

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

Ozonlamanın marul, ıspanak ve maydanozlarda mikrobiyel inaktivasyon ve raf  
ömrü üzerine etkisi

**Hakan KARACA**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2010**

**Her hakkı saklıdır**

## TEZ ONAYI

Hakan KARACA tarafından hazırlanan “**Ozonlamanın marul, ıspanak ve maydanozlarda mikrobiyel inaktivasyon ve raf ömrü üzerine etkisi**” adı tez çalışması **28.10.2010** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Y. Sedat VELİOĞLU

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN  
Ankara Üniversitesi  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Sebahattin NAS  
Pamukkale Üniversitesi  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Levent BAYINDIRLI  
Orta Doğu Teknik Üniversitesi  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Y. Sedat VELİOĞLU  
Ankara Üniversitesi  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Ender Sinan POYRAZOĞLU  
Ankara Üniversitesi  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

**Yukarıdaki sonucu onaylarım.**

**Prof. Dr. Orhan ATAKOL**

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Doktora Tezi

### OZONLAMAMANIN MARUL, İSPANAK VE MAYDANOZLARDA MİKROBİYEL İNAKTİVASYON VE RAF ÖMRÜ ÜZERİNE ETKİSİ

Hakan KARACA

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Y. Sedat VELİOĞLU

Ayıklanıp doğranmış taze meyve ve sebzelerde ürün güvenliğinin sağlanması ve raf ömrünün uzatılması amacıyla üzerinde en çok durulan yöntemlerden biri ozon uygulamasıdır. Bu çalışmada; distile su, ozonlu su (12,0±0,5 ppm) ve klorlu su (100 ppm) ile yıkama uygulamalarının, ayıklanıp doğranmış marul, ıspanak ve maydanozlara inoküle edilmiş *Escherichia coli* ve *Listeria innocua* sayılarının azalmasına ve sebzelerin bazı kimyasal özelliklerine (klorofil a, klorofil b, askorbik asit ve toplam fenolik madde içerikleri ile antioksidan aktivite değerleri) etkileri incelenmiştir. Ayrıca, farklı dezenfektan uygulamalarının maydanozlarda söz konusu mikroorganizmaların gelişimleri ve ürünün kimyasal özellikleri üzerine etkileri de 15 günlük soğuk depolama (5±1 °C) süresince incelenmiştir. Bunların yanı sıra, maydanozlarda doğrudan ozon gazı uygulamasının (950±12 ppm, 20 dakika) bu mikroorganizmaların inaktivasyonuna ve ürünün kimyasal özelliklerine etkisi belirlenmiştir.

Her üç sebze de 5 ve 15 dakika süreli ozonlu su uygulamasının mikrobiyel inaktivasyonda etkili olduğu görülmüştür. On beş dakikalık distile su uygulaması *E. coli* ve *L. innocua* sayılarının azalmasında sınırlı bir etki (~1 logaritmik birim) gösterirken, en yüksek etki klorlu su uygulamasında (sırasıyla yaklaşık 3 ve 2,3 logaritmik birim) görülmüştür. Bu sürede ozon uygulamasıyla elde edilen en yüksek azalma marulda gerçekleşmiş olup *E. coli* ve *L. innocua*'da sırasıyla 2,22 ve 2,24 logaritmik birimdir. İncelenen her üç sebze de *L. innocua* inaktivasyonunda ozonun etkinliği klorunkine yakın bulunmuştur. Klorlu su uygulamasında ıspanakların fenolik madde içeriğinin azalması (p<0,05) dışında; denenen sürelerde, farklı yıkama uygulamalarının sebzelerde incelenen kimyasal özellikler üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Farklı yıkamalar uygulanıp 5 °C'de depolanan maydanozlarda *E. coli* sayısının depolama boyunca azaldığı, *L. innocua* sayısında ise önemli bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Maydanozlardaki klorofil a, klorofil b, askorbik asit ve toplam fenolik madde içerikleri ile antioksidan aktivite değerleri depolama süresince azalmış ancak kontrol örnekleri ile farklı yıkama uygulamalarına maruz kalmış örnekler arasında saptanan fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır (p>0,05). Maydanoz örneklerine doğrudan uygulanan ozon gazı *E. coli* sayısında 1,31, *L. innocua* sayısında ise 1,14 logaritmik birimlik azalmalar sağlamıştır. Bu uygulama maydanozlardaki klorofil a ve klorofil b düzeylerinde önemli bir değişime yol açmazken, askorbik asit ve toplam fenolik madde içerikleri ile antioksidan aktivite değerlerinde sırasıyla %40, %12 ve %41'lik azalmalara neden olmuştur (p<0,05).

**Ekim 2010, 91 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Ozon, Marul, Ispanak, Maydanoz, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, Klorofil, Askorbik asit, Toplam fenolik madde, Antioksidan aktivite

## ABSTRACT

Ph. D. Thesis

Effect of ozonation on microbial inactivation and shelf life of lettuce, spinach and parsley

Hakan KARACA

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Sedat VELİOĞLU

Ozone application is one of the most frequently investigated techniques to ensure food safety and extend the shelf life of fresh-cut fruits and vegetables. In this study, the effects of distilled water, ozonated water ( $12\pm 0,5$  ppm) and chlorinated water (100 ppm) on reductions of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* inoculated on lettuce, spinach and parsley and on some chemical parameters (chlorophyll a, chlorophyll b, ascorbic acid and total phenolic contents and antioxidant activity) of these vegetables were investigated. Besides, the effects of various sanitizing agents on the growth of *E. coli* and *L. innocua* and chemical parameters of parsley were examined during cold storage ( $5\pm 1$  °C) for 15 days. Moreover, the efficiency of gaseous ozone treatment ( $950\pm 12$  ppm, 20 min) on microbial inactivation of *E. coli* and *L. innocua* and the effects of this treatment on chemical parameters of parsley were also determined.

Ozonated water washes for 5 and 15 min were both effective in microbial inactivation in all vegetables tested. Washing with distilled water for 15 min had a limited effect ( $\sim 1$  log reduction) in *E. coli* and *L. innocua* inactivation whereas chlorinated water wash was the most effective treatment resulted in nearly 3 and 2.3 log reductions, respectively. The maximum reductions achieved after ozonated water treatment for 15 min were 2.22 and 2.24 log units for *E. coli* and *L. innocua*, respectively, and observed in lettuce. For all three vegetables tested, the efficiency of ozonated water in inactivation of *L. innocua* was so close to that of chlorinated water. Results showed that washing treatments, for the treatments times tested, did not have any detrimental effects on the chemical components of the vegetables with the exception of slight reduction ( $p < 0.05$ ) in total phenolic content of spinach washed with chlorinated water. On parsley treated with various washing treatments, a steady decline was observed in the number of *E. coli* whereas *L. innocua* could survive and its growth continued throughout storage at 5 °C for 15 days. Chlorophyll a, chlorophyll b, ascorbic acid and total phenolic contents and antioxidant activity of parsley were all reduced throughout storage with no significant differences among samples treated with different washing solutions ( $p > 0.05$ ). Gaseous ozone applied directly to the parsley samples resulted in 1.31 and 1.14 log reductions in the numbers of *E. coli* and *L. innocua*, respectively. This treatment did not affect chlorophyll a and chlorophyll b levels in parsley, however, caused 40, 12 and 41% of reductions in ascorbic acid and total phenolic contents and antioxidant activity, respectively.

**October 2010, 91 pages**

**Key Words:** Ozone, Lettuce, Spinach, Parsley, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, Chlorophyll, Ascorbic acid, Total phenolic content, Antioxidant activity

## TEŞEKKÜR

Gerek insani gerekse bilimsel açıdan kendisinden çok şey öğrendiğim danışman hocam sayın Prof. Dr. Sedat VELİOĞLU'na (Ankara Üniv. Müh. Fak. Gıda Müh. Bölümü), bu araştırmanın konusunun saptanması, planlanması, yürütülmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesinde düşünceleriyle bana yol gösterdiği, paylaştığı görüşleriyle ufkumu genişlettiği ve beni hep desteklediği için teşekkürlerimi sunarım. Doktora çalışmam boyunca her altı ayda bir Denizli'den Ankara'ya gelen değerli hocam sayın Prof. Dr. Sebahattin NAS (Pamukkale Üniv. Müh. Fak. Gıda Müh. Bölümü) ve tüm laboratuvar olanaklarıyla yanımda olan kıymetli hocam sayın Prof. Dr. A. Kadir HALKMAN'a (Ankara Üniv. Müh. Fak. Gıda Müh. Bölümü), Tez İzleme Komitesi toplantılarında ve her ihtiyaç duyduğumda benden esirgemedikleri değerli görüşleri, yararlı katkıları ve büyük destekleri için teşekkür ediyorum.

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Başta bölüm başkanım sayın Prof. Dr. Aziz EKŞİ olmak üzere tüm bölüm hocalarıma, araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve idari personelimize özverili davranışları için teşekkür ediyorum. Benden esirgemedikleri kişisel destekleri ve laboratuvar olanakları için bölüm hocalarım sayın Prof. Dr. Nevzat ARTIK, sayın Prof. Dr. Mehmet ÖZKAN ve sayın Doç. Dr. Ender Sinan POYRAZOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım. Çalışma boyunca, değerli fikirlerini benimle paylaşarak veya mesailerini harcayarak bana destek veren çok sevdiğim çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Evrim Güneş ALTUNTAŞ, Araş. Gör. Gökçe POLAT YEMİŞ, Araş. Gör. Dr. Oktay YEMİŞ, Araş. Gör. Dr. Ferda SARI, Araş. Gör. Özyay MENTEŞ YILMAZ, Araş. Gör. Seçil TÜRKSOY, Araş. Gör. Şule KESKİN ve Araş. Gör. Dr. Emre BAKKALBAŞI'na ve emekli laborantımız sayın Mustafa GAYRETLİ'ye çok teşekkür ediyorum. Son olarak, hayatım boyunca maddi-manevi hiçbir desteği benden esirgemeyen canım aileme teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışması, "Ozonlamanın marul, ıspanak ve maydanozlarda mikrobiyel inaktivasyon ve raf ömrü üzerine etkisi" başlıklı ve 2005K120140 no'lu proje olarak Ankara Üniversitesi Bilim İnsanı Yetiştirme Programı (BİYEP) tarafından desteklenmiştir.

Hakan KARACA  
Ankara, Ekim 2010

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1 Meyve ve Sebzelerin Beslenmedeki Yeri ve Önemi .....	4
2.2 Meyve ve Sebzelerde Bulunabilen Patojen Mikroorganizmalar.....	5
2.2.1 Diyarejenik <i>Escherichia coli</i> (DEC).....	5
2.2.2 <i>Listeria</i> .....	6
2.2.3 <i>Salmonella</i> .....	8
2.2.4 Diğer mikroorganizmalar.....	8
2.3 Meyve ve Sebzelerin Dezenfeksiyonunda Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	8
2.4 Meyve ve Sebze İşlemede Ozon Kullanımı .....	10
2.4.1 Ozonun genel özellikleri .....	11
2.4.2 Mikrobiyel inaktivasyon için ozon kullanımı .....	14
2.4.3 Meyve ve sebzelerin fizyolojisi ve kalite özellikleri üzerine ozonun etkisi .....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1 Materyal.....	18
3.2 Yöntem.....	18
3.2.1 Mikrobiyolojik analizler.....	19
3.2.1.1 İnokülasyon sıvısının hazırlanması.....	19
3.2.1.2 Sebze örneklerinin mikrobiyolojik analize hazırlanmaları.....	19
3.2.1.3 İnokülasyon ve ekim yöntemleri.....	20
3.2.1.4 Yıkama ve depolama yöntemleri.....	21
3.2.1.5 Gaz ozon uygulaması.....	22
3.2.2 Kimyasal analizler.....	23
3.2.2.1 Klorofil a ve klorofil b tayin yöntemi.....	24
3.2.2.1.1 Klorofil a ve klorofil b standart eğrilerinin çizimi.....	24
3.2.2.2 Askorbik asit tayin yöntemi.....	27
3.2.2.2.1 Askorbik asit standart eğrisinin çizimi.....	27
3.2.2.3 Toplam fenolik madde tayin yöntemi.....	29
3.2.2.3.1 Toplam fenolik madde miktarının hesaplanması.....	30
3.2.2.4 Antioksidan aktivite tayin yöntemi.....	30
3.2.2.4.1 Antioksidan aktivite değerinin hesaplanması.....	31
3.2.2.5 Kuru madde tayini.....	32
3.2.2.6 Sudaki ve havadaki ozon konsantrasyonunun ölçülmesi.....	33
3.2.3 İstatistik analizler.....	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	35
4.1 Farklı Ozonlama Sürelerinin Mikrobiyel İnaktivasyon ve Bazı Kimyasal Özellikler Üzerine Etkileri.....	38

<b>4.2 Farklı Yıkama Uygulamalarının Mikrobiyel İnaktivasyon ve Bazı Kimyasal Özellikler Üzerine Etkileri.....</b>	<b>42</b>
<b>4.3 Yıkama Depolanan Maydanlarda Mikrobiyel Gelişim ve Bazı Kimyasal Özelliklerin Değişimi .....</b>	<b>48</b>
<b>4.4 Gaz Ozon Uygulamasıyla Maydanlarda Mikrobiyel İnaktivasyon .....</b>	<b>56</b>
<b>4.5 Gaz Ozon Uygulamasının Maydanlardaki Bazı Kimyasal Özellikler Üzerine Etkisi .....</b>	<b>60</b>
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>66</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>69</b>
<b>EK 1.....</b>	<b>84</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>88</b>

## KISALTMALAR DİZİNİ

EPA	ABD Çevre Koruma Dairesi (US Environmental Protection Agency)
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority)
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)
FDA	ABD Gıda ve İlaç İdaresi (US Food and Drug Administration)
GRAS	Genel olarak güvenli kabul edilen (Generally Recognized as Safe)
HOCl	Hipokloröz asit
HPLC	High pressure liquid chromatography (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi)
KM	Kuru madde
kob	Koloni oluşturan birim
MRD	Maximum recovery diluent
NA	Nutrient agar
PDA	Potato dextrose agar
OCl	Hipoklorit iyonu
THM	Trihalometan
TSA-YE	Tryptic soy agar-yeast extract
TSB	Tryptic soy broth
USDA	ABD Tarım Dairesi (US Department of Agriculture)
UV	Ultraviyole
VRBA	Violet red bile agar
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Ozon molekülünün oluşumu.....	11
Şekil 2.2	Corona Deşarj Metodu ile ozon elde edilişi.....	12
Şekil 3.1	Gaz ozon uygulamasının gerçekleştirildiği düzenek.....	23
Şekil 3.2	Klorofil a standart eğrisi.....	25
Şekil 3.3	Klorofil b standart eğrisi.....	26
Şekil 3.4	Askorbik asit standart eğrisi.....	28
Şekil 3.5	Gallik asit standart eğrisi.....	31
Şekil 3.6	Troloks standart eğrisi.....	32
Şekil 3.7	Havadaki ozon gazı konsantrasyonunun ölçümünde kullanılan ekipman.....	34
Şekil 4.1	Ispanak örneğinin klorofil düzeylerini gösteren kromatogramlar.....	35
Şekil 4.2	Klorofil a ve klorofil b spektrumları.....	36
Şekil 4.3	Maydanozdaki askorbik asit pikinin kromatogramı.....	37
Şekil 4.4	Askorbik asit spektrumu.....	37
Şekil 4.5	Farklı yıkamalar uygulanıp depolanan maydanozlarda <i>Escherichia coli</i> gelişimi.....	49
Şekil 4.6	Farklı yıkamalar uygulanıp depolanan maydanozlarda <i>Listeria innocua</i> gelişimi.....	50
Şekil 4.7	Farklı yıkamalar uygulanıp depolanan maydanozlarda klorofil a miktarının değişimi.....	51
Şekil 4.8	Farklı yıkamalar uygulanıp depolanan maydanozlarda klorofil b miktarının değişimi.....	52
Şekil 4.9	Farklı yıkamalar uygulanıp depolanan maydanozlarda toplam fenolik madde içeriğinin değişimi.....	53
Şekil 4.10	Farklı yıkamalar uygulanıp depolanan maydanozlarda antioksidan aktivite değerinin değişimi.....	54
Şekil 4.11	Farklı yıkamalar uygulanıp depolanan maydanozlarda askorbik asit miktarının değişimi.....	56
Şekil 4.12	Ozon gazı uygulamasıyla (950±12 ppm, 20 dakika) maydanozlarda gerçekleşen <i>E. coli</i> ve <i>L. innocua</i> inaktivasyon düzeyleri.....	58

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	Dezenfeksiyon öncesi ve sonrası her bir sebze için saptanan mikroorganizma yoğunlukları.....	20
Çizelge 3.2	Klorofil a ve klorofil b analizi için HPLC cihazında kullanılan kromatografi koşulları.....	25
Çizelge 3.3	Askorbik asit analizi için HPLC cihazında kullanılan kromatografi koşulları.....	28
Çizelge 4.1	Farklı ozonlama sürelerinin marulda <i>E. coli</i> ve <i>L. innocua</i> inaktivasyonu ve bazı kimyasal bileşenler/özellikler üzerine etkisi.....	39
Çizelge 4.2	Farklı ozonlama sürelerinin ıspanakta <i>E. coli</i> ve <i>L. innocua</i> inaktivasyonu ve bazı kimyasal bileşenler/özellikler üzerine etkisi.....	39
Çizelge 4.3	Farklı ozonlama sürelerinin maydanozda <i>E. coli</i> ve <i>L. innocua</i> inaktivasyonu ve bazı kimyasal bileşenler/özellikler üzerine etkisi.....	40
Çizelge 4.4	Farklı yıkama uygulamalarının marulda <i>E. coli</i> ve <i>L. innocua</i> inaktivasyonu ve bazı kimyasal bileşenler/özellikler üzerine etkisi.....	43
Çizelge 4.5	Farklı yıkama uygulamalarının ıspanakta <i>E. coli</i> ve <i>L. innocua</i> inaktivasyonu ve bazı kimyasal bileşenler/özellikler üzerine etkisi.....	44
Çizelge 4.6	Farklı yıkama uygulamalarının maydanozda <i>E. coli</i> ve <i>L. innocua</i> inaktivasyonu ve bazı kimyasal bileşenler/özellikler üzerine etkisi.....	44
Çizelge 4.7	Gaz ozon uygulamasının maydanozlardaki bazı kimyasal özellikler üzerine etkisi.....	61

## 1. GİRİŞ

Minimal işlem görmüş gıdalar, özellikle de ayıklanıp doğranmış taze meyve ve sebzeler, kullanım kolaylığı nedeniyle tüketicilerin ilgisini her geçen gün daha fazla çekmekte ve bu gıdalara duyulan talep sürekli bir artış göstermektedir. Şüphesiz bu ilgi ve talep artışının bir başka nedeni de Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Gıda-Tarım Örgütü (FAO) gibi kuruluşların kanser ve kardiyovasküler hastalık riskinin azaltılması için mümkün olduğunca doğal haldeki meyve ve sebze tüketiminin artırımını önermesidir (Allende vd. 2006). Bu tür gıdalar, ülkemiz piyasasına da hızla girmiş ve özellikle çalışan kesimin yoğun bir şekilde tercih ettiği ürünler haline gelmiştir.

Minimal işlem görmüş gıdaların raf ömrünü kısıtlayan faktörler içerisinde enzimatik esmerleşme, yüzeyde beyazlaşma, artan etilen üretimi ve solunum en önemli yeri tutmaktadır. Bu tür ürünlerde devam eden mikrobiyel aktivite de ürünün raf ömrünü sınırlar. Ayrıca taze ürünlere, özellikle de sebzelere; *Escherichia*, *Listeria*, *Salmonella* ve *Shigella* gibi bazı bakteri cinslerinin patojen türlerinin kontaminasyonu zaman zaman söz konusu olabilmektedir (Scifo vd. 2009). Bu durum, gıda kaynaklı hastalıklara yol açarak tüketici sağlığı için ciddi bir risk oluşturmaktadır. Nitekim 1996–2006 yılları arasında, sadece ABD’nde, taze ürünlerden kaynaklanan 72 adet gıda kaynaklı hastalığın yaşandığı ve bunların % 25’inin taze doğranmış ürün kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Anonymous 2007). 2006 yılında taze doğranmış ıspanaklardaki *Escherichia coli* O157:H7 serotipi, 3 kişinin ölümüne ve yaklaşık 200 kişinin hastalanmasına neden olmuş ve ülke çapında tüm taze ıspanaklar raflardan toplatılmıştır (Lee ve Baek 2008). Geçmişte *Listeria monocytogenes* ile kontamine olmuş çiğ sebze salatalarının tüketimiyle ilişkilendirilen gıda kaynaklı hastalıklar da söz konusu olmuştur (Ho vd. 1986).

Minimal işlem görmüş meyve ve sebzelerde raf ömrünü uzatabilmek ve potansiyel patojen kontaminasyonlarının önüne geçmek için; depolama öncesi ürünün çeşitli dezenfektanlarla muamele edilmesi sıklıkla uygulanan bir yöntemdir. Bu amaçla klor bazlı dezenfektanlar gıda sanayisinde uzun yıllardan beri yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu dezenfektanların, patojenik ve fekal bazı

mikroorganizmaların, bunların spor formlarının ve virüslerin inaktivasyonunda yetersiz kaldığı bildirilmiştir (Kim vd. 1999). Söz konusu dezenfektanlar ayrıca, suda ve gıdayla temas ettiği yüzeylerde organik maddelerle reaksiyona girerek, trihalometanlar gibi toksik nitelikli bileşikler oluştururlar. Bu nedenle; Almanya, Hollanda, İsviçre ve Belçika başta olmak üzere birçok ülkede klor bazlı dezenfektanların taze doğranmış ürünlerde kullanımının yasaklanması düşünülmektedir (Beltran vd. 2005). Bu durum, klora alternatif olabilecek farklı dezenfektanların arayışına büyük bir ivme kazandırmıştır.

Taze meyve sebzelerin raf ömürlerinin artırılmasında son yıllarda araştırılan alternatiflerin başında ozon uygulamaları gelmektedir. Ozon, Avrupa'da uzun yıllardan beri kullanılan, ABD'nde ise kullanımı son yıllarda yaygın olarak denenen güçlü bir oksidan ve dezenfeksiyon maddesidir. ABD'nde GRAS (Generally Recognized as Safe) statüsüne alınan (Graham 1997) ve gıda uygulamalarında kullanımına izin verilen ozonun (Anonymous 2001), kullanım alanlarının ve etkinliğinin araştırılmasına bilim insanlarının ve gıda üreticilerinin ilgisi gün geçtikçe artmaktadır. Ozonun en önemli avantajı geride kalıntı bırakmamasıdır. Özellikle son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda ozon uygulamaları yoğun bir şekilde denenmiş ve birçok üründe mikroorganizma inaktivasyonu (Selma vd. 2008a), pestisitlerin giderimi (Gabler vd. 2010), mikotoksin degradasyonu (Karaca vd. 2010) ve ürünün raf ömrünün uzamasında (Beltran vd. 2005) oldukça etkili sonuçlar alınmıştır. Bununla birlikte, ozon yüksek oksidasyon kapasitesiyle bazı gıda bileşenlerine zarar verebilir. Bu da üründe kalite kayıplarına yol açıp ürünün tüketici tarafından tercih edilmemesine neden olabilir. Gerçekleştirilen çalışmalar, her ürüne ve her prosese spesifik olarak, maksimum mikroorganizma inaktivasyonunu sağlayacak, bunu yaparken de ürünün kalite özelliklerini olumsuz yönde etkilemeyecek işlemlerin optimizasyonuna duyulan gereği ortaya koymaktadır.

Son yıllarda ülkemizde ve dünyada tüketimleri hızla artan ürün gruplarından biri yaprak sebzelerdir. Tüketim öncesi bu tür gıdaların klor ve ozon gibi kimyasal ajanlarla muamele edilmesi son yıllarda detaylıca araştırılan konulardandır. Bu çalışmada, ayıklanıp doğranmış marul, ıspanak ve maydanozlara inoküle edilmiş *E. coli* ve *L.*

*innocua* inaktivasyonunda ozonlu suyla (12,0±0,5 ppm) yıkama uygulamasının etkinliği ve bu uygulamanın söz konusu sebzelerin klorofil a, klorofil b, askorbik asit ve toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktivite değerleri üzerine etkisi incelenmiştir. Ozonlu suyla yıkama ile elde edilen sonuçlar, saf su ve klorlu su (100 ppm) uygulamalarından elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Ayrıca, farklı dezenfektanlarla muamele edilen maydanozlarda *E. coli* ve *L. innocua* mikroorganizmalarının gelişimleri ile örneklerin klorofil, askorbik asit ve toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktivite değerleri 15 günlük soğuk depolama (5±1 °C) süresince izlenmiştir. Son olarak ozon gazı uygulamasının (950±12 ppm, 20 dakika) maydanozlarda *E. coli* ve *L. innocua* inaktivasyonundaki etkinliği ve bu uygulamanın klorofil, askorbik asit ve toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktivite değerleri üzerine etkisi belirlenmiştir.

Bazı mikroorganizmaların yüksek patojenitesi nedeniyle, laboratuvar denemelerinin patojen mikroorganizmaların kendileriyle gerçekleştirilmesi çoğu kez tehlikeli olabilmektedir. Bu nedenle inaktivasyon çalışmalarında; patojenitesi, test edilmek istenen mikroorganizmanın kadar yüksek olmayan, ancak aynı deney koşullarında (kimyasallarla muamele, depolama vb.) patojen mikroorganizma ile benzer şekilde davranan organizmaların model olarak kullanımı sıklıkla başvurulan bir yöntemdir (Vaz-Velho vd. 2001). Nitekim patojen *L. monocytogenes* yerine patojen olmayan *L. innocua*'nın (Vaz-Velho vd. 2006, Fan vd. 2007) ve patojen *E. coli* O157:H7 yerine patojen olmayan *E. coli* suşunun (Yokoigawa vd. 1999, Gleeson ve O'Beirne 2005) kullanıldığı birçok çalışma söz konusudur. Tarafımızdan yürütülen çalışmada da patojen *L. monocytogenes* ve *E. coli* O157:H7 yerine bu mikroorganizmalarla yüksek fenotipik benzerlik gösteren ve patojen olmayan *L. innocua* ve *E. coli* Tip 1 suşu model organizmalar olarak kullanılmıştır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Meyve ve Sebzelerin Beslenmedeki Yeri ve Önemi

Kardiyovasküler hastalıklar ve kanser, ülkemizde ve dünyada gerçekleşen ölümlerin nedenleri arasında ilk iki sıradadır. Bu hastalıkların ve diğer birçok hastalığın önlenmesi için yeterli meyve ve sebze tüketimi birçok kuruluş [Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), ABD Tarım Dairesi (USDA) ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA)] tarafından önerilmektedir (Allende vd. 2006). Esasen meyve ve sebze tüketiminin sağlık üzerine olumlu etkileri eskiden beri bilinmektedir. Meyve ve sebzeler bu özelliklerini sahip oldukları biyoaktif bileşenlere (fitokimyasallara) ve özellikle de antioksidan bileşenlerine borçludurlar (Gupta ve Prakash 2009). Antioksidanlar, serbest radikalleri ortadan kaldırarak onların hücredeki biyomoleküllere (proteinlere, lipitlere ve DNA'ya) zarar vermelerini engeller (Shahidi 2004).

Yeşil yapraklı sebzeler de antidiabetik, antihistaminik, antikarsinojenik ve antibakteriyel etkileriyle sağlık üzerine son derece önemli faydaları olan sebze gruplarından (Subhasree vd. 2009). Zengin diyet lifi, vitamin, mineral, karotenoid ve fenolik madde içeriklerine sahiptirler. Özellikle içerdikleri C vitamini, fenolik ve karotenoid bileşiklerin bu sebze grubunun toplam antioksidan kapasitesine katkısı büyüktür (Isabelle vd. 2010). Gerçekleştirilen çalışmalar, klorofillerin antimitojen (Negishi vd. 1997) ve antikarsinojenik (Chernomorsky vd. 1999) etkilerini ortaya koymuştur. Ayrıca klorofiller (klorofil a ve klorofil b) yüksek antioksidan aktiviteye sahip karotenoid bileşiklerle birlikte ürünün kalitesinde ve pazarlanmasında büyük öneme sahip renkten sorumludurlar (Pennington ve Fisher 2009). İşte bu nedenle ABD Tarım Dairesi (USDA) özellikle koyu yeşil renge sahip yaprak sebzelerin haftada en az birkaç kez tüketilmesini önermiştir (Anonymous 2008a).

Çeşitli kuruluşlar tarafından yapılan öneriler ve toplum bilincinin artması sonucu taze meyve ve sebzelere duyulan talepte büyük bir artış söz konusudur. Bu artış taze meyve ve sebze üretiminin artması ve özellikle meyve ve sebzelerden hazırlanan tüketime hazır (ready to eat) gıdaların üretimini gerçekleştiren sektörün büyümesiyle sonuçlanmaktadır

(Turatti 2007). Bu ürünlerde gerçekleşebilecek patojen mikroorganizma kontaminasyonları nedeniyle gıda kaynaklı hastalıklar da haliyle artış göstermektedir (Beuchat 1999a).

## **2.2 Meyve ve Sebzelerde Bulunabilen Patojen Mikroorganizmalar**

Meyve ve sebze sektöründe gerek hammaddenin mikrobiyel yükü, gerekse üretim ve/veya üretim sonrası ürüne bulaşan mikroorganizmalar, sektörün en önemli sorunlarından birini oluşturmaktadır (Karaca ve Velioglu 2007). Ürüne bulaşan mikroorganizmalar patojen nitelikteyse, tüketici sağlığını tehlikeye sokacak durumlar söz konusu olabilmektedir.

Meyve ve sebzelerin yetiştiği bahçeler/tarlalar açık sistemler olduğundan bu ortamlardaki ürünlere mikroorganizma bulaşmasının önüne tamamen geçmek mümkün değildir (Vurma vd. 2009). Ürünün kirli sularla yıkanması, uygun olmayan gübre kullanımı ve doğadaki diğer canlılardan (kuş, yabani hayvanlar, sinek vb.) gelebilecek dışkı materyali hasattan önceki önemli kontaminasyon kaynaklarıdır. Hasattan sonra ürünün işlenmesi sırasında kirli yıkama suyu ve ekipman kullanımı, üretimde görev alan personelin yetersiz hijyen bilgisi ve depolama/taşıma sırasında uygun olmayan sıcaklık ve havalandırma şartları ile kontamine üründen gerçekleşebilecek çapraz kontaminasyon gıda güvenliği riski oluşturmaktadır (Klockow ve Keener 2009).

Kontaminasyonlarıyla zaman zaman meyve ve sebzelerde sağlık riski oluşturup gıda kaynaklı hastalıklara neden olan belli başlı mikroorganizmalara aşağıda değinilmiştir:

### **2.2.1 Diyarejenik *Escherichia coli* (DEC)**

Enterobacteriaceae familyasına bağlı olan *Escherichia*; Gram negatif, çubuk şeklinde, sporsuz, fakültatif anaerob bakterilerden oluşur. *Escherichia coli*'nin doğada bulunduğu yegâne yer, insan ve diğer memeli hayvanların ve kanatlıların bağırsak sistemleri ve dolayısıyla bunların dışkılarıdır. Bu yüzden bir gıda maddesinde, içme veya kullanma

suyunda bu mikroorganizmaya rastlanması, o gıdaya doğrudan ya da lağım suyu aracılığıyla dışkı bulaştığının bir göstergesidir (Halkman vd. 2003).

Kauppi vd. (1998) *E. coli* suşlarının gelişim aralığının 7,5–49 °C olduğunu bildirmiştir. Pastörizasyon veya kaynatma sıcaklığında inaktive olan *E. coli*, memeli hayvanların bağırsaklarında gelişmeye adapte olmuş olduğundan en iyi vücut sıcaklığında çoğalır.

Bağırsak florasının doğal bir üyesi halindeki *E. coli* ile konak organizma arasında uyumlu bir ilişki olduğundan, bakteri normalde hastalık yapmaz. Ancak bir başka konak organizmanın bağırsağında hastalık etmeni olabilir. Örneğin bazı hayvanlarda etkisiz olan bazı *E. coli* tipleri, insana bulaştığında hastalık yapabilir (Ünlütürk ve Turantaş 1998).

*E. coli*'nin patojen türleri, etki gösterdiği dokular ve etki mekanizmalarına göre gruplandırılırlar. İshalli hastalıklara neden olan *E. coli* tipleri: enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteroinvazif *E. coli* (EIEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC) ve enterohemorajik *E. coli* (EHEC)'dir. EHEC grubu içinde yer alan *E. coli* O157:H7 adlı serotip, kanlı ishale ve hatta ölüme yol açabilen, günümüzde gıda kaynaklı patojenler içinde en tehlikelisi olarak bilinen bakteridir. İsmindeki “O” somatik hücredeki, “H” ise flagelladaki antijeni belirtmektedir. Bu mikroorganizma, bağırsak yüzeyinde ciddi hasarlara neden olan güçlü toksinleri yüksek düzeylerde üretip kanlı ishal hastalığına neden olmaktadır. Ayrıca beyinde ve böbreklerde kalıcı fonksiyon kayıplarına yol açabilmektedir (Halkman vd. 2001).

Geçmişte *E. coli* O157:H7 ile kontamine olan marul (Achters vd. 1998), maydanoz (Naimi vd. 2003) ve ıspanak (Lee ve Baek 2008) gibi ürünlerin tüketilmesiyle gerçekleşen gıda kaynaklı hastalıklar bildirilmiştir.

