ) varlığında canlılığını sürdürebileceği

anlamına gelmektedir. Gıda maddesini çevreleyen ortamdaki gaz atmosferinin değiştirilmesi -özellikle de O<sub>2</sub> konsantrasyonunun düşürülmesi- ile küf gelişimi ve toksin üretiminin önemli ölçüde azaltılması mümkün görülmektedir. Bu açıdan bakıldığında, ambalaj içerisindeki gaz atmosferinin mikrobiyal gelişim ve kimyasal bozulmaları minimize edecek şekilde değiştirildiği bir yöntem olan modifiye atmosferde paketlenme tekniği, küf gelişiminin ve toksin üretiminin önlenmesinde alternatif bir yol olarak karşımıza çıkmaktadır (Kirtil ve diğ. 2016). Söz konusu teknik, gerek mikroorganizma gelişimini engellemesi gerekse gıdada kalite kayıplarına yol açan birçok reaksiyonu yavaşlatabilmesi nedeniyle gıda sanayi tarafından yaygın olarak tercih edilmektedir.

## **1.1 Tezin Amacı**

Bu tez çalışmasının amacı, besiyeri (Potato dextrose agar, PDA) ve gıda maddesi (yarı kurutulmuş kırmızıbiber) ortamına inoküle edilen aflatoksin üreticisi *A. flavus* küfünün, farklı gaz atmosferlerinde gelişiminin ve aflatoksin üretiminin incelenmesidir.

## **1.2 Literatür Özeti**

### **1.2.1 Küfler ve Mikotoksinler**

#### **1.2.1.1 Küfler**

Küfler miselyum olarak isimlendirilen yapılardan oluşmuş, çok hücreli hareketsiz mikroorganizmalardır. Küfler gıdalarda oluşturdukları çeşitli olumlu veya olumsuz etkiler nedeniyle gıda mikrobiyolojisinde ve gıda teknolojisinde önemli bir yere sahiptir.

Küfler ürettikleri bazı enzimlerle protein, yağ ve karbonhidratları küçük moleküllerine ayırarak, ortamda yeni bileşikler sentezleyebilmekte ve bunun

sonucu olarak da gıda maddesinin lezzet, koku, yapı ve diğer özelliklerinde olumlu etkilere neden olabilmektedir. Roquefort, Camembert, Blue Stilton ve Brie peynirleri, Ang-kak, Miso, Ontjom, Shoyu (soya sosu) ve Tempeh gibi fermente gıda maddeleri bu duruma örnek verilebilir (Akkara ve Tosun 2014). Küflerin gıda üzerinde olumsuz etkileri arasında ise renk bozulmaları, acılık, istenmeyen kokuların oluşumu gibi kolayca algılanabilen değişimlerin yanı sıra besin elementlerinin kaybı ve "mikotoksin" olarak adlandırılan toksik metabolitlerin oluşumu sayılabilir (Aran 2016).

Küfler aerob ve kemoorganotrof (enerji kaynağı olarak kimyasal bileşikleri, elektron kaynağı olarak da organik maddeleri kullanan) mikroorganizmalar olup basit gereksinimleri vardır. Birçok küf çeşidi, geniş pH ve su aktivitesi değerlerinde, yüksek ozmotik basınç veya yüksek sıcaklık gibi çevre şartlarında gelişim gösterebilmektedir. Ayrıca, küflerin sporlarının doğada geniş alanlara yayılmış olmaları, bu organizmaların besin ürünlerinin, mikrobiyal kültür ortamlarının ve yüzeylerin yaygın kontaminantları olarak karşımıza çıkmalarına neden olmaktadır (Madigon ve Martinko 2010).

Üretici suşları, oluşum şartları, kimyasal yapıları ve gösterdikleri toksik etkiler bakımından birbirinden ayrılan mikotoksinlere, küf gelişiminin gözlemlendiği birçok gıdada rastlanabilir. Ancak herhangi bir gıda maddesi üzerinde küfün gelişmesi, söz konusu küfün o gıda üzerinde/içinde mutlaka toksin üreteceği anlamına gelmemektedir. Mikotoksinler, gıda ve yem maddesine bulaşmış mikotoksin üretme yeteneğine sahip (toksikjenik) küfler tarafından ancak uygun koşullar oluştuğunda üretilebilmektedir. Bununla birlikte, ürün üzerinde küfe rastlanılmaması, o üründe daha önceden mikotoksin oluşmadığı anlamına gelmemektedir. Çünkü oluşan mikotoksin, ürün üzerinde küf inaktif olduktan veya uzaklaştırıldıktan sonra dahi uzun süreler varlığını sürdürebilmektedir (Özer 2009, Demircioğlu ve Filazi 2010).

### **1.2.1.2 Mikotoksinler**

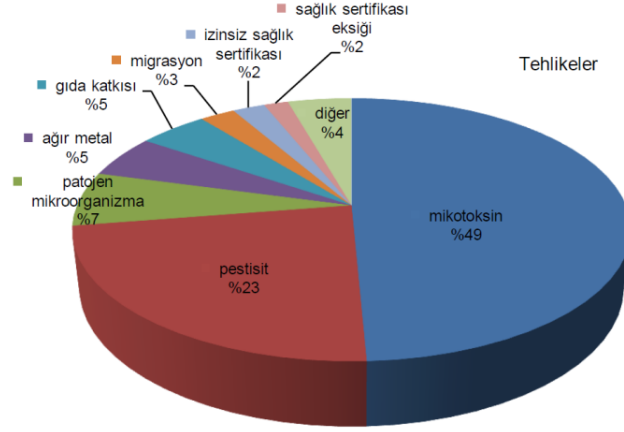
Küfler, uygun koşullarda ham ve işlenmemiş materyalde gelişerek ürünün nitelik ve niceliğini değiştirip bozulmasına neden olmakla birlikte insan sağlığı



üzerinde olumsuz etkilere sahip, "mikotoksin" olarak adlandırılan toksik maddeleri de oluşturmaktadırlar (Atasayar Sabuncuoğlu ve diğ. 2008).

Mikotoksinlerin, vücutta etkili oldukları organ ve dokulara göre veya etki mekanizmalarına bağlı olarak çeşitli olumsuz etkilerinden bahsedilebilir. Karaciğere etki edenler "hepatotoksik", deriye etki edenler "dermatoksik", böbreklerde toksik etki edenler "nefrotoksik", sinir sistemine etki edenler "nörotoksik", bağışıklık sistemini etkileyenler "immunotoksik" veya "immunosupresif" olarak tanımlanırlar. Mikotoksinlerin mutajenik, karsinojenik (kanserojen), teratojenik (embriyonal hasarlar), halusinojenik, östrojenik, tremorjen (titremeye neden olan) etkileri görülebilmektedir (Tiryaki ve diğ. 2011).

Mikotoksinler, insan sağlığı için büyük bir tehlike oluşturmasının yanında, ülkelerin ekonomileri üzerinde de önemli bir etkiye sahiptirler (Nguyen Van Long ve diğ. 2017). Dünyada bu nedenle meydana gelen ekonomik kayıpların milyarlarca dolara ulaştığı belirtilmektedir. Tüm dünyada üretilen tarımsal ürünlerin yaklaşık %25'inin mikotoksinlerle kontamine olduğu, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization, FAO) tarafından tahmin edilmektedir (Park ve diğ. 1999). Tüm bu olumsuz etkiler incelendiğinde, gıda ve yemlerde mikotoksin oluşumunun önlenmesi büyük bir önem arz etmektedir. Avrupa Birliği'nde uygulanan, Gıda ve Yemlerde Hızlı Uyarı Sistemi'nin (Rapid Alert System for Food and Feed-RASFF) son yıllardaki raporları incelendiğinde; mikotoksin kontaminasyonlarının, gıda maddeleri için yapılan uygunsuzluk bildirimleri listesinde her yıl ilk üç içerisinde yer aldığı görülmektedir (RASFF 2014, RASFF 2015, RASFF 2016, RASFF 2017, RASFF 2018). Aşağıda verilen Şekil 1.1'de 2009-2016 yılları arasında Türkiye kaynaklı olarak rapor edilen (alarm, bilgi bildirimleri, sınır iadeleri) toplam 2083 bildirim, tehlike gruplarına göre sınıflandırılmıştır. Buna göre, 993 adet tehlike bildiriminin mikotoksin kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Çınar ve diğ. 2017).



**Şekil 1.1:** 2009-2016 yılları arasında Gıda ve Yemlerde Hızlı Uyarı Sisteminde bildirilen Türkiye kaynaklı tehlikelerin dağılımı (Çınar ve diğ. 2017)

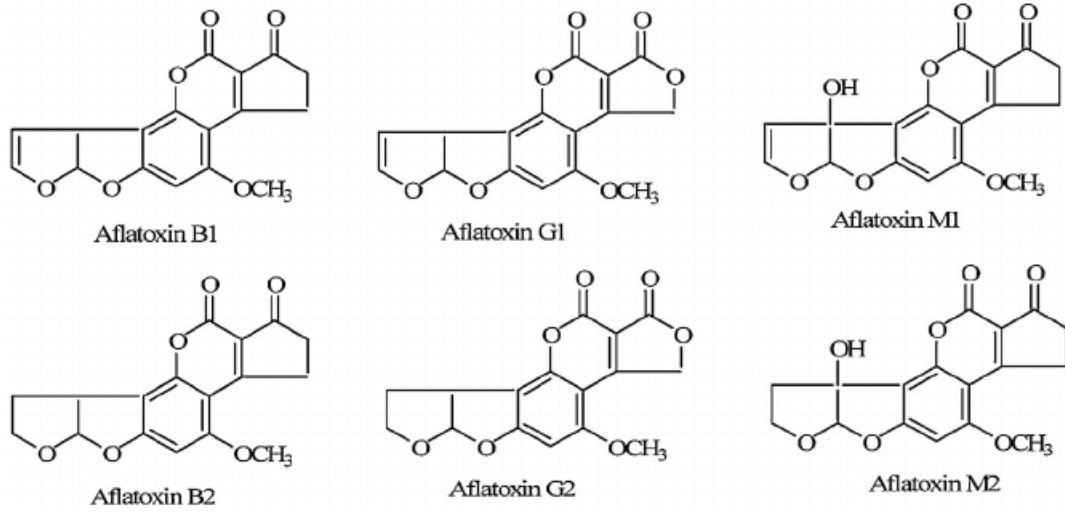
Mikotoksin üretme yeteneğine sahip olan küfler "toksikjenik küfler" olarak adlandırılmaktadır. Yaygın olarak bulunan ve mikotoksinleriyle ciddi problemlere sebep olan küfler arasında *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinslerine ait toksik suşlar örnek verilebilir. En sık karşılaşılan mikotoksinlere ise aflatoksinler, okratoksin, trikotesen, zearalenon, patulin ve fumonisin örnek verilebilir (Atasayar Sabuncuoğlu ve diğ. 2008). Mikotoksinleri üreten küf sporları, rüzgar ve hava akımlarıyla taşınarak hemen her yerde (atmosferin çeşitli katmanları da dahil) bulunabilir. Mikotoksin kontaminasyon düzeyi iklim koşullarına, ürünün cinsine ve coğrafi konuma bağlı olarak mevsimden mevsime ve yıldan yıla farklılık gösterebilir (Karaca ve Nas 2006, Türköz Bakırcı 2014).

Mikotoksin üretimini etkileyen faktörlerden belki de en önemlisi, küfün cinsi yani toksin üreten bir küf olup olmadığıdır. Ayrıca, küfün ürüne bulaşma miktarı, ürünün olgunluk durumu, bileşimi, nem içeriği, pH'sı, ortamın sıcaklığı, nispi nemi ve O<sub>2</sub> miktarı da toksin üretimi üzerine etkili faktörler arasındadır (Chulze 2010).

#### 1.2.1.2.1 Aflatoksinler

Aflatoksinler çoğunlukla *A. flavus* ve *A. parasiticus* tarafından üretilen toksik metabolitler grubunu oluşturur. Aflatoksinler, "difurokumarosiklopentenon" ve "difurokumarolakton" gruplarında sınıflandırılmıştır. Günümüzde 20 farklı aflatoksin tipi tanımlanmıştır. Aflatoksinlerin aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub> olmak

üzere dört ana fraksiyonu bulunmaktadır. Bu isimlendirme ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boyu UV ışığı altında aflatoksin B<sub>1</sub> ve B<sub>2</sub>'nin mavi (blue), aflatoksin G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>'nin ise yeşil (green) floresan ışık vermesiyle ilişkilidir (Özkaya ve Temiz 2003). M grubu aflatoksinler ise temelde süt ve süt ürünlerinde bulunabilmeleri nedeni ile "M" harfi ile simgelenmektedir (Aksoy 1990). Bunların arasında en baskını ve tehlikeli olanı aflatoksin B<sub>1</sub> tipidir. Bazı aflatoksin türlerinin kimyasal yapıları Şekil 1.2'de verilmiştir.



**Şekil 1.2:** Aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> ve M<sub>2</sub>'nin kimyasal yapısı

*Aspergillus* türlerinin dallanan septali hipleri vardır. Bu hiplerden ayrılan tübüler yapılar (konidiofor) uç kısımda genişleyerek vezikül benzeri yapılar oluşturur. Burada aseksüel sporlar (konidia) üretilir. Farklı *Aspergillus* türleri, kültürde üreyen koloni renklerinin yanı sıra konidia ve konidioforların mikroskopik görüntüleri ile de ayırt edilir (Ayberkin ve Çiftçi 2009). Şekil 1.3'te *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un elektron mikroskobu altındaki görüntüleri verilmiştir.



*A. parasiticus*



*A. flavus*

**Şekil 1.3:** *A. flavus* ve *A. parasiticus* elektron mikroskobu altındaki görüntüleri (Anonim 2016)

Aflatoksinlerin akut ve kronik toksisitelerinde türler arası, bireyler arası ve cinsiyete göre önemli farklılıklar gözlenmektedir. Aflatoksin düzeyinin düşük olması riski azaltan bir faktör değildir. Bu toksinlerle kontamine olmuş besinlerin sık ve sürekli tüketilmesi durumunda karaciğerde birikerek kişide zararlı olabilecek bir takım etkilere neden olabilir.

Aflatoksinler tüm canlı organizmalarda karsinojen, teratojen ve mutajen etkiye sebep olmaktadır. DNA, RNA ve protein sentezi inhibisyonu, çeşitli enzim aktivitelerinde azalma, glikoz metabolizması depresyonu, fosfolipidler, serbest yağ asitleri, trigliseritler, kolesterol ve esterleri de dahil lipid sentezi inhibisyonu ve pıhtılaşma faktörü inhibisyonu gibi metabolik etkileri vardır (Türköz Bakırcı 2014).

Gıdalarda bulunabilecek maksimum aflatoksin değerleri pek çok ülkede yasal düzenlemelerle belirlenmiştir. Türk Gıda Kodeksi'ne göre bazı gıda maddelerinde bulunabilecek en yüksek aflatoksin seviyeleri Tablo 1.2'de verilmiştir.

**Tablo 1.1:** Türk Gıda Kodeksi tarafından kabul edilen aflatoksin limitleri (Anonim 2011)

Tarım Ürünleri ve Gıda Maddeleri	Aflatoksin limitleri (ppb)		
	B <sub>1</sub>	B <sub>1</sub> +B <sub>2</sub> +G <sub>1</sub> +G <sub>2</sub>	M <sub>1</sub>
Yerfıstığı ve diğer yağlı tohumlar	8	15	-
Badem, antepfıstığı ve kayısı çekirdeği	12	15	-
Yerfıstığı ve diğer yağlı tohumlar ve bunların işlenmiş ürünleri	5	10	-
Kurutulmuş meyveler	8	10	-
Mısır ve pirinç	5	10	-
Baharatın aşağıdaki türleri için; kırmızıbiber, karabiber, zencefil, zerdeçal	5	10	-
Bebek ve küçük çocuk ek gıdalar	0.10	-	-
Bebek formülleri ve devam formülleri	-	-	0.025

- Belirtilmemiştir.

Baharatlar, mikotoksin sorununa sıkça rastlanılan ve aflatoksin probleminin ciddi bir sorun olduğu gıdalardan birisidir. Tablo 1.1'den de görülebileceği gibi, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'ne göre baharatlarda bulunmasına izin verilen aflatoksin B<sub>1</sub> miktarı 5 ppb, toplam aflatoksin miktarı ise 10 ppb olarak belirlenmiştir. Avrupa Birliği ülkeleri de kırmızıbiber için aynı limit değerleri kabul etmiştir (European Commission 2006).

Kırmızıbiber Türkiye, Hindistan, Meksika, Amerika ve İspanya gibi ülkelerde yüksek miktarda üretilen ve dünyada tüketimi yaygın olan çok popüler bir bahattır. Kırmızıbiber gıdalara kazandırdığı tat ve renk nedeniyle dünyada kültür yetiştiriciliği yapılan ve tüketilen en önemli sebzelerden biridir. A ve C vitaminlerince zengin olan kırmızıbiber kalsiyum, fosfor ve potasyum maddelerini de içeren ve ekonomik açıdan yüksek değere sahip bir gıdadır. Günlük hayatta yemeklerde, salatalarda, turşularda, sos yapımında, salça üretiminde, baharat olarak ve konserve gibi gıda maddelerinde sıkça kullanılmaktadır (Oruç 2005, Akbay ve diğ. 2012, Atasoy ve diğ. 2017).

Baharatlık kırmızıbiber üretimi iki yöntemle yapılmaktadır. Birincisi geleneksel olarak güneşte kurutularak, ikincisi kurutucuda kurutularak

üretimidir. Kurutma sürecinde geçirdiği kritik aşamalar nedeniyle kırmızıbiber mikotoksin, özellikle de aflatoksin kontaminasyonu açısından riskli gıdalar arasında yer almaktadır. Kurutulacak kırmızıbiberlerde küf kontaminasyonu bitki daha tarladayken gerçekleşmekte, küf gelişimi ve toksin oluşumu ise hasada kadar geçen süre içerisinde ve sonraki kurutma aşamalarında devam etmektedir (Dokuzlu 2001, İnanç ve Açık 2017). Kırmızıbiberlerde toprak kökenli toksijenik küf kontaminasyonuna ve aflatoksin, okratoksin gibi küflerin sekonder metabolitlerinin (mikotoksinlerin) oluşumuna sıklıkla rastlanır (Dokuzlu 2001, Şen ve Nas 2010, Yentür ve Er 2012, İnanç ve Açık 2017). Ülkemizde değişik gıda maddelerinde aflatoksin varlığı üzerine yapılan bir piyasa araştırmasında, toz ve kırmızı pul biberlerin %46.7'sinin 5 ppb'den daha fazla aflatoksin B<sub>1</sub> içerdiği tespit edilmiştir (Ağaoğlu 1999).

Gıdalarda mikotoksin kontaminasyonu probleminin çözümünde, *A. flavus*'un gelişmesi ve toksin üretmesi için ihtiyaç duyduğu faktörlerin belirlenmesi ve bunlara karşı önlem(ler) alınması önem arz etmektedir. Doğada aflatoksin oluşumunu teşvik eden ana faktörler, yüksek sıcaklık ve yüksek nem koşullarıdır. *Aspergillus* türleri doğada yaygındır. Bu küfler tarla ürünlerini kontamine edebilirler ve depolanma sırasında da gelişebilirler. Özellikle toprakta, gübrede, bitkilerde ve ayrışan organik bileşikler üzerinde bulunurlar. Küçük ve hafif sporları havada kolaylıkla asılı kalıp çevreye yayılabilir. Havada en yüksek yoğunlukta bulunan küflerden biridir (Kantarcıoğlu ve Yücel 2003, Ayberkin ve Çiftçi 2009).

