



T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI



**SALMONELLA ENTERİTİDİS'İN BİYOKONTROLÜNDE ENKAPSÜLE FAJLARIN
ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ VE ŞÜTTE BİYOKORUYUCU OLARAK
KULLANIMININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

GAMZE KOÇER ALAŞALVAR

EYLÜL 2024

T.C.
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

SALMONELLA ENTERİTİDİS'İN BİYOKONTROLÜNDE ENKAPSÜLE FAJLARIN
ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ VE SÜTTE BİYOKORUYUCU OLARAK
KULLANIMININ DEĞERLENDİRİLMESİ

GAMZE KOÇER ALAŞALVAR

Doktora Tezi

Danışman

Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM

Eylül 2024

Gamze KOÇER ALAŞALVAR tarafından **Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM** danışmanlığında hazırlanan “***Salmonella Enteritidis***’in Biyokontrolünde Enkapsüle Fajların Etkinliğinin Belirlenmesi ve Sütte Biyokoruyucu Olarak Kullanımının Değerlendirilmesi” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Gıda Mühendisliği** Ana Bilim Dalı’nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hilal YILDIZ
Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Didem ŞAHİNGİL
İnönü Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Emre YAVUZER
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ayşe ÖZBEY
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu’nun/...../20.... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

Prof. Dr. Mustafa KARATEPE
MÜDÜR

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

İmza

Gamze KOÇER ALAŞALVAR

ÖZET

SALMONELLA ENTERİTİDİS'İN BİYOKONTROLÜNDE ENKAPSÜLE FAJLARIN ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ VE SÜTTE BİYOKORUYUCU OLARAK KULLANIMININ DEĞERLENDİRİLMESİ

KOÇER ALAŞALVAR, Gamze
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM

Eylül 2024, 117 sayfa

Bu tezin konusu; *S. Enteritidis*'e özgü SE-P47 bakteriyofajının enkapsülasyonu ve kapsüllenen fajın gıda zincirinin farklı aşamalarında kullanım olanaklarının incelenmesidir. Ekstrüzyon ve püskürterek kurutma olmak üzere iki enkapsülasyon tekniği kullanılmış ve ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyon işlemi optimize edilmiştir. Ekstrüzyon yöntemiyle üretilen aljinat boncuklarının daha yüksek faj titresine sahip olduğu tespit edilmiştir. Optimum koşullarda kapsüllenen faj; farklı sıcaklıklarda, farklı pH değerlerinde ve simüle mide sıvısında serbest formdaki faj örneklerine göre daha yüksek stabilite sergilemiştir. Kapsüllenen ve serbest formdaki faj örnekleri 12 ay boyunca 4 ve 25°C'de muhafaza edildiklerinde canlılıklarını korumuştur. Simüle bağırsak sıvısı ve yarım yağlı sütte aljinat boncuklarından faj salınımı belirlenmiş ve *S. Enteritidis* sayısında önemli düşüşler elde edilmiştir. Sonuçlar, ekstrüzyon yöntemiyle aljinat ile kapsüllenen SE-P47 fajının gıda zincirinde hayvanlarda terapötik ajan veya gıdalarda biyokoruyucu ajan olarak kullanım potansiyeli olduğunu göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Aljinat, bakteriyofaj, enkapsülasyon, optimizasyon, *Salmonella*, stabilite.

SUMMARY

DETERMINATION OF THE EFFICACY OF ENCAPSULATED PHAGES IN THE BIOCONTROL OF *SALMONELLA* ENTERITIDIS AND EVALUATION OF USE AS A BIOPRESERVATIVE IN MILK

KOÇER ALAŞALVAR, Gamze
Niğde Ömer Halisdemir University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor : Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM

September 2024, 117 pages

The aim of this thesis is to encapsulate the SE-P47 bacteriophage specific to *S. Enteritidis* and investigate the potential uses of the encapsulated phage at different stages of the food chain. Two encapsulation techniques, extrusion and spray drying, were used and the encapsulation process was optimized by the extrusion method. It was determined that alginate beads produced by extrusion method had higher phage titers. The phage encapsulated under optimum conditions exhibited higher stability than free phage samples at different temperatures and pH values, and in simulated gastric fluid. The encapsulated and free-form phage samples stored at 4 and 25°C for 12 months maintained their viability. The release of phage from alginate beads was determined in simulated intestinal fluid and semi-skimmed milk, resulting in significant reductions in the counts of *S. Enteritidis*. The results show that SE-P47 phage encapsulated with alginate by extrusion method has the potential to be used as a therapeutic agent in animals or as a bioprotective agent in foods in the food chain.

Keywords: Alginate, bacteriophage, encapsulation, optimization, *Salmonella*, stability.

ÖN SÖZ

Bu tez çalışmasında *Salmonella* patojen bakterisine özgü SE-P47 fajının enkapsülasyonu, enkapsülasyon prosesinin optimizasyonu, üretilen faj yüklü aljinat boncuklarının karakterizasyonu ve gıda zincirinin farklı aşamalarında kullanım potansiyeli araştırılmıştır. Elde edilen sonuçların gelecek çalışmalara ışık tutmasını temenni ederim.

Doktora yaptığım süre içerisinde bilgi ve birikimini benden esirgemeyen, çalışmalarım boyunca bakış açısı ve bilgisiyle bana yol gösteren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Zeliha YILDIRIM'a,

Tez çalışmam süresince değerli bilimsel katkılarını esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Hilal YILDIZ'a, Dr. Öğr. Üyesi Ayşe ÖZBEY'e,

Çalışmalarım süresince, beni daima destekleyen değerli meslektaşım ve sevgili eşim Arş. Gör. Dr. Hamza ALAŞALVAR'a, emeklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve her zaman yanımda olan annem Gül Mehtap KOÇER'e, babam Emre KOÇER'e, kardeşlerim Betül KOÇER ve Elif KOÇER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, bu tez çalışmasına finansal destek veren Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: TGT2022/20-LÜTEP) katkılarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ÖN SÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ	xii
SİMGE VE KISALTMALAR	xiii
BÖLÜM I.....	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM II	4
KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1 <i>Salmonella</i>	4
2.2 Bakteriyofaj	6
2.2.1 Bakteriyofajların tarihçesi	6
2.2.2 Bakteriyofajların yapısal özellikleri	8
2.2.3 Bakteriyofajların sınıflandırılması	9
2.2.4 Bakteriyofajların hayat döngüleri	13
2.2.4.1 Litik hayat döngüsü	14
2.2.4.2 Lizojenik hayat döngüsü	18
2.2.5 Gıda zincirinde bakteriyofaj uygulama alanları	19
2.2.6 Bakteriyofaj uygulamalarının avantaj ve dezavantajları	24
2.3 Enkapsülasyon	25
2.3.1 Enkapsülasyon teknikleri	27
2.3.1.1 Ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyon	27
2.3.1.2 Püskürterek kurutma yöntemiyle enkapsülasyon	29
2.3.2 Kaplama maddeleri	31
2.4 Gıda zincirinde enkapsüle bakteriyofaj uygulamaları	32
2.4.1 Bakteriyofaj terapisi	33
2.4.2 Gıdalarda biyokoruyucu olarak kullanım	36

2.5 Optimizasyon	38
2.5.1 Bakteriyofajların enkapsülasyonunun optimizasyonu	40
BÖLÜM III	44
MATERYAL VE METOT	44
3.1 Materyaller	44
3.1.1 Mikroorganizma kültürleri	44
3.1.2 Besiyeri ve kimyasallar	44
3.2 Metotlar	45
3.2.1 Mikroorganizma kültürlerinin hazırlanması ve muhafazası	45
3.2.2 Yüksek titreli bakteriyofaj solüsyonunun hazırlanması	45
3.2.3 Çift tabaka agar plak metodu	45
3.2.4 Enkapsülasyon	46
3.2.4.1 Ekstrüzyon yöntemi ile enkapsülasyon	46
3.2.4.2 Ekstrüzyon yöntemi ile enkapsülasyonun optimizasyonu	47
3.2.4.2.1 Fraksiyonel faktöriyel deneme tasarımı (FFD)	47
3.2.4.2.2 Yüzey merkezli merkezi kompozit tasarım (FCCCD)	47
3.2.4.3 Ekstüzyon yöntemiyle enkapsülasyonda kitosanın etkisi	48
3.2.4.4 Püskürtmeli kurutma yöntemi ile enkapsülasyon	48
3.2.4.5 Enkapsülasyon etkinliği ve verimi	49
3.2.5 Enkapsüle bakteriyofajın karakterizasyonu	50
3.2.5.1 Morfoloji ve boyut dağılımı	50
3.2.6 Serbest ve enkapsüle bakteriyofajların stabilitesi	50
3.2.6.1 pH ve sıcaklık stabilitesi	50
3.2.6.2 Yapay mide ortamında stabilite	51
3.2.6.3 Depolama süresince stabilite	51
3.2.6.3.1 Hayatta kalım	51
3.2.6.3.2 Renk ölçümü	52
3.2.6.3.3 Su aktivitesi	52
3.2.7 Enkapsüle bakteriyofajların salınımı	52
3.2.7.1 Simüle bağırsak sıvısında salınım	52
3.2.7.2 Süt içinde salınım	53
3.2.8 Enkapsüle bakteriyofajın S. Enteritidis'e karşı litik aktivitesinin belirlenmesi	53
3.2.8.1 Simüle bağırsak sıvısında litik aktivite	53

3.2.8.2 Süt içerisinde litik aktivite	54
3.2.9 İstatistiksel Analiz.....	54
BÖLÜM IV	55
BULGULAR VE TARTIŞMA	55
4.1 SE-P47 fajının ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyonu.....	55
4.1.1 Fraksiyonel faktöriyel deneme tasarımı ile etkili faktörlerin taranması	55
4.1.2 Yüzey merkezli merkezi kompozit tasarım ile optimizasyon ve doğrulama	57
4.2 Bakteriyofajın ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyonunda kitosanın etkisi	62
4.3 Püskürterek kurutma yöntemi ile enkapsülasyon	64
4.4 Ekstrüzyon yöntemiyle üretilen enkapsüle bakteriyofajın karakterizasyonu	67
4.4.1 Bakteriyofaj içeren kapsüllerin morfolojisi	67
4.3 Serbest ve enkapsüle bakteriyofajların stabilitesi	70
4.3.1 Sıcaklık ve pH stabilitesi.....	70
4.3.2 Simüle mide ortamında stabilite.....	74
4.3.3 Depolama süresince stabilite.....	75
4.3.3.1 Canlılık	75
4.3.3.2 Renk.....	77
4.3.3.3 Su aktivitesi	78
4.4 Kapsülden bakteriyofajın salınımı	79
4.4.1 Simüle bağırsak sıvısında salınım.....	79
4.4.2 Süt içerisinde salınım	81
4.5 Enkapsüle bakteriyofajın S. Enteritidis'e karşı litik aktivitesinin belirlenmesi	83
4.5.1 Simüle bağırsak sıvısında litik aktivite	83
4.5.2 Süt içerisinde litik aktivite	85
BÖLÜM V	91
SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	91
KAYNAKLAR	95
ÖZ GEÇMİŞ	117
TEZ ÇALIŞMASINDAN ÜRETİLEN ESERLER	118

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bradley sınıflandırması (Bradley, 1967)	10
Çizelge 2.2. Ackermann sınıflandırması (Ackermann, 2003)	12
Çizelge 2.3. Gıda güvenliği uygulamaları için kullanımı onaylanan çeşitli faj ürünleri	21
Çizelge 2.4. Faj terapisi uygulamaları	34
Çizelge 2.5. Gıdalarda enkapsüle faj ve film uygulamaları.....	37
Çizelge 3.1. Fraksiyonel faktöriyel deneme tasarımında kullanılan bağımsız değişkenlerin deneysel değerleri ve kodlanmış seviyeleri	47
Çizelge 3.2. Yüzey merkezli merkezi tümleşik tasarımda kullanılan bağımsız değişkenlerin deneysel değerleri ve kodlanmış seviyeleri	48
Çizelge 4.1. Fraksiyonel faktöriyel deneme tasarımı ve yanıt sonuçları	55
Çizelge 4.2. Yüzey merkezli merkezi kompozit deneme tasarımı ve sonuçlar	58
Çizelge 4.3. ANOVA sonuçları	59
Çizelge 4.4. Kitosanın etkisini belirlemek için kullanılan kaplama maddesi formülasyonları ve sonuçlar	63
Çizelge 4.5. Farklı sıcaklıklarda depolama boyunca serbest ve kapsüllenen fajların canlılığı (log pob/mL ya da g)	76
Çizelge 4.6. Farklı sıcaklıklarda depolama boyunca serbest ve kapsüllenen faj örneklerinin renk değerleri (ΔE).....	77
Çizelge 4.7. Farklı sıcaklıklarda depolama boyunca serbest ve kapsüllenen faj örneklerinin su aktivitesi (a_w) değerleri.....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bakteriyofajın yapısı (Humagain, 2024)	9
Şekil 2.2. Bradley sınıflandırmasına göre faj morfolojileri (Bradley, 1967).....	10
Şekil 2.3. Ackermann sınıflandırmasına göre fajların morfotipleri (Ackermann, 2003)	11
Şekil 2.4. Litik hayat döngüsü	15
Şekil 2.5. Lizojenik hayat döngüsü.....	18
Şekil 2.6. Ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyon (Sultana vd., 2022).....	28
Şekil 2.7. Şekil Püskürterek kurutma düzeneği (Malik, 2021)	30
Şekil 4.1. Pareto grafiği	56
Şekil 4.2. Yarı normal grafik	57
Şekil 4.3. Aljinat boncuklarının morfolojisi. Optik (a) ve taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (b).	67
Şekil 4.4. Kitosan (%0,5) + aljinat (%1,5) kapsüllerinin ışık mikroskobu görüntüleri; 0,5:1 oranında kitosan + aljinat (a), 0,75:1 oranında kitosan + aljinat (b), 1:1 oranında kitosan + aljinat (c).....	69
Şekil 4.5. Kitosan (%0,5) + aljinat (%1,5) kapsüllerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri; 0,5:1 oranında kitosan + aljinat (a), 0,75:1 oranında kitosan + aljinat (b), 1:1 oranında kitosan + aljinat (c).....	70
Şekil 4.6. Serbest (a) ve kapsüllenen fajların (b) termal stabilitesi	71
Şekil 4.7. Serbest ve kapsüllenen fajların pH stabilitesi	72
Şekil 4.8. 37°C'de pH 2 ve 2,5'te simüle mide sıvısına maruz bırakıldıktan sonra serbest ve kapsüllenen fajların canlılığı	74
Şekil 4.9. Simüle bağırsak sıvısında (37°C) aljinat boncuklarından faj salınımı	79
Şekil 4.10. Yarım yağlı sütte (25°C) aljinat boncuklarından faj salınımı.....	82
Şekil 4.11. Kapsüllenen fajın simüle bağırsak sıvısında (37°C) S. Enteritidis'e karşı MOI 1000 (a) ve MOI 100000 (b)'de litik aktivitesi	84
Şekil 4.12. Enkapsüle fajın süt içinde S. Enteritidis METU-S1-411'e karşı 4°C'de MOI değeri 1000 (a) ve 100000 (b)'de litik aktivitesi	86
Şekil 4.13. Kapsüllenen fajın süt içinde S. Enteritidis METU-S1-411'e karşı 25°C'de MOI değeri 1000 (a) ve 100000 (b)'de litik aktivitesi.....	87

FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

Fotoğraf 4.1. 90°C (a), 100°C (b) ve 110°C'de (c) üretilen faj içeren aljinat tozları	64
Fotoğraf 4.2. 90°C (a), 100°C (b) ve 110°C'de (c) üretilen faj içeren kitosan tozları ...	64
Fotoğraf 4.3. Optimum koşullarda ekstrüzyon yöntemiyle üretilen faj yüklü aljinat boncukları.....	67
Fotoğraf 4.4. Kitosan (%0,5) + aljinat (%1,5) kapsüllerinin petri kutusundaki görüntüleri; 0,5:1 oranında kitosan + aljinat (a), 0,75:1 oranında kitosan + aljinat (b), 1:1 oranında kitosan + aljinat (c).....	68

SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
ΔE	Toplam renk farkı

Kısaltmalar	Açıklama
ANOVA	Varyans Analizi
a_w	Su Aktivitesi
BB	Boncuk Boyutu
BVS	Bakteriyel Virüsler Alt Komitesi
CCD	Merkezi Kompozit Tasarım
cp	Santipoise
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FCCCD	Yüzey Merkezli Merkezi Kompozit Tasarım
FFD	Fraksiyonel Faktöriyel Deneme Tasarımı
g	Gram
GRAS	Genellikle Güvenli Kabul Edilir
ICTV	Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi
kob	Koloni Oluşturan Birim
log	Logaritmik
MBS	Kapsül Kırıcı Çözelti
m/m	Kütle/Kütle
MOI	Enfeksiyon Çokluğu
mg	Miligram
mL	Mililitre
m/v	Kütle/Hacim

µL	Mikrolitre
pob	Plak Oluşturan Birim
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
SGF	Simüle Mide Sıvısı
SIF	Simüle Bağırsak Sıvısı
SM	Sodyum Klorür-Magnezyum Sülfat
UHT	Ultra Yüksek Sıcaklık
USDA	Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı
v/v	Hacim/Hacim
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

BÖLÜM I

GİRİŞ

Gıda güvenliği, gıda zincirinin her aşamasında kontaminasyonu önleyecek şekilde gıdanın işlenmesi, hazırlanması ve depolanmasını sağlayarak gıda kalitesinin korunmasını ve sağlığın iyileştirilmesini hedeflemektedir (WHO, 2015a). Gıda güvenliğinin yeterince sağlanamaması tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunudur. Patojenik mikroorganizmalar, gıda kaynaklı hastalıkların en önemli nedenlerinden biridir. Hastalık ve ölüm gibi ciddi sonuçların yanı sıra toplumda sosyoekonomik ve psikolojik sorunlara da yol açmaktadır. Güvenli olmayan gıda tüketiminden kaynaklanan hastalıklar için yapılan sağlık harcamaları, iş gücü kaybı ve gıdanın toplu imhası büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Güvenli olmayan gıda tüketiminin, üretkenlikteki azalmalar ve sağlık harcamaları ile özellikle düşük ve orta gelirli ülkelerde her yıl 110 milyar dolar kayba neden olduğu tahmin edilmektedir (Jaffee vd., 2018). Gıda kaynaklı hastalıkların her yaştan insanı özellikle 5 yaşın altındaki çocuklar ile düşük gelirli bölgelerde yaşayan kişileri etkilediği bilinmektedir. Dünya Sağlık Örgütü raporuna göre, dünya çapında her yıl tahminen 600 milyon gıda kaynaklı hastalık vakası ve 420.000 ölüm meydana gelmektedir (WHO, 2015b). Vaka sayısına göre gıda kaynaklı hastalıkların çoğuna (ishal hastalıkları) sırasıyla norovirus, *Campylobacter* spp., enterotoksijenik *Escherichia coli* ve tifo dışı *Salmonella enterica* neden olmaktadır. Bununla birlikte, gıda kaynaklı hastalıklar sebebiyle hastaneye yatış ve ölümün başlıca etkeni *Salmonella enterica*'dır (Scallan vd., 2015; WHO, 2015b).

Öte yandan antibiyotiğe dirençli bakterilerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Çoklu ilaca dirençli bakteriler sadece insan sağlığı açısından değil hayvancılık endüstrisinde de büyük bir endişe kaynağıdır. Gıda hayvanı üretiminde antimikrobiyal kullanımının 2030 yılına kadar 105,596 (± 3605) tona ulaşacağı öngörülmektedir (Cristobal-Cueto vd., 2021).

Gerek *Salmonella* gerek diğer gıda kaynaklı patojenlerle mücadelede geleneksel yöntemler ve yeni teknolojiler kullanılmaktadır. Son yıllarda özellikle Batı ülkelerinde bakteriyofajların (fajların) kullanımı kimyasal tedavilere alternatif olarak yeniden ortaya çıkmıştır (Broncano-Lavado vd., 2021). Fajlar, çevrede her yerde bulunmaları nedeniyle

Dünya üzerinde en çok bulunan biyolojik ajanlar olarak kabul edilmektedir. Litik fajlar, bakteri hücrelerini enfekte edip lize edebilen daha sonra parçalanan bakteri hücrelerinden salınarak komşu konakçı hücreleri de enfekte etme yeteneğine sahip bakteriye özgü virüslerdir (Lone vd., 2016). Hedef bakteriyel konakçıları dışında insanlar da dahil olmak üzere tüm organizmalar için zararsızdırlar (Harada vd., 2018).