### **2.2.2 Listeria**

*Listeria*; Gram pozitif, kısa-çubuk şeklinde, sporsuz, kapsülsüz, fakültatif anaerob, 25°C'de hareketli ancak 37°C'de hareketsiz bir bakteri cinsidir. Bu cinse ait türler, katı

yüzeyle yapışıp orada gelişmelerini sağlayacak ve çok zor uzaklaştırılabilecek biyofilmler oluşturabilirler. Ayrıca yüksek tuz konsantrasyonu, yüksek pH ve düşük-yüksek sıcaklık gibi zorlu koşullardan canlı olarak çıkabilirler. Bu cinse ait bakteriler; insan ve hayvan dışkı, toprak, bitki, silaj, şehirlerin ve işletmelerin atık suları gibi farklı ortamlarda yaygın olarak bulunabilirler (Ünlütürk ve Turantaş 1998).

*Listeria* cinsi taksonomik olarak 6 türe ayrılır. Bunlar: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* ve *L. grayi*'dir. Bunlardan *L. monocytogenes* insanlarda ve hayvanlarda, *L. ivanovii* ise sadece hayvanlarda hastalık etmenidir. *L. monocytogenes*'in tüm suşları patojen değildir. Patojen *Listeria* türleri tarafından oluşturulan infeksiyon hastalığına "listeriyoz" denir. Hastalık; beyin iltihabı, septisemi, konjunktivit, gastroenterit, mukozada lezyonlar, cilt hastalıkları ve lenf düğümlerinde şişme gibi çeşitli şekillerde ortaya çıkmaktadır. *L. monocytogenes* özellikle anne karnındaki fetusları, hamileleri, yaşlıları ve bağışıklık sistemi zayıflayan bireyleri infekte eder. Hastalık seyrek görülmekle birlikte ölüm oranı oldukça yüksektir (Tunail 2000).

İnsanlarda görülen listeriyoz genellikle *L. monocytogenes* ile kontamine gıdaların tüketimi sonucu gerçekleşmektedir. Bazı peynir çeşitleri (Kagkli vd. 2009), pişmiş et ürünleri (Sheen ve Hwang 2008) ve tüketim öncesi herhangi bir işlem gerektirmeyen hazır gıdalar (Allende vd. 2007a), *L. monocytogenes*'in gelişimine ve canlılığını sürdürebilmesine elverişli olduğundan risk taşıyan gıdalardır. Sebze tüketiminden kaynaklanan risk ile listeriyoz salgınları arasında bir ilişki olduğu farklı araştırmacılar tarafından ileri sürülmüştür (Schlech vd. 1983; Ho vd. 1986). Ayrıca sebzeler *L. monocytogenes* gelişimi için uygun substratlar olarak görülmektedir (Farber vd. 1998, Aytaç vd. 2010). Ancak söz konusu mikroorganizmanın bu tür gıdalarda görülme sıklığı genelde %10'un altında bulunmuştur (Brackett 1999).

*Listeria* türleri 1-45 °C aralığında gelişme yeteneğine sahiptir, yani mikroorganizma buzdolabı sıcaklığında rahatlıkla gelişebilir. Bu durum, gıda muhafazasında soğuk zincir uygulamasının söz konusu bakterinin gelişimini sınırlandıramayacağına bir

göstergesidir ve gıdaları *Listeria* riskinden korumada önemli bir problem oluşturmaktadır (Ekici vd. 2004).

### **2.2.3 Salmonella**

*Salmonella*; çubuk şeklinde, hareketli (hareketsiz olan *S. gallinarum* ve *S. pullorum* hariç), spor oluşturmeyen ve Gram negatif bir bakteri cinsidir. *E. coli* gibi bu bakteri de, insan ve diğer memeli hayvanların ve kanatlıların bağırsak sistemlerinde ve dolayısıyla bunların dışkılarında bulunur. 2500'e kadar serotipi bulunmasına karşın bunlardan 50 kadarı insanlarda sıklıkla görülen hastalıklara neden olmaktadır (Ünlütürk ve Turantaş 1998).

Kontaminasyonu sıklıkla problem yaratan *Salmonella* Türkiye'de de gıda kaynaklı hastalık etmeni mikroorganizmalar sıralamasında başı çekmektedir. Ülkemizde 1999 ve 2000 yıllarında rapor edilen sırasıyla 84340 ve 77515 gıda kaynaklı hastalık vakasında %34'lük payla her iki senede de *Salmonella* ilk sırada yer almıştır (Anonymous 2002).

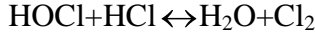
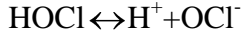
### **2.2.4 Diğer mikroorganizmalar**

Taze meyve ve sebzelerde gıda kaynaklı hastalılara neden olan diğer patojenler arasında *Shigella*, *Yersinia*, *Clostridium*, *Bacillus* ve *Vibrio* cinsleri ile virüsler (örneğin hepatit A) ve parazitler sayılabilir. Ayrıca, bu tür gıdalara kontamine olabilen bazı küf türleri tarafından üretilen mikotoksinler (aflatoksin, okratoksin, patulin vb.) de insan sağlığı için ciddi riskler oluşturabilmektedirler.

## **2.3 Meyve ve Sebzelerin Dezenfeksiyonunda Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Günümüzde klor, gıda sanayisinde en yaygın olarak kullanılan dezenfektan konumundadır. Yüksek oksidasyon gücü nedeniyle güçlü bir dezenfeksiyon maddesidir ve ucuzdur. Genel kullanım şekli olan klorlu su, ya klor gazının ya da hipoklorit tuzlarının (sodyum hipoklorit veya kalsiyum hipoklorit) suda çözünmesiyle oluşturulur. Hazırlanan bu çözelti, pH'ya bağlı olarak farklı oranlarda klor gazı (Cl<sub>2</sub>), hipokloröz asit

(HOCl) ve hipoklorit iyonları (OCl<sup>-</sup>) içerir (Suslow 1997). Klorlu bileşiklerin suda verdiği temel reaksiyonlar aşağıda verilmiştir:



Serbest klor (elverişli klor veya reaktif klor) terimi oksidasyon reaksiyonları veya dezenfeksiyon için kullanılabilen herhangi bir formdaki klor için kullanılır. Toplam klor ise suda bulunan serbest klor ve bağlı klorun toplamıdır ve halen dezenfeksiyon ve organik madde oksidasyonu için kullanılabilen formdadır. Bağlı klor bileşikleri serbest klor formlarından daha stabildirler ve dezenfeksiyon reaksiyonlarını çok daha yavaş gerçekleştirirler. Aktif klor bileşiklerinden bakteri dezenfeksiyonunda en etkin olanı su ile hidroliz sonucu oluşan hipokloröz asittir. Bu asit en yüksek konsantrasyona pH 6'da ulaşsa da aktivite ve stabilite kavramları birlikte düşünüldüğünde dezenfeksiyon için en uygun pH aralığı 6,5–7,5'dir (Suslow 1997).

Klor bileşiklerinin antimikrobiyel etkileri birçok enzimin ve yapısal proteinin –SH gruplarının oksidasyonuna dayanır. Ayrıca, membranın zarar görmesi, protein sentezinin bozulması, nükleik asitlerle gerçekleşen reaksiyonlar ve hücre metabolizmasının engellenmesi de söz konusudur (Ray 2004).

Klorun meyve-sebzeler üzerindeki bazı mikroorganizmaları gidermede sınırlı etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Erkmen 2001). Birçok araştırmacı tarafından (Gomella 1972, Scarpino vd. 1972, Beuchat 1996) klorun özellikle mikroorganizmaların spor formlarının, fekal ve patojenik mikroorganizmaların ve virüslerin inaktivasyonunda nispeten etkisiz kaldığı bildirilmiştir (Kim vd. 1999). Klorun bir başka olumsuzluğu da suda ve gıdayla temas ettiği yüzeylerde organik bileşiklerle reaksiyona girerek toksik bileşikler oluşmasıdır. Örneğin trihalometan (THM) bileşikleri, çözünebilir organik bileşiklerin serbest klor formları (HOCl, OCl<sup>-</sup>) tarafından klorlanması sonucu oluşan karsinojenik bileşiklerdir. Bu nedenle ABD'nde içme sularında toplam THM sınırı 100 ppm olarak belirlenmiştir (Kim vd. 1999).

Taze meyve ve sebzelerde ürün güvenliğinin sağlanması için birçok dezenfektan madde klor bazlı kimyasallara alternatif olarak denenmektedir. Gerek evsel gerekse endüstriyel boyutta kullanımları araştırılan bu dezenfektanların etken bileşikleri organik asitler, kalsiyum oksit, polysorbat 20 (Tween 20) vb. olabilmektedir. Özellikle endüstriyel boyutta taze meyve ve sebzelerin raf ömürlerinin artırılmasında son yıllarda araştırılan alternatif dezenfektanların arasında ise hidrojen peroksit, klor dioksit ve ozon sayılabilir. Klordan daha yüksek oksidasyon kapasitesine sahip olan hidrojen peroksit, marul gibi yaprak sebzelerin raf ömürlerinin uzatılması amacıyla denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Gopal vd. 2010). Yüksek çözünürlüğü ve oksidasyon potansiyeli, üründe yabancı tat ve koku bırakmaması ve toksik nitelikli bileşikler oluşturmaması nedeniyle klor dioksitin de gıda uygulamalarına uygunluğu yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (Gomez-Lopez vd. 2009). Ürün güvenliğinin sağlanması amacıyla test edilen bir diğer alternatif de ozon uygulamalarıdır.

#### **2.4 Meyve ve Sebze İşlemede Ozon Kullanımı**

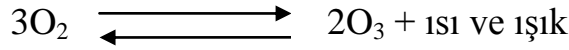
Meyve ve sebzelerin dezenfeksiyonu amacıyla kullanılan bazı kimyasalların, mikrobiyel inaktivasyonda yetersiz kalmaları ve insan sağlığına zararlı bileşikler oluşturmaları gibi bazı olumsuzlukları söz konusudur. Bu nedenle gıda endüstrisi, gıdalarda yaygın olarak bulunabilen ve yeni ortaya çıkan patojenlerin inaktivasyonunda etkin, üründe kalite kayıplarına yol açmayan, mevcut gıda proseslerine kolay adapte edilebilen ve çevreyle dost uygulamaların arayışı içindedir. İşte ozon, tüm bu beklentilere cevap verebilen bir uygulama olarak karşımıza çıkmaktadır. Ozon, içme suyu dezenfeksiyonunda Avrupa'da uzun süredir kullanılan ABD'nde ise kullanımını özellikle son yıllarda yaygın olarak denenen güçlü bir oksidan ve dezenfeksiyon maddesidir. ABD'nde GRAS (Generally Recognized as Safe) statüsüne alınan (Graham 1997) ve gıda uygulamalarında kullanımına izin verilen ozonun (Anonymous 2001), kullanım alanlarının ve etkinliğinin araştırılmasına bilim insanlarının ve gıda üreticilerinin ilgisi gün geçtikçe artmaktadır. Ülkemizde ise ozonun şişelenmiş içme suları dışında gıda uygulamalarında kullanımına ilişkin herhangi bir yasal düzenleme bulunmamaktadır. Brom içeren suların ozonlanmasıyla oluşan toksik nitelikli bromatın şişelenmiş içme

sularında bulunabileceği maksimum düzey 3 mikrogram/L olarak bildirilmiştir (Anonymous 2005). Ozon özellikle son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda yoğun bir şekilde denenmiş ve meyve-sebzeler dâhil birçok gıdada mikroorganizmaların inaktivasyonu, tarımsal ilaç kalıntılarının ve mikotoksinlerin giderimi ve ürünlerin raf ömürlerinin uzatılmasında etkili sonuçlar alınmıştır.

Meyve ve sebzelerin ozonla muamele edilmesi ya depo atmosferine gaz halde ozon verilmesi ya da bu ürünlerin ozonlu suyla yıkanması gibi iki farklı uygulamayla gerçekleştirilebilir (Karaca ve Velioglu 2007).

#### 2.4.1 Ozonun genel özellikleri

Ozon (O<sub>3</sub>); havadaki oksijen molekülünün (O<sub>2</sub>) yüksek bir enerji etkisi ile atomlarına ayrışması ve bu kararsız atomların bir başka oksijen molekülü ile hızla birleşmesi sonucu oluşur. Bu oluşum Şekil 2.1’de şematize edilmiştir.

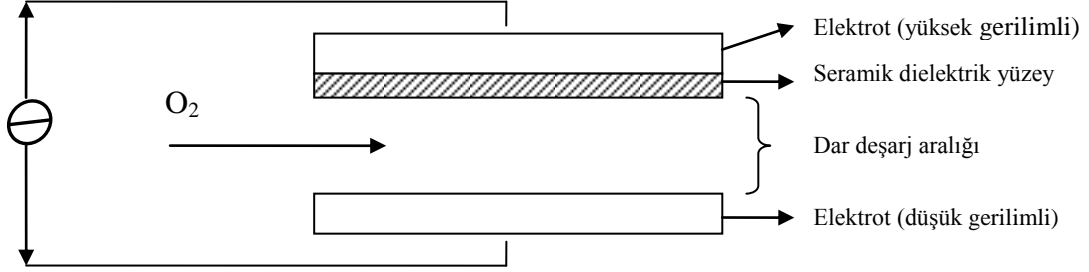


Şekil 2.1 Ozon molekülünün oluşumu

Yüksek enerji doğada, güneşten gelen UV ışınlarından (188 nm dalga boyulu) veya yağmurlu havalarda çakan şimşeklerden kaynaklanır (Suslow 2004). Endüstriyel ozon gazı üretimi ise doğadaki oluşumun mantığıyla UV ışık veren lambalar kullanılarak ya da daha çok “Corona Deşarj Metodu” denen ve Şekil 2.2’de çalışma ilkesi şematize edilmiş metotla gerçekleştirilmektedir.

Hava veya oksijen varlığında, deşarj aralığına uygulanan yüksek voltajlı alternatif akım, oksijen molekülündeki elektronları uyarır ve ayrılmalarını sağlar. Oluşan kararsız oksijen atomları derhal başka bir oksijen molekülüyle birleşir ve ozon molekülünün oluşmasını sağlar. Deşarj aralığına besleme gazı olarak hava verildiğinde kütlece %1–3, saf oksijen gazı verilmesi halinde %6 verimle ozon elde edilebilmektedir (Güzel-

Seydim vd. 2004). Bunlardan başka kimyasal, termal ve elektrolitik metotlarla da ozon elde edilebilmektedir (Kim vd. 1999).



Şekil 2.2 Corona Deşarj Metodu ile ozon elde edilişi

Sulu çözeltilerinde oldukça kararsız, havada ise nispeten daha stabil bir yapıya sahip olan ozon, çok çabuk bir şekilde oksijen molekülüne dönüşür. Bu yüzden depolanamaz, birikmez ve uygulamada kesiksiz üretim gerektirir. Bununla birlikte, ozonun dermatolojik tedavilerde kullanılmak üzere rafine edilmemiş zeytinyağlarında depolanabildiği bilinmektedir. Ozon, oksijen dışında başka bir kalıntı oluşturmaz. Oda sıcaklığı ve buzdolabı sıcaklığında gaz halde bulunan ozon “fırtına sonrası taze hava kokusu” olarak tarif edilen karakteristik ve keskin bir kokuya sahiptir. Ozon, 2,07 mV’luk oksidasyon potansiyeline sahipken; hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hipokloroz asit ( $HOCl$ ), klor ( $Cl_2$ ) ve klordioksitin ( $ClO_2$ ) oksidasyon potansiyelleri sırasıyla 1,78; 1,49; 1,36 ve 1,27 mV’tur. Görüldüğü gibi ozonun oksidasyon potansiyeli diğer oksidan ajanların potansiyellerinden oldukça yüksektir.

Gerek mikrobiyel inaktivasyonda, gerekse kimyasal kalıntıların giderilmesinde ozonun etkinliği çevresel faktörlere büyük ölçüde bağlıdır. Sulu ortamda sıcaklığın düşmesi ozonun çözünebilirliğini arttırdığından etkinliğini de arttırmaktadır. Bu durumun tersi de söz konusudur. Yani ortam sıcaklığının artmasıyla ozon dekompozisyonu da hızlanmaktadır. pH azalışı ortamdaki ozon stabilitesini ve dolayısıyla etkinliğini arttırmaktadır. Ozon etkinliğini arttıran bir diğer faktör de ortamın bağıl neminin artmasıdır (Kuşçu ve Pazır 2004).

Yukarıda bahsedilen faktörlere ilaveten ozonun mikrobiyel inaktivasyon ve/veya kalıntı gidermedeki gücü üzerine etki eden bir başka önemli faktör de ortamın ozon talebidir. Ozon, son derece reaktif bir moleküldür ve klorun tersine özellikle sulu ortamda hiç stabil değildir. İster gaz halde, ister suda çözülmüş halde olsun, bulunduğu ortamdaki organik ve/veya inorganik tüm maddelerle herhangi bir seçicilik göstermeksizin tepkimeye girer. Ozonun bu özelliği “ortamın ozon talebi” ve “kalıntı ozon” gibi kavramların ortaya çıkmasına neden olmuştur (Kim vd. 2003). Kalıntı ozon; hedef gıdaya ozon uygulamasının ardından ortamda saptanabilen ozon konsantrasyonu demektir. Ozonun oksidasyon etkinliği (örneğin mikroorganizmaları inaktive etmesi) uygulanan ozon dozundan çok, ortamda mevcut kalıntı ozon miktarına bağlıdır. Kalıntı ozon seviyesi, yani ozonun etkinliği, uygulama koşullarında ozonun stabilitesine ve ozon talebi bulunan maddelerin ortamdaki yoğunluğuna çok büyük ölçüde bağlıdır. Saf su diğer ortamlarla kıyaslandığında ozon isteği en az olan ortamdır. Sudaki safsızlıklar (örneğin mineral maddeler) uygulanan ozonla tepkimeye girer ve ortamın ozona olan gereksinimini artırır. Tarafımızdan gerçekleştirilen bir çalışmada, ozonla patulin degradasyonunun metal iyonları varlığında azaldığı, metal iyonlarının kelat ajanları ile bağlanması halinde ise ozonla degrade olan patulin miktarının arttığı belirlenmiştir (Karaca ve Velioglu 2009). Ozon uygulanan ortam, gıda gibi organik materyalce zengin bir ortam ise, ozonun etkinliğini belirleyen oksidasyon gücünün bir kısmı ortamdaki bileşikler okside etmek üzere harcanacak ve ozonun etkinliği daha da azalacaktır (Kim vd. 1999).

Ozon, yüksek dozlarda vücuda alındığında toksik etkiler gösterebilmektedir. Bu nedenle günde 8 saat kesintisiz ozona maruz kalabilecek işçilerin sağlığını korumak adına havada bulunacak ozon gazı konsantrasyonu ABD Çevre Koruma Dairesi (Environmental Protection Agency) tarafından 0,075 ppm ile sınırlandırılmıştır (Anonymous 2008b). Bu yasal düzenlemeler çerçevesinde ozon, içme sularının dezenfeksiyonunda uzun zamandır kullanılmaktadır. Günümüzde ise, ozonun gıda sektöründe kullanımına izin verilmesiyle birlikte (Anonymous 2001) etkinliğinin ve farklı uygulama alanlarının araştırılması hız kazanmıştır.

## 2.4.2 Mikrobiyel inaktivasyon için ozon kullanımı

Ozon, mikroorganizmaları, önemli hücresel bileşenlerini ileri derecede oksidasyona uğratarak inaktif hale getirir. Mikroorganizmaların hücre yüzeyleri, ozonlama işleminin öncelikli hedefi durumundadır. Hedef mikroorganizmanın ozonla etkisiz hale getirilmesinde iki temel mekanizma önerilmektedir. Birinci mekanizma protein, peptit ve enzimlerin aminoasit ve sülfidril gruplarının okside olması ve kısa peptitlerin oluşmasıdır. İkinci mekanizma ise, çoklu doymamış yağ asitlerinin, asit peroksitlerine okside olmasıdır. Ozon, hücre yüzeyindeki doymamış yağların etrafını sarar. Bu durum hücrelerin bozulması ve hücresel bileşiklerin hücre dışına sızması ile sonuçlanır. Geleneksel olarak kullanılan dezenfektan klor, seçici olarak hücre içi enzimlerine zarar verirken, ozon, herhangi bir seçicilik göstermeksizin hücre içi proteinlerini okside eder ve hızlı hücre ölümlerine neden olur. Hücre ölümleri ayrıca nükleik asitlerin gördüğü zarar nedeniyle de oluşabilir (Güzel-Seydim vd. 2004).

Ozonun çeşitli mikroorganizma türleri üzerine etkinliği birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir. Bu çalışmaların bir kısmı Ek 1’de özetlenmiştir.

Gerçekleştirilen bir çalışmada, depo atmosferine uygulanan ozon gazının, ticari ambalajlardan geçebilme gücüyle, yeşil ve mavi küflerdeki spor oluşumunun kontrolündeki etkinliği araştırılmıştır. Yeşil küf etmeni *P. digitatum* ve mavi küf etmeni *P. italicum* ile inoküle edilmiş portakallar çeşitli ticari ambalajlar ile paketlenmiş ve deponun farklı kısımlarına yerleştirilmiştir. Ambalajlamalar; oluklu karton kolilere meyvelerin doğrudan yerleştirilmesi, polietilen torbalara konulan meyvelerin karton kolilere yerleştirilmesi ve geri dönüşümlü plastik kutulara meyvelerin polietilen torbalı veya torbasız olarak yerleştirilmesi olmak üzere dört farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. İnoküle edilmiş meyvelerden, paketlerin belli kısımlarına belli miktarlarda konulmuş ve paketler deponun farklı kısımlarına yerleştirilmiştir. 0,72 ppm (v/v) ozon atmosferinde 13 gün tutulan paketlerde ozon seviyesi, ozon penetrasyonu ve küflerin spor oluşturmaları incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre; geri dönüşümlü plastik kutular gözenekli yapısı sayesinde karton kutulara göre, ozon geçirgenliği açısından daha olumludur. Plastik kutulardaki meyvelerden de torbasız konanlar, torbalı konanlara göre

daha çok ozona maruz kalmıştır. Denenen ambalaj uygulamalarından sadece geri dönüşümlü plastik kutulara torbasız olarak yerleştirme uygulaması, ozon penetrasyonu (%82) bakımından kabul edilebilir bulunmuştur. Sadece bu uygulama kullanılarak paketlenmiş meyvelerde küf sporlanması önlenmiştir. Ayrıca aynı paket içinde de ortadaki meyvelerin, üst taraftaki meyvelere göre ozona maruz kalmaları daha kısıtlıdır. Sonuçlar küf sporlanmasının kontrolünde ozonun etkinliği, ozonun penetrasyon özelliklerine, özellikle de meyveyle ozonun temas süresine bağlı olduğunu göstermiştir (Palou vd. 2005).

Beuchat vd. (1999) çalışmalarında *A. flavus* ve *A. parasiticus* küf türlerinin ozonla inaktivasyonunu incelemişlerdir. 25 °C'de 1,74 ppm ozona maruz bırakılan *A. flavus* sporlarının D değeri pH 5,5 ve 7,0'de sırasıyla 1,72 ve 1,54 dak olarak bulunmuştur. *A. parasiticus* sporları için ise D değerleri sırasıyla 2,08 ve 1,71 dak olarak bulunmuştur. D değerinin ortamdaki canlı sporların % 90'ının öldürülmesi için gereken işlem süresi olduğu düşünüldüğünde *A. parasiticus*'un *A. flavus*'tan daha dirençli olduğu ve her iki küf türünün de ozona karşı pH 5,5'te, pH 7'de olduğundan daha dirençli olduğu görülmüştür.

#### **2.4.3 Meyve ve sebzelerin fizyolojisi ve kalite özellikleri üzerine ozonun etkisi**

Ozon, yüksek oksidasyon kapasitesiyle bir yandan birçok mikroorganizmanın inaktivasyonunu sağlarken bir yandan da uygulandığı gıdanın kimyasal bileşiminde, fizyolojisinde ve kalite parametrelerinde değişikliklere neden olabilmektedir. Meyve ve sebzeler ozonla ve klorla muamele gibi kimyasal uygulamalar da dâhil olmak üzere dış etmenlerden kolaylıkla etkilenebilen hassas gıdalardandır. Depo atmosferine verilerek ya da yıkama suyuna ilave edilerek birçok meyve-sebze de uygulanan ozon bu ürünlerin çeşitli özelliklerine olumlu ya da olumsuz etkilerde bulunmuştur.

Ozon uygulamasının taze doğranmış marullarda solunum aktivitesini etkilemediği (Beltran vd. 2005), kerevizlerde ise azalttığı (Zhang vd. 2005) bildirilmiştir. Üç hafta süresince 0,3 ppm ozona maruz kalan şeftalilerin de solunumu ve etilen üretimi kontrol örneklerinden farklı bulunmamıştır (Palou vd. 2005). Depo ve konteynir atmosferinden

etilen gazının uzaklaştırılması tarımsal ürünlerin olgunlaşma prosesini yavaşlatarak zararlanmalarının gecikmesine ve raf ömürlerinin uzamasına neden olur. Skog ve Chu (2001) ozonun, soğuk depo atmosferindeki etilen seviyesini azalttığını ve böylece etilen üreten ve etilene duyarlı ürünlerin birlikte daha uzun süre taşınabileceğini veya depolanabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Kesintisiz ozon gazı uygulaması (0,3 ppm) 5 hafta boyunca 5 °C ve %90 bağıl nemde depolanan şeftalilerde su kaybını artırmıştır. Bu durum aynı şartlarda 4 hafta depolanan üzümde gözlenmemiştir (Palou vd. 2002). Nadas vd. (2003) 1,5 ppm ozon içeren 2 °C'deki atmosferde 3 gün depoladığı çilekleri daha sonra oda sıcaklığına taşımışlardır. Ozonlanan örneklerde soğuk depolama sonrası kontrol örneklerine göre daha az kütle kaybı görülmüş, ancak oda sıcaklığında depolama sonrası bu fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. Ozonun, meyvenin terlemesini sınırlandırarak su kaybını azalttığı düşünülmektedir. Ancak bu etki meyve oda sıcaklığına getirilince ortadan kalkmıştır. Daha sonra kütle kaybı artış göstermiştir (Nadas vd. 2003).

Ozonlu su (~ 10 ppm, 17 °C) içine 10 dakika daldırılan kerevizlerin toplam şeker içeriklerinde kontrol örneklerine göre herhangi bir farklılık saptanmamıştır (Zhang vd. 2005). Perez vd. (1999) çilekleri önce 0,35 ppm ozon atmosferinde 3 gün, daha sonra 20 °C'de normal atmosferde 4 gün depolamıştır. Tüm örneklerde önce sakaroz miktarı azalmış, glukoz ve fruktoz miktarı artmış, sonra hepsinin miktarı azalmıştır. Artma/azalma eğilimleri aynı olmasına rağmen ozonlanmış ve ozonlanmamış örnekler arasındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur. Araştırmacılara göre bu durum, ozon uygulamasıyla oluşmuş oksidatif stresin bir sonucu olarak sakaroz parçalanma iz-yollarının tetiklenmesinden kaynaklanmış olabilir (Perez vd. 1999).

Bitkilerde bulunan polifenol oksidaz enzimlerinin aktivitesiyle ortaya çıkan enzimatik esmerleşme reaksiyonları meyve ve sebzelerde renk değişimlerine neden olmaktadır. Zhang vd. (2005) ozon uygulamasının taze doğranmış kerevizlerde polifenol oksidaz aktivitesini inhibe ettiğini saptamıştır. Benzer şekilde Barth vd. (1995) 0,3 ppm'lik ozon atmosferinde depoladığı böğürtlenlerdeki peroksidaz aktivitesinin sürekli azaldığını ve depolama sonunda kontrol örneklerine göre çok düşük olduğunu saptamışlardır. Öte

yandan 0,1 ppm ozon uygulanan örneklerde kontrol örneklerine göre daha yüksek peroksidaz aktivitesi tespit edilmiştir.

Ozon atmosferinde depolanan şeftali, üzüm ve turunçgillerde herhangi bir fitotoksik yaralanma gözlenmemiştir (Palou vd. 2001, Palou vd. 2002). Benzer şekilde ozonlu suyla muamele edilen havuçların (Klaiber vd. 2004) ve kerevizlerin (Zhang vd. 2005) duyu kalitesinde herhangi bir olumsuzluk saptanmamıştır.

Meyvelerin duyu kalitesi üzerine ozonun en belirgin olumsuzluğu ürünün aroması üzerinedir. Soğukta ozon atmosferinde depolanan çileklerin aromasında geri dönüşümsüz kayıplar gözlenmiştir (Perez vd. 1999, Nadas vd. 2003). Ozon, çileklerin uçucu bileşik yayılımını %40 oranında azaltmıştır. Bu durum, aroma biyosentezinden sorumlu enzimler (lipoksijenaz, hidroperoksit liyaz ve alkol açıltransferaz) ile ilişkilendirilememiştir, çünkü ozonla muamele bu enzimlerin aktivitelerinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Nadas vd. (2003) aroma kaybının meyveden yayılan uçucu bileşiklerin ozonla oksidasyonu sonucu gerçekleşmiş olabileceğini belirtmektedir.

Yukarıda belirtilen çalışmalardan da anlaşılacağı gibi ozonlama işleminin gıdaların fizyolojisi ve kalite özellikleri üzerine etkisi oldukça büyük bir farklılık göstermektedir.

Bu farklılık:

- i) Gıdanın kimyasal bileşimine
- ii) Uygulanan ozon dozuna
- iii) Uygulama şekli ve süresine

bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle her ürüne ve her prosese spesifik olarak, maksimum inaktivasyon etkinliği sağlayacak, bunu yaparken de ürünün kalite özelliklerini bozmayacak ozonlama işlemlerinin optimizasyon çalışmalarına gerek duyulmaktadır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

Farklı yıkama uygulamalarının farklı sebzelerde mikrobiyel inaktivasyon ve bazı kalite kriterleri üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla materyal olarak marul, ıspanak ve maydanoz örnekleri kullanılmıştır. Depolama ve doğrudan ozon gazı uygulamalarında ise kullanılan materyal maydanozdur.

Marul, ıspanak ve maydanoz örnekleri Ankara'daki bir marketten günlük olarak temin edilmiştir. Laboratuvara getirilen ve çeşme suyuyla yıkanan örneklerin fazla suyu santrifüj esaslı bir sebze kurutucuda (Üçsan Plastik, İstanbul) uzaklaştırılmıştır. Homojen bir örnek kitlesi sağlamak amacıyla; maydanozların sap kısımları yapraklarından ayrılıp atılmış, marul ve ıspanaklarda ise bariz yapısal farklılık gösteren orta damar kısmı bir bıçak yardımıyla kesilip ayrılmış ve sadece yeşil kısımlar analiz için kullanılmıştır.

Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan mikroorganizma kültürleri (*E. coli* Tip 1 [NRLL B-3008] ve *L. innocua* [NRLL B-33314]) Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarlarının kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Kullanılan besiyerleri ve diğer malzemeler (MRD, TSB, PALCAM, PALCAM Supplement, VRBA Fluorocult ve organik çözücüler) Merck markadır. Çalışmada kullanılan yüksek saflıktaki su, TKA marka bir su arıtma cihazından (TKA Water Purification Systems GmbH, Niederelbert, Almanya) alınmıştır. Mikrobiyolojik analizlerde kullanılacak tüm malzemeler (distile su, cam malzemeler, pensler, kurutma kağıtları, vb.) 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak (Hirayama, HA-300M, Saitama, Japonya) steril edilmiştir.

#### 3.2 Yöntem

Bu tezde gerçekleştirilen deneysel çalışmalar, mikrobiyolojik ve kimyasal denemeler olmak üzere 2 koldan yürütülmüştür. Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan bitki

materyali, çeşitli yıkama işlemleri ve ozon gazıyla muamele öncesi inokülasyon ve dezenfeksiyon işlemlerine tabi tutulmuştur. Mikrobiyolojik deneyler boyunca aseptik koşullarda çalışılmıştır.

### **3.2.1 Mikrobiyolojik analizler**

#### **3.2.1.1 İnokülasyon sıvısının hazırlanması**

Gliserol çözeltisi içerisinde (gliserol:TSB, 20:80, v/v) ve -18 °C'de saklanan *E. coli* ve *L. innocua* kültürlerinden 50 µL alınıp, test tüpü içerisindeki 10 mL TSB'ye aşılanmış ve 37 °C'de 24 saat etüvde (Nüve, EN 400, Ankara) inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda bu besiyerinden de 20 µL alınıp 10 mL'lik taze TSB'ye yeniden aşılanmış ve 37 °C'de 24 saat tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Bu ikinci inkübasyondan sonra elde edilen sıvı besiyerinin tümü 1 L steril tuz-pepton ortamına (MRD) ilave edilmiş ve bu ortam inokülasyon sıvısı olarak kullanılmıştır. Daha sonra gerçekleştirilen ekimler, bu yöntemle elde edilen inokülasyon sıvılarının  $6,4 \times 10^7$  kob/mL düzeyinde *E. coli* veya  $5,6 \times 10^7$  kob/mL düzeyinde *L. innocua* içerdiğini göstermiştir.

