



Portakal kabuğu atıklarından üretilen biyokompozit ambalaj filminin aflatoksinlere karşı etkisinin incelenmesi

Effect of orange peels waste derived biocomposite film against aflatoxins

Zerrin GÜNKAYA^{1*}, Rasime DEMİREL², Müfide BANAR¹

¹Çevre Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye.
zcokaygil@anadolu.edu.tr, mbanar@anadolu.edu.tr

²Biyoloji Bölümü, Fen Fakültesi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye.
rasimed@anadolu.edu.tr

Geliş Tarihi/Received: 17.12.2015, Kabul Tarihi/Accepted: 29.03.2016

* Yazışılan yazar/Corresponding author

doi: 10.5505/pajes.2016.92653

Araştırma Makalesi/Research Article

Öz

Bu çalışmada yenilikçi bir ürün olarak, portakal kabuğu atıklarından üretilen biyokompozit ambalaj filmine, aflatoksin önleyici özellik kazandırılması üzerinde durulmuştur. Biyokompozit filmin içeriğini portakal kabuklarından elde edilen pektin jeli, termoplastik nişasta ve kil oluşturmaktadır. Biyokompozit film, aflatoksinleri inhibe etmek üzere, enterik kaplamalarda kullanılan aktif bir ilaç malzemesi olan Selüloz Asetat Ftalat (CAP) ile daldırma yöntemiyle kaplanmıştır. Aflatoksin oluşumunun belirlenmesinde hedef gıda olarak kuru üzüm kullanılmış, sterilize edilen kuru üzüm örneklerinde toplam aflatoksin analizi (B1, B2, G1, G2) yapılarak, başlangıç aflatoksin miktarı (mg/g üzüm) belirlenmiştir. Aflatoksin konsantrasyonunun belirlenmesinde ekstraksiyon yöntemi kullanılmış ve analiz fluorometrik test cihazıyla yapılmıştır. Filmlerin kuru üzümde mevcut aflatoksinlere ve yeni aflatoksin oluşumuna etkisinin belirlenmesi için iki set deney yapılmış, yeni toksin oluşumunun belirlenebilmesi için de *Aspergillus parasiticus* kullanılmıştır. Altı kuyucukmikroplate konulan kuru üzüm örneklerinin üzerleri biyokompozit film, CAP kaplanmış biyokompozit film ve karşılaştırma amaçlı olarak ticari ambalaj filmi ile kaplanmış ve 25 °C'de 5 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuru üzümlerde de aflatoksin analizi yapılarak başlangıç değerleriyle birlikte irdelenmiştir. Sonuçlara göre CAP ile kaplamanın biyokompozit ambalaj filminin aflatoksin ve üretimi üzerindeki inhibisyon etkisini arttırdığı belirlenmiş, CAP kaplı biyokompozit filmin yeni aflatoksin oluşumunun önlenmesi açısından ticari ambalaj filmine göre daha etkin olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Aflatoksin, Biyokompozit film, Portakal kabuğu, Selüloz asetat ftalat

Abstract

The aim of the study is to add an aflatoxin inhibition property to a novel biocomposite packaging film which is derived from orange peels waste and including thermo plastic starch and clay. Biocomposite film was coated with, Cellulose Acetate Phthalate (CAP), an enteric coating used as an active pharmaceutical ingredient, for aflatoxini nhibition. Total aflatoxin (B1, B2, G1, G2) analysis was realized on sterilized dry raisins. Before the test, all the dry raisins were sterilized and their initial total aflatoxin content (mg/g raisin) was determined. Then, a group of sterilized dry raisin were contaminated with *Aspergillus parasiticus*. Both sterilized and contaminated dry raisins were covered by the testing films and incubated at 25 °C for five days. After five days, final total aflatoxin contents in sterilized and contaminated dry raisin were measured to determine the existing aflatoxin and new aflatoxin growth, respectively. Total aflatoxin content was measured by a fluorometric mycotoxin test equipment after extraction. Results show that CAP has increased the inhibition effect of biocomposite film against existing aflatoxin and new synthesis. In addition to this, it was observed that CAP is more effective to new aflatoxin synthesis than commercial packaging film.

Keywords: Aflatoxin, Biocomposite film, Cellulose acetate phthalate, Orange peel

1 Giriş

Plastik ambalaj atıklarının neden olduğu çevresel problemlerin azaltılması yönündeki gelişmeler, ambalaj sektörünü geleneksel malzemelerin yerine biyobozunur ambalaj alternatiflerinin oluşturulması yönünde çalışmalar yapmaya yönlendirmiştir. 2013 yılında ülkemizde 904.579 ton plastik ambalaj piyasaya sürülmüş, bunun yaklaşık %52'si geri kazanılmıştır [1]. Geri kazanılan bu kısım şişeler ve kutular gibi hacimli-sert plastik ambalajları kapsamaktadır. Diğer plastik ambalaj grubunu ise hacimsiz-esnek yapıları ile market/alışveriş poşetleri ve gıdaların sarılarak korunmasında kullanılan streç filmler oluşturmaktadır. Market poşetleri genellikle çöp torbası olarak kullanılmakta, evsel atıklarla birlikte kentsel katı atık depolama sahalarına gitmekte ve son zamanlarda oksobiyobozunur olarak piyasaya sürülenlerin dışındakiler uzun yıllar boyunca ortamda bozunmadan kalmaktadır. Gıdaların sarılmasında kullanılan streç filmler ise hacimlerinin

