

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

***Aspergillus flavus* GELİŞİMİ VE AFLATOKSİN ÜRETİMİ**
ÜZERİNE OZON GAZI UYGULAMASININ ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

METEHAN ÖZEL

DENİZLİ, EYLÜL - 2022

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



Aspergillus flavus GELİŞİMİ VE AFLATOKSİN ÜRETİMİ
ÜZERİNE OZON GAZI UYGULAMASININ ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

METEHAN ÖZEL

DENİZLİ, EYLÜL - 2022

Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2021 FEBE 017 no'lu proje ile desteklenmiştir.

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

METEHAN ÖZEL

ÖZET

Aspergillus flavus GELİŞİMİ VE AFLATOKSİN ÜRETİMİ ÜZERİNE OZON GAZI UYGULAMASININ ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

METEHAN ÖZEL

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. HAKAN KARACA)

DENİZLİ, EYLÜL - 2022

Bu çalışmada, ozon gazının Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyeri ve kırmızıbiber örneklerine Yüksek Doz Kısa Süre (YDKS) ve Düşük Doz Uzun Süre (DDUS) yöntemleriyle uygulanmasının aflatoksin üreticisi *Aspergillus flavus* küfünün gelişimine ve aflatoksin B1 üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, PDA besiyerine ve yarı kurutulmuş kırmızıbiberlere *A. flavus* küfünü inoküle edilmiş ve ardından YDKS için 1500 ± 100 $\mu\text{L/L}$ ozon gazı 1, 2, 4 ve 8 saat; DDUS için 0.1 ± 0.05 $\mu\text{L/L}$ ozon gazı 8 gün boyunca uygulanmıştır. Ozonlama işlemleri sonunda PDA'daki küf çapı gelişimleri ve kırmızıbiberlerdeki *A. flavus* küf sayıları belirlenmiştir. PDA örneklerindeki *A. flavus* küfüne uygulanan YDKS ozonlama işlemleri sonucunda, ozon gazının uygulama süreleri arttıkça küf gelişiminin inhibisyonu da artmıştır. Ozon gazının 8 saat boyunca uygulanması ile küf gelişimi tamamen engellenmiştir. DDUS ozon gazı uygulanması ile PDA örneklerindeki *A. flavus* küfünün gelişimini engellemede YDKS uygulamasındaki kadar etkili bir sonuç alınamamıştır. Kırmızıbiber örneklerinde ise YDKS-8 saat ve DDUS uygulamaları *A. flavus* gelişimini inhibe etmesi açısından etkili sonuçlar vermiştir. Aflatoksin üretimleri incelendiğinde PDA ve kırmızıbiber örnekleri için en etkili sonuçlar YDKS-8 saat uygulaması ile alınmıştır. DDUS ozon uygulamasının PDA örneklerinde küf gelişimi üzerine etkili bir inhibisyon oluşturmadığı ve aflatoksin B1 üretiminin sınırlandırılmasında da yetersiz kaldığı görülmüştür. DDUS ozon gazı uygulaması, PDA ve kırmızıbiber örneklerindeki *A. flavus* küfünün morfolojik yapısında önemli değişikliklere yol açmıştır. Bu bulgular, ozon gazının YDKS ve 0.1 $\mu\text{L/L}$ 'den daha yüksek bir ozon konsantrasyonu ile DDUS uygulanması halinde *A. flavus* küfünün gelişiminin ve aflatoksin B1 üretiminin etkili bir şekilde inhibe edilebileceğini ortaya koymaktadır.

ANAHTAR KELİMELER: Aflatoksin, *Aspergillus flavus*, Kırmızıbiber, Ozon Gazı, PDA.

ABSTRACT

EFFECT OF OZONE GAS APPLICATION ON THE DEVELOPMENT AND AFLATOXIN PRODUCTION OF *Aspergillus flavus*

MSC THESIS

METEHAN ÖZEL

PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

FOOD ENGINEERING

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

DENİZLİ, SEPTEMBER 2022

In this study, the effect of ozone gas treatments (High Dose-Short Time [HDST] and Low Dose-Long Time [LDLT]) on growth and aflatoxin B1 production of aflatoxigenic *A. flavus* on Potato Dextrose Agar (PDA) medium and red pepper was investigated. For this aim, *Aspergillus flavus* was inoculated on plates containing PDA media and semi-dried red peppers and then ozone gas (at 1500 ± 100 $\mu\text{L/L}$; 1, 2, 4, 8 h and at 0.1 ± 0.05 $\mu\text{L/L}$; 8 d for HDST and LDLT, respectively) was applied. Colony diameters in PDA and colony counts in red pepper were determined at the end of the treatments. We observed that the inhibitory effect of ozone against *A. flavus* increased as the treatment time in HDST treatment increased. A treatment of 8 h completely inhibited the growth of the fungus. LDLT treatment was not as effective as HDST in inhibiting *A. flavus* growth in PDA medium. On the other hand, both HDST (especially 8 h) and LDLT treatments were quite effective against *A. flavus* growth in red pepper samples. Aflatoxin B1 production was most effectively controlled by HDST treatment for 8 h in both PDA and red pepper. LDLT treatment was not sufficiently effective in inhibiting both growth and aflatoxin B1 production of *A. flavus* in PDA medium. However, this treatment caused noticeable morphological changes in conidial and hyphal structures of the fungus on PDA and red pepper. These findings show that ozone gas can effectively inhibit the growth and aflatoxin B1 production of *A. flavus*, if used as HDST treatment or as LDLT treatment with a concentration higher than 0.1 $\mu\text{L/L}$.

KEYWORDS: Aflatoxin, *Aspergillus flavus*, Red Pepper, Ozone Gas, PDA.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Tezin Amacı	2
1.2 Literatür Özeti	3
1.2.1 Küfler ve Mikotoksinler.....	3
1.2.1.1 Küfler	3
1.2.1.2 Mikotoksinler	4
1.2.2 Ozon Gazı	13
1.2.2.1 Ozon Gazının Yapısal Özellikleri	14
1.2.2.2 Ozon Gazı Üretimi	15
1.2.2.3 Ozon Gazının Etki Mekanizması ve Antimikrobiyal Etkisi ...	16
1.2.2.4 Ozon Gazının İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi	17
1.2.2.5 Ozon Gazı Uygulamalarının Toksik Küfler Üzerine Etkisi	18
2. YÖNTEM.....	24
2.1 <i>Aspergillus flavus</i> Küfünün Gelişim Koşulları, Muhafazası ve Gelişim Takibinin Yapılması	24
2.2 PDA Besiyeri ve Kırmızıbiber Örneklerinin İnokülasyona Hazırlanması	24
2.3 <i>Aspergillus flavus</i> Spor Solüsyonunun Hazırlanması ve İnokülasyon	25
2.4 Farklı Ozon Gazı Uygulamalarının <i>A. flavus</i> Küfünün Gelişimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi.....	26
2.4.1 PDA Besiyerlerine YDKS Yöntemi ile Ozon Gazı Uygulaması.	26
2.4.2 Kırmızıbiber Örneklerine YDKS Yöntemi ile Ozon Gazı Uygulaması	27
2.4.3 PDA Besiyerine DDUS Yöntemi ile Ozon Gazı Uygulaması	28
2.4.4 Kırmızıbiber Örneklerine DDUS Yöntemi ile Ozon Gazı Uygulaması	30
2.5 PDA ve Kırmızıbiber Örneklerindeki <i>A. flavus</i> Küfü Gelişiminin Takibi	30
2.6 Aflatoksin Analizleri	32
2.6.1 Aflatoksin Standart Çözeltilisinin Hazırlanması.....	33
2.6.2 Ekstraksiyon, Temizleme ve Enjeksiyon.....	35
2.7 İstatistiksel Analiz	36
3. BULGULAR	37
3.1 <i>A. flavus</i> Küfü İnoküle Edilmiş PDA Besiyerlerine YDKS Ozon Gazı Uygulamasının Küf Gelişimine Etkisi	37
3.2 <i>A. flavus</i> Küfü İnoküle Edilmiş Kırmızıbiber Örneklerine YDKS Ozon Gazı Uygulamasının Küf Gelişimine Etkisi	39

3.3	<i>A. flavus</i> Küfü İnoküle Edilmiş PDA Besiyerlerine DDUS Ozon Gazı Uygulamasının Küf Gelişimine Etkisi	41
3.4	<i>A. flavus</i> Küfü İnoküle Edilmiş Kırmızıbiber Örneklerine DDUS Ozon Gazı Uygulamasının Küf Gelişimine Etkisi	43
3.5	<i>A. flavus</i> Küfü İnoküle Edilmiş PDA ve Kırmızıbiber Örneklerine Uygulanan YDKS ve DDUS Ozonlama İşlemlerinin Aflatoksin Üretimlerine Olan Etkileri	46
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER	50
5.	KAYNAKLAR.....	53
6.	ÖZGEÇMİŞ.....	62

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Gıda ürünlerinde 2009-2018 yılları arasında dünyada ve ülkemizde yapılan toplam RASFF bildirim sayıları ve oranları (Sağlam ve Masatcıoğlu, 2020).....	6
Şekil 1.2: Gıda ürünlerinde 2009-2018 yılları arasında tespit edilen mikotoksinlerin dünyada ve ülkemizde yapılan RASFF bildirim sayısı ve oranları (Sağlam ve Masatcıoğlu, 2020).	6
Şekil 1.3: Aflatoksin B1, B2, M1, M2, G1 ve G2'nin kimyasal yapıları (Adeyeye, 2019).....	8
Şekil 1.4: Gıda ve yem zincirindeki küf gelişimi ve mikotoksin oluşumu kontrolü için hasat öncesi ve hasat sonrası uygulanan yöntemler (Conte ve diğ. 2020).....	12
Şekil 1.5: Ozon gazı üretiminin sağlandığı Korona Akım metodu (Ekici ve diğ. 2006).....	16
Şekil 2.1: YDKS ozon gazı uygulamasının yapıldığı ozonlama sistemi.	27
Şekil 2.2: DDUS ozon gazı uygulamasının yapıldığı hazne ve kontrol grubu ortamı.	29
Şekil 2.3: Lehim cihazı ile modifiye edilmiş petri kutuları.	30
Şekil 2.4: AFPA besiyerinde gözlemlenen tipik <i>A. flavus</i> küf kolonileri.....	32
Şekil 2.5: AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2 içeren standart çözeltiye ait kromatogram.	34
Şekil 2.6: AFB1 için çizilen kalibrasyon eğrisi.	34
Şekil 2.7: Aflatoksin analizlerinin ekstraksiyon basamağında kullanılan deney düzeneği.	36
Şekil 3.1: Farklı sürelerde $1500 \pm 100 \mu\text{L/L}$ ozon gazı ile muamele edilip, 30°C 'de 3 gün süreyle depolanan PDA besiyerlerinde <i>A. flavus</i> küfünün gelişimleri.....	38
Şekil 3.2: YDKS ozon uygulaması ile muamele edilen biber örneklerinin, 30°C 'de 6 günlük depolama sonundaki <i>A. flavus</i> sayıları.....	40
Şekil 3.3: 30°C 'de 8 gün süreyle hava ve $0.1 \mu\text{L/L}$ 'lik ozon atmosferinde depolanan PDA besiyerlerindeki <i>A. flavus</i> küfünün gelişimleri. ...	41
Şekil 3.4: Depolama süresi boyunca, ozon gazının <i>A. flavus</i> küfünü inhibe etme yüzdeleri.	42
Şekil 3.5: DDUS ozon gazı ve hava ortamındaki kırmızıbiber örneklerinin, 30°C 'de 6 günlük depolama sonundaki <i>A. flavus</i> sayıları.....	44
Şekil 3.6: $0.1 \mu\text{L/L}$ ozon gazı ve hava ortamında 30°C 'de 6 gün boyunca depolanan kırmızıbiber örnekleri.	46

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: TGK'ye göre aflatoksinler için gıdalardaki maksimum limitleri (TGK, 2011).....	9
Tablo 1.2: Gıdalarda mikotoksin oluşumunu etkileyen faktörler.	11
Tablo 1.3: Saf ozonun bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri (Ekici ve diğ. 2006).	15
Tablo 1.4: Ozon gazı uygulamalarının gıda/besiyeri ortamlarındaki toksijenik küf türlerinin gelişimine olan etkisinin incelendiği bazı çalışmalar.....	20
Tablo 1.5: Ozon gazı uygulamalarının gıda/besiyeri ortamlarındaki toksijenik küf türlerinin gelişimine olan etkisinin incelendiği bazı çalışmalar (Devamı).....	21
Tablo 1.6: Ozon gazı uygulamalarının gıdalardaki çeşitli mikotoksinlerin oluşumu üzerine etkisinin incelendiği bazı çalışmalar. mikotoksinlerin oluşumu üzerine etkisinin incelendiği bazı çalışmalar.....	22
Tablo 1.7: Ozon gazı uygulamalarının gıdalardaki çeşitli mikotoksinlerin oluşumu üzerine etkisinin incelendiği bazı çalışmalar (Devamı). .	23
Tablo 2.1: Aflatoksin analizlerinin gerçekleştirildiği HPLC cihazı özellikleri ve analizlerdeki kromatografi koşulları.	33
Tablo 3.1: YDKS ve DDUS ozonlama işlemleri sonunda PDA ve kırmızıbiber örneklerinde üretilen AFB1 miktarları.....	47

SEMBOL LİSTESİ

μg	:	Mikrogram
kg	:	Kilogram
a_w	:	Su Aktivitesi
$^{\circ}\text{C}$:	Santigrat Derece
mV	:	Milivolt
g	:	Gram
L	:	Litre
atm	:	Atmosfer Basıncı
μL	:	Mikrolitre
ppm	:	Milyonda Bir
ppb	:	Milyarda Bir
dk	:	Dakika
kob	:	Koloni Oluşturan Birim
cm	:	Santimetre
mL	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
log	:	Logaritma
μm	:	Mikrometre
mg	:	Miligram
nm	:	Nanometre
α	:	Alfa
Afl	:	Aflatoksin

ÖNSÖZ

Yüksek lisansa başlamamdan, tezin teslim edilmesine kadar geçen 3 senelik süreçte bana her anlamda yol gösteren, her zaman yanımda olup kendimi geliştirmemde yardımcı olan ve her düştüğümde beni tekrar ayağa kaldıran, kendisiyle çalışma fırsatı bulduğum için kendimi çok şanslı hissettiğim kıymetli hocam sayın Doç. Dr. Hakan Karaca'ya teşekkürü bir borç bilirim.

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

Tez dönemi boyunca değerli fikir ve bilgilerini benimle paylaşan Yüksek Gıda Mühendisleri Şeyda Şentürk, Pınar Şengün, Ünkan Urgancı'ya ve Arş. Gör. Ufuk Gökçe Ayrancı'ya çok teşekkür ederim. Ayrıca, teknik konularda yardımlarını esirgemeyen Hakan Bilge ve Onur Kıyak'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca gerek maddi gerek manevi hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen, iyi-kötü her anımda yanımda hissettiğim, beni bu günlere getiren annem Solmaz Özel, babam Murat Özel ve kardeşim Oğuzhan Özel'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak, yanımdayken ailemle berabermiş gibi hissettiğim, sayesinde hiçbir zaman kendimi yalnız hissetmediğim ve kendisini tanımış olduğum için şanslı hissettiğim sevgili kız arkadaşım Melike Özgücan Arkutcu'ya hem tez dönemindeki katkıları için hem de hayatımda olduğu için çok ama çok teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Mikotoksinler; bazı toksijenik küfler tarafından sentezlenen toksik, ikincil metabolitler olarak tanımlanmaktadır (Marin ve diğ. 2013). Mikotoksinlerin en önemli gruplarından biri, yüksek toksik potansiyeli olan aflatoksinlerdir. İki önemli *Aspergillus* küf türü olan *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus*, potansiyel aflatoksin üreticileridir. Aflatoksin türlerinden olan aflatoksin B1 (AFB1), aflatoksin B2 (AFB2), aflatoksin G1 (AFG1) ve aflatoksin G2 (AFG2), Uluslararası Kanser Araştırma Örgütü (International Agency Research on Cancer-IARC) tarafından 1. kategori kanserojen olarak tanımlanmıştır. AFB1, en baskın aflatoksin türü olarak bilinmekle birlikte aflatoksin türlerinin mutajenik, teratojenik ve hepatokarsinojenik etkiler gösterdiği raporlanmıştır (Hussain ve Brasel, 2001).

Aspergillus küf türleri, dünyada yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Bu küf türleri, gıda maddelerine kolayca bulaşabilirler ve uygun koşullarda hayvan yemleri aracılığı ile hayvan metabolizmasına da geçebilirler. Bu durum, özellikle nem ve sıcaklığın yüksek olduğu tropikal ve sub-tropikal iklime sahip ülkelerde daha yaygın bir problemdir (Adeyeye, 2019). *A. flavus* küfü, tarla ve toprak ürünlerine (Arpa, mısır, pamuk tohumu, pirinç, buğday, yerfıstığı, kakao, antepfıstığı, fındık, baharatlar, zeytin, incir, ayçiçeği, kırmızıbiber vb.) bulaşabilir ve depolama sırasında çoğalabilirler. Çevresel koşullar uygun olduğunda bu organizmaların toksijenik olan türleri aflatoksin üretebilirler (Öksüztepe ve Erkan, 2016).

Küflerin mikotoksin üretmesi; sıcaklık, nem, su aktivitesi, pH ve oksijen konsantrasyonu gibi faktörlere bağlıdır. Küfler, mutlak aerob mikroorganizmalar oldukları için, gelişmeleri üzerinde oksijenin önemli bir rolü vardır (Zinedine ve El Akhdari, 2019).

Aflatoksinler, pastörizasyon ve sterilizasyon gibi geleneksel termal yöntemlere karşı oldukça dirençlidir. Bu sebeple gıdalara bulaşabilen aflatoksijenik küf gelişiminin ve aflatoksin üretiminin hasat öncesi ve sonrası aşamalarda çok daha etkili yöntemlerle önlenmesi gereklidir. Bu önlemler fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak sınıflandırılabilir (Hejri ve diğ. 2020).

Aflatoksin üreten küfün gelişimini ve aflatoksin üretimini önleyebilmek adına kullanılan birçok kimyasal ajan mevcuttur. Kullanılan bu kimyasal ajanlar; sitrik ve laktik asit gibi organik asitler, hidrojen peroksit, klor dioksit, 1-metilsiklo propen, amonyak, sodyum bisülfid ve ozon gazı olarak sınıflandırılabilir (Hejri ve diğ. 2020; Conte ve diğ. 2020).

Son yıllarda ozon gazı uygulamaları; kimyasal ajanlar arasında uygulama sonrası kalıntı bırakmaması, düşük maliyetli olması ve umut verici sonuçlar vermesi sebebiyle yaygınlaşmıştır (Hejri ve diğ. 2020).

Ozon, havadaki oksijen molekülünü bölen yüksek enerji girişi ile meydana gelir. Tekli oksijen molekülleri, ozon oluşturabilmek için hızlıca O₂ ile birleşir. Doğadaki bu yüksek enerjinin kaynağı ise UV ışığı (güneşten) ve yıldırımdır (Karaca ve diğ. 2010).

Ozon; bakteri, küf ve virüsler üzerinde yüksek oksitleyici etki gösterdiğinden dolayı gıda sanayinde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ozon, klor dioksit'e göre daha etkili olmakla beraber daha geniş bir mikroorganizma spektrumunu etki altına alabilmektedir (Yıldız ve Yangılar, 2014).

Ozon gazı uygulaması ile, mikotoksin üretebilen toksijenik küfün gelişiminin inhibisyonu sağlanarak hem küf gelişiminin hem de mikotoksin oluşumunun önüne geçilebileceği düşünülmektedir.

1.1 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacı, Patates Dekstroz Agar (PDA) besiyeri ve kırmızıbiber örneklerine inoküle edilen toksijenik *A. flavus* küfünün, sıcaklığı ve bağıl nemi sabitlenen bir kabin içerisinde Yüksek Doz Kısa Süre (YDKS) ve Düşük Doz Uzun Süre (DDUS) ozonlama işlemlerinin uygulanması ile *A. flavus* küfünün besiyeri ve kırmızıbiber üzerindeki gelişimine ve bu küfün potansiyel aflatoksin üretimine olan etkisinin incelenmesidir.

1.2 Literatür Özeti

1.2.1 Küfler ve Mikotoksinler

1.2.1.1 Küfler

Küfler, kitin ve gluklan içeren hücre duvarına sahip, ökaryotik, doğada yaygın olarak bulunan önemli bir mikroorganizma grubu olmakla birlikte; tarım, tıp, gıda, ilaç, sanayi ve kozmetik endüstrileri gibi birçok alanda çeşitli sorunlara yol açmaktadır. Özellikle karbonhidrat, protein, yağ gibi makro bileşenler ve nem açısından zengin olan gıdalar, küfler için yaşam alanı oluşturmaktadır. Küfler, mikrobiyal aktiviteleri sonucunda gıdaların bozulmasına, gıda atıklarının oluşmasına yol açtığı ve ekonomik kayıplara neden olduğu için gıda endüstrisi ve tüketiciler adına önemli bir sorun oluşturmaktadır (Emenli ve Gündüz, 2019).