#### **3.2.1.2 Sebze örneklerinin mikrobiyolojik analize hazırlanmaları**

Marul ve ıspanak yaprakları paslanmaz çelik bir bıçak yardımıyla yaklaşık 2cm x 2cm boyutlarında doğranmıştır. Doğranmış bu örnekler ve maydanoz yaprakları lastik bantlarla gevşekçe bağlanıp 10'ar g'lık porsiyonlar haline getirilmiştir. Hazırlanan örnekler steril bir beher içerisindeki 1/10 oranında seyreltilmiş sodyum hipoklorit çözeltisine (Sigma-Aldrich, %10-13 etkin klor, Steinheim, Almanya) 15 dakika daldırılarak dezenfekte edilmiştir. Sodyum hipoklorit çözeltisinin bu oranda seyreltilmesi ile 350 ppm düzeyinde serbest klor miktarına ulaşılmış ve bu miktarın ölçümü, örnekten gerekli seyreltmeler yapılarak, klor test kitleriyle (Macherey-Nagel, Quantofix, 1-100 mg/L, Duren, Almanya) gerçekleştirilmiştir. Steril bir pens ile dezenfeksiyon sıvısından çıkarılan dezenfeksiyonları tamamlanmış sebze örnekleri steril bir başka beher içerisindeki steril suda birkaç saniye çalkalanarak durulanmış ve steril kurutma kağıtları üzerinde 30 dakika kurumaya bırakılmıştır. Dezenfeksiyon öncesi ve

sonrası her bir sebze için saptanan mikroorganizma yoğunluğu Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Dezenfeksiyon öncesi ve sonrası her bir sebze için saptanan mikroorganizma yoğunlukları

	<i>E. coli</i> (kob/g sebze)		<i>Listeria</i> spp. (kob/g sebze)	
	Dezenfeksiyon öncesi	Dezenfeksiyon sonrası	Dezenfeksiyon öncesi	Dezenfeksiyon sonrası
Maydanoz	<100	<100	<100	<100
Marul	<100	<100	<100	<100
Ispanak	<100	<100	1,1×10 <sup>3</sup>	<100

Görüldüğü gibi mikrobiyolojik analizlerde kullanılan hammaddelerde *E. coli* ve *L. innocua* yoğunlukları; uygulanan inokülasyon sıvısındaki mikroorganizma yoğunlukları (sırasıyla 6,4x10<sup>7</sup> kob/mL ve 5,6×10<sup>7</sup> kob/mL) düşünüldüğünde ihmal edilebilecek düzeydedir.

### 3.2.1.3 İnokülasyon ve ekim yöntemleri

Dezenfeksiyon ve kurutma işlemleri tamamlanmış sebze örnekleri, yukarıda hazırlanışı anlatılan ve manyetik bir balıkla sürekli karıştırılan inokülasyon sıvısına atılmış ve tamamı bu sıvı içerisinde kalacak şekilde 10 dakika boyunca bekletilmiştir. Süre sonunda steril bir pens yardımıyla çıkarılan örnekler yine steril kurutma kağıtları üzerinde oda sıcaklığında 6 saat kurumaya bırakılmıştır. Bu süre mikroorganizmaların sebze yüzeyine doğal kontaminasyon şartlarındaki gibi kuvvetlice yapışabilmesi için gereklidir (Ölmez 2010). Böylece sebzelerin inokülasyon işlemi tamamlanmıştır. Herhangi bir işleme tabi tutulmayacak örnekler doğrudan mikrobiyolojik ekime alınırken diğer örnekler ya steril beherlerde farklı yıkama işlemleriyle (saf su, klorlu su veya ozonlu su ile) ya da gazlama düzeneğinde ozon gazıyla muamele edilmiştir.

Örneklerin mikrobiyolojik analizleri aseptik koşullarda, Halkman (2005) tarafından belirtilen yöntemler esas alınarak gerçekleştirilmiştir. *E. coli* analizi Fluorocult® VRB

agarda ve *L. innocua* analizi PALCAM agarda yayma ekim metodu kullanılarak yapılmıştır. Ekimler sonrası Fluorocult® VRB agar 37 °C’de 18 saat ve PALCAM agar 37 °C’de 36 saat inkübasyona bırakılmıştır.

### **3.2.1.4 Yıkama ve depolama yöntemleri**

Klor bazlı ticari bir ürünün (Ecolab, Ecolab Temizleme Sistemleri A.Ş., Türk Henkel, Kocaeli) steril distile su içerisinde, 2 g/L oranında çözdürülmesiyle yıkama uygulamalarında kullanılacak klor çözeltisi elde edilmiştir. Söz konusu ticari dezenfektanın bu oranda kullanımıyla suda 100 ppm düzeyinde serbest klor miktarına ulaşılmış ve bu miktarın ölçümü klor test kitleriyle gerçekleştirilmiştir. Sebzelerin ozonlu suyla muamelesinde ise literatürde en etkin ozonlama metodu olduğu bildirilen doğrudan gazlama (bubbling) yöntemi kullanılmıştır (Kim vd. 1999; Achen ve Yousef 2001). Ozon gazı, 30 g/saat kapasiteli bir ozon jeneratöründen (OPAL, OG20, Ankara) elde edilmiştir. Ortam havasını kullanan jeneratör, içerisindeki mekanizmayla havadaki oksijeni konsantre etmekte ve ozon üretiminde bu konsantre oksijen gazını besleme olarak kullanmaktadır. Ozon gazının bir debi ölçer (Rite flow flowmeter 150 mm, Size 2, Bel-Art Products, Pequannock, NJ, ABD) kullanılarak belirli bir hızda (827 mL/dak) ozonlama ortamına verilmesi sağlanmıştır. Ozon gazı, silikon bir hortum ile 1 L ultra saf su (5±1°C) içeren cam beher içine daldırılmıştır. Hortumun ucundaki paslanmaz çelik bir filtreyle (Fisher Scientific, Solvent Inlet Filter, 10 µm gözenek çaplı) gaz kabarcıklarının mümkün olduğunca küçük baloncuklar haline getirilmesi ve suda etkin bir şekilde çözünmesi sağlanmıştır.

Yıkamalar 15’er dakikalık sürelerde uygulanmış ve işlemler boyunca sürekli çalışan manyetik karıştırıcı ile etkin bir karıştırma sağlanmıştır.

Yıkama işlemleri tamamlanan örnekler steril bir pens yardımıyla yıkama çözeltilerinden çıkarmış, fazla sularının giderilmesi amacıyla 30 dakika steril kurutma kâğıtları üzerine bırakılmıştır. Farklı yıkama uygulamalarının farklı sebzelerde mikrobiyel inaktivasyon etkinliğini görmek için marul, ıspanak ve maydanoz örneklerinde yıkama uygulamalarından hemen sonra mikrobiyolojik ekimler gerçekleştirilmiştir.

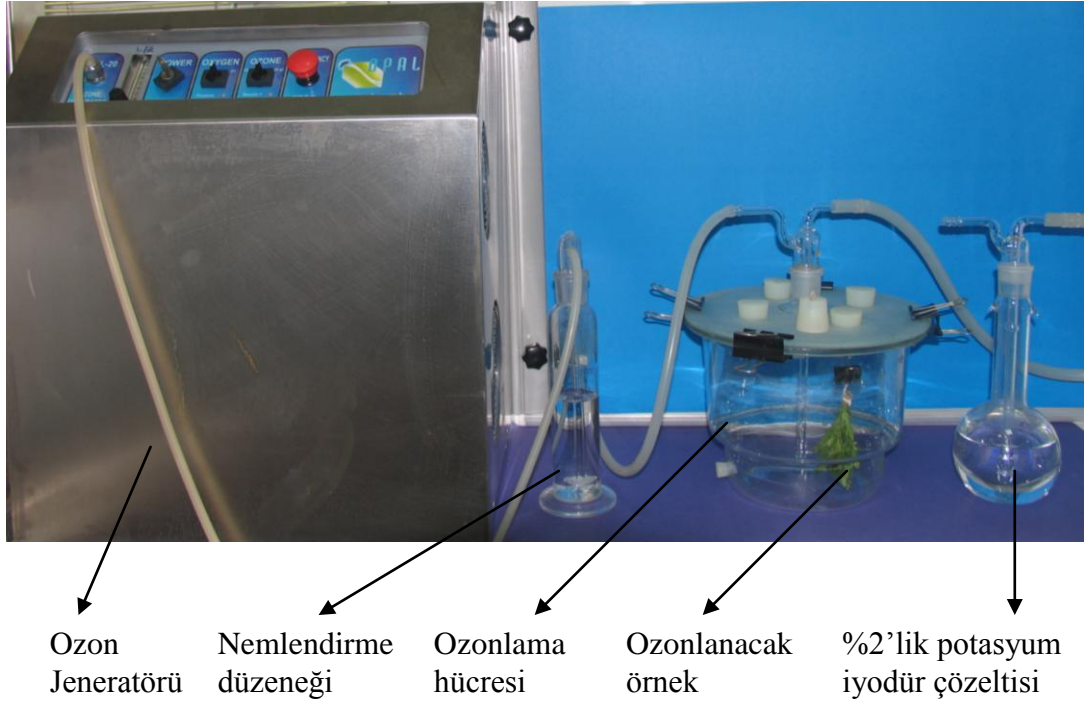
Farklı yıkama uygulamalarıyla muamele edilen üründe depolama süresince mikrobiyel gelişim ve kalite parametrelerinin değişimini izlemek amacıyla, saf su, klorlu su ve ozonlu suyla yıkanmış maydanoz örnekleri kullanılarak depolama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yıkanıp sularından arındırılmış örnekler steril stomacher poşetlerine (dışı alüminyum folyoyla kaplı) alınmış ve bu poşetlerin ağızları bir ısıl kapatma makinesiyle (Audionvac, VMS 153, Weesp, Hollanda) kapatılmıştır. Daha sonra  $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanmış soğutmalı inkübatörlere (Velp Scientifica, FTC-90I, İtalya) yerleştirilen maydanozlardan 5'er gün aralıklarla örnek alınıp çeşitli analizler gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.1.5 Gaz ozon uygulaması**

Gaz ozon uygulaması tarafımızdan özel olarak yaptırılan, 4,5 L hacimli silindirik bir cam düzenekte (hücrede) gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Hücrenin cam kapağı gaz sızıntısını önlemek amacıyla hücreye 4 tarafından kısıkaçlarla tutturulmuştur. Bölüm 3.2.1.4'te detayları anlatılan ozon jeneratöründen gelen ozon gazı, öncelikle içi saf su dolu bir gaz yıkama şişesinden geçirilerek belirli oranda nemlendirilmiş, daha sonra silikon bir hortum ile hücre kapağında bulunan delikten hücre içine verilmiştir. Kapaktaki diğer delikten gelen çıkış hattı bir başka gaz yıkama şişesi içerisindeki %2'lik potasyum iyodür çözeltisine daldırılmış ve ozonun fazlası bu yolla nötralize edilmiştir.

Hücre kapağının üzerinde gerektiğinde örnek alınmasını sağlayacak 4 delik bulunmaktadır ve bu delikler ozona dayanıklı silikon tıplarla (Cole Parmer, No: 8, Niles, IL, ABD) kapatılmıştır. Hücre içerisindeki ozon konsantrasyonu, gazın ilk verilışinden yaklaşık 2 saat sonra, stabil bir düzeye ulaşıncaya, ozon uygulanacak maydanoz örnekleri hücre içine yerleştirilmiştir. Bu işlem, alt yüzeyindeki bir kanca vasıtasıyla ozonlanacak örneği tutan bir silikon tıpanın, hücre kapağındaki bir başka tıpıyla değiştirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Ozonlama öncesi inokülasyon sıvısına daldırılmış (mikrobiyolojik analizlerde kullanılacak) veya daldırılmamış (kimyasal analizlerde kullanılacak) maydanozlar, belirtilen sistemde, oda sıcaklığında 20 dakika

ozon gazı ile muamele edilmiştir. Portatif bir termo-higrograf (Springfield Precision Instruments, Springfield Precise Temp., Wood Ridge, NJ, ABD) ile gerçekleştirilen ölçümlerle, ozonlama işlemi boyunca hücre içerisindeki sıcaklığın  $21,0 \pm 2,1$  °C ve bağıl nemin  $80 \pm 5$  olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.1 Gaz ozon uygulamasının gerçekleştirildiği düzenek

### 3.2.2 Kimyasal analizler

Yukarıda da değinildiği gibi bu tezdeki deneysel çalışmalar, mikrobiyolojik ve kimyasal denemeleri kapsamaktadır. Bölüm 3.2.1'de detaylıca anlatılan sebze örneklerinin analize hazırlanmaları (dezenfeksiyon ve inokülasyon basamakları hariç), yıkama ve depolama uygulamaları ile ozon gazıyla muamele yöntemleri kimyasal analizlerin gerçekleştirileceği örneklere de -aseptik koşullar dışında- tamamen aynı şekilde uygulanmıştır.

### 3.2.2.1 Klorofil a ve klorofil b tayini

Teng ve Chen (1999) tarafından ıspanaklarda uygulanan yöntem, küçük bir modifikasyonla, tarafımızdan marul, ıspanak ve maydanozlarda kullanılmıştır. Farklı uygulamalara maruz bırakılmış sebze örneklerinden 10 g kadar alınıp küçük boy bir laboratuvar parçalayıcısında (Waring Blender) iyice parçalanmıştır. Daha sonra bu kitleden  $\pm 0,001$  g duyarlılıkla 1 g örnek hassas terazide plastik bir behere tartılmış ve üzerine 100 mL %99,8'lik metanol ilave edilmiştir. Beherin etrafına buz sarılmış ve beherin içerisindeki karışım bir ezme makinesinde (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Silent Crusher M, Schwabach, Almanya) homojenize edildikten sonra kaba filtre kağıdından bir santrifüj tüpüne süzümüştür. Bu süzümü 9500 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüj (Sigma, Model 2-16, Osterode, Almanya) edilmiştir. İşlem sonunda üst kısım 0,45  $\mu\text{m}$  gözenek çaplı teflon bir mikrofiltreden (Millipore Millex-LCR, Hydrophilic, PTFE, Bedford, MA, ABD) vida kapaklı, amber renkli şişelere süzümüştür. Bu süzümü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazında analiz edilmiştir. HPLC koşulları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

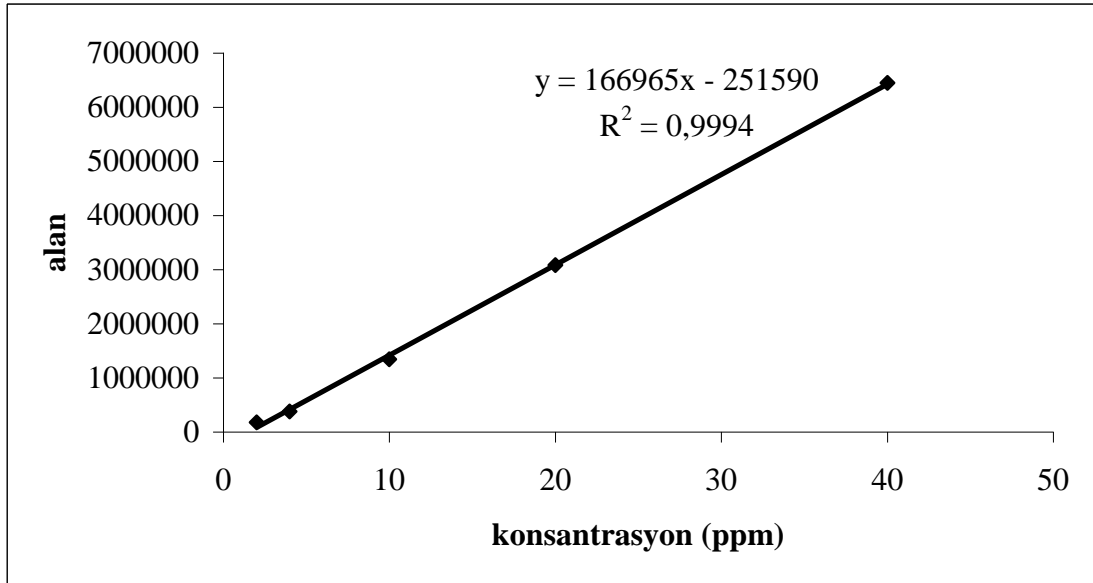
#### 3.2.2.1.1 Klorofil a ve klorofil b standart eğrilerinin çizimi

Klorofil a ve b standart maddelerden (Sigma C-5753 ve Sigma C-5878) stok çözeltiler (klorofil a için 1 mg/25 mL [40 ppm] ve klorofil b için 1 mg/50 mL [20 ppm]'lik) metanol içerisinde hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden klorofil a için 2, 4, 10 ve 20 ppm'lik ve klorofil b için 0,5, 1, 2, 5 ve 10 ppm'lik standart çözeltiler yine metanol içerisinde hazırlanmış ve HPLC cihazında okumaları gerçekleştirilerek kalibrasyon eğrileri çizdirilmiştir. Söz konusu eğriler, Şekil 3.2 ve 3.3'te gösterilmiştir.

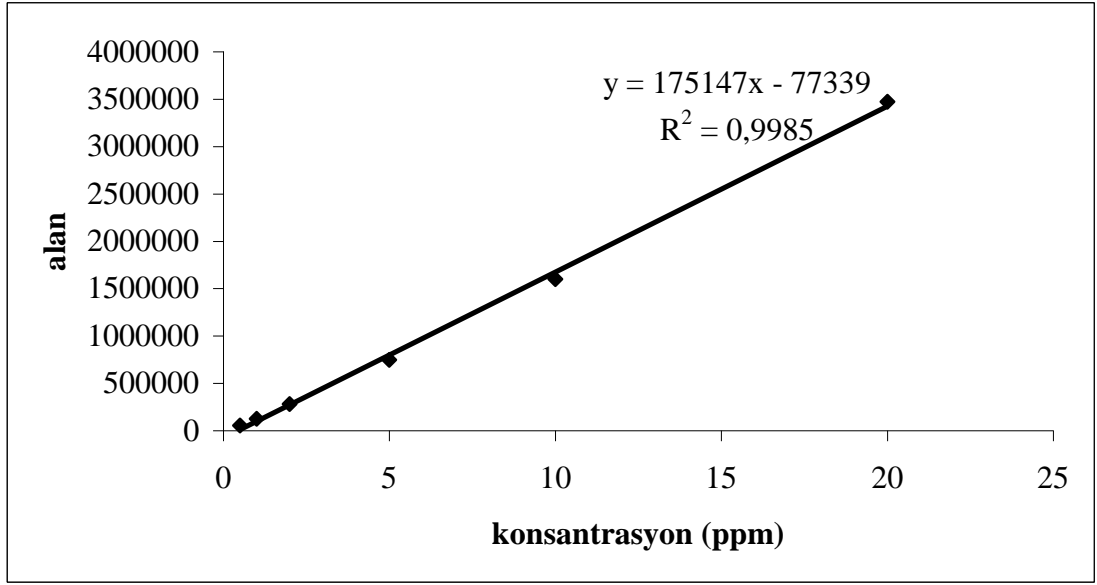
Klorofil standart eğrilerinin çizilmesiyle örneklerdeki klorofil miktarlarının kantitatif hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. Yukarıda anlatılan yöntemle göre ekstrakte edilip HPLC'de okuması gerçekleştirilen bir ıspanak örneği için yapılan hesaplama aşağıda örnek olarak verilmiştir.

Çizelge 3.2 Klorofil a ve klorofil b analizi için HPLC cihazında kullanılan kromatografi koşulları

Sistem	Shimadzu (Prominence Serisi)
Pompa	LC-20AD
Kolon Fırını (sıcaklığı)	CTO-10AS VP (25 °C)
Detektör	Diyot array detektör (SPD M20A)
Mobil faz	Asetonitril:metanol:kloroform:n-hekzan (75:10:7,5:7,5; v/v/v/v), isokratik akış
Kolon	Phenomenex (Luna 5µ, C18, 100A, 250 x 4,6mm, Torrance, CA, ABD)
Elusyon süresi	70 dakika
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Akış hızı	1mL/dakika



Şekil 3.2 Klorofil a standart eğrisi



Şekil 3.3 Klorofil b standart eğrisi

HPLC cihazında elde edilen klorofil a pikinin alanı 1185082 bulunmuştur. Bu değer, kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklemde yerine konduğunda:

$$y = 166965x - 251590$$

$$1185082 = 166965x - 251590$$

$$x = 8,6046 \text{ olarak bulunmuştur}$$

Bu değer, 100 mL ekstraktın klorofil a konsantrasyonudur. Öyleyse 100 mL'deki klorofil a miktarı:

$$8,6046/10 = 0,8646 \text{ mg'dır.}$$

Bu, aynı zamanda 1 g ıspanaktaki klorofil a miktarıdır. Öyleyse 1 kg ıspanaktaki klorofil a miktarı:

$$8,6046 \times 1000 = 860,46 \text{ mg'dır.}$$

Taze ıspanakta (kuru madde oranı, KM: %7,68) saptanan bu değer, KM üzerinden hesaplandığında

$$\text{klorofil } a = \frac{100 \times 860,46}{7,68} = 11203 \text{ mg / kg KM}$$

sonucuna ulaşılır.

### **3.2.2.2 Askorbik asit tayini**

Reyes vd. (2007) tarafından önerilen yöntem, sınırlı bir modifikasyonla, yaprak sebzelerde askorbik asit düzeyini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Plastik bir behere blenderda iyice parçalanmış yaklaşık 10 g örnekten  $\pm 0,001$  g duyarlılıkla 4 g örnek tartılmış ve üzerine %3'lük sitrik asit çözeltisinden 24 mL ilave edilmiştir. Bu karışım, ezme makinesinde, beherin etrafına buz sarılarak homojenize edilmiş ve kaba filtre kağıdından bir santrifüj tüpüne süzümüştür. Süzüntü 10000 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst kısım, işlem öncesinde önce 3 mL metanol ve bunu takiben 3 mL su ile şartlandırılıp boş bir şırınga ile birkaç kez hava geçirilip kurutulmuş bir katı faz ekstraksiyon kartuşundan (Phenomenex, Strata C18-E, 55 $\mu$ m, 70A, 100 mg, Torrance, CA, ABD) geçirilerek temizlenmiş ve Çizelge 3.3'te verilen koşullarda HPLC cihazında analiz edilmiştir.

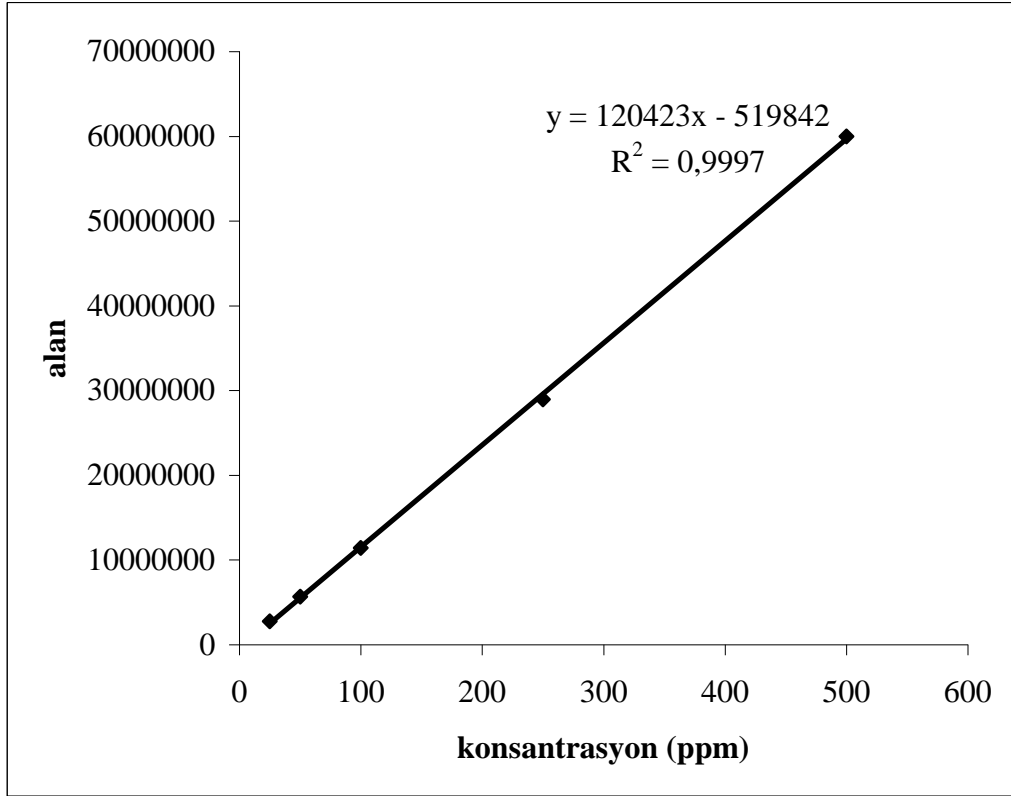
#### **3.2.2.2.1 Askorbik asit standart eğrisinin çizimi**

L-askorbik asit standardının (Aldrich A9,290-2) %3'lük sitrik asit çözeltisi içerisinde çözdürülmesiyle askorbik asit stok çözeltisi (500 ppm'lik) elde edilmiştir. Bu stok çözeltiden de 250, 100, 50 ve 25 ppm'lik standart çözeltiler yine %3'lük sitrik asit çözeltisi içerisinde hazırlanmış ve HPLC cihazında okumaları gerçekleştirilerek askorbik asit standart eğrisi çizilmiştir. Söz konusu eğri Şekil 3.4'te verilmiştir.

Askorbik asit standart eğrisinin çizilmesiyle örneklerdeki askorbik asit miktarlarının kantitatif hesaplamaları gerçekleştirilmiştir. Yukarıda anlatılan yöntemle göre ekstakte edilip HPLC'de okuması gerçekleştirilen bir maydanoz örneği için yapılan hesaplama aşağıda örnek olarak verilmiştir.

Çizelge 3.3 Askorbik asit analizi için HPLC cihazında kullanılan kromatografi koşulları

Sistem	Shimadzu (Prominence Serisi)
Pompa	LC-20AD
Kolon Fırını (sıcaklığı)	CTO-10AS VP (25 °C)
Detektör	Diyot array detektör (SPD M20A)
Mobil faz	%2'lik potasyum dihidrojen fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) çözeltisi [o-fosforik asit ile pH'sı 2,4'e ayarlanmış], isokratik akış
Kolon	Phenomenex (Jupiter 5µm, C18, 300A, 250 x 4,6mm, Torrance, CA, ABD)
Elüsyon süresi	35 dakika
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Akış hızı	0,5 mL/dakika



Şekil 3.4 Askorbik asit standart eğrisi

HPLC cihazında elde edilen askorbik asit pikinin alanı 21039438 bulunmuştur. Bu değer, kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklemde yerine konulduğunda:

$$y = 120423x - 519842$$

$$21039438 = 120423x - 519842$$

$$x = 179,03 \text{ olarak bulunmuştur.}$$

Bu değer, 28 mL ekstraktın askorbik asit konsantrasyonudur. Öyleyse 28 mL'deki askorbik asit miktarı:

$$179,03 \times 28 / 1000 = 5,01 \text{ mg'dır.}$$

Bu, aynı zamanda 4 g maydanozdaki askorbik asit miktarıdır. Öyleyse 1 kg maydanozdaki askorbik asit miktarı:

$$(5,01 \times 1000) / 4 = 1253 \text{ mg'dır.}$$

Taze maydanozda (KM oranı %12,5) saptanan bu değer, KM üzerinden hesaplandığında

$$\text{Askorbik asit} = \frac{100 \times 1253}{12,5} = 10024 \text{ mg / kg KM}$$

sonucuna ulaşılır.

### **3.2.2.3 Toplam fenolik madde tayin yöntemi**

Sebzelerdeki toplam fenolik madde içeriğinin tespiti için Singleton ve Rossi (1965) tarafından önerilen metot tarafımızdan modifiye edilip kullanılmıştır. Blenderda parçalanmış yaklaşık 10 g örneğin 1,5 gramı doğrudan bir santrifüj tüpüne tartılmış ve üzerine 25 mL metanol:su karışımı (80:20, v/v) eklendikten sonra ezme makinesinde, santrifüj tüpünün etrafına buz sarılarak homojenize edilmiştir. Örnek, 220 devir/dakika hızda orbital karıştırıcıda (Biosan, OS-10, Riga, Litvanya) 1 saat süreyle ekstraksiyona

bırakılmış ve daha sonra 11000 devir/dakika hızda 10 dakika süreyle santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan ekstrakt 0,45 µm gözenek çaplı teflon filtreden vida kapaklı amber renkli şişelere süzölmüştür. Bu süzöntüden alınan 20 µL, 1580 µL distile su ve 100 µL Folin-Ciocalteu ayracı bir deney tüpüne konulup vorteks karıştırıcıda (Heidolph D-91126) karıştırıldıktan sonra 3 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra tüpe 300 µL sodyum karbonat çözeltisi (%20'lik w/v) ilave edilip tekrar karıştırılmış ve karanlıkta 2 saat daha bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerin spektrofotometrede (Shimadzu, UV-1601, Kyoto, Japonya) 765 nm'de verdiği absorbans değerleri kaydedilmiştir.

### **3.2.2.3.1 Toplam fenolik madde miktarının hesaplanması**

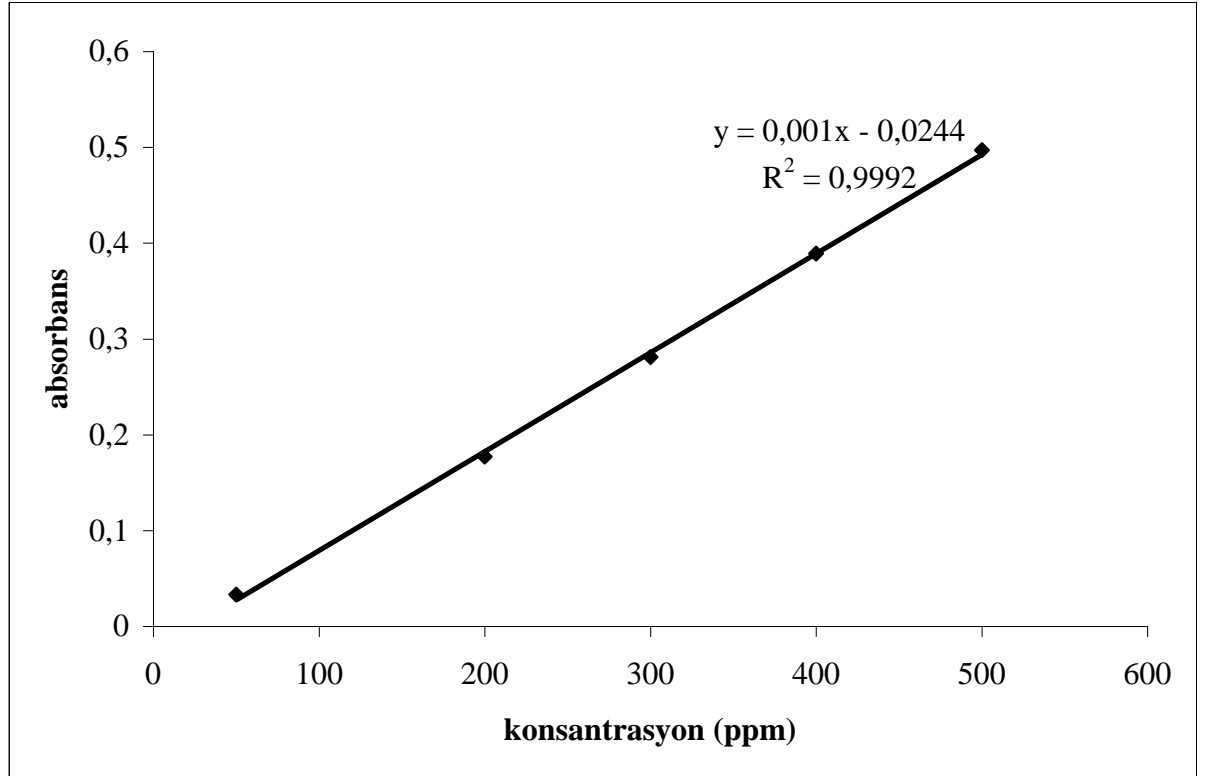
Spektrofotometrede okunan örnek absorbansı, gallik asit standart eğrisi yardımıyla değerlendirilmiştir. Bu amaçla, gallik asit standardı (Sigma G-7384) mutlak etanol içerisinde çözöndürölerek, 500 mg/L konsantrasyonunda stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden de 50, 100, 200, 300 ve 400 mg/L konsantrasyonunda standart çözeltiler hazırlanmıştır. Standart çözeltilere sebze örneklerine uygulanan işlemler uygulanmış ve 765 nm dalga boyunda absorbansları saptanmıştır. Bu absorbans değerleri konsantrasyona karşı grafiğe aktarılınca gallik asit standart eğrisi elde edilmiş ve bu standart eğri Şekil 3.5'te gösterilmiştir.

Örneklerdeki toplam fenolik madde miktarı bu eğriden elde edilmiş ve mg gallik asit eşdeğeri (gae)/kg KM olarak verilmiştir.

### **3.2.2.4 Antioksidan aktivite tayin yöntemi**

Yapraklı sebzelerde antioksidan aktivite tayini için gıdalarda yaygın olarak uygulanan DPPH yöntemi (Brand-Williams vd. 1995) küçük bir modifikasyonla kullanılmıştır. DPPH'ten (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Aldrich D-211400) 0,0025 g tartılıp 100 mL metanol içerisinde çözöndürölmüştür. Denemeler boyunca kullanılan bu çözeltinin 515 nm'deki absorbansı yaklaşık 0,800' dür ve bu değer 0,750'nin altına düşünce çözelti yeniden hazırlanmıştır.