Fajlar gıda endüstrisinde tarım, hayvancılık, gıda işleme, ambalajlama gibi farklı aşamalarda patojen kontrolünde ve bakteri kökenli hastalıkların tedavisinde kullanılabilmektedir (Harada vd., 2018). Bakteriyel enfeksiyon riskini ortadan kaldırmak için doğrudan hayvanlara veya bitkilere, gıda üretim tesislerinde biyofilm oluşumunu önlemek için veya ürünü korumak için doğrudan gıdalara uygulanabilmektedir. Fajların kullanımı biyolojik kontrolde güncel ve umut verici bir alternatiftir. Bu alternatif tedavi aynı zamanda kimyasalların gıdalar üzerinde oluşturduğu istenmeyen etkileri de azaltabilmektedir (Kasman ve Porter, 2022).

Faj uygulamalarında, fajların aktivitelerini gösterebilmeleri hedef bölgeye ulaşmalarına ve bu bölgede yeterli sayıda bulunmalarına bağlıdır (Cooper, 2016). Çeşitli litik fajların sıvı formda kullanımlarında, faj titresinde azalma ve gıda bileşenleriyle istenmeyen etkileşimler meydana gelebilmektedir. Bununla birlikte sindirim enzimleri, yüksek sıcaklık, yüksek veya özellikle düşük pH değerleri, nem, mor ötesi ışınlar gibi farklı fiziko-kimyasal koşullar altında aktiviteleri azalabilir veya tamamen kaybedilebilir (Jończyk-Matysiak vd., 2019; Petsong vd., 2019; Yang vd., 2023).

Fajların kullanım alanını genişletmek, biyolojik aktiviteyi koruyup antimikrobiyal verimi artırarak gıdalarda veya hayvanlarda etkili kullanımı sağlamak konusunda enkapsülasyon teknolojisi ön plana çıkmaktadır. Fajların enkapsülasyonu bir hidrokolloid kaplama ile fajları dış ortamdan ayırarak, hücrelerin doğru zamanda vücutta veya gıda içerisinde serbest bırakılacak şekilde kaplanması esasına dayanır (Choińska-Pulit vd., 2015). Enkapsülasyon, fajların etkinliğini yüksek oranda koruyarak ve onların bağışıklık sisteminden gizlenmesine yardımcı olarak hedef bakteri popülasyonlarına ulaşmalarını kolaylaştırır. Ayrıca, enkapsüle edilmiş fajlar taşınması ve uygulanması daha kolay formülasyonlar sunar. Bu nedenlerle fajların enkapsülasyonu, onların gıda güvenliği ya da tedavi amaçlarıyla etkin ve güvenli bir şekilde kullanılmasını sağlayan önemli bir teknolojidir (Malik, 2021).

Fajların kapsülleme işleminde kullanılan yöntem, işlem parametreleri, kaplama malzemesi gibi değişkenler enkapsülasyon etkinliğini dolayısıyla faj canlılığını etkileyen en önemli faktörlerdir (Choińska-Pulit vd., 2015). Faj kapsülleme işleminde maksimum koruma ve uygulama kolaylığı sağlamak için küçük kapsüller elde edilmelidir. Bu nedenle kapsülleme işleminin optimize edilmesi gerekir. Optimizasyon, üretim maliyetlerini düşürerek ekonomik açıdan sürdürülebilir çözümler sunar. Bildiğimiz kadarıyla faj kapsüllemesinin optimizasyonu konusunda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Araştırmacılar son 10 yıldır faj uygulamalarındaki bazı kısıtlamaların önüne geçebilmek adına enkapsüle faj çalışmalarına yönelmiş olup çalışmalar daha çok terapötik ajan olarak kullanımları kapsamaktadır. Gıda uygulamaları ile ilgili çalışmalar kısıtlıdır.

Bu tez çalışmasının konusu; daha önceki çalışmalarda izolasyon ve karakterizasyonu yapılan *Salmonella* Enteritidis bakterisine özgü SE-P47 fajının enkapsülasyonu, faj içeren kapsüllerin özelliklerinin ve konak hücreye karşı etkinliğinin incelenmesidir. Bu kapsamda, SE-P47 fajı ekstrüzyon ve püskürterek kurutma olmak üzere iki farklı enkapsülasyon tekniği kullanılarak kapsüllenmiştir. Ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyon işlemi deneysel tasarım yaklaşımları kullanılarak optimize edilmiştir. Her iki yöntemle elde edilen kapsüllenmiş fajların aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Ekstrüzyon yöntemiyle optimum enkapsülasyon koşullarında üretilen kapsüllenmiş fajın morfolojisi, pH ve sıcaklık stabilitesi, depolama boyunca stabilitesi ve yapay mide sıvısında stabilitesi belirlenerek karakterize edilmiştir. Yapay bağırsak sıvısında ve sütte kapsüllerden faj salınımı incelenmiştir. Ayrıca, kapsüllenmiş fajın terapötik ajan ve biyokoruyucu ajan olarak kullanımını değerlendirmek için sırasıyla yapay bağırsak sıvısı ve süt kullanılarak *S. Enteritidis*'e karşı litik aktivitesi belirlenmiştir.

BÖLÜM II

KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 *Salmonella*

Salmonella bakterisi ilk olarak 1839 yılında Sohlerin tarafından bulunmuş ve 1880 yılında Eberth tarafından tifodan ölen bir kişinin mezenterik lenf düğümleri ve dalağından izole edilmiştir. *Enterobacteriaceae* familyasına ait olan *Salmonella*, spor oluşturmayan, Gram negatif, çubuk şeklinde ve fakültatif anaerobik bir bakteridir. *Salmonella* bakterileri sahip oldukları peritrik flagella ile hareket ederler (*S. Pullorum* ve *S. Gallinarum* hariç). Bazılarında ise fimbria (pilus) bulunur (Eng vd., 2015; Rahman ve Othman, 2018). *Salmonella*'nın optimum gelişme sıcaklığı 37°C olmakla birlikte genellikle 5-47°C aralığında gelişebilmektedir. Yaklaşık 4,0-9,0 pH aralığında gelişebilir ancak optimum gelişme gösterdiği pH değeri 7,0'dır. *Salmonella*'nın en iyi gelişme gösterdiği su aktivitesi değerleri ise 0,94-0,99 aralığıdır. Ayrıca *Salmonella*'nın %8 tuz ortamını tolere edebildiği de bildirilmektedir (Rahman ve Othman, 2018).

Salmonella'nın kaynağı sığır, koyun, domuz, kümes hayvanları ve evcil hayvanların bağırsak sistemi olup bunlardan kümes hayvanları eti, yumurta, kırmızı et ürünleri ve süt ürünlerine bulaşmaktadır (Heredia ve García, 2018). Ayrıca domates, salatalık ve yeşil yapraklı sebzeler de bulaşabilmektedir (El-DougDoug vd., 2019; Pui vd., 2011). *Salmonella*, kontamine gıda veya su yoluyla, enfekte hayvanlara temas yoluyla veya kontamine bir ortamdan insanlara bulaşarak enfeksiyona neden olabilmektedir (Eng vd., 2015). *Salmonella*'nın *S. enterica* ve *S. bongori* olmak üzere iki ana türü vardır ve 2.500'den fazla serotipi tanımlanmıştır. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*) dünya genelinde *Salmonella* enfeksiyonlarından sorumlu olarak en sık bildirilen serovarların başında gelmektedir (EFSA ve ECDC, 2023; Lamas vd., 2018; WHO, 2015b).

Tifo olmayan *Salmonella enterica* (*S. Typhi* ve *S. Paratyphi* dışındaki *Salmonella enterica*) serovarları dünya çapında her yıl 93,8 milyon akut gastroenterit vakasına ve 155.000 ölüme neden olduğu ve bunların yaklaşık %85'inin gıda kaynaklı olduğu tahmin edilmektedir (WHO, 2016). Ayrıca, Avrupa Birliği'nde (27 ülke) insanlarda en

yaygın olarak rapor edilen ikinci gıda kaynaklı gastrointestinal enfeksiyon salmonellozistir. 2022'de 65.208 adet doğrulanmış salmonellozis vakası (hastaneye kaldırılma ve ölümler) belirlenmiş ve gıda kaynaklı salmonellozis salgınlarının sayısının 2021'e göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (EFSA ve ECDC, 2023). Salmonellozisin belirtileri ateş, karın ağrısı, ishal, mide bulantısı ve kusmadır. Hastalık semptomları *Salmonella* bakterisinin vücuda alımından 6-72 saat sonra (genellikle 12-36 saat) başlar ve hastalık 2-7 gün sürer. Hastalığın tedavisi genelde kusma ve ishal nedeniyle kaybedilen sodyum, potasyum ve klorür iyonları gibi elektrolitleri vücuda geri kazandırmak için elektrolit replasmanı ve rehidrasyondur. Sağlıklı bireylerde hafif veya orta dereceli vakalarda rutin antimikrobiyal tedavi önerilmemektedir. Bunun nedeni, antimikrobiyallerin bakterileri tamamen yok edememesi, dirençli suşları seçmesi ve bunun daha sonra ilacın etkisiz hale gelmesine yol açabilmesidir. Ancak bebekler, yaşlılar ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar gibi sağlık riski taşıyan grupların antimikrobiyal tedavi alması gerekmektedir (WHO, 2024).

Salmonella suşlarında antimikrobiyal direncin ortaya çıkması dünya çapında ciddi bir sağlık sorunudur. Antimikrobiyal dirence sahip *Salmonella* suşlarının ortaya çıkışı, antibiyotiklerin gıda hayvanlarının büyümesini teşvik etmek için hayvan yemlerinde kullanılması ve hayvanlardaki bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için uygunsuz/kontrolsüz kullanılmasıyla ilişkilendirilmektedir (Eng vd., 2015).

Salmonella enfeksiyonunu önleme; tarımsal ve hayvansal üretim, işleme, ambalajlama, nakliye ve depolama gibi gıda zincirinin tüm aşamalarında kontrol önlemlerini gerektirir. Pastörizasyon, yüksek basınç uygulamaları, ışınlama ve kimyasal dezenfektanların kullanılması gibi yöntemler, gıdalardaki mikrobiyal popülasyonları azaltırken gıdanın türüne ve uygulama parametrelerine bağlı olarak besin değeri kaybına ve yararlı bakterilerin de ortamdan elimine edilmesine sebep olabilmektedir (Islam vd., 2020; Moye vd., 2018). Günümüzde tüketicilerin minimum düzeyde işlenmiş veya kimyasal koruyucu içermeyen gıdalara yönelik tercihlerinin artması, kimyasal koruyucuların gıdalarda kullanımlarını kısıtlamaya başlamıştır. Bu nedenle gıdalarda doğal koruyucuların kullanımına yönelim gün geçtikçe artmaktadır.

Hem geleneksel dekontaminasyon yöntemlerinin dezavantajlarını ortadan kaldırmak hem de son yıllarda antibiyotiğe dirençli patojen bakteri sayısının artmasından dolayı

enfeksiyonlarla mücadele için yeni yollara ihtiyaç duyulması konularında biyokoruyucu ajanların kullanımı günümüzde umut vaat etmektedir.

2.2 Bakteriyofaj

Bakteriyofaj (faj) uygulamaları son yıllarda patojen bakterilerin neden olduğu gıda kayıpları ve/veya hastalıklarla mücadelede mevcut yöntemlere alternatif bir teknik olarak görülmektedir. Özellikle patojen bakterilerin antibiyotiğe karşı direncinin artması nedeniyle son zamanlarda popüler hale gelmiş bulunmaktadır (Islam vd., 2020; Teklemariam vd., 2023). Fajlar, bakterileri enfekte etme yeteneğine sahip bakteriye özgü virüslerdir. Zorunlu hücre içi parazitlerdir ve metabolik aktiviteye sahip değildirler (Greer, 2005; Lone vd., 2016). Fajlar doğada oldukça yaygındır ve Dünya’da yaklaşık 10^{31} adet fajın olduğu bildirilmektedir. Toprak, kanalizasyon, su, işleme tesisi atık suları, dışkı ve perakende gıdalardan geri kazanılarak saflaştırılabilirler. Fajların yüksek özgüllüğe sahip olması sayesinde antibiyotiklerin aksine doğal florayı etkilemeyerek sadece konakçı bakteri inhibe edilir. Ayrıca konakçı bakterilerin bulunduğu yerlerde spesifik olarak çoğalırlar. Konakçı yokluğunda fajlar organizmaların bağışıklık sistemi tarafından ortadan kaldırılırlar (Sillankorva vd., 2012; Śliwka vd., 2019).

2.2.1 Bakteriyofajların tarihçesi

Fajlara dair ilk bulguların İngiliz kimyager Ernest Hankin tarafından ortaya koyulduğu düşünülmektedir. Ernest Hankin’in 1896 yılında yayımlamış olduğu “Jumna ve Ganj sularının kolera mikrobi üzerinde bakterisidal etkisi”, başlıklı makalesi birçok yazar tarafından fajların etkisinin çok erken bir tanımı olarak bildirilmiştir (Abedon vd., 2011; Hankin, 1896). Ernest Hankin, Hindistan’daki Ganj ve Jumna nehirlerinin *Vibrio cholerae*’ya karşı antibakteriyel özelliklere sahip olduğunu gözlemlemiş ve bunun, nehre yakın köylerde başta kolera olmak üzere mide-bağırsak enfeksiyonu vakalarının sayısının azalmasından sorumlu olabileceğini bildirmiştir. Bu bulgular, bazı bilim insanları tarafından bakteriyel enfeksiyonun tedavisi için fajların kullanılmasının kökeni olarak değerlendirilse de Ganj ve Jumna nehir sularında gözlemlenen bu antibakteriyel etkinin fajlardan kaynaklanıp kaynaklanmadığı kanıtlanamamıştır (Abedon vd., 2011). Fajlar, 1915 ve 1917 yıllarında sırasıyla Frederick William Twort ve Félix d’Herelle tarafından keşfedilmiştir (D’Herelle, 1917; Twort, 1915). Eski Yunanca’da bakteri

yiye anlamına gelen bakteriyofaj terimini ilk kez d'Herelle kullanmıştır. d'Herelle'nin ilk faj tedavisi çalışmaları, bakteriyel dizanteri üzerine olmuştur. Gönüllü insanlar üzerinde yapılan uygulamaların ardından herhangi bir yan etki gözlemlenmemesi üzerine 1919 yılında dizanteri sebebiyle hastaneye yatırılan 12 yaşında bir erkek çocuğuna oral yolla dizanteriye karşı faj preparatı uygulanmıştır. Faj tedavisi sonrası hastanın hızlı bir şekilde iyileşme gösterdiği ve ertesi gün hastalığa dair semptom gözlemlenmediği rapor edilmiştir. 1921 yılında ise Richard Bruynoghe ve Joseph Maisin tarafından stafilokokal deri enfeksiyonunun tedavisinde fajlar kullanılmış olup 24-48 saat içinde olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Kutter ve Sulakvelidze, 2004). Bununla birlikte başarısız bazı denemelerin de olması ve fajın bakteriyel bir virüsten ziyade enzim yapısı olabileceği hipotezi bilim dünyasında tartışmalara neden olsa da 1920'lerde ve 1930'larda özellikle Hindistan, Mısır, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Sovyetler Birliği'nde faja dair klinik araştırmalar yapılmaya devam edilmiştir. 1940'ta fajların elektron mikroskobu ile görüntülenmesiyle faj biyolojisine dair bilgiler de netleşmeye başlamıştır (Salmond ve Fineran, 2015). İkinci Dünya Savaşı sırasında klinik uygulama için bir Alman ilaç şirketi dizanteri tedavisinde kullanılmak üzere polifagin adlı faj preparatını üretmiştir (Adhya ve Merril, 2006). Bununla birlikte, 1928'de Penisilin'in keşfi ve ilerleyen yıllarda antibiyotiklerin başarılı kullanımları faj tedavisine olan ilginin azalmasına neden olmuştur. Özellikle etki spektrumunun geniş olması ve üretimin ucuz olması sebepleriyle antibiyotikler yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Faj çalışmaları, 1960'lı yılların sonundan itibaren moleküler biyolojinin gelişimine önemli katkılar sağlamıştır. Fajların konakçıları ile etkileşimlerini incelemeye yönelik yapılan deneyler, DNA'nın kalıtsal materyal olduğu ve restriksiyon, modifikasyon gibi temel fonksiyonlarının keşfedilmesinde önemli rol oynamıştır. Günümüzde de gen düzenlenmesinde model olarak Lambda fajı kullanılmaya devam etmektedir (Korf vd., 2019; Salmond ve Fineran, 2015). 1980'lerin sonlarından 2000'lere kadar teknolojiye gelişmelerle beraber yapılan araştırmalarla da faj biyolojisinde önemli gelişmeler kaydedilmiştir.

2006 yılında Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (USDA), gıdalardaki *L. monocytogenes*'i kontrol etmek için kırmızı et ve kümes hayvanları ürünleri gibi yemeye hazır gıdalarda LMP-

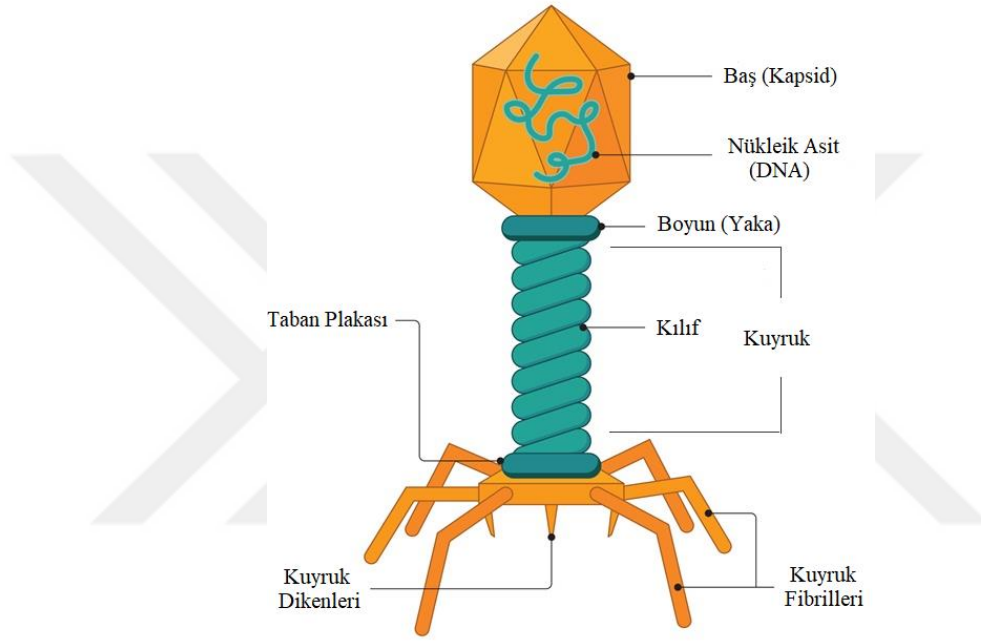
102'nin ve tüm gıda ürünlerinde Listex P100'ün kullanımını onaylamıştır (Akhtar vd., 2017; Lang, 2006). *Listeria* fajlarının gıdalarda kullanımının hükümet kurumları tarafından onaylanması, diğer patojen bakterilerle mücadelede yeni faj preparatlarının üretilmesi ve kullanılmasının da önünü açmıştır. Bununla birlikte, 21. yüzyılda, antibiyotiklerin aşırı ve yanlış kullanımı, antibiyotiklere karşı dirençli patojen bakteri suşlarının artmasına neden olmuştur ve bu durum halk sağlığı açısından endişe kaynağı haline gelmiştir. Bunun üzerine bilim dünyası, gereksiz antibiyotik kullanımını azaltmanın yanı sıra alternatif teknikler üzerinde çalışmaktadır. Gıda endüstrisinde özellikle fermente gıdalarda, sahip oldukları doğal mikroflora nedeni ile antibiyotik kullanımı kısıtlanmaktadır. Bu sebepler tıp, veteriner hekimlik ve gıda endüstrisinde fajlardan ilham alan antibakteriyel yaklaşımların canlanmasını teşvik etmiştir (Fernández vd., 2019).