Küfler, tarım ve gıda endüstrisinde hammaddelerin ve işlenmiş gıdaların birçoğunun bozulmasına yol açabilir ve mikotoksin üretebilmeleri sonucu ciddi sağlık riskleri oluşturabilmektedir. Gıda güvenliği açısından en çok tehlike oluşturabilen küfler *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Botrytis* ve *Alternaria* spp.'dir. Küfler, gıdalarda bozulmaya ve kalite kaybına sebep olmasının yanı sıra kontrollü bir şekilde kullanıldıklarında; organik asit, protein, antibiyotik ve pigment gibi ikincil metabolitleri üretme yeteneklerinden dolayı tıp ve gıda endüstrilerinde olumlu yanları nedeniyle kullanılmaktadır (Emenli ve Gündüz, 2019).

Küflerin gelişmesinde ve toksin üretmesinde ürünün nem içeriği, ortam bağıl nemi, ortam sıcaklığı, pH, ürünün bileşimi ve küfün türü önemlidir. *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* küfleri, mikotoksin üretebilmeleri açısından en önemli küf türleri olarak bilinmektedir (Adeyeye, 2019).

Aspergillus türleri, tüm dünyada en yaygın olarak bulunan küf grubudur. Özellikle koşulların uygun olduğu, yüksek nem ve sıcaklığın hâkim olduğu tropikal ve sub-tropikal bölgelerde gıda maddelerini ve hayvan yemlerini sporları sayesinde kolaylıkla kontamine edebilirler. *Aspergillus* cinsi küfler, gıda işleminde ve

endüstriyel gıdalarda çok önemli ve tehlikeli bir küf çeşididir (Adejumo ve Adejoro, 2014; Adeyeye, 2019).

Aspergillus küflerinin kontaminasyonu sonucu gıdalarda; bozulmalar, pigmentasyon, renk değişikliği, çürüme ve çürük gelişimi gibi duyuşal, besinsel ve mikrobiyal değişiklikler görülebilir. Birçok *Aspergillus* küf çeşidi diğerk mikroorganizma gruplarına kıyasla düşük su aktiviteli gıdalarda gelişebilir (Adejumo ve Adejoro, 2014).

Aspergillus flavus küfü, tüm dünyada yaygın olan ve çeşitli alanlarda birçok substratta dağılım gösterebilen bir küf çeşididir. *A. flavus*, hasat sonrası gıdalarda bozulma yaratan ve tarımsal ürün kaybına yol açan en yaygın *Aspergillus* küf türüdür (Adeyeye, 2019).

1.2.1.2 Mikotoksinler

Mikotoksinler, yem ve gıdalarda bazı toksijenik küf türleri tarafından sentezlenen metabolik ürünler olup, bunlarla beslenen hayvan ve insanlarda mikotoksikozis denen hastalıklara sebep olan toksik maddelerdir (Tiryaki ve diğ., 2011). İnsan ve hayvan sağlığı üzerine ölümcül etkileri ile bilinen; aflatoksinler, fumonisinler, okratoksinler, zearalenonlar ve trikotesenler gibi günümüze kadar tespit edilmiş 400'ü aşkın mikotoksin bulunmaktadır. Mikotoksinler; hasat öncesi tarlada, hasat zamanı ve hasat sonrası uygun olmayan depo koşullarında toksin üretebilen küflerin gelişmesiyle ortaya çıkmaktadır (Gürhayta ve Çağındı, 2015; Açu ve Ocak, 2019).

Tarımda ve gıda endüstrisinde Avrupa Birliği (AB) Yönetmeliğı tarafından belirlenen en tehlikeli mikotoksinlerin (Aflatoksin, Okratoksin A, Deoxynivalenol, Fumonisin ve Trikotesenler) üç ana küf cinsinin (*Fusarium*, *Aspergillus* ve *Penicillium*) toksijenik türleri tarafından üretildiğı bilinmektedir (Kılınç, 2020).

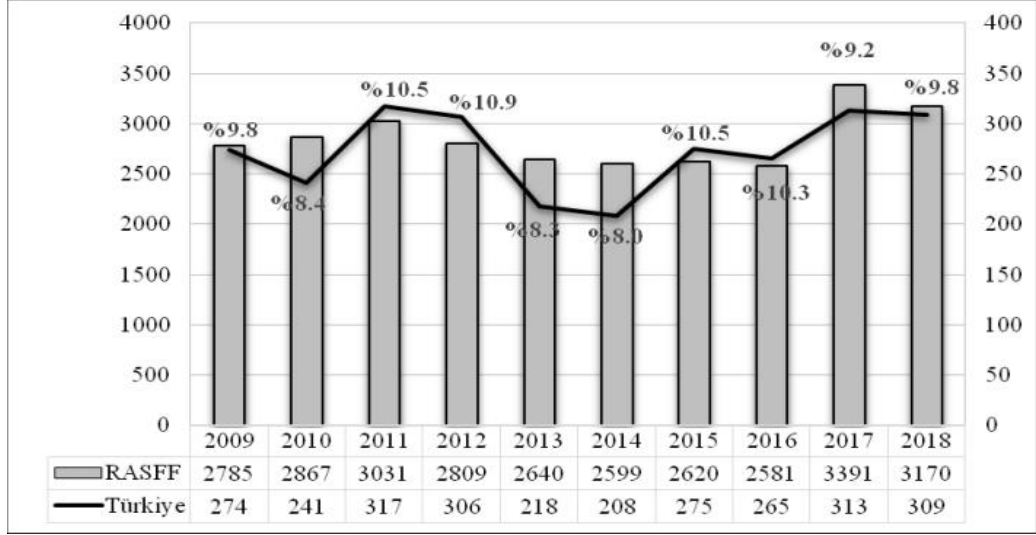
Yem veya tarımsal gıdalarla mikotoksin alımı akut belirtilerden ziyade kronik özellikte zehirlenmelere neden olmakta ve başta karaciğerk olmak üzere, böbrek, immun sistem organ ve dokularında ciddi bozukluklar yaratabilmektedirler. Protein sentezini engelleyebilen etkisi, vücuttaki tüm doku ve organlarda kısa veya uzun vadede ciddi toksik etkiler gösterebilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (World Health

Organization-WHO) verilerine göre, tahıl ağırlıklı beslenen nemli tropikal ülkelerde tespit edilen karaciğer kanseri oranı ile alınan gıdalardaki mikotoksin içeriği arasında doğru bir orantı olduğu belirlenmiştir. Mikotoksinlerin karsinogenik, mutajenik, teratojenik, hepatotoksik, nefrotoksik, immunosupresif, östrojenik ve embriyotoksik etkileri, kanatlı ve memeli hayvanlarda yoğun olarak çalışılmış ve büyük ölçüde açığa kavuşturulmuştur (Oğuz, 2017).

Son yıllarda kaliteli ve sağlıklı ürünlerin tüketilmesine yönelik tüketicinin bilinçlenmesi gıda güvenliğini önemli hale getirmiştir. Ayrıca bu durumun uluslararası ticari boyutu da vardır (Tiryaki ve diğ. 2011). Nitekim AB ülkeleri arasında ihracat/ ithalat edilen ürünlerde mikotoksinlerden kaynaklanan geri dönüşler ve bu ürünlerin hangi ülkelerden geldiği günlük rapor halinde, gıda ve yemlerdeki hızlı alarm sistemi aracılığıyla (Rapid Alert System for Food and Feed- RASFF) duyurulmaktadır.

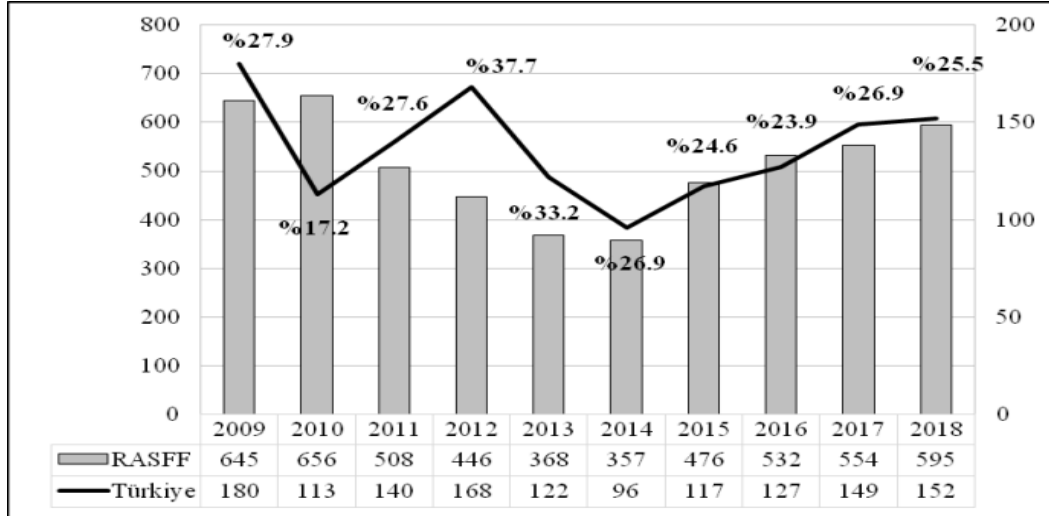
RASFF raporlarında, RASFF üyesi ülkeler ve Türkiye kaynaklı gıdalarda (ham ve/veya işlenmiş) 2009– 2018 arasında yapılmış olan bildirimlerin yıllara göre dağılımı Şekil 1.1’de verilmiştir. RASFF bildirimlerinin yaklaşık %30 artışla 2017 ve 2018 yıllarında en yüksek seviyelere ulaştığı saptanmıştır. Türkiye kaynaklı gıda ürünlerinde yapılan bildirim sayıları ile RASFF üyesi ülkeler tarafından yapılan bildirim sayıları arasında yüksek düzeyde korelasyon ($r = 0.71$) belirlenmiştir. Şekil 1.1’de ayrıca ülkemiz kaynaklı gıdalarda yapılan bildirimlerin, RASFF sistemindeki toplam bildirimlere oranları da verilmiştir. Buna göre, toplam bildirimlerin %8- %10.9’unun ülkemiz kaynaklı olduğu tespit edilmiştir (Sağlam ve Masatcıoğlu, 2020).

Türkiye kaynaklı gıdalarda tespit edilen mikotoksinler için RASFF bildirimlerindeki bu genel dağılımı üye olan ülkelerin verileri ile orta düzeyde korelasyon ($r=0.45$) göstermiş olsa da toplam mikotoksin bildiriminin %17.2- 37.7’sinin Türkiye kaynaklı olduğu tespit edilmiştir (Sağlam ve Masatcıoğlu, 2020).



Şekil 1.1: Gıda ürünlerinde 2009-2018 yılları arasında dünyada ve ülkemizde yapılan toplam RASFF bildirim sayıları ve oranları (Sağlam ve Masatcıoğlu, 2020).

RASFF raporlarında, dünyada ve ülkemizdeki gıdalarda tespit edilen mikotoksin bildirimlerinin yıllara göre değişimi Şekil 1.2’de verilmiştir.



Şekil 1.2: Gıda ürünlerinde 2009-2018 yılları arasında tespit edilen mikotoksinlerin dünyada ve ülkemizde yapılan RASFF bildirim sayısı ve oranları (Sağlam ve Masatcıoğlu, 2020).

Bu verilere ek olarak, 2019 ve 2020 RASFF raporları da incelendiğinde, ülkemiz adına yapılan toplam bildirim sayıları artış göstermektedir (sırasıyla 337 ve 389). 2019 yılında Türkiye kaynaklı toplam 337 bildirimden 104’ünün mikotoksin kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. 2020 yılında ise Türkiye kaynaklı 389 bildirim

97'sinin mikotoksin kaynaklı olduğu tespit edilmiştir. Bu durum sebebiyle ülkemiz için mikotoksin problemi, göz ardı edilmeyecek kadar önem arz etmektedir.

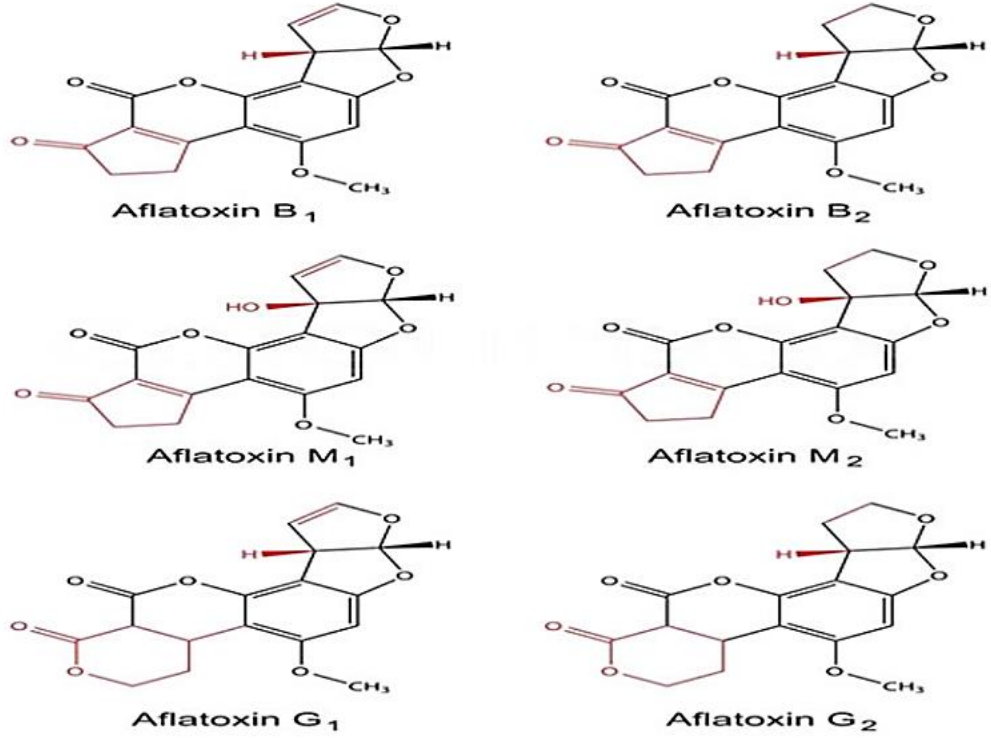
Tarımsal ürünlerde mikotoksin oluşumu, uygun ortam koşullarında ürüne bağılı olmak üzere, hasattan tüketime kadar hemen her aşamada meydana gelebilmektedir. Küfler büyüme ve gelişimlerini tamamladıklarında, hücrelerinde birikmiş olan fazla karbonhidratı ikincil metabolizma ile mikotoksinlere çevirirler. Tarımsal ürünlerde gelişen küfler mikotoksin oluşumundaki temel sebep olmakla beraber, küflerin mikotoksin oluşturmada çevresel faktörler de çok önemlidir (Tiryaki ve diğ. 2011).

En çok bilinen ve üzerine en çok çalışılan mikotoksin grubu olan aflatoksinler, bazı *Aspergillus* küf türleri (*A. flavus*, *A. parasiticus* ve *A. nomius*) tarafından üretilen sekonder metabolit grubudur (Erzurum, 1996). Aflatoksinler, toksijenik olan *Aspergillus* küf türlerinin ikincil bir metabolik yolla sentezlediği bileşiklerdir (Ren ve diğ. 2020).

18 farklı türü tanımlanan aflatoksinler arasında, doğal olarak meydana gelen AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2 olmak üzere 4 adet aflatoksin türü mevcuttur (Filazi ve Sireli, 2013, Adejumo ve Adejoro, 2014). AFB1 ve AFB2, ultraviyole ışık altında mavi (blue) floresan ışık vermesi sebebiyle 'B', AFG1 ve AFG2 ise, yeşil (green) floresan ışık vermesi sebebiyle 'G' harfleri ile tanımlanmıştır (Kensler ve diğ. 2011; Adejumo ve Adejoro, 2014).

Diğer aflatoksin türleri olan Aflatoksin M1 (AFM1) ve Aflatoksin M2 (AFM2), genellikle hayvansal kaynaklı gıdalarda (süt, peynir, yumurta vb.), hayvanların AFB1 ve AFB2 içerikli yemleri tüketmesi sonucu oluşurlar (IARC, 2002; CAST, 2003; Adejumo ve Adejoro, 2014). AFM1, 'Süt toksini' olarak bilinir. AFB1, yemler ile süt hayvanına geçer ve vücutta metabolize olarak AFM1'e dönüşür (Açu ve Ocak, 2019). Yani AFM1 ve AFM2, AFB1'in metabolitidirler (Ren ve diğ., 2020).

Aflatoksin türleri arasındaki toksisite sıralaması AFB1> AFM1> AFG1> AFB2> AFG2> AFM2 şeklindedir (Açu ve Ocak, 2019). Bazı aflatoksin türlerinin kimyasal yapıları Şekil 1.3 'de verilmiştir.



Şekil 1.3: Aflatoksin B₁, B₂, M₁, M₂, G₁ ve G₂'nin kimyasal yapıları (Adeyeye, 2019).

Günümüze kadar 350'ye yakın küf türünün mikotoksin oluşturduğu, bunların içerisinde 20-25 mikotoksin çeşidinin yem ve gıdalarda doğal kirletici olarak buldukları ve bu besinlerin tüketilmesi durumunda, hayvanlarda ve insanlarda akut ya da kronik zehirlenmelere sebep olduğu belirtilmiştir. Yem veya tarımsal gıdalarla mikotoksin alımı, akut belirtilerden ziyade daha çok kronik özellikte zehirlenmelere neden olmakla birlikte başta karaciğer olmak üzere, böbrek ve bağışıklık sistemi organ ve dokularında ciddi bozukluklar yaratmaktadırlar. Mikotoksinler, vücutta protein sentezini engellemesi ile tüm doku ve organlarda kısa veya uzun vadede ciddi toksik etkiler gösterebilmektedir (Oğuz, 2017).

Mikotoksinler, vücutta karaciğere toksik etki edenlere 'hepatotoksik', deriye etki edenlere 'dermatoksik', böbreklere etki edenlere 'nefrotoksik', sinir sistemine etki edenlere 'nörotoksik' ve bağışıklık sistemine etki edenlere ise 'immünotoksik /immünosupresif' olarak tanımlanırlar. Toksik etkileri dışında mutajenik, kanserojenik, teratojenik ve östrojenik etkileri de görülebilmektedir (Tunail, 2000).

Gıdalarda bulunabilecek maksimum aflatoksin içerikleri birçok ülkede yasal düzenlemeler ile belirlenmiştir. Türk Gıda Kodeksi (TGK)'ye göre bazı gıda

maddelerinde bulunabilecek maksimum toplam aflatoksin ve AFB1 miktarları Tablo 1.1’de verilmiştir.

Tablo 1.1: TGK’ye göre aflatoksinler için gıdalardaki maksimum limitleri (TGK, 2011).

Gıda Maddesi	Maksimum limit ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
	AFB1	Toplam Afl	AFM1
Yerfıstığı, diğer yağlı tohumlar ve bunların işlenmiş ürünleri	5	10	-
Badem, Antepfıstığı ve kayısı çekirdeği	8	10	-
Fındık ve Brezilya fındığı	5	10	-
Sert kabuklu meyveler ve bunların işlenmiş ürünleri	5	10	-
Kurutulmuş meyveler	8	10	-
Çiğ süt, ısıtılmış işlem görmüş süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	-	-	0.05
Baharatların aşağıdaki türleri için;	5	10	-
Kırmızıbiber (<i>Capsicum spp.</i>) (Bunların kurutulmuş meyveleri, tüm ve öğütülmüş halleri dahil)			
Karabiber (<i>Piper spp.</i>) (Bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil)			
Hintceviz/Muskat (<i>Myristica fragrans</i>)			
Zencefil (<i>Zingiber officinale</i>)			
Zerdeçal (<i>Curcuma longa</i>)			
Bunların bir veya birkaçını içeren karışım baharat			

Gıdalarda kullanılan birçok baharat; küf sporları, mayalar ve bakterilerin kontaminasyonuna maruz kalabilmektedir. Baharat üretiminde kullanılan meyve/sebzelerin üretildiği bitkiler toprak ve su ile temas halinde olduklarından kontaminasyon hızlı ve kolay bir biçimde gerçekleşebilir.