Toplam fenolik madde analizi için hazırlanan, metanol:su karışımı (80:20, v/v) içerisindeki, santrifüjlenmiş ve süzölmüş sebze ekstraktından 60 µL alınıp 1940 µL DPPH çözeltilisiyle karıştırılmış ve 1 saat karanlıkta bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerin spektrofotometrede 515 nm’de verdiği absorbans değerleri kaydedilmiştir. Cihazın sıfırlanmasında saf metanol, kör olarak ise metanol:su karışımı (80:20, v/v) kullanılmıştır.

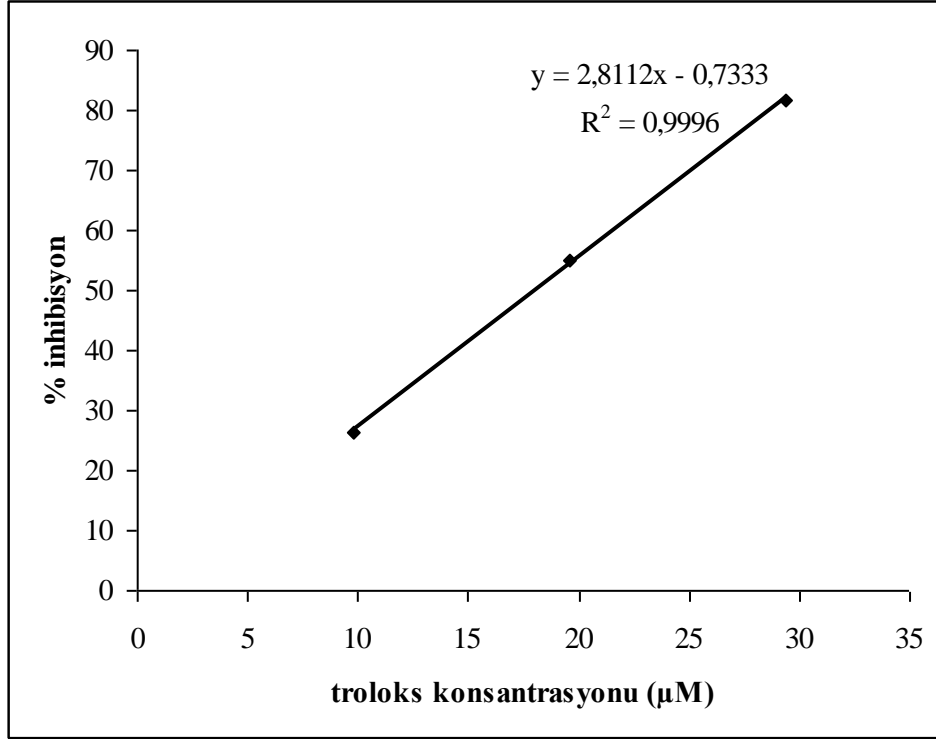


Şekil 3.5 Gallik asit standart eğrisi

#### 3.2.2.4.1 Antioksidan aktivite değerinin hesaplanması

Örnekte yapılmış okuma, standart eğri yardımıyla değerlendirilmiştir. Bu amaçla, 63 mg troluks (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid, Aldrich 23,881-3) 100 mL metanol içerisinde çözüldürülerek, 2,5 mM’lik troluks stok çözeltilisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiliden metanolla hazırlanan 0,5, 1,0, 1,5 ve 2,0 mM’lik çalışma standartlarından 20’şer µL alınıp içerisinde 1 mL DPPH çözeltilisi bulunan

tüplere ilave edilmiş ve tüp içeriği karıştırılmıştır. Bu çözeltiler 1 saat karanlıkta bekletilip 515 nm dalga boyunda verdiği absorbanslar ölçülmüştür. Bu absorbans değerleri konsantrasyona karşı grafiğe aktarılıp troloks standart eğrisi elde edilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Troloks standart eğrisi

Örneklerin antioksidan aktivite değerleri bu eğriden elde edilmiş ve µmoL troloks eşdeğeri/g KM olarak verilmiştir.

### 3.2.2.5 Kuru madde tayini

Depolama boyunca örneklerin su kaybetmesinden kaynaklanabilecek hataların önüne geçebilmek için klorofil, askorbik asit, toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite değerleri sebzelerin KM miktarları üzerinden verilmiştir. KM içerikleri sebzelerin sabit ağırlığa gelinceye kadar (yaklaşık 24 saat) 105±5 °C'ye ayarlanmış etüvde (Nüve, FN 120, Ankara) tutulmasıyla belirlenmiştir (Gornicki ve Kaleta 2007).

### 3.2.2.6 Sudaki ve havadaki ozon konsantrasyonunun ölçülmesi

Ozonu suda etkin bir şekilde çözebilmek için jeneratörünün gaz çıkışından gelen silikon hortumun ucuna paslanmaz çelik bir filtre (Solvent Inlet Filter, Fisher Scientific, 10 µm gözenek çaplı) takılmış ve hortum, 5±1°C'de 1 L ultra saf su içeren beher içine doğrudan daldırılmıştır. Su kitlesi 15 dakika ozonlanmış ve ozonlama işlemi boyunca sürekli çalışan manyetik karıştırıcı ile etkin bir karıştırma sağlanmıştır. Ozonlanmış sudan işlem sonunda örnekler alınıp spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. Ozonlama işlemi 3 kez gerçekleştirilmiş ve aşağıda belirtildiği şekilde yapılan hesaplamalara göre sudaki ozon konsantrasyonu ortalama 12,0±0,5 ppm olarak bulunmuştur.

Suda çözünen ozon miktarının tespitinde, ozonun indigo trisülfonat kimyasalının rengini açması prensibine dayanan İndigo Kolorimetrik Metot (Anonymous 1992) kullanılmıştır. Bunun için öncelikle İndigo stok çözeltisi, bu çözeltilerden de boya çözeltisi (İndigo II çözeltisi) hazırlanmıştır. 100 mL'lik bir ölçü balonuna 10 mL boya çözeltisi ve 10 mL ozonlanmış su örneğinden konulmuş ve balon çizgisine kadar saf suyla tamamlanmıştır. Şahit numunede sadece boya çözeltisi ve saf su vardır. Daha sonra spektrofotometrede 600 nm'de absorbans ölçülmüş ve aşağıda belirtilen denkleme göre örnekteki ozon konsantrasyonu hesaplanmıştır.

$$O_3 \text{ konsantrasyonu (mg / L)} = \frac{100X(Abs_1 - Abs_2)}{f \times b \times V}$$

Burada;

Abs<sub>1</sub>: Şahidin verdiği absorbans

Abs<sub>2</sub>: Örneğin verdiği absorbans

f: 0,42 L/mg.cm [sulu ozon için 258 nm'deki absorpsiyon katsayısı (ε=2950/M.cm)'na karşılık gelen faktör]

b: Işığın spektrofotometrede çözelti içerisinde izlediği yol (1 cm)

V: Örnek hacmi (mL)'dir.

Havadaki ozon konsantrasyonunun ölçümünde ise Şekil 3.7’de bir gaz örnekleme pompası (Gastec Corporation, Model GV-100S, Kanagawa, Japan) ve içerisinde ozonla reaksiyon verebilen indigo trisülfonat kimyasalı bulunan ozon gazı ölçüm tüpü (Sensidyne, No. 182SA, 50-1000 ppm ölçüm aralıklı, Clearwater, FL, ABD) kullanılmıştır. Gerçekleştirilen 3 ölçüm sonucunda maydanozların ozon gazıyla muamele edildiği cam hücre içerisindeki ozon konsantrasyonunun ortalama  $950\pm 12$  ppm olduğu tespit edilmiştir.



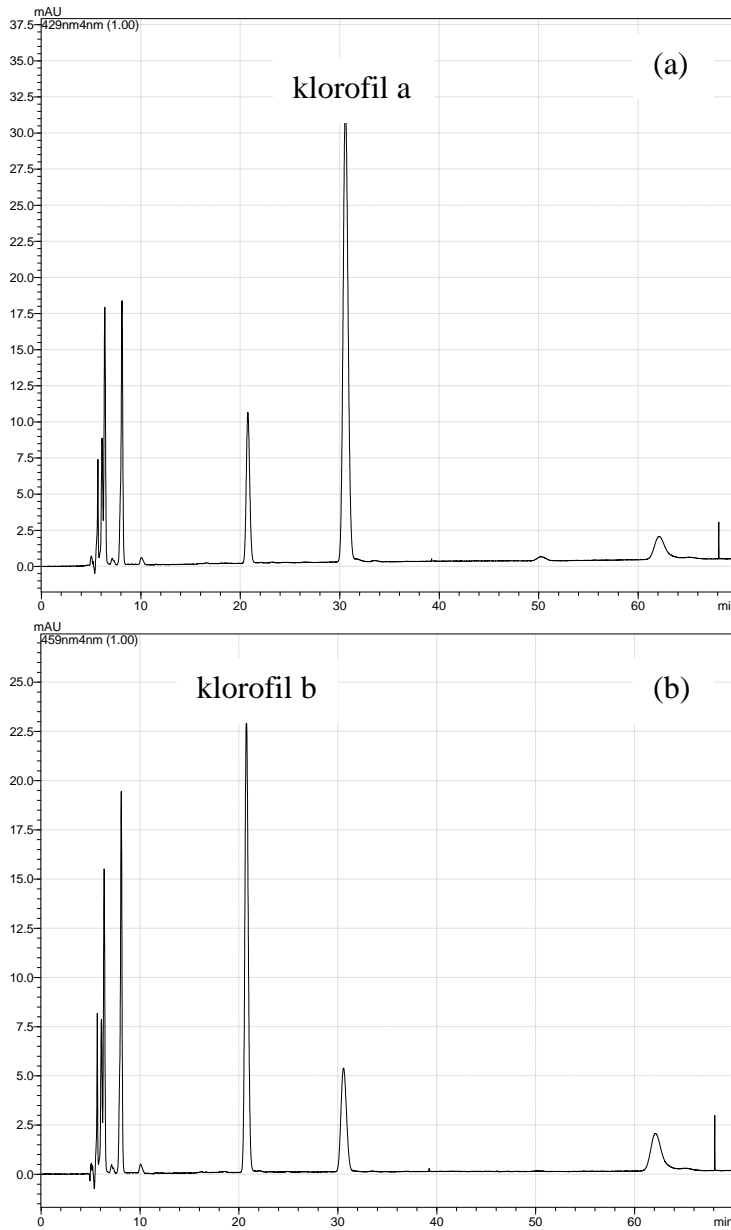
Şekil 3.7 Havadaki ozon gazı konsantrasyonunun ölçümünde kullanılan ekipman

### 3.2.3 İstatistik analizler

Elde edilen veriler faktöriyel düzende varyans analizi (ANOVA) tekniği ile değerlendirilmiştir. Ortalamalar arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. İstatistiksel değerlendirmelerde MINITAB 13.0 ve MSTAT-C paket programlarından yararlanılmıştır.

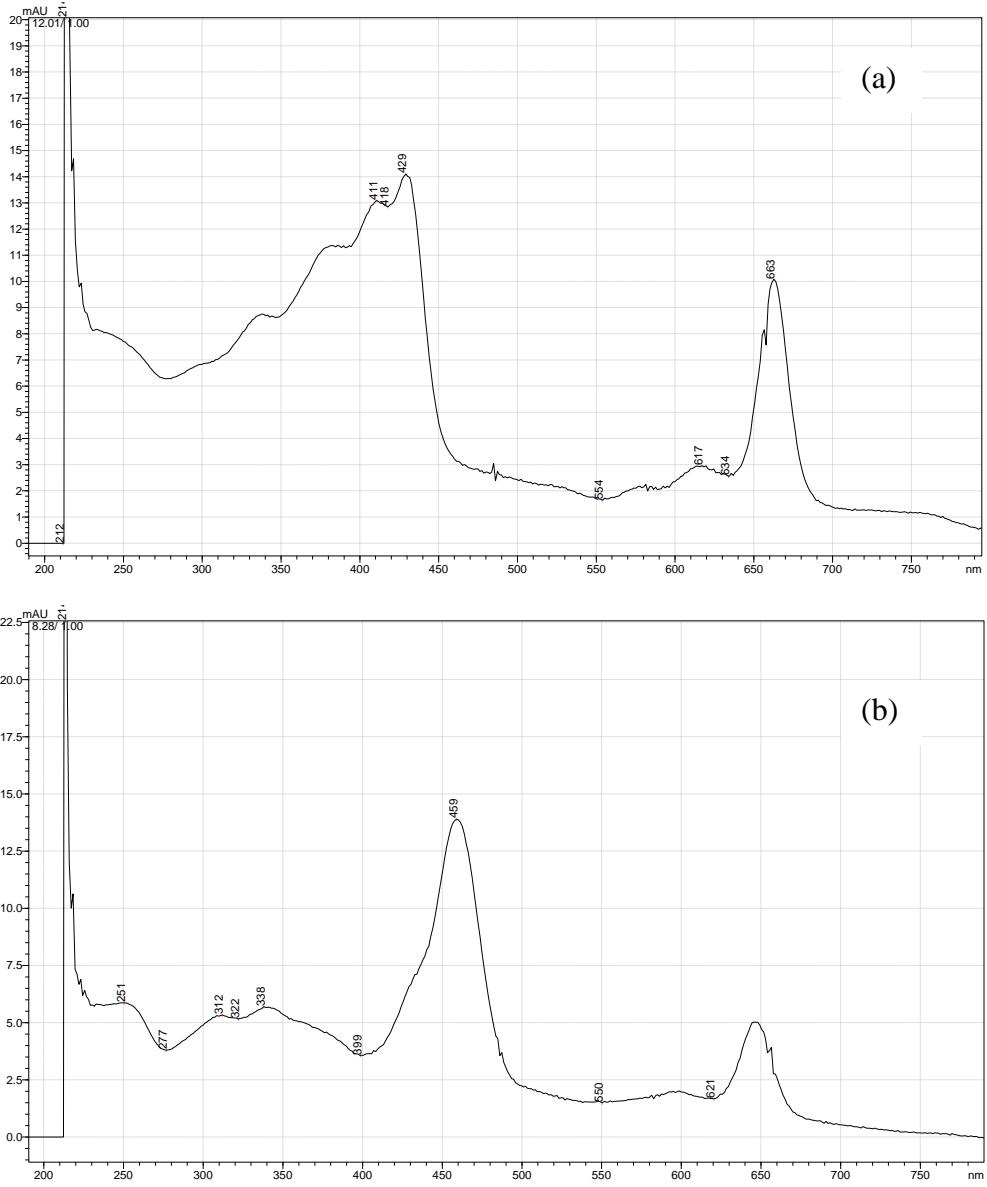
#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Farklı dezenfektan çözeltileriyle muamele edilen, soğukta 15 gün depolanan ya da doğrudan ozon gazıyla muamele edilen örneklerdeki klorofil a, klorofil b ve askorbik asit düzeyleri HPLC cihazıyla gerçekleştirilen analizlerle belirlenmiştir. Ispanak örneğinden, Bölüm 3.2.2.1’de açıklanan klorofil tayin yöntemi kullanılarak elde edilen HPLC kromatogramları Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1 Ispanak örneğinin klorofil düzeylerini gösteren kromatogramlar (a:429 nm, b:459 nm)

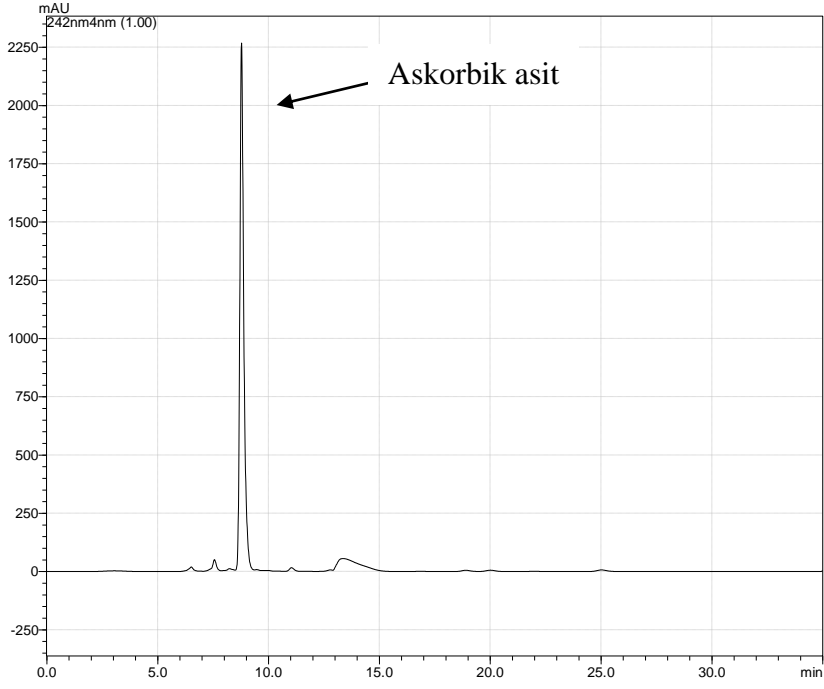
Görüldüğü gibi klorofil a ve klorofil b için alıkonma zamanları sırasıyla 31 ve 21'inci dakikalardır. Bu kromatogramlardaki piklerin detektörden alınan spektrumları ise Şekil 4.2'de verilmiştir. Klorofil a'nın maksimum absorbands verdiği dalga boyunun 429 nm, klorofil b'nin ise 459 nm olduğu görülmektedir.



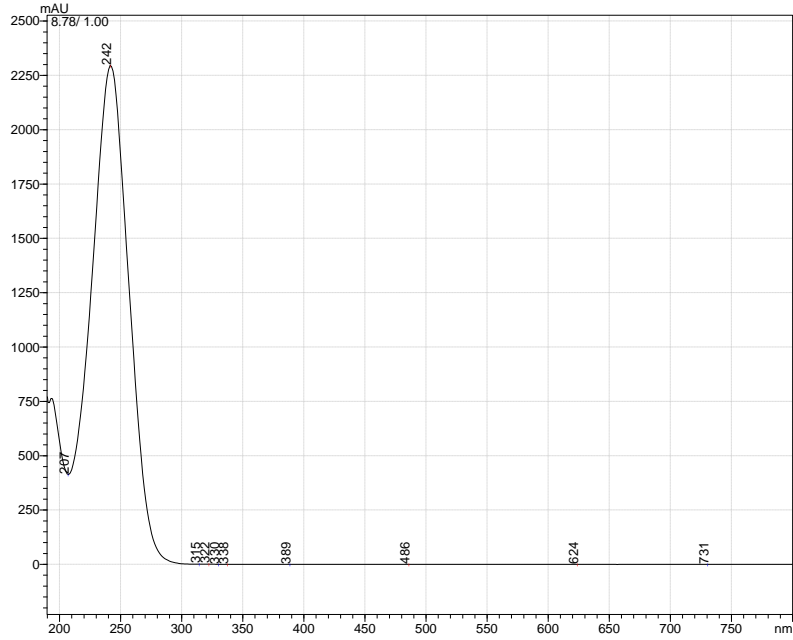
Şekil 4.2 (a) Klorofil a spektrumu, (b) Klorofil b spektrumu

Bölüm 3.2.2.2'de açıklanan askorbik asit tayin yöntemi kullanılarak maydanozdan elde edilen kromatogram Şekil 4.3'te verilmiştir. Bu kromatogramda yaklaşık 8. dakikada gelen askorbik asit pikinin detektörden alınan spektrumu ise Şekil 4.4'te verilmiştir.

Askorbik asidin maksimum absorbans verdiği dalga boyunun 242 nm olduğu görülmektedir.



Şekil 4.3 Maydanozdaki askorbik asit pikinin kromatogramı



Şekil 4.4 Askorbik asit spektrumu

#### 4.1 Farklı Ozonlama Sürelerinin Mikrobiyel İnaktivasyon ve Bazı Kimyasal Özellikler Üzerine Etkileri

Farklı ozonlama sürelerinin marul, ıspanak ve maydanozlarda *E. coli* ve *L. innocua* inaktivasyonu ve bazı kimyasal bileşenler üzerine etkisi sırasıyla Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3'te verilmiştir. Gerek 5 dakikalık, gerekse 15 dakikalık ozonlu su uygulamalarının, incelenen her üç sebze de mikrobiyel inaktivasyon sağlamada etkin olduğu belirlenmiştir. Beş dakikalık uygulamalarla *E. coli* için elde edilen 1,25–2,09 logaritmik birimlik ve *L. innocua* için elde edilen 1,54–2,17 logaritmik birimlik azalmalar istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ). En yüksek *E. coli* ve *L. innocua* inaktivasyonu (sırasıyla 2,22 ve 2,24 logaritmik azalma) ozonlu suyla 15 dakika muamele edilen marul örneklerinde görülmüştür. Ozonlu suyla muamele süresi arttıkça, test edilen her iki mikroorganizmanın inaktivasyonu genel olarak artmıştır. Ancak 5 ve 15 dakikalık ozon uygulamaları arasında saptanan farklılık sadece ıspanaklarda *E. coli* ve maydanozlarda *L. innocua* inaktivasyon sonuçları için anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Ozonlu suyla yıkama süresinin uzatılmasıyla elde edilen mikrobiyel inaktivasyonun etkinliği konusunda literatürde çelişkili bulgular mevcuttur. Örneğin Singh vd. (2002a) ozonlu suyla (5,2 mg/L) 10 dakikalık yıkamanın, havuçlarda *E. coli* O157:H7 inaktivasyonunda 1 ve 5 dakikalık yıkamalara göre daha etkin olduğunu bildirmişlerdir. Fakat aynı araştırmacılar 10 ve 15 dakikalık uygulamalar arasında mikrobiyel inaktivasyon etkinliği bakımından fark bulamamışlardır. Achen ve Yousef (2001), elmalardaki *E. coli* O157:H7'yi gidermek için iki farklı ozonlama metodu (gazlama ve daldırma) denemişler ve her iki metot için de test edilen üç farklı ozonlama süresi (1, 3 ve 5 dak) arasında mikrobiyel inaktivasyon sağlamada önemli bir fark tespit edememişlerdir. Ozonla muamele süresini uzatmanın ilave bir mikrobiyel inaktivasyon etkinliği getirmediği marullarda *E. coli* ile çalışan Ölmez (2010) ve *L. monocytogenes* ile çalışan Ölmez ve Akbaş (2009) tarafından da bildirilmiştir.

Çizelge 4.1 Farklı ozonlama sürelerinin marulda *E. coli* ve *L. innocua* inaktivasyonu ve bazı kimyasal özellikler üzerine etkisi \*

Mikroorganizma veya özellik	Ozonlu suyla yıkanma süresi (dak)		
	0	5	15
<i>E. coli</i> (log kob/g sebze)	6,61±0,06 <sup>A</sup>	4,52±0,09 <sup>B</sup>	4,39±0,09 <sup>B</sup>
<i>L. innocua</i> (log kob/g sebze)	6,62±0,03 <sup>A</sup>	4,45±0,09 <sup>B</sup>	4,38±0,08 <sup>B</sup>
Klorofil a (mg/kg KM)	16124±347 <sup>A</sup>	15984±408 <sup>A</sup>	15822±263 <sup>A</sup>
Klorofil b (mg/kg KM)	7459±403 <sup>A</sup>	7086±82 <sup>A</sup>	6977±63 <sup>A</sup>
Askorbik asit (mg/kg KM)	2051±222 <sup>A</sup>	2024±236 <sup>A</sup>	2065±216 <sup>A</sup>
Toplam fenolik madde (mg gae/kg KM)	9287±493 <sup>A</sup>	9231±471 <sup>A</sup>	9141±153 <sup>A</sup>
Antioksidan aktivite (µM troloks/g KM)	100±3 <sup>A</sup>	108±5 <sup>A</sup>	94±4 <sup>A</sup>

\*: Aynı satırdaki farklı harfler (A-C) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0,05).

Çizelge 4.2 Farklı ozonlama sürelerinin ıspanakta *E. coli* ve *L. innocua* inaktivasyonu ve bazı kimyasal özellikler üzerine etkisi \*

Mikroorganizma veya özellik	Ozonlu suyla yıkanma süresi (dak)		
	0	5	15
<i>E. coli</i> (log kob/g sebze)	6,40±0,06 <sup>A</sup>	5,15±0,12 <sup>B</sup>	4,67±0,15 <sup>C</sup>
<i>L. innocua</i> (log kob/g sebze)	6,53±0,04 <sup>A</sup>	4,99±0,05 <sup>B</sup>	4,92±0,01 <sup>B</sup>
Klorofil a (mg/kg KM)	11505±742 <sup>A</sup>	11052±799 <sup>A</sup>	11555±804 <sup>A</sup>
Klorofil b (mg/kg KM)	5068±180 <sup>A</sup>	5051±256 <sup>A</sup>	5077±151 <sup>A</sup>
Askorbik asit (mg/kg KM)	4098±194 <sup>A</sup>	3969±269 <sup>A</sup>	4063±191 <sup>A</sup>
Toplam fenolik madde (mg gae/kg KM)	14804±153 <sup>A</sup>	14870±187 <sup>A</sup>	14752±707 <sup>A</sup>
Antioksidan aktivite (µM troloks/g KM)	52±1 <sup>A</sup>	62±9 <sup>A</sup>	53±7 <sup>A</sup>

\*: Aynı satırdaki farklı harfler (A-C) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0,05).

Çizelge 4.3 Farklı ozonlama sürelerinin maydanozda *E. coli* ve *L. innocua* inaktivasyonu ve bazı kimyasal özellikler üzerine etkisi \*

Mikroorganizma veya özellik	Ozonlu suyla yıkanma süresi (dak)		
	0	5	15
<i>E. coli</i> (log kob/g sebze)	6,46±0,03 <sup>A</sup>	4,60±0,09 <sup>B</sup>	4,45±0,09 <sup>B</sup>
<i>L. innocua</i> (log kob/g sebze)	6,40±0,06 <sup>A</sup>	4,75±0,09 <sup>B</sup>	4,51±0,09 <sup>C</sup>
Klorofil a (mg/kg KM)	8622±216 <sup>A</sup>	8227±715 <sup>A</sup>	8686±564 <sup>A</sup>
Klorofil b (mg/kg KM)	3745±215 <sup>A</sup>	3674±396 <sup>A</sup>	3734±317 <sup>A</sup>
Askorbik asit (mg/kg KM)	10189±268 <sup>A</sup>	9911±125 <sup>A</sup>	10034±294 <sup>A</sup>
Toplam fenolik madde (mg gae/kg KM)	23727±832 <sup>A</sup>	22958±973 <sup>A</sup>	23352±840 <sup>A</sup>
Antioksidan aktivite (µM troluks/g KM)	119±8 <sup>A</sup>	121±4 <sup>A</sup>	118±9 <sup>A</sup>

\*: Aynı satırdaki farklı harfler (A-C) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0,05).

Singh vd. (2002b), daha fazla mikrobiyel inaktivasyon etkinliği sağlamak için yıkama süresinin uzatılması yerine, yıkama işleminin taze dezenfektan çözeltilerle tekrarlanması daha mantıklı bir işlem olabileceğini belirtmiştir. Marulları her seferinde taze hazırlanan ozonlu suyla (10 mg/L, 5 dak) üç kez yıkayan araştırmacılar ilk yıkamayla elde ettikleri 1,12 logaritmik birimlik azalmaya ilaveten ikinci yıkamayla 1,62 logaritmik birimlik bir mikrobiyel azalma daha elde etmişlerdir. Bu durum, sebze bulunan mikroorganizmaların taze ozon çözeltisiyle muamelesi sonucu inaktive olmasına bağlanmıştır. Ancak ozonlu suyla üçüncü bir yıkama, mikroorganizma sayısında ekstra herhangi bir azalma meydana getirmemiştir. Bu durum ise mikroorganizmaların sebzenin kesik kenarlarından dezenfektanın ulaşamayacağı derinliklere muhtemel penetrasyonu ile açıklanmıştır. Dezenfektan uygulamalarının tekrarlanması ile ekstra mikrobiyel inaktivasyon etkinliği sağlanabileceği söz konusu çalışmayla gösterilmişse de bu uygulamanın getireceği ilave maliyet de göz önünde tutulmalıdır.

Ozonlu suyla farklı sürelerde muamele edilen marul, ıspanak ve maydanozların kimyasal bileşenlerinde/özelliklerinde meydana gelen değişimler de sırasıyla Çizelge

4.1, 4.2 ve 4.3'te görülmektedir. Ozonlu suyla yıkama uygulamaları, incelenen sebzelerin temel renk maddeleri olan klorofil a ve klorofil b'de sınırlı bir azalış gerçekleştirirse de belirlenen bu farklılıklar istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Buradan, ozonla yıkama uygulamalarının yaprak sebzelerde görsel kaliteyi olumsuz yönde etkilemediği çıkarımı yapılabilir. Literatürdeki araştırmalar da, çeşitli kimyasallarla gerçekleştirilen yıkama uygulamalarının farklı sebzelerde herhangi bir görsel kalite kaybına yol açmadığını göstermiştir. Örneğin, taze doğranmış marulları su, ozonlu su (10 ve 20 mg/L) ve klorlu su (80 mg/L) ile yıkayan Beltran vd. (2005) ve çeşme suyu, sodyum hipoklorit (100 mg/L) ve klor dioksit (3 mg/L) çözeltileriyle yıkayan Lopez-Galvez vd. (2010) yıkama uygulamalarının hemen ardından tüm örneklerde görsel kalitenin iyi olduğunu ve farklı yıkamalar uygulanmış örnekler arasında istatistiksel açıdan önemli bir farkın bulunmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca, maydanozların askorbik asit ve kafeik asit çözeltilerine daldırılması (Meir vd. 1995) ve taze doğranmış roka, pazı ve hindibanın sitrik asit çözeltisiyle yıkanması (Ferrante vd. 2004) söz konusu sebzelerdeki klorofil düzeyini etkilememiştir.

Bu çalışmada, ozonlu suyla gerçekleştirilen 5 ve 15 dakikalık muameleler marul, ıspanak ve maydanozun askorbik asit ve toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktivite değerlerini istatistiksel açıdan önemli düzeyde etkilememiştir ( $p>0,05$ ). Söz gelimi, yıkanmamış marul, ıspanak ve maydanoz örneklerinin askorbik asit içerikleri sırasıyla 2051, 4098 ve 10189 mg/kg KM olarak tespit edilirken, ozonlu suyla 5 ve 15 dakikalık yıkamalar sonucunda bu değerler söz konusu üç sebze için sırasıyla 2024, 3969 ve 9911 mg/kg KM ve 2065, 4063 ve 10034 mg/kg KM olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde, ozonlu suyla muamele edilmiş kereviz (Zhang vd. 2005) ve marullarda (Beltran vd. 2005, Hassenberg ve Idler 2005, Koseki ve Isobe 2006, Akbaş ve Ölmez 2007) askorbik asit içeriğinin kontrol örneklerine göre istatistiksel açıdan önemli bir fark göstermediği bildirilmiştir.

Tam olarak parçalanmamış dokulardaki renk maddelerinin ve askorbik asit ile fenolik maddeler gibi gıdaların antioksidan aktivite değerine önemli katkıda bulunan bileşiklerin yıkama uygulamalarından etkilenmemesi esasen şaşırtıcı bir sonuç değildir. Çünkü bu bileşikler fiziksel olarak zarar görmemiş sağlam bitki dokularında çok iyi bir

şekilde korunur (Santos ve Silva 2008). Ancak herhangi bir prosesle (ince doğrama, meyve-sebze suyuna işleme, vb) doku parçalanırsa bu bileşikler savunmasız ve korunmasız kalır ve her türlü parçalanmaya karşı hassasiyet kazanırlar. Meyve ve sebze sularının ozonlanması sonucu meydana gelen renk değişimlerinin (Williams vd. 2004, Tiwari vd. 2009a) ve askorbik asit kayıplarının (Tiwari vd. 2008, Tiwari vd. 2009b) bu nedenle gerçekleştiği düşünülmektedir.

#### **4.2 Farklı Yıkama Uygulamalarının Mikrobiyel İnaktivasyon ve Bazı Kimyasal Özellikler Üzerine Etkileri**

Farklı sebzelerdeki mikroorganizmalar üzerine çeşitli yıkama uygulamalarının etkilerini görmek için çeşitli denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla *E. coli* ve *L. innocua* ile inoküle edilmiş marul, ıspanak ve maydanoz örnekleri, saf su, ozonlu su ve klorlu su ile 15 dakika süreyle yıkanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4, 4.5 ve 4.6'da verilmiştir.

Sebzelerin suyla yıkanması sonucu her üç sebze de gerek *E. coli* gerekse *L. innocua* sayısında sınırlı bir azalış gerçekleşmiştir. Suyla muamele edilen marul, ıspanak ve maydanozda sırasıyla 1,11; 0,99 ve 1,12 logaritmik birimlik *E. coli* azalışları gözlenirken, *L. innocua* için bu oranlar 1,29; 1,17 ve 0,71 olarak belirlenmiştir.

Literatürde çeşitli ürünlerde gerçekleştirilen suyla yıkama çalışmaları da mikroorganizma sayılarında yaklaşık 1 logaritmik birimlik azalmalarla sonuçlanmıştır. Örneğin suyla yıkamayla *E. coli* sayısındaki azalma yeşil biberlerde 1,5 logaritmik birim olarak gerçekleşirken (Han vd. 2000), marullarda 0,41 logaritmik birimde kalmıştır (Ölmez 2010). Mikroorganizmaların suyla azaltılmasında elde edilecek başarı, test edilen ürün (Singh vd. 2002a) ve mikroorganizma (Adams vd. 1989) türünün yanı sıra yıkama uygulamasının süresine (Singh vd. 2002a), incelenen ürünün kısmına [kabuk, meyve eti vb.] (Achen ve Yousef 2001) ve uygulanan inokülasyon metoduna (Singh vd. 2002b) bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir.