Başta kuraklık stresi olmak üzere, bitki stresi üründe aflatoksin oluşumunu çok fazla arttırmaktadır. Benzer şekilde böcek zararları ve onların neden olduğu bulaşlar, bitkiye zarar veren diğer fungal hastalıklar, bitkiyi zayıf düşürerek üründe aflatoksin oluşumuna neden olmaktadır. Bitkilerin *A. flavus* bulaşına karşı dirençlerinin farklılığı, üründe oluşabilecek aflatoksin düzeyini etkileyebilmektedir (Duman 2002).

Aflatoksin üretiminde sıcaklık, pH, a<sub>w</sub>, atmosferdeki gazlar ve çevrenin bağıl nemi oldukça büyük önem taşımaktadır. Belirli a<sub>w</sub> değerlerinin altında *A. flavus* ve *A. parasiticus* türü küfler gelişemedikleri gibi toksin de üretemezler (Demirel ve Yıldırım 2000, Ergun ve diğ. 2006).

*A. flavus*'un gelişmesi ve mikotoksin üretebilmesi için gerekli  $a_w$  değerinin 0.73-0.85 olduğu, gelişme sıcaklığının 19-35°C arasında değişmekle beraber, optimum sıcaklığın 28°C olduğu bilinmektedir. Havadaki nemin, %80'nin ve ürünün içerdiği suyun %14'ün üzerinde olması halinde *A. flavus*'un aflatoksin üretiminin kolaylaştığı ve bağıl nem ile ürün neminin artmasıyla aflatoksin oluşumunun da arttığı bildirilmektedir (Demirel ve Yıldırım 2000, Ergun ve diğ. 2006, Giorni ve diğ. 2008).

Pek çok araştırmacı küflerin  $a_w$ , depolama sıcaklığı, ortam atmosferinde bulunan O<sub>2</sub> ve karbondioksit (CO<sub>2</sub>) konsantrasyonlarına olan hassasiyetleri nedeniyle bu özelliklerinin kombine etkisini incelemişlerdir (Ellis ve diğ. 1994b, Giorni ve diğ. 2008). Bu açıdan bakıldığında, gıdanın bulunduğu ortamın gaz atmosferinin değiştirilmesiyle, küf gelişiminin ve toksin üretiminin sınırlandırılabilirdiği ve hatta durdurulabilirdiği Modifiye Atmosferde Paketleme (MAP) tekniği günümüzde pek çok araştırmacının ilgi odağı haline gelmiştir.

### **1.2.2 Modifiye Atmosferde Paketleme İşlemi**

MAP tekniği esas olarak ambalajlanmış gıdaların veya ambalajsız olarak kitle halinde depolanmakta olan gıdaların buldukları ortam atmosferinin bileşiminin, raf ömrünü uzatmayı sağlayacak yönde bizzat veya kendiliğinden değiştirilmesine dayanan bir yöntemdir (Cemeroğlu 2013). Son zamanlarda gıdaların muhafazası için kullanılan MAP teknolojisi çok daha popüler hale gelmiştir.

Modifiye atmosfer teknolojileri, öncelikle taze ürünleri kalite kayıplarından korumak ve ürünlerin pazarlanabileceği süreyi uzatmak için kullanılır. MAP uygulamalarının üründeki kayıpları azalttığı ve daha verimli bir depolanabilirlik sağladığı mevcut ticari başarısı ile ispatlanmıştır (Ben-Yehoshua 2005).

MAP uygulamasında paket içerisindeki atmosferin değiştirilmesi ile paketlenen üründe gerçekleşebilecek mikrobiyolojik, fizyolojik ve kimyasal değişimler sınırlandırılarak ürünün raf ömrü arttırılmış olur (Chaix ve diğ. 2015). MAP uygulamalarının üründe uygulanabilirliği uygulamanın şekline ve

depolanacak ürünlerin özelliklerine bağlıdır (Ben-Yehoshua 2005). CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> ve N<sub>2</sub>'un farklı gaz karışımlarının uygulandığı MAP teknolojisi; et, yerfıstığı, ceviz, balık, pirinç ve fırın ürünlerinin depolanmasında kullanılabilir (Ellis ve diğ. 1993).

Ortadoğu'da gerçekleştirilen arkeolojik çalışmalarda bundan yaklaşık 10.000 yıl önce yeraltı çukurlarında tahıl tanelerini depolamak için MAP uygulamalarının kullanıldığı bulunmuştur. Bu da aslında MAP uygulamalarındaki stratejilerin, insanlığın binlerce yıllık deneyimi ve teknolojinin gelişmesiyle gelen daha yeni yaklaşımlara ve bilimsel ilerlemelere dayandığını göstermektedir (Ben-Yehoshua 2005).

MAP uygulamasının, ürünün raf ömrü üzerindeki etkisi; ürün tipine, taze materyalin başlangıç kalitesine, gaz karışımına, depolama sıcaklığına, işleme ve paketlenme esnasında hijyenik kurallara uyulup uyulmamasına, gaz/ürün hacim oranına ve paketlenme materyalinin koruma/bariyer özelliklerine bağlıdır (Kılınç ve Çaklı 2004). MAP uygulaması, kendi içinde pasif MAP ve aktif MAP olarak ikiye ayrılır.

### **1.2.2.1 Pasif Modifikasyon**

Bu paketlenme tekniğinde, ambalajdaki gaz atmosferinin bileşimi, ürünün solunumundan yararlanılarak ayarlanır. Diğer bir ifadeyle, pasif modifikasyon, herhangi bir müdahalede bulunmaksızın ambalaj içerisinde kendiliğinden oluşur. Solunum yapan gıda maddesi, belirli geçirgenlik özelliklerine sahip ambalaj materyali ile paketlenir. Zamanla ürünün solunumu sonucu paket içerisinde O<sub>2</sub> miktarı azalırken CO<sub>2</sub> miktarı artar. Belirli bir süre sonunda ambalaj içerisinde "denge gaz bileşimi" oluşur. Bu denge gaz bileşiminin sürdürülebilmesi ambalaj filminin gaz geçirgenliğiyle sağlanır (Caleb ve diğ. 2013, Cemeroğlu 2013, Zhang ve diğ. 2015).

Pasif modifikasyonda, paket içerisinde istenen gaz kompozisyonunun oluşması için belirli bir süre geçmesi gerekmektedir. Bu süre boyunca paket içerisindeki ürün, uygun olmayan gaz kompozisyonuna maruz kalabilir. Uygun



olmayan gaz kompozisyonunun, ürünün önemli kalite özellikleri üzerine olumsuz etkiler göstermesi muhtemeldir. Bu nedenle pasif modifikasyon tekniğinin uygulaması aktif modifikasyon tekniğine kıyasla daha sınırlıdır (Charles ve diğ. 2003).

### **1.2.2.2 Aktif Modifikasyon**

Aktif modifikasyon solunum yapan taze meyve sebzelerin yanında, solunum olayının söz konusu olmadığı kırmızı et ve ürünleri, kanatlı etleri, deniz ürünleri, süt ürünleri, hazır yemekler, fırın ürünleri vb. birçok üründe uygulanmakta olan bir tekniktir. Aktif modifikasyon tekniğinde, pasif modifikasyondan farklı olarak "denge gaz bileşiminin" oluşumu gerçekleştirilen müdahale ile kısa sürede sağlanır. Bu uygulamada işlemi hızlandırmak için ya ürünün içinde bulunduğu ambalaj atmosferine gaz enjekte edilir ya da "gaz absorbentlerinden" veya "gaz jeneratörlerinden" yararlanılarak arzulanan gaz karışımları paket içerisinde oluşturulur. Böylece paket içerisinde istenen gaz kompozisyonuna hızla ulaşılarak, ürünün arzulanan fiziksel ve kimyasal özelliklerinin maksimum düzeyde korunması sağlanır (Cemeroğlu 2013, Zhang ve diğ. 2015).

Genellikle aktif MAP, düşük düzeyde O<sub>2</sub> ve yüksek düzeyde CO<sub>2</sub> içerecek şekilde dizayn edilir (Mangaraj ve diğ. 2009). Ortam atmosferinin düşük O<sub>2</sub> ve yüksek CO<sub>2</sub> kompozisyonuna sahip olması oksidasyon riskini azaltır. Bununla birlikte bozulmaya neden olan mikroorganizmaların metabolizmasını etkiler ve bakteriyostatik etki sağlar (Chaix ve diğ. 2014).

Gıdalarda MAP uygulamasında kullanılacak gaz kompozisyonunun, ürünün kendine has özelliklerine bağlı olarak belirlenmesi gerekir. O<sub>2</sub> konsantrasyonu belirli bir sınır değer altına düşürüldüğünde paket içerisinde anaerobik koşulların oluşması MAP uygulamalarında karşılaşılan genel bir problemdir. Çünkü bu durumda anaerob mikroorganizmaların gelişmesi için uygun koşullar oluşabilir (Charles ve diğ. 2003).

Gıda endüstrisi için geliştirilen ambalaj teknolojileri, özellikle son yirmi yıldır, taze ve minimum işlenmiş gıdaların muhafazasında büyük ilerlemeler

sağlamıştır. Bu tür ambalajlarda havanın paket içerisinden uzaklaştırılmasının ardından, istenen gaz karışımının enjekte edilmesiyle bir başlangıç atmosferi oluşturulur. Bu karışım daha sonra aşağıda bahsi geçen faktörlere bağlı olarak değişime uğrayabilir (Skandamis 2002):

- Ambalaj malzemesinin O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ve su buharı geçirgenliği
- Ambalajın bulunduğu ortamın sıcaklığı
- Ambalajın yüzey alanı
- Ambalaj malzemesinin kalınlığı
- Ambalajın sızdırmazlığı

Ambalaj materyali seçiminde bu hususlar dikkate alınarak paketleme için uygun malzemeye karar verilir.

MAP teknolojisinde kullanılan temel gazlar O<sub>2</sub>, azot (N<sub>2</sub>) ve CO<sub>2</sub>'tir. Bunların yanı sıra kullanılacak gazlar arasında nitröz ve nitrik oksitler, karbon monoksit, kükürt dioksit, etilen ve klor da bulunur. Ancak bu maddelerin güvenlik, maliyet veya yasal gerekçeler nedeniyle kullanımı çok yaygın değildir (Philips 1996).

O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> gazları paketlenen ürünün özelliklerine göre ve üreticinin ve/veya tüketicinin tercihinine bağlı olarak farklı kombinasyonlarda ve oranlarda kullanılır. Uygulanacak gaz kombinasyonu ve oranı, ürünün mikrobiyolojik florası, O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> duyarlılığı ve arzulanan kalite kriterlerine (renk, tekstür, vb.) göre yapılır (Philips 1996). MAP uygulamasında kullanılan gazların her birinin farklı özellikleri bulunmaktadır. Bu özellikler aşağıda özetlenmiştir.

Oksijen (O<sub>2</sub>); gıdalar üzerinde pek çok etkisi bulunan çok önemli bir gazdır. Genelde aerobik bakterilerin gelişimini desteklerken, anaerob bakterilerin gelişimini engeller. Paketlenmiş bir ambalajda O<sub>2</sub>'in bulunması ürünün kimyasal, biyokimyasal ve mikrobiyal özelliklerini etkileyip bozulmalara neden olduğundan, ambalajlanan gıdanın tepe boşluğundaki O<sub>2</sub> oranı azaltılmalıdır. Ancak bazı durumlarda MAP uygulamalarında ambalaj içerisinde belirli düzeyde O<sub>2</sub> bulunması istenir. Örneğin hasat sonrası solunuma devam eden meyve ve sebzelerin paketlerinin içeriğinde bir miktar O<sub>2</sub> bulunması gerekmektedir. Ayrıca paket

içerisindeki düşük O<sub>2</sub> seviyesi, patojen anaerobik bakterilerin, özellikle *Clostridium botulinum*'un yüzeydeki gelişimini engelleyebilmektedir (Gün ve diğ. 2009).

Azot (N<sub>2</sub>); suda ve yağda çözünmeyen inert bir gazdır. Bu gazın doğrudan bir antimikrobiyal etkisi yoktur ve paketin çökmesini önlemek amacıyla kullanılır. N<sub>2</sub>, aerobik organizmaların oluşturduğu kokuşmayı önlemek için de kullanılır (Philips 1996). Oksidatif acılaşmayı geciktirmek için O<sub>2</sub> duyarlı ürünlerde O<sub>2</sub> yerine kullanılır ve aerobik mikroorganizmaların gelişimini inhibe eder (Kılınç ve Çaklı 2004).

Karbondiyoksit (CO<sub>2</sub>); MAP teknolojisinde en etkili antimikrobiyal aktiviteye sahip gazdır. CO<sub>2</sub>'in etkinliği; gazın başlangıç ve son konsantrasyonuna, depolama sıcaklığına ve mikroorganizma yüküne bağlı olarak değişir. CO<sub>2</sub> bakterisit veya fungusit olmamasına rağmen, özellikle Gram negatif aerobik bakterilere karşı bakteriyostatik, küflere karşı fungistatik özelliğe sahiptir. Mikroorganizmanın sitoplazmasında pH'yı düşürmesi ve burada bulunan enzimlere etkisi, dolayısıyla hücre zarının geçirgenliğini etkilemesi nedeniyle mikrobiyal gelişimi engellemektedir. Bu etki CO<sub>2</sub> konsantrasyonu, CO<sub>2</sub> kısmi basıncı, tepe boşluğundaki CO<sub>2</sub> miktarı, mikroorganizma tipi, ürünün mikrobiyal yükü, depolama sıcaklığı, asitlik, a<sub>w</sub> ve ambalajlanan ürün çeşidine bağlı olarak geliştirilebilir. Ayrıca paketlemede kullanılan CO<sub>2</sub>'in çözünebilirliği gıda maddesinin a<sub>w</sub> ve pH gibi fiziksel ve kimyasal özelliğine ve rutubet, yağ ve protein gibi gıdanın bileşiminde var olan maddelerin miktarına göre değişebilmektedir. Genelde CO<sub>2</sub>'in inhibe edici etkisi mikroorganizmaların lag fazı ve logaritmik faz aşamalarında gerçekleşir (Philips 1996, Gün ve diğ. 2009). CO<sub>2</sub>'nin MAP teknolojisinde kullanılmasıyla oluşabilecek muhtemel sonuçlar aşağıda özetlenmiştir (Kılınç ve Çaklı 2004):

- O<sub>2</sub>'nin yerine CO<sub>2</sub> gazının kullanılması aerobik mikroorganizmaların gelişimini inhibe etmektedir.
- CO<sub>2</sub>'in karbonik asite hidrasyonu ürünün asitlenmesine sebep olmaktadır.
- CO<sub>2</sub> veya onun iyonları bakteriyel hücre geçirgenlik karakterini değiştirebilir.
- Metabolik oluşum CO<sub>2</sub> varlığından etkilenebilmekte ve bunun sonucunda bakteriyel enzimatik aktivite değişmektedir.

### 1.2.2.3 Modifiye Atmosferde Paketleme Tekniğinin Gıda Maddeleri Üzerine Etkisi

İlk olarak 1917'de paket içerisindeki gaz atmosferinin bileşiminin değiştirilmesi ile elmaların raf ömründe bir artışın olduğu tespit edilmiştir (Wang ve diğ. 2014). O günden günümüze özellikle de son yıllarda gıda kaynaklarında gerçekleşen belirgin ve ürkütücü azalmalar gıdaların depolanması sırasında kullanılan yöntemlerin gelişmesine ve araştırmaların arttırılmasına neden olmuştur.

Et, süt, yumurta, balık gibi çabuk bozulan gıdaların raf ömürleri atmosferik oksijenin varlığında; O<sub>2</sub>'in kimyasal etkisi, aerobik mikroorganizmaların gelişimi ve zararlılar nedeniyle kısıtlanmaktadır. Bu faktörlerin her biri tek başına veya birbiri ile bağlantılı olarak renk, tat ve kokuda değişiklikler meydana getirerek gıdaların kalitesinde bozulmaya neden olurlar. Gıdaların raf ömrünün uzatılmasında en sık kullanılan yöntemlerden biri soğukta muhafaza tekniğidir. Ancak soğukta muhafazanın, etkili ambalajlama teknikleriyle beraber kullanılması gıdaların tazeliklerinin daha uzun süre korunmasında giderek artan bir uygulama olarak karşımıza çıkmaktadır.

Gıdaların bozulmasına yol açan ve toksinleriyle insan sağlığını tehdit eden bazı küf türlerine karşı MAP tekniğinin etkinliği birçok araştırmacı tarafından test edilmiştir. Bu konuda literatürde bulunan çalışmalar sentetik besiyerlerinde ve gıda maddelerinde gerçekleştirilenler şeklinde tarafımızdan sınıflandırılmış ve söz konusu çalışmaların sonuçları sırasıyla Tablo 1.2 ve 1.3'te özetlenmiştir. Tablolardan da görüleceği gibi, aflatoksinleriyle ciddi sağlık riskleri ve ekonomik problemlere yol açan *A. flavus* küfünün gelişimi ve toksin üretimine karşı MAP tekniğinin etkinliği bazı besiyeri ortamlarında ve çeşitli gıda maddelerinde araştırılmıştır. Ancak ülkemizde önemli miktarda üretilen/tüketilen ve aflatoksinle kontaminasyonu bakımından riskli bir ürün olan kırmızıbiberlerde *A. flavus* gelişimi ve aflatoksin üretimine karşı MAP tekniğinin etkinliğini araştıran herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Dolayısıyla, bu tez çalışmasında PDA besiyerinde ve yarı kurutulmuş kırmızıbiberlerde *A. flavus* küfünün gelişimi ve aflatoksin üretimine karşı MAP tekniğinin etkinliğinin tüm boyutlarıyla araştırılması hedeflenmiştir.