Kırmızı pul ve toz biber, ülkemizde yoğun olarak tüketilen baharatların başında gelmektedirler. Ülkemizde yapılan çalışmalar bu baharatların yaygın olarak çeşitli mikroorganizmalar tarafından kontaminasyona maruz kaldığını göstermiştir (Tekinşen ve Sarıgöl, 1982; Karapınar ve Tuncel, 1986). Türkiye’de kırmızıbiberde

aflatoksin düzeyinin yasal limitlerin üzerinde bulunabildiğine dair çalışmalar da bulunmaktadır (Taydaş ve Aşkın, 1995; Ağaoğlu, 1999).

Kırmızıbiber, *Solanaceae* familyasına ait olan *Capsicum annuum* türünden bir sebzenin kurutularak öğütülmesi sonucu elde edilen, yemeklere lezzet, aroma ve acılık vermek amacıyla kullanılan bir baharat çeşididir. Anavatanı tropik Amerika'dır. Meksika, Şili ve Peru'da 2000 yıldan beri üretimi yapılmaktadır. Türkiye'de ise çoğunlukla Akdeniz, Ege ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde yetiştirilmektedir. Bu bölgelerde biber taze olarak da tüketilmekle birlikte; sanayi hammaddesi olarak başta konserve, salça, turşu, sos çeşitleri ve işlenmiş et ürünlerinde (pastırma, sucuk, sosis, salam vb.) kurutulmuş, toz ve pul biber şeklinde kullanılmaktadır (Duman, 2002).

Kırmızıbiber, eskiden beri hem taze halde hem de baharat olarak tüketilse de günümüzde daha çok baharat haline getirilerek kullanılmaktadır. Günümüzde, baharatlık biber üretiminde endüstriyel metotlar yaygın olarak kullanılmakla beraber, bazı ülkelerde hala geleneksel olarak güneşte doğal şartlar altında kurutma ile kırmızıbiber baharatı elde edilmektedir (Atasoy ve diğ. 2017).

Kurutma işlemi doğal ve yapay (dehidrasyon) kurutma olarak ikiye ayrılmaktadır. Doğal kurutma açık şartlarda gölgede veya direk güneş ışığı altında yapılmaktadır. Yapay kurutmada ise kabin veya tünellerde sıcak havayla kurutma, vakumla kurutma, kızıl ötesi kurutma, ozmotik kurutma, püskürtmeli kurutma, dielektrik kurutma ve mikrodalga ile kurutma gibi uygulamalarda güneş dışında diğer enerji kaynakları kullanılmaktadır (Anonim, 2006).

Yapılan çalışmalar, *Capsicum* cinsinde yer alan kırmızıbiberlerin kanserojen ve teratojen etkileri olan aflatoksin ve okratoksin gibi mikotoksinlerin oluşumu yönünden riskli ürünler arasında bulunduğunu göstermektedir. Kırmızıbiberde küf kontaminasyonu ilk başta bitki üzerinde başlamakta, hasada kadar geçen süre içerisinde ve daha sonra kurutma sırasında küf gelişimi devam etmekte ve toksin oluşumu başlamaktadır. Aflatoksinin henüz biber dalında iken bile oluşabileceği, yapılan çalışmalar ile saptanmıştır (Dokuzlu, 2001).

Gıdalardaki aflatoksin problemine karşı önlemlerin alınmasında, *A. flavus* küfünün gelişmesi ve aflatoksin üretebilmesi için gerekli fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörlerin bilinmesi önem arz etmektedir. Doğada aflatoksin oluşumunu teşvik eden ana faktörler; *A. flavus* küfünün toksijenik olup olmaması, gıda maddesinin bileşimi, nem ve sıcaklık gibi faktörlerdir (Gürhayta ve Çağındı, 2015). *Aspergillus* türleri doğada yaygındır. Özellikle toprakta, gübrede, bitkilerde ve ayrışan organik bileşikler üzerinde bulunurlar. Küçük ve hafif sporları havada kolaylıkla asılı kalıp çevreye yayılabilir. Üreme hız ve kapasitesi yüksektir. Havada en yüksek yoğunlukta bulunan küflerden biridir (Kantarcioglu ve Yücel, 2003; Ayberkin ve Çiftçi, 2009).

Küf gelişimi sonucu mikotoksin oluşumunu etkileyen faktörler; fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörler olmak üzere 3 ana başlık altında toplanabilir. Gıdalarda mikotoksin oluşumunu etkileyen faktörler Tablo 1.2’de verilmiştir.

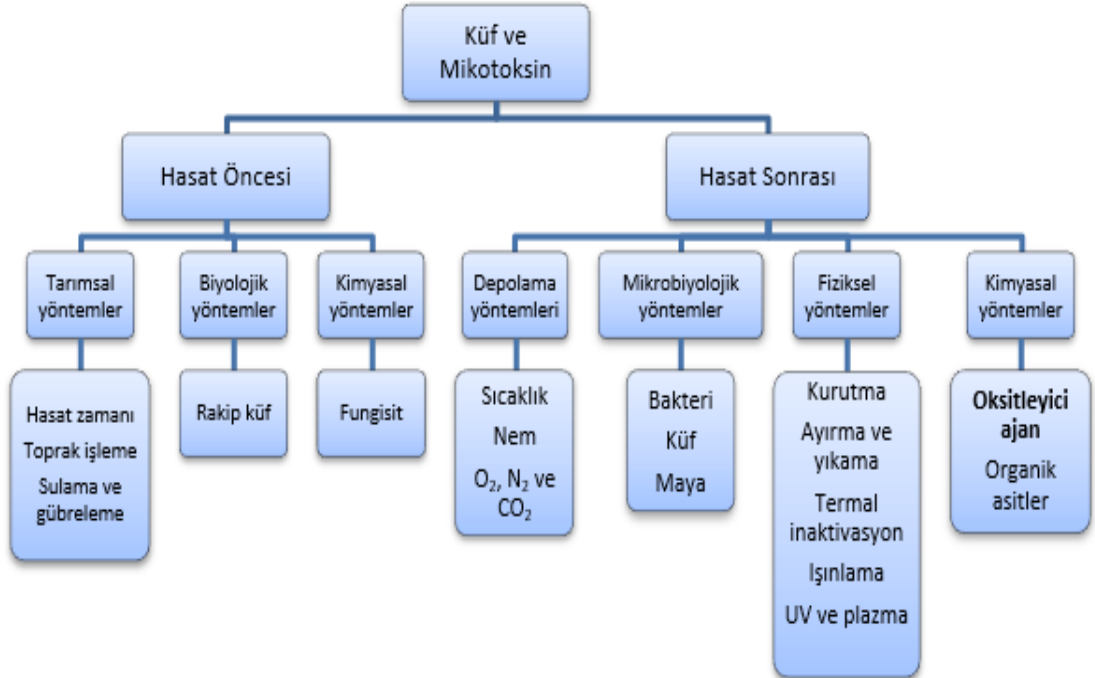
Başta kuraklık stresi olmak üzere, bitki stresi de üründe aflatoksin oluşumunu arttıran önemli faktörlerdendir. Benzer şekilde böcek zararları ve onların neden olduğu kontaminasyonlar, bitkiye zarar veren diğer fungal hastalıklar, bitkiyi zayıf düşürerek üründe aflatoksin oluşumuna neden olmaktadır. Bitkilerin *A. flavus* kontaminasyonuna karşı dirençlerinin farklı oluşu, üründe oluşabilecek aflatoksin düzeyini de etkileyebilmektedir. Diğer taraftan her *A. flavus* türü aflatoksin oluşturabilme yeteneğinde değildir (Duman, 2002).

Tablo 1.2: Gıdalarda mikotoksin oluşumunu etkileyen faktörler.

Fiziksel Faktörler	Kimyasal Faktörler	Biyolojik Faktörler
Bağıl hava nemi	Substrat yapısı ve bileşimi	Küf kontaminasyon ve inokulum miktarı
Substrat nem içeriği	Kimyasal işlemler (Gübreleme, ilaçlama)	Bitki çeşidi ve bitki dayanıklılığı
Kuruma hızı	Hava gaz kompozisyonu	Bitki stresi ve hastalıkları
Sıcaklık		Küf genetik farklılıkları
Mekanik zararlanmalar		Mikroorganizmalar arası rekabet durumu
Zaman		Kemirgen ve zararlılar
Yeniden nemlenme		

A. flavus'un gelişimi ve aflatoksin üretebilmesi için gerekli a_w değerinin 0.78-0.99 aralığında, gelişim sıcaklığının 10-43°C arasında değişmekle beraber optimum gelişim ve aflatoksin üretimi sıcaklığı 30 °C'dir. Yüksek bağıl nem (>%80) ve %17.60 üzerindeki substrat su içeriği şartlarında *A. flavus* gelişimi hızlanmakta ve aflatoksin üretimi sağlanmaktadır (Gürhayta ve Çağındı, 2015; Atasoy ve diğ. 2017; Thanushree ve diğ. 2019).

Genel olarak, küf gelişiminin ve mikotoksin oluşumunun kontrolü iki ana strateji ile belirlenir. Bunlar; küf gelişiminin inhibisyonu ve mikotoksin üretiminin engellenmesi şeklindedir. Yem ve gıdalarda küf gelişimini ve mikotoksin oluşumunu engelleyebilmek adına hasat öncesi ve hasat sonrası aşamalarda uygulanabilecek birçok yöntem mevcuttur. Bu yöntemler; tarımsal, biyolojik ve fiziksel sistemlere dayanmaktadır (Conte ve diğ. 2020). Gıda ve yem zincirindeki küf gelişimi ve mikotoksin oluşumu kontrolü için hasat öncesi ve hasat sonrası uygulanan yöntemler Şekil 1.4'te verilmiştir.



Şekil 1.4: Gıda ve yem zincirindeki küf gelişimi ve mikotoksin oluşumu kontrolü için hasat öncesi ve hasat sonrası uygulanan yöntemler (Conte ve diğ. 2020).

Küf gelişimini ve mikotoksin oluşumunu önleyebilmek için; bazı bazlar (amonyak, sodyum hidroksit gibi), oksitleyici ajanlar (hidrojen peroksit, ozon gibi) ve organik asitler (formik ve propiyonik asit gibi) olmak üzere kimyasal ajanlar kullanılmaktadır (Gavahian ve Cullen, 2020). Gıda ve yem zincirinde küf gelişimi ve mikotoksin oluşumunun kontrolü için tarlada, hasatta ve işlenmiş ürünlerde kullanılan kimyasalların azaltılmasında basit ve etkili çözümlerin eksikliği, bu alandaki sorunları kısmen veya tamamen ortadan kaldıracak alternatif bir yöntem arayışına yol açmaktadır.

Ozonlama işlemi, uygulama sonrası kalıntı bırakmayan basit ve çevre dostu bir teknoloji olarak tanımlanmaktadır. Ozon gazı kullanımı ile küf gelişimi inhibisyonu ve mikotoksin oluşumunun engellenmesine dair birçok makale rapor edilmiştir (Piemontese ve diğ. 2018; Conte ve diğ. 2020).

1.2.2 Ozon Gazı

Eskiden günümüze kadar gıda güvenliğini sağlama amacıyla kullanılan dezenfeksiyon sistemleri (genellikle klor bazlı dezenfektanlar), günümüzde farklı koşullarda (yüksek pH vb.) bazı mikroorganizmalarda ve bu mikroorganizmaların spor formları üzerinde etkisiz kalması ve bununla birlikte işlem sonucu trihalometan gibi gıdalarda istenmeyen zararlı parçalanma ürünleri oluştuğundan ötürü kullanımları sakıncalı görülmektedir.

Kullanılan dezenfektan maddeleri ile ilgili yapılan çalışmalarda, gıdalara yönelik kullanımlarda çevre dostu, gıda proseslerine uygun, kullanımı sonrası zararlı bir kalıntı bırakmayan, patojen mikroorganizmalar ve bunların spor formları üzerine geniş ve güçlü etkiye sahip olan maddelere eğilim gösterilmiştir. İstenen bu şartlarda, güçlü antimikrobiyal ve antiviral etkisi bilinen ozon gazı ile ilgili çalışmalara son yıllarda önem verilmiştir (Savaş ve diğ. 2014).

Ozon gazı, 1840 yılında Alman kimyager Christian Frederick Schönbein tarafından keşfedilmiştir. 1900'lü yılların başında bitki ve toprak sulamadaki su arıtımında, 1940'ta ise içme suyu arıtımında kullanılmaya başlanmıştır. Teknolojinin

ilerlemesiyle birlikte 1980'lerde ozon gazı üretiminin kolaylaşması ve ucuz maliyetle gerçekleştirilmesiyle birlikte kullanım alanları artmıştır (Ekici ve diğ. 2006).

Ozon gazı, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA) tarafından 'Genel olarak güvenli' (Generally Recognized As Safe-GRAS) olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca 2001 yılında alınmış olan bir kararla 'Gıdalarla doğrudan temasında sakınca olmayan' özelliğini kazanan ozon gazı, gıdalar için güvenli bir antimikrobiyal ve dezenfekte edici bir ajan olarak tanımlanmıştır (Arda ve diğ. 2021).

1.2.2.1 Ozon Gazının Yapısal Özellikleri

Ozon gazı yeryüzünde, atmosferde doğal olarak bulunan ve oksijenin 3 atomlu formu olan doğal bir molekül olarak tanımlanmaktadır. Ozon gazının kendisine has keskin bir kokusu vardır ve atmosferik koşullarda oldukça kararsız bir yapıdadır (Savaş ve diğ. 2014).

Havada nispeten kararlı olan ozon gazı, sulu forma dönüştürüldüğünde çok kısa sürede kararsız bir yapıya dönüşmektedir. Bu sebeple ozon gazı depolanmamaktadır ve kullanılması için sürekli üretilmelidir. Ozon gazının ayrışması ile oluşan tek ürün oksijendir ve bu sebeple ozon gazı uygulaması sonrasında gıdalar üzerinde herhangi bir kalıntıya rastlanmamaktadır. Ozon gazı, diğer kimyasal dezenfektanlara oranla daha yüksek bir oksidasyon-redüksiyon potansiyeline (2.07 mV) sahiptir (Karaca ve Velioğlu, 2007).

Ozon gazının ortamdaki kararlılığın süresi; sıcaklığa, pH'a, basınca ve organik maddelerin varlığına bağlıdır. Ozon gazı sulu forma dönüştürüldüğünde, gaz formuna göre daha kısa sürede oksijene parçalanmaktadır. Sulu ozonun düşük pH ortamında (pH<6.5) yarılanma süresi daha yüksektir (Hejri ve diğ. 2020). Ortam sıcaklığının yükselmesi ise, ozon gazının daha hızlı parçalanmasını sağlamaktadır (Aslam ve diğ. 2019). Tablo 1.3'te, doğada saf olarak bulunan ozonun bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri verilmiştir.

Tablo 1.3: Saf ozonun bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri (Ekici ve diğ. 2006).

Özellik	Ozon
Formülü	O ₃
Molekül ağırlığı (g/mol)	48
Yoğunluk (g/L)	2.144
Kaynama Noktası (°C)	-111.9 ± 0.3
Erime Noktası (°C)	-192.5 ± 0.4
Kritik Sıcaklık (°C)	-12.1
Kritik Basınç (atm)	54.6

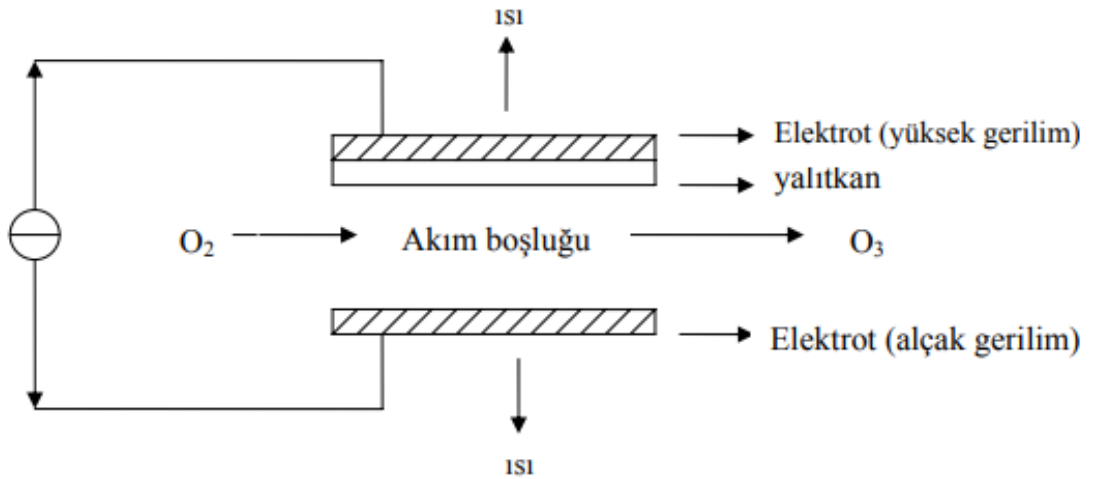
1.2.2.2 Ozon Gazı Üretimi

Ozon gazı, havadaki oksijen moleküllerine (O₂) yüksek bir enerji girdisi ile O₂ moleküllerinin parçalanıp tekli oksijen atomlarının (O) oluşmasıyla, ortamda mevcut olan diğer O₂ molekülleriyle birleşmesi sonucu oluşmaktadır. Doğada bu yüksek enerji girdisinin kaynağı güneşten gelen ultraviyole (UV) ışın ve yıldırım deşarjıdır (Karaca ve diğ. 2010).

Doğada kendiliğinden var olan ve oluşabilen ozon gazının yanı sıra, insanoğlu doğadan esinlendiği bu döngüyü ticari olarak ozon gazının üretilmesinde kullanmaktadır. Hava ve saf oksijen ortamının sağlanması ile yüksek voltajlı elektrik akımı enerjisiyle insanoğlu ozon gazını ticari olarak da elde etmektedir (Oğuz ve Çelik, 2001).

Ozon, ticari olarak genellikle ‘Korona Akım’ metodu ile üretilmektedir. O₂ moleküllerinin yüksek elektrik akımından geçirilmesiyle O₂ molekülleri parçalanarak reaktif serbest O atomlarına dönüşmesi sağlanır. Serbest kalan O atomları, O₂ molekülleri ile karşılaştığında bu moleküllere bağlanarak kararsız formda olan ozon gazı elde edilir. Ozon gazı oluştuktan sonra tekrar başlangıçtaki O₂ ve O yapılarına dönüşebileceği gibi, serbest O atomları da aralarında O₂ molekülüne dönüşebilmektedir. Buradaki atom ve moleküller, ortamda mevcut olabilecek diğer reaktif ürünler ile de reaksiyona girebilir. Bu yüzden ozon gazı son derece reaktif bir bileşen olarak tanımlanmaktadır (Ekici ve diğ. 2006). Ozon gazı üretiminde

kullanılan Korona Akım metodu Şekil 1.5'te verilmiştir.



Şekil 1.5: Ozon gazı üretiminin sağlandığı Korona Akım metodu (Ekici ve diğ. 2006).

1.2.2.3 Ozon Gazının Etki Mekanizması ve Antimikrobiyal Etkisi

Ozon gazının; küf, bakteri, virüs, protozoa, mikotoksin, pestisit, depo zararlıları ve mikroorganizma sporları gibi geniş bir spektruma karşı antimikrobiyal etki ve toksin formlarının yapılarını bozma eğilimi gösterdiği rapor edilmiştir. Ozon gazının antimikrobiyal etkisi; hücre duvarı ve hücre zarı üzerine verdiği hasar ile açıklanmaktadır. Ozon gazının yüksek oksitleyici gücü ile mikroorganizmaların hücre duvarı parçalanabilmektedir (Aslam ve diğ. 2019).

Birçok çalışma, ozonlama işlemiyle patojen mikroorganizmaların oksitlenerek etkisiz hale getirildiğini tespit etmiştir. Ozonun özellikle hücre zarındaki doymamış lipitlere hasar vererek bu yapıların sızmasına ve mikrobiyal lizise yol açtığı açıklanmıştır. Ayrıca patojen mikroorganizmaların gelişimini sağlayan hücre içi protein yapılarına zarar vererek gelişimini durdurup hücre ölümüne kadar yol açtığı belirtilmektedir (Conte ve diğ. 2020; Fan, 2021).

Ozon gazı, Gram negatif bakterilerin sahip olduğu lipopolisakarit ve lipoprotein tabakalarına verdiği hasar ile hücrenin geçirgenliğini bozarak hücre ölümüne sebep olmaktadır.

Ozonun virüslere verdiği etki birden çok mekanizma ile gerçekleşebilmektedir. Yapılan bir çalışmada, ozon gazı uygulaması sonucu

virüslerin faj partiküllerinde kırılmaların olduğu ve RNA sızıntısının olduğu belirlenmiştir (Kuşçu ve Pazır, 2004; Ekici ve diğ. 2006).