Çizelge 4.4 Farklı yıkama uygulamalarının marulda *E. coli* ve *L. innocua* inaktivasyonu ve bazı kimyasal özellikler üzerine etkisi \*

Mikroorganizma veya özellik	Yıkama Uygulaması			
	Yıkanmamış	Su	Ozon	Klor
<i>E. coli</i> (log kob/g sebze)	6,41±0,01 <sup>A</sup>	5,30±0,06 <sup>B</sup>	4,34±0,06 <sup>C</sup>	3,53±0,20 <sup>D</sup>
<i>L. innocua</i> (log kob/g sebze)	6,45±0,02 <sup>A</sup>	5,16±0,04 <sup>B</sup>	4,38±0,05 <sup>C</sup>	4,16±0,05 <sup>D</sup>
Klorofil a (mg/kg KM)	16358±201 <sup>A</sup>	16099±693 <sup>A</sup>	16384±484 <sup>A</sup>	16736±293 <sup>A</sup>
Klorofil b (mg/kg KM)	7920±60 <sup>A</sup>	7730±300 <sup>A</sup>	7882±212 <sup>A</sup>	7977±289 <sup>A</sup>
Askorbik asit (mg/kg KM)	1999±190 <sup>A</sup>	1969±172 <sup>A</sup>	1941±137 <sup>A</sup>	1966±110 <sup>A</sup>
Toplam fenolik madde (mg gae/kg KM)	8681±454 <sup>A</sup>	8366±836 <sup>A</sup>	8748±464 <sup>A</sup>	7489±312 <sup>A</sup>
Antioksidan aktivite (µM troloks/g KM)	86±8 <sup>A</sup>	79±5 <sup>A</sup>	95±6 <sup>A</sup>	84±11 <sup>A</sup>

\*: Aynı satırdaki farklı harfler (A-D) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0,05).

Tarımsal ürünlere, potansiyel kontaminasyonların önlenmesi ve bu ürünlerin raf ömürlerinin uzatılması için yıkama suyuna çeşitli dezenfektan maddelerin eklenmesi kaçınılmaz görülmektedir. Nitekim gerçekleştirilen bu çalışmada da ozon ve klor uygulamaları ile *E. coli* ve *L. innocua* inaktivasyonunda saf suyla yıkamaya göre daha üstün sonuçlar gözlenmiştir.

Bu çalışmadaki verilere göre; gerek *E. coli* gerekse *L. innocua* için en yüksek inaktivasyon oranları, klorlu suyla yıkama sonucunda elde edilmiştir. *E. coli* sayılarında klorlu suyla yıkama uygulaması marul, ıspanak ve maydanozlarda sırasıyla 2,88; 2,70 ve 2,98 logaritmik birimlik azalmalar sağlarken, ozonlu suyla yıkama sonucu gerçekleşen azalmalar sırasıyla 2,07; 1,70 ve 2,20 düzeyinde gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.5 Farklı yıkama uygulamalarının ıspanakta *E. coli* ve *L. innocua* inaktivasyonu ve bazı kimyasal özellikler üzerine etkisi \*

Mikroorganizma veya özellik	Yıkama Uygulaması			
	Yıkanmamış	Su	Ozon	Klor
<i>E. coli</i> (log kob/g sebze)	6,36±0,04 <sup>A</sup>	5,37±0,09 <sup>B</sup>	4,66±0,19 <sup>C</sup>	3,66±0,18 <sup>D</sup>
<i>L. innocua</i> (log kob/g sebze)	6,42±0,02 <sup>A</sup>	5,25±0,09 <sup>B</sup>	4,36±0,01 <sup>C</sup>	4,18±0,04 <sup>D</sup>
Klorofil a (mg/kg KM)	10921±442 <sup>A</sup>	10682±601 <sup>A</sup>	10532±596 <sup>A</sup>	9925±495 <sup>A</sup>
Klorofil b (mg/kg KM)	4885±209 <sup>A</sup>	4873±305 <sup>A</sup>	4803±261 <sup>A</sup>	4542±334 <sup>A</sup>
Askorbik asit (mg/kg KM)	3517±134 <sup>A</sup>	3450±158 <sup>A</sup>	3440±104 <sup>A</sup>	3334±132 <sup>A</sup>
Toplam fenolik madde (mg gae/kg KM)	14892±133 <sup>A</sup>	15067±846 <sup>A</sup>	14409±553 <sup>AB</sup>	12941±559 <sup>B</sup>
Antioksidan aktivite (µM troloks/g KM)	53±7 <sup>A</sup>	59±9 <sup>A</sup>	55±3 <sup>A</sup>	50±8 <sup>A</sup>

\*: Aynı satırdaki farklı harfler (A-D) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0,05).

Çizelge 4.6 Farklı yıkama uygulamalarının maydanozda *E. coli* ve *L. innocua* inaktivasyonu ve bazı kimyasal özellikler üzerine etkisi \*

Mikroorganizma veya özellik	Yıkama Uygulaması			
	Yıkanmamış	Su	Ozon	Klor
<i>E. coli</i> (log kob/g sebze)	6,58±0,04 <sup>A</sup>	5,46±0,09 <sup>B</sup>	4,38±0,06 <sup>C</sup>	3,60±0,06 <sup>D</sup>
<i>L. innocua</i> (log kob/g sebze)	6,59±0,01 <sup>A</sup>	5,88±0,03 <sup>B</sup>	4,40±0,07 <sup>C</sup>	4,36±0,03 <sup>C</sup>
Klorofil a (mg/kg KM)	9383±232 <sup>A</sup>	9215±176 <sup>A</sup>	9085±554 <sup>A</sup>	9114±680 <sup>A</sup>
Klorofil b (mg/kg KM)	3762±42 <sup>A</sup>	3720±19 <sup>A</sup>	3677±136 <sup>A</sup>	3643±135 <sup>A</sup>
Askorbik asit (mg/kg KM)	10964±56 <sup>A</sup>	10841±55 <sup>A</sup>	11357±127 <sup>A</sup>	11316±124 <sup>A</sup>
Toplam fenolik madde (mg gae/kg KM)	23914±839 <sup>A</sup>	23477±324 <sup>A</sup>	22789±826 <sup>A</sup>	22664±125 <sup>A</sup>
Antioksidan aktivite (µM troloks/g KM)	116±6 <sup>A</sup>	115±4 <sup>A</sup>	116±4 <sup>A</sup>	112±6 <sup>A</sup>

\*: Aynı satırdaki farklı harfler (A-D) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0,05).

Singh vd. (2002a) ozonlu suyla (9,7–16,5 mg/L) 10 dakikalık yıkama uygulaması sonunda marul ve havuçlardaki *E. coli* O157:H7'nin 1,41–1,80 logaritmik birim azaldığını bildirmiştir. Suyun 20 °C'de 2–64 dakika süresince ozonlanması ile elde edilen 1,7–8,9 mg/L'lik ozon dozu yabamersinlerindeki *E. coli* O157:H7'de 2 dakikalık uygulama sonucunda 1,3 ve 64 dakikalık uygulama sonucunda 4,9 logaritmik birimlik azalmalara neden olmuştur (Bialka ve Demirci 2007). *E. coli* O157:H7 inoküle edilmiş marulların 10 ppm'lik ozonlu suyla 10 dakika yıkanması ile 2,15 logaritmik birimlik bir azalma gerçekleşmiştir (Singh vd. 2002b). Sharma vd. (2002) ozonlu suyla (21 ppm) yıkama ve basınç uygulaması kombinasyonu ile alfalfa çekirdeklerinde *E. coli* O157:H7 inaktivasyonu üzerine çalışmışlardır. Araştırmacılar *E. coli* O157:H7 popülasyonunda, 8 ve 12 psi'lik hidrostatik basınç ve ozonlu su uygulaması ile sırasıyla 0,74–1,56 ve 0,72–1,26 logaritmik birimlik azalmalar gözlemlemişlerdir. En yüksek inaktivasyon oranları olan 2,03 logaritmik birimlik azalmaya ise 12 psi'lik basıncın 64 dakikalık uzun bir uygulama süresi sonunda ulaşılmıştır. Görüldüğü gibi, ozonlu suyla yıkama sonucu tarafımızdan belirlenen *E. coli* inaktivasyon değerleri literatür verileriyle son derece uyumludur.

Ozonun sağladığı mikrobiyel inaktivasyonun değerlendirilmesinde, uygulama tekniği son derece önemli bir faktördür. Birçok araştırmacı ozonun gazlama (bubbling) şeklinde uygulanmasının, ürünün önceden ozonlanmış suya daldırılmasından çok daha etkin sonuçlar verdiğini bildirmiştir (Kim vd. 1999, Achen ve Yousef 2001). Ölmez (2010) farklı ozonlama metotlarının marullardaki *E. coli* popülasyonunu indirgedeki etkinliği üzerine çalışmıştır. Araştırmacı iki dakikalık uygulamalar ile gazlama metoduyla yaklaşık 2 logaritmik birimlik azalma gözlerken, önceden ozonlanmış suya daldırma uygulaması ile gerçekleşen indirgenme yalnızca 1 logaritmik düzeyde kalmıştır. Bu durum, gazlama sırasında gaz-sıvı ara yüzeyinde oluşan sıvı-film tabakası ile açıklanmış ve yüksek konsantrasyonda ozon içeren bu film tabakası ile temas eden üründe daha yüksek oranda mikrobiyel inaktivasyon sağlandığı ileri sürülmüştür (Kim vd. 1999). Bizim çalışmamızda da ozonla maksimum mikrobiyel inaktivasyon etkinliği sağlamak için gazlama metodu kullanılmış ve bu sayede 2 logaritmik birimden daha yüksek inaktivasyon oranları elde edilmiştir.

Klorlu su ile yıkama uygulaması tarafımızdan test edilen sebzelerdeki *E. coli* sayısını 2,70–2,98 logaritmik birim azaltmıştır. Klorlu su uygulamalarının yaprak sebzelerdeki *E. coli* düzeyini 2–3 logaritmik birim azalttığı başka araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Stopforth vd. 2008, Lopez-Galvez vd. 2009). Ancak *E. coli* indirgemedede klorun etkinliği uygulanan klor dozuna ve uygulanma şekline sıkı sıkıya bağlıdır. Örneğin 20 ppm’lik daldırma şeklinde klor uygulaması marullardaki *E. coli* O157:H7’yi indirgemedede saf sudan daha etkin bulunmamıştır (Li vd. 2001). Saf suyun ve 200 ppm’lik klor çözeltisinin spreyleme şeklinde marullara uygulanması sonucunda da *E. coli* O157:H7 indirgenmesinde istatistiksel açıdan önemli bir fark gözlenmemiştir (Beuchat 1999b).

Çalışmamızda marul, ıspanak ve maydanozlardaki *L. innocua* sayılarındaki gerçekleşen azalmalar klorlu suyla yıkamalar sonucunda sırasıyla 2,20; 2,24 ve 2,23; ozonlu suyla yıkamalar sonucunda ise sırasıyla 2,07; 2,06 ve 2,19 olarak belirlenmiştir. Klor uygulamalarının meyve ve sebzelerde *L. monocytogenes* azaltılmasında nispeten etkisiz kaldığı kimi araştırmacılar tarafından dile getirilmiştir (Beuchat ve Brackett 1990, Li vd. 2002). Tarafımızdan gerçekleştirilen çalışmada 100 ppm klorun 15 dakika uygulanmasıyla *L. innocua* sayısında yaklaşık 2 logaritmik birimlik azalışlar kaydedilmiştir. Aynı inaktivasyon oranı 200 ppm’lik klor çözeltisine 10 saniye daldırılan Brüksel lahanalarındaki *L. monocytogenes* sayısı için de elde edilmiştir (Brackett 1987). Ayrıca Zhang ve Farber (1996) taze doğranmış marulların 200 ppm klorlu suyla yıkanması sonucu *L. monocytogenes* sayısında 1,3-1,7 logaritmik birimlik azalmalar tespit etmiştir.

Ozonlu suyla yıkama uygulamalarının tarımsal ürünlerdeki *L. monocytogenes* sayısında azalmalara neden olduğu da önceki çalışmalarla ortaya konulmuştur. Örneğin, ozonlu suyla (5 ppm) 1 dakika muamele edilen tüm haldeki patateslerde 0,8 logaritmik birimlik (Selma vd. 2006), 5 dakika ozonlu suyla yıkanan marullarda ise yaklaşık 5 birimlik (Rodgers vd. 2004) *L. monocytogenes* inaktivasyonlarının gerçekleştiği bildirilmiştir. Ölmez ve Akbaş (2009) marullardaki *L. monocytogenes* sayısı üzerine ozon konsantrasyonunun (0,5–4,5 ppm) ve uygulama süresinin (0,5–3,5 dak) etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar uygulama süresine bağlı olarak 4,5 ppm ozon dozuyla

1,5–2,4 logaritmik ve 0,5 ppm ozon dozuyla 0,2–0,8 logaritmik birimlik azalmalar gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Ozon konsantrasyonunun 3 ppm'e kadarki yükselişi *L. monocytogenes* inaktivasyonunu artırırken, bu dozun üzerindeki seviyeler mikroorganizmanın inaktivasyonunu etkilememiştir.

Mikrobiyel inaktivasyon etkinliği bakımından klor ve ozon karşılaştırıldığında zaman zaman ozonun klora eşdeğer etkinlik gösterdiği (Ölmez ve Akbaş 2009, Ölmez 2010) ve hatta bazen ozonun klordan daha etkin olduğu (Kim vd. 1999) iddia edilse de, bilimsel bulguların çoğu genelde klorun ozondan daha etkin olduğunu ortaya koymuştur (Whitmore ve Denny 1992, Chaidez vd. 2007, Wei vd. 2007, Das ve Kim 2010). Tarafımızdan gerçekleştirilen deneyler de gerek *E. coli* gerekse *L. innocua* için en yüksek inaktivasyon oranlarının klorlu suyla yıkama uygulamalarıyla elde edildiğini göstermiştir. Yaprak sebzelerdeki *E. coli* sayısında klorlu su uygulamasıyla yaklaşık 3 logaritmik birimlik, ozonlu su uygulamasıyla ise yaklaşık 2 logaritmik birimlik bir azalma elde edilmiştir. *L. innocua* inaktivasyonunda ise ozonun performansı klorunkine son derece yakındır. Hatta maydanoz örneklerinin bu iki dezenfektanla yıkanması sonrasında elde edilen sonuçlar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ( $p>0,05$ ). Bu durum, *L. innocua* gibi Gram pozitif bakterilerin *E. coli* gibi Gram negatif bakterilere göre klor uygulamalarına karşı daha dirençli olmasından (Mir vd. 1997) kaynaklanmış olabilir.

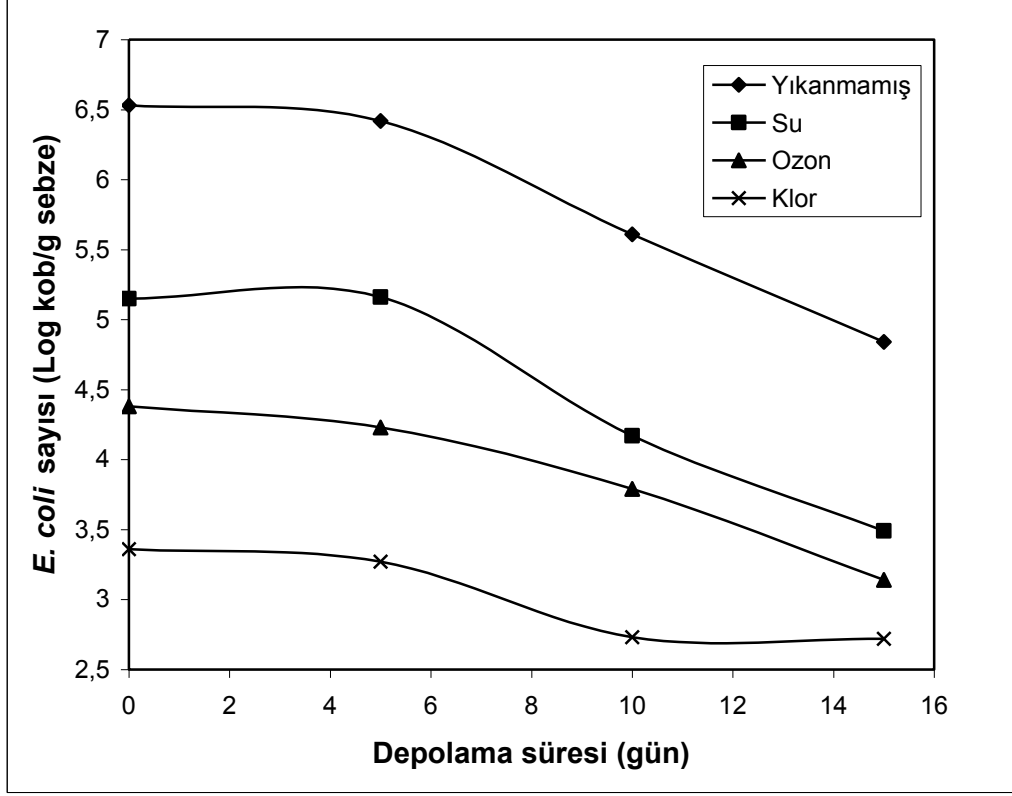
Yapılan bu çalışmada sebzelerde incelenen kimyasal bileşenler/özellikler üzerine farklı yıkama uygulamalarının genelde istatistiksel açıdan önemli bir etkisi olmadığı görülmüştür. Bu durumun istisnası olabilecek tek sonuç, klorlu su uygulamalarının yaprak sebzelerin toplam fenolik madde içeriklerini azaltması ve meydana gelen bu azalmanın ıspanaklarda istatistiksel açıdan önemli olmasıdır ( $p<0,05$ ). Benzer şekilde, klorlu suyla yıkanan marul örneklerinde fenolik bileşiklerin zarar gördüğü önceki çalışmalarda da bildirilmiştir (Fukumoto vd. 2002, Baur vd. 2004). Bu durum, birçok fenolik bileşiğin sentezinde önemli bir rolü olan fenilalanin ammonia-liyaz enziminin aktivitesinde klor uygulamaları sonucu meydana gelen düşüşe bağlanmıştır. Fenolik bileşiklerin teker teker analizleriyle, marullarda en çok bulunan çözünebilir fenolik bileşikler olan kafeik asit türevlerinin (Baur vd. 2004) ve bu türevlerden 3,5-di-o-

kafeoilquinik asit maddesinin (Fukumoto vd. 2002) miktarlarının klorlu su uygulamaları sonucu azaldığı gösterilmiştir. Buna karşın; klorun da dahil olduğu birçok dezenfektan madde ile yıkanan rokalarda (Martinez-Sanchez vd. 2006), marullarda (Beltran vd. 2005), pazı, roka ve hindibada (Ferrante vd. 2004) fenolik madde içerikleri farklı yıkama uygulamalarından etkilenmemiştir. Yine klorlu ve ozonlu suyla gerçekleştirilen muameleler marullarda toplam antioksidan aktiviteyi (Kenny ve O'Beirne 2009) ve vitamin C içeriğini (Hassenberg ve Idler 2005, Ölmez ve Akbaş 2009) etkilememiştir. Esasen tarafımızdan saptanan ve literatürde bulunan söz konusu veriler dikkat çekicidir. Çünkü incelenen sebzelerin antioksidan aktivitesi üzerine büyük katkısı olan askorbik asit, suda kolaylıkla çözünen bir vitamindir. Saf suyla yıkama işlemiyle bile üründe belirli bir miktar askorbik asit kaybı olasıdır. Nitekim Lopez-Galvez vd. (2010) yıkanmamış örneklerde yıkanmışlara göre daha yüksek düzeyde askorbik asit saptamışlardır. Ayrıca askorbik asidin ozon ve klor gibi oksidan maddelerle yükseltgenmesi de söz konusu olabilir. Nitekim literatürde marulların ozonlu suyla (Beltran vd. 2005), biber ve çileklerin klorlu suyla (Wright ve Kader 1997, Nunes ve Emond 1999) ve rokaların laktik asit çözeltisiyle (Martinez-Sanchez vd. 2006) yıkanması sonucu ürünlerin askorbik asit içeriklerinde önemli düzeyde azalmalar görülmüştür. Taze doğranmış ürünlerin besleyici unsurlarının korunmasında, kullanılan dezenfektan dozunun yanı sıra uygulanan proses metodunun (yıkama, doğrama vb.) tahripkarlığı da önem taşımaktadır. Ürün ne kadar küçük parçalar halinde doğranırsa parçalanmış bitki dokularından sızan hücre sıvısı o denli fazla olacak ve ürünün besleyici unsurlarındaki kayıp da o denli büyük olacaktır (Barry-Ryan ve O'Beirne 1999, Kenny ve O'Beirne 2009).

### **4.3 Yıkama Depolanan Maydanozlarda Mikrobiyel Gelişim ve Bazı Kimyasal Özelliklerin Değişimi**

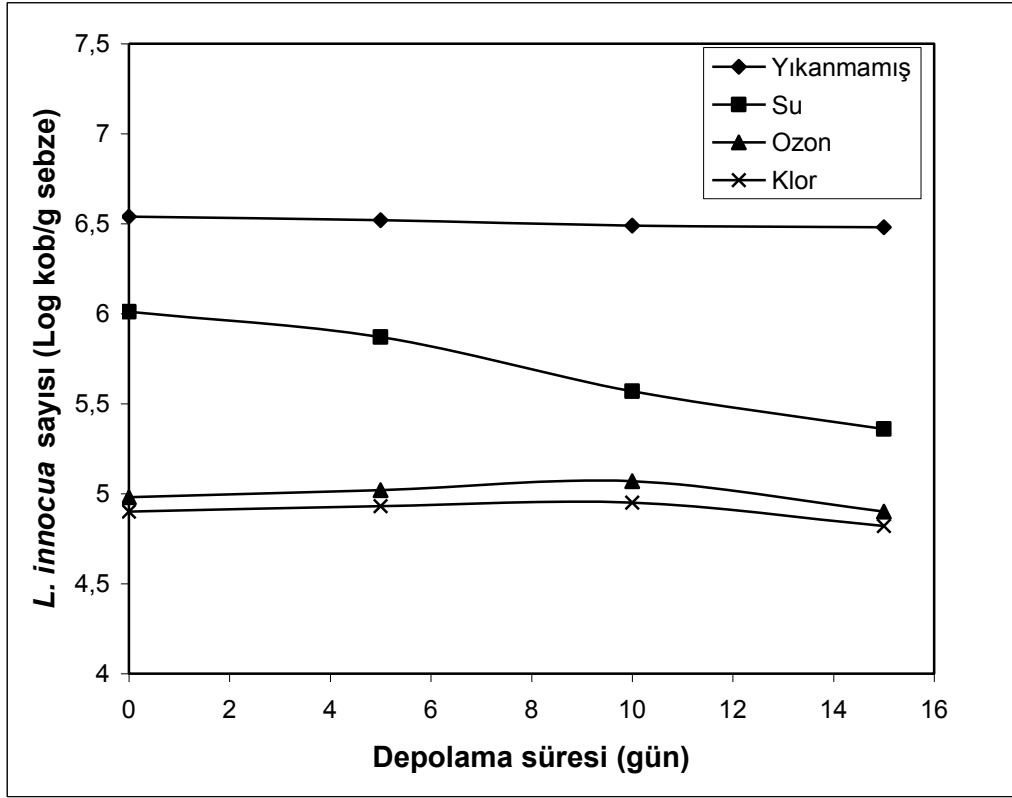
Farklı yıkamalar uygulanıp depolanan maydanozlarda *E. coli* gelişimi Şekil 4.5'te görülmektedir. *E. coli* ile inoküle edildikten sonra herhangi bir işleme tabi tutulmamış örneklerdeki mikroorganizma sayısı ortalama 6,53 log kob/g yaş sebze olarak belirlenmiştir. Depolamanın hemen başında gerçekleştirilen saf suyla, ozonlu suyla ve klorlu suyla yıkamalar sonucu bu sayı sırasıyla 5,15; 4,38 ve 3,36 log kob/g yaş sebze düzeyine düşmüştür. *E. coli* sayıları tüm örneklerde depolama boyunca azalmıştır. 15

günlük depolama sonunda *E. coli* sayıları yıkanmamış örnekler ile suyla, ozonlu suyla ve klorlu suyla yıkanmış örneklerde ortalama 4,84, 3,49, 3,14 ve 2,72 log kob/g yaş maydanoz olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.5 Farklı yıkamalar uygulanıp depolanan maydanozlarda *E. coli* gelişimi

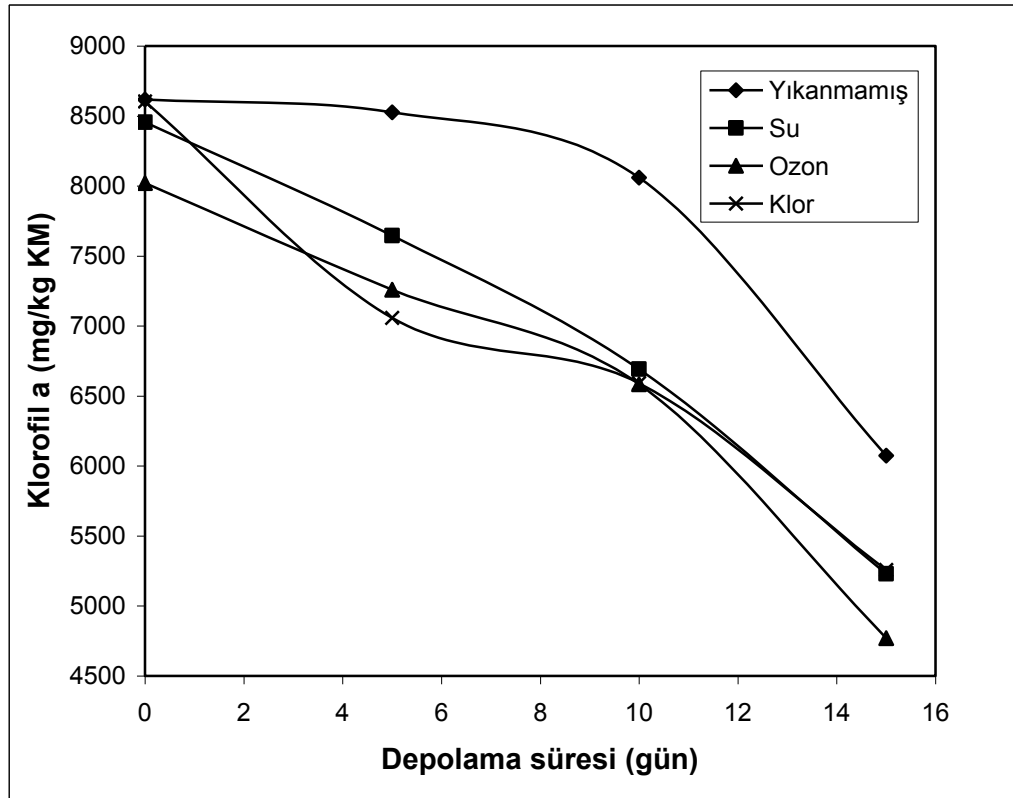
Farklı yıkamalar uygulanıp 5°C’de depolanan maydanozlarda *L. innocua* gelişimi Şekil 4.6’da görülmektedir. *L. innocua* ile inoküle edildikten sonra herhangi bir işleme tabi tutulmamış örneklerdeki mikroorganizma sayısı ortalama 6,54 log kob/g yaş sebze olarak belirlenmiştir. Saf suyla, ozonlu suyla ve klorlu suyla yıkamalar sonrası sırasıyla 0,53; 1,56 ve 1,64 logaritmik birimlik azalmalar sağlanmıştır. 15 gün süren depolama periyodu sonunda *L. innocua* sayısı yıkanmamış, suyla yıkanmış, ozonlu suyla yıkamış ve klorlu suyla yıkanmış örneklerde sırasıyla 6,48; 5,36; 4,90 ve 4,82 log kob/g yaş sebze olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6 Farklı yıkamalar uygulanıp depolanan maydanozlarda *L. innocua* gelişimi

Psikrotrof bir bakteri olan *L. monocytogenes*'in birçok tarımsal üründe 3-20 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında canlı kalabildiği ve hatta gelişebildiği bilinmektedir (Beuchat vd. 1986, Berrang vd. 1989, Beuchat ve Brackett 1990, Kallander vd. 1991, Farber vd. 1998). Sıcaklığın 20 °C'den 8 °C'nin altına düşürülmesi halinde mikroorganizmanın gelişim hızı önemli ölçüde düşer ancak canlılığı sürer (Carlin vd. 1995). 5 °C civarında depolanan marul (Steinbruegge vd. 1988, Li vd. 2002) ve hindibada (Carlin vd. 1995) *L. monocytogenes*'in gelişimini çok yavaş bir şekilde sürdürdüğü bildirilmiştir. Mezofilik bir bakteri olan *E. coli*'nin de canlılığı ve gelişimi üzerine depolama sıcaklığının etkisi büyüktür. Ispanakların ve klorla muamele edilmiş marulların 8 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda depolanması halinde yüksek *E. coli* gelişimi gözlenirken bu derecenin altındaki sıcaklıklarda mikroorganizma gelişmesi durmuştur (Li vd. 2001, Luo vd. 2009). Bu nedenle tarımsal ürünlerin hasat sonrası hemen soğutulması ve soğuk muhafazanın kesintisiz sürdürülmesi ürün güvenliği açısından son derece önemlidir.

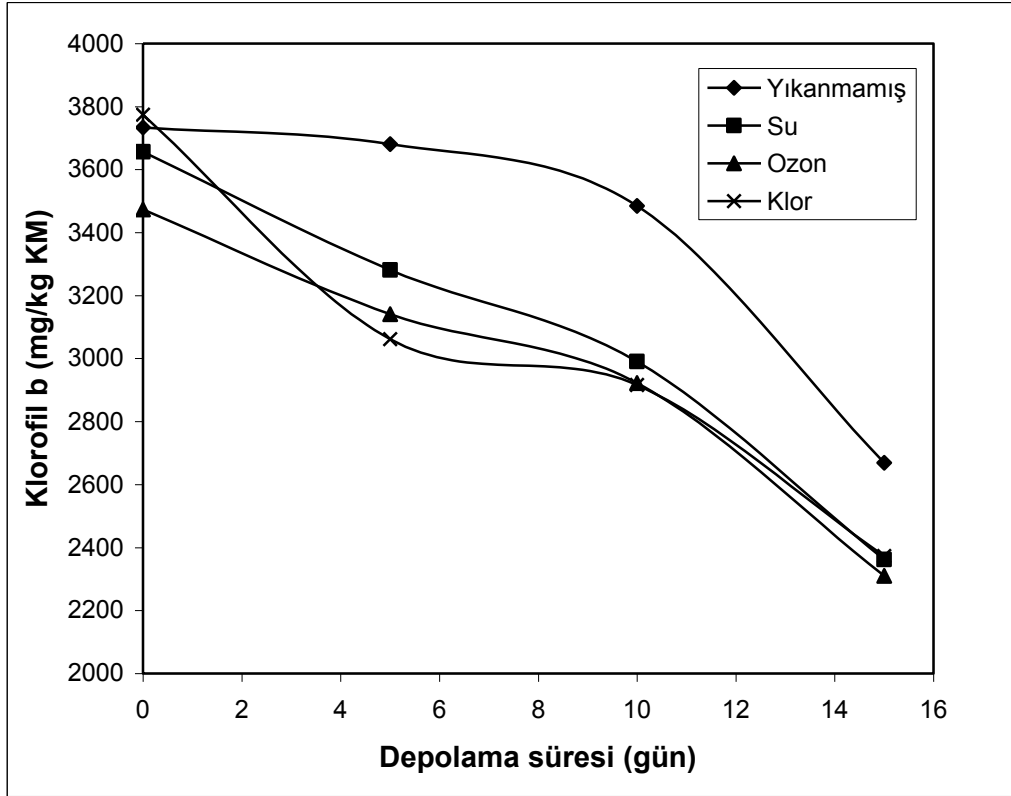
Farklı yıkamalar uygulanıp depolanan maydanozlarda gerçekleşen klorofil a ve klorofil b değişimleri sırasıyla Şekil 4.7 ve 4.8’de verilmiştir. İncelenen tüm örneklerde hem klorofil a hem de klorofil b düzeyleri depolama boyunca bir azalış göstermiştir. Depolama ile yaprak sebzelerin klorofil düzeylerinin azalması, bitki dokusunun hasat sonrası fizyolojisinin doğal bir sonucudur (Ferrante vd. 2004). Daha önce de marul (Bolin ve Huxsoll 1991), pazı (Roura vd. 2000), hindiba ve roka (Ferrante vd. 2004) gibi ürünlerin yeşil renklerinde azalmalar meydana geldiği bildirilmiştir.