2.2.2 Bakteriyofajların yapısal özellikleri

Fajların büyüklüğü genellikle 24 ile 200 nm arasında değişmektedir. En büyük faj T4 fajı olup yaklaşık 200 nm uzunluğunda ve 80-100 nm genişliğindedir. Tüm fajlar boyut ve şekil bakımından farklılık gösterebilen bir baş (kapsid) yapısı içerir. Fajların birçoğunun baş yapısına bağlı kuyrukları vardır. T4 gibi kompleks fajların kuyruğu kasılma yeteneğine sahip bir kılıfla (kontraktil kuyruk) çevrilidir. Ayrıca bu fajlarda, kuyruğun sonunda bir taban plakası ve buna bağlı bir veya daha fazla kuyruk fibrilleri ve kuyruk dikenleri bulunur (Mayer, 2016). Kompleks bir fajın yapısı Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

Baş yapısı fajların bazılarında ikosahedral bazılarında ise filamentli şekildedir ve yaklaşık 80×110 nm boyutlarındadır. Baş, kapsomer adı verilen çok sayıda aynı veya farklı protein molekülünden oluşmaktadır. Baş yapısının içinde fajın nükleik asidi bulunur. Baş, nükleik asit için koruyucu görevi yapar. Nükleik asit ve kapsitten oluşan yapıya nükleokapsit adı verilir. Faj türüne bağlı olarak nükleik asit ya DNA ya da RNA'dır, her ikisi birden bulunamaz. Nükleik asit çoğunlukla tek veya çift sarmallı DNA'dır. DNA dizilerinin uzunlukları 18-400 kb arasında değişmektedir (Orlova, 2012; Sharma vd., 2016). Boyun kısmı, baş ve kuyruk yapılarını birbirine bağlar. Kuyruk, bazı faj tiplerinde bulunmazken bazılarında basit veya kompleks yapıda bulunabilir. Yaklaşık 25×110 nm boyutlarındadır. Kuyruk hem bir sinyal verici hem de enfeksiyon

sırasında DNA'nın konakçı hücreye iletiildiği bir boru hattı görevi görür. Kompleks fajlarda kuyruk yapısı, fajın bakteriye tutunması sonrasında kılıfın kasılma hareketleri ile genetik materyalin bakteri hücresine aktarılmasını sağlar (Orlova, 2012; Sharma vd., 2016). Kompleks fajların kuyruğunun alt kısmında yer alan taban plakası ve kuyruk lifleri fajın bakteri hücresine bağlanmasında rol oynar. Bütün fajların taban plakaları ve kuyruk lifleri yoktur. Bu durumlarda faj partikülünün bakteriye bağlanmasında başka yapılar da rol oynar (Leiman vd., 2003; Mayer, 2016).



Şekil 2.1. Bakteriyofajın yapısı (Humagain, 2024)

2.2.3 Bakteriyofajların sınıflandırılması

Dünyada milyarlarca faj olduğu düşünüldüğünde, faj araştırmaları için sınıflandırma kaçınılmaz olmaktadır. Fajlar, nükleik asit tipi, nükleik asidin tek veya çift sarmallı olması ve morfolojik özellikleri yönünden sınıflandırılmaktadır. Bunlardan en önemlileri Bradley ve Ackerman sınıflandırmalarıdır.

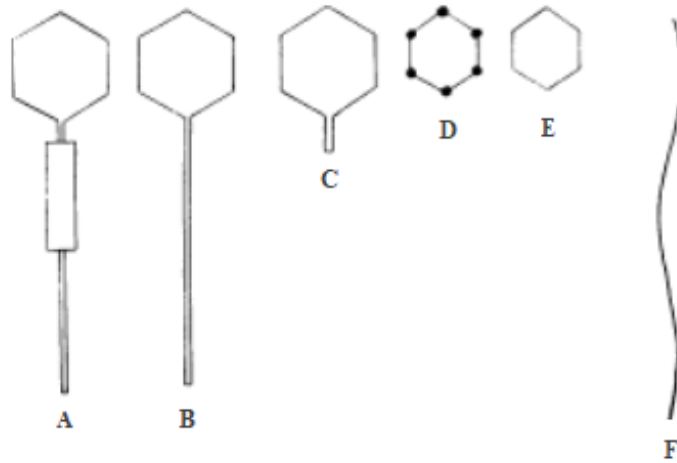
Uzun yıllar elektron mikroskobu görüntülerinde kaydedilen gelişmelerle beraber fajların sistematik olarak ilk sınıflandırılması 1967 yılında Bradley tarafından yapılmıştır. Bu sınıflandırma, 1966 yılında kurulan Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV) tarafından onaylanmış ve toplam 111 faj listelenmiştir (Sharma vd., 2016). Bradley sınıflandırmasında fajlar, morfolojik özellikleri (baş ve kuyruk özellikleri) ve nükleik

asit tipine göre 6 gruba ayrılmıştır. Faj grupları A, B, C, D, E ve F tipi fajlar olarak adlandırılmış olup en karmaşık yapıda olanı A tipi fajlardır (Bradley, 1967; Soykut ve Tunail, 2009). Bu faj grupları ve özellikleri Çizelge 2.1’de, morfolojileri ise Şekil 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Bradley sınıflandırması (Bradley, 1967)

Tip	Nükleik Asit	Örnek	Özellikler
A	DNA, ds, L	T2, T4, T6	Polihedral baş, uzun kuyruk, kontraktıl kılıf
B	DNA, ds, L	T1, T5, λ	Polihedral baş, kontraktıl kılıfı olmayan uzun kuyruk
C	DNA, ds, L	T3, T7, P22	Polihedral baş, kontraktıl kılıfı olmayan kısa kuyruk
D	DNA, ss, C	Φ X174, S13	İkosahedral baş, kapsid üzerinde çok büyük kapsomere sahip, kuyuksuz
E	RNA, ss, L	F2R17, Fr, MS2	İkosahedral baş, kapsid üzerinde çok küçük kapsomere sahip, kuyuksuz
F	RNA, ss, L	FE, fd, M13	Başsız, ipliksi ya da filamentöz

ds: çift sarmal, C: sirküler, ss: tek sarmal, L: lineer

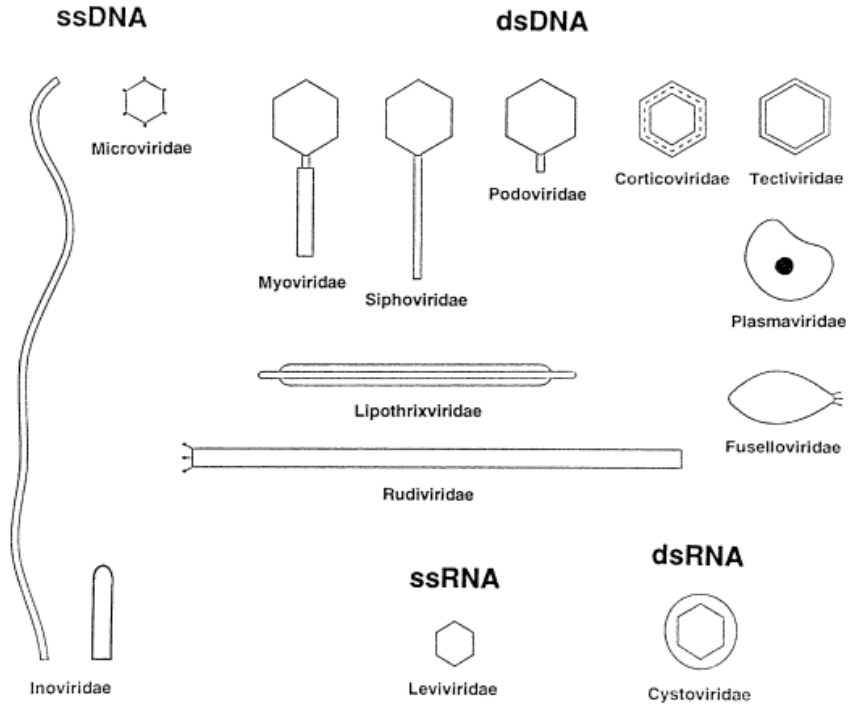


Şekil 2.2. Bradley sınıflandırmasına göre faj morfolojileri (Bradley, 1967)

1971 yılında ICTV, Bradley’in sınıflandırmasına göre fajları T4, λ , PM2, Φ X174, MS2 ve fd fajları ile temsil edilen 6 gruba ayırmıştır (Ackermann, 2003; Wildy, 1971).

Bradley tarafından ortaya konulan bu sınıflandırma, mevcut sınıflandırma yapısının temelini oluşturmaktadır. Ancak zamanla yeni faj gruplarının keşfedilmesi ve fajların aile, cins ve tür bazında ayrımının mümkün olmaması sebepleriyle yeni sınıflandırmalara ihtiyaç duyulmuştur. ICTV'nin tasarlamış olduğu "Polythetic Türler Kavramı" sisteminde bir faj türü yine ICTV tarafından belirlenmiş olan özelliklerden tamamını veya bir kısmını taşımasına göre tanımlanabilmektedir. Bu sınıflandırma sisteminde nükleik asidin doğası, partikül yapısı, DNA-DNA hibridizasyonu, nükleotit veya aminoasit sekansları gibi parametreler kullanılabilmektedir (Soykut ve Tunail, 2009).

Fajların en güncel sınıflandırması Ackermann sınıflandırmasıdır. Bu sınıflandırma modelinde fajların morfolojik özellikleri ve nükleik asit yapıları temel alınmıştır. Şu anki sistem aileye kadar tanımlama yapılabilmeye olanak tanımaktadır ancak tür bazında sınıflandırma yapılamamaktadır. Ackermann sınıflandırmasına göre 1 takımda 13 farklı faj ailesi ve 31 cins bulunmaktadır ve bu fajlar kuyruklu, polihedral, filamentöz ve pleomorfik olmak üzere dört yapısal gruba ayrılmıştır (Ackermann, 2003). Ackermann sınıflandırmasına göre, 13 faj ailesinin morfotipleri ve fajlara dair bilgiler sırasıyla Şekil 2.3'te ve Çizelge 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.3. Ackermann sınıflandırmasına göre fajların morfotipleri (Ackermann, 2003)

Çizelge 2.2. Ackermann sınıflandırması (Ackermann, 2003)

Morfoloji	Nükleik Asit	Takım ve Familya	Cins	Örnek	Özellikleri
Kuyruklu	DNA, ds, L	<i>Caudovirales</i>	15		
		<i>Myoviridae</i>	6	T4	Kontraktıl kuyruk
		<i>Siphoviridae</i>	6	λ	Kontraktıl olmayan uzun kuyruk
		<i>Podoviridae</i>	3	T7	Kısa kuyruk
Polihedral	DNA, ss, C	<i>Microviridae</i>	4	ϕ X174	
	ds, C, T	<i>Corticoviridae</i>	1	PM2	Lipit içeren kompleks kapsid
	ds, L	<i>Tectiviridae</i>	1	PRD1	İçsel lipoprotein kese
	RNA, ss, L	<i>Leviviridae</i>	2	MS2	
	ds, L, S	<i>Cystoviridae</i>	1	ϕ 6	Lipit zarf
Filamentöz	DNA, ss, C	<i>Inoviridae</i>	2	fd	Filament veya çubuk
	ds, L	<i>Lipothrixviridae</i>	1	TTV1	Lipit zarf
	ds, L	<i>Rudiviridae</i>	1	SIRV1	TMV benzeri
Pleomorfik	DNA, ds, C, T	<i>Plasmaviridae</i>	1	L2	Lipit zarf, kapsid yok
	ds, C, T	<i>Fuselloviridae</i>	1	SSV1	Limon benzeri, kapsid yok

ds: çift sarmal, C: sirküler, S: parçalı, ss: tek sarmal, L: lineer, T: süper helikal

Virolojide aileler temel olarak nükleik asidin doğasına ve parçacık morfolojisine göre tanımlanır. Cins ve türler için evrensel bir kriter yoktur. Çizelge 2.2’de de belirtildiği gibi, 13 farklı aileye ait fajların çoğu dsDNA içerir, geriye kalan kısmı ise ssDNA, ssRNA veya dsRNA’ya sahiptir. Fajların büyük bir çoğunluğu (yaklaşık %96’sı) kuyruklu yapıya sahiptir ve kuyruklu fajlar içinde *Myoviridae*, *Siphoviridae* ve *Podoviridae* aileleri yer alır. Diğer ailelere ait bazı fajlar, lipit içeren zarflara sahiptir veya parçacık duvarının bir parçası olarak lipitler içermektedirler.

Yıllar içinde çevre, insan, hayvan ve bitki örneklerinden yeni bakteriyel virüslerin izolasyonu ve yüksek verimli dizileme tekniklerinin kullanılması, geniş bir virüs kataloğu ortaya çıkarmıştır. Bu durumda, mevcut sınıflandırma modelleri yetersiz kalmaya başlamıştır (Simmonds ve Aiewsakun, 2018). Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi'nin Bakteriyel Virüsler Alt Komitesi (BVS)'nin 2021-2022 yılları arasında yaptıkları çalışmalarla bakteriyel virüslerin taksonomisinde önemli değişiklikler yapılmıştır. ICTV'nin son sınıflandırma versiyonuna göre, önceki sınıflandırma sistemindeki *Podoviridae*, *Siphoviridae* ve *Myoviridae* aileleri gibi birçok büyük faj

ailesinin yanı sıra *Caudovirales* takımı da kaldırılmıştır. Bu morfolojik temelli ailelerin kaldırılmasının önemli sebeplerinden biri polifiletik olmaları ve ortak evrim geçmişlerini doğru bir şekilde yansıtmadıklarına dair bilimsel görüşlerdir. Birçok faj ailesinin kaldırılması ve yeni fajların keşfedilmeleriyle beraber yeni düzenlemeler yapılmıştır. 1 takım, 22 familya, 30 alt familya, 321 cins ve 862 tür yeni oluşturulmuş veya yeniden sınıflandırılmıştır. *Caudoviricetes* sınıfı altında güncellenen faj ailelerinin üyeleri arasındaki ortalama benzerlik artmış ve aile düzeyinde sınıflandırma daha uygulanabilir bir hale getirilmiştir (Turner vd., 2023; Zhu vd., 2022). Ayrıca türler için iki terimli bir isimlendirme sistemi oluşturulup onaylanmıştır. Bu isimlendirmede tür adı, çoğunlukla örnek virüsün adından oluşmaktadır. Örneğin; T4 fajı yani *Escherichia* virüsü T4 türü, *Tequatrovirus* T4 olarak yeniden adlandırılmıştır (Turner vd., 2023). Güncel sınıflandırma versiyonuna ICTV'nin web sitesinden ulaşılabilir.

2.2.4 Bakteriyofajların hayat döngüleri

Hücre içi paraziti olan virüsler, hücre ve nükleer membranlar gibi yarı geçirgen sınırlara, ribozom ve mitokondri gibi organellere ve biyokimyasal olarak aktif bir metabolizmaya sahip değildir. Bu sebeplerle tek başlarına yaşamak için gerekli olan enerjiyi ve makromolekülleri sentezleyemezler ve konakçı hücreye ihtiyaç duyarlar. Dolayısıyla virüsler konakçı hücre içinde canlı, konakçı hücre dışında cansız özellik gösterirler (de Farias vd., 2019). Virüsler, hücresel yaşam formlarını enfekte ettikten sonra hücre mekanizmasını, viral genomu kopyalamak ve viral kapsidler üretmek üzere kullanırlar (de Farias vd., 2019). Faj çalışmalarının gerek laboratuvarında gerek endüstriyel anlamda verimli bir şekilde yürütülebilmesi için faj ile konakçı hücre arasındaki etkileşimlerin ve hayat döngülerinin iyi bilinmesi gerekmektedir.

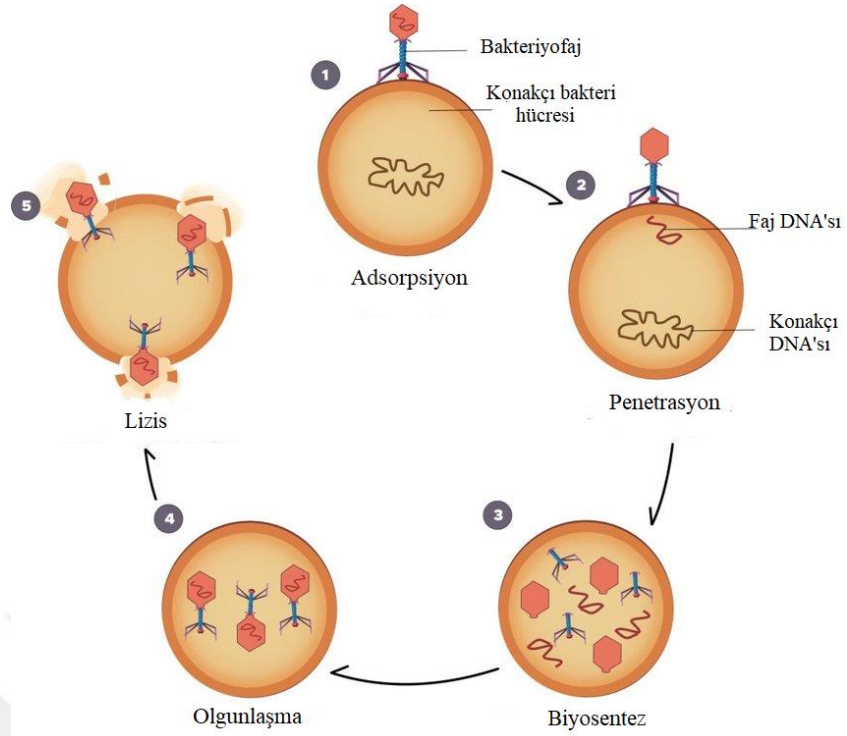
Fajlar konakçı hücreyi enfekte ettiklerinde yani çoğalmak üzere hücreye girdiklerinde yaşamlarını litik veya lizojenik hayat döngüleri ile devam ettirirler. Litik döngü içerisinde olan fajlar litik veya virülant fajlar, lizojenik döngüdeki fajlar ise lizojenik veya ılımlı fajlar olarak adlandırılırlar. Litik fajlara T4 fajı, lizojenik fajlara ise λ fajı örnek verilebilir. Hayat döngüsü nasıl olursa olsun fajların yaşam döngülerinin devamı için temel koşul, bakteri hücresine başarılı bir şekilde nüfuz etmeleridir (Rakhuba vd., 2010). Litik döngünün sonunda konakçı bakteri hücresi parçalanarak öldürülür. Lizojenik döngü bakteriyel konakçı hücreyi öldürmez. Bu döngüde faj DNA'sı, konakçı

hücrenin kromozomuna dahil edilir ve faj, konakçı hücreye zarar vermeden çoğalır. Burada esas çoğalan genetik materyaldir, yeni virüs partikülleri ortaya çıkmaz (Fernández vd., 2019).