Ozon gazının küf gelişimini önlemedeki etki mekanizması ise küfün koruyucu membranına verdiği hasar ile açıklanmaktadır. Bazı küf türlerinin membran yapılarının farklılığı sonucu ozon gazının farklı küf türlerine karşı etkinliği değişebilmektedir ve ozon gazına olan dirençleri artabilmektedir (Awuchi ve diğ. 2021).

Ozon gazının mikotoksinlere olan etki mekanizması mikotoksin çeşidine göre değişmekle beraber, çoğu mikotoksinlerin ozon gazı ile detoksifikasyon etki mekanizması halen bilinmemektedir. Aflatoksinlere uygulanan ozon gazı ile, AFB1 ve AFG1’de bulunan furan halka yapılarındaki C8-C9 çift bağlarına zarar vererek bu furan yapısında bulunan hipertoksik bölgelerin yapısı bozulmaktadır. AFB2 ve AFG2’de C8-C9 çift bağı yoktur ve ozon gazının bu iki aflatoksin türüne verdiği etki mekanizması yapılarında buldukları lakton halkalarıdır. Sonuç olarak aflatoksin türlerine ozon gazının etki mekanizması sonucu ilk ürüne göre molekül ağırlığı daha düşük ve daha az toksik maddeler oluşmaktadır (Conte ve diğ. 2020; Awuchi ve diğ. 2021).

Ozon gazının mikroorganizmalar üzerine etki mekanizması ve antimikrobiyal etkinliği; ortam sıcaklığına, pH’ya, bağıl neme, ozon konsantrasyonuna ve ortamdaki çözünebilir organik maddelerin varlığına göre değişebilmektedir. Çünkü bu faktörler, ozon gazının ortamdaki çözünürlüğünü ve stabilitesini etkilemektedir (Kuşçu ve Pazır, 2004; Varga ve Szigeti, 2016).

1.2.2.4 Ozon Gazının İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi

Okside edici birçok gaz gibi, ozon gazının da yüksek konsantrasyonlarına uzun süre maruz kalınması insan sağlığı açısından risk teşkil etmektedir (Ekici ve diğ. 2006). 0.1 µL/L (ppm) ozon dozuna maruz kalınması sonucu gözlerde, boğazda ve burunda ufak çaplı tahriş oluşabilmektedir. Daha yüksek ozon dozlarında ise insanda öldürücü etkiye kadar gidebilmektedir (Kuşçu ve Pazır, 2004; Varga ve Szigeti, 2016).

Ozon gazının endüstriyel alanlarda kullanımında iş sağlığı ve güvenliği açısından dikkat edilmesi gereken sınır değerler bulunmaktadır. WHO tarafından insanların bulunduğu kapalı ortamlarda ozon konsantrasyonu 0.05 ppm'i aşmaması tavsiye edilmektedir. Kısa süreli olarak (15 dakika) maruz kalınabilecek maksimum ozon sınır değeri 0.3 ppm'dir (Özcan ve Uraz, 2021).

FDA tarafından; iş yerlerinde, çalışma alanlarında bir gün içerisinde uzun süreli maruz kalınabilecek ozon gazı maksimum sınır değeri 0.1 ppm 8 saat/gün olarak belirlenmiştir. 'Yaşam ve sağlık için hemen tehlikeli (Immediately Dangerous to Life or Health-IDLH)' ozon konsantrasyon sınırı ise 5 ppm'dir. Bu ozon gazı konsantrasyonlarına maruz kalmak tehlikeli olduğu için ozon gazı ile çalışılan alanlarda işçilerin maske kullanma zorunluluğu bulunmaktadır (Ekici ve diğ. 2006; Savaş ve diğ. 2014).

1.2.2.5 Ozon Gazı Uygulamalarının Toksik Küfler Üzerine Etkisi

Ozon gazı ilk olarak su arıtımında ve dezenfeksiyonunda; demir ve mangan gibi ağır metallerin giderilmesi ve tat/koku iyileştirilmesi alanlarında kullanılmıştır. Ardından GRAS madde özelliğini kazanması ile gıdalarda kullanımı yaygınlaşmıştır. 20. yüzyıldan itibaren ise et, süt, meyve-sebze ve tahıl ürünleri gibi birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır (Kim ve diğ. 1999; Aslam ve diğ. 2019).

Bugüne kadar meyve-sebze ürünlerinde küf kontaminasyonları ve patojen mikroorganizmalara karşı dezenfekte edici birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en çok bilineni olan sıvı klor uygulamasının, ticari kullanımlarda mikrobiyal yükü azaltıcı etkisi görülmüştür. Ancak bu maddenin organik asitlerle girdiği reaksiyonlar sonucu haloasetik asit ve trihalometanlar gibi toksik yan ürünler oluşturması büyük bir dezavantaj olarak rapor edilmiştir. Ayrıca sıvı klor uygulamalarının, uygulanan ürünlerdeki tat ve koku kalitesine olumsuz etki ettiği tespit edilmiştir (Aslam ve diğ. 2019).

Gıdalarda bozulmaya sebep olan ve oluşturdukları mikotoksinler ile insan sağlığını ciddi şekilde tehdit eden bazı küf türlerinin gelişimine ve mikotoksinlerin üretimine karşı ozon gazı uygulamalarının inhibe edici etkisi birçok araştırmacı tarafından test edilmiştir. Literatürde bulunan bazı çalışmalar toksijenik küf gelişimi

ve mikotoksin üretimine karşı uygulanan ozon gazının etkisi şeklinde tarafımızca sınıflandırılıp bu çalışmaların sonuçları Tablo 1.4'te ve Tablo 1.6'da özetlenmiştir.

Tablolardan da görülebileceği gibi, küf gelişimi ve aflatoksin üretimine karşı ozon gazının etkisi birçok araştırmacı tarafından farklı ürünlerde araştırılmıştır. Ancak ülkemizde yoğun bir şekilde üretilen ve tüketilen kırmızıbiberlerde, *A. flavus* küf gelişimi ve bu küfün aflatoksin üretebilmesine karşı ozon gazının etkinliğinin birlikte incelendiği çalışmalara literatürde rastlanmamıştır. Dolayısıyla bu tez çalışmasında PDA besiyerine ve yarı kurutulmuş kırmızıbibere inokülasyonu yapılan toksijenik *A. flavus* küfüne karşı uygulanan ozon gazı ile *A. flavus* küfünün gelişimine ve aflatoksin üretimine olan etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

Tablo 1.4: Ozon gazı uygulamalarının gıda/besiyeri ortamlarındaki toksijenik küf türlerinin gelişimine olan etkisinin incelendiği bazı çalışmalar.

Küf	Test ortamı	Ozon konsantrasyonu ve uygulama süresi	İnkübasyon şartları	Bulgular	Yazarlar
<i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>P. citrinum</i>	Hurma ve Czapek Dox Agar besiyeri	6 ppm 1, 2, 3 ve 4 saat	28 °C- 7 gün	- 6 ppm ozonlama ile 1'den 4 saate artan ozonlama süresi ile sporlanmanın gittikçe azaldığı belirtilmiştir. - 4 saatlik uygulama sonucu <i>A. niger</i> küfünde sporlanma gözlemlenmemiştir. - <i>A. flavus</i> ve <i>P. citrinum</i> küflerinin 4 saatlik ozonlanması ile spor üretimleri kontrol gruplarına göre sırasıyla %81.56 ve %81.31 azalmıştır.	Ahmadi ve diğ. (2009)
<i>A. nidulans</i> <i>A. ochraceus</i>	PDA besiyeri	200 ve 300 ppm – 10 dk 0.2 ppm – 12 gün	18 °C- 12 gün	- 0.2 ppm düşük doz ozonlama ile iki küf türündeki koloni gelişimi, 200-300 ppm ozonlamaya kıyasla daha çok engellenmiştir. - 0.2 ppm düşük doz ozonlama, diğer iki yüksek doza kıyasla <i>A. nidulans</i> spor üretimini sıfıra indirmiştir.	Babu ve Singleton (2009)
<i>P. digitatum</i>	Mandalina	200 ppb 2, 4 ve 6 saat	25 °C- 3 gün	- Meyve üzerine inoküle edilen küfün ozonlanması sonucu ozonlama süresinin artışı ile küf çapı gelişiminin inhibisyonu da artmıştır. - 2, 4 ve 6 saatlik ozonlama ile küf çapı gelişimleri sırasıyla %68, %95 ve %96 engellenmiştir.	Boonkorn ve diğ. (2012)
<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>P. citrinum</i> <i>F. verticillioides</i> <i>F. graminearum</i>	PDA besiyeri	60 ppm 40, 60, 90 ve 120 dk	25 °C- 8 gün	- <i>F. graminearum</i> ve <i>P. citrinum</i> küflerine 120 dk uygulanan ozonlama işlemi ile inkübasyon süresi boyunca koloni çapı gelişimi gözlemlenmemiştir. - 60 ppm ve 120 dk ozonlama işlemi ile 5 küf türünün küf hiflerinin ölümü gerçekleşmiştir. - 60 ppm ve 120 dk ozonlama işlemi ile <i>A. flavus</i> küf gelişimi 8 günün sonunda %25 sınırlandırılmıştır.	Savi ve Scussel (2014)

Tablo 1.5: Ozon gazı uygulamalarının gıda/besiyeri ortamlarındaki toksijenik küf türlerinin gelişimine olan etkisinin incelendiği bazı çalışmalar (Devamı)

Küf	Test ortamı	Ozon konsantrasyonu ve uygulama süresi	İnkübasyon şartları	Bulgular	Yazarlar
<i>A. flavus</i> <i>P. citrinum</i>	Buğday ve PDA besiyeri	40 ve 60 ppm 30, 60, 120 ve 180 dk	28 °C– 7 gün	- <i>A.flavus</i> küfü için 40 ppm ve 60 ppm ozon gazının 30 dk'lık uygulaması ile sırasıyla %80.72 ve %87.81'lik spor inhibisyonu sağlanmıştır. - 60 ppm ozon gazının 180 dk'lık uygulaması ile <i>A. flavus</i> ve <i>P. citrinum</i> gelişimleri tamamen inhibe edilmiştir.	Savi ve diğ. (2015)
<i>Fusarium</i> spp <i>Aspergillus</i> spp	Plate Count Agar (PCA) besiyeri	20, 40 ve 60 ppm 2, 5 ve 8 saat	36 °C– 2 gün	- 60 ppm ozon gazının 8 saatlik uygulaması ile <i>Fusarium</i> spp ve <i>Aspergillus</i> spp küflerinin koloni oluşturan birim (kob) sayıları sırayla 2.77 ve 2.04 logaritmik düzeyde azaltılmıştır.	Porto ve diğ. (2019)
<i>P. expansum</i> <i>B. cinerea</i>	Kivi	79.44 ppm 1 hafta (günde 1 saat ozonlama)	0 °C- 7 gün	- Uygulanan ozonlama işlemleri sonucu koloni çapı gelişimi <i>P. expansum</i> inoküle edilmiş örnekte %36, <i>B. cinerea</i> inoküle edilmiş örnekte ise %59'luk bir inhibisyon sağlanmıştır. - İşlem sonucu spor sayısı <i>P. expansum</i> için %30, <i>B. cinerea</i> için %44 azaltılmıştır.	Luo ve diğ. (2019)

Tablo 1.6: Ozon gazı uygulamalarının gıdalardaki çeşitli mikotoksinlerin oluşumu üzerine etkisinin incelendiği bazı çalışmalar. mikotoksinlerin oluşumu üzerine etkisinin incelendiği bazı çalışmalar.

Mikotoksin	Test ortamı	Ozon konsantrasyonu ve uygulama süresi	İnkübasyon şartları	Bulgular	Yazarlar
Aflatoksin	Yer fıstığı	13 ve 21 ppm 1, 2, 3 ve 4 gün	25 °C- 5 gün	- 21 ppm ozon gazının 4 gün boyunca uygulanması ile yer fıstıklarındaki toplam aflatoksin ve AFB1 üretimleri kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %30 ve %25 engellenmiştir.	Alencar ve diğ. (2011)
Okratoksin A	Sosis	1 ppm 8 saat/gün	12 °C- 45 gün	- 45 günlük ozonlama süresi sonunda kontrol grubunda 1250 ppb okratoksin A üretimi tespit edilmiş iken ozonlanan sosislerde okratoksin A üretimi 0.1 ppb'nin altında sınırlandırılmıştır.	Iacumin ve diğ. (2012)
Aflatoksin	Buğday	40 ve 60 ppm 30, 60, 120 ve 180 dk	28 °C- 7 gün	- 40 ppm ozon gazı ve 120 dakikalık işlem süresi ile AFB1 üretimi, kontrol grubuna kıyasla %92.91 azaltılmıştır. - 60 ppm ozon gazı ve 180 dakikalık işlem süresi ile AFB1 üretimi, kontrol grubuna kıyasla %94.63 azaltılmıştır.	Savi ve diğ. (2015)

Tablo 1.7: Ozon gazı uygulamalarının gıdalardaki çeşitli mikotoksinlerin oluşumu üzerine etkisinin incelendiği bazı çalışmalar (Devamı).

Mikotoksin	Test ortamı	Ozon konsantrasyonu ve uygulama süresi	İnkübasyon şartları	Bulgular	Yazarlar
Aflatoksin	Buğday	50 ppm 3, 4 ve 5 gün	20 °C- 14 gün	- 50 ppm ozon gazının buğdaylara 3, 4 ve 5 gün uygulanması ile AFB1 üretimleri, kontrol grubuna kıyasla uygulama süresi artırıldıkça azalma göstermiştir. - 50 ppm ozonun 5 gün uygulanması ile buğdaylardaki AFB1 miktarı kontrol grubuna göre %60 azaltılmıştır.	Taran ve diğ. (2020)
Aflatoksin	Meyan kökü ve nane	3 ppm 30, 90, 150 ve 210 dk	28 °C- 7 gün	- 3 ppm ozon gazının 210 dk uygulanması ile meyan kökü ve nane örneklerindeki üretilen AFB1 miktarları kontrol grubuna kıyasla sırasıyla %93.75 ve %90 azaltılmıştır.	Ouf ve Ali (2021)
Aflatoksin	Antep fıstığı	50, 100 ve 200 ppm 30 dk	30 °C- 10 gün	- Uygulanmış olan ozon konsantrasyonlarının artmasıyla birlikte antep fıstığına inoküle edilen <i>A. flavus</i> küfünün AFB1 üretimleri gittikçe azalmıştır.	Baazeem ve diğ. (2022)

2. YÖNTEM

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

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

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

Pasajlama işleminde, projede *in vitro* çalışmalarda kullanılan PDA besiyeri kullanılmıştır. İçinde PDA besiyeri bulunan petri kutularındaki küf kolonileri steril bir öze yardımıyla alınmış ve içinde söz konusu agarı bulunduran diğer bir petri kutusuna üç nokta ekim yöntemiyle aktarılmıştır. Ardından petri kutuları 30 °C'de 7 gün depolamaya bırakılmıştır. Bu işlem, periyodik olarak 3 tekrerrülü yapılmıştır.

2.2 PDA Besiyeri ve Kırmızıbiber Örneklerinin İnokülasyona Hazırlanması

Tez kapsamında kullanılan PDA besiyeri, besiyeri bileşenlerinin satın alınmasıyla birlikte laboratuvar şartlarında hazırlanmıştır. Bu amaçla Denizli'deki yerel marketlerden temin edilen patatesler (200 g), yıkanarak kabukları soyulmadan küçük parçalar haline getirilmiş, bir tencereye alınmış ve üzerine 1 litre saf su eklenip kaynamaya bırakılmıştır. Yarım saat boyunca kaynar halde bırakılan patatesler bir huni ve cendere bezi yardımıyla süzdürülerek mezüre alınmış olup, buharlaşarak eksilen su miktarı tekrar saf su ile 1 litreye kadar tamamlanmıştır.

Ardından içerisinde 20 g dekstroz monohidrat (Tekkim, 14431) ve 15 g agar (Sigma, 05039) ilave edilerek besiyeri karışımı hazırlanmıştır. Bu besiyeri, otoklavda (Hirayama, HA-300M, Saitama, Japonya) 121 °C’de 15 dakika sterilize edilmiş ve analizlere hazır hale getirilmiştir.

Analizlerde kullanılan diğer bir materyal olan kırmızıbiberler, yine Denizli’deki yerel marketlerden temin edilmiştir. Yıkanan ve kurulan biberler, bir bıçak yardımıyla çekirdek ve saplarından ayrılıp 5x5 cm boyutlarında kesilerek kare parçalara ayrılmıştır. Ardından biber parçaları ev tipi bir kurutucuda (Profilo, PFD2350W, Polonya) kurumaya bırakılmıştır. Yarı kurutulmuş biberler kurutucudan alındıktan sonra soğumaya bırakılarak inokülasyon işlemine hazır hale getirilmiştir. Çalışmalarımızda, kırmızıbiber örneklerinde sağlıklı bir küf gelişimini sağlayacak nem değerlerini belirlemek adına 5x5 cm boyutlarındaki biberler, farklı kurutma süreleri boyunca (8, 9, 10, 11 ve 12 saat) kurumaya bırakılmıştır. Denenen her bir kurutma süresi sonunda biber örneklerinin nem miktarları bir nem tayin cihazı (Scaltec, SMO 01, Göttingen, Almanya) ile tespit edilmiştir. Kurutma işlemleri sonunda, 11 saat boyunca kurutulmuş biberlerdeki ölçülen nem değeri aralığı %61.20-70.48 olarak belirlenmiştir. Bu örneklerin a_w değerleri bir su aktivitesi tayin cihazı (GBX Fast/Lab, Romans sur Isère, Fransa) ile belirlenmiş ve 0.85-0.91 olarak tespit edilmiştir. Yapılmış olan bir literatür çalışmasında *A. flavus* küfünün gıdalardaki optimal gelişimi ve mikotoksin üretebilmesi için gerekli olan a_w aralığı 0.80-0.99 olarak verilmiştir (Thanushree ve diğ. 2019). Buna göre bu tez çalışmasında, *A. flavus* küfünün gelişiminin takibi için 11 saat boyunca kurutulmuş biber örneklerinin kullanılmasına karar verilmiştir.

2.3 *Aspergillus flavus* Spor Solüsyonunun Hazırlanması ve İnokülasyon

25 °C’de 7 gün boyunca inkübe edilmiş *A. flavus* küfünü içeren PDA besiyeri üzerine 10 mL steril saf su eklenmiştir. Steril edilmiş bir drigalski spatülü yardımıyla besiyeri yüzeyi kazınarak küf sporlarının suya geçmesi sağlanmıştır. Elde edilen spor süspansiyonu, steril bir tüpe cendere bezinden süzdürülerek alınmıştır. Analizlerimizde kullanılacak olan bu süspansiyonun içerdiği küf spor sayısını tespit

etmek amacıyla Thoma lamında hücre sayım tekniği kullanılmıştır. Thoma lamında koloniler sayılmış, gerekli hesaplamaların yapılmasıyla birlikte belirli oranlarda dilüsyonlar hazırlanarak süspansiyondaki küf spor sayısı 3×10^7 spor/mL olarak ayarlanmıştır.

Hazırlanan *A. flavus* spor süspansiyonundan (3×10^7 spor/mL), önceden petrilere dökülmüş ve katılaştırılmış PDA besiyerlerinin ve kırmızıbiber örneklerinin (etli iç kısmı üstte olacak şekilde) merkezlerine steril kabin içerisinde otomatik pipet yardımıyla 10 µL alınıp inoküle edilmiştir. Merkezlerine küf sporu inoküle edilen petri içerisindeki PDA besiyeri ve kırmızıbiber örneklerinin kontrol grupları depolama ortamlarına, ozon gazı uygulanacak gruplar ise ozon gazı uygulama haznelere alınmıştır.

2.4 Farklı Ozon Gazı Uygulamalarının *A. flavus* Küfünün Gelişimi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Ozon gazı ortamındaki *A. flavus* küfünün, PDA ve kırmızıbiber üzerindeki gelişimleri ve potansiyel aflatoksin üretimlerinin incelenmesi amacıyla ozon gazı uygulaması iki farklı yöntem ile uygulanmıştır. Gerçekleştirilmiş olan ozon gazı uygulamaları, ozon gazının Yüksek Doz Kısa Süre (YDKS) ve Düşük Doz Uzun Süre (DDUS) olmak üzere birbirinden bağımsız iki yöntem ile PDA ve kırmızıbiber örneklerine uygulanması şeklindedir.