Şekil 4.7 Farklı yıkamalar uygulanıp depolanan maydanozlarda klorofil a miktarının değişimi

Yıkama uygulanmış örneklerdeki klorofil a ve klorofil b düzeyleri, depolamanın beşinci gününden itibaren yıkanmamış örneklere göre önemli ölçüde bir azalma göstermiştir ( $p < 0,05$ ). Kalan depolama periyodunca süren bu durum, parçalamayla zarar görmüş dokudan sızan hücre sıvılarının yıkama uygulamalarıyla uzaklaşması ile açıklanabilir. Nitekim Kenny ve O’Beirne (2009) da suya ve klor çözeltisine daldırılan marullarda gerçekleşen renk kaybının daha ılımlı bir uygulama olan çeşme suyu altında yıkamaya göre daha fazla olduğunu bildirmiştir. Şiddetli yıkama ve doğrama gibi prosesler taze ürünlerin parçalanması/çatlama ile sonuçlanabilir. Bitki dokusu sağlamken birbirinden

farklı bölgelerde bulunan klorofil ve onun parçalayıcısı klorofilaz enzimi, dokunun parçalanmasıyla bir araya gelir ve degradasyon reaksiyonları başlar. Özellikle parçalanmış dokuya komşu bölgelerde, sızan asitlerin ve hidrolize edici enzimlerin etkisiyle üründe gerçekleşen kalite kaybı son derece büyük olur (Roura vd. 2000).

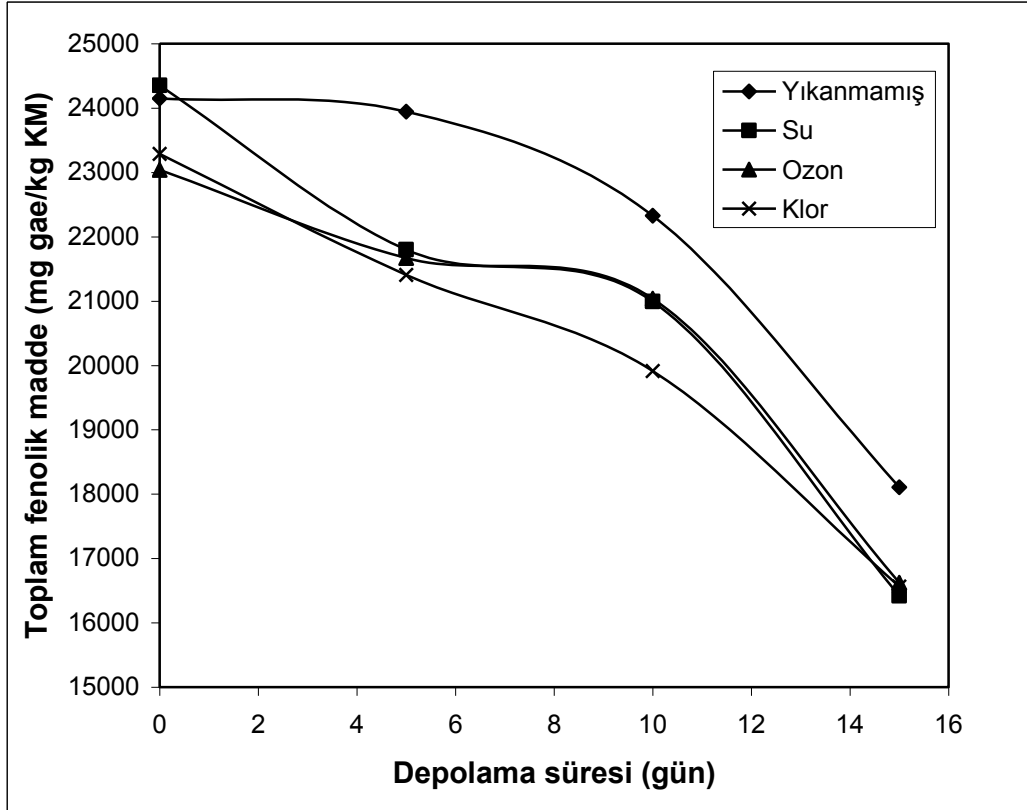


Şekil 4.8 Farklı yıkamalar uygulanıp depolanan maydanozlarda klorofil b miktarının değişimi

Yıkamanın hemen sonrasında ve depolama boyunca gerçekleştirilen analizler, farklı yıkama uygulamalarına maruz kalan örneklerin klorofil içeriklerinin arasında istatistiksel açıdan fark bulunmadığını göstermiştir. Bu durum; farklı çözeltilerle yıkayıp depolanan roka (Martinez-Sanchez vd. 2006), marul (Akbaş ve Ölmez 2007, Lopez-Galvez vd. 2010) ve ıspanaklarda (Artes-Hernandez vd. 2009) gerçekleştiği bildirilen durumlarla benzerlik göstermektedir. Ozonlu suyla yıkanan örnekler, depolamanın başında ve sonunda en düşük klorofil a ve klorofil b düzeyine sahip örnekler ise de istatistiksel değerlendirmeler ozonun diğer yıkama uygulamalarından farklı sonuçlara yol açmadığını göstermiştir ( $p>0,05$ ). Oysa klorofillerin; ozon, klor ve serbest radikaller gibi oksidan bileşiklere karşı son derece hassas olduğu bilinmektedir

(Philosoph-Hadas vd. 1994). Muhtemelen bu nedenle, klorlu suyla muamele edilen yeşil biberlerde (Nunes ve Emond 1999) klorofil miktarlarının azaldığı bildirilmiştir.

Farklı yıkamalar uygulanıp depolanan maydanozlarda toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktivite değerleri de izlenmiştir ve sonuçlar sırasıyla Şekil 4.9 ve 4.10'da verilmiştir.

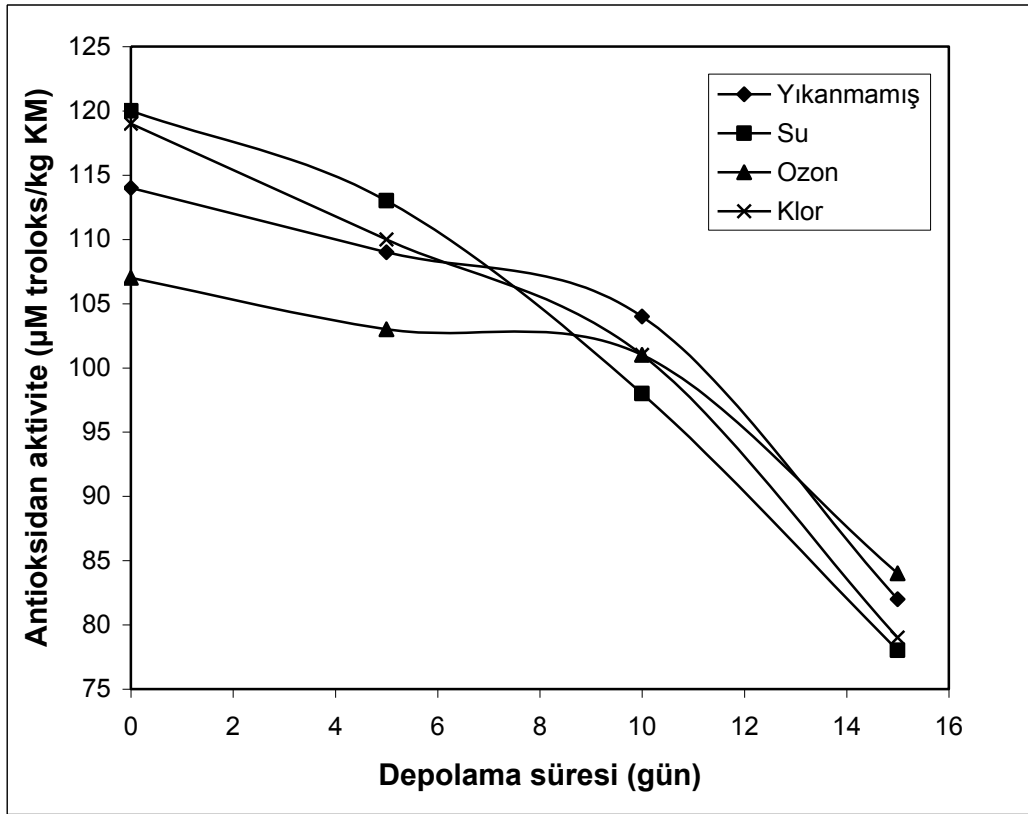


Şekil 4.9 Farklı yıkamalar uygulanıp depolanan maydanozlarda toplam fenolik madde içeriğinin değişimi

Örneklerin toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktivite değerleri depolama süresince azalmış ancak kontrol örnekleri ve farklı muameleler görmüş örnekler arasında saptanan fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Literatürde gerek yıkama prosesiyle, gerekse depolamayla meyve ve sebzelerin toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktivite değerlerindeki değişime ilişkin çelişkili bilgiler söz konusudur. Yıkama işleminin çeşitli ürünlerde toplam fenolik madde içeriğini (Martinez-Sanchez vd. 2006, Kenny ve O'Beirne 2009) ve antioksidan aktivite değerini (Artes-Hernandez vd. 2009, Kenny ve O'Beirne 2009) etkilemediği

bildirilmiştir. Bununla beraber, klor çözeltisiyle yıkanan marulların (Beltran vd. 2005) ve hidrojen peroksit çözeltisiyle yıkanan domateslerin (Kim vd. 2007) depolanması sırasında toplam fenolik madde içeriğinde azalmalar söz konusu olmuştur. Araştırmacılar bu durumu açıklamak için yıkama ve antimikrobiyel madde uygulamaları sırasında suya karışıp ortamdaki uzaklaşma ve oksidasyon gibi nedenler öne sürmüşlerdir.



Şekil 4.10 Farklı yıkamalar uygulanıp depolanan maydanozlarda antioksidan aktivite değerlerinin değişimi

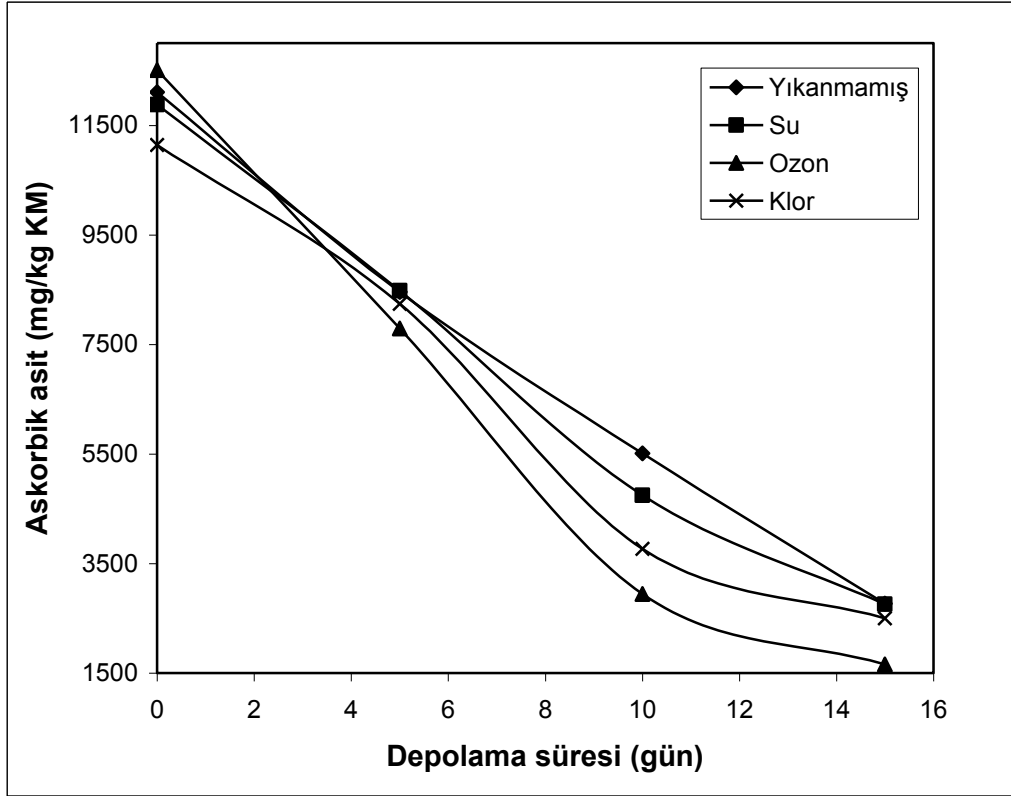
Depolama süresince ürünlerin toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivite değerinin değişiminde ise çok daha karışık mekanizmaların etkin olduğu düşünülmektedir. Dokunun şiddetli yıkama veya doğrama işlemleriyle zarar görmesi fenolik bileşiklerin sentezinde görevli fenilalanin ammonia-lyaz enziminin aktivitesini teşvik eder ve dolayısıyla fenolik maddelerin birikimine ve antioksidan aktivite artışına neden olur (Saltveit 2000, Kovacik vd. 2007). Nitekim depolama süresince fenolik maddelerin miktarının (Babic vd. 1993, Cantos vd. 2001, Beltran vd. 2005, Kalt 2005, Klaiber vd. 2005) ve antioksidan kapasitenin (Kevers vd. 2007, Reyes vd. 2007,

Patthamakanokporn vd. 2008) arttığı bildirilmiştir. Öte yandan fenolik madde içeriğinin ve antioksidan aktivite değerinin depolamayla değişmediğini (Baur vd. 2004, Degl'Innocenti vd. 2007, Kenny ve O'Beirne 2009) hatta azaldığını (Piga vd. 2003, Vina ve Chaves 2006, Artes-Hernandez vd. 2009) bildiren yayınlar da mevcuttur. Antioksidan aktivitenin azalma nedeni olarak, membran zararlanmasına ve dolayısıyla antioksidan bileşiklerin niteliğinin ve kompozisyonunun değişimine neden olan oksidatif stres gösterilmiştir (Artes-Hernandez 2009). Esasen depolama boyunca fenolik maddelerdeki değişim bitkinin dokusuna (Fukumoto vd. 2002) ve fenolik bileşiğin türüne (Cantos vd. 2001, Baur vd. 2004, Beltran vd. 2005) bağlı olarak değişiklik gösterir. Dolayısıyla toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivite değerindeki değişim dokularda meydana gelen yıkım ve sentez reaksiyonlarının bir bileşkesi şeklinde ortaya çıkar (Kenny ve O'Beirne 2009).

Farklı yıkamalar uygulanıp depolanan maydanozların askorbik asit içeriklerindeki değişim Şekil 4.11'de verilmiştir. Askorbik asit miktarları tüm örneklerde depolama boyunca azalmıştır. Askorbik asit miktarının azalışının kuşkonmaz (Esteve vd. 1995), pazı (Gil vd. 1998) ve marulun (Beltran vd. 2005, Akbaş ve Ölmez 2007, Lopez-Galvez vd. 2010) depolanması sürecinde de gözlemlendiği daha önce bildirilmiştir. Bu durum, bitkilerin hasat sonrası fizyolojisinin doğal bir sonucu olarak, dokunun bütünlüğünün/sağlamlığının bozulmasıyla askorbik asit ve onu parçalayabilen enzimlerin bir araya gelmesiyle gerçekleşmiş olabilir.

Ozon, yüksek oksidasyon kapasitesiyle canlı hücrelerdeki doğal savunma mekanizmasını harekete geçirir. Bu mekanizma, oksidasyon stresine karşı koymak için bitki hücresinde askorbik asit gibi antioksidatif maddelerin sentezini/birikimini teşvik eder (Sandermann vd. 1998). Çileklerde (Perez vd. 1999) ve turunçgillerde (Iglesias vd. 2006) askorbik asit düzeyinin, domateslerde ise antioksidan aktivite değerinin (Tzortzakis vd. 2007) uygulanan ozonlama işleminin hemen ardından önemli ölçüde yükseldiği, ancak belli bir süre sonra bu etkinin geçtiği bildirilmiştir. Tarafımızdan gerçekleştirilen çalışmada da ozonlu suyla muamele görmüş örnekler, diğer örneklere göre, depolamanın başında yüksek ve depolamanın sonunda düşük askorbik asit

düzeyine sahiptir. Ancak ozonla muamele de dahil çeşitli uygulamalara maruz kalan örnekler arasında gözlenen fark istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ).



Şekil 4.11 Farklı yıkamalar uygulanıp depolanan maydanozlarda askorbik asit miktarının değişimi

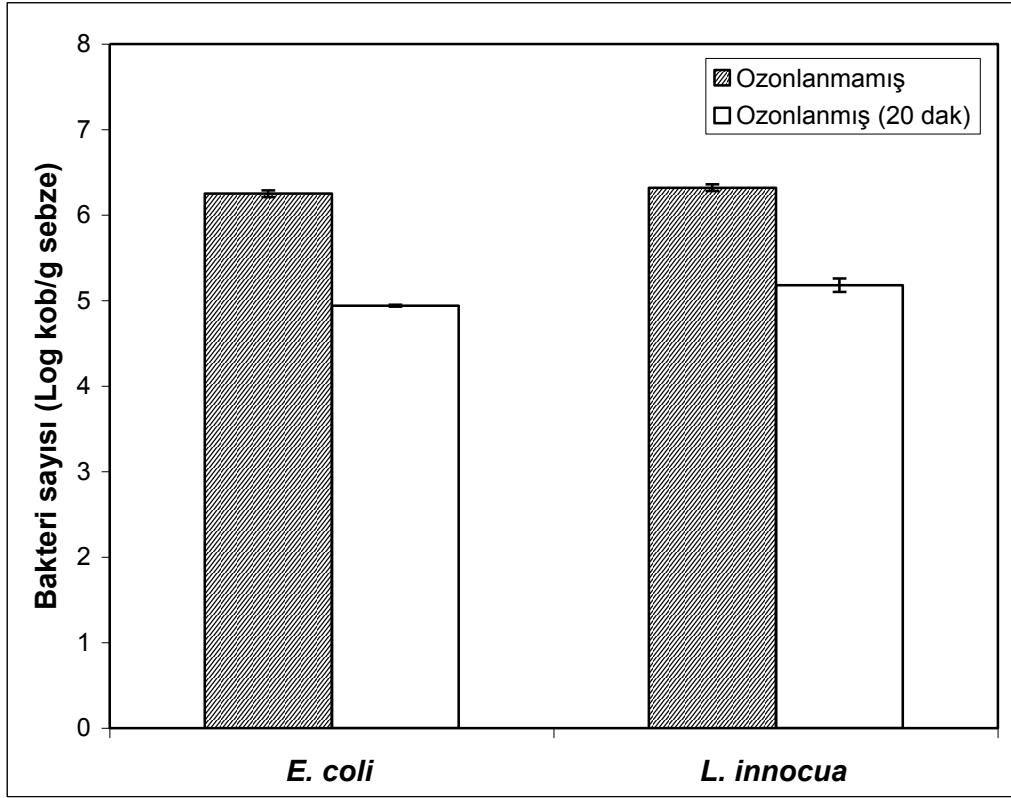
#### 4.4 Gaz Ozon Uygulamasıyla Maydanozlarda Mikrobiyel İnaktivasyon

Sulu (aqueous) ozon uygulamalarının esasen ozon gazının suda çözünürlüğüne dayanması ve bu çözünürlüğün düşük olması, sulu ozon uygulamalarının etkinliğini sınırlayan en önemli faktördür. Buna karşın, dozun duyarlı olarak ayarlanabilir olması nedeniyle sulu ozon uygulamaları endüstride yaygın olarak kullanılmaktadır. Ozon moleküllerinin gaz fazda sıvı fazdakine göre yarı-ömürlerinin daha uzun (Kim vd. 1999) ve difüzyon hızlarının daha yüksek (Vurma vd. 2009) olduğu bilinmektedir. Ozon gazı uygulamaları, ya düşük dozda ozonun (0,1-10 ppm) ürünün depolanması sırasında nispeten uzun süreler (günlerce-aylarca) uygulanmasıyla (Palou vd. 2003) ya da yüksek ozon dozlarının (100-10000 ppm) ürüne daha kısa periyotlarda (dakikalar-saatler) uygulanmasıyla (Gabler vd. 2010) gerçekleştirilebilmektedir. Sıkıştırılıp çok yüksek

konsantrasyonlarda elde edilebilen ve doğası gereği sulu ozon uygulamalarından daha etkili olduğu bilinen ozon gazının gıda sanayisindeki uygulamalarına son yıllarda büyük önem verilmektedir.

Bölüm 3.2.1.3'te anlatılan inokülasyon yöntemi kullanılarak *E. coli* ve *L. innocua* ile inoküle edilen maydanoz örnekleri 950±12 ppm ozon gazı ile 20 dakika muamele edilmiştir. Bu uygulamanın maydanozlardaki *E. coli* ve *L. innocua* mikroorganizmaları üzerine etkisi Şekil 4.12'de görülmektedir.

Sadece 20 dakikalık bir ozon gazı uygulaması maydanoz örneklerindeki *E. coli* sayısında 1,31 logaritmik birimlik bir azalma sağlamıştır ve bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,01$ ). Daha önce de gaz ozon uygulamalarının ıspanak (Klockow ve Keener 2009), yabanmersini (Bialka ve Demirci 2007), kuru incir (Akbaş ve Özdemir 2008), karabiber (Emer vd. 2008) ve antepfıstığı (Akbaş ve Özdemir 2006) gibi çeşitli ürünlerdeki *E. coli* inaktivasyonunda etkili olduğu bildirilmiştir. Singh vd. (2002a) ozon gazının (2,1-7,6 mg/L) *E. coli* O157:H7'ye karşı bakterisidal etkisinin uygulanan ozon dozu ve uygulama süresinin artmasıyla kuvvetlendiğini gözlemişlerdir. Araştırmacılar, 5 ve 10 dakikalık uygulamalarla herhangi bir inaktivasyon gerçekleşmediğini ancak 15 dakikalık uygulamalarla marullarda 0,79–1,79 ve havuçlarda 1,11–2,64 logaritmik birimlik azalmalar sağladıklarını bildirmişlerdir. Ispanaklardaki *E. coli* O157:H7'yi elemine edebilmek için Vurma vd. (2009) vakum soğutma ve ozon gazı uygulamasını kombine etmişler ve bu prosesle mikroorganizma sayısında en çok 2,4 logaritmik birimlik bir azalma sağlamışlardır. Aynı çalışmanın bir başka bölümünde ise 3 gün boyunca 8–16 ppm ozon gazına tabi tutulan ıspanaklarda 1,4 logaritmik birimlik *E. coli* O157:H7 inaktivasyonu meydana gelmiştir.



Şekil 4.12 Ozon gazı uygulamasıyla (950±12 ppm, 20 dakika) maydanozlarda gerçekleşen *E. coli* ve *L. innocua* inaktivasyon düzeyleri

Bu çalışmada maydanozlara inoküle edilen *L. innocua*'nın 20 dakikalık ozon gazı uygulamasıyla 1,14 log kob/g düzeyinde inaktive olduğu ve bu inaktivasyon oranının istatistiksel açıdan önemli olduğu ( $p < 0,01$ ) belirlenmiştir. *Listeria* bakterilerinin ozon gazı uygulamalarıyla inaktive edildiği daha önce model sistem çalışmalarıyla da ortaya konulmuştur. İki *L. monocytogenes* ve bir *L. innocua* suşunu TSA-YE'ye inoküle eden Vaz-Velho vd. (2001) farklı süreler (20–90 dak) ve farklı dozlarda ( $0,10-0,25 \times 10^{-3}$  g/L) ozon gazı uygulaması sonucu mikroorganizmaların sayısında 3,5 logaritmik birime varan azalmalar belirlemişlerdir. Araştırmacılar, inaktivasyon etkinliğinin (yaklaşık 3 logaritmik birim) esasen ozonlamanın ilk 20 dakikasında gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Fan vd. (2007) de PDA ve NA'ya inoküle ettiği *L. innocua* mikroorganizmasına 2 farklı sıcaklıkta (5 ve 20 °C) değişen sürelerde (0–24 saat) ozon gazı (100 nL/L) uygulamışlardır. Araştırmacılar 20 °C'deki inaktivasyon etkisinin 5 °C'dekinden fazla olduğunu tespit etmişlerdir. İki logaritmik birimlik bir azalma için 20 °C'de 1,3 saatlik, 5 °C'de ise 2,5 saatlik bir uygulama gerektiği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda maydanozlardaki *L. innocua* sayısında meydana gelen 1,14 logaritmik birimlik azalma

oda sıcaklığında (~ 22 °C'de) 20 dakikalık gaz ozon uygulaması ile elde edilmiştir. Somon balıklarına inoküle edilen *L. innocua*'yı 20 dakika  $1 \times 10^{-4}$  g/L ozon gazıyla muamele eden Vaz-Velho vd. (2006) yalnızca 1 logaritmik birimlik bir inaktivasyon oranı tespit etmişlerdir. Araştırmacılar ozon gazının bu çalışmadaki sınırlı etkinliğini balıkta ozonla okside olabilen başka maddelerin varlığına bağlamışlardır. Bizim çalışmamızda da ozonlanan maydanozlarda bulunan ve okside olabilen maddeler muhtemelen ozonla elde edilen inaktivasyon oranında etkili olmuştur.

Selma vd. (2008a) mikrobiyel yükü azaltmak amacıyla taze doğranmış meyve ve sebzelerin üretiminde doğrama işlemi öncesi ozon gazının kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca gaz ozon uygulamalarının gıdalarda *E. coli* O157:H7 (Singh vd. 2002a) ve *L. monocytogenes* (Restaino vd. 1995) patojenlerinin inaktivasyonu için sulu ozon uygulamalarından daha etkin olduğu bildirilmiştir. Dikkat edilirse ozon gazı uygulamasında, sulu ozon uygulamasından farklı olarak herhangi bir yıkama ya da suyla akıp gitme etkisi olmaksızın önemli mikrobiyolojik inaktivasyon oranları elde edilmiştir. Bu nedenle gaz ozon uygulaması yıkanamayacak ya da prosesinde yıkama işlemi içermeyen ürünlerde bulaşması muhtemel *E. coli* ve *L. monocytogenes* mikroorganizmalarını elemine etmek için uygun bir işlem olarak önerilebilir.

Ozon gazı uygulamasında ortam nemi çok kritik öneme sahip bir parametredir. Sisteme sürekli bir gaz beslemesi olduğundan, eğer ortam nemi ayarlanmazsa ya da beslemede nemli hava kullanılmazsa ürün gitgide su kaybedecek ve aşırı kuruma sonucu ürün kalitesinde kayıplar oluşacaktır. Ayrıca, ozon ortamında su buharının var olması durumunda ozonun yanı sıra başka oksidatif radikaller (hidroksil, süperoksit ve peroksit radikalleri, singlet oksijen vb.) de oluşacak ve bunlar da mikroorganizma inaktivasyonuna katkıda bulunacaklardır (Klockow ve Keener 2009). İşte bu nedenle, çalışmamızda ozonlama düzeneğine gönderilen gaz öncelikle içi saf su dolu bir gaz yıkama şişesinden geçirilip nemlendirilmiş ve sonra maydanozların bulunduğu düzeneğe gönderilmiştir. Bu yolla, ozonlama düzeneği içerisinde sabit %  $80 \pm 5$  bağıl nem içeriği işlem boyunca (20 dak) korunmuştur.

Ozon, mikroorganizmaların yaşamsal hücre bileşenlerini inaktive ederek antimikrobiyel etkisini gösterir. Bakteri hücresinin yüzeyi ozon için ilk hedefdir. Oksidasyon sonucu hücre zarı geçirgenliği artar, zarda çatlaklar oluşur ve sonunda hücre sağlamlığını/bütünlüğünü kaybedip inaktif olur. Hücre içi proteinlerin ozonla oksidasyonu hızlı mikrobiyel inaktivasyonla sonuçlanır (Zuma vd. 2009). *E. coli* gibi Gram negatif bakteriler, peptidoglikan lamella üzerinde lipoproteinlerden ve polisakkaritlerden oluşan bir dış membran içerirler. Hücre zarının bu ince yapısı ozona karşı zayıf bir direnç gösterdiğinden Gram negatif bakterilerin Gram pozitiflere göre ozonla inaktivasyona karşı daha hassas oldukları ileri sürülmüştür (Maillard 2002). Buna karşın Vaz-Velho vd. (2006) ve Cullen vd. (2010) Gram pozitif bakterilerin Gram negatiflere göre ozona karşı daha duyarlı olduğunu belirtmişlerdir. Restaino vd. (1995) *L. monocytogenes*'in test edilen diğer 3 Gram pozitif bakteriden (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* ve *Bacillus cereus*) ve Gram negatif bakterilerden (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Yersinia enterocolitica*) ozona karşı daha duyarlı olduğunu belirtmiştir. Bizim sonuçlarımız da ozon gazı ile gerek *E. coli*'de gerekse *L. innocua*'da önemli düzeyde inaktivasyon sağlandığını ve iki mikroorganizmanın inaktivasyon oranları arasında sadece küçük bir farklılığın olduğunu göstermiştir.

#### **4.5 Gaz Ozon Uygulamasının Maydanozlardaki Bazı Kimyasal Özellikler Üzerine Etkisi**

Herhangi bir dezenfeksiyon maddesinin/sisteminin teknolojik açıdan “uygun” olabilmesi için üründe sadece mikrobiyel güvenliği sağlaması yeterli değildir. Ayrıca ürünün kalitesine katkıda bulunan bileşenler üzerine de herhangi bir olumsuzluk yaratmaması gerekmektedir. Ozon gibi oksidan maddeler bir yandan mikroorganizma inaktivasyonu ile gıdalarda ürün güvenliğini sağlarken, bir yandan da yüksek oksidasyon kapasitesi nedeniyle üründeki oksidasyona duyarlı bileşiklere zarar verebilir. İşte bu konunun araştırılması amacıyla, önemli düzeyde mikrobiyel inaktivasyon sağlayan ozon gazı uygulamasının maydanoz kalitesine katkıda bulunan belli başlı bileşenler üzerine etkisi tarafımızdan incelenmiştir. Yirmi dakika süreyle uygulanan 950±12 ppm'lik gaz ozon uygulamasının maydanozlardaki klorofil a, klorofil

b, askorbik asit, toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite değerleri üzerine etkisi Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7 Gaz ozon uygulamasının maydanozlardaki bazı kimyasal özellikler üzerine etkisi\*

Kimyasal özellik	Gaz ozon uygulama süresi (dak)	
	0	20
Klorofil a (mg/kg KM)	7917±578 <sup>A</sup>	7772±654 <sup>A</sup>
Klorofil b (mg/kg KM)	3534±145 <sup>A</sup>	3439±252 <sup>A</sup>
Askorbik asit (mg/kg KM)	10047±433 <sup>A</sup>	5979±1069 <sup>B</sup>
Toplam fenolik madde (mg gae/kg KM)	27071±460 <sup>A</sup>	23227±866 <sup>B</sup>
Antioksidan aktivite (µM troloks/g KM)	105±4 <sup>A</sup>	62±9 <sup>B</sup>

\*: İncelenen her bir kimyasal özellik için, farklı harfler (A-B) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0,05).

Tarafımızdan gerçekleştirilen çalışmada kullanılan ozon gazı uygulaması maydanozlardaki klorofil a ve klorofil b miktarlarında istatistiksel açıdan önemli bir değişime yol açmamıştır (p>0,05). Ozon gazının farklı renk maddeleri üzerine etkisi daha önce birçok üründe çalışılmıştır. Örneğin ozonla işlem görmüş domateslerin likopen içeriğinin (Aguayo vd. 2006) ve karotenoid (β-karoten, lutein ve likopen) kompozisyonunun (Tzortzakis vd. 2007) değişmediği bildirilmiştir. Ayrıca çilekteki (Perez vd. 1999, Keutgen ve Pawelzik 2008) ve böğürtlendeki (Barth vd. 1995) antosiyanin pigmentlerinin ozon gazı uygulamasından olumsuz yönde etkilenmediği bildirilmiştir. Bizim üzerinde çalıştığımız yaprak sebzelerdeki baskın renk maddesi olan klorofil pigmenti üzerine ozon gazının etkisi ile ilgili yeterince çalışma bulunmamaktadır. Bununla beraber brokoli (Skog ve Chu 2000), marul (Singh vd. 2002a, Ölmez ve Akbaş 2009), ıspanak (Vurma vd. 2009, Klockow ve Keener 2009) ve *Arabidopsis thaliana* bitkisi (Kubo vd. 1995) gibi pek çok üründe ozon uygulamaları sonrası rengin kaybolması ve yarı saydam bir görünüm oluşması gibi sonuçlar bildirilmiştir. Ancak bu sonuçlar klorofil kaybı verileriyle desteklenmemiştir. Daha şiddetli gaz ozon uygulamalarının turunçgil yaprağı (Iglesias vd. 2006) ve ıspanaklarda (Luwe vd. 1993) yaprak dokusunda büyük zararlanmalara neden olduğu bildirilmiştir. Tarafımızdan 20 dakika süreyle uygulanan 950±12 ppm’lik ozon gazının

maydanozlarda herhangi bir zararlanmaya ve renk kaybına yol açmayan bir uygulama olduğu böylece belirlenmiştir.

Maydanozdaki fenoliklerin ve askorbik asit gibi diğer antioksidan bileşiklerin ozon uygulaması sırasında gerçekleşen oksidasyon reaksiyonlarının doğal substratları oldukları gözlenmiştir. Başlangıçta askorbik asit düzeyi  $10047 \pm 433$  mg/kg KM olan maydanoz örneklerinde askorbik asit düzeyi 20 dakikalık ozon gazı uygulamasının ardından  $5979 \pm 769$  mg/kg KM seviyesine inmiştir. Bu oran yaklaşık %40'lık bir azalmaya karşılık gelir ve istatistiksel açıdan önemlidir ( $p < 0,05$ ). Gaz ozon uygulaması ayrıca toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite değerlerinde de sırasıyla %12 ve %41'lik azalmalara neden olmuştur ( $p < 0,05$ ).