çok küçük olması nedeniyle geri dönüşüm için ayrılmamakta, yiyecek atıkları ile beraber çöpe atılmaktadır. Genellikle polietilenden (PE) üretilen bu filmler, atık depolama sahalarında yiyecek atıkları içerisinde birikmekte ve yıllarca bozunmadan kalmaktadır. Bu durum ise sürdürülebilirlik kapsamında yeşil üretimin prensiplerine uymamaktadır. Yeşil üretim prensipleri gereği ürünler, kullanım ömürlerinde verimli, fakat kullanım ömürleri bitince ayrı bir çaba gerektirmeden doğada kolayca bozunabilmelidirler [2]. Bu prensip özellikle, kullanım ömrü kısa olan ambalaj filmlerinde, petrokimya bazlı polimerler yerine biyopolimerlerin kullanılmasını işaret etmektedir. Ancak, karbonhidratlar, proteinler, yağlar ve polisakaritler gibi doğal polimerlerden üretilen biyobozunur malzemelerin kullanımı, su geçirmezliklerinin ve dayanım faktörlerinin düşük olması nedeniyle sınırlı kalmaktadır. Bu durumda doğal polimerlerin, diğer polimerlerle karıştırılması ve/veya kil gibi inorganik dolgularla modifiye edilmeleri gereklidir [3].

Tarımsal atıklarda bulunan ve asidik polisakkaritlerden oluşan bir biyopolimer olan pektinler, meyvelerde ve bazı sebzelerde bulunan beyaz renkli, amorf yapıya sahip kompleks karbonhidrat yapılarıdır. Pektin, meyve suyu, ayçiçek yağı ve şeker üretiminin ikincil ürünü olarak ortaya çıkar. Bitki hücre duvarının yapısal bir bileşeni olan pektin, temelinde ramnoz girişleri ile birlikte yan zincirlerde doğal şeker içeren metil ile kısmen esterlenmiş olan poli ($\alpha(1\rightarrow4)$) galakturonik asitten oluşur. Pektin suda çözünür ve biyobozunur bir yapıya sahiptir [3]-[6]. Turuncgillerin kabuğundaki "albedo" denilen beyaz kısım ve elmanın posası ile kabuğu, ticari pektin üretiminde en yaygın olarak kullanılan hammaddelerdir [7],[8]. Portakal kabuğunun albedo kısmı ise %50 oranında pektin içermektedir [4]. Ticari pektin üretimi genel olarak ekstraksiyon tekniklerine dayanmakta, üretilen pektin jeli kurutularak pektin haline getirilmektedir. Fakat bu arada yüksek nem içeriği nedeniyle %90'lara yakın kütle kaybı olduğundan pektin üretiminin maliyeti yüksek olmaktadır. Bu nedenle ülkemizde pektin üretimi yapılmamakta, pektin ihtiyacı yurt dışından sağlanmaktadır. Diğer yandan, Türkiye'de 2015 yılında 1,816,798 ton portakal [9] üretilmiş olup, portakal suyu üretim tesislerinde yaklaşık 760,000 ton atık portakal kabuğu olduğu tahmin edilmektedir. Oluşan atık portakal kabuklarının bir bölümünün hayvan yemi olarak kullanıldığı, bir kısmının kurutularak değerlendirildiği ve geri kalan kısmının ise kentsel katı atık depolama tesislerine götürüldüğü saptanmıştır. Bu durum özellikle narenciye üretimi yapılan yerleşim yerlerindeki belediyeler için önemli bir sorun oluşturmaktadır. O nedenle, atık portakal kabuklarındaki pektin içeriğinin, gıda sektöründe olmasa bile biyobozunur ambalaj sektöründe kullanılması, bu atıkların değerlendirilmesinde önemli bir potansiyeli oluşturmaktadır.

Biyobozunur kompozitlerin ambalaj sektöründe kullanımında, biyobozunurluk ve dayanıklılık dışında ambalajdan, antibakteriyel olma, ürünün raf ömrünü uzatma gibi daha farklı özellikler de beklenmektedir [10]-[13]. Çünkü uygun olmayan çevresel koşullarda kurutulan, depolanan ve ambalajlanan gıdalarda üreyen küfler mikotoksin üretimi açısından bir risk faktörü oluşturmaktadır.

Mikotoksinler insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri ve bitkisel ve hayvansal ürünlerdeki önemli ekonomik kayıplara neden olmaları nedeniyle Dünya genelinde özel bir ilgi alanına sahiptirler. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü tarafından (Food and Agriculture Organization, FAO), dünyadaki tarımsal ürünlerin %25-50'sinin mikotoksinlerle kirletildiği tahmin edilmektedir. Aflatoksinler, gıda ve besinlerde ortaya çıkan *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus nomius* küflerinin ikincil metabolitleridir. En toksik aflatoksin türü olan Aflatoksin B1, laboratuvar hayvanlarında karsinogenik, mutajenik ve teratojenik etkiler göstermiş ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından, kesin kansere neden olan etkenler (Grup 1) içerisine alınmıştır [14].

Gıdalarda izin verilebilen mikotoksin limitleri ülkelerin gelişmişlik durumuna, halk sağlığı ve ekonomi alanındaki göstergelere göre değişiklik göstermektedir. Fakat genel yaklaşım itibarıyla maksimum limitleri geçen derişimlerde gıdaların piyasaya sürülmesi yasaktır [15]. Ülkemizde "Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği" [16] uyarınca da aflatoksin içeriği, maksimum limitleri geçen gıdaların piyasaya sürülmesine ve limitlere uygun gıdalar ile karıştırılarak seyreltme yapılmasına izin verilmemektedir. Ayrıca, mikotoksin bulaşmış gıdalarda kimyasal kullanımı ile detoksifikasyon da yasaklanmıştır. O nedenle son yıllarda,

plastik ambalaj içerisinde mikotoksin oluşumunu inhibe etmek üzere, modifiye ambalaj atmosferi oluşturma teknikleri üzerine yapılan çalışmaların önemi artmıştır [17]-[20].