2.4.1 PDA Besiyerlerine YDKS Yöntemi ile Ozon Gazı Uygulaması

YDKS yöntemi ile PDA besiyerlerinin ozonlanması, çeker ocak sistemi altında kapağında delikler açılarak modifiye edilmiş, 14 litre hacimli ozon gazı uygulama haznesi içerisinde yapılmıştır. Bu haznenin kapağındaki deliklerden PDA besiyerlerini geçirebilmek ve ozon gazına maruz bırakabilmek için küçük cam petriler (Borosil, 50x12 mm) kullanılmıştır. Ozonlama sistemi; bir ozon jeneratörü (AZ 1001, Kuark Tekozon, Ankara), jeneratörü besleyen bir hava pompası, ozonlama haznesi ve ozon gazı analizöründen (2B Technologies, 106-H, ABD) oluşturulmuştur. Ozon jeneratörü, hava pompasının jeneratöre hava beslemesiyle

çalıştırılmıştır. Ozon analizörünün ekranında okunan değer sabitlenene kadar (yaklaşık 1 saat) beklenmiş ve hazne içerisindeki ozon gazı konsantrasyonunun $1500 \pm 100 \mu\text{L/L}$ 'de sabit kaldığı görülmüştür. Ardından *A. flavus* küfü içeren küçük cam petri kapaksız bir şekilde, deliklerden steril bir maşa yardımı ile geçirilerek hazne içerisine alınmıştır. Delikler tıplar ile kapatıldıktan hemen sonra süre başlatılmış ve petri kapakları ozon gazına sırasıyla 1, 2, 4 ve 8 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Ozonlama işlemleri boyunca hazne içi sıcaklık ve bağıl nem değerleri dijital bir higro-termometre cihazıyla (TFA, Dostmann/ Wertheim) sırasıyla $25 \pm 6 \text{ }^\circ\text{C}$ ve $\%50 \pm 8$ olarak ölçülmüştür. Ozonlanan örnekler işlem sonunda $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 'ye ayarlanmış bir inkübatöre alınmıştır. YDKS ozon gazı uygulamasının yapıldığı deney ortamı Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1: YDKS ozon gazı uygulamasının yapıldığı ozonlama sistemi.

2.4.2 Kırmızıbiber Örneklerine YDKS Yöntemi ile Ozon Gazı Uygulaması

Biberlere uygulanan YDKS ozonlama yöntemi, PDA örneklerindeki gibi aynı deney ortamında ve şartlarda yapılmıştır. Kesilip kurutulan ve *A. flavus* küfü ile inoküle edilen kırmızıbiberler, önceden steril edilmiş alüminyum folyo üzerine, spor süspansiyonunun bulunduğu biberlerin etli yüzeyi üstte kalacak şekilde yerleştirilmiş

ve ozonlama haznesinin kapağının deliğinden steril maşa yardımıyla hazne içerisine konmuştur. Aynı sürelerle (1, 2, 4 ve 8 saat) ozonlanan biberler, işlemlerin sonunda steril plastik petrilere konularak 30 °C'ye ayarlanmış inkübatöre alınmıştır.

2.4.3 PDA Besiyerine DDUS Yöntemi ile Ozon Gazı Uygulaması

DDUS yöntemi ile PDA besiyerlerinin ozonlanması için 20 litre hacimli cam bir akvaryum haznesi kullanılmıştır. Haznenin kapağına, ozon gazının hazne içine girmesi için jeneratörden gelen ozon gazının geçtiği borunun çapı ölçüsünde, 1 cm çaplı bir delik açılarak kapak modifiye edilmiştir. Hazne içerisine uygulanacak olan ozon gazı konsantrasyonunun sabit kalmasını sağlayabilmek için kullanılan ozon gazı jeneratörüne, farklı bir ozon gazı analizörü (Teknozone, TKZ-OS6, İzmir, Türkiye) ve hava pompası yerine oksijen konsantratörü bağlanmış ve jeneratör-konsantratör-analizör cihazları arasında elektriksel bağlantı kurulmuştur. Ozon analizörünün alt ve üst sınırı sırasıyla 0.05 µL/L ve 0.15 µL/L'ye ayarlanmıştır. Böylece ortamdaki ozon konsantrasyonunun 0.05 µL/L'nin altına düştüğünde ozon jeneratörünün çalıştırılması, 0.15 µL/L'nin üzerine çıktığında ise jeneratörün durdurulması sağlanmıştır. Bu sayede hazne içi ozon konsantrasyonunun 0.1±0.05 µL/L'de sabit kalması sağlanmıştır. Analizör ve hava nemlendirici (Havvaca, HD-1350B) hazne içerisine yerleştirilmiştir. Deney ortamında sağlanması istenen sıcaklık, laboratuvardaki bir klima (Olefini, OLE 18 DCW) ile 25±1 °C olarak ayarlanmıştır. Kontrol grubu için, aynı laboratuvardaki bir dolap içerisine nemlendirici cihaz yerleştirilmesi ile deney ortamı sağlanmıştır. DDUS ozon gazı uygulamasının yapıldığı hazne ve kontrol grubu ortamı Şekil 2.2'de verilmiştir.

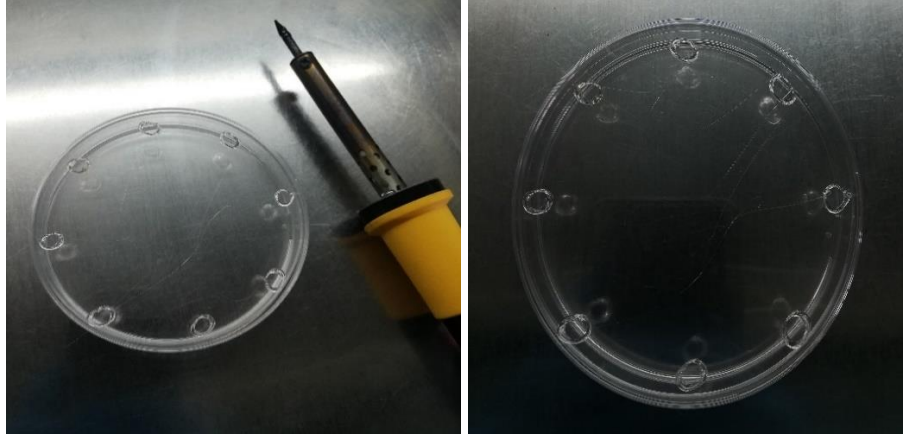


Şekil 2.2: DDUS ozon gazı uygulamasının yapıldığı hazne ve kontrol grubu ortamı.

Plastik petri kutularına dökülen ve katılaştıran PDA besiyerleri, *A. flavus* spor süspansiyonu ile inoküle edilmiştir. Ardından, petri kutusu içine inoküle edilen küfün ozon gazına maruz kalabilmesi için, kapaklarına lehim cihazı ile 1 cm çapında 8 adet delik açılarak petri kutuları modifiye edilmiştir. Modifiye edilmiş petri kutusuna ait görseller Şekil 2.3'te verilmiştir. Modifiye edilmiş petri kutuları, ozon gazı uygulama haznesine alınmış ve analiz başlatılmıştır.

Ozonlama haznesine alınan PDA'ların bulunduğu petri kutularının kapaklarında söz konusu delikler olmasına karşın, kontrol grubu örneklerinin kapakları, ön denemelerde kapakların delik olması durumunda doğal bir kontaminasyon oluşmasından ötürü, kontrol grubu petri kutuları kapakları delinmeden depolamaya alınmıştır. Bu işlem, kırmızıbiber örneklerinde de kontaminasyon görüldüğü için kırmızıbiberlere de aynı şekilde uygulanmıştır.

Hazne ve dolap içi ortam bağıl nem değerlerinin, nemlendirme cihazının ayarlanmasıyla 55 ± 15 'te sabit kalması sağlanmıştır. Ön denemelerde, PDA besiyerinde kontrol ortamında *A. flavus* küfünün gelişimi, petri kutusunun çapını 8 günde kapladığı tespit edildiğinden dolayı analiz 8. günde sonlandırılmıştır.



Şekil 2.3: Lehim cihazı ile modifiye edilmiş petri kutuları.

2.4.4 Kırmızıbiber Örneklerine DDUS Yöntemi ile Ozon Gazı Uygulaması

Biber örneklerine uygulanan DDUS ozonlama işlemi, PDA besiyerinde gerçekleştirilen deneylerle aynı ortam şartlarında yapılmıştır. İnoküle edilen yarı kurutulmuş biber örnekleri, plastik petrilere alındıktan sonra yine lehim cihazı ile kapaklarına 1 cm çapında 8 adet delik açılmıştır. Ozonlama haznesi ve kontrol gruplarının bulunduğu dolap ortamı içi sıcaklık ve bağıl nem değerleri PDA uygulamasındaki gibi sırasıyla 25 ± 1 °C ve $\%55\pm 15$ olarak ayarlanmıştır. Ön denemelerde, kontrol gruplarındaki biberlerin etli yüzünün tamamen küflenmesi 6. günde tamamlandığı tespit edildiği için depolama işlemi 6. günde sonlandırılmıştır.

2.5 PDA ve Kırmızıbiber Örneklerindeki *A. flavus* Küfü Gelişiminin Takibi

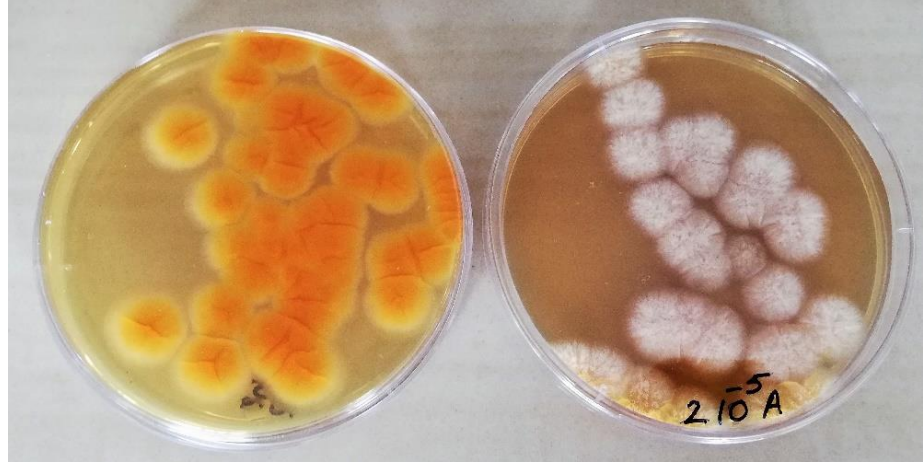
PDA besiyerlerine uygulanan YDKS ozonlama işleminin *A. flavus* küfüne karşı olan inhibisyon etkisinin takibi; Karaca ve diğ. (2014) tarafından önerilen bir yöntem ile yapılmıştır. Buna göre kullanılan cam petrilere PDA örneklerinin, depolama süreleri boyunca üzerinde gelişen küf kolonisinin 3. güne kadar her gün olmak üzere küf gelişimi, birbirine dik 2 düzlemde küf çapının bir cetvel yardımıyla ölçülerek milimetre (mm) cinsinden hesaplanmasıyla tespit edilmiştir. Bu çalışmaların her biri 5 tekerrürlü yapılmıştır. Kontrol grubunda inkübasyon süresi

sonunda ölçülen değer (dc) 45 mm olup, farklı ozonlama sürelerine maruz kalan petrilerin ayrı ayrı her bir grup için çaplarının ortalamaları (dt), mm cinsinden belirlenmiş ve aşağıdaki denklem (2.1) kullanılarak % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır.

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

PDA besiyerinde DDUS ozon uygulamasında ise, besiyeri üzerinde *A. flavus* küfünün gelişiminin takibi 8. güne kadar sürdürülmüş ve her gün yine bir cetvel yardımı ile mm cinsinden ölçümler yapılmıştır. Kontrol grubunda, inkübasyon süresi sonunda ölçülen değer 85 mm olup, kontrol grubuna kıyasla 0.1 µL/L konsantrasyonunda ozonlanan PDA'da küf gelişimi, koloni çaplarının ortalamalarının alınmasının ardından % inhibisyon değerleri yukarıda belirtilen formülle (2.1) hesaplanmıştır.

Biber örneklerine uygulanan YDKS ve DDUS ozon gazı uygulamalarında, petri kaplarındaki gibi simetrik bir küf kolonisi gelişimi gözlemlenemediği için çap ölçümü yapılamamıştır. Bu sebeple biberler, depolama süresinin sonunda alınıp *Aspergillus flavus* ve *parasiticus* Agar (AFPA, Sigma-17121) besiyeri üzerine mikrobiyolojik yayma ekim yöntemi uygulanarak ozon gazının her iki metotla birlikte biberlerdeki *A. flavus* küfünün gelişimine olan etkisi incelenmiştir. Seçici bir besiyeri olan AFPA'da gerçekleştirilen çalışmada, dilüsyon hazırlama işlemlerinin ardından yayma ekim yapıp petri kutuları 30 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. 48 saatin sonunda besiyeri üzerinde gelişen turuncu renkli kolonilerin sayımı yapılarak gelişim miktarlarının hesabı, dilüsyon oranları dikkate alınarak yapılmış ve sonuçlar log kob/g olarak verilmiştir (Ghitakou ve diğ. 2006; Tripathi ve Mishra, 2009). Şekil 2.4'te kırmızıbiber örneklerine ait olan AFPA besiyerinde gözlemlenen tipik *A. flavus* küf kolonilerinin arkadan ve önden görüntüleri verilmiştir.



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

2.6 Aflatoksin Analizleri

PDA ve kırmızıbiber örneklerindeki küf gelişimi takibi için yapılan inokülasyon, ozon gazı uygulaması ve depolama işlemleri, bu kez de üretilen aflatoksin miktarlarının tespiti için yapılmıştır. Yapılan aflatoksin analizleri ile, PDA ve kırmızıbiber örneklerine ayrı ayrı uygulanan YDKS ve DDUS ozonlama metotları ile *A. flavus* küfünün aflatoksin üretim miktarları incelenmiştir.

PDA ve kırmızıbiberlerde üretilen aflatoksin miktarı tayini, aflatoksinlerin örneklerden ekstrakte edilmesi ve ekstraktın Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) cihazında analiz edilmesiyle gerçekleştirilmiştir.

Analizlerde kullanılan çözeltiler, AFB1 ve G1'in floresans yayılımlarını değiştirdikleri için bu aflatoksinlerin dedektör tarafından kolayca teşhis edilmesi amacıyla türevlendirme işlemi yapılmıştır. HPLC kolonu ile floresans dedektör arasına yerleştirilen bir hücrede (Coring Cell, CC3200130) elektrokimyasal olarak üretilen brom ile AFB1 ve AFG1, daha yüksek floresans özellik gösteren türevleri olan B2A ve G2A'ya dönüştürülmüştür. Türevlendirme işleminin yapılabilmesi için mobil faz içerisine potasyum bromür (KBr; Sigma-Aldrich, 02110) ve nitrik asit (HNO₃; Merck, 100443, %65) ilave edilmiştir.

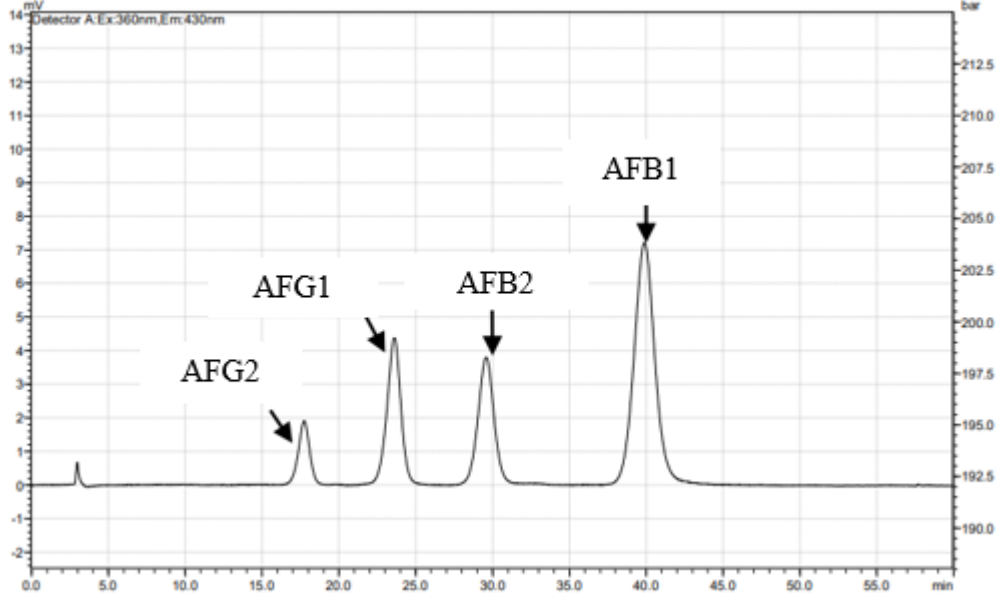
Aflatoksin analizlerinin gerçekleştirildiği HPLC cihazı özellikleri ve analizlerdeki kromatografi koşulları Tablo 2.1’de verilmiştir. Tüm aflatoksin analizleri her bir metottaki gruplar için 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır.

Tablo 2.1: Aflatoksin analizlerinin gerçekleştirildiği HPLC cihazı özellikleri ve analizlerdeki kromatografi koşulları.

HPLC	Shimadzu LC-20AD, Kyoto, Japonya
POMPA	Shimadzu LC-20A
DEGASSER	Shimadzu DGU-20A
KOLON	İntersil ODS 3 analitik kolon (GL Sciences, ODS 3 İntersil, patikül çapı: 5µm, 250*4.6 mm iç çap, Tokyo, Japonya)
KOLON FIRINI	25 °C (Shimadzu CTO-20A)
DEDEKTÖR	Floresans dedektör (Shimadzu RF-20A)
MOBİL FAZ	Metanol:Su (216 mg KBr+636 µL 4M’lık HNO ₃ , 40:60)
AKIŞ HIZI	1 mL/dakika
DALGA BOYU	Tahrik: excitation dalga boyu 360 nm, Yayım: emission dalga boyu 430 nm
ENJEKSİYON HACMİ	20 µL

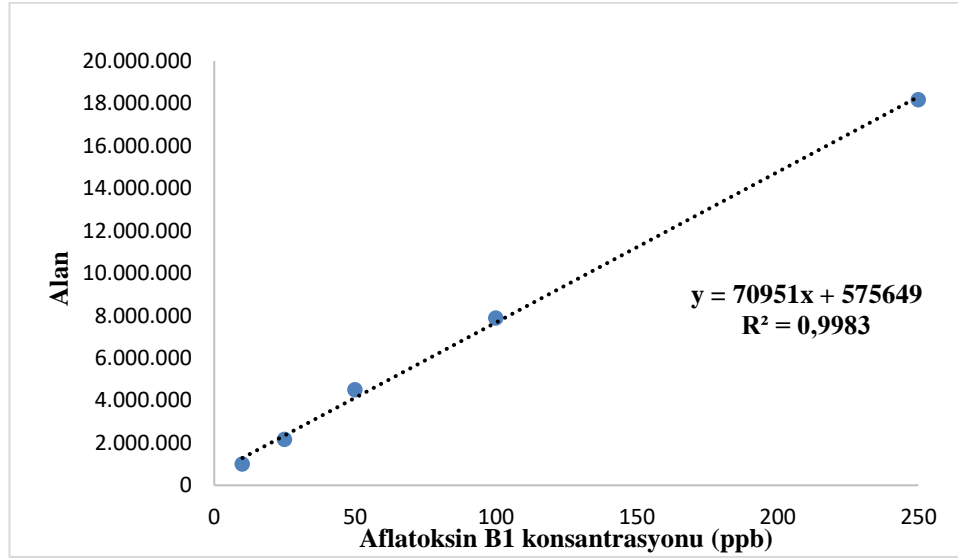
2.6.1 Aflatoksin Standart Çözeltisinin Hazırlanması

Aflatoksin standardı olarak mililitresinde 1 µg AFB1, 0.29 µg AFB2, 0.99 µg AFG1 ve 0.27 µg AFG2 bulunan 1 mL metanol içerisinde çözülmüş toplam aflatoksin standart çözeltisi (Supelco, Bellefonte, PA, ABD) kullanılmıştır. Aflatoksinler, sabit mobil faz akış hızındaki geliş zamanları tespit edilerek bulunmuştur. İçerisinde 10 ppb AFB1, 2.9 ppb AFB2, 9.9 ppb AFG1 ve 2.7 ppb AFG2 bulunduran aflatoksin standart çözeltisine ait kromatogram Şekil 2.5’te verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere, AFG2, G1, B2 ve B1 pikleri sırasıyla 17.75, 23.63, 25.59 ve 39.38. dakikalarda gelmiştir.



Şekil 2.5: AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2 içeren standart çözeltiliye ait kromatogram.

Analizlerde kullanılan *A. flavus* küfünün sadece AFB1'i üretmesinden dolayı, kalibrasyon eğrisi çizmek için metanol ile içerisinde 10-250 ppb AFB1 bulunan çözeltiler hazırlanmış ve HPLC cihazına verilmiştir. Her bir konsantrasyon için ayrı ayrı 5 noktalı kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. AFB1 için elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 2.6'da verilmiştir.