**Tablo 1.2:** Besiyeri ortamında çeşitli küflerin gelişimi ve mikotoksin üretimi üzerine MAP tekniğinin etkisinin incelendiği bazı çalışmalar

Küf	Test Ortamı	İnkübasyon Şartları	Denenen Gaz Atmosferi	Bulgular	Yazar
<i>Byssoschlamys nivea</i> <i>P. roqueforti</i> <i>A. flavus</i>	Cam kavanoz içerisinde Czapek Yeast Extract Agar (CYA) ve PDA besiyeri	25°C, 60 gün	<%0.5 O <sub>2</sub> , %20-60 CO <sub>2</sub> ve %40-80 N <sub>2</sub>	- %40 ve %60 CO <sub>2</sub> atmosferlerinde <i>A. flavus</i> gelişimi gözlenmemiştir. - <i>A. flavus</i> %20 CO <sub>2</sub> atmosferinde az da olsa gelişebilmiş ancak aflatoksin üretmemiştir. - <i>P. roqueforti</i> tarafından üretilen rokför C mikotoksini CYA'da 8 günün sonunda maksimum miktarda üretilmiştir, PDA'da ise 14. günde maksimuma ulaşmış ve sonrasında toksin üretimi azalmıştır. <i>P. roqueforti</i> %40 ve %60 CO <sub>2</sub> atmosferinde gelişmemiştir. - <i>B. nivea</i> %20 ve %40 CO <sub>2</sub> atmosferinde çok düşük düzeyde patulin mikotoksini üretmiştir.	Taniwaki ve diğ. (2009)
<i>A. carbonarius</i> <i>A. niger</i>	EVOH ambalaj materyali içerisinde CYA besiyeri (a <sub>w</sub> : 0.97)	25°C, 24 gün	%1-20 O <sub>2</sub> , %0-15 CO <sub>2</sub> ve %78-99 N <sub>2</sub>	- <i>A. niger</i> küfünün <i>A. carbonarius</i> küfünden MAP uygulamasına karşı daha dirençli olduğu görülmüştür. - İncelenen her iki küf türünde de büyüme oranlarının %5 O <sub>2</sub> + %95 N <sub>2</sub> atmosferinde maksimum düzeyde olduğu tespit edilmiştir. - 7 günlük inkübasyonun ardından %5-20 O <sub>2</sub> atmosferinde okratoksin A (OTA) maksimum miktarda üretilmişken, aynı depolama süresi sonunda %1 O <sub>2</sub> + %15 CO <sub>2</sub> atmosferinde OTA üretiminin çok düşük seviyelerde olduğu tespit edilmiştir.	Valero ve diğ. (2008)
<i>F. verticillioides</i> <i>F. proliferatum</i>	Yüksek O <sub>2</sub> bariyerli ambalaj materyali içerisinde PDA besiyeri (a <sub>w</sub> : 0.93-0.98)	25°C, 27 gün	%20 O <sub>2</sub> , %0-60 CO <sub>2</sub> ve %20-80 N <sub>2</sub>	- Denenen tüm a <sub>w</sub> değerlerinde, paket içerisindeki CO <sub>2</sub> konsantrasyonundaki artışın, <i>F. verticillioides</i> ve <i>F. proliferatum</i> küflerinin gelişiminde yavaşlamaya sebep olduğu tespit edilmiştir. - Hem a <sub>w</sub> hem de paket içerisindeki CO <sub>2</sub> gazının küf gelişim hızına etkisi olduğu görülmüştür. - %10 CO <sub>2</sub> gazının <i>F. verticillioides</i> tarafından gerçekleştirilen fumonisin B <sub>1</sub> üretimini tamamen inhibe ettiği görülmüştür.	Samapundo (2007)
<i>P. roqueforti</i> <i>A. flavus</i> <i>Mucor plumbeus</i> <i>Eurotium sp.</i>	Cryovac torbalar içerisinde tarçın ve karanfil yağı ile katkılanan Malt Extract Agar (MEA) besiyeri	25°C, 60 gün	%0.05-10 O <sub>2</sub> , %20-40 CO <sub>2</sub> ve %50-80 N <sub>2</sub>	- Paket içerisindeki CO <sub>2</sub> gazının %20'den %40'a çıkarılması, küfler üzerindeki inhibe edici özelliklerinin araştırıldığı yağların etkinliğini arttırmıştır. - Yağların, incelenen tüm küf türlerinin gelişimlerini önlemede düşük oksijen (<%0.05) ve yüksek CO <sub>2</sub> atmosferinde (%40) daha etkili olduğu görülmüştür.	Matan (2006)

**Tablo 1.2:** Besiyeri ortamında çeşitli küflerin gelişimi ve mikotoksin üretimi üzerine MAP tekniğinin etkisinin incelendiği bazı çalışmalar (devam)

<i>P. aurantiogriseum</i>	PA/PP ambalaj materyali içerisinde CYA besiyeri	15°C, 24 gün	%0-20 O <sub>2</sub> , %0-100 CO <sub>2</sub> ve %0-100 N <sub>2</sub>	- Paket içerisinde %30 seviyesindeki, CO <sub>2</sub> konsantrasyonunun küf gelişimini önlemekte yetersiz kaldığı, bu gazın %70'lik seviyesinin küf gelişimini yavaşlattığı, daha yüksek seviyelerin ise küf gelişimini tamamen durdurduğu görülmüştür. - Hava atmosferinde ve %100 N <sub>2</sub> gazı altında paketlenen örneklerde küf gelişimi benzer seviyelerde olduğu gözlenmiştir.	Zardetto (2005)
<i>A. niger</i> <i>E. amstelodami</i> <i>P. chrysogenum</i> <i>F. oxysporum</i>	Sidamil ambalaj materyali içerisinde Oxytetracycline glucose yeast extract besiyeri (a <sub>w</sub> :0.80-0.95, pH:4)	20-40°C, 45 gün	%0-20 O <sub>2</sub> , %0-100 CO <sub>2</sub> ve %0-100 N <sub>2</sub>	- Anaerobik atmosfer koşullarında küf gelişimi incelenen bütün türler için düşük a <sub>w</sub> değerlerinde tamamen inhibe edilirken, yüksek a <sub>w</sub> değerlerinde paket içerisinde kalan O <sub>2</sub> gazı sebebiyle kısıtlı bir gelişim göstermiş, ancak gelişim devam etmemiştir. - 0.88 ile 0.92 arasındaki herhangi bir a <sub>w</sub> değerinde, %100 CO <sub>2</sub> atmosferi küf gelişimini tamamen engellemiştir.	El Halouat (1997)
<i>A. flavus</i>	Cryovac torbalar içerisinde MEA besiyeri (a <sub>w</sub> :0.94-0.98, pH:5-9)	15-35°C, 15 gün	%0-20 O <sub>2</sub> + tamamlayıcı gaz (%60 CO <sub>2</sub> + %40 N <sub>2</sub> )	- Küf gelişimi, inkübasyon süresince paket içi gaz atmosferinden bağımsız bir şekilde 25°C'de, 15-20°C'den daha hızlı gerçekleşmiştir. - 15°C'de, <i>A. flavus</i> küf gelişimi ancak 0.95 ve daha yüksek a <sub>w</sub> değerlerine sahip ortamlarda gerçekleşmiştir. - <i>A. flavus</i> küf gelişimi yüksek depolama sıcaklıklarında (25-35°C) inkübe edilen ve %10-20 O <sub>2</sub> (%54-48 CO <sub>2</sub> ) içeren ambalajlarda daha hızlı gerçekleşmiştir.	Ellis ve diğ. (1993)

**Tablo 1.3:** Bazı gıda maddelerinde çeşitli küflerin gelişimi ve mikotoksin üretimi üzerine MAP tekniğinin etkisinin incelendiği bazı çalışmalar

Küf	Test Ortamı	İnkübasyon Şartları	Paket İçi Gaz Atmosferi	Bulgular	Yazar
<i>A. flavus</i>	Plastik hazne içerisinde PDA besiyeri ( $a_w$ :0.92-0.95) ve mısır	25°C, 21 gün	<%1 O <sub>2</sub> , %25-75 CO <sub>2</sub> ve %24-74 N <sub>2</sub>	- %25 ve %50 CO <sub>2</sub> atmosferi küf gelişiminde yaklaşık %30-35 oranında bir inhibisyon etkiye sebep olmuştur. - %75 CO <sub>2</sub> atmosferi ise $a_w$ değerinden bağımsız bir şekilde %50 oranında bir inhibisyon etkiye sebep olmuştur. - Aflatoksin üretiminin inhibisyonunda en etkili gaz atmosferinin %50-75 CO <sub>2</sub> olduğu (%46-58 inhibisyon) tespit edilmiştir. - Genel olarak PDA besiyeri ve mısırdaki inhibisyon etki görebilmek için en az %50 CO <sub>2</sub> gaz atmosferine ihtiyaç duyulduğu belirlenmiştir.	Giorni ve diğ. (2008)
<i>P. commune</i> <i>P. solitum</i> <i>P. polonicum</i> <i>A. flavus</i> <i>P. corylophilum</i> <i>E. repens</i> <i>E. fibuliger</i>	OPP20/PELD/ EVOH-PELD4720 ambalaj materyali içerisinde hardal yağı ile katkılanan buğday ve çavdar ekmeği	25°C, 35 gün	%0-1 O <sub>2</sub> , %0-100 CO <sub>2</sub> ve %0-100 N <sub>2</sub>	- Buğday ekmeği örneklerinde <i>A. flavus</i> küfü CO <sub>2</sub> 'e karşı <i>P. solitum</i> ve <i>P. polonicum</i> 'dan daha dirençli, <i>P. commune</i> 'den daha duyarlı bulunmuştur. - MAP ve hardal yağının birlikte kullanımıyla gerçekleştirilmiş olan uygulamalarda inhibisyon etkinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür.	Suhr (2005)
<i>E. amstelodami</i> <i>E. herbariorum</i> <i>E. repens</i> <i>E. rubrum</i>	PA/PE Coex PA ambalaj materyali içerisinde DG18 besiyeri ( $a_w$ :0.80-0.90) ve PS içeren kek	25°C, 28 gün	%0-20 O <sub>2</sub> , %0-100 CO <sub>2</sub> ve %0-100 N <sub>2</sub>	- Denenen tüm potasyum sorbat (PS) konsantrasyonları ve MAP uygulamalarının pH 6'da pH 7.5'a göre daha etkili olduğu görülmüştür. - pH 6'da, %0.1 düzeyindeki PS ve %50-70 CO <sub>2</sub> gazı uygulaması, tüm $a_w$ değerlerinde 28 güne kadar küf gelişimini etkili bir şekilde önlemiştir.	Guynot ve diğ. (2004)
<i>P. expansum</i>	PP ve PE ambalaj materyalleri içerisinde elma	25°C, 14 gün	%48-88 CO <sub>2</sub> ve %12-52 N <sub>2</sub>	- PP'den üretilmiş poşetler içerisindeki elmalar üzerinde denenen hiçbir gaz atmosferi, <i>P. expansum</i> küfünün gelişimini inhibe edici etki göstermemiştir. - Araştırılan üç gaz kompozisyonunun neredeyse hepsi PE'den üretilmiş poşetlerle paketlenmiş elmalardaki patulin üretimini tamamen inhibe edici etki göstermiştir. - PE'den üretilmiş poşetlerle paketlenmiş elmalarda inkübasyon süresi boyunca paket içerisinde yer alan gazlardan CO <sub>2</sub> 'in zamanla azaldığı ve N <sub>2</sub> 'nin ise arttığını gözlenmiştir.	Moodley ve diğ. (2001)

**Tablo 1.3.** Bazı gıda maddelerinde çeşitli küflerin gelişimi ve mikotoksin üretimi üzerine MAP tekniğinin etkisinin incelendiği bazı çalışmalar (devam)

<i>M. plumbeus</i> <i>F. oxysporum</i> <i>B. fulva</i> <i>B. nivea</i> <i>P. commune</i> <i>P. roqueforti</i> <i>A. flavus</i> <i>E. chevalieri</i>	PP/EVOH/PP ambalaj materyalleri içerisinde Cheddar peyniri	25°C, 14 gün	%0-5 O <sub>2</sub> , %20-40 CO <sub>2</sub> ve %55-80 N <sub>2</sub>	- Çalışmada incelenen bütün küf türleri %20-40 CO <sub>2</sub> ve %1-5 O <sub>2</sub> gaz atmosferinde, gelişimlerini sürdürmelerine rağmen, hava ile paketlenen örneklerle kıyaslandığında gelişimin, türlere bağlı olarak, %20-80 oranında azaldığı görülmüştür. - Araştırılan gaz atmosferlerinde aflatoksin B <sub>1</sub> ve B <sub>2</sub> , rokofor C ve siklopiazonik asit (CPA) oluşumunun büyük ölçüde azaltılmasına rağmen tamamen inhibe edici etki gözlenmiştir.	Taniwaki ve diğ. (2001)
<i>A. flavus</i>	ASI, ASII ve ASIII ambalaj materyalleri içerisinde PDA ve fıstık	20-30°C, 14 gün	%0-20 O <sub>2</sub> , %0-65 CO <sub>2</sub> ve %35-78 N <sub>2</sub>	- 20°C'de denen tüm gaz atmosferlerinde yüksek gaz bariyerli bir film olan ASI ve orta bariyerli bir film olan ASII ile paketlenmiş yer fıstıkları için <i>A. flavus</i> küfünün gelişimi inkübasyonun 15. gününe kadar gerçekleşmemiştir. - Aynı paketlerin 25 ve 30°C'de inkübasyonu sonucunda küf gelişimi 3-5 gün içerisinde gözle görülür bir hal almıştır.	Ellis ve diğ. (1994a)
<i>A. flavus</i>	Cryovac torbalar içerisinde MEA (a <sub>w</sub> :0.91-0.97, pH: 4) besiyeri ve fıstık	16.6-33.4°C, 21 gün	%1.6-18.4 O <sub>2</sub> + tamamlayıcı gaz (%60 CO <sub>2</sub> + %40 N <sub>2</sub> )	- Çalışmada, inkübasyon sıcaklığı özellikle a <sub>w</sub> ve paket içerisinde yer alan O <sub>2</sub> 'nin, küf gelişimi ve aflatoksin üretimi üzerinde önemli etkilere sahip olduğu görülmüştür. - Ayrıca çalışmada, düşük a <sub>w</sub> uygulamasının, sınırlı O <sub>2</sub> (<%1) ile paketlenmiş yer fıstığı örneklerinde <i>A. flavus</i> küfünün gelişimi ve aflatoksin oluşumunu tamamen önlediği görülmüştür.	Ellis ve diğ. (1994b)



## 2. YÖNTEM

### 2.1 *Aspergillus flavus* Küfünün Gelişme Koşulları, Muhafazası ve Gelişim Takibinin Yapılması

Deneyleerde kullanılan *A. flavus* (MAM-200682) küfü TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gıda Enstitüsü'ndeki kültür koleksiyonundan temin edilmiştir (Özçakmak ve diğ. 2010). Küf izolatı, analizlerde kullanılıncaya kadar saf kültür halinde %60'lık gliserol içerisinde -70°C'de saklanmıştır. Analizlerde kullanılacak izolat, PDA besiyerinde aktive edilmiştir.

Tez çalışması boyunca, *A. flavus* küf izolatının canlılığını sürdürebilmesi önem arz etmektedir. Bu nedenle, 7-10 günlük periyotlarla steril kabin altında pasajlama işlemi yapılmış ve küf izolatının canlılığının sürdürülmesi sağlanmıştır.

Pasajlama işleminde, projede *in vitro* çalışmalarda kullanılan PDA besiyeri kullanılmıştır. İçinde PDA besiyeri bulunan petri kutularındaki küf kolonileri steril bir öze yardımıyla alınmış ve içinde söz konusu agarı bulunduran diğere bir petri kutusuna üç nokta ekim yöntemiyle aktarılmıştır. Ardından petri kutuları 25°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem, periyodik olarak 3 tekerrürlü yapılmıştır.

### 2.2 Örneklerin Modifiye Atmosfer Altında Paketlenmesi

Modifiye atmosferde paketleme işlemi, DZ-260, Seles marka (Wenzhou Xingye Machinery Equipment Co. Ltd., Pekin, Çin) paketleme makinesi ile gerçekleştirilmiştir. Söz konusu cihazın çalışması, öncelikle ambalaj içerisindeki havanın vakum ile çekilmesi ve istenen gaz kompozisyonunun (%100 N<sub>2</sub>, %70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub> veya %100 CO<sub>2</sub>) paket içerisine verilmesi şeklinde gerçekleşmektedir. Paketleme çalışmalarında kullanılan cihaza ve tüplere ait görseller Şekil 2.1'de verilmiştir.



**Şekil 2.1:** Paketlemede kullanılan cihaz ve gaz tüpleri

Çalışmamızda %100 N<sub>2</sub> ( $\geq$ %99.995 saflıkta), %70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub> (%30 $\pm$ 2.5 CO<sub>2</sub> saflıkta) ve %100 CO<sub>2</sub> (%99.0 saflıkta) olmak üzere 3 farklı gaz atmosferini içeren tüpler kullanılmıştır ve bu tüpler Denizgaz Gulf Cryo (Bornova, İzmir) firmasından tedarik edilmiştir.

### 2.2.1 Paketleme Materyalinin Belirlenmesi

Paketleme materyali olarak öngörülen ve aşağıda isimleri belirtilen 5 adet poşet üzerinde çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

- Polietilen + Poliamit + Etilen Vinil Alkol + Poliamit + Polietilen (PE+ PA+ EVOH+ PA+ PE, kalınlık: 65 $\pm$ 5  $\mu$ m, O<sub>2</sub> geçirgenliği: (23°C-%0 RH)<3 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> gün ve su buharı geçirgenliği: (38°C-%90 RH)<12 g/m<sup>2</sup> gün)
- Polietilen Tereftalat + Co-Extrude Etilen Vinil Alkol (PET+ Coex EVOH, kalınlık: 75 $\pm$ 5  $\mu$ m, O<sub>2</sub> geçirgenliği:  $\leq$ 5 cm<sup>3</sup>/1 atm/m<sup>2</sup> gün, N<sub>2</sub> geçirgenliği:  $\leq$ 15 cm<sup>3</sup>/1 atm/m<sup>2</sup> gün ve su buharı geçirgenliği:  $\leq$ 5 g/m<sup>2</sup> gün)
- Poliamit + Polietilen (PA+ PE, kalınlık: 120 $\pm$ 5  $\mu$ m, O<sub>2</sub> geçirgenliği: <160 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> gün ve su buharı geçirgenliği: <8 g/m<sup>2</sup> gün)
- Polietilen Tereftalat + Alüminyum + Co-Extrude Poliamit (PET+ Al+ Coex PA, kalınlık: 150  $\mu$ m, O<sub>2</sub> geçirgenliği: <0.0002 cm<sup>3</sup>/1 atm/m<sup>2</sup> gün, N<sub>2</sub> geçirgenliği: <0.0002 cm<sup>3</sup>/1 atm/m<sup>2</sup> gün ve su buharı geçirgenliği: <0.0002 g/m<sup>2</sup> gün)
- Low Density Polyethylene (LDPE, Koroplast marka kilitli buzdolabı poşeti, İstanbul, Türkiye, kalınlık: 40 $\pm$ 5  $\mu$ m)

Tez çalışmasında kullanılacak paketleme materyalinin belirlenmesi amacıyla, içerisine "%30 CO<sub>2</sub> + %70 N<sub>2</sub>" gazı uygulanıp ısı yolla kapatılan poşetler 10 gün

boyunca 25°C'de bekletilmiştir. 0, 5 ve 10. günlerde poşet örnekleri içerisindeki O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ve N<sub>2</sub> gazlarının miktarları takip edilmiştir.

### 2.2.2 Paket İçi Gaz Atmosferi Bileşiminin Belirlenmesi

Bu amaçla Dansensor (Checkpoint, PBI, Ringsted, Danimarka) marka bir cihaz kullanılmıştır. Cihaza bağlı bulunan şırınga ucu, paketin üzerine yerleştirilmiş olan bir septumdan pakete sokulmuş ve 15 saniye süresince paket içindeki gaz bileşimi cihaza beslenmiştir. Cihaz, O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> konsantrasyonlarını % olarak vermekte, N<sub>2</sub> konsantrasyonu ise bu iki değerin toplamının 100'den çıkartılmasıyla bulunmaktadır. Gaz ölçümünde kullanılan cihaza ait görseller Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2: Paket içi gaz atmosferinin belirlenmesinde kullanılan cihaz

### 2.3 *Aspergillus flavus* Küfünün Farklı Ortamlardaki Gelişiminin Takibi

Burada iki farklı ortamda MAP'ın *A. flavus* küfü üzerine etkisi araştırılmıştır. İlk olarak "PDA besiyerinde *A. flavus* küfünün gelişimi üzerinde farklı gaz atmosferlerinin etkisi" incelenmiş ve ikinci olarak üzerinde çok az sayıda çalışmanın gerçekleştirildiği "yarı kurutulmuş kırmızıbiberlerde *A. flavus* küfünün gelişimi üzerinde farklı gaz atmosferlerinin etkisi" belirlenmeye çalışılmıştır.

### **2.3.1 PDA Besiyeri Ortamında *Aspergillus flavus* Küfünün Gelişiminin Takibi**

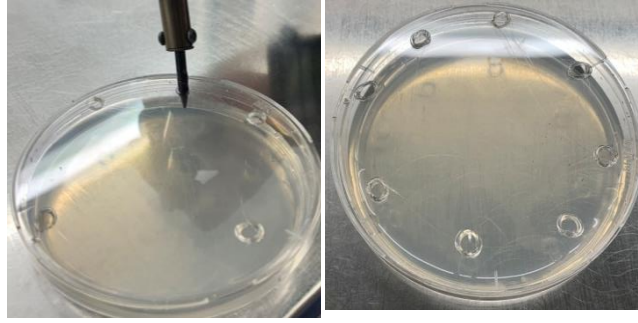
Literatürde *A. flavus* ve *A. parasiticus* küfünün gelişebildiği pH aralığı olarak minimum 2.1, maksimum 11.2 olduğu ve optimum gelişim aralığının 3.5-8 pH olduğu belirtilmiştir (Sweeney ve Dobson 1998). Bu doğrultuda, tez çalışmasında PDA besiyerinde *A. flavus* küfünün gelişimi üzerine pH'nın etkisinin incelenmesi amacıyla pH 3.5, 5.6, 7.0 ve 9.0 değerlerinin test edilmesine karar verilmiştir.