Bu noktadan hareketle, bu çalışmada portakal kabuğu atıklarından üretilen biyokompozit ambalaj filmine, ilaç endüstrisinde kullanılan enterik bir kaplama olan Selüloz Asetat Ftalat (CAP) ile kaplayarak aflatoksin önleyici özellik kazandırılması üzerinde durulmuş ve önemli bulgular elde edilmiştir. Yapılan literatür araştırmasında, ulusal ve uluslararası literatürde bu yönde yapılmış bir çalışmaya rastlanmadığından, çalışmanın oldukça yenilikçi olduğu düşünülmektedir.

2 Materyal ve metod

Bu çalışmada öncelikle portakal kabuğu atıklarından üretilen biyokompozit film CAP ile kaplanmış ve bu filmler ile ticari streç film (LDPE) karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma amacıyla yapılan aflatoksin analizlerinde, hasat ve muhafaza koşullarında toksijenik küflerin en çok kirlettiği gıda grubu olan kurum üzüm kullanılmıştır.

2.1 Malzemeler

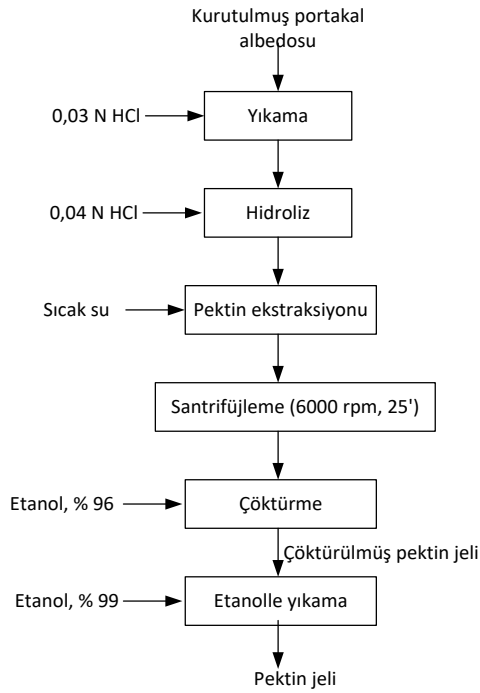
Çalışmada kullanılan portakal kabukları evlerden toplanmış olup, nişasta gıda amaçlı üretilmiş normal ticari mısır nişastasıdır. Hexadecyltrimethylammonium chloride (HTAC), Propilen oksit, CAP ve Dietil ftalat Sigma Aldrich'ten, Sodium trimetaphosphate (STMP) ve sodium tripolyphosphate (STPP) Merck'ten temin edilmiştir. Kil, Eczacıbaşı'ndan temin edilmiş olan Sodyum montmorillonit (Na-MMT)'dir.

2.2 Pektin ekstraksiyonu

Pektin jelinin elde edilmesi için öncelikle portakal kabuklarının albedo denilen iç kısımları ve flavedo denilen turuncu kısımları ayrılmış ve kurutulmuştur. Pektin jelinin elde edilmesiyle ilgili prosedürde Cho ve diğ. (2003) [21] tarafından çalışılan yöntem uygulanmıştır. Çözünür pigment ve tozların giderilmesi için, kurutulmuş atık portakal albedoları, katı/çözücü oranı 1:10 olacak şekilde, 0.03 N'lik HCl çözeltisi ile yıkanmış, hazırlanan karışım 30 dk. boyunca 60 °C'de karıştırılmış ve 30 dak.'nın ardından bu karışımın suyu süzülmuştür. Kalan süzüntü üzerine katı/ çözücü oranı 1:2.5 olacak şekilde 0.04 N'lik HCl çözeltisi eklenerek hidroliz yapılmış ve 90 °C'de 20 dk. boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra, 90 °C'de 30 dk. boyunca karıştırılmak üzere, karışımın üzerine katı/su oranı 1:10 olacak şekilde sıcak su eklenerek karışım ekstrakte edilmiştir. 30 dak.'lık karıştırma işleminden sonra, karışım süzümü, süzüntü 6000 rpm'de 25 dk. boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucu oluşan berrak kısım ayrılmış, %95'lik etanol ile yıkanarak jel kıvamında pektin elde edilmiş ve daha sonra kullanmak üzere buzdolabında saklanmıştır. Deneysel olarak anlatılan pektin ekstraksiyonu yönteminin akım şeması Şekil 1'de verilmiştir. Aynı işlemler, diğer kısım olan flavedoda da uygulanmış fakat santrifüj sonrasında oluşan berrak kısma etanol ilave edildiğinde herhangi bir çökme gözlenmediğinden, bu kısımdan pektin elde edilememiştir.

2.3 Biyokompozit filmin üretilmesi

Biyokompozit filmin üretilmesinde öncelikle atık portakal kabuklarından ekstraksiyonla pektin jeli elde edilmiş, daha sonra pektin jeli/termoplastik nişasta/kil içerikli karışımlar hazırlanmıştır. Karışımların hazırlanmasında Taguchi deney tasarımı yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 1: Portakal albedosundan pektin jeli ekstraksiyonu yönteminin akım şeması.

Taguchi yönteminde ortogonal diziler kullanılarak diğer klasik yöntemlere göre (tam faktöriyel ya da kesirli faktöriyel diziler) çok daha az deney ile daha fazla bilgi elde edilebilmektedir. Böylece deney öncesi yapılan çalışmalar sonucunda, deney sayılarında önemli derecede azalma gözlenir. Yöntemde öncelikle deney sonuçlarına etki edebilecek faktörler ve bu faktörlerin düzeyleri belirlenir. Bu çalışmada biyokompozit filmin üretilmesinde dikkate alınan faktörler ve düzeyleri Tablo 1’de verilmiştir. Tablo 1’den görüleceği üzere nişasta ve kil modifiye edilmiştir. Nişasta modifikasyonunda propilen oksit, STMP ve STTP ile hidroksipropilasyonu takiben çapraz bağlama yapılmıştır. Kil modifikasyonunda ise HTAC kullanılmıştır. Nişastaya uygulanan modifikasyon işlemi, Çokaygil ve diğ. (2014) tarafından gerçekleştirilen çalışmada detaylı bir şekilde verilmiştir.