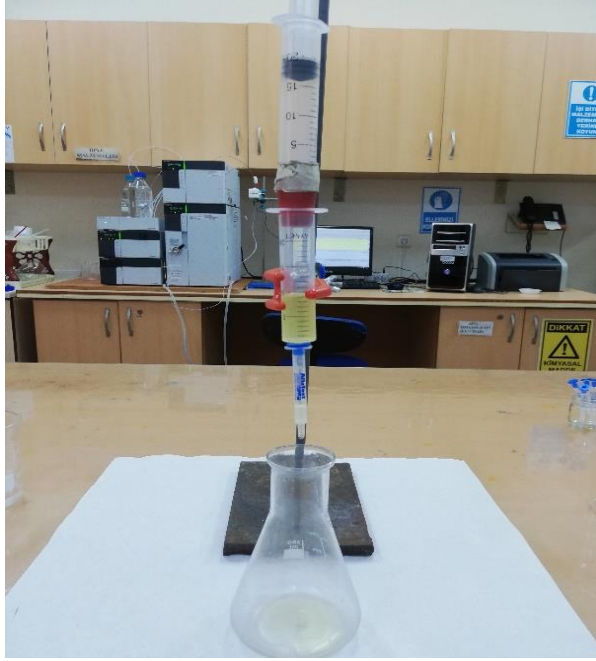


Şekil 2.6: AFB1 için çizilen kalibrasyon eğrisi.

2.6.2 Ekstraksiyon, Temizleme ve Enjeksiyon

Örneklerde aflatoksin analizi AOAC 999.07 numaralı 'Fıstık Ezmesi, Antepfıstığı Ezmesi, İncir Ezmesi ve Toz Biberde Aflatoksin Belirlenmesi' başlıklı resmi metot, kendi çalışmamıza uyarlanarak gerçekleştirilmiştir (Stroka ve diğ. 2000). Aflatoksin içeriği tespit edilmek istenen plastik petriyelerdeki PDA örnekleri (yaklaşık 20 g) Waring blender haznesine alınmış ve içerisine 2.5 g sodyum klorür (Sigma-Aldrich, 31434), 7.5 mL saf su ve 70 mL saf metanol (İsolab, 947.043) ilave edilmiştir. Aflatoksin analizlerinde kullanılan cam petrideki PDA ve kırmızıbiber örneklerinin gramajları sırasıyla yaklaşık olarak 5 g ve 2.5 g olduğundan, ekstraksiyon işleminde kullanılan metanol, sodyum klorür ve saf su miktarları örnek miktarlarına göre (sırasıyla dördte bir ve sekizde bir oranlarında) azaltılarak kullanılmıştır. Blender 1 dakika düşük devir hızıyla çalıştırılmıştır. Daha sonra blender içeriği kaba filtre kağıdından süzölmüştür. Süzöntüden 5 mL alınıp üzerine 10 mL fosfat tampon çözeltisi (phosphate buffer solution=PBS, pH:7.4) eklenerek seyreltilmiştir. PBS, 8 g sodyum klorür, 0.2 g potasyum klorür, 0.2 g potasyum dihidrojen fosfat ve 1.45 g disodyum hidrojen dihidratın 1000 mL saf su içerisinde çözdürülmesi ile hazırlanmıştır.

Seyreltilen ekstrakt (15 mL) doğal akış hızında (yaklaşık 3 mL/dakika) immuno affinite kolondan (Aokin AG, Berlin, Almanya) geçirilmiştir. Filtrattan sonra kolondan birkaç defa hava geçirilmiştir. Kolon iki kez 10 mL saf su geçirilerek (5 mL/dakika) yıkanmış ve ardından tekrar birkaç defa hava geçirilmiştir. Ucu, orijinal tıpasıyla kapatılan kolona üstten 1 mL metanol (HPLC saflığında, Merck, 106007) ilave edilmiş ve 3 dakika bu şekilde beklenmiştir. Süre sonunda kolondaki metanol bir vial alınmış ve üzerine 1 mL saf su ilave edilmiştir. Vial içerisindeki bu örnek, HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Enjeksiyon işlemi, 50 µL'lik şırınga (Hamilton, 705NR) ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan her enjeksiyonun öncesinde ve sonrasında şırınga HPLC saflığındaki metanol ile temizlenmiştir. Aflatoksin analizlerinin ekstraksiyon basamağında kullanılan deney düzeneği Şekil 2.7'de verilmiştir.



Şekil 2.7: Aflatoksin analizlerinin ekstraksiyon basamağında kullanılan deney düzeneği.

2.7 İstatistiksel Analiz

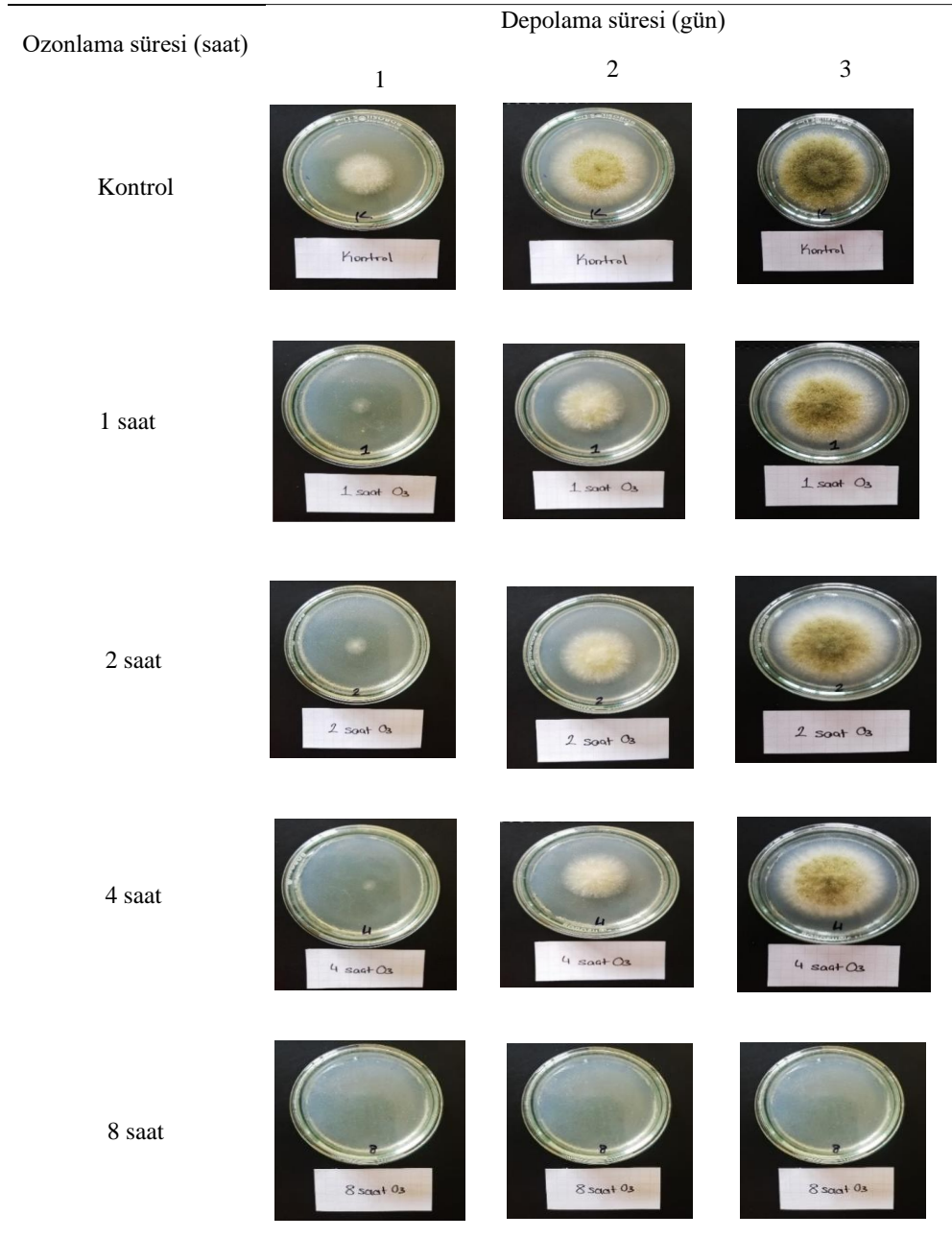
Çalışmamızdaki istatistiksel değerlendirmeler ‘Minitab 16 Statistical Software’ ve ‘MSTAT-C Statistical Software’ programları kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen veriler Minitab programındaki ‘Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA)’ yöntemi ile değerlendirilmiştir. Ortalamalar arasındaki farklılıklar Tukey testi ile karşılaştırılmış olup karşılaştırma gruplarına ait veriler $\alpha=0.05$ güven aralığına göre test edilmiştir. Daha sonra ortalamalar, MSTAT-C programındaki ‘Duncan Çoklu Aralık Testleri ($p \leq 0.05$)’ kullanılarak karşılaştırılmıştır.

3. BULGULAR

3.1 *A. flavus* Küfü İnoküle Edilmiş PDA Besiyerlerine YDKS Ozon Gazı Uygulamasının Küf Gelişimine Etkisi

Farklı sürelerde 1500 ± 100 $\mu\text{L/L}$ ozon gazı ile muamele edilip, 30 $^{\circ}\text{C}$ 'de 3 gün süreyle depolanan PDA besiyerlerinde *A. flavus* küfünün gelişimleri Şekil 3.1'de görülmektedir.

Kontrol örneklerinde küf koloni çapı depolamanın 1., 2. ve 3. günlerinde sırasıyla 19 , 35 ve 45 mm olarak belirlenmiştir. Gerçekleştirilen ozonlama uygulamaları sonrasındaki depolama sürecinde küf gelişiminin gözle görülür bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Ozonla muamele süresi arttıkça, küf gelişiminin inhibisyonu da artmıştır. Örneğin, 1 , 2 ve 4 saatlik ozon uygulamaları sonucunda depolamanın 3. günündeki inhibisyon oranlarının sırasıyla $\%18$, 24 ve 33 olduğu belirlenmiştir. 8 saatlik ozon uygulaması ile küf gelişiminin tamamen inhibe olduğu tespit edilmiştir. Literatürdeki çalışmalar da ozon uygulamalarıyla *A. flavus* küfünün gelişiminin azaltıldığını (Baazeem ve diğ. 2022) ve hatta tamamen durdurulabildiğini (Santos ve diğ. 2016) bildirmişlerdir.



Şekil 3.1: Farklı sürelerde $1500 \pm 100 \mu\text{L/L}$ ozon gazı ile muamele edilip, 30°C 'de 3 gün süreyle depolanan PDA besiyerlerinde *A. flavus* küfünün gelişimleri.

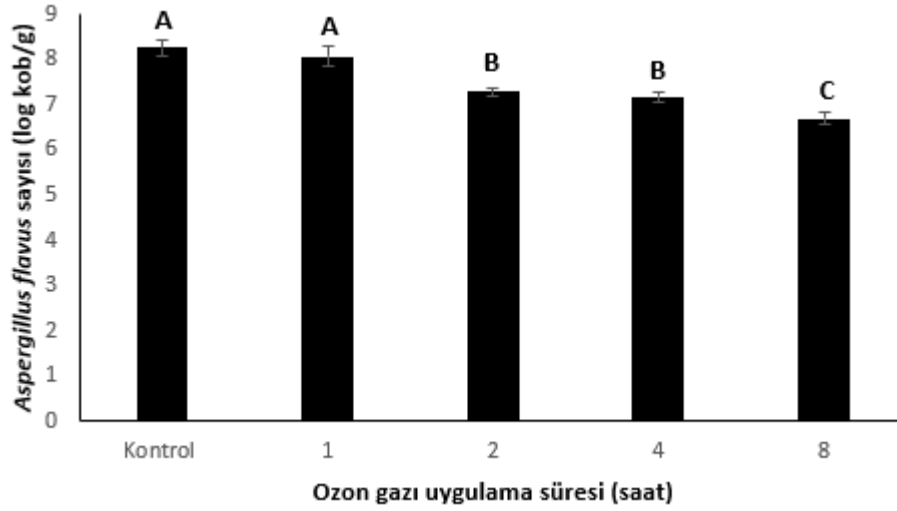
Gerçekleştirdiğimiz çalışmaya benzer bir şekilde, Savi ve Scussel (2014), PDA besiyeri merkezine farklı küf türlerini (*F. graminearum*, *F. verticillioides*, *P. citrinum*, *A. flavus* ve *A. parasiticus*) inoküle edip 1 ve 2 saat süresince $60 \mu\text{L/L}$ ozon gazı uygulamışlar ve besiyerindeki küf kolonilerinin gelişimlerini 25°C 'de 8 gün boyunca izlemişlerdir. Yazarlar, 1 ve 2 saatlik ozon uygulamaları sonucunda *A. flavus* küfünün gelişiminin %15 ve %28.5, *A. parasiticus* gelişiminin ise %8 ve %23

oranında azaldığını bildirmişlerdir. *A. flavus* küfüne uygulanan ozon gazıyla küfün morfolojik yapısında deformasyonlar ve hif yapısında yırtılmalar gözlemlenmiştir. Böylece küf hücre zarının da yırtılmasıyla birlikte, büyümenin azaldığını iddia etmişlerdir. Ayrıca ozonlanan örneklerde yüksek oranlarda %49-97 hif ölümü gerçekleşmiştir. Bu durumun sebebi, ozon gazı varlığında, küfün reaktif oksijen stres durumuna girmesiyle birlikte küf hücresinin ölümünün sağlanmasıdır. Ozon gazının tüm küf türlerinde reaktif oksijen stres üretimi gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre yazarlar, söz konusu *Aspergillus* küflerinin ozona karşı en dirençli küf türleri olduğu bildirmişlerdir (Savi ve Scussel, 2014).

Buna karşın Brodowska ve diğ. (2017), arıç kozalağı ve kakule tohumunda gerçekleştirdikleri bir çalışmada farklı küf türlerinin ozonla inhibisyonlarını incelemiş ve bir başka *Aspergillus* türü olan *A. niger*'in, test edilen türler arasında ozondan en çok etkilenen tür olduğunu bildirmiştir. Şüphesiz, küfün ozonla inhibe edilmesi üzerine, küfün türü, bulunduğu ortam şartları, inokülasyon yoğunluğu, ozonlama şartları gibi birçok faktör etkilidir.

3.2 *A. flavus* Küfü İnoküle Edilmiş Kırmızıbiber Örneklerine YDKS Ozon Gazı Uygulamasının Küf Gelişimine Etkisi

YDKS ozon uygulaması, yarı-kurutulmuş biber örneklerinde de denenmiştir. Yarı-kurutulmuş biber örneklerine *A. flavus* küfü inokülasyonu yapıldıktan sonra, farklı sürelerde (0-8 saat) ozonlama uygulaması gerçekleştirilmiştir. Daha sonra biber örnekleri, 30 °C'de 6 günlük depolamaya bırakılmıştır. Depolama sonrasında, biber örneklerindeki *A. flavus* küfü sayısı AFPA besiyeri kullanılarak tespit edilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2: YDKS ozon uygulaması ile muamele edilen biber örneklerinin, 30 derecede 6 günlük depolama sonundaki *A. flavus* sayıları.

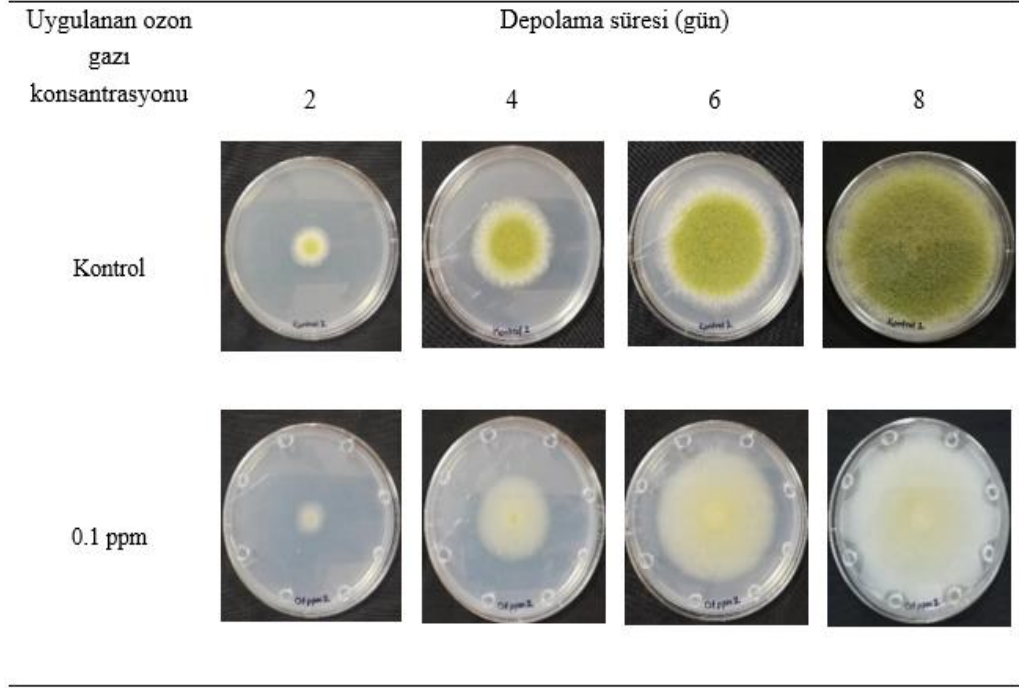
Ozonlama işlemi yapılmamış örneklerde (kontrol), 6 günlük depolama sonunda tespit edilen *A. flavus* küfü sayısı 1.90×10^8 kob/g olarak bulunmuştur. Ozonlama işlemi gören tüm biber örneklerinde küf sayısının azaldığı tespit edilmiş ve 1, 2, 4 ve 8 saatlik işlem gören örneklerde küf sayısında sırasıyla 0.20, 0.98, 1.09 ve 1.57 log'luk azalmalar meydana geldiği tespit edilmiştir.

Literatürdeki çalışmalarda da söz konusu değerlere yakın sonuçlar bulunmuştur. Örneğin; McDonough ve diğ. (2011), mısırları $47800 \mu\text{L/L}$ gibi yüksek bir ozon dozuyla 1.8 dakika gibi kısa bir süre muamele ettiklerinde, *A. flavus* sayısında %96'luk (1.06 log'a tekabül eder) bir azalma gördüklerini bildirmiştir. İşlem 3 kere tekrarlandığında ise 2 log'luk azalma tespit edilmiştir.

Ozon gazı ile muamele edilip depolanmış farklı ürünlerde, *Aspergillus* cinsine ait küflerin gelişiminin ve spor sayılarının etkili bir şekilde sınırlandırıldığını bildiren çalışmalar mevcuttur (Al-Ahmadi ve diğ. 2009; Giordano ve diğ. 2012; Beber Rodrigues ve diğ. 2015; Savi ve diğ. 2015; Ouf ve Ali 2021).

3.3 *A. flavus* Küfü İnoküle Edilmiş PDA Besiyerlerine DDUS Ozon Gazı Uygulamasının Küf Gelişimine Etkisi

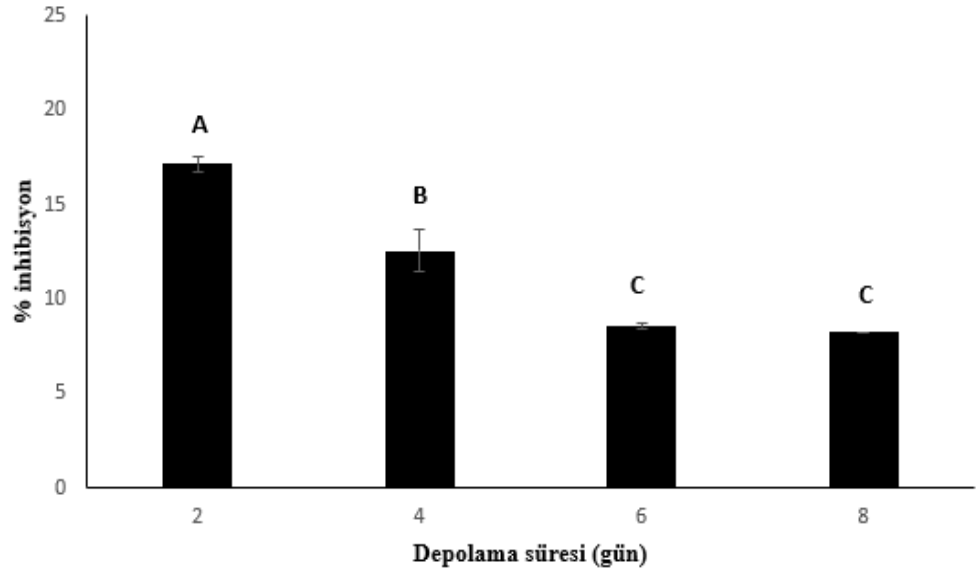
A. flavus küfünün sporlarıyla inoküle edilip, 8 gün süreyle hava ve 0.1 $\mu\text{L/L}$ 'lik ozon atmosferinde depolanan PDA besiyerlerinin görselleri Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3: 30 °C'de 8 gün süreyle hava ve 0.1 $\mu\text{L/L}$ 'lik ozon atmosferinde depolanan PDA besiyerlerindeki *A. flavus* küfünün gelişimleri.