#### **2.3.1.1 *Aspergillus flavus* Spor Süspansiyonunun Hazırlanması**

*A. flavus* küfü ile inoküle edilip 7 gün boyunca 25°C'de inkübe edilen besiyeri üzerine 10 mL steril saf su eklenmiştir. Steril bir drigalski spatülü yardımıyla besiyeri yüzeyi kazınmış, küf sporlarının suya geçmesi sağlanmış ve böylece *A. flavus* küf sporu süspansiyonu elde edilmiştir. Çalışmada kullanılacak bu süspansiyondaki küf sporu sayısını öğrenmek için Thoma lamında hücre sayımı tekniği kullanılmıştır. Söz konusu lamda koloniler sayılmış, gerekli hesaplamalar yapılmış ve belirlenen oranlarda dilüsyonlar gerçekleştirilerek süspansiyondaki küf sporu sayısı  $3.8 \times 10^7$  spor/mL olarak ayarlanmıştır.

#### **2.3.1.2 Besiyeri Ortamının Modifiye Atmosfer için Hazırlanması**

Besiyeri ortamında *A. flavus* küfünün gelişimi ve toksin üretimi üzerine MAP tekniğinin etkisinin incelenmesi için, deneylerde kullanılan petri kutuları modifiye edilmiştir. Buna göre; plastik petri kutularının kapaklarında lehim makinasıyla, her birinin çapı yaklaşık 0.5 cm olan 8 adet delik açılmıştır. Bu delikler sayesinde, paket içi (petri kutusunun içi dahil) gaz atmosferinin istenen kompozisyonda ayarlanması sağlanmıştır. Modifiye petri kutusuna ait görseller Şekil 2.3'te verilmiştir.



**Şekil 2.3:** Kapak kısmına delikler açılmış petri kutusu

PDA besiyerinin istenilen pH değerlerine ayarlanmasında L-(+)-tartarik asit (Tekkim TK201080.01002, %99.5) ve sodyum hidroksit (NaOH; Sigma 06203) kimyasallarıyla hazırlanan çözeltilerden yararlanılmıştır. pH'yı 3.5'a ayarlamak için otoklavlanmış PDA besiyerine steril kabin altında ayrı bir şişede steril edilmiş %10'luk L-(+)-tartarik asit çözeltisinden litreye 14 mL gelecek şekilde eklenmiştir. pH 5.6 değeri PDA besiyerinin orijinal pH değeri olduğu için besiyerine herhangi bir kimyasal eklenmemiştir. PDA besiyerini pH 7.0 ve 9.0 değerlerine getirmek için 0.1 N'lik NaOH çözeltisinden yararlanılmıştır. Ayarlamalar sonrası hazırlanan besiyerlerinin pH değerleri masa tipi bir pH-metre (HI 2211 pH/ORP Meter, HANNA Instruments, ABD) ile belirlenmiştir. Hazırlanan besiyerleri, uygun pH'lara getirildikten sonra (pH 3.5 hariç) otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

Hazırlanan küf spor süspansiyonundan ( $3.8 \times 10^7$  spor/mL) 10 µL alınıp, farklı pH (3.5, 5.6, 7.0 ve 9.0) değerlerine sahip PDA besiyerlerinin tam ortasına gelecek şekilde inoküle edilmiştir. Hava atmosferinde paketlenen kontrol örneklerinde *A. flavus* küfünün gelişiminin takibi Koroplast marka kilitli buzdolabı poşetleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Merkezine küf sporları konmuş besiyeri içeren petri kutusu, buzdolabı poşeti içerisine yere paralel şekilde yerleştirilmiş ve bu şekilde hazırlanan paket 25°C'ye ayarlanmış bir etüvde inkübasyona bırakılmıştır. MAP uygulaması için, gerçekleştirilen ön-denemeler sonucunda içerisindeki gaz atmosferini etkin bir şekilde muhafaza ettiği belirlenen (PE+PA+EVOH+PA+PE) ambalaj materyali kullanılmıştır. Petri kutusu, bu ambalaj materyali içerisine yukarıda anlatıldığı şekilde yerleştirilmiş, paket içerisindeki mevcut gaz, vakum uygulaması (0.09 MPa) ile uzaklaştırılmış ve istenen gaz kompozisyonu (%100 N<sub>2</sub>, %70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub> veya %100 CO<sub>2</sub>) paket içerisine gönderilmiştir.

Steril edilen besiyerleri üzerine inoküle edilen *A. flavus* küf gelişiminin takibi Karaca ve diğ. (2014) tarafından önerilen yöntem kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla 25°C'de iki günde bir olmak üzere küf gelişimi, birbirine dik 2 düzlemde küf çapının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Bu çalışma her bir pH ve gaz atmosferleri için 5 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak her bir pH değeri için hava atmosferi ile paketlenmiş örnekler seçilmiş ve bu besiyerlerinde gelişen küf kolonisinin çaplarının ortalaması (dc) olarak kabul edilmiştir. Aynı pH değerlerine sahip farklı gaz atmosferi ile paketlenmiş besiyerlerinde gelişen küf kolonisinin çaplarının ortalaması ise (dt) olarak belirlenmiş ve aşağıda yer alan eşitliği kullanılarak %inhibisyon değeri hesaplanmıştır.

$$\%inhibisyon = \frac{dc-dt}{dc} \times 100 \quad (2.1)$$

### 2.3.2 Kırmızıbiberde *Aspergillus flavus* Küfünün Gelişiminin Takibi

PDA besiyerinde gerçekleştirilen çalışmalara benzer şekilde *A. flavus* küfü ile inoküle edilip 7 gün boyunca 25°C'de inkübe edilen besiyeri üzerine 10 mL steril saf su eklenmiştir. Steril bir drigalski spatülü yardımıyla besiyeri yüzeyi kazınmış, küf sporlarının suya geçmesi sağlanmış ve böylece *A. flavus* küf sporu süspansiyonu elde edilmiştir. Çalışmada kullanılacak bu süspansiyondaki küf sporu sayısını öğrenebilmek için Thoma lamında hücre sayımı tekniği kullanılmıştır. Söz konusu lamda koloniler sayılmış, gerekli hesaplamalar yapılmış ve belirlenen oranlarda dilüsyonlar gerçekleştirilerek süspansiyondaki küf sporu sayısı  $7.4 \times 10^7$  spor/mL olarak ayarlanmıştır.

#### 2.3.2.1 Kırmızıbiberin Modifiye Atmosfer Paketleme için Hazırlanması

Kırmızıbiberler Denizli'de bulunan yerel bir marketten temin edilmiştir. Yıkanan ve temiz bir bezle silinen kırmızıbiberler, bir bıçakla 2-3 cm eninde ve boyunda küçük parçalara ayrılmıştır. Daha sonra, biber parçaları ev tipi bir kurutucuda (Profilo, PFD2350W, Polonya) kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan

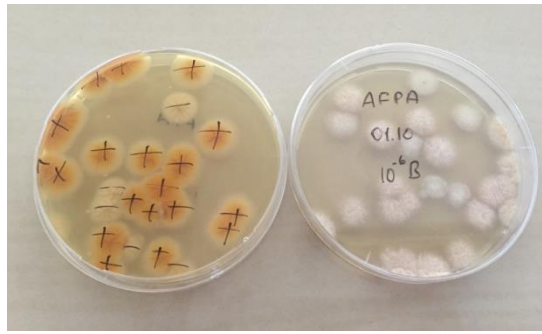
örnekler kurutucudan alındıktan sonra bir süre soğumaya bırakılmış ve küf inokülasyonuna hazır hale getirilmiştir. Literatürde yapılan araştırmada kırmızıbiberlerde küf gelişimi ve toksin üretimi için gerekli  $a_w$  aralığı 0.68-0.79 olarak verilmiştir (Ağaoğlu 1999).

Çalışmamızda inoküle edilecek biber örnekleri için en uygun nem miktarının tespiti amacıyla farklı seviyelerde nem içeren (%21.83-72.25) kırmızıbiberler kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Kurutulmuş örneklerin nem miktarı Scaltec (SMO 01, Göttingen, Almanya) marka nem tayini cihazı ile tespit edilmiştir. Kırmızıbiber örnekleri *A. flavus* küfü ile yukarıda anlatıldığı şekilde inoküle edilmiş ve 25°C'de 8 günlük bir inkübasyona bırakılmıştır. Nem seviyesi %48.78'in altında olan kırmızıbiber örneklerinde inkübasyon süresince herhangi bir küf gelişimine rastlanmamıştır. Söz konusu değer üstündeki tüm nem değerlerinde küf gelişimi gözlenmiş ancak küf gelişiminin takibinin en sağlıklı şekilde yapılabileceği değer aralığı olarak %57.70-65.69 belirlenmiştir. Bu nem aralığına karşılık gelen  $a_w$  değerleri (0.82-0.87) GBX FAsT/lab (Romans sur Isère, Fransa) su aktivitesi tayin cihazı kullanılarak tespit edilmiştir.

Kurutulan kırmızıbiberler etli iç yüzeyi üste gelecek şekilde steril petri kutularının içerisine yerleştirilmiştir. Küf spor süspansiyonundan ( $7.4 \times 10^7$  spor/mL) 10 µL alınıp petri kutusunun içerisindeki kırmızıbiber örneklerinin tam ortasına gelecek şekilde inoküle edilmiştir. Petri kutularının kapakları üzerinde, PDA besiyerinde gerçekleştirilen denemelerdeki gibi 8 adet delik açılmıştır. Hava atmosferinde paketlenen kontrol örneklerinde *A. flavus* küfünün gelişiminin takibi Koroplast marka kilitli buzdolabı poşetleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Merkezine küf sporları konmuş kırmızıbiber örneğini içeren petri kutusu, buzdolabı poşeti içerisine yere paralel şekilde yerleştirilmiş ve bu şekilde hazırlanan paket 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. PDA besiyerinde olduğu gibi kırmızıbiberlerde gerçekleştirilen MAP uygulaması için, PE+PA+EVOH+PA+PE ambalaj materyali kullanılmıştır. Paket içerisindeki mevcut gaz, vakum uygulaması ile uzaklaştırılmış ve istenen gaz kompozisyonu (%100 N<sub>2</sub>, %70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub> veya %100 CO<sub>2</sub>) paket içerisine gönderilmiştir.

*A. flavus* küfü inoküle edilmiş yarı kurutulmuş kırmızıbiber örneklerinde küf gelişim takibi *Aspergillus flavus* ve *parasiticus* agar (AFPA) besiyerinde 25°C'de 8

günlük inkübasyonun ardından gerçekleştirilmiştir. Seçici bir besiyeri olan AFPA'da gerçekleştirilen çalışmada hazırlanan dilüsyonlar 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmış ve bu süreç sonucunda besiyeri üzerinde oluşan turuncu koloniler sayılarak gelişim miktarı dilüsyon oranlarına göre hesaplamaları yapılmış ve sonuçlar log kob/g olarak kaydedilmiştir (Ghitakou ve diğ. 2006, Tripathi ve Mishra 2009). Kırmızıbiberlerde *A. flavus* küf gelişim takibinde her bir gaz atmosferleri için 5 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Aşağıda yer alan Şekil 2.4'te kırmızıbiberlerde AFPA besiyerinde gözlemlenen tipik *A. flavus* küf koloni görüntüsüne yer verilmiştir.



**Şekil 2.4:** AFPA besiyerinde gözlemlenen tipik *A. flavus* küf kolonileri

## 2.4 Aflatoksin Analizleri

Literatürde *A. flavus* küfünün aflatoksin üretimi için gerekli optimum sıcaklık değerinin 20-35°C aralığında olduğu bildirilmiştir (Demirel ve Yıldırım 2000, Ergun ve diğ. 2006). Küf gelişiminin takibi için gerçekleştirilen inokülasyon ve inkübasyon işlemleri, bu kez üretilen aflatoksin miktarının tespiti amacıyla yapılmıştır. Gerçekleştirilen aflatoksin analizleriyle, farklı gaz atmosferlerinde (hava, %100 N<sub>2</sub>, %70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub>, %100 CO<sub>2</sub>) paketlenmiş ve 25°C'de 8 gün inkübasyona bırakılmış kırmızıbiberlerde ve pH'sı 3.5, 5.6, 7.0, 9.0 olan besiyerlerinde *A. flavus* küfünün aflatoksin üretim miktarları incelenmiştir.

Besiyerlerinde ve kırmızıbiberlerde üretilen aflatoksin miktarının tayini, aflatoksinlerin örnekten ekstrakte edilmesi ve ekstraktın yüksek basınç sıvı kromatografisinde (high performance liquid chromatography, HPLC) analiz edilmesiyle gerçekleştirilmiştir.



Analizde kullanılan çözeltiler aflatoksin B<sub>1</sub> ve G<sub>1</sub>'in floresans yayınımlarını değiştirdiği için söz konusu aflatoksinlerin dedektör tarafından kolayca teşhis edilmesini sağlamak amacıyla türevlendirme işlemi gerçekleştirilmiştir. HPLC kolonu ile floresans dedektör arasına yerleştirilen bir hücrede (Coring Cell, CC3200130) elektrokimyasal olarak üretilen brom ile aflatoksin B<sub>1</sub> ve G<sub>1</sub>, daha yüksek floresans özellik gösteren türevleri B<sub>2a</sub> ve G<sub>2a</sub>'ya dönüştürülmüştür. Türevlendirme işleminin gerçekleştirilmesi için mobil faz içerisine potasyum bromür (KBr; Sigma-Aldrich, 02110) ve nitrik asit (HNO<sub>3</sub>; Merck, 100443, %65) ilave edilmiştir.

Aflatoksin analizlerinin gerçekleştirildiği HPLC cihazının özellikleri ve analizlerdeki kromatografi koşulları Tablo 2.1'de verilmiştir. Tüm aflatoksin analizleri, her bir uygulama için 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

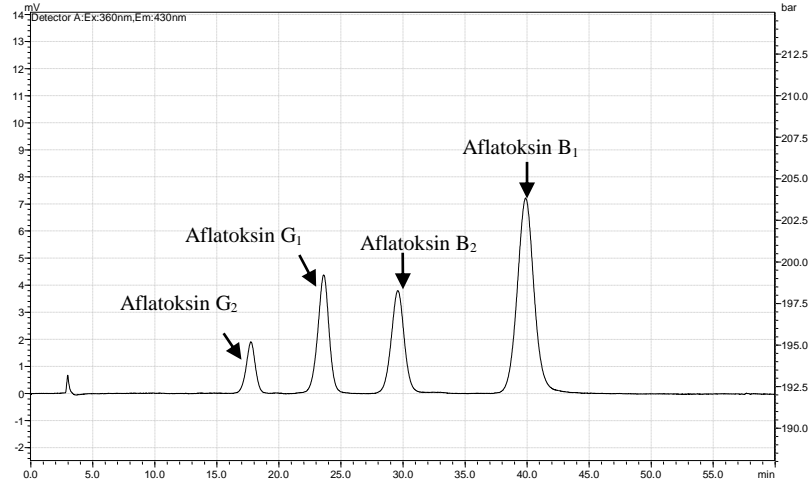
**Tablo 2.1:** Aflatoksin analizlerinin gerçekleştirildiği HPLC cihazının özellikleri ve analizlerdeki kromatografi şartları

<b>HPLC</b>	Shimadzu LC-20AD, Kyoto, Japonya
<b>Pompa</b>	Shimadzu LC-20A
<b>Degasser</b>	Shimadzu DGU-20A
<b>Kolon</b>	Inertsil ODS 3 analitik kolon (GL Sciences, ODS 3 Inertsil, partikül çapı: 5µm, 250*4.6 mm iç çap, Tokyo, Japonya)
<b>Kolon fırını</b>	25°C (Shimadzu CTO-20A)
<b>Dedektör</b>	Floresans Dedektör (Shimadzu RF-20A)
<b>Mobil faz</b>	Metanol:Su (216 mg KBr+ 636 µL 4 M'lık HNO <sub>3</sub> ) (40:60)
<b>Akış hızı</b>	1 mL/dakika
<b>Dalga boyu</b>	Tahrik=excitation dalga boyu 360 nm, Yayım=emission dalga boyu 430 nm
<b>Enjeksiyon hacmi</b>	20 µL

#### 2.4.1 Aflatoksin Standart Çözeltisinin Hazırlanması

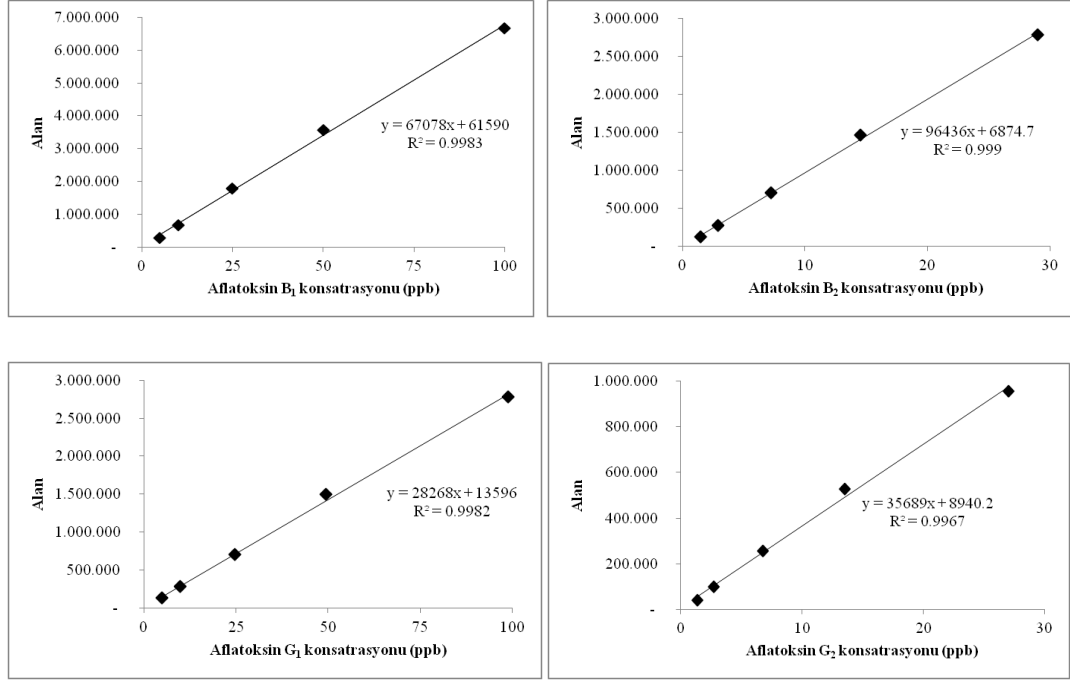
Aflatoksin standardı olarak, mililitresinde 1 µg aflatoksin B<sub>1</sub>, 0.29 µg aflatoksin B<sub>2</sub>, 0.99 µg aflatoksin G<sub>1</sub> ve 0.27 µg aflatoksin G<sub>2</sub> bulunan 1 mL metanol içerisinde çözülmüş toplam aflatoksin standart çözeltisi (Supelco, Bellefonte, PA, ABD) kullanılmıştır. Aflatoksinler sabit akış hızındaki geliş zamanları tespit edilerek

bulunmuştur. Şekil 2.5'te içerisinde 10 ppb aflatoksin B<sub>1</sub>, 2.9 ppb aflatoksin B<sub>2</sub>, 9.9 ppb aflatoksin G<sub>1</sub> ve 2.7 ppb aflatoksin G<sub>2</sub> bulunduran aflatoksin standart çözeltisine ait kromatogram verilmiştir. Aflatoksin standart maddelerine ait pikler sırasıyla B<sub>1</sub> 39.88, B<sub>2</sub> 29.59, G<sub>1</sub> 23.63 ve G<sub>2</sub> 17.75. dakikalarda gelmiştir.