Tablo 1: Biyokompozit filmin üretilmesinde dikkate alınan faktörler ve düzeyleri.

Faktörler	D1	D2	D3	D4
Nişasta türü (A)	N	%5 M	%10 M	%15 M
Pektin jeli/nişasta oranı (B)	63/37	60/40	57/43	54/46
Kil türü (C)	N	%15 M	%25M	% 25M
Kil içeriği (D) (% ağırlıkça)	0	0.25	0.45	0.70

D: Düzey, N: Doğal, M: Modifiye.

Bu faktörler ve seviyelerden oluşan bir deney tasarımı için MINITAB 15 yazılımında Taguchi yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde göre 4⁴ şeklindeki bir deney düzeneği için L16 ortogonal dizisi seçilmiştir. Değişik seviyelerdeki faktörlerin kombinasyonundan oluşan her bir deney sırası, deney esnasında değişerek sonuçları olumsuz şekilde etkileyebilecek ve daha önceden bilinmeyen ve kontrol edilemeyen faktörlere

karşı önlem almak için basit tekrarlı yöntemleri kullanılarak rassallaştırılmıştır. Rassallaştırılmış faktör ve seviyelerinin yerleşimi Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2: Rassallaştırılmış faktör ve seviyelerinin yerleşimi.

Rassallaştırılmış deney sırası	Faktörler			
	A	B	C	D
1	5M	60/40	N	0.45
2	10M	54/46	%15 M	0.45
3	10M	57/43	N	0.70
4	5M	54/46	%25 M	0
5	N	57/43	%25 M	0.45
6	15M	57/43	%15 M	0
7	N	60/40	%15 M	0.25
8	15M	60/40	%25 M	0.70
9	5M	57/43	%50 M	0.25
10	10M	60/40	%50 M	0
11	5M	63/37	%15 M	0.70
12	15M	54/46	N	0.25
13	N	54/46	%50 M	0.70
14	15M	63/37	%50 M	0.45
15	N	63/37	N	0
16	10M	63/37	%25 M	0.25

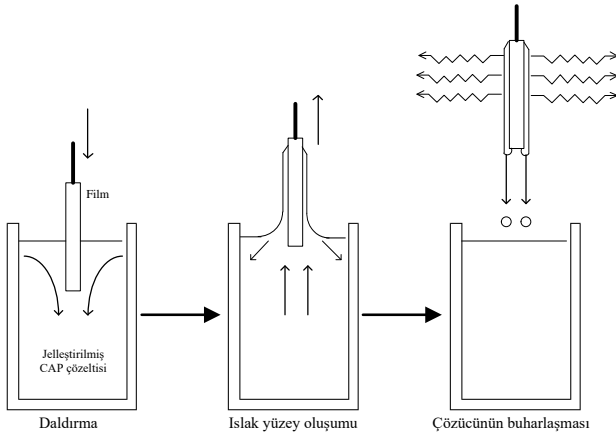
Taguchi deney tasarımı yönteminin kullanılışı ve karışımların bu yöntem ile hazırlanışının detayları Çokaygil (2013) [22] tarafından gerçekleştirilen tez çalışmasında ve Çokaygil ve diğ. (2014) [23] tarafından gerçekleştirilen çalışmada detaylı bir şekilde verilmiştir. Hazırlanan formülasyonlar iyice karıştırılmış, bir gece 70 °C’de etüvde bekletilerek kurutulmuş ve kurutulmuş karışımlar Retsch marka öğütücüde 4000 rpm’de 5 sn saat yönünde ve 5 sn. ters yönde karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Toz halindeki homojen karışımlardan 18 g tartılarak laboratuvar tipi çift vidalı ekstrüdere beslenmiştir (DSM XPlore 15 mL Compounder). 120 °C ve 100 rpm’de ekstrüzyonda 2 dk. tutulan karışım, belirlenen süre sonunda eriyik polimer halinde ekstrüderden alınmıştır. Daha sonra ekstrüderin çıkışına 0.2 mm kalınlığında ince film ucu takılmış ve polimer halindeki karışım yine aynı çalışma koşullarında ekstrüdere beslenmiştir. 2 dk. sonunda ince film ucundan film şeklinde akmakta olan polimer, hızlıca, film çekme makinasına (DSM Xplore) aktarılmıştır. Üretilen biyokompozit filmin çift vidalı ekstrüderden çıkışı ve film makinasına beslenmesine dair bir görüntü Şekil 2’de verilmiştir. Filmler arasında yapılan yapısal ve mekanik dayanım açısından değerlendirmede; %15 oranında modifiye edilmiş nişasta ile 54/46 oranında (pektin jeli/nişasta) hazırlanmış %25 oranında doğal kil (Na-LS) içeren filmin en iyi film olduğuna karar verilmiştir. CAP ile kaplama ve aflatoxin analizleri bu film ile gerçekleştirilmiştir. Bu filmin seçilmesine dair analiz sonuçlarının detayları daha önceki çalışmada verilmiştir [23].



Şekil 2: Çift vidalı ekstrüder çıkışına bağlı film çekme makinasında, film çekme aşamasından bir görüntü.