A. flavus küfünün gelişiminin, ozon atmosferinde daha yavaş da olsa, her 2 depolama şartlarında da ilerlediği görülmektedir. *A. flavus* küfünün gelişimi depolamanın 2, 4, 6 ve 8. gününde hava atmosferinde 23, 45, 70 ve 85 mm olarak, ozon atmosferinde ise 19, 39, 64 ve 78 mm olarak ölçülmüştür. Depolama atmosferinde 0.1 $\mu\text{L/L}$ ozon gazı bulunması durumunda, depolamanın 2, 4, 6 ve 8. günlerinde küf gelişiminin sırasıyla %17.4, %13.3, %8.6 ve %8.2 düzeylerinde inhibe olduğu belirlenmiştir.

Depolama süresi boyunca, ozon gazının *A. flavus* küfünü inhibe etme oranının azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 3.4). Bu durum, *A. flavus* küfünün ozon gazına karşı başta oldukça hassas olduğunu, ancak zamanla ozona karşı bir direnç geliştirdiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 3.4: Depolama süresi boyunca, ozon gazının *A. flavus* küfünü inhibe etme yüzdeleri.

Bataller ve diğ. (2012), papaya meyvesinden izole ettikleri *Aspergillus* spp. küfünü PDA besiyerine inoküle etmişler ve 4 gün boyunca 233 $\mu\text{L/L}$ ozonla muamele etmişlerdir. 4. günün sonuna kadar misel çapı gelişimi, koloni rengi ve yapıları takip edilmiştir. 2. güne kadar ozon ve kontrol grupları arasında çap gelişimi farkı mevcutken, 4. günün sonunda 2 grubun çapları birbirine eşitlenmiştir. Bu nedenle, *Aspergillus* spp.'nin 2. günden itibaren ozona karşı önemli bir direnç gösterdiği sonucuna varılmıştır. Küfe uygulanan ozonlama işlemi sonucu inhibisyon etkisi, gün geçtikçe azalmıştır.

Aynı şekilde Rodrigues ve diğ. (2015), 20, 60 ve 120 dakika ozonla muamele ettiği ay çekirdeklerinde ozonlama işleminin sonuna doğru *A. flavus* küfünün görülme sıklığı (incidence)'nin ve şiddeti (severity)'nin azalmasının durduğunu bildirmişlerdir.

Benzer şekilde, Taran ve diğ. (2020), *A. flavus* ile yapay olarak kontamine edilen ve 100 $\mu\text{L/L}$ ozon atmosferinde depolanan mısır tanelerindeki küf gelişiminin, depolamanın sonuna doğru ozon gazından daha az etkilendiğini gözlemlemişlerdir.

Öte yandan depolama atmosferindeki, 0.1 $\mu\text{L/L}$ ozon gazı varlığı esasen küfün morfolojisi üzerine etki etmiştir. Şöyle ki;

Kontrol örneklerindeki koloni yapısı, merkezde (yaşlı kolonilerde) yeşil, çevresinde (genç kolonilerde) beyazdır. Ozonlanan örneklerde ise koloni yapısı, merkezde (yaşlı kolonilerde) açık sarı, çevresinde (genç kolonilerde) yine beyazdır (Şekil 3.3). Çalışmalarımıza benzer şekilde PDA besiyerinde (Zotti ve diğ. 2008) ve Brezilya fıncığı örneklerinde (De Oliveira ve diğ. 2020) yapılan ozonlama işlemleri sonucu *A. flavus* küf koloni renginin değiştiği bildirilmiştir.

Bu durumun anthraquinone denen bir maddenin ozon gazıyla okside olmasından kaynaklandığı iddia edilmektedir Shier ve diğ. (2005). Bu maddenin aflatoksin sentezindeki oluşan bir ara ürün olduğu bilinmektedir.

Görüldüğü kadarıyla ozon gazı, *A. flavus* küfünün sporlanması üzerine de önemli bir etki göstermiştir. Kontrol grubunda, ilk örnekleme gününden depolama sonuna kadar, tüm petrielerde yeşil renkli bir sporlanma gözlemlenirken, 0.1 µL/L ozon atmosferinde ise depolama boyunca, yeşil küf sporları hiç gözlemlenmemiş, sarımsı misellerin depolama boyunca artarak petri kutusunu kapladığı tespit edilmiştir. Tarafımızca tespit edilmiş olan bu durum, benzer şekilde yapılmış olan diğer çalışmalarda da (Antony-Babu ve Singleton, 2009; Fodil ve diğ. 2016) bildirilmiştir.

3.4 *A. flavus* Küfü İnoküle Edilmiş Kırmızıbiber Örneklerine DDUS Ozon Gazı Uygulamasının Küf Gelişimine Etkisi

DDUS ozon gazı uygulaması kırmızıbiberler için de denenmiştir. Yarı kurutulmuş biberlere *A. flavus* küfü inokülasyonu yapıldıktan sonra, 0.1±0.05 µL/L ozon gazı ve hava ortamına alınarak analiz başlatılmıştır. 6 gün sonra, biber örneklerindeki *A. flavus* küf sayısını tespit etmek amacıyla AFPA besiyerine ekim yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.5: DDUS ozon gazı ve hava ortamındaki kırmızıbiber örneklerinin, 30 °C’de 6 günlük depolama sonundaki *A. flavus* sayıları.

Kontrol örneklerinde (hava ortamında) 6 günlük depolama sonunda tespit edilen *A. flavus* küfü sayısı 1.80×10^8 kob/g olarak bulunmuştur. 0.1 µL/L ozon ortamında 6 gün depolanan biberlerdeki *A. flavus* sayısında kontrol grubuna kıyasla 1.66 logaritmalık azalma meydana gelmiştir.

Gıdaların nispeten düşük ozon dozlarını (0.1 ppm-50 ppm) içeren ortamlarda nispeten uzun süreler (3-45 gün) depolanması daha önce de çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir.

Örneğin, Iacumin ve diğ. (2012), fermentasyona alınacak olan sosislere daldırma metodu ile *A. ochraceus* sporlarını inoküle etmişlerdir. 45 günlük fermentasyon süresince sosisler her gün 8 saatlik 1 µL/L ozon gazına maruz bırakılmıştır. *A. ochraceus* gelişimi incelenmiş ve 45. güne kadar küf sayısı hesaplanmıştır. Kontrol grubu örneklerinde, depolamanın 14. gününde gözle görülür bir küf gelişimi gözlenirken, ozonlanan sosislerde 45. güne kadar herhangi bir küf gelişimi tespit edilmemiştir.

Taran ve diğ. (2020), bir tahıl deposundaki buğdaylara *A. flavus* ve *P. nordicum* küflerini inoküle etmişler ve 3 gün boyunca 50 ppm ozon gazına maruz bırakmışlardır. Deney sonucunda *A. flavus* spor sayısı %75, *P. nordicum* sayısı %60 oranında azaltılmıştır.

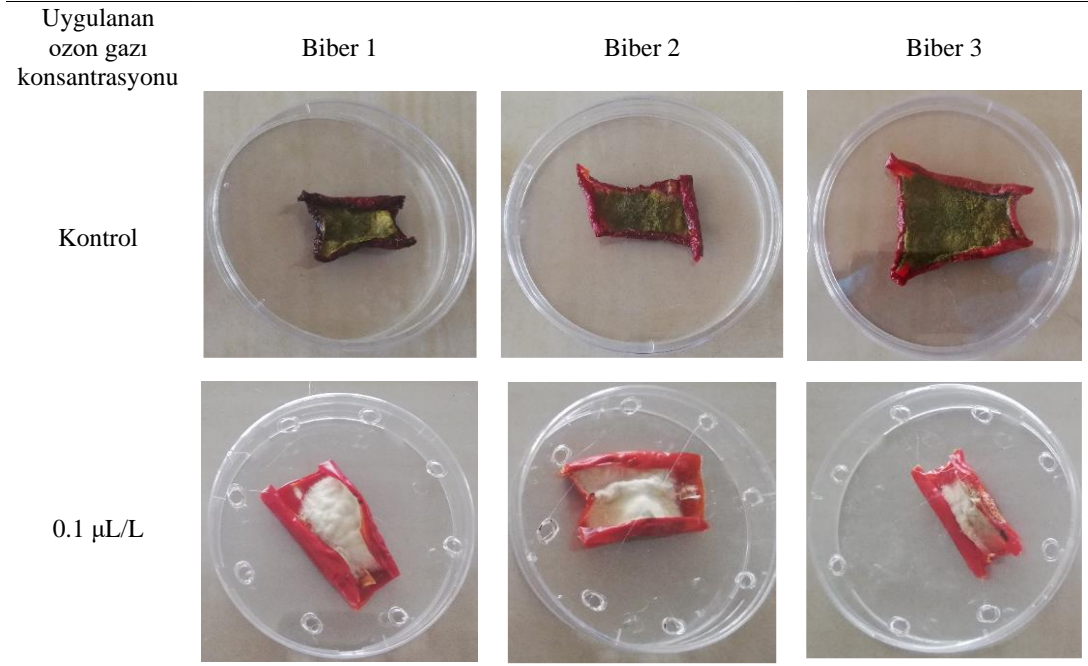
Kells ve diğ. (2001), depolanmış olan mısırlara inoküle ettikleri *A. parasiticus* küfüne 25 ppm ozonu 5 gün, 50 ppm ozonu 3 gün uygulamışlardır. 25 ppm-5 gün uygulamasıyla *A. parasiticus* sayısında etkili bir azalma sağlanamazken, 50 ppm-3 gün uygulamasıyla küf sayısı %63 azaltılmıştır.

De Alencar ve diğ. (2012), yerfistiklerini *A. flavus* küfö ile inoküle ettikten sonra, örnekleri kontrol ve ozon grubu olarak ayırmışlar ve 4 gün boyunca 13-21 ppm ozon gazı ortamına bırakmışlardır. 4. gün sonunda AFPA besiyerine yaptıkları ekim sonucunda 13 ppm ozon gazı için 2, 21 ppm ozon gazı için 3 logaritmik azalmalar tespit etmişlerdir.

Ayrıca küflerin morfolojik yapıları da incelenmiş, ozon gazı ortamındaki fıstıkların, küf kolonisinde depigmentasyon gözlemlenmiştir. Kontrol grubu üzerindeki küf yapısı yeşil renkte iken, ozonlanan fıstıklardaki küf renginin beyaz renkte olduğu tespit edilmiştir.

Aynı durum, bizim deneylerimizde kullanılan biber örneklerinde de gözlemlenmiştir. Kontrol grubu olan biber örneklerinde *A. flavus* küfünün gelişimi yeşil renkli koloniler halinde, ozonlanan örneklerde ise beyaz küf miselleri şeklinde gerçekleşmiştir (Şekil 3.6). Bu durumun, ozonlanan yer fıstıklarındaki küf yapısını oluşturan bileşenlerin oksidasyonu ile ilişkili olduğu iddia edilebilir.

Ayrıca, analizlerimizde kullanılan kırmızıbiberlerde, ozon gazı uygulamaları sonunda kontrol gruplarına kıyasla fizyolojik değişiklikler gözlemlenmiştir. Bunlar; renk, ağırlık ve nem değeri gibi faktörlerdir. Yapılan çalışmalarda, meyve-sebze ürünlerine uygulanan ozon gazı işlemleri sonucunda bazı fiziksel ve kimyasal kalite kayıpları yaşandığı rapor edilmiştir. Özellikle ozon gazı bazı meyve-sebzelerde (şeftali, üzüm, çilek, kereviz, marul, brokoli, ıspanak) farklı kalite kayıplarına (ağırlık kaybı, toplam şeker içeriği kaybı, polifenol ve vitamin kaybı, renk pigmentlerinin kaybı) yol açtığı tespit edilmiştir. Bu kalite kayıplarının yaşanmasında gıdanın türü, ozon gazı konsantrasyonu, uygulama şekli ve süresi gibi faktörler önemli rol oynamaktadır (Karaca ve Velioğlu, 2007).



Şekil 3.6: 0.1 µL/L ozon gazı ve hava ortamında 30 °C’de 6 gün boyunca depolanan kırmızıbiber örnekleri.

3.5 *A. flavus* Küfü İnoküle Edilmiş PDA ve Kırmızıbiber Örneklerine Uygulanan YDKS ve DDUS Ozonlama İşlemlerinin Aflatoksin Üretimlerine Olan Etkileri

Yüksek dozda ozonla farklı süreler muamele görüp 30 °C’de depolanan PDA besiyeri ve kırmızıbiber örneklerinde depolama sonunda tespit edilen AFB1 miktarları Tablo 3.1’de verilmiştir.

Kontrol örneklerinde 30 °C’de 3 gün sonunda tespit edilen AFB1 düzeyi ile, 1500 ± 100 µL/L ozon ile 1, 2 ve 4 saat muamele görüp ardından depolanan besiyerlerinde tespit edilen AFB1 düzeyleri arasında istatistiksel açıdan fark bulunmamıştır (p<0.05). Ancak 8 saat ozonlanıp 3 gün depolanan besiyerinde üretilen AFB1 miktarı %89 daha az bulunmuştur.

Benzer şekilde; kontrol örneklerinde tespit edilen AFB1 düzeyi ile, 1500±100 µL/L ozon ile 1 ve 2 saat muamele görüp ardından 6 gün depolanan kırmızı biber örneklerinde tespit edilen AFB1 düzeyleri arasında istatistiksel açıdan fark bulunmamıştır (p<0.05). Ancak 4 ve 8 saat ozonlanıp 6 gün depolanan kırmızıbiber

örneklerinde tespit edilen AFB1 düzeylerinin sırasıyla %73 ve %97 oranında daha az olduğu tespit edilmiştir.

Bu durum, tarımsal ürünlerin depolanması sürecinde *A. flavus* tarafından üretilen AFB1 miktarının etkili bir şekilde sınırlandırılabilmesi için ozon gazının 4-8 saat gibi uzun bir süre uygulanması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Tablo 3.1: YDKS ve DDUS ozonlama işlemleri sonunda PDA ve kırmızıbiber örneklerinde üretilen AFB1 miktarları.

		Ozonlama ortamı	
		AFB1 miktarı (ppb)	
		PDA	Kırmızıbiber
Yüksek doz - kısa süre ozon uygulaması	Kontrol	197.8 ± 8.7 A	219.7 ± 9.2 A
	1	201.1 ± 9.8 A	220.9 ± 9.8 A
	2	178.9 ± 9.2 A	201.2 ± 8.7 A
	4	166.7 ± 8.6 A	59.1 ± 5.5 B
	8	21.5 ± 4.4 B	4.8 ± 2.1 C
Düşük doz - uzun süre ozon uygulaması	Kontrol	210.6 ± 3.3 a	245.3 ± 9.4 a
	Ozonlanmış (8 gün)	167.6 ± 13.4 b	34.7 ± 3.9 b

DDUS ozon uygulaması sonucunda, PDA besiyerinde ve kırmızıbiber örneklerinde tespit edilen AFB1 seviyeleri de Tablo 3.1’de görülmektedir.

Her ne kadar ozon ve hava atmosferindeki depolama sürecinde PDA besiyerinde küfün sporlanmasında ve koloni yapısında önemli farklılıklar görülmüş olsa da (Şekil 3.3), üretilen AFB1 miktarı çok da farklı bulunmamıştır (Sadece %20.4’lük bir fark mevcuttur).

Biberde DDUS ozon uygulaması hem küf gelişimini hem de üretilen AFB1 seviyesini etkili bir şekilde azaltmıştır (küf gelişimini 1.66 log, AFB1 üretimini %85.9 oranında azaltmıştır).

Sonuçlar, DDUS ozon uygulamasıyla biberlerde PDA’ya göre AFB1 üretiminin daha fazla düzeyde (sırasıyla %85.9 ve %20.4) kısıtlandırıldığını göstermektedir. Benzer bir durum YDKS uygulaması için de söz konusudur (örneğin, 8 saatlik uygulama sonunda AFB1 üretimi biberlerde %97, PDA’da %89 oranında azalmıştır). Bu, ozon gazı uygulamalarının *A. flavus*’un AFB1 üretiminde kırmızıbiberde PDA’ya göre daha etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bulgularımızla paralel olarak Ayrancı ve Karaca (2021), farklı gaz kompozisyonları altında kırmızıbiber ve PDA örneklerindeki *A. flavus* küfünün AFB1 üretimini incelemişler ve PDA besiyerinde üretilen AFB1 miktarının kırmızıbiberlerde üretilen miktara göre daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Bu durum, farklı gaz kompozisyonlarında (yüksek ozon, azot, karbondioksit konsantrasyonlarında) PDA’nın kırmızıbiberden AFB1 üretimi için daha uygun bir substrat olduğu şeklinde açıklanabilir.

Ozon gazının çeşitli gıdalarda aflatoksinlerin (Ta ve diğ. 2012; Taran ve diğ. 2020) ve diğer bazı mikotoksinlerin (Iacumin ve diğ. 2012; Akbar ve diğ. 2020; Ouf ve Ali, 2021) üretimini sınırlandırabildiği bildirilmiştir.

Savi ve diğ. (2015), buğday tanelerine inoküle ettikleri *A. flavus* küfüne 60 ppm ozon gazını 1, 2 ve 3 saat uygulamışlar ve belirli depolama şartları altında AFB1 üretimlerini incelemişlerdir. 1, 2 ve 3 saatlik ozon uygulamasıyla küfün AFB1 üretimi sırasıyla %89.3, %89.5 ve %94.6 düzeylerinde engellenmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlar; DDUS ozon gazının PDA örneklerine uygulanmasında küf koloni renginin depigmentasyona uğradığı ancak yine de belirli bir düzeyde (kontrolden %20.4 kadar daha az) AFB1 üretebildiğini ortaya koymuştur. Bu durum, kullandığımız ozon dozunun (0.1 µL/L) PDA'lardaki AFB1 üretimini tamamen engellemede sınırlı kaldığını ortaya koymaktadır. Daha yüksek ozon konsantrasyonlarının uygulanması ile aflatoksin üretiminde önemli rol aldığı bilinen anthraquinone maddesinin daha ileri düzeyde okside olması sağlanarak aflatoksin üretiminin tamamen engellenebileceği tarafımızca düşünülmektedir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, ülkemizin bazı önemli ihracat ürünlerinde (kuru incir, fındık, antep fıstığı, kırmızıbiber vb.) sıklıkla problemlere neden olan ve insan sağlığına olumsuz etkileri olduğu bilinen aflatoksin mikotoksini üreticilerinden *A. flavus* küfünün gelişiminin ve AFB1 üretiminin, ozon gazının farklı uygulamaları ile inhibe edilme düzeyinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla besiyeri (PDA) ve gıda maddesi (yarı kurutulmuş kırmızıbiber) ortamlarına inoküle edilen toksijenik *A. flavus* küfünün gelişimi ve aflatoksin üretimi üzerine, birbirinden farklı iki ozon gazı uygulama yönteminin (YDKS ve DDUS) etkisi incelenmiştir. Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

- 1) YDKS ve DDUS ozon gazı uygulamalarının, *A. flavus* küfünün hem PDA hem de kırmızıbiber ortamında gelişimini azaltmada ve AFB1 üretimini engellemede önemli oranlarda etkili olduğu bulunmuştur.
- 2) PDA besiyerinde *A. flavus* küfünün gelişiminin ve AFB1 üretiminin engellenmesinde en etkili yöntemin, ozon gazının 8 saatlik YDKS uygulaması olduğu sonucuna varılmıştır.
- 3) Kırmızıbiber örneklerinde *A. flavus* küfünün gelişiminin ve AFB1 üretiminin engellenmesinde, ozon gazının 8 saatlik YDKS uygulaması ve DDUS uygulamalarının oldukça etkili olduğu tespit edilmiştir.
- 4) DDUS ozon gazının PDA örneklerine uygulanması sonucu *A. flavus* küfünün her ne kadar morfolojik yapısında (sporlanma ve koloni renginde) değişiklikler gözlemlense de küf koloni çapı gelişiminde ve AFB1 üretiminde ciddi bir azalma meydana gelmemiştir.