Lizojenik döngünün ortaya çıkışı CI, CII ve CIII olmak üzere üç viral proteinin varlığına bağlanmaktadır. CI proteini, faj DNA'sının konakçı bakteriye girişini takiben üretilir. CI, yeni virüs parçacıklarını birleştirmek için gerekli olan çeşitli viral proteinlerin üretilmesini engelleyen baskılayıcı bir proteindir. Bu işlevini, yeni faj parçacıklarının üretimi için gereken bilginin viral genom üzerindeki dizileri işgal ederek okunmasını önleyerek yapar. Viral DNA'nın konakçı DNA'sına entegre olmasıyla CII ve CIII proteinleri üretilir. Bu proteinler ise, viral bileşenlerin sentezini bloke etme görevinde CI'e yardımcı olurlar. CII proteini, konakçının transkripsiyon işlevi ile CI üretiminin devamını sağlarken CIII proteini, CII proteininin konakçının enzimleri tarafından parçalanmasını önlemeye yardımcı olur. CI proteini, DNA'nın belirli bir uzantısına bağlanarak kendi transkripsiyonunun devamını sağlarken DNA'nın başka bir bölgesine bağlanarak CRO proteininin üretilmesini engeller. Lizojenik veya litik hayat döngülerinin ortaya çıkışı, OR operatörü adı verilen bir DNA parçasına bağlanan CRO ve CI proteinleri arasındaki sayısal üstünlüğe bağlıdır. Bu DNA dizisi, proteinlerin işgal edebileceği üç bölgeye sahiptir. Hangi bölgelerin hangi protein tarafından işgal edildiğine bağlı olarak ya CI ya da CRO proteinlerinin üretimi teşvik edilir. CI proteinin üretimi fazla olursa lizojenik devam eder. CRO proteini üretimi yapılırsa litik döngü başlar. Litik döngü, çevresel stres faktörlerine maruz kalma (örneğin sıcaklık, ultraviyole radyasyon, vb.) gibi konakçı bakteriye zarar veren olaylarla da tetiklenebilir (Kutter ve Sulakvelidze, 2004; Lerner ve Wilmoth Lerner, 2003).

2.2.4.1 Litik hayat döngüsü

Litik hayat döngüsü adsorpsiyon, penetrasyon, biyosentez, olgunlaşma ve lizis olmak üzere beş aşamadan oluşmaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Litik hayat döngüsü

Adsorpsiyon: Enfeksiyon sürecindeki ilk adım, fajın bakteri hücresine tutunmasıdır. Birçok bakteriye logaritmik fazda, bazı bakterilere ise durgun fazda daha iyi ve daha fazla sayıda faj adsorbe edilebilmektedir. Kuyruklu fajlar, kuyruklarındaki fibriller, kuyruk dikenleri ve kuyruk tabanı yapıları ile bakteri hücresine adsorbe olurlar. Bu bağlanmada önce fibriller daha sonra dikenler ve kuyruk tabanı bakteriye tutunur. Kuyruksuz veya iplikli fajlar ise yüzeylerindeki reseptörlerle bakteri hücresine adsorbe olurlar. Fajların bağlandığı bakteri hücresinin yüzeyinde bulunan reseptörler; proteinler (pilus, flagella, dış membran proteinleri), glikolipitler (yüzey antijenleri: O ve Vi antijenleri), teikoik asit, lipoprotein, lipopolisakkarit molekülleri olarak sıralanabilir (Mayer, 2016). Gram negatif bakterilerin Gram pozitif bakterilerden farklı olarak sahip olduğu lipopolisakkarit tabakası ve bu tabakaya gömülü proteinler faj tutunmasında önemli reseptörlerdir. Teikoik asit ise Gram pozitif bakterilere özgü reseptörlerdir. Fajın bakteri hücresi ile etkileşimindeki özgüllük, bakteri hücre yüzeyindeki reseptörlerin doğasına ve yapısal özelliklerine bağlı olarak adsorpsiyonun özgüllüğü ile belirlenir (Rakhuba vd., 2010; Sharma vd., 2016).

Adsorpsiyonun ilk basamağında, bakteri hücresi ile faj arasındaki tutunma geri dönüşümlüdür. Ancak adsorpsiyon aşamasının sonunda bu bağlanma güçlenerek geri

dönüşümsüz hale gelir. Özellikle taban plakası, fajın bir bakteriye geri döndürülemez şekilde bağlanmasını sağlar (Mayer, 2016; Orlova, 2012). Adsorpsiyon hızı, faj-konakçı çiftine özgü bir özelliktir ve faj/konakçının konsantrasyonuna bağlı olarak değişebilir. Fajlar hareketten sorumlu yapılara sahip olmadıkları için bakteri hücreleri ile etkileşimleri rastgele çarpışmalar ile oluşmaktadır. Bu nedenle, fajların ve bakteri hücrelerinin konsantrasyonu arttıkça rastgele çarpışmaların sayısındaki artma eğilimi ile daha yüksek adsorpsiyon oranı ortaya çıkmaktadır. Ayrıca pH, sıcaklık, ortamdaki belirli madde ve iyonların varlığı gibi faktörler de adsorpsiyon hızını etkilemektedir. Ortamda Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarının varlığının, birçok fajın bakteri hücresine tutunmasını kolaylaştırdığı bildirilmiştir. Bu iyonlar, adsorpsiyon sırasında fajın kuyruk iplikçiklerinin açılmasına ve hücre çeperine tutunmasına yardımcı olurlar (Rakhuba vd., 2010; Sillankorva vd., 2004).

Penetrasyon: Penetrasyon aşaması, faj nükleik asidinin bakteri hücresi içine gönderildiği aşamadır. Virionlar konakçı hücrenin kapsül, mukoz madde ve peptidoglikan gibi tabakalarını delmek için gerekli olan enzimatik aktiviteye sahiptirler. Lipopolisakkarite tutunan virionlar genellikle adsorpsiyondan sonra bu polisakkaritleri parçalarlar. Faj gruplarına göre farklı penetrasyon mekanizmaları görülebilmektedir. Kasılabilir kılıflı kuyruklu fajlarda, kuyruğun şırınga benzeri bir hareketi ile genetik materyal bakteri hücresine aktarılır. Kılıf kasılarak kuyruk kısmının hücre duvarına girmesini sağlar. Kapsit içindeki genetik materyal kuyruk içindeki kanaldan geçerek bakteri sitoplazmasına aktarılır. Kapsit ve kuyruk dışarıda kalır, içeri giremez. Kuyruğu olmayan fajlar ise küçük diş benzeri yapıları ile hücre zarının bir kısmını enzimatik olarak parçaladıktan sonra nükleik asidini bakteri hücresi içine kapsit kısmı dışarıda kalacak şekilde gönderir (Roos vd., 2007; Sharma vd., 2016).

Biyosentez ve Olgunlaşma: Fajların konakçı hücre içinde çoğaldığı dönemdir. Biyosentez aşamasında fajın yapıtaşları sentezlenmektedir. Öncelikle faj genomu (DNA veya RNA) kopyalanır. Faj, kendi genetik materyalinin birden fazla kopyasını oluşturmak için bakteriyel metabolik mekanizmayı kullanır. DNA virüsleri kendilerini doğrudan mRNA (haberci RNA) moleküllerine kopyalar ve bunlar daha sonra konakçı hücrenin ribozomlarını yönlendirmek için kullanılır. RNA virüslerinde ise ters transkriptaz enzimi viral RNA'yı DNA'ya kopyalar ve daha sonra viral RNA'nın transkripsiyonu için DNA virüslerindeki mekanizma izlenir. Ardından, fajı oluşturan

yapısal proteinler ve bakteri hücresinin lizisi için gerekli olan proteinler ayrı ayrı sentezlenir. Sentezlenen yapısal proteinler, fajların kapsidini ve kuyruğunu oluşturmak üzere bir araya getirilir. Dolayısıyla baş, kuyruk ve diğer faj yapıları oluşur (Sharma vd., 2016). Olgunlaşma aşamasında ise sentezlenen faj bileşenleri birleşerek olgun faj partiküllerini meydana getirir. Öncelikle nükleik asit baş içinde paketlenir. Daha sonra baş yapısına kuyruk eklenir (Mayer, 2016; Sharma vd., 2016). Fajların genetik materyallerinin bakteri sitoplazmasına girmesinden olgun fajların oluşumuna kadar süren bu dönem latent dönem veya tutulma dönemi olarak da adlandırılır.

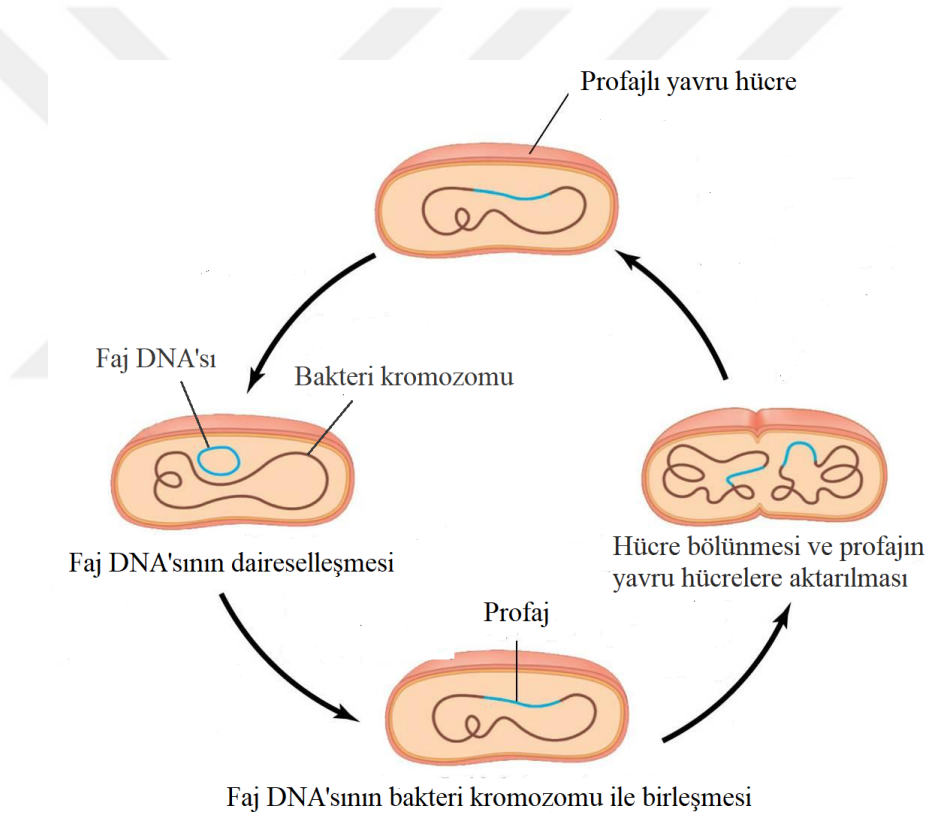
Lizis: Lizis aşaması için iki mekanizma öne sürülmektedir: birinci mekanizma, hücre basınçtan patlayana kadar yeni fajların ortaya çıkması, daha karmaşık olan ikinci mekanizma ise iki ana proteinin rolü ile lizis olayıdır. Özellikle çift sarmallı DNA fajlarında bu iki mekanizmanın beraber çalışmasıyla da bakteri ölümü gerçekleşmektedir (Kutter ve Sulakvelidze, 2004). Bakteri hücresi içinde çoğalıp olgunlaşan fajlar, belirli bir sayıya ulaştıktan sonra kendi enzim ve proteinlerini kullanarak bakteri hücrelerini parçalar. Lizis olayında holin proteinleri ve endolizin enzimi rol oynar. Holin proteinleri, konakçının hücre membranında gözenekler açarak endolizinin bakteri hücre duvarının bileşeni olan peptidoglikan tabakasına ulaşmasını sağlar. Hidrolitik bir enzim olan endolizin, peptidoglikan tabakasındaki bağları kopararak hücre duvarı bütünlüğünü bozar. Sitoplazma ve onu çevreleyen ortam arasındaki osmotik basınç farkı nedeniyle bakteri hücresi parçalanır. Lize olan (parçalanan) konakçı hücreden salınan faj partikülleri, yeni bakteri hücrelerini enfekte etmeye devam eder (Hanlon, 2007; Sharma vd., 2016). Küçük ve tek sarmallı DNA ve RNA fajları, kendi endolizinlerini veya holinlerini kodlamaz ve lizis zamanlamasını tam olarak kontrol edemezler. Ancak peptidoglikan tabakasının bütünlüğünü bozmak için konakçı enzimleri ile birlikte çeşitli küçük "protein antibiyotiklerini" geliştirmişlerdir (Kutter ve Sulakvelidze, 2004).

Litik hayat döngüsü sonunda meydana gelen bakteri hücresinin içerden lizisi, fajların antibakteriyel mekanizmalarından biridir. Antibakteriyel etki “dışardan lizis” olarak ifade edilen mekanizma ile de meydana gelebilir. Özellikle yüksek konsantrasyonlarda faj uygulamalarında, bakteriyel hücre duvarına adsorbe olan çok sayıda faj, hücre duvarı üzerinde etkili olan kuyruklu faj enzimlerinin etkisi ile hücre duvarı hasarına neden

olabilir. Bu durumda, bakteri hücresi içinde faj üretimi olmaksızın bakteriyel hücre lizisi meydana gelebilmektedir (Abedon, 2011; Malik vd., 2017).

2.2.4.2 Lizojenik hayat döngüsü

Lizojenik döngüyü yürüten “lizojenik” veya “ılımlı” fajlar, DNA'larını konakçı hücre DNA'sına entegre eden virüslerdir. Lizojenik hayat döngüsünde, litik döngüde olduğu gibi faj konakçı hücrelerine adsorbe olur ve nükleik asidini bakteri hücrelerine enjekte eder. Penetrasyon sonrasında, viral genetik materyal bakteri kromozomu ile birleşir. Bakteriyel DNA çoğaldığında faj DNA'sı da aynı anda çoğalır ve böylece her yavru hücre viral DNA'yı içerir. Fajların lizojenik hayat döngüsü Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Lizojenik hayat döngüsü

Faj DNA'sının bakteri kromozomu ile bütünleşmesine “lizojeni”, konakçı hücrenin DNA'sına bağlanan faj genetik materyaline de “profaj” denilmektedir. DNA'sı ile bütünleşmiş faj taşıyan bakterilere ise lizojenik bakteri adı verilmektedir. Lizojenik hayat döngüsünde yeni faj partikülleri oluşmamaktadır ve bakterinin canlılığı, çoğalma yeteneği etkilenmemektedir. Lizojenik bakteriler de diğer bakteriler gibi çoğalarak hayati fonksiyonlarını devam ettirirler (Hanlon, 2007; Sharma vd., 2016). Bununla

birlikte, viral genetik materyalin konakçıya dahil olması nedeniyle, enfekte olmuş bakterilerin fenotipinde değişiklik meydana gelmesi, yaygın bir olgudur. Bu dönüşümün bakterilerin patojenitesini etkileyebildiği bildirilmektedir (Brüssow vd., 2004; Keen, 2012). Profaj, kendi genlerinin ve ayrıca yakından ilişkili fajların genlerinin transkripsiyonunu bloke eden bir baskılayıcı proteinin sentezini yönetir. Bu nedenle bir profajın varlığı, bakteri hücrelerine diğer fajların neden olduğu enfeksiyonlara karşı bir tür bağışıklık kazandırabilir (Hanlon, 2007).

Stres koşulları altında ılıman faj, litik hayat döngüsüne geçebilir. Bakterinin gelişme koşullarında olumsuz değişimler meydana geldiğinde (inkübasyon sıcaklığının değişimi, besin maddelerinin azalması vb.) veya bakteri DNA'sına zarar veren işlemler olduğunda (radyasyon, antibiyotik uygulaması, vb.) profaj, konakçı bakterinin DNA'sından ayrılabilir. Bu durumlarda, faj DNA'sı bakteri kromozomundan profaj DNA'yı kesecek enzimi kodlayan geni transkrip eder. Böylece lizojenik faj, litik faja dönüşür. Litik döngünün aktivasyonu üzerine faj enfeksiyonu ve konakçı genetik fonksiyonları yeniden programlanır. Bu durumda döngü, viral genomun replikasyonu, yapısal ve fonksiyonel faj proteinlerinin sentezi, üretilen faj parçacıklarının birleştirilmesi ve lizisde rol oynayan proteinlerin faaliyetleri ile bakteri hücresinin parçalanmasıyla sonuçlanır (Hanlon, 2007; Olszak vd., 2017).

2.2.5 Gıda zincirinde bakteriyofaj uygulama alanları

Teknolojinin sürekli gelişmesiyle beraber muhafaza, depolama ve dağıtım imkânları artsa da yiyecek ve içeceklerin gıda kaynaklı patojenlerle bulaşma riski hala problem olmaya devam etmektedir. Gerek *Salmonella* gerek diğer gıda kaynaklı patojenlerle mücadelede geleneksel yöntemler ve yeni teknolojiler kullanılmaktadır. Uzun yıllardır süt başta olmak üzere özellikle sıvı gıdalarda yaygın olarak kullanılan ısıtma işlemleri zararlı mikroorganizma hücreleri çoğunlukla inaktif hale getirilirken yararlı bakterilerin de ortamdaki elimine edilmesine sebep olabildiği bilinmektedir. Bununla birlikte, bazı ısıya dayanıklı mikroorganizmalar canlılığını koruyabilmektedir. Ayrıca ısıtma işlemleri gıdanın bileşimi, fiziko-kimyasal, fonksiyonel ve duyu özellikleri olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Mejares vd., 2022; Mukhopadhyay vd., 2010). Yapılan çalışmalar, yüksek sıcaklık uygulamaları ile sütte, başta protein denatürasyonu olmak üzere lipid oksidasyonu, arzu edilmeyen lezzet, enzimatik olmayan esmerleşme, bazı vitaminlerin

kaybı gibi istenmeyen sonuçların ortaya çıkabileceğini göstermektedir (Mejares vd., 2022; Yang vd., 2012). Süte uygulanan ısı olmayan inaktivasyon yöntemleri de mevcuttur. Bu yöntemler; soğuk plazma (Coutinho vd., 2018), ohmik ısıtma (Cappato vd., 2017), yüksek hidrostatik basınç (Barba vd., 2012; Liu vd., 2020), atımlı elektrik alan (Da Cruz vd., 2010), atımlı ışık (Miller vd., 2012), ultraviyole ışık (Ansari vd., 2019; Krishnamurthy vd., 2007) ve ultrases (Guimarães vd., 2019) olarak sıralanabilir. Liu vd. (2020) tarafında yapılan bir çalışmada, yüksek hidrostatik basınç işleminin (600 MPa, 5 dk) sütlerde toplam bakteri ve *E. coli* sayısının azaltılmasında etkili bulunurken yüksek derece β -laktoglobulin denatürasyonu gözlemlendiği bildirilmiştir. Matak vd. (2007)'nin çalışmasında ise ultraviyole radyasyon ($15.8 \pm 1.6 \text{ mJ/cm}^2$, 18 s) uygulanan sütte duyu özelliklerinde değişim (kötü koku, çiftlik, gübre, keçimsi bir aroma) meydana geldiği rapor edilmiştir.

Mevcut uygulamaların yukarıda belirtildiği gibi birtakım dezavantajlarına ilaveten bazı *Salmonella* serovarlarının çevre koşullarına ve antibiyotiklere direnç kazanması göz önüne alınarak *Salmonella* patojen bakterisi ile mücadelede alternatif çözüm arayışları artmıştır. Bakteriye özgü ve çevre dostu olmaları ile dikkat çeken fajlar ile biyokontrol, bu dezavantajları ortadan kaldırma potansiyeline sahip bir teknik olarak görülmektedir (Moye vd., 2018). Fajlar, keşfedilmesinden bu yana sadece tıp ve veteriner hekimliği alanlarında değil aynı zamanda tarımsal üretimlerde de yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Faj uygulamalarından tüm gıda zincirinde faydalanılabilir. Bu kullanım alanları; tarım ve hayvancılıkta patojen kolonizasyonunun ve enfeksiyonunun azaltılması (faj tedavisi), gıdaların dekontaminasyonu (biyokontrol), yeniden kontaminasyonun önlenmesi ve gıda ürünlerinin raf ömrünün uzatılması (biyokoruma) ile gıdayla temas eden yüzeylerin dezenfeksiyonu ve biyofilm oluşumunu önlemek (biyo-sanitasyon) olarak sıralanabilmektedir (Sillankorva vd., 2012). Gıda güvenliği açısından bakıldığında, litik fajlar mevcut en zararsız antibakteriyel yaklaşımlardan biri olarak görülmektedir.