2.4 Biyokompozit filmin CAP ile kaplanması

Biyokompozit filmin kaplanmasında kullanılan CAP hidrofobik bir plastikleştirici olan Dietilftalat ile plastikleştirilmiştir. Filmin CAP ile daldırma yöntemine göre kaplanmasında başlangıç olarak %5 CAP çözeltisi hazırlanmış, bu çözeltiye %40 DP ilave edilmiş ve yarım saat karıştırılmıştır. Oluşan karışım 90 °C'de yarı hacme inene kadar bekletilerek jelleştirilmiş ve film 5 dk. süre ile bu jele daldırılmış ve yavaşça geri çekilerek oda ortamında bir gün kurumaya bırakılmıştır. Filmin daldırma yöntemiyle kaplanması Şekil 3'te şematik olarak gösterilmiştir. 3 cm x 4 cm boyutlarındaki film, kaplamadan önce ve sonra tartılmıştır. Tartım farkından, filmin yapısına giren CAP kütlesinin film kütlesine oranı %8.21 olarak hesaplanmıştır. Literatürde, CAP ile ilaç kaplamasında tavsiye edilen kaplama/ilâç oranı %0.5-9 aralığında verilmektedir [24]. Bu değerler esas alındığında %5 CAP ile kaplamada bulunan CAP/film oranı (%8.21) üst sınıra yakın olduğundan kaplama koşullarının yeterli olduğu görülmüştür.



Şekil 3: Filmin daldırma yöntemiyle kaplanmasının şematik gösterimi.

2.5 Aflatoksin analizleri

Aflatoksin analizlerinde biyokompozit film, CAP ile kaplanmış biyokompozit film ve ticari streç filmin etkisi incelenmiştir. Analizlerde, hasat ve muhafaza koşullarında toksijenik küflerin en çok kirlettiği gıda grubu olan kurum üzüm kullanılmıştır. Aflatoksin analizi öncesinde kuru üzüm numunelerinde sterilizasyon ve sterilizasyonun kontrolü, filmlerde ise toksijenik küfe etki belirleme işlemleri yapılmıştır.

Filmlerin küf ve aflatoksinler üzerine etkisini belirlemeden önce piyasadan temin edilen kuru üzüm numuneleri sterilize edilmiştir. Bunun için kuru üzümler öncelikle %70'lik alkol ile muamele edilerek yüzey sterilizasyonu yapılmış ve bu işlem

esasında tüm üzüm yüzeyinin alkol ile temas etmesine dikkat edilmiştir. 5 dak.'lık muamele işleminden sonra üzüm yüzeyindeki alkol, steril distile su ile yıkama yapılarak uzaklaştırılmıştır. Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen üzümler oda sıcaklığında gece boyunca steril kabinde bekletilerek kurutulmuştur. Bu arada, gerçekleştirilen yüzey sterilizasyonunun kontrolü için sterilizasyon öncesi ve sonrasında beş adet üzüm tanesi alınmış, Potato Dekstroz Agar (PDA, toksijenik olan ve olmayan tüm küf kontaminasyonu için besiyeri) ve *Aspergillus Flavus/Parasiticus* Agar (AFPA, mikotoksin üreten toksijenik küfler için besiyeri) besi ortamlarına yerleştirilmiş, 25 °C'de 5 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda küf gelişiminin olup olmadığı gözlemlenmiştir.

Filmlerin toksijenik küfe etkisini belirlemek için aflatoksin üretme yeteneğine sahip olan *Aspergillus parasiticus*'un (NRRL 465) 1x10⁵/mL derişimdeki spor süspansiyonu thoma lamında sayım yapılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan spor süspansiyonundan 200 µL alınarak petri kaplarındaki AFPA besiyeri ortamına aktarılmış, yüzey sterilizasyonu yapılan drigalski spatülü ile aşının tüm besiyeri yüzeyine yayılması sağlanmıştır. Aşılama işlemi tamamlandıktan sonra besiyerinin aşırı emmesi için 1-2 dk. süre ile beklenmiştir. Daha sonra filmler steril pens yardımıyla petri kabının ortasında kalacak şekilde besiyerinin üzerine yerleştirilmiş ve hazırlanan petripler 25 °C'de 5 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda film etrafında oluşan inhibisyonzonu ve AFPA besi ortamında aflatoksin üretimini işaret eden turuncu renk (besiyerinde bulunan demir içeriğinin aflatoksinler ile etkileşimi sonucunda meydana gelen) oluşumu incelenmiştir.

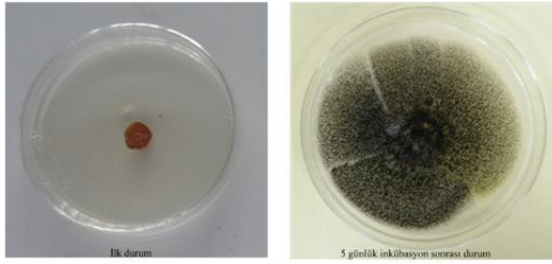
Sterilize edilen kuru üzümde aflatoksin analizi (B1, B2, G1, G2 olarak toplam aflatoksin) yapılarak, başlangıç aflatoksin miktarı (mg/g üzüm) belirlenmiştir. Analizde öncelikle 25 g kuru üzüm örneği 5 g NaCl ve 100 mL metanol çözeltisi (80:20 metanol: su) laboratuvar tipi parçalayıcıda karıştırılmış ve daha sonra Vicam marka mikrofiber filtre kağıdından süzülümüştür. Süzütüden, 1 g örneğe denk gelen hacim olan 4 mL alınmış ve vakum monifold düzeneğinde aflatoksin immunoaktif kolondan geçirilmiştir. Örnek geçirildikten sonra aynı kolondan sırasıyla 10 mL saf su, 10 mL hava ve 1 mL metanol geçirilmiştir. Kolonun altındaki tüpte biriken son süzütüye 1 mL %10'luk Aflatoksin developer eklenmiş ve Fluorometrik test cihazında (Vicam) okuma yapılmıştır. Analiz üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Filmlerin kuru üzümde mevcut aflatoksinlere ve yeni aflatoksin oluşumuna etkisinin belirlenmesi için üç tekrarlı iki set deney yapılmıştır. Filmlerin mevcut aflatoksinler üzerine etkisini belirlemek üzere hücre kültürü yuvalarından ilkinde sadece 2.5 g kuru üzüm alınmış, yeni aflatoksin oluşumuna etkisinin belirlenmesi içinse ikinci yuvaya yine 2.5 g kuru üzüm alınmış üzerine 1 mL *Aspergillus parasiticus* eklenmiştir. Filmler her iki yuvayı da örtecek şekilde kaplanmış ve kuru üzümler 25 °C'de 5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuru üzümlere başlangıçta uygulanan ekstraksiyon yöntemi uygulanarak aflatoksin analizi yapılmıştır. Analizler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