Fenoliklerin ve diğer antioksidatif bileşiklerin oksidasyona karşı duyarlılığında söz konusu bileşiğin niteliği ve hücrede bulunduğu yer hiç şüphesiz çok önemlidir. Balkabağı yapraklarını 150 ppm ozonla 5 gün, günde 5 saat süreyle muamele eden Ranieri vd. (1996) ozon uygulamasının örneklerin iki farklı fraksiyonundaki fenolik bileşikler üzerine etkisini incelemiştir. Araştırmacılar ozon uygulamasının hücre sıvısındaki serbest fenoliklerin miktarını önemli düzeyde azalttığını, ancak kalıntı hücre materyalindeki serbest ve glikozide bağlı fenoliklerin miktarında bir artışa neden olduğunu bildirmiştir. Wiese ve Pell (2003) de domatesin hücre duvarında bulunan fenolik bileşiklerin ozonla oksidasyona karşı farklı hassasiyet gösterdiğini ve hücre duvarına bağlı benzaldehit izomerlerinin düzeyinin ozon uygulamasıyla azaldığını bildirmiştir.

Ozon, bitki dokusuna stomata (gözenek) kısmından girer ve hücrenin apoplast sıvısındaki bileşenlerle reaksiyona girerek aktif oksijen türlerini (hidroksil radikaller, süperoksit anyonlar ve hidrojen peroksit) oluşturur. Bu aktif oksijen türleri ve ozon, hücrenin oksidasyona karşı hassas biyomoleküllerini okside eder. Nitekim turunçgil yapraklarının antioksidan bileşiklerinde (Iglesias vd. 2006) ve çileklerin fenolik madde içeriklerinde (Allende vd. 2007b) ozon uygulamalarıyla bazı azalmalar olduğu bildirilmiştir. Tzortzakakis vd. (2007) ozon gazına ( $1 \mu\text{mol/mol}$  hava) maruz bırakılan domateslerde antioksidan kapasitenin değişmediğini ve fenolik madde içeriğinde

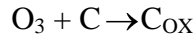
gözlenen düşüşün de istatistiksel olarak önemli olmadığını bildirmiştir. Ayrıca ozon gazı uygulaması çileklerin (Keutgen ve Pawelzik 2008) ve yabamersinlerinin (Song vd. 2003) toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktivite değerlerinde herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır.

Askorbik asit degradasyonu, üründe kalite kaybına yol açan ve ürünün raf ömrünü sınırlayan önemli reaksiyonlardandır. Ozon gibi yüksek oksidasyon kapasiteli bir ajanla muamele gören ürünlerde askorbik asit gibi antioksidan bileşiklerin kaybı söz konusudur. Nitekim ozon uygulamalarının gerçekleştirdiğimiz bu çalışmanın sonuçlarına paralel olarak pirinç yaprakları (Imai ve Kobori 2008) ve çileklerde (Allende vd. 2007b) askorbik asit seviyesini düşürdüğü bildirilmiştir.

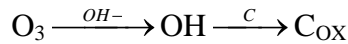
Yüksek reaktif özelliği ve stabil olmaması nedeniyle ozonun organik maddelerle nasıl bir reaksiyon vereceğini kestirmek bir hayli güçtür. Askorbik asit degradasyonunun hem oksidatif hem de oksidatif olmayan mekanizmalarla gerçekleşebildiği bilinmektedir (Tiwari vd. 2008). Moleküler ozonun verdiği reaksiyonlar selektiftir ve doymamış aromatik ve alifatik bileşiklerle sınırlıdır. Ozon; askorbat ile, yağ asitlerinin doymamış bağlarıyla verdiği reaksiyondan daha hızlı bir reaksiyon verir. Ozonun askorbat, fumarat ve oleat ile verdiği reaksiyonların biyomoleküler hız sabitleri sırasıyla 210000, 60000 ve 68000 m<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>'dir (Luwe vd. 1993).

Ozon organik maddeleri iki yolla okside edebilir:

i) Ozon molekülünün doğrudan oksidasyonu



ii) Hidroksil iyonları gibi seçici olmayan ve güçlü serbest radikaller oluşturarak



Garcia-Viguera ve Bridle (1999) tarafından model sistemlerde gerçekleştirilen bir çalışmaya göre askorbik asit degradasyonunda serbest radikal mekanizmasının etkin olması daha olasıdır. Ozon, yaprak hücresine bitkinin açık olan stomata bölgelerinden girip apoplast içine difüze olur. Burada süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi serbest radikallerin oluşumuna yol açar.

Dehidroaskorbik asit, askorbik asidin bir oksidasyon ürünüdür ve o da biyolojik aktiviteye sahip olduğundan vitamin özelliği gösterir. Dehidroaskorbik asit ya yükseltgenip tekrar askorbik aside dönüşür, ya da geri dönüşümsüz bir şekilde okside olup vitamin özelliği göstermeyen diketogulonik aside dönüşür (Davey vd. 2000). Kimyasallara maruz kalmak gibi stres koşullarında askorbik asidi dehidroaskorbik aside dönüştüren askorbat oksidaz enziminin aktivitesi artar (Lee ve Kader 2000). Askorbik asit, güçlü bir oksidan bileşikle kolayca dehidroaskorbik aside dönüştüğünden, tarımsal ürünlerin C vitamini içeriğinden bahsedebilmek için hem askorbik asit hem de dehidroaskorbik asit miktarlarının belirlenmesi gerekmektedir.

Ozonla zenginleştirilmiş atmosferde yetiştirilen çileklerde askorbik asit düzeyinin düşük olduğu, dehidroaskorbik asit düzeyinin ise kontrol örneklerinininkinden farklı olmadığı bildirilmiştir (Keutgen ve Pawelzik 2008). Kenny ve O'Beirne (2009) askorbik asit azalması belirlediği marul örneklerinde hiç dehidroaskorbik asit saptamamışlardır. Luwe vd. (1993) serada saksılarda yetiştirdiği ıspanakları 24 saat 0,3 µL/L ozonla muamele etmişlerdir. Bitkinin apoplastındaki askorbik asit konsantrasyonu 420 nmol/cm<sup>3</sup>'ten 50 nmol/cm<sup>3</sup> seviyesine düşerken dehidroaskorbik asit konsantrasyonu ozonlama süresince sürekli artmıştır. Ozonlamanın durdurulmasıyla dehidroaskorbik asit konsantrasyonu azalmaya başlamış ve belli bir süre sonra kontrol örnekleriyle aynı seviyeye gelmiştir. Ancak ozonlanan yapraklardaki askorbik asit seviyesi ozonlamanın durdurulmasının ardından yükselmemiştir. Askorbik asidin ozonla degradasyonu ile gerçekleşen bu karmaşık reaksiyonların tam olarak aydınlatılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Ozonlama uygulanan maydanozlarda %40 askorbik asit ve %41 toplam antioksidan aktivite kaybı söz konusudur. Askorbik asidin maydanozlarda kütleye en çok bulunan antioksidan bileşik olduğu bilindiğinden (Lisiewska ve Kmiecik 1997) maydanozlardaki toplam antioksidan kapasiteye askorbik asidin katkısının yüksek olacağını söylemek yanlış olmayacaktır. Bu durumda, ozon gazıyla muamele gören maydanozların askorbik asit içeriğindeki kayıpla toplam antioksidan aktivite değerinin azalması arasındaki ilişki tutarlıdır. Bununla beraber, Luwe vd. (1993) ıspanak yapraklarına gönderilen ozon akımıyla sebzenin apoplastındaki askorbatın azalma oranı arasında büyük bir farklılık

tespit etmiştir. Araştırmacılara göre bu durum, ozonun sadece askorbatla değil, diğer hücrenel bileşenlerle de reaksiyona girdiğini göstermektedir. Maydanozlarda da antioksidan özellik gösteren tek bileşik askorbik asit olmadığından, fenolikler ve karotenoidler gibi diğer bazı bileşenlerin de ozonla reaksiyona girmiş olabileceği söylenebilir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, ayıklanıp doğranmış marul, ıspanak ve maydanozlara inoküle edilmiş *E. coli* ve *L. innocua* inaktivasyonunda ozonlu suyla ( $12,0\pm 0,5$  ppm) yıkama uygulamasının etkinliği ve bu uygulamanın söz konusu sebzelerin klorofil a, klorofil b, askorbik asit ve toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktivite değerleri üzerine etkisi incelenmiştir. Ozonlu suyla yıkama ile elde edilen sonuçlar, saf su ve klorlu su (100 ppm) uygulamalarından elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Buna ilaveten, farklı dezenfektanlarla muamele edilen maydanozlarda *E. coli* ve *L. innocua* mikroorganizmalarının gelişimleri ile örneklerin klorofil, askorbik asit ve toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktivite değerleri 15 günlük soğuk depolama ( $5\pm 1$  °C) süresince izlenmiştir. Ayrıca ozon gazı uygulamasının ( $950\pm 12$  ppm, 20 dakika) maydanozlarda *E. coli* ve *L. innocua* inaktivasyonundaki etkinliği ve bu uygulamanın klorofil, askorbik asit ve toplam fenolik madde içerikleri ve antioksidan aktivite değerleri üzerine etkisi belirlenmiştir. Araştırmadan elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

(1) Gerek 5 dakikalık, gerekse 15 dakikalık ozonlu su uygulamalarının incelenen her üç sebze de mikrobiyel inaktivasyon sağlamada etkili olduğu belirlenmiştir. Ozonlu suyla muamele süresi arttıkça, test edilen her iki mikroorganizmanın inaktivasyonu genel olarak artmıştır. Ozonlu suyla gerçekleşen en yüksek *E. coli* ve *L. innocua* inaktivasyonu, 15 dakikalık muameleler sonucunda sırasıyla 2,22 ve 2,24 logaritmik birim seviyesinde marul örneklerinde gerçekleşmiştir.

(2) Distile suyla yıkama uygulaması sonucu her üç sebze de mikroorganizma sayılarında sınırlı bir azalış (yaklaşık 1 logaritmik birim) gözlenirken, her iki mikroorganizma için en yüksek inaktivasyon oranları klorlu su ile muameleler sonucu elde edilmiştir. Klor uygulaması her 3 sebze de *E. coli* sayısında yaklaşık 3 logaritmik birim, *L. innocua* sayısında ise yaklaşık 2,2 log birimlik azalmalar sağlamıştır.

(3) *L. innocua* inaktivasyonunda ozonun performansı klorunkine son derece yakın bulunmuştur. Maydanoz örneklerinin klorlu ve ozonlu suyla yıkanması ile elde edilen inaktivasyon oranları (sırasıyla 2,23 ve 2,19 logaritmik birim) arasındaki fark

istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ( $p<0,05$ ). Bu sonuçlar; ozonun, klorun yerine geçebilecek kadar etkin (özellikle *Listeria* spp. açısından) ve klor uygulamalarından kaynaklanan toksik kalıntı problemini ortadan kaldırabilecek güvenli bir dezenfektan olarak kullanılabilceğini göstermektedir.

(4) Farklı yıkama uygulamalarının; marul, ıspanak ve maydanozlarda incelenen kimyasal özellikler üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bu durumun istisnası olabilecek tek sonuç, klorlu su uygulamalarının yaprak sebzelerin toplam fenolik madde içeriğini azaltması ve meydana gelen bu azalmanın ıspanak örneklerinde istatistiksel açıdan önemli olmasıdır ( $p<0,05$ ). Bu sonuç, gıda sanayisinde yıkama uygulamalarında sıklıkla kullanılan klorun uygulanmasında doz ve süre parametrelerine çok dikkat edilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

(5) Farklı yıkamalar uygulanıp 5 °C’de depolanan maydanozlarda *E. coli* sayılarının tüm örneklerde depolama boyunca azaldığı belirlenmiş, *L. innocua* sayılarında ise depolama süresince önemli bir değişiklik görülmemiştir. Bu durum, düşük depolama sıcaklıklarında bile canlılığını ve gelişmesini sürdürebilen *Listeria* cinsi bakterilerden kaynaklanan tehlikeyi gözler önüne sermektedir.

(6) Maydanozlardaki klorofil a, klorofil b, askorbik asit ve toplam fenolik madde içerikleri ile antioksidan aktivite değerleri depolama süresince azalmıştır. Bu durum bitkinin hasat sonu fizyolojisinin doğal bir sonucudur ve bu prosesinin mümkün olduğunca yavaş ilerlemesi için depolamadaki sıcaklık ve nem parametrelerinin sürekli kontrol altında tutulması gerekmektedir.

(7) Maydanoz örneklerine 20 dakika süreyle uygulanan 950±12 ppm konsantrasyondaki ozon gazı *E. coli* sayısında 1,31, *L. innocua* sayısında 1,14 logaritmik birimlik azalmalar sağlamıştır. Herhangi bir yıkama (suyla akıp gitme) etkisi olmaksızın bu kadar kısa sürede gerçekleşen bu inaktivasyon oranları, gaz ozon uygulamasının mikroorganizmaları elemine etmedeki gücünü ortaya koymaktadır. Gaz ozon uygulaması, yıkanamayacak ya da prosesinde yıkama işlemi içermeyen ürünlerde

bulaşması muhtemel *E. coli* ve *L. monocytogenes* mikroorganizmalarını elemine etmek için önerilebilir.

(8) Ozon gazı uygulaması maydanozlarda klorofil düzeylerinde herhangi bir olumsuzluğa yol açmazken, askorbik asit ve toplam fenolik madde içerikleri ile antioksidan aktivite değerinde sırasıyla %40, %12 ve %41 düzeyinde azalmalara neden olmuştur. Bu durum, maydanozdaki fenolikler ve askorbik asit gibi antioksidan bileşiklerin ozon uygulaması sırasında gerçekleşen oksidasyon reaksiyonlarının doğal substratları olduğunu göstermiştir.

(9) Herhangi bir dezenfeksiyon maddesinin/sisteminin teknolojik açıdan “uygun” olabilmesi için üründe sadece mikrobiyel güvenliği sağlaması yeterli değildir. Ayrıca ürünün kalitesine katkıda bulunan bileşenler üzerine de herhangi bir olumsuzluk yaratmaması gerekmektedir. Bu nedenle, suda çözünen ozon ve gaz ozon düzeylerinin maksimum mikrobiyel inaktivasyon sağlarken ürünün kalite özelliklerine ve besleyici unsurlarına zarar vermeyecek şekilde optimize edilmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Achen, M. and Yousef, A.E. 2001. Efficacy of ozone against *Escherichia coli* O157:H7 on apples. *Journal of Food Science*, 66, 1380-1384.
- Achers, M.L., Mahon, B.E., Leahy, E., Goode, B., Damrow, T., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Rice, D.H., Barrett, T.J., Hutwagner, L., Griffin, P.M. and Slutsker, L. 1998. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. *The Journal of Infectious Diseases*, 177, 1588-1593.
- Adams, M.R., Hartley, A.D. and Cox, L.J. 1989. Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads. *Food Microbiology*, 6, 69-77.
- Aguayo, E., Escalona, V.H. and Artes, F. 2006. Effect of cyclic exposure to ozone gas on physicochemical, sensorial and microbial quality of whole and sliced tomatoes. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 169-177.
- Akbaş, M.Y. and Ölmez, H. 2007. Effectiveness of organic acid, ozonated water and chlorine dippings on microbial reduction and storage quality of fresh-cut iceberg lettuce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2609-2616.
- Akbaş, M.Y. and Özdemir, M. 2006. Effectiveness of ozone for inactivation of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* in pistachios. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 513-519.
- Akbaş, M.Y. and Özdemir, M. 2008. Application of gaseous ozone to control populations of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Bacillus cereus* spores in dried figs. *Food Microbiology*, 25, 386-391.
- Allende, A., Tomas-Barberan, F.A. and Gil, M.I. 2006. Minimal processing for healthy traditional foods. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 513-519.
- Allende, A., Martinez, B., Selma, V., Gil, M.I., Suarez, J.E. and Rodriguez, A. 2007a. Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce. *Food Microbiology*, 24, 759-766.
- Allende, A., Marin, A., Buendía, B., Tomas-Barberan, F. and Gil, M.I. 2007b. Impact of combined postharvest treatments (UV-C light, gaseous O<sub>3</sub>, superatmospheric O<sub>2</sub> and high CO<sub>2</sub>) on health promoting compounds and shelf-life of strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, 46, 201-211.
- Anonymous. 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (18th edition): 4500-O<sub>3</sub>. "Indigo Colorimetric Method", APHA: American Public Health Association, Washington DC, WC, ABD.

- Anonymous. 2001. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption. Federal Register, Rules and Regulations June 26, Volume: 66, Number: 123, Sec.: 173.368 Ozone, Final Rule.
- Anonymous. 2002. Surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe 8th report 1999-2000, Country Reports: Turkey, WHO: World Health Organization, 1-4.
- Anonymous. 2005. Bromate in drinking-water. WHO/SDE/WSH/05.08/78. World Health Organization, 1-16. [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/chemicals/bromate030406.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/bromate030406.pdf). Erişim Tarihi: 23.09.2010.
- Anonymous. 2007. Guide to minimize microbial food safety hazards of fresh-cut fruits and vegetables. United States Department of Agriculture, Food and Drug Administration, FDA. <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/prodgui3.html>. Erişim Tarihi: 25.06.2007.
- Anonymous. 2008a. MyPyramid Food Guide-Vegetable Subgroups. United States Department of Agriculture, CNPP: Center for Nutrition Policy and Promotion, [http://www.mypyramid.gov/pyramid/vegetables\\_print.html](http://www.mypyramid.gov/pyramid/vegetables_print.html). Erişim Tarihi: 15.06.2008.
- Anonymous. 2008b. National ambient air quality standards for ozone. EPA: Environmental Protection Agency, 40 CFR, Parts 50&58.
- Artes-Hernandez, F., Escalona, V.H., Robles, P.A., Martinez-Hernandez, G.B. and Artes, F. 2009. Effect of UV-C radiation on quality of minimally processed spinach leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 414-421.
- Aytaç S.A., Ben, U., Cengiz C. and Taban, B.M. 2010. Evaluation of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* contamination on leafy green vegetables. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 8, 275-279.
- Babic, I., Amiot, M.J., Nguyenthe, C. and Aubert, S. 1993. Changes in phenolic content in fresh ready-to-use shredded carrots during storage. *Journal of Food Science*, 58, 351-356.
- Barth, M.M., Zhou, C., Mercier, J. and Payne, F.A. 1995. Ozone storage effects on anthocyanin content and fungal growth in blackberries. *Journal of Food Science*, 60, 1286-1288.
- Barry-Ryan, C. and O'Beirne, D. 1999. Ascorbic acid retention in shredded iceberg lettuce as affected by minimal processing. *Journal of Food Science*, 64, 498-500.
- Baur, S. Klaiber, R.G., Koblo, A. and Carle, R. 2004. Effect of different washing procedures on phenolic metabolism of shredded, packaged iceberg lettuce during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7017-7025.

- Beltran, D., Selma, M.V., Marin, A. and Gil, M.I. 2005. Ozonated water extends the shelf life of fresh-cut lettuce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5654-5663.
- Berrang, M.E., Brackett, R.E. and Beuchat, L.R. 1989. Growth of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under controlled atmosphere. *Journal of Food Protection*. 52, 702-705.
- Beuchat, L.R., Brackett, R.E. Hao, D.Y.Y and Conner, D.E. 1986. Growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. *Canadian Journal of Microbiology*, 32, 791-795.
- Beuchat, L.R. 1996. *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. *Food Control*, 7, 223-228.
- Beuchat, L.R. 1999a. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: A review. [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/surface\\_decon.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/surface_decon.pdf). Erişim Tarihi: 25.06.2010
- Beuchat, L.R. 1999b. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces applied to lettuce and the effectiveness of chlorinated water as a disinfectant. *Journal of Food Protection*, 62, 845-849.
- Beuchat, L.R., Chmielewski, R., Keswani, J., Law, S.E. and Frank, J.F. 1999. Inactivation of aflatoxigenic *Aspergilli* by treatment with ozone. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 202-205.
- Beuchat, L.R. and Brackett, R.E. 1990. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by shredding, chlorine treatment, modified atmosphere packaging and temperature. *Journal of Food Science*, 55, 755-758.
- Bialka, K.L. and Demirci, A. 2007. Decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on blueberries using ozone and pulsed UV-Light. *Journal of Food Science*, 72, 391-396.
- Bolin, H.R. and Huxsoll, C.C. 1991. Effect of preparation procedures and storage parameters on quality retention of salad-cut lettuce. *Journal of Food Science*, 56, 60-62.
- Brackett, R.E. 1987. Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 50, 999-1003.
- Brackett, R.E. 1999. Incidence, contributing factors, and control of bacterial pathogens in produce. *Postharvest Biology and Technology*, 15, 305-311.
- Brand-Williams, W. Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28, 25-30.

- Cantos, E., Espin, J.C. and Tomas-Barberan, F.A. 2001. Effect of wounding on phenolic enzymes in six minimally processed lettuce cultivars upon storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 322-330.
- Carlin, F., Nguyenthe, C. and Dasilva, A.A. 1995. Factors affecting the growth of *Listeria monocytogenes* on minimally processed fresh endive. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 636-646.
- Chaidez, C., Lopez, J., Vidales, J. and Castro-Del Campo, N. 2007. Efficacy of chlorinated and ozonated water in reducing *Salmonella typhimium* attached to tomato surfaces. *International Journal of Environmental Health Research*, 17, 311-318.
- Chernomorsky, S., Segelman, A. and Poretz, R.D. 1999. Effect of dietary chlorophyll derivatives on mutagenesis and tumor cell growth. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 19, 313-322.
- Cullen, P.J., Valdramidis, V.P., Tiwari, B.K., Patil, S., Bourke, P. and O'Donnell, C.P. 2010. Ozone processing for food preservation: an overview on fruit juice treatments. *Ozone Science and Engineering*, 32, 166-179.
- Das, B.K. and Kim, J.G. 2010. Microbial quality and safety of fresh-cut broccoli with different sanitizers and contact times. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 363-369.
- Davey, M.W., Van Montagu, M., Inze, D., Sanmartin, M., Kannellis, A., Smirnov, N., Benzie, I.J.J., Strain, J.J., Favell, D. and Fletcher, J. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 825-860.
- Degl'Innocenti, E., Pardossi, A., Tognoni, F. and Guidi, L. 2007. Physiological basis of sensitivity to enzymatic browning in lettuce, escarole and rocket salad when stored as fresh-cut products. *Food Chemistry*, 104, 209-215.
- Ekici, K., İşleyici, Ö. ve Sağun, E. 2004. Süt ve süt ürünlerinde *Listeria monocytogenes* varlığı. *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15, 97-101.
- Emer, Z., Akbaş, M.Y., Özdemir, M. 2008. Bactericidal activity of ozone against *Escherichia coli* in whole and ground black-peppers. *Journal of Food Protection*, 71, 914-917
- Erkmen, O. 2001. Uses of ozone to improve the safety and quality of foods. *Gıda Teknolojisi*, 5, 58-64.
- Esteve, M.J., Farre, R., Frigola, A. and Clemente, G. 1995. Changes in ascorbic acid content of green asparagus during the harvesting period and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2058-2061.

- Farber, J.M., Wang, S.L., Cai, Y. and Zhang, S. 1998. Changes in populations of *Listeria monocytogenes* inoculated on fresh-cut vegetables. *Journal of Food Protection*, 61, 192-195.
- Fan, L., Song, J., Mcrae, K.B., Walker, B.A. and Sharpe, D. 2007. Gaseous ozone treatment inactivates *Listeria innocua* in vitro. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2657-2663.
- Ferrante, A., Incrocci, L., Maggini, R., Serra, G. and Tognoni, F. 2004. Colour changes of fresh-cut leafy vegetables during storage. *International Journal of Food, Agriculture and Environment*, 2, 40-44.
- Fukumoto, L.R. Toivonen, P.M.A. and Delaquis, P.J. 2002. Effect of wash water temperature and chlorination on phenolic metabolism and browning of stored iceberg lettuce photosynthetic vascular tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4503-4511.
- Gabler, F.M., Smilanick, J.L., Mansour, M.F. and Karaca, H. 2010. Influence of fumigation with high concentrations of ozone gas on postharvest gray mold and fungicide residues on table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 55, 85-90.
- Garcia-Viguera, C. and Bridle, P. 1999. Influence of structure on colour stability of anthocyanins flavylum salts with ascorbic acid. *Food Chemistry*, 64, 21-26.
- Gil, M.I., Ferreres, F. and Tomas-Barberan F.A. 1998. Effect of modified atmosphere packaging on the flavonoids and vitamin C content of minimally processed Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cykla*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2007-2012.
- Gleeson, E. and O'Beirne, D. 2005. Effects of process severity on survival and growth of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. *Food Control*, 16, 677-685.
- Gomella, C. 1972. Ozone practice in France. *Journal of the American Water Works Association*, 64, 39-46.
- Gomez-Lopez, V.M., Rajkovic, A., Ragaert, P., Smigic, N. and Devlieghere, F. 2009. Chlorine dioxide for minimally processed produce preservation: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 17-26.
- Gopal, A., Coventry, J., Wan, J., Roginski, H. and Ajlouni, S. 2010. Alternative disinfection techniques to extend the shelf life of minimally processed iceberg lettuce. *Food Microbiology*, 27, 210-219.
- Gornicki, K. and Kaleta, A. 2007. Modelling convection drying of blanched parsley root slices. *Biosystems Engineering*, 97, 51-59.

- Graham, D.M. 1997. Use of ozone for food processing. *Food Technology*, 51, 72-75.
- Gupta, S. and Prakash, J. 2009. Studies on Indian green leafy vegetables for their antioxidant activity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64, 39-45.
- Güzel-Seydim, Z.B., Greene, A.K. and Seydim, A.C. 2004. Use of ozone in the food industry. *Food Science and Technology*, 37, 453-460.
- Halkman, A.K., Noveir, M.R. ve Doğan H.B. 2001. *Escherichia coli* O157:H7 Serotipi. Sim Matbaacılık Ltd. Şti., 44 s., Ankara.
- Halkman, D.H.B., Cakir, I., Keven, F., Worobo, R.W. and Halkman, A.K. 2003. Relationship among fecal coliforms and *Escherichia coli* in various foods. *European Food Research and Technology*, 214, 331-334.
- Halkman, A.K. 2005. Gıda Mikrobiyolojisi Uygulamaları. Başak Matbaacılık ve Tanıtım Hizmetleri Ltd. Şti., 358 s., Ankara.
- Han, Y., Sherman, D.M., Linton, R.H., Nielsen, S.S. and Nelson, P.E. 2000. The effects of washing and chlorine dioxide gas on survival and attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to green pepper surfaces. *Food Microbiology*, 17, 521-533.
- Hassenberg, K. and Idler, C. 2005. Influence of washing method on the quality of prepacked iceberg lettuce. *Agricultural Engineering International (the CIGR E-journal, Manuscript FP 05 003) Vol VII, November 2005*, 1-8.
- Hassenberg, K., Frohling, A., Geyer, M., Schluter, O. and Herppich, W.B. 2008. Ozonated wash water for inhibition of *Pectobacterium carotovorum* on carrots and the effect on the physiological behaviour of produce. *European Journal of Horticultural Science*, 73, 37-42.
- Ho, J.L., Shands, K.N., Friedland G., Eckind, P. and Fraser D.W. 1986. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston Hospitals. *Archives of Internal Medicine*, 146, 520-524.
- Iglesias, D.J., Calatayud, A., Barreno, E., Primo-Millo, E. and Talon, M. 2006. Responses of citrus plants to ozone: leaf biochemistry, antioxidant mechanisms and lipid peroxidation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 125-131.
- Imai, K. and Kobori, K. 2008. Effects of the interaction between ozone and carbon dioxide on gas exchange, ascorbic acid content, and visible leaf symptoms in rice leaves. *Photosynthetica*, 46, 387-394.
- Isabelle, M., Lee, B.L., Lim, M.T., Koh, W.P., Huang, D.J. and Ong, C.N. 2010. Antioxidant activity and profiles of common vegetables in Singapore. *Food Chemistry*, 120, 993-1003.

- Kagkli, D.M., Iliopoulos, V., Stergiou, V., Lazaridou, A. and Nychas, G.J. 2009. Differential *Listeria monocytogenes* strain survival and growth in Katiki, a traditional Greek soft cheese, at different storage temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 3621-3626.
- Kallander, K.D., Hitchins, A.D., Lancette, G.A., Schmiege, J.A., Garcia, G.R., Solomon, H.M. and Sofos, J.N. 1991. Fate of *Listeria monocytogenes* in shredded cabbage stored at 5 °C and 25 °C under a modified atmosphere. *Journal of Food Protection*, 54, 302-304.
- Kalt, W. 2005. Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 70, 11-19.
- Karaca, H. and Velioglu, Y.S. 2007. Ozone applications in fruit and vegetable processing. *Food Reviews International*, 23, 91-106.
- Karaca, H. and Velioglu, Y.S. 2009. Effects of some metals and chelating agents on patulin degradation by ozone. *Ozone Science and Engineering*, 31, 224-231.
- Karaca, H., Velioglu, Y.S. and Nas, S. 2010. Mycotoxins: contamination of dried fruits and degradation by ozone. *Toxin Reviews*, 29, 51-59.
- Kauppi, K.L., O'Sullivan, D.J. and Tatini, S.R. 1998. Influence of nitrogen source on low temperature growth of verotoxigenic *Escherichia coli*. *Food Microbiology*, 15, 355-364.
- Kenny, O. and O'Beirne, D. 2009. The effects of washing treatment on antioxidant retention in ready-to-use iceberg lettuce. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1146-1156.
- Keutgen, A.J. and Pawelzik, E. 2008. Influence of preharvest ozone exposure on quality of strawberry fruit under simulated retail conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 10-18.
- Kevers, C., Falkowski, M., Tabart, J., Defraigne, J.O., Dommes, J. and Pincemail, J. 2007. Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8596-8603.
- Kim, J.G. 1998. Ozone as an antimicrobial agent in minimally processed foods. Ph.D. thesis, The Ohio State University, 225 p., Columbus, OH, ABD.
- Kim, J.G., Yousef, A.E. and Dave, S. 1999. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. *Journal of Food Protection*, 62, 1071-1087.
- Kim, J.G., Yousef, A.E. and Khadre, M.A. 2003. Ozone and its current and future application in the food industry. *Advances in Food and Nutrition Research*, 45, 167-218.

- Kim, H.J., Fonseca, J.M., Kubota, C. and Choi, J.H. 2007. Effect of hydrogen peroxide on quality of fresh-cut tomato. *Journal of Food Science*, 72, 463-467.
- Klaiber, R.G., Baur, S., Magel, L., Hammes, W.P. and Carle, R. 2004. Quality of shredded, packaged carrots as affected by different washing treatments. *Journal of Food Science*. 69, 161-166.
- Klaiber, R.G., Baur, S., Koblo, A. and Carle, R. 2005. Influence of washing treatment and storage atmosphere on phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic acid content of minimally processed carrot sticks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1065-1072.
- Klockow, P.A. and Keener, K.M. 2009. Safety and quality assessment of packaged spinach treated with a novel ozone-generation system. *Food Science and Technology*, 42, 1047-1053.
- Koseki, S. and Isobe, S. 2006. Effect of ozonated water treatment on microbial control and on browning of iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Food Protection*, 69, 154-160.
- Kovacik, J., Klejdus, B., Backor, M. and Repcak, M. 2007. Phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic compounds accumulation in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* leaf rosettes. *Plant Science*, 172, 393-399.
- Kubo, A., Saji, H., Tanaka, K. and Kondo, N. 1995. Expression of arabidopsis cytosolic ascorbate peroxidase gene in response to ozone or sulfur dioxide. *Plant Molecular Biology*, 29, 479-489.
- Kuşçu, A. ve Pazır, F. 2004. Gıda endüstrisinde ozon uygulamaları. *Gıda*, 29, 123-129.
- Lee, S.Y. and Baik, S.Y. 2008. Effect of chemical sanitizer combined with modified atmosphere packaging on inhibiting *Escherichia coli* O157:H7 in commercial spinach. *Food Microbiology*, 25, 582-587.
- Lee, S.K. and Kader, A.A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 207-220.
- Li, Y., Brackett, R.E, Chen, J.R. and Beuchat, L.R. 2001. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated onto cut lettuce before or after heating in chlorinated water, followed by storage at 5 or 15 °C. *Journal of Food Protection*, 64, 305-309.
- Li, Y., Brackett, R.E, Chen, J.R. and Beuchat, L.R. 2002. Mild heat treatment of lettuce enhances growth of *Listeria monocytogenes* during subsequent storage at 5 °C or 15 °C. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 269-275.