Gıdalarda biyokoruyucu olarak faj uygulamaları çoğunlukla *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas* spp. patojen bakterileri üzerinde yoğunlaşmıştır (Moye vd., 2018). FDA, *Salmonella*, *E. coli*, *Campylobacter* ve *Listeria* gibi sık görülen bakteriyel gıda kaynaklı patojenlerin üstesinden gelmek için tasarlanmış çeşitli faj bazlı

preparatların gıdalarda kullanımını onaylamıştır. Bu faj preparatları Koşer ve Helal sertifikalarına da sahiptir (Cooper, 2016; Moye vd., 2018). Onaylanan belli başlı faj ürünleri Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Gıda güvenliği uygulamaları için kullanımı onaylanan çeşitli faj ürünleri

Üretici Firma	Faj Ürünü	Hedef Mikroorganizma
FINK TEC GmbH (Hamm, Almanya)	Secure Shield E1	<i>E. coli</i>
	Ecolicide® (EcolicidePX™)	<i>E. coli</i> O157:H7
	EcoShield™	<i>E. coli</i> O157:H7
Intralytix, Inc. (Baltimore, MD, ABD)	ListShield™	<i>L. monocytogenes</i>
	SalmoFresh™	<i>Salmonella</i> spp.
	ShigaShield™ (ShigActive™)	<i>Shigella</i> spp.
Microos Food Safety (Wageningen, Hollanda)	PhageGuard Listex™	<i>L. monocytogenes</i>
	PhageGuard S™	<i>Salmonella</i> spp.
Passport Food Safety Solutions (West Des Moines, IA, ABD)	Finalyse®	<i>E. coli</i> O157:H7
Phagelux (Shanghai, Çin)	AgriPhage™	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato
	SalmoPro®	<i>Salmonella</i> spp.

Hem bitkisel hem de hayvansal kökenli gıdaların hasat öncesi üretim aşamaları sırasında faj ile biyokoruma stratejileri, bitki, hayvan ve insan patojenlerinin kontrolüne yöneliktir. Gıda üretim sürecinin ilk aşamalarında fajlar, gıdaların verimini ve kalitesini artırmak ve hayvansal kökenli gıdalar söz konusu olduğunda insan patojenlerinin çevreye yayılmasını kontrol etmek için kullanılabilir (Greer, 2005). Hayvanlarda faj tedavisinin uygulanması ile hastalık yükü ve enfeksiyon nedeniyle hayvan ölümlerinin azalmasını sağlamak mümkündür. Böylece, hem süt ve et üretimindeki kesintiler hem de bakteriyel hastalıklardan kaynaklanan kayıplar nedeniyle çiftçiler üzerindeki ekonomik yük azalacaktır. Fajların hayvan vücutlarına etkili bir şekilde verilmesi önemli bir konudur. Fajın ihtiyaç duyulan bölgeye ulaştırılması, taşıma ve dağıtım sırasında canlı kalması ve konakçı bakteri popülasyonunu etkilemek için yeterli

sayıda mevcut olması gerekmektedir. Bir faj kültürünün canlı bir hayvana verilebileceği bir dizi metodolojik yol vardır: ağızdan dağıtım, intragastrik, deri yoluyla, kas yoluyla, kan veya damar yoluyla. En yaygın yol, yiyecek veya suyun canlı fajlarla dozlandırıldığı ağızdan dağıtımdır (Cooper, 2016). Canlı hayvanlarda çeşitli patojenik bakterilerin inhibisyonu için fajların kullanıldığı deneysel çalışmalar devam etmektedir. Yapılan çalışmalara göre, fajlar patojen mikroorganizma hücre sayısını azaltmada etkili olmakta ve bulaşıcı hastalıklara karşı terapötik ajan olarak iyi bir etkinlik göstermektedir (Ahmadi vd., 2016; Basdew ve Laing, 2015; Kim vd., 2014; Seo vd., 2018).

Fajlar, gıdalarda hasat sonrası aşamalarda biyokontrol ajanı olarak, gerek depolama sırasında bozulmaya neden olan bakterileri gerek insan patojenlerini kontrol etmek için süt ve ürünleri, kümes hayvanları eti, kırmızı et, meyve ve sebzeler ile yemeye hazır gıdalara uygulanabilmektedir (Greer, 2005). Sütün sağılmasından tüketime kadar olan zincir boyunca, sütün toplanması, çeşitli süt ürünlerine işleme ve işleme sonrasında yemeye hazır gıdaların hazırlanması sırasında dekontaminasyon ve/veya yeniden kontaminasyonu önlemek için faj ilavesi yapılabilir. Süt endüstrisinde faj kullanımının, bakteriyel insan patojenlerinin sayısını azaltmada etkili olabildiği gösterilmiştir (Cooper, 2016). Fajların patojen bakterileri inhibe edici etkisinden gıda ambalajlamasında da yararlanılmaktadır. Canlı fajlar gıdaların üzerine yerleştirilen emici pedlere dahil edilerek zamanla substrata geçiş yaparlar. Bu yöntem hem perakendeciler hem de tüketiciler için gıdaları daha uzun süre taze tutmanın yeni bir yolunu sunabilmektedir.

Çeşitli litik fajlar, gıdalara genellikle sıvı formda püskürtme ya da gıdaların faj solüsyonuna daldırılması yöntemleri ile uygulanmaktadır. Fakat bazı durumlarda, hedef patojenler gıda ürünlerinin sadece belli bir yüzeyinde yoğun olarak lokalize olduğundan veya gıda ürünlerinin bütün yüzeylerinde bulunabileceğinden dolayı püskürtme yoluyla faj uygulaması dezavantajlı olmaktadır. Daldırma yönteminde ise kullanılan faj miktarları fazladır. Fajların sıvı formda kullanımları faj titresinde azalmalar, gıda bileşenleri ile istenmeyen etkileşimler, mide asitlik değerlerinde ve sindirim enzimlerinin varlığında etkinliğinin azalması ya da tamamen sonlanması gibi birtakım sınırlamalara yol açabilmektedir. Bu nedenle insanlarda, hayvanlarda ve gıdalarda fajların kullanımı, oral veya lokal uygulama için farklı formülasyonlar gerektirir (Joerger, 2003; Petsong vd., 2019). Fajlar protein ve nükleik asitlerden oluştuğu için

sıvı formda uzun süreli depolama sırasında aktivitelerini kaybetme riski taşırlar. Fajların protein kapsitleri olduğundan, faj formülasyonları diğer protein bazlı formülasyonlarla benzerlik gösterir. Proteinlerin sıvı formları genellikle toz formlarından daha kararsızdır (Sezer ve Boyacı, 2024). Fajlar gıdalara çeşitli yöntemlerle uygulandıklarında bakteri yükünü azaltmak için işlem sonrasında ve depolama koşulları sırasında canlı kalması gerekmektedir. Yapılan çalışmalar, fajların bakteriyel hücrelerin metabolik olarak daha aktif olacağı sıcaklıklarda bakteriyel hücre ölümünü en iyi şekilde etkileyebildiğini bildirmektedir. Faj üremesinin konakçı bakteri hücresinin biyokimyasal süreçlerine bağlı olması da bu görüşleri desteklemektedir. Bununla birlikte 4°C gibi düşük sıcaklıklarda da fajlar bakteri hücrelerinin lizisini sağlayabilmektedir (Cooper, 2016). Bu bilgiler doğrultusunda, fajların gıda endüstrisinde kullanılabilmesi ve uygulamaların başarıya ulaşması için dikkat edilmesi gereken hususlar aşağıda sıralanmıştır (Abedon vd., 2011; Vu vd., 2024):

- i. Fajın yapısında toksinlerin veya antibiyotik direnç genlerinin bulunmaması gerekir.
- ii. Faja dirençli mutantların ortaya çıkmasını engelleme yeteneği bulunmalıdır.
- iii. Hedef patojenin çoklu izolatlarına karşı geniş bir konakçı aralığı olmalıdır.
- iv. Faj enfeksiyonu ve çoğalması metabolik olarak aktif konakçı hücrelerin varlığını gerektirir.
- v. Fajın uygulama sonrasında canlılığını sürdürmesi gerekmektedir. Bu da fajın sıcaklık, asitlik gibi faktörlere karşı stabilitesinin araştırılmasını ve korunmasını gerektirir.
- vi. Bakteriyel hücre sayısının azaltılması için gerekli olan fajın konakçı hücreye oranı kritik öneme sahiptir. Çoğunlukla bakteriden daha yüksek konsantrasyonda faj kullanımı uygun görülmektedir.
- vii. Gıdaların birden fazla kaynaktan gelen çeşitli bakteriyel patojenleri içermeye potansiyeli göz önüne alındığında, faj kokteyllerinin kullanımı daha etkili olacaktır. Faj kokteyli oluşturulmasında uygun fajların seçimi, kritik öneme sahiptir ve konakçı aralıklarının tam olarak araştırılması gerekmektedir.
- viii. Fajların biyokontrol ajanları olarak kullanılmasında, canlı fajların insan besin zincirine girmesi sebebiyle tüketici sağlığına zarar vermemesi gerektiği unutulmamalıdır.

2.2.6 Bakteriyofaj uygulamalarının avantaj ve dezavantajları

Fajlar biyokontrol ajanları olarak çeşitli avantajlar sunar. Bu avantajlar şu şekilde sıralanabilmektedir (Erol ve Kaskatepe, 2024; Loc-Carrillo ve Abedon, 2011; Sillankorva vd., 2012; Śliwka vd., 2019):

- i. Fajlar yüksek özgüllüğe sahiptir. Bakteriyel hücre duvarı reseptörleri tarafından belirlenen konakçının hedeflenmesiyle doğal mikroflora zarar görmez.
- ii. Fajların kendi kendini kopyalama ve kendi kendini sınırlama özellikleri vardır. Yani fajlar, ortamda canlı konakçı olduğu sürece çoğalabilir ve antimikrobiyal etkilerini sürdürebilir. Konakçı yokluğunda ise organizmaların bağışıklık sistemi tarafından ortadan kaldırılır. Fajların bu özelliği otomatik dozlama olarak bilinir.
- iii. Bakteriler hayatta kalmak için faj savunma mekanizmaları geliştirdikçe fajlar değişen konakçı sistemlere uyum sağlayabilirler.
- iv. Yapıları nükleik asit ve proteinlerden oluştukları için toksik değildir.
- v. Fajlar nispeten ucuzdur ve basit bir üretim teknolojisine sahiptir.
- vi. Gıda işleme sırasındaki çevresel streslere ve gıdanın fizikokimyasal özelliklerine karşı genellikle iyi bir stabilite sergilerler.
- vii. Düşük dozlarda kullanıldıklarında bile yüksek etkinlik gösterebilirler.
- viii. Uzun raf ömrüne sahiptirler.

Bu avantajlarla beraber faj uygulamalarında birtakım dezavantajlar veya kısıtlamalar da bulunmaktadır (Malik, 2021; Shahdadi vd., 2024):

- i. Birçok koruma metodunda olduğu gibi faj preparatlarının gıda endüstrisinde kullanılabilmesi için sağlık açısından güvenli olduklarının onaylanması gerekmektedir.
- ii. Konakçıya özgü olmalarından dolayı antibakteriyel spektrumu dar olan fajların aktivitesini artırmak için faj kokteyllerinin oluşturulması gerekir. Uygun kokteyl ve formülasyonların geliştirilmesi için çalışmalara ihtiyaç vardır.
- iii. Fajlar yüksek sıcaklık, asitlik, organik çözücülere maruz kalma, arayüzey etkileri gibi durumlara maruz kaldığında stabilitesini koruyamadıkları için hücre içindeki patojenlerin inhibisyonunu engellemektedir.
- iv. Gıda içerikleri ve diyet, insan bağırsağında faj kompozisyonunu etkileyebilmektedir.

- v. Hayvan ya da insan bağışıklık sisteminin fajları nötralize etmesi durumunda faj terapisinin etkinliği kısıtlanmaktadır.
- vi. Muhafaza sırasında faj aktivite kaybı ve faj uygulama yöntemi de uygulamaların başarısız olmasına neden olabilmektedir.

2.3 Enkapsülasyon

Enkapsülasyon teknolojisi, fajın kullanım alanını genişletmek, uygulama kolaylığı, taşıma ve depolama kolaylığı sağlamak, iyi bir stabilite ile antimikrobiyal etkiyi artırmanın yollarından biri olarak görülmektedir. Enkapsülasyon, çeşitli bileşenlerin uygun bir madde ile tamamen sarıldığı, kaplandığı ve fiziksel bir bariyerle korunduğu teknolojiyi ifade eder. Bu teknoloji, 1950'lerde keşfedilmesinden bu yana kimya, döküm, tıp ve eczacılık gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Gıda endüstrisindeki ilk uygulamalar ise 1970'lerde çeşitli gıda bileşenleri, gıda katkı maddeleri ve probiyotiklere odaklı uygulamalarla karşımıza çıkmaktadır (Calderón-Oliver ve Ponce-Alquicira, 2022). Enkapsülasyon işlemlerinde aktif bileşenlerin çevresel stres faktörlerinden (oksijen, radyasyon, ışık, nem ve ekstrem pH koşulları vb.) korunması ve bileşenlerin matrislerden salınmasının kontrol edilmesi birincil öneme sahiptir. Bununla birlikte hedefler arasında azaltılmış toksisite, azaltılmış maliyet ve bir besin maddesinin artırılmış biyoyararlılığı ile ürün kullanımını iyileştirmek de yer almaktadır. Enkapsülasyon teknolojisinin gıda endüstrisindeki kullanım amaçları aşağıda sıralanmıştır (Calderón-Oliver ve Ponce-Alquicira, 2022; Xu vd., 2024):

- i. Çeşitli bileşenlerin çözünürlük, akışkanlık ve depolama stabilitelerini iyileştirmek.
- ii. Aroma bileşenlerinin buharlaşmasını önlemek ve aroma kaybını azaltmak.
- iii. Gıda katkı maddeleri ve diğer bazı maddelerin toksikolojik etkilerini azaltmak.
- iv. Biyoaktif bileşenleri ve mikroorganizmaları (probiyotikler, fajlar gibi) oksidasyon, ultraviyole ışık, sıcaklık, asitlik ve nem gibi faktörlere karşı koruyarak besin değeri ve özel fonksiyonları muhafaza etmek.
- v. Birbiriyle reaksiyona girebilecek bileşenlerin ayrı ayrı gömülmesini sağlayarak sistem içerisinde stabilitelerini sağlamak. Bu fonksiyon, bileşenlerin birbirini etkilemeksizin düzenli bir şekilde salınmasına, aktivitelerini gereken zamanlarda göstermesine ve böylece gıda ürünlerinin lezzetini ve besleyiciliğini artırmasına olanak tanır.

- vi. Bazı besin maddelerinin hoş olmayan tat veya kokularını maskeleyerek besin değerinden faydalanmak.
- vii. Gıdalardaki mikro besinlerin ve fizyolojik olarak aktif maddelerin etkinliğini koruyarak bunların insan vücudu üzerinde faydalarını sürdürmek.
- viii. Kaplanan bileşenin, önceden tasarlanmış bir çözünme ve serbest bırakma mekanizması ile kontrollü salınımına olanak tanımak.

Enkapsülasyon işlemi, genellikle çekirdek malzemenin duvar malzemesi çözeltisi ile karıştırılması ve bu karışımın kurutulması veya yoğunlaştırılması olmak üzere iki temel adımdan oluşur. Enkapsülasyonda, kapsüllenen maddeye çekirdek malzemesi, aktif madde veya iç faz; kapsülleme için kullanılan maddeye ise duvar malzemesi, kaplama malzemesi veya kabuk adı verilir. Çekirdek malzeme aromalar, pigmentler, vitaminler, amino asitler, yağlar, uçucu katkı maddeleri, enzimler, probiyotikler veya fajlar gibi antimikrobiyal ajanlar olabilir. Duvar malzemesi, çekirdek malzemenin oksijen, sıcaklık, asitlik, nem ve ultraviyole radyasyon gibi çeşitli çevresel faktörlerden korunmasına yardımcı olur. Ürün stabilitesinin artırılmasına ve raf ömrünün uzatılmasına katkıda bulunur. Çekirdek materyallerin çözünürlük, hidrofil ve lipofil gibi fiziksel özelliklerinin geliştirilmesinde rol oynar. Çekirdek malzemenin salınım koşullarını ve hızını kontrol ederek hassas dağıtım sağlar. Aynı zamanda çekirdek malzemeye ilişkili hoş olmayan tat ve kokuları maskeleyerek genel ürün kalitesini artırır (Bu vd., 2021).

Enkapsülasyon teknolojisi ile üretilen parçacıklar genellikle kapsül olarak adlandırılır. Boyutları birkaç nm ile birkaç mm arasında değişmektedir. Parçacık boyutu 1 µm'den küçük olduğunda nanopartiküller, 1 mm'den küçük olduğunda mikropartiküller, 1 mm'den büyük olduğunda ise makropartiküller olarak adlandırılırlar. Kapsüller ideal veya ideale yakın küresel şekle veya düzensiz şekle sahip olabilir (Choińska-Pulit vd., 2015). Kapsüller, morfolojiye göre mononükleer, polinükleer, matris tipi ve çok duvarlı olarak sınıflandırılabilir. Mononükleer kapsüller, tek bir kabukla çevrelenmiş tek bir çekirdekten oluşan en yaygın kapsül türüdür. Ancak bazı durumlarda aktif bileşenin kontrollü salınımı, tek duvarlı malzemelerden daha fazlasını gerektirir. Bu nedenle polinükleer yani çok çekirdekli kapsülleme uygulamaları da mevcuttur. Çok çekirdekli kapsüller, tek bir kabuk içine alınmış birçok aktif bileşene sahiptir. Bu kapsüller, çeşitli enkapsülasyon yöntemlerinin kombinasyonu ile üretilebilir. Çekirdek malzemeleri ilk

önce bir duvar malzemesiyle kaplanır, ardından başka bir genel duvar malzemesiyle kapsülленir. Matris tipi (matris içindeki) kapsüllerde çekirdek malzemesi, kabuk malzemesi içinde homojen bir şekilde dağıtılır. Matris tipi kapsüller, ilaç endüstrisinde ilaç dağıtımı için yaygın olarak kullanılırlar. Gıda endüstrisinde de aromaların enkapsülasyonunda kullanılmaktadır. Çok duvarlı kapsüller ise daha çok kontrollü salınım sağlamak için farklı duvar malzemeleriyle çevrelenmiş tek bir çekirdekten oluşan kapsüllerdir (Bamidele ve Emmambux, 2021; Jegat ve Taverdet, 2000).

Gıda ürünleri için enkapsülasyon teknolojisini kullanırken hem verimi hem de üretim maliyetini dikkate almak önemlidir. Çekirdek malzemeye bağlı olarak, işleme ve üretime uygun, düşük bir maliyetle en yüksek kapsülleme oranına ulaşmak için farklı kapsülleme teknikleri seçilebilir.

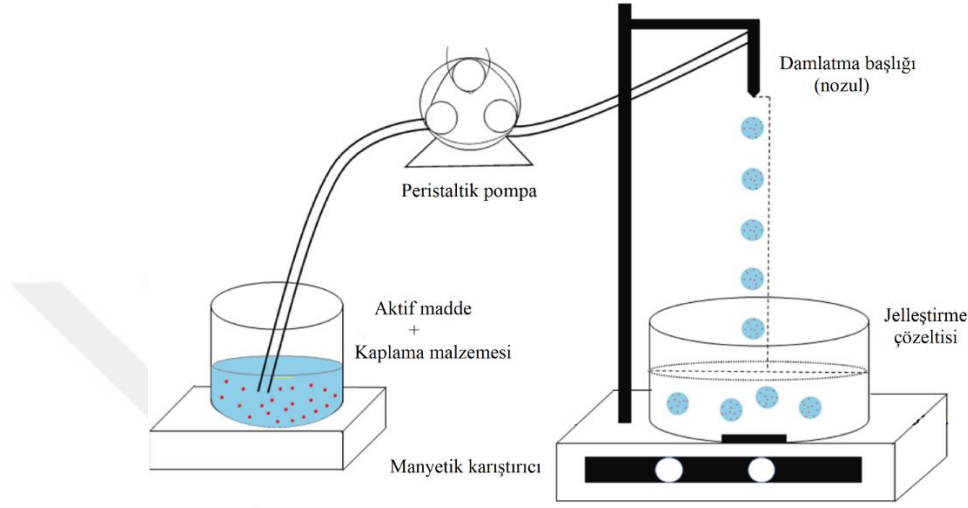
2.3.1 Enkapsülasyon teknikleri

Aktif bileşenin doğasına, kaplama malzemesinin özelliklerine, kullanım amacına ve son ürünün arzu edilen özelliklerine göre değişen çeşitli enkapsülasyon teknikleri geliştirilmiştir. Günümüzde gıda bileşenlerinin enkapsülasyonu için kullanılan birçok yöntem mevcuttur. Bu yöntemler; püskürterek kurutma, püskürterek-soğutarak kurutma, dondurarak kurutma, akışkan yatak, yağ fazı ayırma yöntemi, ekstrüzyon, arayüzey polimerizasyonu, hava süspansiyonu, elektrostatik eğirme, kompozit fazlar emülsiyon yöntemi, moleküler kapsülleme yöntemi, küçük delikli pıhtılaşma yöntemi, lipozom kapsülleme, emülsiyon kapsülleme, karmaşık koaservasyon, nanokapsülleme ve süperkritik çarpan akış teknolojisidir (Xu vd., 2024). Kaplanmak istenen bileşikler genellikle sıvı formda olduğu için tercih edilen çoğu teknik kurutmaya dayanmaktadır. Mikroorganizmaların ve dolayısıyla fajların enkapsülasyonunda en yaygın kullanılan yöntemler arasında püskürterek kurutma ve ekstrüzyon yöntemleri vardır (Choińska-Pulit vd., 2015; Śliwka vd., 2019).