**Şekil 2.5:** İçerisinde aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>'yi bulunduran standart çözeltiye ait kromatogram

Kalibrasyon eğrilerini çizmek için toplam aflatoksin standardı kullanılarak metanol ile içerisinde 5-100 ppb aflatoksin B<sub>1</sub>, 1.45-29 ppb aflatoksin B<sub>2</sub>, 4.95-99 ppb aflatoksin G<sub>1</sub> ve 1.35-27 ppb aflatoksin G<sub>2</sub> bulunan çözeltiler hazırlanmış ve sırasıyla HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Her bir konsantrasyon için tüm aflatoksin çeşitlerinin ayrı ayrı 5 noktalı kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 2.6'da verilmiştir.



**Şekil 2.6:** Aflatoxin kalibrasyon eğrileri a) Aflatoxin B<sub>1</sub> için çizilen kalibrasyon eğrisi, b) Aflatoxin B<sub>2</sub> için çizilen kalibrasyon eğrisi, c) Aflatoxin G<sub>1</sub> için çizilen kalibrasyon eğrisi, d) Aflatoxin G<sub>2</sub> için çizilen kalibrasyon eğrisi

#### 2.4.2 Ekstraksiyon, Temizleme ve Enjeksiyon

Örneklerde aflatoxin analizi AOAC 999.07 numaralı "Fıstık Ezmesi, Antepfıstığı Ezmesi, İncir Ezmesi ve Toz Biberde Aflatoxin Belirlenmesi" başlıklı resmi metot modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (Stroka ve diğ. 2000). Aflatoxin içeriği tespit edilmek istenen besiyeri (yaklaşık 20 g) Waring blenderın haznesine alınmış ve içerisine 2.5 g sodyum klorür (NaCl; Sigma-Aldrich, 31434), 7.5 mL saf su ve 70 mL saf metanol (İsolab, 947.043) ilave edilmiştir. Aflatoxin analizlerinde kullanılan biber örneklerinin miktarı yaklaşık 2 g olduğundan, ekstraksiyon işleminde kullanılan metanol, NaCl ve saf su miktarları da aynı oranda (onda bir oranında) azaltılarak kullanılmıştır. Blender 1 dakika düşük devir hızıyla çalıştırılmıştır. Daha sonra blender içeriği kaba filtre kağıdından süzümüştür. Süzüntüden 5 mL alınıp 10 mL fosfat tampon çözeltisi (phosphate buffer solution=PBS) (pH 7.4) ile seyreltilmiştir. PBS; 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ve 1.45 g disodyum hidrojen dihidratın (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; Merck, 106580) 1000 mL saf su içerisinde çözündürülmesiyle hazırlanmıştır.

Seyreltilmiş ekstrakt (15 mL) doğal akış hızında (yaklaşık 3 mL/dakika) immuno affinite kolondan (IAC; Aokin AG, Berlin, Almanya) geçirilmiştir. Filtrattan sonra kolondan birkaç defa hava geçirilmiştir. Kolon iki kez 10 mL saf su geçirilerek (5 mL/dakika) yıkanmış ve ardından tekrar birkaç defa hava geçirilmiştir. Ucu, orijinal tıpasıyla kapatılan kolona üstten 1 mL metanol (HPLC saflığında, Merck, 106007) ilave edilmiş ve 3 dakika bu şekilde beklenmiştir. Süre sonunda kolondaki metanol bir vial alınmış ve üzerine 1 mL saf su ile ilave edilmiştir. HPLC enjeksiyonunda vial içerisindeki bu örnek kullanılmıştır. Enjeksiyon işlemi 50 µL'lik şırınga (Hamilton, 705 NR) yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Yapılan her enjeksiyonun öncesinde ve sonrasında şırınga HPLC saflığında metanol ile temizlenmiştir.

## 2.5 Aflatoksin Analizlerinde Gözlenebilme Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırının (LOQ) Belirlenmesi

Aflatoksin analizlerinde gözlenebilme sınırı (Limit of Detection, LOD) ve tayin sınırı (Limit of Quantification, LOQ) değerini belirlemek için 5 noktalı kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Bunun için toplam aflatoksin standardı kullanılarak metanol ile içerisinde 0.025-0.5 ppb aflatoksin B<sub>1</sub>, 0.00725-0.145 ppb aflatoksin B<sub>2</sub>, 0.2475-0.495 ppb aflatoksin G<sub>1</sub> ve 0.00675-0.135 ppb aflatoksin G<sub>2</sub> bulunan çözeltiler hazırlanmış ve sırasıyla HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Her bir konsantrasyon için 3 enjeksiyon yapılmıştır. Kalibrasyon eğrileri, (2.2) ve (2.3)'de yer alan eşitlikler yardımıyla her bir aflatoksin çeşidi için LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler sırasıyla aflatoksin B<sub>1</sub> için 0.016 ve 0.048 ppb, aflatoksin B<sub>2</sub> için 0.016 ve 0.049 ppb, aflatoksin G<sub>1</sub> için 0.025 ve 0.076 ppb ve aflatoksin G<sub>2</sub> için 0.04 ve 0.12 ppb olarak tespit edilmiştir.

$$LOD = \frac{3.3 \times \text{standart sapma}}{\text{eğim}} \quad (2.2)$$

$$LOQ = \frac{10 \times \text{standart sapma}}{\text{eğim}} \quad (2.3)$$

## 2.6 İstatistik Analiz

Çalışmamızda istatistik değerlendirmeler "Minitab 16 Statistical Software" programı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) tekniği ile değerlendirilmiştir. Ortalamalar arasındaki farklılıklar Tukey testi ile karşılaştırılmış ve karşılaştırma gruplarına ait veriler  $\alpha= 0.05$  güven aralığına göre test edilmiştir.

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 3.1 Farklı Paketleme Materyallerinin Paket İçi Gaz Bileşimine Etkisi

İçerisine %70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub> oranında gaz karışımı basılan ve 25°C'de 10 gün bekletilen farklı ambalaj materyallerinden üretilmiş paketler içerisindeki O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ve N<sub>2</sub> gazlarının kompozisyonun değişimi Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablodan da görüldüğü üzere; basılan gaz karışımı, denenen ambalajlardan biri hariç (PET+Al+Coex PA) tümünde gayet iyi bir şekilde depolamanın başında tespit edilebilmiştir. Problemlili olan ambalaj materyalinin yapısında var olan alüminyum nedeniyle esneklik göstermediği belirlenmiş ve bu nedenle vakum uygulamasıyla paket içerisindeki havanın etkin bir şekilde uzaklaştırılmadığı sonucuna varılmıştır. Paket içerisine gönderilen gaz karışımının (%70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub>) başlangıçta en ideal şekilde olduğu ve 10 günlük depolama süresince korunduğu ambalaj materyalinin PE+PA+EVOH+PA+PE'den üretilmiş poşet örnekleri olduğu belirlenmiştir. Bu durumun söz konusu ambalaj malzemesinin üstün özelliklerinden (esneklik, düşük O<sub>2</sub> ve N<sub>2</sub> geçirgenliği, vb.) kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle PE+PA+EVOH+PA+PE'den üretilmiş poşetlerin tez çalışmasında MAP uygulamalarında kullanılmasına karar verilmiştir. Normal atmosfer koşullarını sağlamak için ise LDPE materyalinden üretilmiş fermuarlı buzdolabı poşetleri kullanılmıştır.

**Tablo 3.1:** İncelenen farklı ambalaj materyallerine ait gaz ölçüm sonuçları

AMBALAJ MALZEMESİ	0. GÜN	5. GÜN	10. GÜN
PE+PA+EVOH+ PA+PE	<p>O<sub>2</sub> 0% CO<sub>2</sub> 30% N<sub>2</sub> 70%</p>	<p>O<sub>2</sub> 0% CO<sub>2</sub> 30% N<sub>2</sub> 70%</p>	<p>O<sub>2</sub> 0% CO<sub>2</sub> 30% N<sub>2</sub> 70%</p>
PET+COEX EVOH	<p>O<sub>2</sub> 0% CO<sub>2</sub> 29% N<sub>2</sub> 71%</p>	<p>O<sub>2</sub> 0% CO<sub>2</sub> 29% N<sub>2</sub> 71%</p>	<p>O<sub>2</sub> 0% CO<sub>2</sub> 29% N<sub>2</sub> 71%</p>
PET+Al+COEXPA	<p>O<sub>2</sub> 4% CO<sub>2</sub> 24% N<sub>2</sub> 72%</p>	<p>O<sub>2</sub> 6% CO<sub>2</sub> 21% N<sub>2</sub> 73%</p>	<p>O<sub>2</sub> 21% CO<sub>2</sub> 1% N<sub>2</sub> 78%</p>
PA+PE	<p>O<sub>2</sub> 0% CO<sub>2</sub> 29% N<sub>2</sub> 71%</p>	<p>O<sub>2</sub> 0% CO<sub>2</sub> 28% N<sub>2</sub> 72%</p>	<p>O<sub>2</sub> 1% CO<sub>2</sub> 27% N<sub>2</sub> 72%</p>
LDPE fermuarlı buzdolabı poşeti	<p>O<sub>2</sub> 0% CO<sub>2</sub> 29% N<sub>2</sub> 71%</p>	<p>O<sub>2</sub> 17% CO<sub>2</sub> 0% N<sub>2</sub> 83%</p>	<p>O<sub>2</sub> 19% CO<sub>2</sub> 0% N<sub>2</sub> 81%</p>

### 3.1.1 *Aspergillus flavus* Küfü ile İnoküle Edilip MAP Tekniğiyle Paketlenen PDA Besiyerlerinde Paket İçi Gaz Bileşimi Değişimi

PDA besiyeri üzerine inoküle edilmiş *A. flavus* küfünü içeren ve farklı gaz atmosferlerinde (hava, %100 N<sub>2</sub>, %70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub> veya %100 CO<sub>2</sub>) paketlenerek 8 gün boyunca 25°C'de inkübasyona bırakılmış örneklerin başlangıç ve son durumdaki (8. gün) gaz kompozisyonları incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 3.2'de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ve N<sub>2</sub> gaz oranları verilerek belirtilmiştir.

**Tablo 3.2:** Farklı pH'lara sahip PDA besiyeri üzerine inoküle edilmiş *A. flavus* küfünü içeren paketlerde bulunan gaz kompozisyonunun başlangıç ve 8 gün sonundaki O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ve N<sub>2</sub> oranları (%)

pH	Gaz kompozisyonu	Başlangıç			8. Gün		
		O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>
3.5	Hava	20.8±0.1	0.0±0.0	79.2±0.1	21.0±0.0	0.0±0.0	79.0±0.0
	%100 N <sub>2</sub>	0.4±0.5	0.0±0.0	99.6±0.5	0.0±0.0	2.8±0.4	97.2±0.4
	%70 N <sub>2</sub> + %30 O <sub>2</sub>	0.0±0.0	29.7±0.2	70.3±0.2	0.1±0.1	27.0±0.6	72.9±0.5
	%100 CO <sub>2</sub>	1.1±0.4	93.3±1.3	3.0±1.2	1.6±1.4	90.9±6.4	7.5±6.2
5.6	Hava	20.8±0.1	0.0±0.0	79.2±0.1	21.0±0.0	0.0±0.0	79.0±0.0
	%100 N <sub>2</sub>	0.4±0.5	0.0±0.0	99.6±0.5	0.0±0.0	1.8±1.6	98.2±1.6
	%70 N <sub>2</sub> + %30 O <sub>2</sub>	0.0±0.0	29.6±0.3	70.4±0.3	0.1±0.1	27.0±0.6	72.9±0.5
	%100 CO <sub>2</sub>	1.1±0.4	95.8±1.3	3.0±1.2	1.6±1.4	90.9±6.4	7.5±6.2
7.0	Hava	20.8±0.1	0.0±0.0	79.2±0.1	21.0±0.0	0.0±0.0	79.0±0.0
	%100 N <sub>2</sub>	0.4±0.2	0.0±0.0	99.6±0.2	0.0±0.0	2.3±0.2	97.7±0.2
	%70 N <sub>2</sub> + %30 O <sub>2</sub>	0.4±0.3	29.4±0.4	70.2±0.2	0.0±0.0	27.5±0.5	72.5±0.5
	%100 CO <sub>2</sub>	2.0±1.0	93.3±3.4	4.7±2.4	3.0±1.0	91.5±5.7	5.5±4.9
9.0	Hava	20.8±0.1	0.0±0.0	79.2±0.1	21.0±0.0	0.0±0.0	79.0±0.0
	%100 N <sub>2</sub>	0.1±0.2	0.2±0.2	99.6±0.3	0.0±0.0	2.8±0.2	97.2±0.3
	%70 N <sub>2</sub> + %30 O <sub>2</sub>	0.3±0.3	29.7±1.0	69.9±0.9	0.0±0.0	27.7±1.0	72.3±0.5
	%100 CO <sub>2</sub>	1.6±0.5	95.2±2.8	3.2±3.0	5.5±1.8	91.1±1.2	3.3±3.0



Tablo incelendiğinde paket içerisine gönderilen gaz kompozisyonunun depolama süresince genellikle korunduğu görülmüştür. Başlangıçta az da olsa kalan O<sub>2</sub> miktarının paketlenme sırasında uygulanan vakum miktarının yetersizliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bazı durumlarda görülen CO<sub>2</sub> konsantrasyonundaki artışın mutlak aerob bir mikroorganizma olan *A. flavus* küfünün ortamda iz miktarda kalmış olan O<sub>2</sub>'i solunum metabolizması sırasında kullanması sonucu açığa çıkan CO<sub>2</sub>'ten kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Ellis ve diğ. 1994a). Aynı şekilde bazı durumlarda görülen CO<sub>2</sub> gazındaki azalmanın, paket içi gaz atmosferi ve dış ortam (hava) gaz atmosferi arasında gerçekleşebilecek gaz transferinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Nitekim Moodley ve diğ. (2002), *P. expansum* inoküle edilmiş ve MAP tekniğiyle ambalajlanmış elmalarda, paket içerisindeki CO<sub>2</sub> oranının zamanla düştüğünü, N<sub>2</sub> oranının ise zamanla arttığını belirtmişlerdir.

### **3.1.2 *Aspergillus flavus* Küfü ile İnoküle Edilip MAP Tekniğiyle Paketlenen Kırmızıbiberlerde Paket İçi Gaz Bileşimi Değişimi**

Kırmızıbiber üzerine inoküle edilmiş *A. flavus* küfünü içeren ve farklı gaz atmosferlerinde (hava, %100 N<sub>2</sub>, %70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub> veya %100 CO<sub>2</sub>) paketlenerek 8 gün boyunca 25°C'de inkübasyona bırakılmış örneklerin ilk ve son durumdaki gaz kompozisyonları incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 3.3'te O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ve N<sub>2</sub> gaz oranları verilmiştir. Tablo incelendiğinde PDA besiyerinin paketlenmesindeki durumla benzer bir şekilde, kırmızıbiberlerde de depolamanın son gününe kadar paket içi gaz atmosferi genellikle korunmuştur.

**Tablo 3.3:** Kırmızıbiber üzerine inoküle edilmiş *A. flavus* küfünü içeren paketlerde bulunan gaz kompozisyonunun başlangıç ve 8 gün sonundaki O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ve N<sub>2</sub> oranları (%)

Gaz kompozisyonu	Başlangıç			8. Gün		
	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>
Hava	20.8±0.1	0.8±0.4	78.4±0.3	21.0±0.0	0.0±0.0	79.0±0.0
% 100 N <sub>2</sub>	0.3±0.5	0.0±0.1	99.6±0.5	0.1±0.1	0.6±0.3	99.3±0.2
% 70 N <sub>2</sub> + % 30 CO <sub>2</sub>	0.1±0.1	30.8±1.0	69.1±0.1	0.4±0.2	28.3±0.2	71.4±0.1
% 100 CO <sub>2</sub>	1.1±0.4	97.7±2.4	1.6±2.1	1.4±0.2	93.6±4.1	5.0±3.9

### 3.2 *Aspergillus flavus* Küfüne Modifiye Atmosferde Paketleme Uygulamasının Küf Gelişimi Üzerine Etkisi

#### 3.2.1 PDA Besiyerinde *Aspergillus flavus* Küfünün Gelişimi

*A. flavus* küfö, normal atmosfer koşullarında farklı pH değerlerine sahip PDA besiyerinde 25°C’de inkübasyona bırakılmış ve pH’ları 3.5, 5.6, 7.0 ve 9.0 olan besiyerlerinde sırasıyla 16, 14, 10 ve 8. günlerde maksimum gelişim miktarına (85 mm) ulaşarak besiyerinin üzerini tamamen kaplamıştır. Farklı pH değerlerine sahip olan ve MAP tekniğiyle paketlenmiş besiyerlerindeki küf gelişimlerini kıyaslamak için, besiyerleri 8 günlük inkübasyona bırakılmış ve iki günde bir alınan küf koloni çap ölçümlerinden (2.1) eşitliği kullanılarak inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Tablo 3.4’te farklı pH değerlerine sahip PDA besiyeri üzerine inoküle edilen *A. flavus* küfünün gelişimi üzerine MAP’ın inhibisyon etkisi verilmiştir.

**Tablo 3.4:** Farklı pH değerlerine sahip PDA besiyerine inoküle edilen *A. flavus* küfünün gelişimi üzerine MAP'ın inhibisyon etkisi (%)<sup>\*,\*\*</sup>

pH	Gaz Kompozisyonu	2. Gün	4. Gün	6. Gün	8. Gün
3.5	Hava	-	-	-	-
	%100 N <sub>2</sub>	46.56±8.37 Ba	7.33±5.10 Cb	30.93±6.61 Bb	48.57±5.04 Ba
	%70 N <sub>2</sub> + %30 CO <sub>2</sub>	36.64±18.60 Ba	23.08±12.66 Ba	19.07±12.09 Cb	36.86±11.27 Ca
	%100 CO <sub>2</sub>	100.00±0.00 Aa	91.94±3.84 Aa	88.66±1.59 Aa	84.26±3.24 Aa
5.6	Hava	-	-	-	-
	%100 N <sub>2</sub>	0.00±0.00 Cb	20.29±4.20 Ba	41.15±3.43 Bab	49.44±3.33 Ba
	%70 N <sub>2</sub> + %30 CO <sub>2</sub>	34.20±8.99 Ba	12.17±3.25 Bab	23.27±5.48 Cab	35.83±4.79 Ca
	%100 CO <sub>2</sub>	100.00±0.00 Aa	87.11±1.22 Aa	90.22±0.90 Aa	83.19±1.00 Aa
7.0	Hava	-	-	-	-
	%100 N <sub>2</sub>	0.00±0.00 Cb	20.00±4.94 Ba	44.96±2.91 Ba	55.61±2.67 Ba
	%70 N <sub>2</sub> + %30 CO <sub>2</sub>	27.69±10.32 Ba	7.73±6.52 Cb	26.82±3.37 Cab	40.85±3.63 Ca
	%100 CO <sub>2</sub>	100.00±0.00 Aa	93.18±2.30 Aa	90.39±1.03 Aa	90.12±1.37 Aa
9.0	Hava	-	-	-	-
	%100 N <sub>2</sub>	0.00±0.00 Cb	10.74±17.08 Bab	35.17±17.37 Bab	47.53±14.84 Ba
	%70 N <sub>2</sub> + %30 CO <sub>2</sub>	34.42±5.62 Ba	11.86±10.10 Bab	34.87±4.37 Ba	47.29±4.02 Ba
	%100 CO <sub>2</sub>	100.00±0.00 Aa	88.81±3.39 Aa	89.57±1.63 Aa	88.47±2.22 Aa

\*: İnkübasyonun herhangi bir gününde, aynı pH'ya sahip besiyerleri için hesaplanan inhibisyon ortalamalarından (n=5) farklı büyük harfle gösterilenler istatistiksel olarak farklıdır (p<0.05).