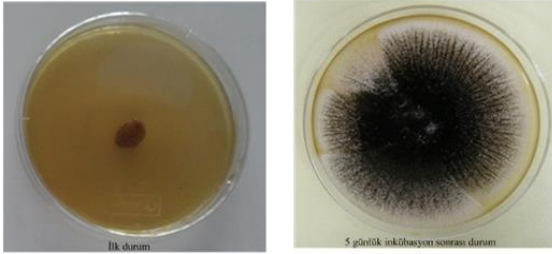
3 Bulgular

Kuru üzüm numunelerine yapılan yüzey sterilizasyonunun kontrolü, PDA ve AFPA besiyerlerine yerleştirilen sterilizasyon öncesi ve sonrası kuru üzüm numunelerinin 5 günlük inkübasyonu sonucunda gözlemlenmiştir. Sterilizasyon öncesi ve sonrası kuru üzüm numunelerinin PDA ve AFPA

besiyerlerindeki ilk durumu ve 5 günlük inkübasyon sonrası görüntüleri, sırasıyla Şekil 4 ve 5'te verilmiştir. Bu şekiller birlikte değerlendirildiğinde, 5 günlük inkübasyon sonunda PDA besiyerinde sterilizasyon öncesi kuru üzüm dört bölgede spor oluştururken, sterilizasyon sonrası kuru üzümün tek bölgede spor oluşturduğu görülmüştür. AFPA besiyeri için bakıldığında ise sterilizasyon sonrası kuru üzümde toksijenik küf oluşmadığı (ortadaki gelişim çevreden kaynaklanan bir maya oluşumudur) görülmüştür.

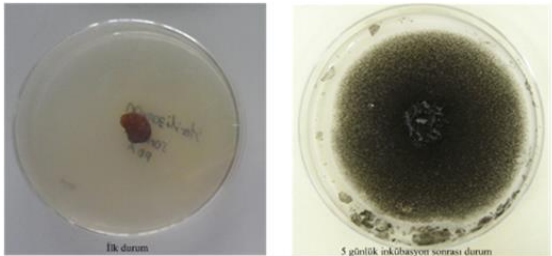


(a)

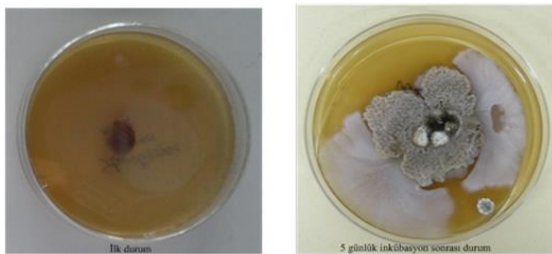


(b)

Şekil 4: Sterilizasyon öncesi kuru üzüm örneklerinde mikrobiyal kontrol. (a): PDA besiyeri ortamı, (b): AFPA besiyeri ortamı.



(a)

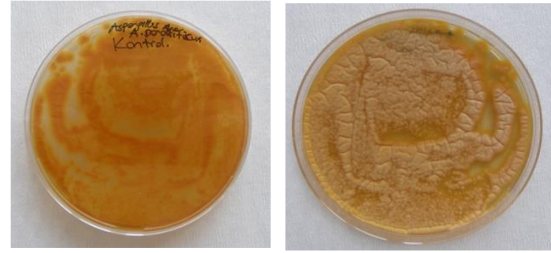


(b)

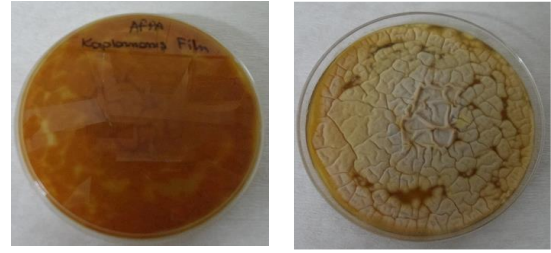
Şekil 5: Sterilizasyon sonrası kuru üzüm örneklerinde mikrobiyal kontrol. (a): PDA besiyeri ortamı, (b): AFPA besiyeri ortamı.