2.3.1.1 Ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyon

Ekstrüzyon yöntemi, mikroorganizmaların kapsülленmesinde yaygın olarak kullanılan fiziko-mekanik bir yöntemdir. Ekstrüzyon teknolojisi, bir malzemenin amaca göre dizayn edilen belirli çaptaki bir başlıktan/delikten belirli bir hızda akmaya zorlanması

olarak tanımlanmaktadır. Yöntem, aktif madde ve hidrokolloid çözelti karışımının bir jelleştirme çözeltisine damlatılması ile uygulanır. Jelleştirme çözeltisi olarak çoğunlukla kalsiyum klorür (CaCl_2) çözeltisi kullanılmaktadır. Damlatma aracı şırınga, titreşimli bir ağızlık, püskürtme ağzı, jet kesici veya püskürtme diski olabilir. Ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyon düzeneğinin şematik gösterimi Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyon (Sultana vd., 2022)

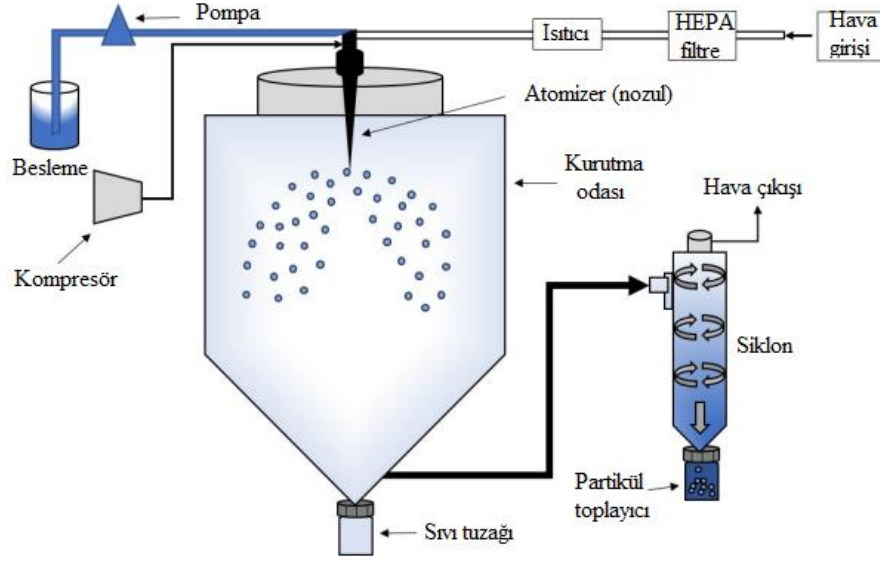
En yaygın ekstrüzyon teknikleri rezonans ve jet kesme ve elektrostatik yöntemlerdir. Ekstrüzyon yöntemiyle elde edilen kapsüller genellikle 0,1-5,0 mm boyutlarında olmaktadır. Elektrostatik ekstrüzyon ile 50 μm 'ye kadar küçük parçacıklar üretilebilir. Bu yöntemle üretilen kapsüller, genellikle yuvarlak formda olmasından dolayı sıklıkla boncuk olarak adlandırılır. Ekstrüzyon yönteminde kuvvetli karıştırma veya yüksek sıcaklık gibi işlem faktörleri olmadığı için hem uygulama kolaylığı sunar hem de mikroorganizmalarda hücresel hasarı en aza indirir (Choińska-Pulit vd., 2015; Nedovic vd., 2011). Yöntem, hücrelerin yüksek canlılığını koruyabilmesinin yanı sıra kolay uygulama, yüksek verim ve düşük maliyet avantajlarını sunar. Ayrıca çevre dostu bir tekniktir. Ekstrüzyonun en önemli dezavantajı ölçek büyütmenin zorluğudur. Üretim ölçeğini büyütme amacıyla ekstrüzyon proseslerinde çoklu nozul, döner diskli atomizer, jet kesici gibi birtakım ilavelerle değişiklikler yapılabilmektedir (Mortazavian vd., 2007).

Ekstrüzyon yöntemi ile enkapsülasyon, faj kapsüllemesinde de kullanılmaktadır. Batalha vd. (2021), farklı hidrokolloidler (aljinat, karragenan, kitosan, peynir altı suyu

proteini) kullanarak ekstrüzyon tekniğiyle UFV-AREG1 fajı yüklü boncuklar üretmiş ve tüm kaplama maddelerinde yaklaşık %99 ile oldukça yüksek bir enkapsülasyon etkinliği elde edilmiştir. Batalha vd. (2021)'nin çalışmasında, enkapsüle edilen fajın stabilitesi ve salınım özellikleri araştırılarak çiftlik hayvanlarında mikrobiyal kontaminasyonu azaltmaya yönelik oral kullanımı değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, enkapsüle UFV-AREG1 fajının simüle edilmiş mide sıvısında hayatta kalma şansını, serbest fajlara kıyasla önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir. Ayrıca simüle edilmiş bağırsak sıvısında kontrollü salınım olanağı (en az %50 salınım) sunmuştur (Batalha vd., 2021). Bir başka çalışmada, manitol ve sodyum aljinat kullanılarak kapsüllenene T4 fajının depolama, yapay mide ve bağırsak sıvılarında sergilediği stabilite verilerine göre fajların ağızdan uygulanması ile patojen bakterilerin bağırsakta kolonizasyonunu azaltmak için kullanma potansiyelini ortaya koymuştur (Śliwka vd., 2019).

2.3.1.2 Püskürterek kurutma yöntemiyle enkapsülasyon

Püskürterek kurutma, gıda sektöründe en eski ve en yaygın kullanılan kapsülleme tekniklerinden biridir. Bu teknik, çekirdek madde ve polimer matrisi içeren bir çözeltinin bir kurutma odasında sıcak hava akımında atomizasyonu ile granüller halinde kurutulması esasına dayanır. Kabuk malzemesi, emülsiyonun su kısmının (çözücü) hızla buharlaşması nedeniyle çekirdek üzerinde katılır. Parçacıklar, kurutucudan çıkan hava akımından ayrılır ve toplama için siklonlar veya torba filtreler kullanılır (Choińska-Pulit vd., 2015). Gıda endüstrisinde kullanılan tipik bir püskürterek kurutma düzeneğinin şematik gösterimi Şekil 2.7'de verilmiştir. Püskürterek kurutma, ölçeklenebilir, sürekli ve nispeten ekonomik bir endüstriyel proses teknolojisidir. Bu teknik ile boyutları genellikle 10-100 µm arasında değişen, çözünürlüğü yüksek tozlar üretilir. Bu özellik son ürünün duyuşal özellikleri açısından arzu edilen bir durumdur. Gıda endüstrisinde çoğunlukla kokuların, yağların ve aromaların kapsüllenmesinde kullanılır.



Şekil 2.7. Şekil Püskürterek kurutma düzeneği (Malik, 2021)

Püskürtmeli kurutucular yaygın olmasına rağmen bu tekniğin, ekipmanın karmaşıklığı, kurutma odasındaki tekdüze olmayan koşullar ve parçacık boyutunu kontrol etmenin her zaman kolay olmaması gibi çeşitli dezavantajları vardır (Choińska-Pulit vd., 2015; Nedovic vd., 2011). Bir başka dezavantaj, suyun buharlaşmasını kolaylaştırmak için gereken yüksek sıcaklıktır. Yüksek sıcaklık ve dehidrasyon, son ürünlerdeki mikroorganizma hücre canlılığını azaltabilir (Malik, 2021). 120°C'nin üzerindeki hava giriş sıcaklığının ve 60°C'nin üzerindeki hava çıkış sıcaklığının, probiyotik bakteri kültürlerinin canlılığını önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir. Fajların da termal strese duyarlı olabildiği bilinmektedir ve kurutma sıcaklıkları faj aktivitesinde kayıplara neden olabilir. Bununla birlikte, fajlar termal stabilite açısından önemli farklılıklar gösterebilir. Genellikle, fajlarla yapılan püskürterek kurutma çalışmalarında, düşük sıcaklıklarda (40-50°C hava çıkış sıcaklıkları) çalışan eş zamanlı kurutucular kullanılmış, bu da üretilen tozlarda daha yüksek faj titreleri elde edilmesine ve kurutmadan hemen sonra genel faj kayıplarının azalmasına neden olmuştur (Choińska-Pulit vd., 2015; Malik, 2021). Daha önce yapılan bir çalışmada, *Pseudomonas* fajı hem püskürterek kurutma (giriş sıcaklığı 60°C, çıkış sıcaklığı 40-45°C) hem de dondurarak kurutma metodu ile toz formuna getirilmiştir. Püskürterek kurutma ile elde edilen ürünün faj titresinde 1,5 log pob/mL'lik önemli bir azalma meydana gelirken; ultrasonik bir başlık kullanarak dondurarak kurutma ile elde edilen ürünün faj aktivitesinde daha fazla kayıp olmuştur. Bununla birlikte, püskürterek kurutma ile stabil bir faj tozu üretildiği, diğer metoda göre tozun daha iyi aerosol performans sergilediği ve enfeksiyon tedavisinde canlı faj

sağlama potansiyelinin diğer metoda göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Leung vd., 2016).

2.3.2 Kaplama maddeleri

Mikroorganizma hücrelerini kapsüllemek için çok sayıda madde kullanılır. Üretilen kapsüllerin özelliklerinin belirlenmesinde önemli bir rol oynayan kaplama maddelerinin seçimi, aktif maddenin özellikleri ve kullanım amacı dikkate alınarak yapılır. Kaplama maddesinin fajı olumsuz çevresel koşullarına karşı koruyabilmesi ve enfeksiyon bölgesine ulaştırabilmesi önemlidir (Malik vd., 2017). Ayrıca seçilecek kaplama maddesinin genellikle güvenli kabul edilmesi (GRAS), biyolojik olarak parçalanabilir olması ve yüksek mikrobiyal yüke izin vermesi gerekir. Fajın enkapsülasyonunda hem doğal hem de sentetik polimer maddeler kullanılabilir. Sentetik polimerler daha yüksek mekanik mukavemet ve daha iyi kimyasal stabilite sunsa da daha hafif işlem süreçleri gerektirmesi ve mikrobiyal hücrelerin canlılığını daha iyi koruması sebepleriyle doğal polimerler daha çok tercih edilir (Rathore vd., 2013; Timilsena vd., 2020). Kullanılan kaplama maddeleri genellikle karbonhidratlar, proteinler, lipitler ve bunların türevleri olan doğal polimerik maddelerdir. Mikroorganizmaların enkapsülasyonunda kullanılan kaplama maddeleri arasında sodyum aljinat, kitosan, jelatin, etilselüloz, karboksimetil selüloz, karragenan, peynir altı suyu proteinleri, pektin, nişasta, selüloz türevleri, keçiyoynuzu zamkı, akasya zamkı, poliesterler, yağ asitleri, mumlar ve polietilen glikol yer almaktadır (Abdelsattar vd., 2019; Choińska-Pulit vd., 2015; Petsong vd., 2019; Timilsena vd., 2020).

Aljinat, mikroorganizmaların kapsüllemesinde en çok tercih edilen kaplama maddelerinden biridir (Batalha vd., 2021; Ma vd., 2012). Uzun yıllardır gıda endüstrisinde kıvam arttırıcı, jelleştirici ve kolloidal stabilizatör olarak da kullanılan aljinat, kahverengi algler (*Phaeophyceae*) ve bazı bakterilerden (*Azotobacter vinelandii* ve *Pseudomonas aeruginosa*) elde edilmektedir. Aljinat, 1,4 bağlı β -D-mannuronik asit ve α -L-glukuronik asit monomerlerinden oluşan anyonik doğrusal bir polisakkarittir. β -D-mannuronik asit ile α -L-glukuronik asit bileşenlerinin oluşturduğu dizi bileşimi, dağılımı ve moleküler ağırlık, aljinatların fiziksel özelliklerini belirler. Aljinat çözeltilerinin viskozitesi esas olarak malzemenin moleküler ağırlığına bağlıdır (Augst vd., 2006). Uygun koşullar altında, sodyum aljinatın yapı birimi olan glukuronik asit

katyonlar ile bir bağ kurarak (iyonik etkileşimler) hidrojel oluşturma yeteneğine sahiptir. Aljinat, jelleştirici olarak kullanılan CaCl_2 ile temas ettiğinde kalsiyum iyonlarının aljinatla çapraz bağlanması, bir aljinat jeli ve özel bir müdahale gerektirmeden ürünü hızlı bir şekilde saran yarı geçirgen bir kalsiyum membranı oluşur (Valdivia-Rivera vd., 2021). Aljinatın sıklıkla kullanılan bir kapsülleme materyali olmasının sebepleri doğal, ucuz ve biyouyumlu olması, toksik olmaması, GRAS olarak kabul edilmesi, birçok enkapsülasyon metoduna uygun olması, farklı kabuk materyalleri ile uyumlu kombinasyonlar meydana getirmesi ve porozitesinin yüksek olması şeklinde sıralanabilir. Ayrıca kaplama materyali olarak mekanik stabiliteye, tuz ve şelatlayıcı ajanlara karşı yüksek toleransa sahiptir (Augst vd., 2006; Gökbulut vd., 2018).

Enkapsülasyon çalışmalarında yaygın olarak tercih edilen bir başka kaplama materyali kitosandır. Kitosan, genellikle mantarlar, istiridyeler, böcekler gibi çeşitli doğal kaynaklarda bulunan kitinin deasetilasyonunu ile üretilen pozitif yüklü bir polisakkarittir. Kitosan, bir N-asetil-D-glukozamine bağlı bir β -1,4-D-glukozamin biriminden oluşan temel bir yapıya sahiptir. Kitinin deasetilasyon derecesi, kitosanın özelliklerini etkiler. Örneğin kitinin deasetilasyon derecesi %50'yi aştığında kitosan sulu asidik koşullarda çözünür hale gelir. Ayrıca, homojen veya heterojen deasetilasyon koşullarının kitosanın mikro yapısı üzerinde önemli bir etkisi vardır. Bu da çözünürlüğünü ve uygulamalarını yani ilaç veya gıda taşıyıcılığını belirler (Calinoiu vd., 2019). Kitosan doğal, alerjen madde içermeyen, güvenli ve sağlık yararları olan biyouyumlu bir polimerdir. Antimikrobiyal aktivitesi ve antioksidan özellikleri de kitosani ilgi çekici kılmaktadır (Sabaghi vd., 2015). Enkapsülasyon proseslerinde genellikle doğal veya yapay polimerlerle karıştırılarak kullanılır. Kitosan, negatif yüklü bir polimer etrafında yarı geçirgen bir zar oluşturabilir ve genellikle jel boncuklarını ya da kapsülleri kaplayarak onların stabilitelerini artırmaya yönelik kullanılır (Abdelsattar vd., 2019; Anal ve Singh, 2007).

2.4 Gıda zincirinde enkapsüle bakteriyofaj uygulamaları

Enkapsülasyonun fajların olumsuz koşullara (gastrointestinal koşullar, gıda işleme, saklama koşulları vb.) karşı korunması ve kontrollü salınımlarının sağlanması amacıyla kullanılan etkili bir yöntem olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Kapsüllenmiş fajların potansiyel uygulamaları, gıdalarda ve farklı çiftlik hayvanlarında patojen

bakterilerin kontrol edilmesi veya ortadan kaldırılması için değerlendirilmiştir. Literatüre bakıldığında, enkapsüle faj çalışmalarının daha çok terapötik ajan olarak kullanımlarda yoğunlaştığı ve gıda uygulamaları ile ilgili çalışmaların kısıtlı olduğu görülmektedir.

2.4.1 Bakteriyofaj terapisi

Dünya çapında ciddi bir halk sağlığı sorunu olan antibiyotik direnci ve çoklu ilaca dirençli patojenik bakterilerin artışı nedeniyle ticari olarak satılan antibiyotikler zamanla daha az etkili hale gelmektedir. Bu durum, hayvanlarda veya insanlarda faj ile tedavi olanaklarının araştırılmasının önünü açmıştır. Faj kapsülleme teknikleri, minimum faj kaybıyla gastrointestinal sistemin zorlu koşullarına karşı faj için koruyucu bir dağıtım modeli sağlamaktadır. Farklı kaplama maddeleri ve farklı tekniklerle kapsüllenen çeşitli patojen bakterilere karşı etkili faj preparatlarının hücre içi ve dışı koşullarda değerlendirildiği bazı çalışmalar Çizelge 2.4'te verilmiştir. Çizelgede rapor edilen çalışmalar incelendiğinde; genellikle kaplama maddesi olarak aljinat ve enkapsülasyon yöntemi olarak ekstrüzyon yönteminin kullanıldığı görülmektedir. Canlı hayvanlarla çalışmanın getirmiş olduğu birtakım kısıtlamalar, araştırmaların çoğunlukla hücre dışında simüle edilmiş ortamlarda yapılmasına neden olsa da son yıllarda hayvanlar üzerindeki çalışmalarda artış mevcuttur.

Faj terapisine yönelik çalışmalarda hedef alınan öncelikli patojen bakteriler; tavuk, domuz, sığır gibi çiftlik hayvanlarında sıklıkla hastalıklara neden olan *Salmonella* ve *E. coli*'nin farklı suşlarıdır. Stanford vd. (2010)'nin çalışmasında, sprey kurutucuda Eudragit S100 ile kaplanan dört *E. coli* fajının pH 3,0'a maruz bırakılmasının ardından fajların geri kazanımı mümkün olurken serbest fajlarda aktivite tamamen kaybedilmiştir. Çalışmada *E. coli* O157:H7'ye karşı litik aktiviteyi değerlendirmek için aşılama yapılan sığırlara aşılama 1 gün önce ve aşılama 1, 3, 6 ve 8. günlerde ya oral yolla faj kapsülü (10^{10} pob) ya da enkapsüle faj karıştırılmış yem (10^{11} pob) verilmiştir. 10 hafta boyunca incelenen dışkı ve deri örneklerinden elde edilen *E. coli* O157:H7 sayılarına göre, faj tedavisi sığırlarda bakteri dökülmesini azaltmamış ancak kapsül olarak verilen sığırlarda dökülme süresini, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 14 gün azaltmıştır. Araştırmacılar faj dağıtım sistemlerinin tam

olarak başarıya ulaşması için faj ekolojisinin daha iyi anlaşılması gerektiğine dikkat çekmişlerdir.