\*\* : İnkübasyonun herhangi bir gününde, aynı gaz kompozisyonuna sahip besiyerleri için hesaplanan inhibisyon ortalamalarından (n=5) farklı küçük harfle gösterilenler istatistiksel olarak farklıdır (p<0.05).

Tablodaki veriler incelendiğinde, farklı gaz atmosferleri bileşimleri altında paketlenme uygulaması birkaç durum hariç tüm örneklerde *A. flavus* gelişimini inhibe etmede etkili bulunmuştur. %100 N<sub>2</sub> gazı uygulamaları, inkübasyonun başlangıcında nispeten etkisiz ya da sınırlı etkiye sahipken, inkübasyonun sonuna doğru (özellikle 6. ve 8. günlerde) yüksek inhibisyon etki (%30.93-55.61) göstermiştir. Bu durum *A. flavus* küfünün ortamda iz miktarda kalan O<sub>2</sub>'i kullanarak gelişimini sürdürmesi ve ortamda O<sub>2</sub>'nin bitmesiyle solunum sonucu açığa çıkan CO<sub>2</sub>'in *A. flavus* küfü üzerine inhibe edici etki göstermesiyle açıklanabilir (Guynot 2004). %100 N<sub>2</sub> atmosferinde paketlenen örneklerde denenen 4 pH değerinin 3'ünde, inhibisyon etkisinin depolama boyunca arttığı tespit edilmiştir. %100 N<sub>2</sub> gazı uygulaması inkübasyonun 2. gününde pH'sı 3.5 olan örneklerde %46.56'lık bir inhibisyon etki göstermiş ancak denenen diğer pH değerlerinde etkisiz kalmıştır. Bu durum inkübasyonun devamında değişmiş ve inkübasyonun son günü (8. günü) farklı pH değerlerine sahip örneklerde tespit edilen inhibisyon değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0.005).

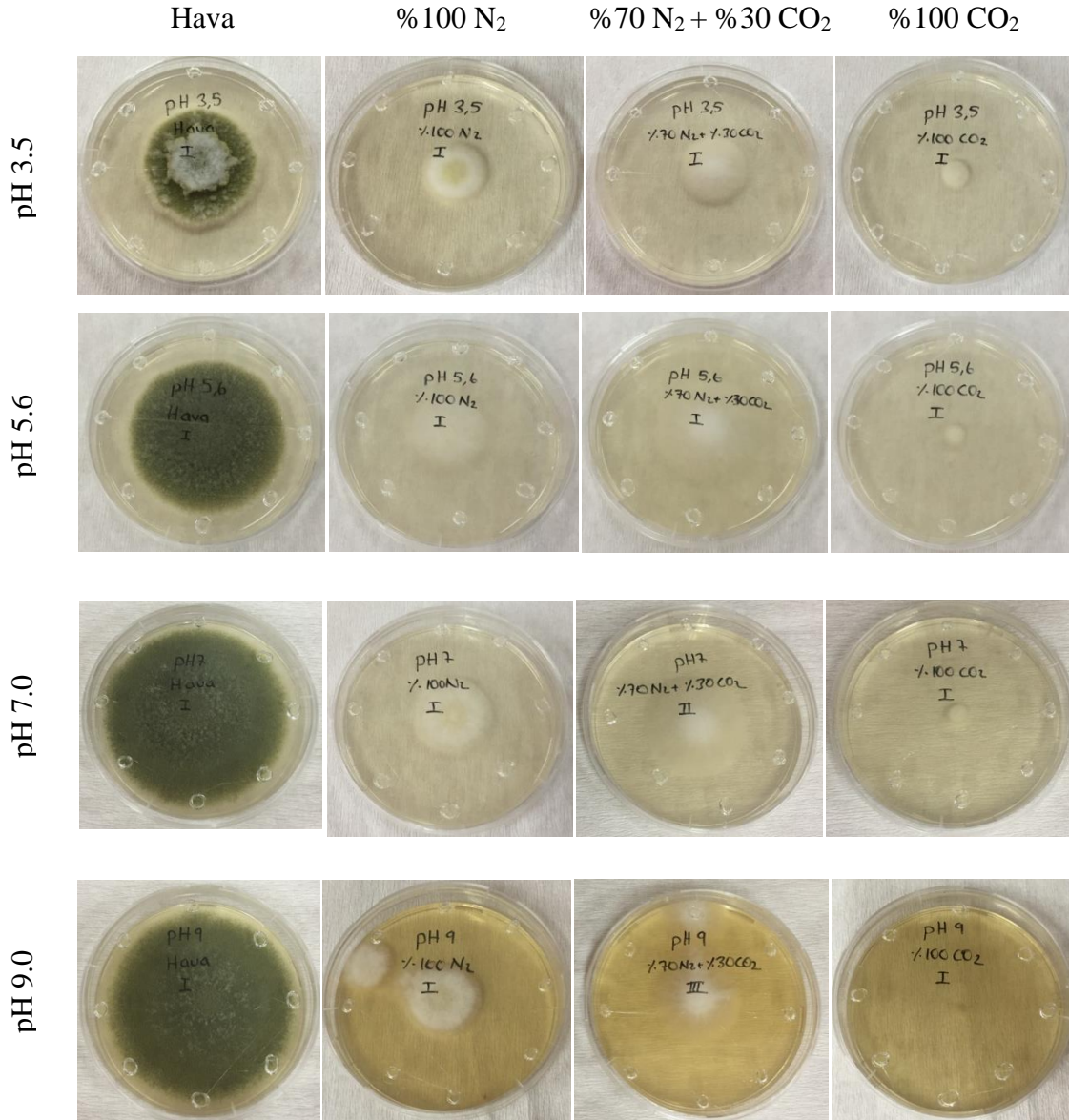
%70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub> atmosferi uygulaması; test edilen tüm pH değerlerinde inkübasyonun başlangıcında *A. flavus* gelişimini inhibe etmede etkili bulunmuştur. Bu uygulamayla, inkübasyonun 2. gününde %27.69-36.64'lük inhibisyon oranları elde edilmiştir. Ancak inkübasyonun ilerleyen zamanlarında bu uygulama, denenen farklı gaz kompozisyonları arasında en düşük inhibisyona yol açan uygulama olmuştur. %70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub> atmosferinde paketlenen örneklerde tespit edilen inhibisyonun, inkübasyonun başında (2. gün) ve sonunda (8. gün) pH'dan bağımsız olarak gerçekleştiği belirlenmiştir (p>0.005). %70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub> atmosferinde paketlenen örneklerde en yüksek inhibisyon oranı pH'sı 9.0'a ayarlanmış besiyeri örneklerinde elde edilmiş ve %47.29 olarak gerçekleşmiştir. Taniwaki ve diğ. (2009)'nin yapmış olduğu bir çalışmada *A. flavus* küfünün %20 CO<sub>2</sub> gaz atmosferinde yavaş da olsa gelişebildiği ancak %40 CO<sub>2</sub> gaz atmosferinde gelişemediği tespit edilmiştir. Benzer şekilde Giorni ve diğ. (2008)'nin PDA besiyerinde *A. flavus* küfünün gelişimini inceledikleri çalışmalarında, paket içerisindeki CO<sub>2</sub> konsantrasyonunun %25'ten %75'e yükseltilmesiyle küf gelişiminin önemli düzeyde (yaklaşık %90 oranında) inhibe edildiği tespit edilmiştir.

%100 CO<sub>2</sub> atmosferinde paketlenen örneklerde inhibisyon etkinin, asidik pH'ya sahip örneklerde (pH 3.5 ve 5.6) inkübasyon süresince azalırken, nötr (pH 7.0) ve bazik (pH 9.0) pH'ya sahip örneklerde zamanla değişmediği tespit edilmiştir (İstatistiksel değerlendirme sonuçları tabloya yansıtılmamıştır). Guynot ve diğ. (2004) CO<sub>2</sub>'nin antifungal aktivitesinin pH'ya bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, uyguladıkları tüm MAP koşullarında CO<sub>2</sub>'nin inhibisyon etkisinin pH 6'da pH 7.5'dan daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda %100 CO<sub>2</sub> atmosferi her depolama günü ve her pH değerinde en yüksek inhibisyon verilerinin alınmasını sağlayan uygulama olmuştur (Tablo 3.4). %100 CO<sub>2</sub> atmosferi uygulaması, çalışılan koşullarda küf gelişimini en az %83.19 düzeyinde inhibe etmiş ve test edilen her pH değerinde inkübasyonun 2. günü *A. flavus* gelişimini tamamen durdurmuştur. Guynot ve diğ. (2003) CO<sub>2</sub> gazının *A. flavus* küfüne karşı gösterdiği fungistatik etkinin pH'dan bağımsız olduğunu tespit etmişler ve bu durumu, çalışmada kullandıkları dar pH aralığına (pH 6.0-8.0) bağlamışlardır. Northolt ve Bullerman (1982)'nin yaptıkları çalışmada MAP uygulamasında paket içi atmosferde kullanılan %80'nin üzerindeki CO<sub>2</sub>

konsantrasyonunun ya da %1'in altındaki O<sub>2</sub> konsantrasyonunun küf gelişimini tamamen inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Şekil 3.1'de farklı pH ve farklı modifiye atmosferde paketlenmiş besiyerlerinin 8 günlük depolama sonrasındaki çekilmiş görüntüleri yer almaktadır.



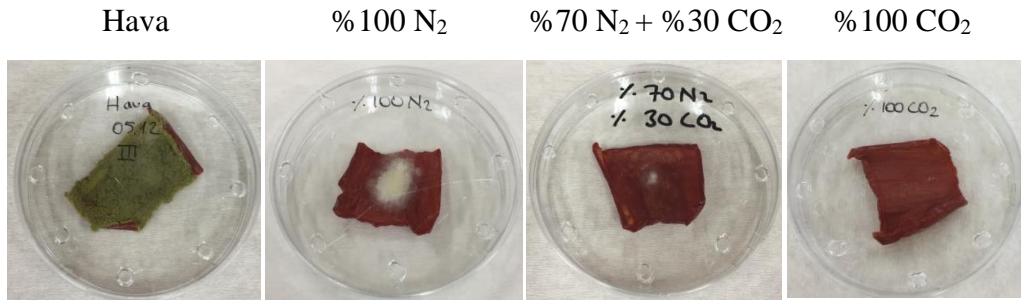
**Şekil 3.1:** Farklı pH değerlerine sahip besiyerlerinde farklı gaz atmosferlerinin etkisi

Görüldüğü gibi *A. flavus* küfü hava ortamında her pH değerinde gelişmiş ve sporlanmış, diğer gaz atmosferlerinde ise sınırlı düzeyde gelişmiş ve hiçbir şekilde sporlanmamıştır. Kantarcıoğlu ve Yücel (2003)'e göre, *A. flavus* kolonileri farklı hızda gelişebilir; renkleri türlere ve gelişme koşullarına bağlı olarak beyaz, sarı, sarımsı kahverengi, siyaha yakın kahverengi, kırmızı veya yeşil tonlarında harelidir ve sık konidyoforların oluşturduğu bir keçe görünümündedir. Koloni rengi daima,

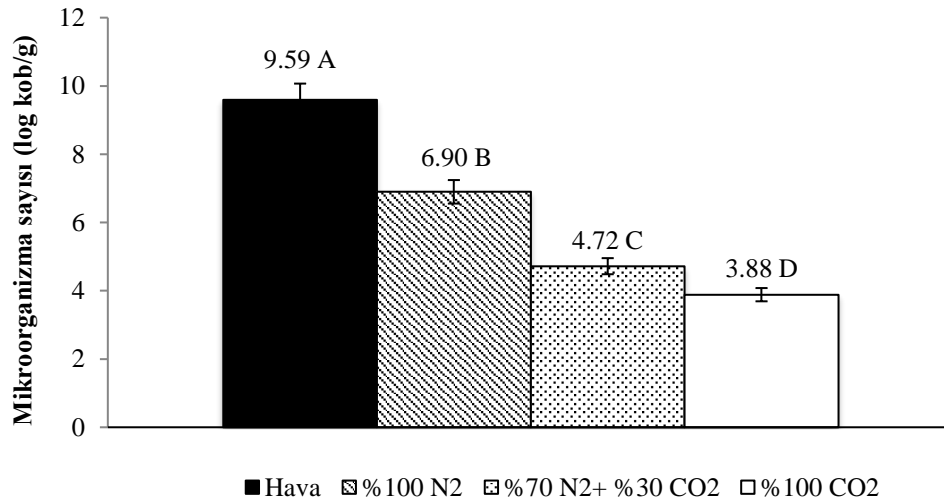
vegetatif hiflerin, konidyumlu başların ve varsa eşeyli yapıların rengine bağlıdır. Besiyerine dağılan pigment üretebilirler ve bu pigmentin renginin koloninin hava miselli kısmının renginden farklı olabileceği belirtilmiştir.

### 3.2.2 Kırmızıbiberlerde *Aspergillus flavus* Küfünün Gelişimi

Hava, %100 N<sub>2</sub>, %70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub> ve %100 CO<sub>2</sub> gaz kompozisyonlarında paketlenmiş ve 25°C'de 8 gün inkübasyona bırakılan kırmızıbiber örneklerinde *A. flavus* küfü gelişiminin gözlemlendiği örneklerin görselleri Şekil 3.2'de; mikroorganizma sayısının değişiminin gösterildiği grafik Şekil 3.3'te verilmiştir.



**Şekil 3.2:** Kırmızıbiberlerde 8 günlük inkübasyon sonucunda farklı gaz kompozisyonlarının *A. flavus* küfünün gelişimine etkisi



**Şekil 3.3:** Kırmızıbiber örneklerine inoküle edilen *A. flavus* küfünün gelişimi üzerine MAP'ın etkisinin AFPA besiyeri sayım sonuçları (log kob/g)\*

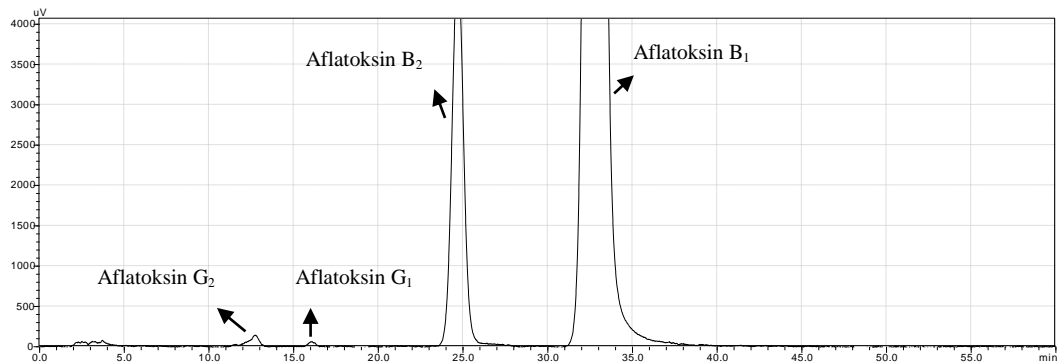
\*: Farklı harflerle gösterilen ortalamalar (n=3) istatistiksel olarak farklıdır (p<0.05).

Şekil 3.3'te görüldüğü gibi kırmızıbiber *A. flavus* küfünün gelişimi için iyi bir kaynaktır. Hava atmosferinde paketlenen kırmızıbiber örnekleri küfün en iyi gelişim gösterdiği ortam olmuştur (9.59 kob/g). Ortamdan O<sub>2</sub>'nin uzaklaştırılması ve CO<sub>2</sub>'nin eklenmesiyle küf sayısı azalmıştır. CO<sub>2</sub>'nin MAP tekniğindeki kullanım amacı, mikrobiyal gelişimi kısıtlamak ve meyve-sebze gibi solunum yapan gıdalarda solunumu yavaşlatmaktır (Pereira de Abreu ve diğ. 2012). Bu bilgi doğrultusunda CO<sub>2</sub> gaz atmosferi içeren paketlerde gözlenen yüksek inhibisyon etki olağandır. Benzer şekilde Giorni ve diğ. (2008) mısır örnekleriyle yaptıkları çalışmada hava atmosferinde paketlenmiş örneklerdeki *A. flavus* küf gelişiminin %25 CO<sub>2</sub> gaz atmosferinde paketlenen örneklerden daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. %75 CO<sub>2</sub> gaz atmosferinde paketlenen örneklerde ise küf gelişimin çok daha düşük seviyelerde kaldığı belirtilmiştir.

### 3.3 Modifiye Atmosferde Paketleme Uygulamasının *Aspergillus flavus* Küfünün Aflatoksin Üretimi Üzerine Etkisi

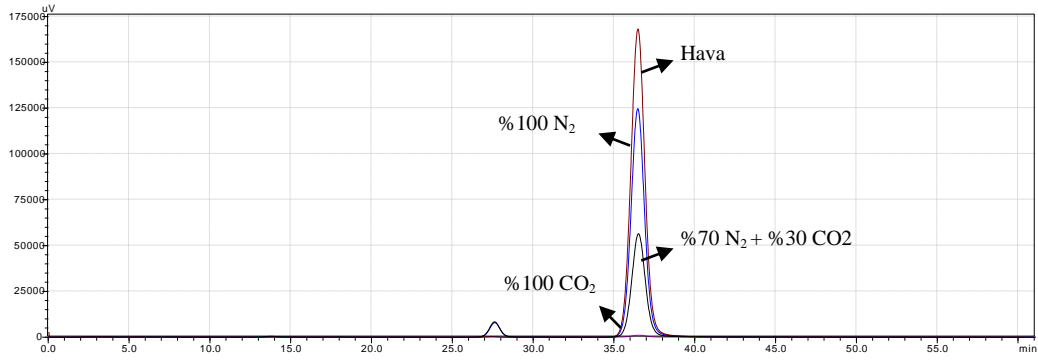
#### 3.3.1 PDA Besiyeri Örneklerinde Aflatoksin Üretimi

PDA besiyerlerinde gerçekleştirilen aflatoksin analizleri sonucunda Şekil 3.4'te yer alan kromatogramda görüldüğü gibi aflatoksin B<sub>1</sub>'in alıkonma zamanı 34.27 dakika olarak belirlenmiştir. Sırasıyla B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>'nin alıkonma zamanları ise sırasıyla 24.69, 16.06, 12.75 olduğu görülmüştür.