Filmlerin, aflatoksin oluşturan aflatoksijenik küfe etkilerinin belirlenmesi için yapılan çalışması sonucunda; kontrol, biyokompozit film, CAP ile kaplanmış biyokompozit film ve

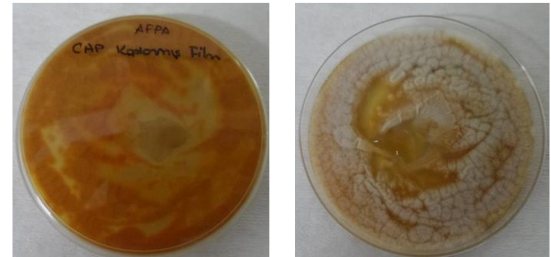
ticari streç film içeren besiyerlerinin, 5 günlük inkübasyon sonucundaki görüntüleri sırasıyla Şekil 6'da verilmiştir. Kontrol besiyerinde (Şekil 6a) beklenildiği üzere herhangi bir inhibisyon zonu oluşmamış ve besiyerinde bulunan demir içeriğinin aflatoksinler ile etkileşime girdiğini işaret eden turuncu renk, tüm besiyerini kaplamıştır. Biyokompozit film içeren besiyerinin (Şekil 6b) görüntüsü, kontrol besiyeri ile oldukça fazla benzerlik göstermiş, film üzerinde ve etrafında herhangi bir inhibisyonzonu gözlemlenmemiştir. Şekil 6c ve Şekil 6d'de verilen CAP ile kaplanmış biyokompozit film ve ticari film içeren besiyerlerinde ise, diğer görüntülerden farklı olarak, filmlerin üzerinde ve etrafında saydam bir bölge olan inhibisyon zonunun oluştuğu görülmüştür. Bu görüntü, CAP ile kaplanmış filmin aflatoksijenik küf gelişimi üzerine antifungal bir etkisinin olduğunu işaret etmektedir.



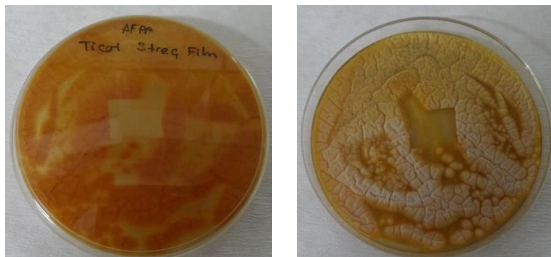
(a)



(b)



(c)

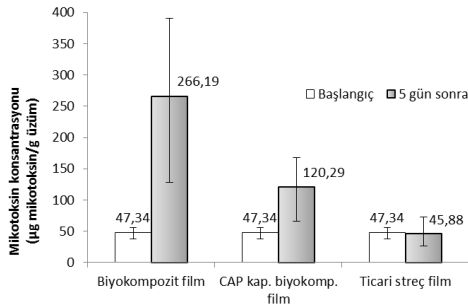


(d)

Şekil 6: AFPA besiyerinin alt ve üst görünüşleri. (a): Kontrol, (b): Biyokompozit film içeren besiyeri, (c): CAP ile kaplanmış biyokompozit film içeren besiyeri, (d): Ticari streç film içeren besiyeri.

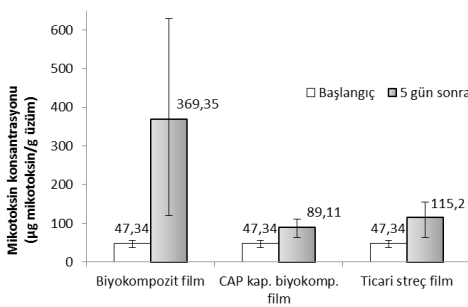
4 Sonuçlar

Aflatoksin analizleri sonucunda elde edilen veriler, başlangıç aflatoksin miktarıyla ilişkilendirilmiş ve filmlerin mevcut aflatoksinlere etkisi Şekil 7'de, filmlerin yeni aflatoksin oluşumuna etkisi ise Şekil 8'de verilmiştir. Şekil 7'den görüleceği üzere, başlangıç aflatoksin miktarına (47.34 µg aflatoksin/g kuru üzüm), biyokompozit film ve CAP ile kaplanmış biyokompozit filmin bir etkisi olmamış, film ile korunan kuru üzümde aflatoksin miktarı yaklaşık 5 katına çıkarken, CAP ile kaplanmış biyokompozit film ile korunan kuru üzümdeki aflatoksin miktarı başlangıç değerinin 3 katına çıkmıştır. Ticari streç film ile korunan kuru üzümde, başlangıç aflatoksin miktarında bir artış görülmemiştir. Bu değerlere göre mevcut aflatoksinlere etki açısından filmlerin sıralaması ticari streç film > CAP ile kaplanmış biyokompozit filmin >biyokompozit film olarak belirlenmiştir.



Şekil 7: Filmlerin 5 günlük inkübasyon sonucunda başlangıç değerine göre mevcut aflatoksin oluşumu üzerine etkisi.

Diğer yandan başlangıç aflatoksin miktarına (47.34 µg aflatoksin/g kuru üzüm) ilaveten toksijenik küfün (*Aspergillus parasiticus*) de oluşturduğu aflatoksin miktarına, biyokompozit filmin bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Şekil 8). Bu sonuç, Şekil 6b'de verilen filmin yerleştirildiği AFPA besiyerinde 5 günlük inkübasyon sonucunda film üzerinde ve etrafında herhangi bir inhibisyon zonunun oluşmaması sonucuyla da desteklenmiştir. CAP ile kaplanmış biyokompozit film ise yeni aflatoksin oluşumunu önlemede oldukça etkili olmuş, başlangıç miktarı yeni oluşumlarla birlikte sadece 2 katına çıkmıştır. Bu sonuç Şekil 6c'de gösterilen AFPA besiyerine yerleştirilen eksfoliyeli filmin üzerinde ve etrafında inhibisyonzonu oluşumu ile desteklenmiştir. Ticari streç filmde ise başlangıç miktarı yeni oluşumlarla birlikte 3 katına çıkmıştır. Bu değerlere göre yeni aflatoksin oluşumunun önlenmesi açısından filmlerin sıralaması CAP ile kaplanmış biyokompozit film > ticari streç film >biyokompozit film olarak belirlenmiştir.



Şekil 8: Filmlerin 5 günlük inkübasyon sonucunda başlangıç değerine göre yeni aflatoksin oluşumu üzerine etkisi.