- 5) DDUS ozon gazı uygulamasında kullanılan ozon gazı konsantrasyonunun artırılması halinde (0.1 µL/L'den daha yüksek) PDA besiyerinde *A. flavus* küfünün gelişiminin ve AFB1 üretiminin daha yüksek oranlarda engellenebileceği tarafımızca düşünülmektedir.
- 6) PDA besiyerinde küf gelişiminin engellenmesi için YDKS ozonun 4 saat ve üzeri uygulamasının gerekliliği tespit edilmiştir. Kırmızıbiber örneklerinde ise YDKS ozonun 2 saat ve üzeri uygulanması halinde etkili olduğu görülmüştür.
- 7) DDUS ozonun, PDA örneklerine uygulanması sonucu, küf gelişiminde kısmi bir inhibisyon sağlandığı (%8.2) ve AFB1 üretiminin ancak %20.4 düzeyinde engellenebildiği tespit edilmiştir. Bu durum kırmızıbiber örnekleri için daha farklıdır. DDUS ozon gazı, kırmızıbiberlere inoküle edilen *A. flavus* küfünü gelişimini ve AFB1 üretimini PDA'ya kıyasla daha yüksek oranda (sırasıyla 1.66 log ve %85.9) engellemiştir. Bu durum, PDA besiyerinin *A. flavus* küfünün gelişimi ve AFB1 üretimi için kırmızıbibere göre daha uygun bir substrat olduğunu ortaya koymaktadır.
- 8) Ozon gazı uygulamaları ile, tarımsal ürünlerin hasat sonrası depolanmasında fiziksel, biyolojik ve kimyasal etmenlerle oluşabilecek *A. flavus* küfünü gelişimi sınırlandırılabilir ve aflatoksin üretimi engellenebilir.
- 9) Ozon gazı uygulamaları, son yıllarda gıda endüstrisindeki kullanımı gittikçe yaygınlaşan bir kimyasal dezenfeksiyon işlemidir. Kullanımının kolay olması, uygulama sonrası kalıntı bırakmaması ve çevre dostu bir uygulama olmasından dolayı ozon gazının gıda endüstrisinde problem yaratabilen mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal bir ajan olarak kullanılması insan tüketimine uygun gıda üretimi açısından bir avantajdır.

10) Ülkemizde çoğunlukla ihracat konusunda problemler çıkaran ve vücuda alınması sonucunda farklı toksik etkiler gösteren aflatoksin mikotoksininin ozon gazı ile üretiminin engellenmesine ve aflatoksin üreticisi olan *A. flavus* küfünün gelişimini inhibe etmesine dair ozon gazının etkilerinin incelendiği çalışmalar güncel bir konu olarak öne çıkmaktadır. Tez çalışmamız ile *A. flavus* gelişimi ve aflatoksin üretimi problemlerine karşı ozon gazı uygulaması ile etkili sonuçlar elde edilmesi, kırmızıbiber dışındaki *A. flavus* ve aflatoksin problemi görülen incir, fındık, fıstık, mısır, buğday gibi tarımsal ürünler için de antifungal bir ajan olarak çözüm olabileceği konusunda umut vadetmektedir.

5. KAYNAKLAR

Açu, M. ve Ocak, Ö.Ö., ‘Gıdalarda Aflatoksin Düzeylerinin Belirlenmesinde Kullanılan Analiz Yöntemleri’, *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 4 (2), 168-181, (2019).

Adejumo, T.O. ve Adejoro, D.O., ‘Incidence of Aflatoxins, Fumonisin, Trichothecenes and Ochratoxins in Nigerian Foods and Possible Intervention Strategies’, *Food Sci. Qual. Manag.*, 31, 127–146, (2014).

Adeyeye, S.A., ‘Aflatoxigenic Fungi and Mycotoxins in Food: A Review’, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, (2019).

Ağaoğlu, S., ‘Van İlinde Açıkta Satılan Kırmızı Pul Biberlerde Aflatoksin B1 Varlığının Araştırılması’, *Van Tıp Dergisi*, 6 (4), 28-30, (1999).

Akbar, A., Medina, A. ve Magan, N., ‘Potential Control of Mycotoxigenic Fungi and Ochratoxin A in Stored Coffee Using Gaseous Ozone Treatment’, *Microorganisms*, 8 (10), 1462, (2020).

Al-Ahmadi, S.S., Ibrahim, R.A. ve Ouf, S.A., ‘Application of Ozone to Control Insect Pests and Moulds of Date Fruits’, *Biosci. Biotechnol. Res. Asia*, 6 (2), 435-446, (2009).

Antony-Babu, S. ve Singleton, I., ‘Effect of Ozone on Spore Germination, Spore Production and Biomass Production in Two *Aspergillus* Species’, *S.S.B.M.*, 96, 413-422, (2009).

Arda, B., Onbaşı, E., Öztürk, A. ve Cınar, A., ‘Ozon Gazının Antifungal Ajan Olarak Etkinliğinin Belirlenmesi’, *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, 26, 40-48, (2021).

Aslam, R., Alam, M.S. ve Saeed, P.A., ‘Sanitization Potential of Ozone and its Role in Postharvest Quality Management of Fruits and Vegetables’, *Food Eng. Rev.*, 12, 48-67, (2019).

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

Awuchi, C.G., Ondari, E.N., Ogbonna, C.U., Upadhyay, A.K., Baran, K., Okpala, C.O., Korzeniowska, M. ve Guine, R.P., ‘Mycotoxins Affecting Animals, Foods, Humans, and Plants: Types, Occurrence, Toxicities, Action Mechanisms, Prevention, and Detoxification Strategies: A Revisit’, *Foods*, 10 (6), 1279, (2021).

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

Ayrancı, U.G. ve Karaca, H., ‘Effect of in-Package Gas Composition on Growth and Aflatoxin Production of *Aspergillus flavus* in Culture Medium and Red Pepper’, *Int. J. Food Microbiol.*, 357 (9), (2021).

Baazeem, A., Medina, A. ve Magan, N., ‘Impacts of Gaseous Ozone (O₃) on Germination, Mycelial Growth, and Aflatoxin B1 Production In Vitro and In Situ Contamination of Stored Pistachio Nuts’, *Toxins*, 14 (6), 416, (2022).

Bataller, M., Gonzalez, J.E., Veliz, E. ve Fernandez L.A., ‘Ozone Applications in the Post-Harvest of Papaya (*Carica papaya* L.): An Alternative to Amistar Fungicide’, *Ozone Sci. Eng.*, 34 (3), 151-155, (2012).

Beber-Rodrigues, M., Savi, G.D. ve Scussel, V.M., ‘Ozone Effect on Fungi Proliferation and Genera Susceptibility of Treated Stored Dry Paddy Rice (*Oryza Sativa* L.)’, *J. Food Saf.*, 35 (1), 59-65, (2015).

Boonkorn, P., Gemma, H., Sugaya, S., Seta, S., Uthaiutra, J. ve Whangchai, K., ‘Impact of High-Dose, Short Periods of Ozone Exposure on Green Mold and Antioxidant Enzyme Activity of Tangerine Fruit’, *Postharvest Biol. Technol.*, 67, 25-28, (2012).

Brodowska, A.J., Nowak, A., Janyska, A.K., Piatkowski, M. ve Smigielski, K., ‘Modelling the Ozone-Based Treatments for Inactivation of Microorganisms’, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 14 (10), 1196, (2017).

Conte, G., Fontanelli, M., Galli, F., Cotrozzi, L., Pagni, L. ve Pellegrini, E., ‘Mycotoxins in Feed and Food and the Role of Ozone in Their Detoxification and Degradation: An Update’, *Toxins*, 12 (8), 486, (2020).

De Alencar, E.R., Faroni, L.R.D., Soares, N.F.F., Da Silva, W.A. ve Carvalho, M.C.S., ‘Efficacy of Ozone as a Fungicidal and Detoxifying Agent of Aflatoxins in Peanuts’, *J. Sci. Food Agric.*, 92 (4), 899–905, (2012).

De Oliveira, J.M., De Alencar, E.R., Blum, L.E.B., Ferreira, W.F.S., Botelho, S.C.C., Racanicci, A.M.C., Leandro, E.S., Mendonça, M.A., Moscon, E.S., Bizerra, L.V.A.S. ve Silva, C.R., ‘Ozonation of Brazil Nuts: Decomposition Kinetics, Control of *Aspergillus flavus* and the Effect on Color and on Raw Oil Quality’, *Food Sci. Technol.*, 123, (2020).

Dokuzlu, C., ‘Kırmızı Toz Biberde Aflatoksin’, *J. Fac. Vet. Med.*, 20, 19-23, (2001).

Duman, A.D., ‘Kahramanmaraş’ta Kırmızı Biberin Önemi ve Sorunları’, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 5 (1), (2002).

Ekici, L., Sağdıç, O. ve Kesmen, Z., ‘Gıda Endüstrisinde Alternatif Bir Dezenfektan: Ozon’, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 1 (1), 47-57, (2006).

Emenli, İ. ve Gündüz, G.T., ‘Gıdalarda Bulunan Küflerin Tanımlanmasında Kullanılan Yöntemler’, *Gıda*, 44 (4), 692-706, (2019).

Fan, X., ‘Gaseous Ozone to Preserve Quality and Enhance Microbial Safety of Fresh Produce: Recent Developments and Research Needs’, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 20 (5), 4993-5014, (2021).

Filazi, A. ve Sireli, U.T., *Aflatoxins: Recent Advances and Future Prospects*, Rijeka, Croatia: InTech, 143–170, (2013).

Fodil, S., Yaseen, T., D'Onghia, A.M., Varvaro, L. ve Ricelli, A., 'Use of Ozone to Control Conidial Germination in Ochratoxin A Producing Black *Aspergilli* Isolated in Raisins From Algeria', *Postharvest Pathology*, doi: 10.17660/ActaHortic.2016.1144.23, (2016).

Gavahian, M. ve Cullen, P.J., 'Cold Plasma As an Emerging Technique for Mycotoxin-Free Food: Efficacy, Mechanisms, and Trends', *Food Rev. Int.*, 36 (2), 193-214, (2020).

Ghitakou, S., Koutras, K., Kanellou, E. ve Markaki, P., "Study of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A Production by Natural Microflora and *Aspergillus parasiticus* in Black and Green Olives of Greek Origin", *Food Microbiol.*, 23 (7), 612-621, (2006).

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, [online], (20 Temmuz 2022), <https://www.resmigazete.gov.tr>, (2011).

Giordano, B.N., Nones, J. ve Scussel, V.M., 'Susceptibility of the In-Shell Brazil Nut Mycoflora and Aflatoxin Contamination to Ozone Gas Treatment during Storage', *J. Agric. Sci.*, 4 (8), 10, (2012).

Gürhayta, O.F. ve Çağındı, Ö., 'Kurutulmuş Meyvelerde Aflatoksin ve Okratoksin A Varlığının ve Sağlık Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi', *CBÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 12 (2), 327-338, (2015).

Hejri, L.A., Hajeb, P. ve Ehsani, R.J., 'Application of Ozone for Degradation of Mycotoxins in Food: A Review', *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 19 (4), 1777-1808, (2020).

Hussain, H.S. ve Brasel, J.M., 'Toxicity, Metabolism and Impact of Mycotoxins on Humans and Animals', *Toxicology*, 167 (2), 101-134, (2001).

Iacumin, L., Manzano, M. ve Comi, G., 'Prevention of *Aspergillus ochraceus* Growth on and Ochratoxin a Contamination of Sausages Using Ozonated Air', *Food Microbiol.*, 29 (2), 229-232, (2012).

International Agency for Research on Cancer (IARC), *Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene*, 82, Lyon, France: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1–556, (2002).

Kantarcıoğlu, A.S. ve Yücel, A., ‘*Aspergillus* Cinsi Mantarlar ve İnvaziv Aspergilloz: Mikoloji, Patogenez, Laboratuvar Tanımı, Antifungallara Direnç ve Duyarlılık Deneyleri’, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 34 (3), (2003).

Karaca, H. ve Veliöğlu, Y.S., ‘Ozone Applications in Fruit and Vegetable Processing’, *Food Rev. Int.*, 23 (1), 91-106, (2007).

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

Karaca, H., Veliöğlu, Y.S. ve Nas, S., ‘Mycotoxins: Contamination of Dried Fruits and Degradation by Ozone’, *Toxin Rev.*, 29 (2), 51-59, (2010).

Karapınar, M. ve Tuncel, G., ‘Perakende Satılan Bazı Toz Baharatların Mikrobiyolojik Kaliteleri’, *E.Ü. Müh. Fak. Derg.*, 4, 27-36, (1986).

Kells, S.A., Mason, L.J., Maier, D.E. ve Woloshuk, C.P., ‘Efficacy and Fumigation Characteristics of Ozone in Stored Maize’, *J. Stored Prod. Res.*, 37 (4), 371-382, (2001).

Kensler, T.W., Roebuck, B.D., Wogan, G.N. ve Groopman, J.D., ‘Aflatoxin: A 50 Year Odyssey of Mechanistic and Translational Toxicology’, *Toxicol. Sci.*, 120 (1), 28–48, (2011).

Kılınç, B., ‘Balık Ürünlerinde Küf Gelişiminin Yarattığı Problemler ve Kontrolüne Yönelik Çözümler’, *J. Limnol. Freshw. Fisheries Res.*, 6 (2), 169-178, (2020).

Kim, J.G., Yousef, A.E. ve Dave, S., 'Application of Ozone for Enhancing the Microbiological Safety and Quality of Foods: A Review', *J. Food Prot.*, 62 (9), 1071-1087, (1999).

Kuşçu, A. ve Pazır, F., 'Gıda Endüstrisinde Ozon Uygulamaları', *Gıda*, 29 (2): 123-129, (2004).

Luo, A., Bai, J., Li, R., Fang, Y., Li, L., Wang, D., Zhang, L., Liang, J., Huang, T. ve Kou, L., 'Effects of Ozone Treatment on the Quality of Kiwifruit During Postharvest Storage Affected by *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*', *J. Phytopathology*, 167 (7), 470-478, (2019).

Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G. ve Sanchis, V., 'Mycotoxins: Occurrence, Toxicology, and Exposure Assessment', *Food Chem. Toxicol.*, 60, 218–237, (2013).

McDonough, M.X., Campabadal, C.A., Mason, L.J., Maier, D.E., Denvir, A. ve Woloshuk, C., 'Ozone Application in a Modified Screw Conveyor to Treat Grain for Insect Pests, Fungal Contaminants, and Mycotoxins', *J. Stored Prod. Res.*, 47 (3), 249-254, (2011).

Oğuz, E. ve Çelik, Z., 'Suların Ozonlanmasındaki Gelişmeler', *PAÜ Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 7 (3), 367-372, (2001).

Oğuz, H., 'Mikotoksinler ve Önemi', *J. Vet. Sci. Pharmacol. Toxicol.*, 3 (2), 113-119, (2017).

Ouf, S.A. ve Ali, E.M., 'Does the Treatment of Dried Herbs with Ozone as a Fungal Decontaminating Agent Affect the Active Constituents?', *Environ. Pollut.*, 277, (2021).

Öksüztepe, G. ve Erkan, S., 'Mikotoksinler ve Halk Sağlığı Açısından Önemi', *Harran Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 5 (2), 190-195, (2016).

Özcan, G. ve Uraz, C., 2. Ulusal İş Sağlığı ve Güvenliği Öğrenci Kongresi Bildiri Kitabı, (41), İstanbul, Türkiye: Üsküdar Üniversitesi, Üsküdar Üniversitesi Yayınları, 92-96, (2021).

Özçakmak, S., Dervişoğlu, S., Pembeci-Kodolbaş, C. ve Sağdıç, O., "Effects of Thyme and Rosemary Essential Oils on the Growth of Two Aflatoxigenic *Aspergillus flavus* Strains", *J. Appl. Bot. Food Qual.*, 83 (2), 170-174, (2010).

Piemontese, L., Messia, M.C., Marconi, E.M., Falasca, L., Zivoli, R., Gambacorta, L., Perrone, G. ve Solfrizzo, M. 'Effect of Gaseous Ozone Treatments on DON, Microbial Contaminants and Technological Parameters of Wheat and Semolina' *Food Addit. Contam.*, 35 (4), 761–772, (2018).

Porto, Y.D., Trombete, F.M., Silva, O.F., Castro, I.M., Direito, G.M. ve Ascheri, J.L., 'Gaseous Ozonation to Reduce Aflatoxins Levels and Microbial Contamination in Corn Grits', *Microorganisms*, 7 (8), 220, (2019).

Ren, X., Zhang, Q., Zhang, W., Mao, J. ve Li, P., 'Control of Aflatoxigenic Molds by Antagonistic Microorganisms: Inhibitory Behaviors, Bioactive Compounds, Related Mechanisms, and Influencing Factors', *Toxins*, 12 (1), 24, (2020).

Rodrigues, V.O., Costa, F.R., Nery, M.C., Cruz, S.M., Melo, S.G. ve Carvalho, M.L., 'Treating Sunflower Seeds Subjected to Ozonation', *J. Seed Sci.*, 37 (3), 202-210, (2015).

Sağlam, A. ve Masatcıoğlu, M.T., 'Avrupa Birliği ve Türkiye Kaynaklı Gıdalarda 2009–2018 Yılları Arasında RASFF Bildirimleri', *Gıda*, 45 (4), 623-634, (2020).

Santos, R.R., Faroni, L.R., Cecon, P.R., Ferreira, A.P. ve Pereira, O.L., 'Ozone as Fungicide in Rice Grains', *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.*, 20 (3), 230-235, (2016).

Savaş, E., Tavşanlı, H. ve Gökgözoğlu, İ., 'Gıda Endüstrisinde Ozon Uygulamaları', *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2 (3), 122-127, (2014).

Savi, G.D. ve Scussel, V.M., 'Effects of Ozone Gas Exposure on Toxicogenic Fungi Species from *Fusarium*, *Aspergillus*, and *Penicillium* Genera', *Ozone Sci. Eng.*, 36 (2), 144-152, (2014).

Savi, G.D., Piacentini, K.C. ve Scussel V.M., 'Ozone Treatment Efficiency in *Aspergillus* and *Penicillium* Growth Inhibition and Mycotoxin Degradation of Stored Wheat Grains (*Triticum Aestivum* L.)', *J. Food Process. Preserv.*, 39 (6), 940-948, (2015).

Shier, W.T., Lao, Y., Steele, T.W. ve Abbas, H.K., 'Yellow Pigments Used in Rapid Identification of Aflatoxin-Producing *Aspergillus* Strains Are Anthraquinones Associated with the Aflatoxin Biosynthetic Pathway', *Bioorg. Chem.*, 33 (6), 426-438, (2005).

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

Ta, E.D., Ama, S., Desouky, A.E., Ha, E.M. ve Naguib, K., 'Effect of Ozone Gas on Degradation of Aflatoxin B1 and *Aspergillus flavus* Fungal', *J. Environ. Toxicol.*, 2 (2), (2012).

Taran, G.V., Puach, S.G., Zamuriev, A.A., Opalev, P.O. ve Yaroshenko, M.O., 'Plasma-Chemical Method of Grain Fungal Contamination Control', *Problems Atomic Sci. Technol.*, 52 (8), 127-130, (2020).

Taydaş, E.E. ve Aşkın, O., 'Kırmızı Biberlerde Aflatoksin Oluşumu' *Gıda*, 20 (1), 3-8, (1995).

Tekinşen, O.C. ve Sarıgöl, C., 'Elazığ Yöresinde Tüketime Sunulan Bazı Ögütülmüş Baharatın Mikrobiyal Florası', *F.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 7, 151-162, (1982).

Thanushree, M.P., Sailendri, D., Yoha, K.S., Moses, J.A. ve Anandharamakrishnan, C., 'Mycotoxin Contamination in Food: An Exposition on Spices', *Food Sci. Technol.*, 93, 69-80, (2019).

Tiryaki, O., Seçer, E. ve Temur, C., ‘Yemlerde Mikotoksin Oluşumu, Toksisiteleri ve Mikotoksin Kalıntı Analizleri’, *J. A.A.R.I.*, 21 (1), 44-58, (2011).

Tripathi, S. ve Mishra, H. N., "Nutritional Changes in Powdered Red Pepper Upon in vitro Infection of *Aspergillus flavus*", *Brazilian J. Food Microbiol.*, 40 (1), 139-144, (2009).

Tunail, N., *Funguslar ve Mikotoksinler, Ankara, Türkiye: Sim Matbaası*, (2000).

Varga, L. ve Szigeti, J., ‘Use of Ozone in the Dairy Industry: A review’, *Int. J. Dairy Technol*, 69 (2), 157-168, (2016).

Yıldız, P.O. ve Yangılar, F., ‘Ozon ve Gıda Endüstrisinde Kullanım Alanları’, *BE Fen Bilimleri Dergisi*, 3 (1), 94-101, (2014).

Zinedine, A. ve El Akhdari, S., ‘Food Safety and Climate Change: Case of Mycotoxins’, *Res. Global Environ. Changes Human Health*, 74-97, (2019).

Zotti, M., Porro, R., Vizzini, A. ve Mariotti, M.G., ‘Inactivation of *Aspergillus* spp. by Ozone Treatment’ *Ozone Sci. Eng.*, 30 (6), 423-430, (2008).