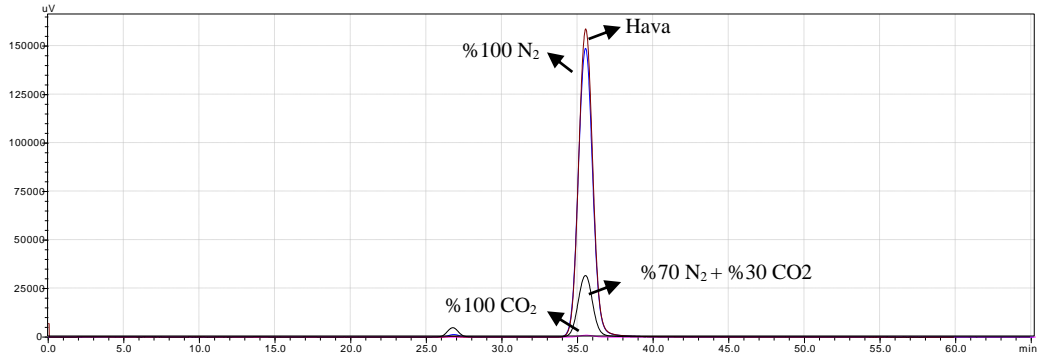


Şekil 3. 4: %70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub> atmosferinde paketlenmiş pH 5.6 PDA besiyerinde aflatoksin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>'nin kromatogram görüntüsü

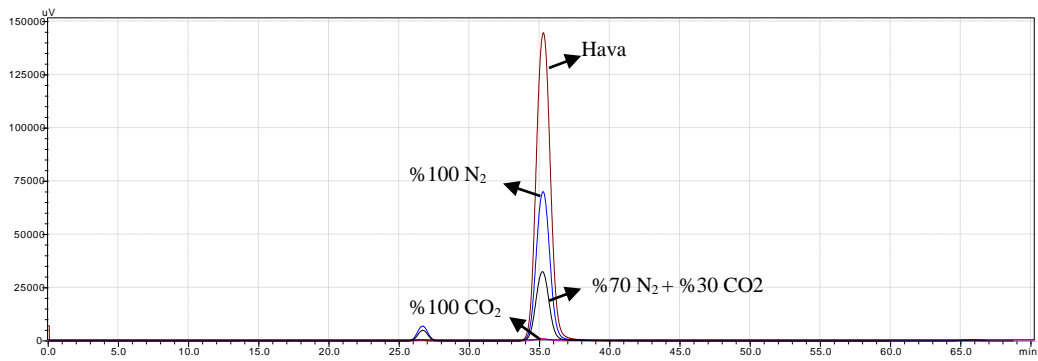
Farklı pH'lara ayarlanmış PDA besiyerlerinde gerçekleştirilen aflatoksin analizleri sonucunda elde edilen kromatogramlar Şekil 3.5- 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.5: pH'sı 3.5'a ayarlanmış PDA besiyerinde farklı gaz atmosferlerinde paketlemenin üretilen aflatoksin B<sub>1</sub> miktarı üzerine etkisi

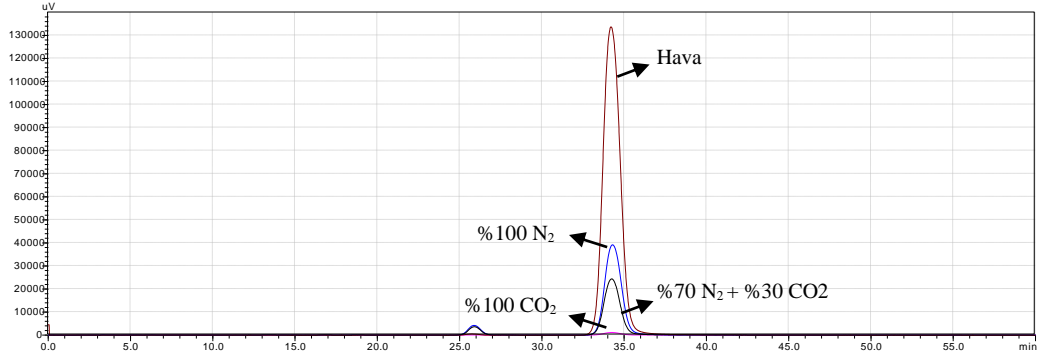


Şekil 3.6: pH'sı 5.6'a ayarlanmış PDA besiyerinde farklı gaz atmosferlerinde paketlemenin üretilen aflatoksin B<sub>1</sub> miktarı üzerine etkisi



Şekil 3.7: pH'sı 7.0'a ayarlanmış PDA besiyerinde farklı gaz atmosferlerinde paketlemenin üretilen aflatoksin B<sub>1</sub> miktarı üzerine etkisi





**Şekil 3.8:** pH'sı 9.0'a ayarlanmış PDA besiyerinde farklı gaz atmosferlerinde paketlemenin üretilen aflatoxin B<sub>1</sub> miktarı üzerine etkisi

Besiyerlerinde aflatoxin analizleri için farklı pH değerlerine sahip PDA besiyerleri farklı gaz atmosferleri altında paketlenmiş ve 25°C'deki etüvde 8 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 8. gününde aflatoxin analizleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 3.5'te verilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde *A. flavus* küfü PDA besiyerinde B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub> aflatoxin türlerini aflatoxin B<sub>1</sub> ile kıyaslandığında çok düşük düzeyde ürettiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde Giorni ve diğ. (2008)'nin sentetik besiyeri ortamında ve mısırlarda gerçekleştirdikleri aflatoxin analizinde aflatoxin B<sub>1</sub>'i baskın aflatoxin çeşidi olarak belirlemişlerdir.

**Tablo 3.5:** Farklı pH değerlerine sahip PDA besiyerine inoküle edilen *A. flavus* küfünün aflatoksin üretimi üzerine MAP'ın etkisi\*. \*\*

pH	Gaz Kompozisyonu	Aflatoksin B <sub>1</sub> (ppb)	Toplam Aflatoksin (ppb)
3.5	Hava	144.95±7.16 Ab	145.06±7.18 Ab
	% 100 N <sub>2</sub>	100.69±4.21 Bb	104.67±4.35 Bb
	% 70 N <sub>2</sub> + % 30 CO <sub>2</sub>	43.36±1.82 Ca	47.58±1.96 Ca
	% 100 CO <sub>2</sub>	0.03±0.28 Da	0.24±0.14 Da
5.6	Hava	153.03±2.93 Aa	153.83±2.39 Aa
	% 100 N <sub>2</sub>	132.63±4.20 Ba	133.28±4.37 Ba
	% 70 N <sub>2</sub> + % 30 CO <sub>2</sub>	28.56±0.44 Cb	31.43±0.50 Cb
	% 100 CO <sub>2</sub>	0.04±0.03 Da	0.09±0.03 Da
7.0	Hava	144.80±6.40 Ab	145.03±6.4 Ab
	% 100 N <sub>2</sub>	65.13±0.95 Bc	69.14±1.00 Bc
	% 70 N <sub>2</sub> + % 30 CO <sub>2</sub>	28.18±0.84 Cb	31.09±0.88 Cb
	% 100 CO <sub>2</sub>	0.20±0.03 Da	0.24±0.02 Da
9.0	Hava	143.56±4.24 Ab	143.79±4.25 Ab
	% 100 N <sub>2</sub>	36.88±1.81 Bd	39.54±1.89 Bd
	% 70 N <sub>2</sub> + % 30 CO <sub>2</sub>	22.47±0.21 Cc	24.86±0.21 Cc
	% 100 CO <sub>2</sub>	0.19±0.03 Da	0.23±0.03 Da

\*: İnkübasyonun herhangi bir gününde, aynı pH'ya sahip besiyerleri için hesaplanan aflatoksin ortalamalarından (n=3) farklı büyük harfle gösterilenler istatistiksel olarak farklıdır (p<0.05).

\*\* : İnkübasyonun herhangi bir gününde, aynı gaz kompozisyonuna sahip besiyerleri için hesaplanan aflatoksin ortalamalarından (n=3) farklı küçük harfle gösterilenler istatistiksel olarak farklıdır (p<0.05).

Gerçekleştirilen her bir denemede *A. flavus* küfü tarafından üretilen aflatoksin miktarları hava> %100 N<sub>2</sub>> %70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub>> %100 CO<sub>2</sub> şeklinde bulunmuştur. Bu sonuç en fazla aflatoksin üretiminin hava atmosferinde olduğunu, ortamdaki O<sub>2</sub> miktarının azaltılması veya sıfırlanması halinde küfün istatistiksel olarak daha az (p<0.05) aflatoksin ürettiğini göstermiştir. Ortam atmosferine %30 oranında dahil edilen CO<sub>2</sub> ile üretilen aflatoksin miktarının daha da azaldığı (p<0.05) ve ortamdaki

CO<sub>2</sub> düzeyinin %30'dan %100'e çıkarılmasıyla *A. flavus*'un aflatoksin üretiminin çok düşük düzeylerde kaldığı tespit edilmiştir. Taniwaki ve diğ. (2009)'nin yaptıkları çalışmada PDA ve CYA besiyerinde *A. flavus* küfünün %20'nin üzerindeki CO<sub>2</sub> konsantrasyonunda yaşayabildiği ancak aflatoksin üretmediğini bazı istisnai durumların paket içerisinde var olabilecek iz düzeydeki O<sub>2</sub>'den kaynaklanmış olabileceği belirtilmiştir.

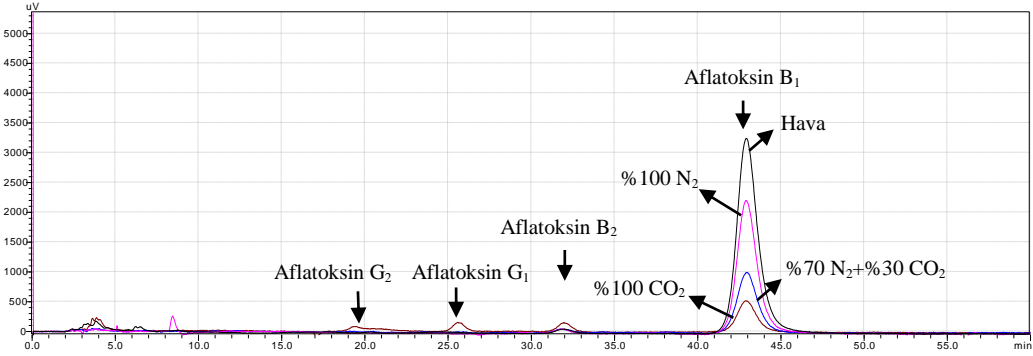
Hava atmosferinde paketlenen örneklerde en fazla aflatoksin üretimi pH 5.6'da gerçekleşmiştir. Diğer pH değerleri arasında (pH 3.5, pH 7.0 ve pH 9.0) aflatoksin üretimi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). %100 N<sub>2</sub> atmosferinde depolanan örneklerde üretilen aflatoksin miktarları pH 5.6 > pH 3.5 > pH 7.0 > pH 9.0 şeklinde gerçekleşmiştir. Ellis ve diğ. (1993)'nin gerçekleştirdiği çalışmada, MAP uygulamasıyla *A. flavus* küfünün gelişimini ve toksin üretimini durdurmak için düşük  $a_w$  değerlerinde uygulanan yüksek pH veya düşük pH kombinasyonlarının etkili bir yöntem olduğu belirtilmiştir. Bu sonuç, küf gelişimi ve toksin üretiminin diğer pH değerlerinde, pH 5.6'ya göre daha düşük seviyede gerçekleştiğini ortaya koyan bulgularımız ile uyumaktadır.

%70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub> atmosferinde depolanan örneklerde en fazla aflatoksin üretiminin pH 3.5'ta, en düşük aflatoksin üretiminin pH 9.0'da olduğu tespit edilmiştir. Bu gaz atmosferinde üretilen aflatoksin miktarları açısından pH 5.6 ile 7.0 arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Aflatoksin üretiminin pH 9.0'da düşük seviyede olmasının sebebi *A. flavus*'un aflatoksin üretmesi için gerekli optimum pH değeri olan 6.0'dan nispeten uzak bir pH değeri olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Sweeney ve Dobson 1998).

%100 CO<sub>2</sub> atmosferinde depolanan örneklerde üretilen aflatoksin miktarları besiyeri pH'sından bağımsız olarak önemli ölçüde sınırlandırılmıştır. %100 CO<sub>2</sub>'in etkisinin besiyeri pH'sından bağımsız olduğu ( $p>0.05$ ) gerçekleştirilen istatistiksel analiz sonucunda tespit edilmiştir. Pek çok araştırmacı tarafından CO<sub>2</sub>'nin fungisidal etkisinden bahsedilmektedir. Guynot ve diğ. (2003), %100 CO<sub>2</sub> atmosferinin *A. flavus*'un da dahil olduğu bazı küf türlerinin gelişimi ve toksin üretimini diğer değişkenlerden ( $a_w$  ve pH) bağımsız olarak tamamen durdurduğunu belirtmişlerdir.

### 3.3.2 Kırmızıbiber Örneklerinde Aflatoksin Üretimi

Kırmızıbiberlerde yapılan aflatoksin analizi sonucu elde edilen kromatogram ise Şekil 3.9'da verilmiştir. Kromatogramda görüldüğü gibi aflatoksin B<sub>1</sub>'in alıkonma zamanı 42.02 dakika olarak belirlenmiştir. Sırasıyla B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> ve G<sub>2</sub>'nin alıkonma zamanları ise sırasıyla 31.26, 25.85 ve 17.37 olduğu görülmüştür.



Şekil 3.9: Kırmızıbiberde farklı gaz atmosferlerinde paketlemenin üretilen aflatoksin B<sub>1</sub> miktarı üzerine etkisi

Kırmızıbiberler aflatoksin analizleri için farklı gaz atmosferleri altında paketlenmiş ve 25°C'deki etüvde 8 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 8. gününde aflatoksin analizleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 3.6'da verilmiştir. Gerçekleştirilen aflatoksin analizi sonucunda aflatoksin B<sub>1</sub> baskın aflatoksin çeşidi olarak dikkat çekmektedir. Nitekim Dokuzlu (2001)'nin kırmızı toz biberlerde aflatoksin miktarını araştırdığı bir çalışmada kullandığı 14 örneğin hepsinde aflatoksin B<sub>1</sub>, yalnızca 1 tanesinde ise aflatoksin B<sub>1</sub>'in dışında bir mikotoksin çeşidinin (aflatoksin G<sub>1</sub>) varlığı tespit edilmiştir.

Tablo 3.6: Kırmızıbiber üzerine inoküle edilen *A. flavus* küfünün aflatoksin üretimi üzerine MAP'ın etkisi\*

Gaz Kompozisyonu	Aflatoksin B <sub>1</sub> (ppb)	Toplam Aflatoksin (ppb)
Hava	84.41±3.41 A	85.17±3.44 A
% 100 N <sub>2</sub>	0.49±0.28 B	0.67±0.54 B
% 70 N <sub>2</sub> + % 30 CO <sub>2</sub>	1.27±0.78 B	1.80±0.74 B
% 100 CO <sub>2</sub>	0.52±0.18 B	1.07±0.29 B

\*: Farklı harflerle gösterilen ortalamalar (n=3) istatistiksel olarak farklıdır (p<0.05).

Kırmızıbiber örneklerinde üretilen aflatoksin B<sub>1</sub> miktarları hava, %100 N<sub>2</sub>, %70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub> ve %100 CO<sub>2</sub> atmosferi ortamlarında sırasıyla 84.41, 0.49, 1.27 ve 0.52 ppb olarak tespit edilmiştir. Hava atmosferinde depolanan örnekler dikkate alındığında *A. flavus*'un besiyeri ortamında ürettiği aflatoksin B<sub>1</sub> miktarının kırmızıbiberlerde ürettiği aflatoksin B<sub>1</sub> miktarından daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Tripathi ve Mishra (2009) *A. flavus* küfünün gelişmesi ve toksin üretmesi için kırmızıbiberin iyi bir kaynak olduğunu belirtmişlerdir. Besiyeri ve kırmızıbiber arasındaki farklılığın sebebinin *A. flavus*'un besinsel ihtiyaçlarını PDA besiyerinin kırmızıbiberden daha iyi karşıladığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Örneğin *A. flavus* küfü aflatoksin sentezi için gerekli karbonu glikoz, sakkaroz ve galaktozdan karşılamaktadır (Gourama ve Bullerman 1995). Ancak kırmızıbiberlerde glikoz ve sakkarozun yanında fruktozun olması aflatoksin üretimi açısından PDA besiyerine kıyasla daha az üretimin gerçekleşmesine sebep olmuş olabilir (Nielsen ve diğ. 1991). Bu farklılığın bir başka sebebi kırmızıbiberlerin *A. flavus* küf gelişimini ve toksin üretimini sınırlayıcı etkiye sahip olan demir iyonlarını ihtiva etmesi sayılabilir (Gourama ve Bullerman 1995). Benzer şekilde kırmızıbiberlerde bulunabilecek bazı doğal maddelerin antimikrobiyal potansiyelinin kırmızıbiberlerdeki küf gelişimi ve toksin üretimini sınırlayıcı etki göstermiş olabileceğini düşünülmektedir (Manimala ve Murugesan 2014).

Bu çalışmada test edilen %100 N<sub>2</sub> ve %70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub> atmosferi uygulamalarının, *A. flavus*'un aflatoksin üretimine karşı inhibisyon etkisinin kırmızıbiberlerde besiyeri ortamından daha yüksek olduğu görülmüştür. %100 N<sub>2</sub> ve %70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub> atmosferi uygulamalarının besiyeri ortamında (pH'sı 5.6) %13.33 ve %81.34 düzeyinde bir inhibisyon yaratırken aynı uygulamaların kırmızıbiberde yarattığı inhibisyon düzeyleri %99.42 ve %98.49 olarak tespit edilmiştir.

#### 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, önemli bir aflatoksin üreticisi küf olan *A. flavus*'un gelişimi ve toksin üretimi üzerine modifiye atmosferde paketlenme işleminin etkisi tespit edilmiştir. Bu amaçla besiyeri (PDA) ve gıda maddesi (yarı kurutulmuş kırmızıbiber) ortamına inoküle edilen aflatoksin üreticisi *A. flavus* küfünün, farklı gaz atmosferlerinde (hava, %100 N<sub>2</sub>, %70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub> veya %100 CO<sub>2</sub>) gelişimi ve aflatoksin üretimi incelenmiştir. Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetletmiştir:

- 1) Test edilen MAP tekniği *A. flavus* küfünün gelişimini ve aflatoksin üretimini gerek besiyeri gerekse kırmızıbiber ortamında kontrol etmede etkili bulunmuştur.
- 2) Mutlak aerob olan *A. flavus* küfünün paket içerisinde kalan az miktardaki O<sub>2</sub> gazını gelişimi için kullanabildiği ve bu O<sub>2</sub>'nin tükenmesinin ardından ise küf gelişiminin yavaşladığı belirlenmiştir.
- 3) Normal atmosfer koşullarında, farklı pH değerlerine sahip PDA besiyerlerinde *A. flavus* küfünün gelişimi incelendiğinde, küfün en hızlı pH 9'da geliştiği ve onu sırasıyla pH 7.0, 5.6 ve 3.5'un takip ettiği tespit edilmiştir.
- 4) Yine normal atmosfer koşullarında farklı pH değerlerine sahip PDA besiyerlerinde *A. flavus* küfünün aflatoksin üretim miktarları incelendiğinde en yüksek üretimin (153.03 ppb) pH 5.6'da gerçekleştiği diğer pH'lar arasında istatistiksel açıdan fark bulunmadığı görülmüştür (p>0.05).
- 5) İncelenen bütün pH değerlerinde paket içerisine verilen diğer gaz karışımlarının (%100 N<sub>2</sub>, %70 N<sub>2</sub> + %30 CO<sub>2</sub> ve %1000 CO<sub>2</sub>) hava atmosferinde paketlenen örneklere kıyasla küfün gelişimini geciktirdiği ve toksin üretimini azalttığı görülmüştür. Ayrıca paket içerisinde CO<sub>2</sub> oranının artması ile küf gelişimi daha etkili bir şekilde inhibe edilmiştir.
- 6) Kırmızıbiberlerde küf gelişimine MAP'ın etkisi istatistiksel olarak farklılık gösterse de (p<0.05) aflatoksin üretimine etkisi kullanılan tüm gaz

kompozisyonlarında istatistiksel açıdan benzer etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir ( $p>0.05$ ).