Toksijenik küflerin oluşturduğu kanserojenik toksinler olan aflatoksinler, özellikle, güneşte kurutulmuş ama nemli kalması nedeniyle küflerin olduğu gıdalarda bulunmaktadır. Bu gıda türlerinde küf oluşumu devam ederken, aflatoksin üretimi de sürekli olmaktadır. Çalışmanın sonucunda portakal kabuğu atıklarından üretilmiş olan biyokompozit filmin tek başına mevcut ve yeni oluşan aflatoksinleri önlemeye bir etkisinin olmadığı, diğer yandan enterik bir kaplama olan CAP ile kaplanması durumunda filmin, toksijenik küf ve yeni aflatoksin oluşumuna etkisinin ticari streç filmden daha iyi olduğu sonucuna varılmıştır.

5 Teşekkür

Bu çalışma, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca kabul edilen 1003F106 No.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

6 Kaynaklar

- [1] Çevre ve Şehircilik Bakanlığı. "Ambalaj Bülteni". http://www.csb.gov.tr/db/cygm/editordosya/2013_ambalaj_bulteni.pdf (16.03.2016).
- [2] Anastas PT, Zimmerman JB. "Design through the 12 principles of green engineering". *Environmental Science Technology*, 37(5), 94-101, 2003.
- [3] Mangiacapra P, Gorrasi G, Sorrentino A, Vittoria V. "Biodegradable nanocomposites obtained by ball milling of pectin and montmorillonites". *Carbohydrate Polymers*, 64(4), 516-523, 2006.
- [4] Fishman ML, Coffin, DR, Konstance RP, Onwulata CI. "Extrusion of pectin/starch blends plasticized with glycerol". *Carbohydrate Polymers*, 41(4), 317-325, 2000.
- [5] Fishman ML, Coffin, DR, Onwulata CI, Konstance RP. "Extrusion of pectin and glycerol with various combinations of orange albedo and starch". *Carbohydrate Polymers*, 57(4), 401-413, 2004.
- [6] Fishman ML, Coffin, DR, Onwulata CI, Willett JL. "Two stage extrusion of plasticized pectin/poly (vinyl alcohol) blends". *Carbohydrate Polymers*, 65(4), 421-429, 2006.
- [7] Koubala BB, Mbome LI, Kansci G, Mbiapo FT, Crepeau MJ, Thibault, JF, Ralet MC. "Physicochemical properties of pectins from ambarella peels (*Spondias cytherea*) obtained using different extraction conditions". *Food Chemistry*, 106(3), 1202-1207, 2008.
- [8] Schiewer S, Patil S. "Pectin-Rich fruit wastes as biosorbents for heavy metal removal: Equilibrium and kinetics". *Bioresource Technology*, 99(6), 1896-1903, 2008.
- [9] TÜİK. "Meyveler, İçecek ve Baharat Bitkilerin Üretim Miktarları". http://www.tuik.gov.tr/PrelstatistikTablo.do?istab_id=1564 (16.03.2016).
- [10] Appendini P, Hotchkiss JH. "Review of antimicrobial food packaging". *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(2), 113-126, 2002.
- [11] Çağrı A, Üstünlü Z, Ryser ET. "Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-amino benzoic or sorbic acids". *Journal of Food Science*, 66(6), 865-870, 2001.

- [12] Falguera, V, Quintero, JP, Jimenez, A, Munoz, JA, Ibarz A, "Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use". *Trends in Food Science & Technology*, 22(6), 292-303, 2011.
- [13] Kuorwel K, Cran MJ, Sonneveld K, Miltz J, Bigger SW. "Antimicrobial activity of natural agents coated on starch-based films against staphylococcus aureus". *Journal of Food Science*, 76(8), 531-537, 2011.
- [14] Demirel R, Sarıözlü, NY. "Mycotoxigenic moulds and mycotoxins in flours consumed in Turkey". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(8), 1577-1584, 2014.
- [15] Abrunhosa L, Morales H, Soares C, Calado T, Vila-Chã AS, Pereira M, Venâncio A. "A review of mycotoxins in food and feed products in Portugal and estimation of probable daily intakes". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(2), 249-265, 2016.
- [16] Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği. "Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı". Ankara, Türkiye, 28157, 2011.
- [17] Manso S, Pezo D, Gomez-Lus R, Nerin N. "Diminution of aflatoxin B1 production caused by an active packaging containing cinnamon essential oil". *Food Control*, 45, 101-108, 2014.
- [18] Quiles JM, Manyes L, Luciano FB, Mañes J, Meca G. "Influence of the antimicrobial compound allyl isothiocyanate against the aspergillus parasiticus growth and its aflatoxins production in pizza crust". *Food and Chemical Toxicology*, 83, 222-228, 2015.
- [19] Wang, H, Xiangyu J, Haibo W. "Modified atmosphere packaging bags of peanuts with effect of inhibition of aflatoxin growth". *Journal of Applied Polymer Science*, 131(8), 1-6, 2014.
- [20] Coffin DR, Fishman, ML. "Physical and mechanical properties of highly plasticized pectin/starch films". *Journal of Applied Polymer Science*, 54(9), 1311-1320, 1994.
- [21] Cho CW, Lee DY, Kim CW. "Concentration and purification of soluble pectin from mandarin peels using crossflow microfiltration system". *Carbohydrate Polymers*, 54(1), 21-26, 2003.
- [22] Çokaygil Günkaya Z. Portakal Kabuklarından Biyobozunur Nanokompozit Film Üretimi ve Gıda Ambalajı Olarak Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye, 2013.
- [23] Çokaygil Günkaya Z, Banar M, Seyhan AT. "Orange peel-derived pectin jelly and corn starch-based biocomposite film with layered silicates". *Journal of Applied Polymer Science*, 131(16), 1-12, 2014.
- [24] Kibbe AH. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 3rd ed. Washington, DC, Pharmaceutical Press, 2000.