- Lisiewska, Z. and Kmiecik, W. 1997. Effect of freezing and storage on quality factors in Hamburg and leafy parsley. *Food Chemistry*, 60, 633-637.
- Lopez-Galvez, F., Allende, A., Selma, M.V. and Gil, M.I. 2009. Prevention of *Escherichia coli* cross-contamination by different commercial sanitizers during washing of fresh-cut lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 133, 167-171.
- Lopez-Galvez, F., Allende, A., Truchado, P., Martinez-Sanchez, A., Tudela, J.A., Selma, M.V. and Gil, M.I. 2010. Suitability of aqueous chlorine dioxide versus sodium hypochlorite as an effective sanitizer for preserving quality of fresh-cut lettuce while avoiding by-product formation. *Postharvest Biology and Technology*, 55, 53-60.
- Luo, Y., He, Q., McEvoy, J.L. and Conway, W.S. 2009. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in the presence of indigenous microorganisms on commercially packaged baby spinach, as impacted by storage temperature and time. *Journal of Food Protection*, 72, 2038-2045.
- Luwe, M.W.F., Takahama, U. and Heber, U. 1993. Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiology*, 101, 969-976.
- Maillard, J.Y. 2002. Bacterial target sites for biocide action. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 16-27.
- Martinez-Sanchez, A., Allende, A., Bennett, R.N., Ferreres, F. and Gil, M.I. 2006. Microbial, nutritional and sensory quality of rocket leaves as affected by different sanitizers. *Postharvest Biology and Technology*, 42, 86-97.
- Meir, S., Kanner, J., Akiri, B. and Philosoph-Hadas, S. 1995. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defence systems of various senescing leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1813-1819.
- Mir, J., Morato, J. and Ribas, F. 1997. Resistance to chlorine of freshwater bacterial strains. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 7-18.
- Nadas, A., Olmo, M. and Garcia, J.M. 2003. Growth of *Botrytis cinerea* and strawberry quality in ozone-enriched atmospheres. *Journal of Food Science*, 68, 1798-1802.
- Naimi, T.S., Wicklund, J.H., Olsen, S.J., Krause, G., Wells, J.G., Bartkus, J.M., Boxrud, D.J., Sullivan, M., Kassenborg, H., Besser, J.M., Mintz, E.D., Osterholm, M.T. and Hedberg, C.W. 2003. Concurrent outbreaks of *Shigella sonnei* and enterotoxigenic *Escherichia coli* infections associated with parsley: Implication for surveillance and control of foodborne illness. *Journal of Food Protection*, 66, 535-541.

- Negishi, T., Rai, H. and Hayatsu, H. 1997. Antigenotoxic activity of natural chlorophylls. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 376, 97-100.
- Nunes, M.C.N. and Emond, L.P. 1999. Chlorinated water treatments affects postharvest quality of green bell peppers. *Journal of Food Quality*, 22, 353-361.
- Ölmez, H. and Akbaş, M.Y. 2009. Optimization of ozone treatment of fresh-cut green leaf lettuce. *Journal of Food Engineering*, 90, 487-494.
- Ölmez, H. 2010. Effect of different sanitizing methods and incubation time and temperature on inactivation of *Escherichia coli* on lettuce. *Journal of Food Safety*, 30, 288-299.
- Ölmez, H. and Temur, S.D. 2010. Effects of different sanitizing treatments on biofilms and attachment of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on green leaf lettuce. *Food Science and Technology*, 43, 964-970.
- Öztekin, S., Zorlugenç, B. and Zorlugenç, F.K. 2006. Effects of ozone treatment on microflora of dried figs. *Journal of Food Engineering*, 75, 396-399.
- Palou, L., Smilanick, J.L., Crisosto, C.H. and Mansour, M. 2001. Effect of gaseous ozone exposure on the development of green and blue molds on cold stored citrus fruit. *Plant Disease*, 85, 632-638.
- Palou, L., Crisosto, C.H., Smilanick, J.L., Adaskaveg, J.E. and Zoffoli, L.P. 2002. Effects of continuous 0.3 ppm ozone exposure on decay development and physiological responses of peaches and table grapes in cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 39-48.
- Palou, L., Smilanick, J.L., Crisosto, C.H., Mansour, M. and Plaza, P. 2003. Ozone gas penetration and control of the sporulation of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* within commercial packages of oranges during cold storage. *Crop Protection*, 22, 1131-1134.
- Palou, L., Smilanick, J.L., Mansour, M., Crisosto, C.H. and Clark, T.J. 2005. Evaluation of ozone gas penetration through citrus commercial packages and control of green and blue molds sporulation during cold storage. *Central Valley Postharvest Newsletter*, University of California, April, 14 (1), 1-10.
- Patthamakanokporn, O., Puwastien, P., Nitithamyong, A and Sirichakwal, P.P. 2008. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 241-248.
- Pennington, J.A.T. and Fisher, R.A. 2009. Classification of fruits and vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 23-31.

- Perez, A.G., Sanz, C., Rios, J.J., Olias, R. and Olias, J.M. 1999. Effects of ozone treatment on postharvest strawberry quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1652-1656.
- Philosoph-Hadas, S., Meir, S., Akiri, B., Kanner, J. 1994. Oxidative defense systems in leaves of three edible herb species in relation to their senescence rates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2376-2381.
- Piga, A., Del Caro, A., Pinna, I. and Agabbio, M. 2003. Changes in ascorbic acid, polyphenol content and antioxidant activity in minimally processed cactus pear fruits. *Food Science and Technology*, 36, 257-262.
- Ranieri, A., D'Urso, G., Nali, C., Lorenzini, G. and Soldatini, G.F. 1996. Ozone stimulates apoplastic antioxidant systems in pumpkin leaves. *Physiologia Plantarum*, 97, 381-387.
- Ray, B. 2004. *Fundamental Food Microbiology*. CRC Press, 608 p., Boca Raton, Florida, ABD.
- Restaino, L., Frampton, E.J., Hemphill, J.B. and Palnikar, P. 1995. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3471-3475.
- Reyes, L.F., Villarreal, J.E. and Cisneros-Zevallos, L. 2007. The increase in antioxidant capacity after wounding depends on the type of fruit or vegetable tissue. *Food Chemistry*, 101, 1254-1262.
- Rodgers, S.L., Cash, J.N, Siddiq, M. and Ryser, E.T. 2004. A comparison of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. *Journal of Food Protection*, 67, 721-731.
- Roura, S.I., Davidovich, L.A. and del Valle, C.E. 2000. Quality loss in minimally processed Swiss chard related to amount of damaged area. *Food Science and Technology*, 33, 53-59.
- Saltveit, M.E. 2000. Wound induced changes in phenolic metabolism and tissue browning are altered by heat shock. *Postharvest Biology and Technology*, 21, 61-69.
- Sandermann, H., Ernst, D., Heller, W. and Langebartels, C. 1998. Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends in Plant Science*, 3, 47-50.
- Santos, P.H.S. and Silva, M.A. 2008. Retention of vitamin C in drying processes of fruits and vegetables: A review. *Drying Technology*, 26, 1421-1437.

- Scarpino, P.V., Berg, G., Chang, S.L., Dahling, D. and Lucas, M. 1972. A comparative study of inactivation of viruses in water by chlorine. *Water Research*, 6, 959-965.
- Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortollussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S. and Broome, C.V. 1983. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine*, 308, 203-206.
- Scifo, G.O., Randazzo, C.L., Restuccia, C., Fava, G. and Caggia, C. 2009. *Listeria innocua* growth in fresh cut mixed leafy salads packaged in modified atmosphere. *Food Control*, 20, 611-617.
- Selma, M.V., Beltran, D., Chacon-Vera, E. and Gil, M.I. 2006. Effect of ozone on the inactivation of *Yersinia enterocolitica* and the reduction of natural flora on potatoes. *Journal of Food Protection*, 69, 2357-2363.
- Selma, M.V., Ibanez, A.M., Cantwell, M. and Suslow, T. 2008a. Reduction by gaseous ozone of *Salmonella* and microbial flora associated with fresh-cut cantaloupe. *Food Microbiology*, 25, 558-565.
- Selma, M.V., Ibanez, A.M., Allende, A., Cantwell, M. and Suslow, T. 2008b. Effect of gaseous ozone and hot water on microbial and sensory quality of cantaloupe and potential transference of *Escherichia coli* O157:H7 during cutting. *Food Microbiology*, 25, 162-168.
- Shahidi, F. 2004. Functional foods: Their role in health promotion and disease prevention. *Journal of Food Science*, 69, 146-149.
- Sharma, R.R., Demirci, A., Beuchat, L.R. and Fett, W.F. 2002. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfalfa seeds with ozonated water under pressure. *Journal of Food Safety*, 22, 107-119.
- Sheen, S. and Hwang, C.A. 2008. Modeling transfer of *Listeria monocytogenes* from slicer to deli meat during mechanical slicing. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5, 135-146.
- Silveira, A.C., Aguayo, E. and Artes, F. 2010. Emerging sanitizers and Clean Room packaging for improving the microbial quality of fresh-cut 'Galia' melon. *Food Control*, 21, 863-871.
- Singh, N., Singh, R.K., Bhunia, A.K. and Strohshine, R.L. 2002a. Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. *Food Science and Technology*, 35, 720-729.

- Singh, N., Singh, R.K., Bhunia, A.K. and Strohshine, R.L. 2002b. Effect of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce. *Food Microbiology*, 19, 183-193.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Skog, L.J. and Chu, C.L. 2001. Effect of ozone on qualities of fruits and vegetables in cold storage. *Canadian Journal of Plant Science*, 81, 773-778.
- Smilanick, J.L., Margosan, D.M. and Gabler, F.M. 2002. Impact of ozonated water on the quality and shelf-life of fresh citrus fruit, stone fruit and table grapes. *Ozone Science and Engineering*, 24, 343-356.
- Song, J., Fan, J.H., Forney, C.F., Jordan, M.A. Hildebrand, P.D., Kalt, W. and Ryan, D.A.J. 2003. Effects of ozone treatment and controlled atmosphere storage on quality and phytochemicals in Highbush blueberries. *Proceedings of the 8th International Controlled Atmosphere Research Conference, Acta Horticulturae*, 600, 417-423.
- Steinbruegge, E.G., Maxcy, R.B and Liewen, M.B. 1988. Fate of *Listeria monocytogenes* on ready to serve lettuce. *Journal of Food Protection*, 51, 596-599.
- Stopforth, J.D., Mai, T., Kottapalli, B. and Samadpour, M. 2008. Effect of acidified sodium chloride, chlorine, and acidic electrolyzed water on *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* inoculated onto leafy greens. *Journal of Food Protection*, 71, 625-628.
- Subhasree, B., Baskar, R., Keerthana, R.L., Susan, R.L. and Rajasekaran, P. 2009. Evaluation of antioxidant potential in selected green leafy vegetables. *Food Chemistry*, 115, 1213-1220.
- Suslow, T. 1997. Postharvest Chlorination: Basic Properties and Key Points for Effective Disinfection. University of California-Division of Agriculture and Natural Resources, 8 p., ANR Publication No: 8003, Davis, CA, ABD.
- Suslow, T. 2004. Ozone Applications for Postharvest Disinfection of Edible Horticultural Crops. University of California-Division of Agriculture and Natural Resources, 8 p., ANR Publication No: 8133, Davis, CA, ABD.
- Teng, S.S. and Chen, B.H. 1999. Formation of pyrochlorophylls and their derivatives in spinach leaves during heating. *Food Chemistry*, 65, 367-373.
- Tiwari, B.K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C.P. and Cullen, P.J. 2008. Kinetics of freshly squeezed orange juice quality changes during ozone processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6416-6422.

- Tiwari, B.K., O'Donnell, C.P., Muthukumarappan, K. and Cullen, P.J. 2009a. Anthocyanin and colour degradation in ozone treated blackberry juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 70–75.
- Tiwari, B.K., O'Donnell, C.P., Brunton, N. and Cullen, P.J. 2009b. Degradation kinetics of tomato juice quality parameters by ozonation. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1199–1205.
- Tunail, N. 2000. Mikrobiyel Enfeksiyonlar ve İntoksikasyonlar. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları. Sim Matbaacılık Ltd. Şti., 522 s., Ankara.
- Turatti, A. 2007. Sanitation design of fresh-cut processing and plant processing. Proceedings of the International Conference on Quality Management of Fresh Cut Produce, *Acta Horticulturae (ISHS)* 746, 147-158. [http://www.actahort.org/books/746/746\\_17.htm](http://www.actahort.org/books/746/746_17.htm). Erişim Tarihi: 15.04.2010.
- Tzortzakis, N., Borland, A., Singleton, I. and Barnes, J. 2007. Impact of atmospheric ozone-enrichment on quality-related attributes of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 45, 317-325.
- Ünlütürk, A. ve Turantaş, F. 1998. Gıda Mikrobiyolojisi. Mengi Tan Basımevi, 605 s, Çınarlı, İzmir.
- Vaz-Velho, M., Fonseca, F., Silva, M. and Gibbs, P. 2001. Is *Listeria innocua* 2030c, a tetracycline-resistant strain, a suitable marker for replacing *L. monocytogenes* in challenge studies with cold-smoked fish? *Food Control*, 12, 361-364.
- Vaz-Velho, M., Silva, M., Pessoa, A. and Gibbs, P. 2006. Inactivation by ozone of *Listeria innocua* on salmon-trout during cold-smoke processing. *Food Control*, 17, 609-616.
- Vina, S.Z. and Chaves, A.R. 2006. Antioxidant responses in minimally processed celery during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 94, 68-74.
- Vurma, M., Pandit, R.B., Sastry, S.K. and Yousef, A.E. 2009. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and natural microbiota on spinach leaves using gaseous ozone during vacuum cooling and simulated transportation. *Journal of Food Protection*, 72, 1538-1546.
- Wei, K.J., Zhou, H.D., Zhou, T. and Gong, J.H. 2007. Comparison of aqueous ozone and chlorine as sanitizers in the food processing industry: Impact of fresh agricultural produce quality. *Ozone Science and Engineering*, 29, 113-120.
- Whitmore, T.N. and Denny, S. 1992. The effect of disinfectants on a geosmin-producing strain of *Streptomyces griseus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 72, 160-165.

- Wiese, C.B. and Pell, E.J. 2003. Oxidative modification of the cell wall in tomato plants exposed to ozone. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 375-382.
- Williams, R.C., Sumner, S.S. and Golden, D.A. 2004. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in apple cider and orange juice as affected by ozone and treatment temperature. *Journal of Food Protection*, 67, 2381-2386.
- Wright, K.P. and Kader, A.A. 1997. Effect of slicing and controlled-atmosphere storage on the ascorbate content and quality of strawberries and persimmon. *Postharvest Biology and Technology*, 10, 39-48.
- Yokoigawa, K., Takakiwa, A., Kawai, H. 1999. Difference between *Escherichia coli* O157:H7 and non-pathogenic *E. coli*: Survival and growth in seasonings. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88, 574-576.
- Zorlugenç, B., Zorlugenç, F.K., Öztekin, S. and Evliya, I.B. 2008. The influence of gaseous ozone and ozonated water on microbial flora and degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> in dried figs. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3593-3597.
- Zhang, S. and Farber, J.M. 1996. The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. *Food Microbiology*, 13, 311-321.
- Zhang, L., Lu, Z., Yu, Z. and Gao, X. 2005. Preservation fresh-cut celery by treatment of ozonated water. *Food Control*, 16, 279-283.
- Zuma, F., Lin, J. and Jonnalagadda, S.B. 2009. Ozone-initiated disinfection kinetics of *Escherichia coli* in water. *Journal of Environmental Science and Health Part A-Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 44, 48-56.

## EK 1 Farklı mikroorganizmaların inaktivasyonunda ozon uygulamalarının etkinliği

Ozon uygulanan ürün	Ozon Uygulaması	Sonuçlar	Kaynak
Böğürtlen	Yeni hasat edilmiş böğürtlenler 2°C'de 0,1-0,3 ppm ozon atmosferinde 12 gün depolanmıştır	Misel gelişimi görsel olarak takip edilmiş, sonuçlar % çürük meyve olarak verilmiştir. - 12. günün sonunda ozon uygulanan meyvelerde bozulma olmazken kontrol grubu meyvelerde %20 oranında misel gelişimi saptanmıştır. - Enfeksiyonların esas etmeninin <i>Botrytis cinerea</i> olduğu saptanmıştır.	Barth vd. (1995)
Parçalanmış marul	Sonication, karıştırma, stomaching ve bubbling gibi farklı mekanik uygulamalar ile ozonlama işlemi gerçekleştirilmiştir	- En etkin ozonlama yöntemi olarak "bubbling" belirlenmiştir. - (%4,9 v/v, 0,5 L/dak) ozon bubbling uygulamasının mikrobiyal yükü 5 dak.'da 1,5-1,9 log indirdiği saptanmıştır. - Ozonun maruldaki mikroorganizmalara etkin bir şekilde ulaşması için bubbling+yüksek hızda karıştırma önerilmiştir.	Kim (1998)
Çilek	2°C'de 0,35 ppm ozon ortamında 3 gün depolamadan sonra perakende koşullarında (20°C'de) 4 gün depolama	Misel gelişimi görsel olarak takip edilmiş, sonuçlar % çürük meyve olarak verilmiştir. - 20°C'ye alındıktan sonraki 2. güne kadar, ozonlanmış örneklerde kısmi bir korunma (%15) sağlanmıştır. - Ancak 4. günün sonunda <i>B. cinerea</i> etmenli gri çürüklük, ozonlanmış ve kontrol örneklerinde eşit düzeyde görülmüştür.	Perez vd. (1999)
Portakal ve limon ( <i>Penicillium digitatum</i> ve <i>P. italicum</i> ile aşılınmış)	0,3 ppm ozon atmosferinde 4,5-5°C'de portakallar 4 hafta, limonlar 9 hafta muamele edilmiş ve 10°C'de 1 ppm'lik ozon atmosferinde 2 hafta tutulmuş	- Ozona muamele, <i>P. digitatum</i> etmenli yeşil küf ve <i>P. italicum</i> etmenli mavi küf oluşum sıklığını etkilememiş ancak bu hastalıkların daha yavaş ilerlemesine neden olmuş ve 1 hafta kadar geciktirmiştir. - Sporlanma önlenmiş veya azaltılmıştır. Düşük sıcaklık ile ozonun sinerjistik etkisi görülmüştür. - Fungusitlere dayanıklı suşların sporlarının vejetatif hale geçmesi geciktirilmiş böylece hasat sonrası fungusitlerinin ömürleri uzatılmıştır.	Palou vd. (2001)
Şeftali ve üzüm (Çeşitli mikroorganizmalar ile aşılınmış)	5°C'de % 90 bağıl nemde 0,3 ppm ozon varlığında 4-5 hafta depolama	- Misel gelişimi ve sporlanması ozonla depolama boyunca önlenmiş ancak ürünler çevre atmosferine getirildiğinde misel gelişimi ve sporlanma başlamıştır. - Şeftalilerde <i>Monilinia fructicola</i> etmenli kahverengi çürüklük dışında diğer çürümelerin görülme sıklığı ve şiddeti değişmemiştir. - Üzümlerde görülen <i>B. cinerea</i> etmenli gri çürüklük 7 hafta depolamayla inhibe olmuştur.	Palou vd. (2002)

EK 1 Farklı mikroorganizmaların inaktivasyonunda ozon uygulamalarının etkinliği (devam)

Ozon uygulanan ürün	Ozon uygulaması	Sonuçlar	Kaynak
Turunçgiller Şeftali Nektarin Üzüm	Paslanmaz çelik sepetlere doldurulan meyveler ozonlu suyla dolu (ozon konsantrasyonu 1,5-10 ppm) havuzlara daldırılmış (farklı süreler tutma+havada kurutma+depolama)	- 10 ppm'lik ozonlu su içinde 20 dak. tutma ile <i>P. digitatum</i> etmenli yeşil küf ve <i>Geotrichum citriauranti</i> etmenli ekşi çürüklük azaltılamamıştır. - <i>Monilinia fructicola</i> etmenli kahverengi çürüklükle karşılaşılma sıklığı şeftalilerin 1,5 ppm'lik ozonlu suya 1 dak. daldırılması ile % 10,9'dan % 5,4'e düşmüştür. - 5 ppm'lik ozonlu su içinde 1 dak. tutma ile aerobik bakteri popülasyonu 1,1 log birim, maya ve filamentli küf popülasyonu 0,7 log birim azalmıştır. 5 dak. süre ile tutmakla ise bu azalmalar sırasıyla 1,6 ve 1,3 log birim şeklinde gerçekleşmiştir. - Ozonlanmamış üzümlerde %35 sıklıkla görülen <i>B. cinerea</i> etmenli gri çürüklük 10 ppm'lik ozonlu suya 1 ve 6 dak.'lık daldırmalar sonucu %10-26 arasında değişen oranlarda azalmıştır.	Smilanick vd. (2002)
Çilek ( <i>B. cinerea</i> ile aşılınmış veya doğal enfekte)	1,5 ppm ozon içeren depoda 2°C'de 3 gün depolama	Ozon atmosferinde depolanmayan meyvelerde, ozon atmosferinde depolananlara göre küf misellerinin gelişiminin daha hızlı olduğu belirlenmiştir.	Nadas vd. (2003)
Doğranmış kereviz	17°C'de 0,03, 0,08, 0,18 ppm ozonlu su içeren havuzlara daldırıp 2, 6, 10 dak. tutma ve 4°C'de 9 gün depolama	Başlangıçta toplam bakteri sayısı 5,08 log kob/g'dır. 9 günlük depolama sonunda kontrol örneklerinde 6,78 log kob/g. 0,03, 0,08 ve 0,18ppm'lik ozonlu suya daldırılan örneklerde sırasıyla 5,72, 5,64 ve 5,63 log kob/g olarak belirlenmiştir. Ozonlu su uygulaması doğranmış kerevizlerde bakteri gelişimini engelleyerek mikrobiyal bozulmayı azaltmış böylece mikrobiyal güvenlik sağlanmıştır.	Zhang vd. (2005)
Patates ve model sistem ( <i>Yersinia enterocolitica</i> ve <i>L. monocytogenes</i> ile inoküle)	Model sisteme ve patates yüzeyine uygulanan suda çözülmüş ozon (1,4-5 ppm)	- 1,4 ve 1,9 ppm'lik ozon uygulaması (1 dak.) sudaki <i>Y. enterocolitica</i> popülasyonunu 4,6 ve 6,2 log kob/mL düzeyinde azaltmıştır. - Ozonlu su (5 ppm, 1 dak.) patates yüzeyindeki <i>Y. enterocolitica</i> ve <i>L. monocytogenes</i> 1,6 ve 0,8 log kob/g düzeyinde azaltmıştır.	Selma vd. (2006)

EK 1 Farklı mikroorganizmaların inaktivasyonunda ozon uygulamalarının etkinliği (devam)

Ozon uygulanan ürün	Ozon uygulaması	Sonuçlar	Kaynak
Domates (tüm halde veya dilimlenmiş)	Nemli gaz ozon akımı (4±0,5 µL/L, her 3 saatte bir 30 dak.)	Mezofilik bakteri, psikrofilik bakteri ve küf-maya sayısında sırasıyla 1,07, 1,27 ve 0,5 log birimlik azalmalar sağlanmıştır.	Aguayo vd. (2006)
Kuru incir	Gaz ozon (5 veya 10 ppm) 3 veya 5 saat	- Toplam aerobik-mezofilik mikroorganizma ve küf-maya sayısındaki azalmalar %38 ve %72 düzeyinde gerçekleşmiştir. - Koliformlar tamamen inaktif olmuştur. - Mikroorganizma inaktivasyonu için en az 3 saat 5 ppm ozonla muamele gerekmektedir.	Öztekin vd. (2006)
Doğranmış marul	3–10 ppm ozonlu su (5 dak.) tek başına veya sıcak suyla (50°C, 2,5 dak.) birlikte	- Doğal bakteri florasındaki azalış, ozon konsantrasyonunun artmasıyla artış göstermiştir. Ancak 5 ppm ile elde edilen 1,4 log kob/g'lık azalışın üzerinde bir azalış gerçekleşmemiştir. - Sıcak su ile kombinasyon, ozonlu suyla elde edilenin üzerinde bir mikrobiyel etkinlik sağlamamıştır.	Koseki ve Isobe (2006)
Domates ( <i>Salmonella typhimurium</i> ile inoküle edilmiş)	1-2 mg/L'lik ozonlu su (120 saniye daldırma veya 30 saniye püskürtme)	- 1 ve 2 mg/L'lik ozonlu suya daldırma sırasıyla 2,32 ve 2,53 log birimlik azalmalar sağlamıştır. - 1 ve 2 mg/L'lik ozonlu su püskürtmeleri sırasıyla 1,84 ve 2,40 log birimlik azalmalar sağlamıştır.	Chaidez vd. (2007)
Marul	4 mg/L'lik ozonlu suya 2 dak. daldırma (20±1°C'de)	Enterobacteriaceae, mezofilik bakteri ve psikrofil bakteri sayıları sırasıyla 1,3, 1,7 ve 1,5 log kob/g oranında azalmıştır.	Akbaş ve Ölmez (2007)
Kavun	Sıcak su (75°C, 1 dak.) ve gaz ozon (10000 ppm, 30 dak.) kombinasyonu	Mezofilik bakteri, psikrofil bakteri, küf ve koliform sayılarında sırasıyla 3,8, 5,1, 2,2 ve 2,3 log birimlik azalmalar sağlanmıştır.	Selma vd. (2008b)

EK 1 Farklı mikroorganizmaların inaktivasyonunda ozon uygulamalarının etkinliği (devam)

Ozon uygulanan ürün	Ozon uygulaması	Sonuçlar	Kaynak
Kavun (kabuğu <i>Salmonella</i> ile aşılınmış veya doğal floralı)	Kısmi vakum altında gaz ozon (10000 ppm, 30 dak.)	Toplam canlı ve <i>Salmonella</i> sayıları sırasıyla 4,2 ve 2,8 log kob/12,6 cm <sup>2</sup> kabuk alanı oranında azalmıştır.	Selma vd. (2008a)
Kuru incir	13,8 mg/L ozon gazıyla ya da 1,7 mg/L ozonlu suyla 7,5-30 dak. muamele	- Her 2 uygulama sonucunda; aerobik bakteriler tamamen inaktif olmazken 7,5 dak. sonunda <i>E. coli</i> tamamen elemine edilmiştir. - Ozonlu suyla 7,5 dak. muamele koliformları, 15 dak. muamele ise mayaları tamamen inaktive etmiştir. - 15 dakikalık uygulamalar üründe bulunan küflerin tümünü inaktive etmeye yetmiştir.	Zorlugenç vd. (2008)
Havuç	Ozonlu su (4 ppm) ile 2 dak. yıkama	<i>Pectobacterium carotovorum</i> (havuçlarda yumuşak çürüklük etmeni) inaktive edilmiştir.	Hassenberg vd. (2008)
Doğranmış kavun	Ozonlu suyun (0,4 mg/L, 3 dak.) perasetik asitle (80 mg/L, 1 dak.) kombinasyonu ardından 5°C'de 10 gün depolama	Ozon+perasetik asit kominasyonu psikrofil ve mezofil mikroorganizmaları sırasıyla 0,9 ve 0,8 log kob/g düzeyinde azaltmıştır.	Silveira vd. (2010)
Marul ( <i>E. coli</i> ve <i>L. monocytogenes</i> ile inoküle edilmiş)	2 mg/L'lik ozonlu suya (10°C'de) 2 dak. daldırma	- Mikroorganizmaların ekiminden 6 saat sonrasına kadar <i>E. coli</i> ve <i>L. monocytogenes</i> mikroorganizmaları %99,9 oranında azalmıştır. - Mikroorganizmaların ekiminden 48 saat sonra her 2 mikroorganizmanın sayısında %90'dan düşük azalmalar gerçekleşmiştir (biyofilm oluşumundan dolayı)	Ölmez ve Temur (2010)

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hakan Karaca  
Doğum Yeri : Denizli  
Doğum Tarihi : 24.01.1979  
Medeni Hali : Bekâr  
Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu

Lise : Denizli Anadolu Lisesi (1994-1997)  
Lisans : Mersin Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü (1997-2001)  
Yüksek Lisans : Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (2001-2005)

### Çalıştığı Kurumlar

Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü (2002-2005)  
Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü (2005-)

### Yayımları

#### A. SCI Kapsamındaki dergilerde yayımlanan makaleleri

1. **Karaca, H.** and Nas, S. 2006. Aflatoxins, patulin and ergosterol contents of dried figs in Turkey. Food Additives and Contaminants, 23, 502-508.
2. **Karaca, H.** and Velioglu, Y.S. 2007. Ozone applications in fruit and vegetable processing. Food Reviews International, 23, 91-106.
3. **Karaca, H.** and Velioglu, Y.S. 2009. Effects of some metals and chelating agents on patulin degradation by ozone. Ozone Science and Engineering, 31, 224-231.
4. **Karaca, H.** and Nas, S. 2009. Combined effect of pH and heat treatment on degradation of aflatoxins in dried figs. Journal of Food Processing and Preservation, 33, 329-339.

5. **Karaca, H.** 2010. Use of Ozone in the citrus industry. *Ozone Science and Engineering*, 32, 122-129.
6. Gabler, F.M., Smilanick, J.L., Mansour, M.F. and **Karaca, H.** 2010. Influence of fumigation with high concentrations of ozone gas on postharvest gray mold and fungicide residues on table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 55, 85-90.
7. **Karaca, H.**, Velioglu, Y.S. and Nas, S. 2010. Mycotoxins: contamination of dried fruits and degradation by ozone. *Toxin Reviews*, 29, 51-59.

#### **B. Diğer hakemli dergilerde yayınlanan makaleleri**

1. **Karaca, H.** ve Nas, S., 2004. Ülkemiz açısından önemli bazı kuru meyvelerde toksik ikincil metabolitler, *Akademik Gıda*, 8, 16-21.

#### **C. Diğer dergilerde yayınlanan makaleleri**

1. **Karaca, H.** ve Nas, S., 2003. Önemli ihraç ürünümüz incirde aflatoksin sorunu, *CineTarım*, 49, 34-35.
2. Velioglu, Y.S. ve **Karaca, H.** 2008. Tavuk, balık ve yumurtada ozonla dezenfekte. *Popüler Bilim, Ekim*, 176, 24-27.

#### **D. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan tebliğler**

1. **Karaca, H.** and Nas, S., 2004. Toxic secondary metabolites in dried fruits in Turkey. POSTER SUNUMU, 11th International Symposium on Mycotoxins and Phytotoxins, 17-21 May, Bethesda, Maryland, USA.
2. **Karaca, H.** and Nas, S., 2005. Mycotoxins in dried figs. SÖZLÜ SUNUM, 3rd International Symposium on Fig, 16-20 May, Vilamoura, Algarve, Portugal.
3. **Karaca, H.**, Velioglu, Y.S. and Ercan, D., 2007. Effects of metals on patulin degradation by ozone. SÖZLÜ SUNUM, (Presentation No: 103) World Congress on Ozone and Ultraviolet Technologies, 27-29 August, Los Angeles, California, USA.

4. **Karaca, H.** and Velioglu, S., 2007. Ozone application, as a promising technology for patulin degradation: Influence of pH and temperature. POSTER SUNUMU, (Poster No: 1269), 12th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, 21-25 May, İstanbul, Turkey.
5. **Karaca, H.** 2009. Influence of ozone on mycotoxins and pesticide residues on agricultural products. SÖZLÜ SUNUM, 31. Annual Citrus Postharvest Pest Control Conferences, 16 March, University of California-Riverside Extension, Santa Barbara, California, USA.
6. **Karaca, H.** and Velioglu, S., 2010. Effects of ozone and chlorine washes on microbial inactivation and some quality parameters of spinach, lettuce, and parsley. POSTER SUNUMU, (Poster No: B801), 1st International Congress on Food Technology, 3-6 November, Antalya, Turkey.

#### **E. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan tebliğler**

1. Kadakal, Ç., **Karaca, H.**, Nas, S. ve Artık, N., 2003. Elmanın çürüklük oranının elma suyunun patulin düzeyine etkisi. SÖZLÜ SUNUM, I. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, 18-19 Eylül, İstanbul.
2. **Karaca, H.** ve Yemiş, O. Mikotoksin kontaminasyonu: zeytin ve ürünlerinde toksin riski. POSTER SUNUMU, I. Ulusal Zeytin Öğrenci Kongresi, 17-18 Mayıs, Edremit, Balıkesir

#### **F. Dinleyici olarak katıldığı bilimsel toplantılar**

1. Mikotoksin Biyoteknolojisi: Sorunlar ve Çözümler Çalıştayı, 17-20 Haziran, 2003, İzmir.
2. II. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu, 23-24 Mayıs 2005, İstanbul
3. Gıda İşinleme Kursu, 4-6 Aralık 2007, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu-SANAEM, Ankara.
4. Monitoring of dioxins in foodstuffs in Turkey, October 8, 2008, Ankara Provincial Control Laboratory, Ankara.
5. International Water Technology Conference and Ozone V, April, 2-4, 2007,

Fresno State University, Fresno, California, USA

6. Türkiye 9. Gıda kongresi 24-26 Mayıs 2006, Bolu
7. IFT (Institute of Food Technologists) Annual Meeting and Expo. 6-10 June 2009, Anaheim, California, USA.

#### **G. Yer aldığı projeler**

1. “Kuru incirlerde aflatoksin, patulin ve ergosterol içeriklerinin belirlenmesi ve farklı koşullarda aflatoksinlerin parçalanma düzeylerinin belirlenmesi” isimli projede yardımcı araştırmacı (Pamukkale Üniversitesi BAP Müdürlüğü, 2003FBE003).
2. “Patulinin ozonla degradasyon etkinliğinin bazı kelatörler kullanılarak artırılması” isimli projede yardımcı araştırmacı (TÜBİTAK, 106O051).
3. “Ozon, klor ve hidrojen peroksit uygulamalarının pazıda klorofil miktarı üzerine etkileri” isimli projede yardımcı araştırmacı (Ankara Üniversitesi BAP Müdürlüğü, 20080745001 HDP).
4. “Ozonlamanın marul, ıspanak ve maydanozlarda mikrobiyel inaktivasyon ve raf ömrü üzerine etkisi” isimli projede yardımcı araştırmacı (Ankara Üniversitesi Bilim İnsanı Yetiştirme Programı [BİYEP], 2005K120140).

#### **H. Aldığı burslar ve ödüller**

1. TÜBİTAK 2214- Yurt Dışı Araştırma Burs Programı (Kasım 2008 – Kasım 2009)