Çizelge 2.4. Faj terapisi uygulamaları

Faj	Kaplama maddesi	Enkapsülasyon yöntemi	Değerlendirildiği ortam/materyal	Kaynak
<i>E. coli</i> fajları	Eudragit S100	Püskürterek kurutma	Besi sığırları	(Stanford vd., 2010)
<i>Salmonella</i> faj kokteyli	Sodyum aljinat	Emülsifikasyon	Domuz (besleme yoluyla)	(Saez vd., 2011)
<i>Staphylococcus aureus</i> fajı	Aljinat, CaCO ₃	Ekstrüzyon	Simüle gastrointestinal sıvı	(Ma vd., 2012)
<i>Salmonella</i> Felix O1 fajı	Aljinat-peynir altı suyu proteini karışımı	Ekstrüzyon	Simüle gastrointestinal sıvı	(Tang vd., 2013)
<i>E. coli</i> O157:H7 fajı	Aljinat, Kitosan	Ekstrüzyon	Simüle gastrointestinal sıvı	(Kim vd., 2015)
<i>Salmonella</i> faj kokteyli	Lipozom	Film hidrasyon yöntemi ve Liyofilizasyon	Etlik piliç	(Colom vd., 2015)
<i>Salmonella</i> faj kokteyli	Aljinat, CaCO ₃	Ekstrüzyon	Ticari piliçler	(Colom vd., 2017)
<i>E. coli</i> ZCEC5 fajı	Aljinat, Kitosan	Ekstrüzyon	Simüle gastrointestinal sıvı	(Abdelsattar vd., 2019)
<i>Salmonella</i> Felix O1 fajı	Eudragit S100	Püskürterek kurutma	Simüle gastrointestinal sıvı	(Vinner vd., 2019)
<i>Salmonella</i> UAB_Phi20 fajı	Lipozom	Film hidrasyon yöntemi	Fare, simüle insan gastrointestinal bağırsak bariyeri	(Otero vd., 2019)
<i>Pseudomonas</i> PEV20 fajı	Laktoz, Lösin	Püskürterek kurutma	İn vitro	(Khanal vd., 2021)
<i>E. coli</i> T3 fajı	Eudragit S100	Ekstrüzyon	Simüle gastrointestinal sıvı	(Richards ve Malik, 2021)
<i>Salmonella</i> S1 fajı	Aljinat	Ekstrüzyon	Tavuk	(Gomez-Garcia vd., 2021)
<i>Salmonella</i> FGS011 fajı	Eudragit L100	Püskürterek kurutma	Tavuk	(Lorenzo-Rebenaque vd., 2022)
<i>Salmonella</i> fajı	Sodyum aljinat, Ksantan gam, Oligosakkaritler	Ekstrüzyon	İn vitro, civciv	(Zhang vd., 2023)
<i>E. coli</i> A221 fajı	Aljinat, Kitosan	Ekstrüzyon	Domuz	(Mao vd., 2023)
<i>Salmonella</i> faj kokteyli	Aljinat, Karragenan, CaCO ₃	Ekstrüzyon	Simüle gastrointestinal sıvı	(Dlamini vd., 2023)

Abdelsattar vd. (2019)'nin çalışmasında, ZCEC5 *E. coli* O157:H7 fajının kontrollü salınımı için ekstrüzyon yöntemiyle stabil bir aljinat-kitosan boncuk dağıtım sistemi geliştirmiştir. Boncukların simüle edilmiş gastrointestinal sıvıda 5 saatlik inkübasyondan sonra tam salınımına yaklaşılarak 7,5 log pob/mL'ye ulaşılmıştır. Simüle edilmiş gastrointestinal sıvıda fajın boncuklardan kümülatif salınımıyla orantılı olarak *E. coli* O157:H7 bakterisinde 10 saat içinde 4,2 ile 4,8 log kob/mL düzeyinde bir azalma meydana gelmiştir. Ayrıca bu çalışmada, kapsüllenen faj örneklerinde özellikle pH 2,0'da asit stresine karşı koruyucu bir etki elde edildiği gösterilmiştir.

Günümüze yaklaştıkça faj terapisine dair yapılan çalışmalarda, fajın canlı hayvan sisteminde etkinliğini daha iyi açıklayabilmek için farklı tekniklerden yararlanıldığı da görülmektedir. Otero vd. (2019), lipozomla kapsüllenen florokrom etiketli *Salmonella* fajlarını (UAB_Phi20) farelere 10^{13} pob/kg'lık dozla oral yolla uyguladıktan sonra görüntüleme yoluyla biyodağılımı incelemişlerdir. Kapsüllenen fajlar, midede uzun süre kalıcılığını korumuştur. Bağırsakta ise kapsüllenmiş faj tespit edilememiştir. Kapsüllenen fajlar büyük oranda bağırsak bariyerine yapışmışlardır. Bağırsak bariyerini geçebilen kapsüllenmiş fajlar dalağa (%68), karaciğere (%38), kaslara (%47) ve plazmaya (%21) ulaşmıştır. Etiketli fajları içeren boyanan lipozomların hücre zarlarına gömüldükleri, kapsüllenmemiş etiketli fajların ise zarı geçebildikleri ortaya konmuştur. Araştırmacılar, midede kapsüllenmiş faj kapasitesinin yüksek olmasının, fajların bağırsakta yavaş iletimini ve sürekli varlığını mümkün kıldığını ve böylece uzun süreli ve başarılı oral faj tedavisine katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir.

E. coli, domuz yavrularında sıklıkla ishale neden olan yaygın bir patojendir. Yavru domuzlarda *E. coli* enfeksiyonunun tedavisinde kullanılmak üzere ekstrüzyon yöntemiyle aljinat ile kapsüllenen ve ardından kitosan ile kaplanan faj preparatının (faj A221) terapötik etkisi incelenmiştir (Mao vd., 2023). Oral faj tedavisi uygulanan enfekte domuzlarda kilo artışı olurken (günde ortalama 0,160 kg) faj tedavisi uygulanmayanlarda kilo kaybı (günde ortalama 0,05 kg) yaşanmıştır. Bu veriler, mikrokapsüllenmiş faj A221 ile oral tedavinin *E. coli*'nin neden olduğu ishalin etkilerini hafiflettiğini göstermiştir. Bununla birlikte, oral mikrokapsüllenmiş faj A221 tedavisi altında jejunal lenf düğümleri, çekum ve dalaktaki bakteri yükü, enfekte grupla karşılaştırıldığında önemli ölçüde azalmıştır. Benzer şekilde A221 grubunun bağırsak florasındaki *Enterobacteriaceae* oranı, enfekte grubunkinden önemli ölçüde daha düşük

bulunmuştur. Ayrıca, A221 fajının tedavisi altında domuz yavrularının bağırsak florasındaki faydalı bakterilerin enfekte gruptakilerin aksine önemli ölçüde korunması, faj terapisi uygulamalarını avantajlı kılmaktadır.

2.4.2 Gıdalarda biyokoruyucu olarak kullanım

Enkapsülasyon teknolojisi, gıda endüstrisinde biyokoruyucu ajan olarak önemli bir potansiyele sahip olan fajları çevresel faktörlere karşı korumak, kontrollü ve sürekli salınımı sağlamak konusunda değerli bir çözüm sunar. Gıdalara çeşitli yollarla bulaşan ve gıda ile tüketildiğinde hastalıklara yol açan *Salmonella* spp., *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Shigella* spp., ve *Pseudomonas* spp. gibi patojen bakterilerle mücadelede faj kullanımının etkili olduğunu gösteren çok sayıda çalışma olmasına karşın kapsüllenen fajın biyokoruyucu olarak kullanımının araştırıldığı kısıtlı sayıda çalışma vardır. Gıdalarda patojen bakterilerin inhibisyonu ve raf ömrünün uzatılması amaçlarıyla aktif ambalaj sistemleri de kullanılmaktadır. Bu kapsamda, yenilebilir filmleri konakçıya özgü fajlarla birleştirerek patojene özgü antimikrobiyal yenilebilir filmler geliştirme üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Film uygulamaları ve çeşitli tekniklerle kapsüllenen fajların model gıdalarda kullanımının değerlendirildiği çalışmalar Çizelge 2.5'te verilmiştir.

Toz formunda mikrokapsüllenmiş faj kokteylinin *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium*'u kontrol etmek için etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada, model gıda olarak çiğ tavuk eti ve ayçiçeği filizi kullanılmıştır (Petsong vd., 2019). Bu çalışmadan elde edilen bulgular, faj kokteylinin alternatif yeni formunun, *Salmonella*'nın gıda matrisleri üzerinde kontrol edilmesinde geleneksel faj lizatı ile karşılaştırılabilir bir verimlilik sağladığını göstermektedir. Faj içeren tozlar, gıdanın kendine özgü özelliklerini etkilemeden çeşitli gıda ürünlerine uygulanabilme potansiyeline sahip olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca bu form, daha uzun raf ömrü, daha az parçacık ağırlığı gibi avantajlar sağlayıp taşıma, depolama ve kullanım kolaylığı sunmaktadır. Bir başka çalışmada (Sezer ve Boyacı, 2024), kriyoprotektan olarak sükröz ve jelatin karışımı kullanılarak liyofilize edilen *Salmonella* faj kokteylinin etkinliği çiğ tavuk göğüs etinde incelenmiştir. Çalışmada mikrokapsüllenmiş faj kokteyli, *S. Enteritidis* veya *S. Typhimurium* ile aşılanan et yüzeyine serpilerek uygulanmıştır. 4°C'de 6 günlük depolama sonunda bakteri sayısında önemli düşüşler elde edilmiştir ($p < 0,05$). Tavuk eti

numunelerindeki faj titresinin 6 gün boyunca korunduğu da rapor edilmiştir. Bu çalışmada 4 ve 25°C’de 10 ay depolanan faj tozlarının etkinlikleri de tavuk eti üzerinde değerlendirilmiş olup iki uygulamada da kontrol grubuna göre *Salmonella* sayısında anlamlı azalmalar gözlemlenmiştir. Böylece, toz formundaki faj preparatının uzun süre depolama sonrasında da biyokoruyucu olarak kullanım potansiyeli ortaya konmuştur.

Çizelge 2.5. Gıdalarda enkapsüle faj ve film uygulamaları

Faj	Kaplama maddesi/film materyali	Enkapsülasyon yöntemi	Gıda matrisi	Kaynak
<i>E. coli</i> kolifaj T4	Peynir altı suyu proteini	Film üretimi	İn vitro	(Vonasek vd., 2014)
<i>E. coli</i> O157:H7 fajı	Lipozom, Kitosan (film materyali)	İnce film dispersiyon yöntemi ile enkapsülasyon ve Film üretimi	Sığır eti	(Cui vd., 2017)
<i>E. coli</i> vB_EcoMH2W fajı	Kitosan	Film üretimi	Domates	(Amarillas vd., 2018)
<i>Salmonella</i> faj kokteyli	Peynir altı suyu proteini, Trehaloz dihidrat	Dondurarak kurutma	İn vitro, çiğ tavuk eti, ayçiçeği filizi	(Petsong vd., 2019)
<i>P. fluorescens</i> φIBB-PF7A fajı	Sodyum aljinat	Film üretimi	Derisiz tavuk göğsü filetosu	(Alves vd., 2019)
<i>Salmonella</i> φ135 fajı <i>E. coli</i> vB_EcoS-EC4 fajı	Sodyum aljinat	Film üretimi	İn vitro	(Alves vd., 2020)
<i>Salmonella</i> T156 fajı	Tris-HCl, Sodyum aljinat, Kitosan	Ekstrüzyon	Yağsız süt, marul	(Li vd., 2021)
<i>Salmonella</i> faj kokteyli	Peynir altı suyu proteini, Karboksimetil selüloz, Kitosan, Sodyum aljinat	Film üretimi	Çilek	(Sezer vd., 2022)
<i>E. coli</i> kolifaj T4	Maltodekstrin, Trehaloz	Püskürterek kurutma	İn vitro, yağsız süt, sığır eti	(Choi vd., 2023)
<i>Salmonella</i> faj kokteyli	Sükroz-jelatin karışımı	Dondurarak kurutma	Çiğ tavuk göğüs eti	(Sezer ve Boyacı, 2024)

Li vd. (2021) tarafından *Salmonella*'ya özgü T156 fajı karakterize edildikten sonra ekstrüzyon metodu ile kapsüllenerek yağsız süt ve marulda litik aktivitesi incelenmiştir. Üretilen faj içeren aljinat boncukları, koruyucu ajan olarak trehaloz kullanılarak havada kurutulmuştur. *S. Typhimurium* ile aşılanan gıda örneklerine fajlar, mikroküreleri kırıcı çözeltide çözündürülüp sodyum klorür-magnezyum sülfat (SM) tamponunda yeniden süspanse edilerek uygulanmıştır. Süt ve marul örneklerinde enkapsüle fajın etkinliği 4°C ve 25°C'de değerlendirilmiş olup bakteri sayısında önemli düşüşler meydana geldiği rapor edilmiştir. Araştırmacılar, mikrokapsüllenmiş fajın hazırlanma sürecinin optimize edilmesi, parçacık boyutunun iyileştirilmesi ve mikrokapsüllenmiş fajlar için daha iyi bir koruma sağlanmasının antibakteriyel etkiyi artırılabilceğini bildirmişlerdir.

2.5 Optimizasyon

Gerekli kalite özelliklerini korurken, üretim maliyetini ve işlem süresini artırmadan sistem performansını iyileştirmek, gıda işleme ve imalatının temel amacıdır. Optimum işleme koşullarını ve formülasyonu bulmak, başarılı bir ürün için büyük önem taşımaktadır. Optimizasyon, en iyi şekilde kullanmak ya da en uygun hale getirmek anlamlarına gelmektedir. Optimum işleme koşullarını ve en iyi çıktıyı sağlayacak bileşenlerin kombinasyonu optimizasyon işlemi ile tespit edilebilmektedir (Kidane, 2021). Genellikle, bir sistemin çalışmasında veya malın üretiminde bağımlı (kontrol edilemeyen) ve bağımsız (kontrol edilebilen) değişkenler bulunmaktadır. “Bağımsız değişkenler” veya “faktörler” birbirinden bağımsız olarak değiştirilebilen girdi değişkenleridir. “Bağımlı değişkenler” veya “yanıtlar” ise birçok bağımsız değişkenden etkilenen çıktı değişkenleridir. Optimizasyonun gerçekleştirilmesinde bağımsız değişkenler dikkate alınarak, bağımlı değişkenlerde meydana gelen değişimler incelenmektedir (Bezerra vd., 2008; Pereira vd., 2021). Gıda proseslerinde optimizasyon, bir parametredeki değişikliklerin yanıt üzerindeki etkisinin araştırılması ve diğer tüm parametrelerin sabit bir seviyede tutulması (aynı anda tek değişken tekniği) yoluyla gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntemin en büyük sınırlaması, değişkenler arasındaki etkileşimli etkilerin hesaba katılmaması ve faktörlerin yanıt üzerindeki tam etkisinin açıklanmaması veya tüm deney alanı içindeki değişkenlerin davranışına genel bir bakışın bulunmamasıdır. Ayrıca bu yöntem, araştırmayı yürütmek için gereken deneysel çalışma sayısını artırması sebebiyle zaman alıcı ve maliyetlidir (Alasalvar ve Yildirim, 2021; Kidane, 2021). Bu sınırlamaları gidermek için birden

fazla faktörün aynı anda dikkate alındığı deneysel tasarımlar ve yanıt yüzey yöntemi (response surface methodology, RSM) gibi prosedürler uygulanarak optimizasyon çalışmaları yapılmalıdır. Böylece, sınırlı sayıda deneyle daha fazla bilgi elde edilebilir. RSM, ilgilenilen bir yanıtın çeşitli değişkenlerden etkilendiği ve amacın bu yanıtı optimize etmek olduğu süreçleri geliştirmek, iyileştirmek ve optimize etmek için yaygın olarak kullanılan istatistiksel bir tekniktir. Gıda endüstrisinde birçok prosesle birlikte enkapsülasyon çalışmalarında da kullanılan bu metodoloji, bağımsız değişkenlerin tek başına veya bir arada süreçler üzerindeki etkisini tanımlar. Ayrıca, kimyasal veya biyokimyasal süreçleri tanımlayan bir matematiksel model oluşturur (Baş ve Boyacı, 2007). RSM, istatistiksel tahminler yapmak amacıyla bir veri kümesinin davranışını tanımlaması gereken verilere bir polinom modelinin uyması ile yürütülmektedir. RSM'nin ilkeleri; bağımsız değişkenlerin (faktörlerin) taranması, faktör seviyelerinin belirlenmesi, deney tasarımının seçimi, regresyon modelinin seçimi, modelin doğrulanması, modelin grafiksel sunumu ve optimum koşulların belirlenmesi olarak özetlenebilir (Kidane, 2021).

RSM yaklaşımı uygulanmadan önce, çeşitli deneysel değişkenlerin ve bunların etkileşimlerinin hangisinin daha anlamlı etkiler oluşturduğunu belirlemek için deney tasarımlarının kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla iki seviyeli faktöriyel deneme tasarımı, üç seviyeli faktöriyel deneme tasarımı, merkezi kompozit tasarım (central composite design, CCD) ve Box-Behnken gibi deneysel tasarımlar uygulanabilir (Yolmeh ve Jafari, 2017). Tam faktöriyel tasarım, ikinci dereceden fonksiyonların modellenmesinde ve faktör sayısının 2'den büyük olduğu durumlarda deneysel çalışma sayısının artmasından dolayı iyi bir verime sahip değildir. Tasarım değişkenlerinin sayısı artarsa, değişkenler arasında yalnızca birkaç kombinasyonun tahmin edilmesi pahasına tam faktöriyel tasarımın bir kısmı kullanılabilir. Buna kısmi faktöriyel tasarım adı verilir ve genellikle önemli tasarım değişkenlerini taramak için kullanılır. Kısmi iki seviyeli (-1 ve +1) faktöriyel deneysel tasarımlar; verimli, ekonomik ve az sayıda deneysel çalışma ile ana etkiler hakkında çok bilgi sundukları için tercih edilirler ancak etkileşimler hakkında verdikleri bilgi kısıtlıdır. İki faktör arasındaki etkileşimi sunmakla beraber üç faktör arasındaki etkileşim analiz edilememektedir (Alasalvar ve Yildirim, 2021; Yolmeh ve Jafari, 2017).

CCD, kısmi faktöriyel deneme tasarımına merkez nokta (0) ilavesi ile üretilen bir deneme tasarımıdır ve toplamda iki noktadan oluşmaktadır: faktöriyel noktalar ve bir merkezi nokta. Bu tasarımlar, ikinci derece modelin parametrelerini tahmin etmek için yaygın olarak kullanılırlar. Yıldız noktalar çıkarıldığında (-1, 0, +1) yüzey merkezli dizayn (face centered design) olarak adlandırılmaktadır (Değirmencioğlu vd., 2006).

2.5.1 Bakteriyofajların enkapsülasyonunun optimizasyonu

Yüksek kaliteli bir faj ürünü, güvenli ve etkili olmalıdır. Üretim amacına göre, hayvanlarda veya insanlarda vaat edilen terapötik faydayı sağlamalı ya da gıdalarda biyokontrol ajanı olarak patojenleri yüksek oranda inhibe edebilmelidir. Bunun sağlanabilmesi için üretim parametrelerinin ürüne göre tasarlanması önemlidir.

Enkapsüle fajın stabilitesi, kapsülleme işleminin en önemli özelliklerinden biridir. Çeşitli çalışmalar, aktif bileşenin (çekirdeğin) stabilitesinin büyük ölçüde kabuk matrisinin yapısına ve işlevselliğine, işleme koşullarına ve varsa çekirdek-kabuk etkileşimlerine bağlı olduğunu bildirmektedir. Çekirdeğin kapsül içindeki dağılımı da stabilitesini ve salınmasını etkilemektedir. Kapsülleme işleminde kullanılan yöntem ve kaplama malzemesi, kapsül morfolojisinin de belirleyici faktörleridir (Choińska-Pulit vd., 2015; Timilsena vd., 2020).