- 7) %100 CO<sub>2</sub> atmosferi altında paketlenen kızılcık biberlerde gerekse PDA'da küf gelişiminde %90'ın üzerinde, aflatoksin üretiminde ise %97'nin üzerinde bir inhibisyon etkiye yol açmıştır.
- 8) MAP tekniği kullanılarak depolama sırasında paket içeriğinde gerçekleştirilebilecek olan yüksek CO<sub>2</sub> gaz karışımlarıyla pek çok üründe ciddi sorunlara sebep olan aflatoksin üreticisi *A. flavus* küfünün gelişimi yavaşlatılabilir ve toksin üretimi azaltılabilir.
- 9) Son yıllarda ülkemizde dahil olmak üzere dünya genelinde aflatoksin problemi sıklıkla karşılaşılan ve ciddi sağlık sorunlarına sebep olması nedeniyle çözümü için pek çok yöntemin araştırıldığı güncel bir konu olarak öne çıkmaktadır. Tez çalışmamız ile bu probleme karşı MAP tekniğinin kullanımıyla elde edilen başarılı sonuçlar, yalnızca kızılcık biber için değil incir, mısır, fıstık gibi aflatoksin sorununun sıklıkla karşılaşıldığı diğer tarımsal ürünler için de çözüm olabileceği konusunda umut vadetmektedir.

## KAYNAKLAR

Ağaoğlu, S., "Van İlinde Açıkta Satılan Kırmızı Pul Biberlerde Aflatoksin B<sub>1</sub> Varlığının Araştırılması", *Van Tıp Dergisi*, 6(4), 28-30, (1999).

Akbay C., Boz İ., Yıldız- Tiryaki G., Candemir S. ve Arpacı B. B., "Kahramanmaraş ve Gaziantep İllerinde Kırmızıbiberin Üretim Yapısı ve Kurutma Yöntemleri", *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 15(2), 1-10, (2012).

Akkara, M. ve Tosun, H. "Funguslardan Elde Edilen Endüstriyel Ürünler" *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 9(2), 46-53, (2014).

Aksoy U., "Aflatoksin", *Ege Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi*, (1990).

Anonim, "Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği", *25157 Sayılı Resmi Gazete*, (2011).

Anonim, Background Information on Aflatoxin [online] (10.04.2019), <https://vegetarianz.weebly.com/alfatoxin-content.html>, (2016).

Aran, N., *Gıda Biyoteknolojisi*, Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık Tic. Ltd Şti, 6. Basım, 1-17, (2016).

Atasayar Sabuncuoğlu, S., Baydar, T., Giray, B. ve Şahin, G., "Mikotoksinler: Toksik Etkileri, Degredasyonları, Oluşumlarının Önlenmesi ve Zararlı Etkilerinin Azaltılması", *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 28(1) 63-92, (2008).

Atasoy A. F., Hayoğlu İ., Korkmaz A., Kara E. ve Yıldırım A., "Geleneksel Ev İsoot Baharatının Aflatoksin İçeriğinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma", *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 21 (1), 35-40, (2017).



Ayberkin, E. ve Çiftçi, E., "Çocuklarda *Aspergillus* Enfeksiyonları", *Çocuk Enfeksiyonları Dergisi*, 3, 118-125, (2009).

Ben-Yehoshua, S., Beaudry, R. M., Fishman, S., Jayanty, S. and Mir, N., *Environmentally Friendly Technologies for Agricultural Produce Quality 4- Modified Atmosphere Packaging and Controlled Atmosphere Storage*, Edit. Ben-Yehoshua, S., Taylor & Francis Group, 61-112, (2005).

Caleb O. J., Mahajan P. V., Al-Said, F. A-J. and Opara U. L., "Modified Atmosphere Packaging Technology of Fresh and Fresh-Cut Produce and The Microbial Consequences- A Review", *Food Bioprocess Technology*, 6, 303-329, (2013).

Cemeroğlu B. S., *Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi: 1. Cilt*, Ankara: Bizim Grup Basımevi Ajans Tanıtım Org. Yay. Dağ. San. Tic. Ltd. Şti., 5. Baskı, 239-246, (2013).

Chaix E., Couvert O., Guillaume C., Gontard N. and Guillard V., "Predictive Microbiology Coupled with Gas (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>) Transfer in Food/Packaging Systems: How to Develop an Efficient Decision Support Tool for Food Packaging Dimensioning", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, 1-21, (2015).

Charles F., Sanchez J. and Gontard N., "Active Modified Atmosphere Packaging of Fresh Fruits and Vegetables: Modeling with Tomatoes and Oxygen Absorber", *Journal of Food Science*, 68, 1736-1742, (2003).

Chulze, S. N., "Strategies to Reduce Mycotoxin Levels in Maize During Storage: A Review", *Food Additives and Contaminants*, 27(5), 651-657, (2010).

Çınar, S., Yılmaz, S. N., Aydın, E. ve Yorulmaz, A., "Gıda ve Yem Alarm Sistemi (RASFF) 2009-2016 Türkiye Raporu", *Türk Tarım ve Teknoloji Dergisi*, 5(8), 873-882, (2017).

Çiçek, H., Yılmaz, N., Çelik, A., Özlü Ceylan, N. ve Meram, İ., "Kapsaisin (Kırmızı Biber) İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri", *Anadolu Tıp Dergisi*, 7, 1-10, (2005).

Demircioğlu, S. ve Filazi, A., "Türkiye'de Üretilen Kırmızıbiberlerde Aflatoksin Kalıntılarının Araştırılması", *Veteriner Hekimler Derneđi Dergisi*, 81(2), 63-66, (2010).

Demirel, M. and Yıldırım, A., "Van Yöresinde Yetiştirici Şartlarında Depolanan Kaba Yemlerde Aflatoksin Oluşumunun Saptanması", *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi (J. Agric. Sci.)*, 10(1), 77-83, (2000).

Dokuzlu C., "Kırmızı Toz Biberlerde Aflatoksin", *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20, 19-23, (2001).

Duman, A. D., "Kahramanmaraş'ta Kırmızı Biberin Önemi ve Sorunları", *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 5, 111-117, (2002).

El Halouat, A. and Debevere, J M., "Effect of Water Activity, Modified Atmosphere Packaging and Storage Temperature on Spore Germination of Moulds Isolated from Prunes", *International Journal of Food Microbiology*, 35, 41-48, (1997).

Ellis, W. O., Smith, J. P., Simpson, B. K. and Ramaswamy, H., "Effect of Gas Barrier Characteristics of Films on Aflatoxin Production by *Aspergillus flavus* in Peanuts Packaged under Modified Atmosphere Packaging (MAP) Conditions", *Food Research International*, 27, 505-512, (1994a).

Ellis, W. O., Smith, J. P., Simpson, B. K. and Ramaswamy, H., "Growth of and Aflatoxin Production by *Aspergillus flavus* in Peanuts Stored under Modified Atmosphere Packaging (MAP) Conditions", *International Journal of Food Microbiology*, 22, 173-187, (1994b).

Ellis, W.O., Smith, J. P., Simpson B. K., Khanizadeh S. and Oldham J. H., "Control of Growth and Aflatoxin Production of *Aspergillus flavus* under Modified Atmosphere Packaging (MAP) Conditions", *Food Microbiology*, 10, 9-21, (1993).

Ergun, A., Altıokka, G. and Atkoşar, Z., "Aflatoksinler: Tayin Yöntemleri Üzerine", *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7, 175-81 (2006).

European Commission, "Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs [online]", (17.04.2019), <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1881-20140701&from=EN> (2006).

Ghitakou, S., Koutras, K., Kanellou, E. and Markaki, P., "Study of Aflatoxin B<sub>1</sub> and Ochratoxin A Production by Natural Microflora and *Aspergillus parasiticus* in Black and Green Olives of Greek Origin", *Food Microbiology*, 23, 612-621, (2006).

Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A. and Magan, N., "Effect of a<sub>w</sub> and CO<sub>2</sub> Level on *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin Production in High Moisture Maize Post-harvest", *International Journal of Food Microbiology*, 109-113, (2008).

Gourama, H. and Bullerman, L. B., "*Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic Fungi of Concern in Foods and Feeds: A Review", *Journal of Food Protection*, 58(12), 1395-1404, (1995).

Guynot, M. E., Marin, S., Sanchis, V. and Ramos, A. J., "An Attempt to Minimize Potassium Sorbate Concentration in Sponge Cakes by Modified Atmosphere Packaging Combination to Prevent Fungal Spoilage", *Food Microbiology*, 21, 449-457, (2004).

Guynot, M. E., Marin, S., Sanchis, V. and Ramos, A. J., "Modified Atmosphere Packaging for Prevention of Mold Spoilage of Bakery Products with Different pH and Water Activity Levels", *Journal of Food Protection*, 66(10), 1864-1872, (2003).

Gün İ., Güzel-Seydim Z. ve Seydim A. C., "Modifiye Atmosferde Paketlemenin Farklı Tipteki Peynirlerin Bazı Niteliklerine Etkisi", *Gıda*, 34(5), 309-316 (2009).

Inan, F., Pala, M. and Doymaz, I., "Use of Ozone in Detoxification of Aflatoxin B<sub>1</sub> in Red Pepper" *Journal of Stored Products Research*, 43, 425-429 (2007).

İnanç A. L. ve Açık A., "Direkt Etanol Enjeksiyonlu Kırmızıbiberlerdeki *Aspergillus flavus* Küflerinin Büyüme Kinetiği", *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 20(2), 120-127, (2017).

Kantarcıoğlu, S. A. ve Yücel, A., "*Aspergillus* Cinsi Mantarlar ve İnvaziv Aspergilloz: Mikoloji, Patogenez, Laboratuvar Tanımı, Antifungallere Direnç ve Duyarlılık Deneyleri", *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 34(3), 140-157, (2003).

Karaca, H. ve Nas, S., "Aflatoxins, Patulin and Ergosterol Contents of Dried Figs in Turkey", *Food Additives and Contaminants*, 23(5), 502-508, (2008).

Karaca, H., Perez-Gago, M. B., Taberner, V. and Palou, L., "Evaluating Food Additives as Antifungal Agents Against *Monilinia fructicola* in vitro and in Hydroxypropyl Methycellulose-Lipid Composite Edible Coatings for Plums", *International Journal of Food Microbiology*, 179, 72-79, (2014).

Kılınç, B. ve Çaklı, Ş., "Su Ürünlerinin Modifiye Atmosferde Paketlenmesi", *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 21(3-4), 349-353, (2004).

Kirtıl, E., Kilercioglu, M. and Oztop, M. H., "Reference Module in Food Science, Modified Atmosphere Packaging of Foods", Eds. Richard Berryman, Davies, P., Gerlis, R., *Elsevier*, 1-6 (2016).

Madigon, M. T. and Martinko, J. M., "Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi", *Palme Yayıncılık*, Ankara, 11. Baskı, 469, (2010).

Mangaraj, S., Goswami, T. K. and Mahajan, P. V., "Applications of Plastic Films for Modified Atmosphere Packaging of Fruits and Vegetables: A Review", *Food Engineering Reviews*, 1, 133-158, (2009).

- Manimala, M. R. A. and Murugesan, R., "In vitro Antioxidant and Antimicrobial Activity of Carotenoid Pigment Extracted from *Sporobolomyces* sp. Isolated from Natural Source" *Journal of Applied and Natural Science*, 6(2), 649-653, (2014).
- Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A. J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V. and Parker, M., "Antimicrobial Activity of Cinnamon and Clove Oils under Modified Atmosphere Conditions", *International Journal of Food Microbiology*, 107, 180-185, (2006).
- Moodley, R. S., Govinden, R. and Odhav, B., "The Effect of Modified Atmospheres and Packaging on Patulin Production in Apples", *Journal of Food Protection*, 65(5), 867-871, (2002).
- Nguyen Van Long, N., Vasseur, V., Couvert, O., Coroller, L., Burlot, M., Rigalma, K. and Mounier, J., "Modeling the Effect of Modified Atmospheres on Conidial Germination of Fungi from Dairy", *Foods Frontiers in Microbiology*, (2017).
- Nielsen, T. H., Skjærbæk, H. C. and Karlsen, P., "Carbohydrate Metabolism During Fruit Development in Sweet Pepper (*Capsicum annuum*) Plants", *Physiologia Plantarum*, 82, 311-319 (1991).
- Northolt, M. D. and Bullerman, L. B., "Prevention of Mould Growth and Toxin Production through Control of Environmental Conditions", *Journal of Food Protection*, 45, 516-526, (1982).
- Oruç, H. H., "Mikotoksinler ve Tanı Yöntemleri", *Uludağ University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*, 24(1-4), 105-110, (2005).
- Özçakmak, S., Dervişoğlu, S., Pembeci-Kodolbaş, C. and Sağdıç, O., "Effects of Thyme and Rosemary Essential Oils on the Growth of Two Aflatoxigenic *Aspergillus flavus* Strains", *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 83, 170-174, (2010).
- Özer, H., "Fındıklara Uygulanan Fiziksel ve Isıl Süreçlerin Aflatoksinler Üzerine Etkisi", *Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, İstanbul*, (2009).

Özkaya Ş. and Temiz A., "Aflatoksinler: Kimyasal Yapıları, Toksisiteleri ve Detoksifikasyonları", *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1, 1-21, (2003).

Park, D.L., Njapau, H. and Boutrif, E., "Minimizing Risks Posed by Mycotoxins Utilizing The HACCP Concept", *International Information System for the Agricultural Science and Technology*, (1999).

Pereira de Abreu, D. A., Cruz, J. M. and Paseiro Losada, P., "Active and Intelligent Packaging for the Food Industry", *Food Reviews International*, 28,146-187, (2012).

Philips, C. A., "Review: Modified Atmosphere Packaging and its Effects on the Microbiological Quality and Safety of Produce", *International Journal of Food Science and Technology*, 31, 463-479, (1996).

RASFF, "Rapid Alert System for Food and Feed", *Annual Report on Functioning of the RASFF*, EU Report, EU Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, (2018).

RASFF, "Rapid Alert System for Food and Feed", *Annual Report on Functioning of the RASFF*, EU Report, EU Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, (2017).

RASFF, "Rapid Alert System for Food and Feed", *Annual Report on Functioning of the RASFF*, EU Report, EU Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, (2016).

RASFF, "Rapid Alert System for Food and Feed", *Annual Report on Functioning of the RASFF*, EU Report, EU Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, (2015).

RASFF, "Rapid Alert System for Food and Feed", *Annual Report on Functioning of the RASFF*, EU Report, EU Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, (2014).

Samapundo, S., De Meulenaer, B., Atukwase, A., Debevere, J. and Devlieghere F., "The Influence of Modified Atmospheres and Their Interaction with Water Activity on the Radial Growth and Fumonisin B<sub>1</sub> Production of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on Corn. Part I: The Effect of Initial Headspace Carbon Dioxide Concentration", *International Journal of Food Microbiology*, 114, 160-167, (2007).

Skandamis, P. N. and Nychas G. J. E., "Preservation of Fresh Meat with Active and Modified Atmosphere Packaging Conditions" *International Journal of Food Microbiology*, 79(1-2), 35-45, (2002).

Stroka, J., Anklam, E., Jörisen, U. and Gilbert J., "Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography Using Post-Column Bromination for Determination of Aflatoxins in Peanut Butter, Pistachio Paste, Fig Paste and Paprika Powder: Collaborative Study", *Journal of AOAC International*, 83(2), 320-340, (2000).

Suhr, K. I. and Nielsen, P. V., "Inhibition of Fungal Growth on Wheat and Rye Bread by Modified Atmosphere Packaging and Active Packaging Using Volatile Mustard Essential Oil", *Journal of Food Science*, 70(1), 37-44, (2005).

Sweeney, M. J. And Dobson A. D. W., "Review: Mycotoxin Production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* Species", *International Journal of Food Microbiology*, 43, 141-158, (1998).

Şen L. ve Nas S., "Kuru İncir, Üzüm ve Kırmızıbiberlerde Mikotoksin Varlığı", *Akademik Gıda*, 8(3), 24-32, (2010).

Taniwaki, M. H., Hocking, A. D., Pitt, J. I. and Fleet, G. H., "Growth of Fungi and Mycotoxin Production on Cheese under Modified Atmospheres", *International Journal of Food Microbiology*, 68, 125-133, (2001).

Taniwaki, M. H., Hocking, A. D., Pitt, J. I. and Fleet, G. H., "Growth and Mycotoxin Production by Food Spoilage Fungi under High Carbon Dioxide and Low Oxygen Atmospheres", *International Journal of Food Microbiology*, 132, 100-108, (2009).

Tiryaki, O., Seçer, E. ve Temur, C., "Yemlerde Mikotoksin Oluşumu, Toksisiteleri ve Mikotoksin Kalıntı Analizleri", *Anadolu: Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*", 21(1), 44-58, (2011).

Tripathi, S. and Mishra, H. N., "Nutritional Changes in Powdered Red Pepper Upon in vitro Infection of *Aspergillus flavus*", *Brazilian Journal of Food Microbiology*, 40, 139-144, (2009).

Türköz Bakırcı, G., "Tahıl ve Tahıl Ürünlerinin Aflatoksin, Okratoksin A, Zearalenon, Fumonisin ve Deoksinivalenol Mikotoksinleri Yönünden İncelenmesi" *Akademik Gıda*, 12(2), 46-56, (2014).

Valero, A., Begum, M., Hocking, A. D., Marin, S., Ramos, A. J. and Sanchis, V., "Mycelial Growth and Ochratoxin a Production by *Aspergillus Section nigri* on Simulated Grape Medium in Modified Atmospheres", *Journal of Applied Microbiology*, 105, 372-379, (2008).

Wang, H., Jin, X. and Wu, H., "Modified Atmosphere Packaging Bags of Peanuts with Effect of Inhibition of Aflatoxin Growth" *Journal of Applied Polymer Science*, 1-6, (2014).

Yentür, G. ve Er, B., "Gıdalarda Aflatoksin Varlığının Değerlendirilmesi", *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(1), 41-52, (2012).

Zardetto, S., "Effect of Modified Atmosphere Packaging at Abuse Temperature on the Growth of *Penicillium aurantiogriseum* Isolated from Fresh Filled Pasta", *Food Microbiology*, 22, 367-371, (2005).

Zhang M., Meng X., Bhandari B., Fang Z. and Chen H., "Recent Application of Modified Atmosphere Packaging (MAP) in Fresh and Fresh-cut Foods", *Food Reviews International*, 31, 172-193, (2015).



## 5. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : UFUK GÖKÇE AYRANCI

Doğum Yeri ve Tarihi : DİYARBAKIR/ 07.10.1992

Lisans Üniversite : PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ

Elektronik posta : ufuk\_gokce\_ayranci@hotmail.com

İletişim Adresi : Asmalievler Mah. 6630 Sok. No:42 C  
Blok Daire: Bodrum 3 Pamukkale/  
Denizli

### Yayın Listesi :

- Ayrancı, U. G. and Karaca, H., "Bitter Almond and Amygdalin", *International Multidisciplinary Congress of Eurasia*, 23-25 August, Rome, Italy, (2017).
- Ayrancı, U. G., Tüfekçi, S. and Özgören, E., "Effect of Ultrasound Pre-treatment of Drying Kinetics of Kumquat", *International Multidisciplinary Congress of Eurasia*, 23-25 August, Rome, Italy, (2017).
- Özgören, E., Ayrancı, U. G. and Tüfekçi, S. "Effect of Infusion Time and Temperature on Antioxidant Capacity, Total Phenolic Content of Dandelion Tea" *International Multidisciplinary Congress of Eurasia*, 23-25 August, Rome, Italy, (2017).
- Urgancı, Ü., Ayrancı, U. G., Özgören, E. and Işık, F., "Effect of Infusion Time and Temperature on The Antioxidant Activity, Total Phenolic Content and Color Properties of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Tea" *Traditional Foods From Adriatic to Caucasus*, 19-21 April, Kyrenia, Turkish Republic of Northern Cyprus, (2018).
- Özünlü, O., Ayrancı, U. G., Ergezer, H. and Karaca, H., "Effects of Ozone Treatments on Some Physicochemical and Microbiologic Properties of Turkey Breast Muscle", *ISEKI- Food Association*, 3-5 July, Stuttgart, Germany, (2018).
- Ayrancı, U. G. and Karaca, H., "Degradation of Aflatoxins by Use of Ozone Gas", *6th ASM International Congress of Agriculture and Environment*, 11-13 October, Antalya, Turkey, (2018).