Ekstrüzyon işleminde hidrokolloid çözeltinin bileşimi, konsantrasyonu ve viskozitesi, sertleştirici çözeltinin konsantrasyonu, biyoaktif madde ile hidrokolloid çözeltinin karışım oranları, damlatma iğnesinin çapı, hidrokolloid çözeltinin akış hızı, serbest düşme mesafesi gibi değişkenlerin dikkate alınması gerekmektedir. Bu faktörler, kapsüllerin enkapsülasyon etkinliği ve morfolojisi üzerinde önemli bir etki göstermektedir (Anal ve Singh, 2007; Krasaekoopt vd., 2003; Shi vd., 2013). Kapsül içindeki fajın yüksek titrede olması ve kapsül boyutları gıda zincirinde enkapsüle faj uygulamalarını yönlendiren unsurlardandır. Bu nedenle enkapsülasyon işlemi, enkapsüle fajın en yüksek oranda korunmasını, kaplama malzemesinden salınımı ve uygun kapsül boyutlarıyla uygulama kolaylığını sağlayacak şekilde optimize edilmelidir.

Literatürde faj enkapsülasyonunun optimizasyonu konusunda sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak son birkaç yıl içerisinde odak noktası optimizasyon olan araştırmaların yapıldığı görülmektedir. Vinner vd. (2019) tarafından, püskürterek kurutma sırasında fajların hayatta kalmasını iyileştirmek ve iyi depolama stabilitesine sahip stabil kuru tozlar üretmek için farklı oranlarda trehaloz ve polimer Eudragit S100 içeren formülasyonlar ve kurutma sıcaklıklarının etkileri araştırılarak süreç optimize edilmiştir. Formülasyona trehaloz eklenmesinin, Felix O1 fajını yüksek sıcaklık ve kurutma stresine karşı korumasıyla daha yüksek faj canlılığı elde edildiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, yüksek oranda trehalozdan oluşan formülasyonlar, pH 2,0'da simüle mide sıvısında zayıf asit stabilitesi göstermiştir. Mikropartikül kabuğundaki polimer oranının artırılması asit korumasını artırmıştır. Püskürtmeli kurutma sırasında faj koruması, asit ve iyi depolama stabilitesi sağlayan kaplama malzemesi formülasyonunun PS21 (%2 m/v polimer, %1 m/v trehaloz) olduğu belirlenmiştir. Bir başka çalışmada, *Salmonella* faj süspansiyonunu dondurarak kurutma yoluyla toz haline dönüştürme işleminde, peynir altı suyu proteini ve trehalozdan oluşan kaplama malzemesi formülasyonunun optimizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla Design-Expert 7 programı kullanılarak iki kaplama malzemesinin 9 ayrı formülasyonundan oluşan deney tasarımları oluşturulmuştur. Bu değişkenlerin faj geri kazanımı yani üretilen tozlar içindeki faj canlılığı üzerine etkileri incelenmiştir. Dondurarak kurutulduktan sonra toz formundaki fajın hayatta kalma oranının en yüksek olduğu optimal formülasyonun 3:1 (v/v) oranında peynir altı suyu proteini/trehaloz kombinasyonu olduğu rapor edilmiştir (Petson vd., 2021). Felix O1 fajının titreşimli ekstrüzyon tekniği ile enkapsülasyonunun optimize edilmesine dair yürütülen çalışmada, yanıtlar (yüksek mikrokapsülleme etkinliği, pH 2,0'a karşı en yüksek direnç ve en küçük kapsül boyutu) ile bağımsız değişkenler (mikrokapsülleyici karışımındaki sodyum aljinat/sodyum kazeinat oranı ve damlatma sırasındaki titreşim frekansı) arasındaki ilişkileri tanımlamak için RSM uygulanmıştır. Box-Behnken deneysel tasarımı ile de faktörlerin etkileşimi ve ikinci dereceden etkileri belirlenmiştir. Çalışmaya göre, en yüksek mikrokapsülleme etkinliği için optimum koşullar 1,61 kHz titreşim frekansı değeri, %1,86 sodyum aljinat içeriği ve %3,26 sodyum kazeinat içeriğidir. pH 2'ye karşı en yüksek direnç için optimum koşullar frekans değeri 4,50 kHz, %2,00 sodyum aljinat içeriği ve %2,69 sodyum kazeinat içeriğidir. Üç yanıtın tümü için ise 4,50 kHz frekans değeri, %1,53 sodyum aljinat içeriği ve %2,72 sodyum kazeinat içeriği optimum koşullar olarak belirlenmiştir (Ergin vd., 2021).

Yukarıdaki bahsedilen çalışmalarda da belirtildiği gibi faj enkapsülasyonunda kullanılan yöntem, kaplama maddesine ve işlem parametrelerine göre fajın hayatta kalma oranı, kapsül boyutu ve çeşitli koşullardaki stabilitesi değişebilmektedir. Bu sebeple fajın kapsüllenmesinde yaygın olarak kullanılan pratik bir yöntem olan ekstrüzyon işleminin optimizasyonu önem arz etmektedir.

Daha önce laboratuvarımızda izole edilen ve tanımlanan SE-P47 fajı, *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* dahil diğer *S. enterica* serovarlarına karşı etkilidir. SE-P47 fajının uzun, kasılmayan bir kuyruğu vardır ve morfolojik olarak *Siphoviridae* familyasının taksonomik bir grubuna aittir. Geniş konak aralığına sahiptir ve *sefC*, *pefA*, *spvC*, *sopE* ve *gipA* virülans gen bölgelerini içermez (Yıldırım vd., 2018, 2019). Bu çalışmanın amacı (i) ekstrüzyon yöntemiyle kapsüllemedeki etkili değişkenleri istatistiksel optimizasyon araçlarını kullanarak taramak ve optimize etmek, (ii) püskürterek kurutma tekniği ile fajın kapsüllenecek iki teknikteki enkapsülasyon etkinliklerini karşılaştırmak, (iii) ekstrüzyon yöntemiyle optimum koşullar altında üretilen enkapsüle fajın sıcaklık, pH, depolama ve gastrointestinal sisteme karşı stabilitesini değerlendirmek, (iv) enkapsüle ve serbest (kapsüllenmeyen) fajların stabilitesini karşılaştırmak, (v) ekstrüzyon yöntemiyle optimum koşullar altında üretilen enkapsüle fajın terapötik ajan olarak kullanım potansiyelini simüle bağırsak sıvısında incelemek, (vi) model gıda olarak yarım yağlı sütte biyokoruyucu olarak kullanım potansiyelini araştırmaktır.

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOT

3.1 Materyaller

3.1.1 Mikroorganizma kültürleri

Çalışmamızda kullanılan *Salmonella* Enteritidis'e özgü SE-P47 fajı ve konak hücresi olan *Salmonella enterica* serovar Enteritidis METU-S1-411 bakterisi Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1.2 Besiyeri ve kimyasallar

Brain Heart Infusion (BHI) (Lab M, Birleşik Krallık), Luria Bertani (LB) (Lab M, Birleşik Krallık) sıvı besiyerleri, Rappaport Vassiliadis Soy selektif besiyeri (Lab M, Birleşik Krallık) ve mikrobiyolojik agar (Condalab, İspanya) mikroorganizma kültürlerinin geliştirilmesinde kullanılmıştır. Bakteri dilüsyonlarının hazırlanmasında %0,1 pepton (Merck, Almanya), sodyum aljinat (Acros Organics, Belgium) ve kitosan (Sigma Aldrich, İzlanda) enkapsülasyon işlemlerinde kaplama maddesi olarak kullanılmışlardır. Asetik asit (Sigma-Aldrich, ABD) kitosanın hazırlanmasında ve kalsiyum klorür (CaCl_2 , Tekkim Kimya, Türkiye) ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyonda jelleştirici çözelti olarak kullanılmıştır. Faj dilüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan sodyum klorür-magnezyum sülfat (SM) tamponunun içeriği olan Tris hidroklorür (Tris - HCl) ve sodyum klorür (NaCl) Sigma Aldrich (ABD)'ten, magnezyum sülfat (MgSO_4) ve jelatin ise Merck (Almanya)'ten temin edilmiştir. Sodyum sitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (Merck, Almanya) ile sodyum bikarbonat (NaHCO_3) (Sigma Aldrich, Almanya) kapsül kırıcı çözelti (MBS) hazırlığında kullanılmıştır. Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), pepsin ve pankreatin ise Merck (Almanya)'ten satın alınmıştır.

3.2 Metotlar

3.2.1 Mikroorganizma kültürlerinin hazırlanması ve muhafazası

Bakteri ve faj stokları sırasıyla %20 (v/v) gliserol içeren BHI sıvı besiyerinde ve %30 (v/v) gliserol içeren LB besiyeri içerisinde -80°C’de muhafaza edilmiştir. Yürütülen tüm analizler için bakteri kültürü, 100 µL stok bakteri kültürünün 5 mL BHI besiyerine aktarılıp 37°C’de inkübe edilmesiyle hazırlanmıştır. *S. Enteritis*’e özgü SE-P47 fajının geliştirilmesinde ise LB besiyeri kullanılmıştır.

3.2.2 Yüksek titreli bakteriyofaj solüsyonunun hazırlanması

Yüksek titreli faj solüsyonu Yildirim vd. (2019)’nin metoduna göre hazırlanmıştır. Faj (100 µL) ve aktif bakteri kültürü (300 µL), 45-50°C’de 4 mL LB yumuşak agara (LB sıvı besiyeri + %0,7 agar) aktararak vorteks (Reax top, Heidolph, Almanya) yardımıyla homojen bir şekilde karışması sağlandıktan sonra boş Petri kaplarına dökülerek yayılmıştır. Agarın katılaşmasının ardından 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra fajların geri kazanımı için Petri kaplarına 2 mL SM tamponu (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 99 mM NaCl, 8 mM MgSO₄ ve %0,01 (m/v) jelatin, pH 7,5) eklenmiş ve fajları içeren yumuşak agar sıyrılarak steril santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Örnekler 25°C’de 2 saat karıştırıldıktan (120 rpm) sonra bakteri hücrelerini parçalamak için tüplere (50 µL/mL) kloroform eklenmiştir. Böylece bakteri hücreleri içinde oluşan fajlar da açığa çıkarılmıştır. Örnekler santrifüj işlemine (4°C, 7000 × g, 15 dakika) tabi tutulduktan sonra süpernatant 0,45 µm gözenek boyutuna sahip steril membran filtrelerden geçirilerek bakteri hücreleri faj solüsyonundan uzaklaştırılmıştır. Hazırlanan faj örnekleri enkapsülasyonda kullanılmak üzere 4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.3 Çift tabaka agar plak metodu

Faj titresinin belirlenmesinde çift tabaka agar plak metodu kullanılmıştır (Kropinski vd., 2009). Hazırlanan faj örneklerinden seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Faj dilüsyonlardan alınan 100 µL’lik hacim, 300 µL konakçı hücre içeren 45-50°C’deki LB yumuşak agara ilave edilip karıştırıldıktan sonra katılaşmış LB agar (LB sıvı besiyeri + %1,5 agar)

içeren Petri kaplarına dökülerek yayılmıştır. 35-37°C’de 24-48 saat inkübasyonun ardından plak sayımı yapılmış ve faj titresi plak oluşturma birimi (pob/mL) olarak verilmiştir.

3.2.4 Enkapsülasyon

Faj preparatının enkapsülasyonu için ekstrüzyon ve püskürterek kurutma olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır. Öncelikle kaplama maddesi olarak aljinat kullanılarak ekstrüzyon yöntemiyle fajın enkapsülasyonu gerçekleştirilmiş ve bu prosesin optimizasyonu yapılmıştır. Ardından belirlenen optimum enkapsülasyon koşullarında kaplama maddesine kitosan ilavesinin etkisi incelenmiştir. İkinci yöntem olarak kullanılan püskürtmeli kurutma yönteminde ise kaplama maddesi olarak aljinat ve kitosan ayrı ayrı kullanılmıştır. Her iki yöntem ve farklı kaplama maddesi kombinasyonlarıyla elde edilen enkapsülasyon etkinlikleri kıyaslanmıştır. Tüm enkapsülasyon proseslerinde faj çözeltisinin titresi 10^{10} pob/mL seviyesine ayarlanmıştır.

3.2.4.1 Ekstrüzyon yöntemi ile enkapsülasyon

Ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyon işlemi, Krasaekoopt vd., (2004)’nin çalışmasından uyarlanan yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Kaplama materyali olarak farklı konsantrasyonlarda sodyum aljinat çözeltileri (%1,5-3,0, m/v) kullanılmıştır. Aljinat çözeltisi, manyetik karıştırıcıda 20 saat boyunca karıştırılarak hazırlandıktan sonra 121°C’de 15 dk steril edilmiştir. Aseptik koşullarda, farklı oranlarda karıştırılan faj çözeltisi ve kaplama malzemesi 1000 rpm’de 5 dakika boyunca karıştırılarak (Daihan, HG-15A, Kore) homojen hale getirilmiştir. Karışım, peristaltik pompa (BT600-2J, Longer Pump, Çin) ve damla ayar seti kullanılarak bir enjektör iğne ucu (26 G, $0,45 \times 13$ mm) ile CaCl_2 içerisine 17 cm yükseklikten 0,75 mL/dk hızında damlatılmıştır. Damlatma işlemi sırasında CaCl_2 çözeltisinin manyetik karıştırıcı (MS-300HS, Misung Scientific Co., Kore) vasıtasıyla 200 rpm’de sürekli karışması sağlanmıştır. Damlatma işlemi bittikten sonra CaCl_2 çözeltisi 30 dk karıştırılarak oluşan aljinat boncuklarının jelleşmesi sağlanmıştır. Daha sonra aljinat boncukları Whatman filtre kağıdından (No:4) süzülüp saf su ile durulanarak steril Petri kaplarına aktarılmıştır. Petri kaplarındaki örnekler 4°C’de 24 saat bekletildikten sonra

mikrobiyolojik ekim kabininde hava akımında 1 saat kurutulmuştur. Analizler kurutulmuş aljinat boncukları kullanılarak yapılmıştır.

3.2.4.2 Ekstrüzyon yöntemi ile enkapsülasyonun optimizasyonu

3.2.4.2.1 Fraksiyonel faktöriyel deneme tasarımı (FFD)

Fajın ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyonu üzerine bağımsız değişkenlerin etkilerini değerlendirmek için Design Expert 7.0 programı ile oluşturulan fraksiyonel faktöriyel deneme tasarımı (FFD) (2^{4-1}) kullanılmıştır. Literatür temel alınarak belirlenen aljinat konsantrasyonu, CaCl_2 konsantrasyonu, CaCl_2 /aljinat ve aljinat/faj olmak üzere dört bağımsız değişken düşük düzeyde (-1) ve yüksek düzeyde (+1) taranmıştır (Çizelge 3.1). Çizelge 3.1’de verilen bağımsız değişkenlerin alt ve üst sınır değerleri, boncuk oluşumu hedeflenerek yapılan ön çalışmalar ile belirlenmiştir. FFD, 8 deneme noktasından meydana gelmiştir.

Çizelge 3.1. Fraksiyonel faktöriyel deneme tasarımında kullanılan bağımsız değişkenlerin deneysel değerleri ve kodlanmış seviyeleri

Bağımsız değişkenler	Semboller	Birimler	Kodlanmış seviyeler	
			-1	+1
Aljinat konsantrasyonu	A	% (m/v)	1,5	3
CaCl_2 konsantrasyonu	B	M	0,05	0,2
CaCl_2 /aljinat oranı	C	mL/mL	2	6
Aljinat/faj oranı	D	mL/mL	2	9

3.2.4.2.2 Yüzey merkezli merkezi kompozit tasarım (FCCCD)

Fajın ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyonunda optimum koşulları belirlemek amacıyla iki faktörlü ve üç seviyeli yüzey merkezli merkezi kompozit deneme tasarımı (FCCCD) kullanılmıştır. Bağımsız değişkenler ve aralıkları FFD yöntemine dayanmaktadır. Sonuçlara göre, aljinat konsantrasyonu ve aljinat/faj oranı Çizelge 3.2’de verildiği gibi üç kodlu düzeyde (-1, 0, 1) değerlendirilmiştir. Deneysel tasarım 13 deneme noktasından oluşmaktadır. Yanıt olarak enkapsülasyon etkinliği ve kapsül boyutu kullanılmış olup en yüksek enkapsülasyon etkinliği (EE, %) ve en küçük boncuk boyutu (BB, mm) hedeflenmiştir.

Çizelge 3.2. Yüzey merkezli merkezi tümleşik tasarımda kullanılan bağımsız değişkenlerin deneysel değerleri ve kodlanmış seviyeleri

Bağımsız değişkenler	Semboller	Birimler	Kodlanmış seviyeler		
			-1	0	+1
Aljinat konsantrasyonu	A	% (m/v)	1,5	2,25	3,0
Aljinat/faj oranı	D	mL/mL	2,0	5,5	9,0

3.2.4.3 Ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyonda kitosanın etkisi

Fajın aljinat kaplama maddesi kullanılarak ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyonunun optimize edilmesinin ardından kitosanın bu proses üzerine etkisi gözlemlenmiştir. Bu amaçla, %0,5 (m/v) konsantrasyonda kitosan (düşük moleküler ağırlık) %1'lik (v/v) asetik asit çözeltisi içinde sürekli karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan kitosan çözeltisi, yukarıda anlatıldığı gibi önceden hazırlanan aljinat çözeltisi içine ayrı ayrı 0,5:1; 0,75:1 ve 1:1 oranlarında katılarak tamamen homojen hale gelmesi için 250 rpm'de gece boyu karıştırılmıştır (Batalha vd., 2021). Hazırlanan kaplama maddesinin homojenizasyonunun ardından ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyon gerçekleştirilmiştir. Enkapsülasyonda kullanılan değişkenler daha önce belirlenen optimum değerlerde tutulmuştur.

3.2.4.4 Püskürtmeli kurutma yöntemi ile enkapsülasyon

Püskürtmeli kurutucu ile enkapsülasyon işleminde kaplama materyali olarak aljinat ve kitosan ayrı ayrı kullanılmıştır. %2 (m/v) konsantrasyonda aljinat çözeltisi manyetik karıştırıcıda 20 saat boyunca karıştırılmıştır ve hazırlanan kaplama materyali 121°C'de 15 dk steril edilmiştir. 1:2 (v/v) oranında karıştırılan faj solüsyonu ve aljinat çözeltisi, 1000 rpm'de 5 dakika boyunca karıştırılarak homojen hale getirildikten sonra karışım, sprey kurutucuda kurutulmuştur. Kurutma uygulamasında giriş sıcaklığı sırasıyla 90, 100 ve 110°C olacak şekilde ayarlanmıştır (Acar Soykut vd., 2019; Endo vd., 2012). Püskürterek kurutma yöntemiyle kitosan partiküllerini elde etmek için öncelikle %2 (m/v) konsantrasyonda kitosan (düşük moleküler ağırlık, viskozite ortalama 145,0 cp) çözeltisi, %1'lik (v/v) asetik asit içinde sürekli karıştırılarak hazırlanmıştır. Faj solüsyonu ve hazırlanan kitosanın 1:2 (v/v) oranında karıştırılmasının ardından yukarıda verilen kurutma şartlarında enkapsülasyon gerçekleştirilmiştir (Endo vd., 2012).

3.2.4.5 Enkapsülasyon etkinliği ve verimi

Enkapsülasyon etkinliği Ma vd., (2008)'nin metoduna göre belirlenmiştir. Bu amaçla serbest (T_{enk}) ve boncuklardan salınan (T_{ser}) faj titreleri belirlenmiştir. Serbest faj titresi, kaplama öncesindeki faj ve kaplama maddesi karışımında mevcut olan fajın titresini, salınan faj titresi ise kaplama sonrasında kapsüllerden salınan faj titresini ifade etmektedir. Aljinat boncuklarından salınan fajı belirlemek için, faj içeren boncuklar, kapsül kırıcı çözelti (MBS, 50 mM sodyum sitrat, 0,2 M sodyum bikarbonat, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5) içine 1:99 oranında ilave edilmiştir. Çalkalamalı inkübatörde (Wisd Laboratory Instruments, Wisecube) 25°C'de 10 dk boyunca 100 rpm'de sürekli karıştırılarak boncukların çözünmesi yoluyla fajın açığa çıkması sağlanmıştır. Hem serbest hem de salınan fajların titresi, yukarıda açıklandığı gibi çift tabaka agar plak yöntemiyle belirlenmiştir. Enkapsülasyon etkinliği (EE), denklem 3.1'e göre hesaplanmıştır.

$$EE (\%) = (T_{enk}/T_{ser}) \times 100 \quad (3.1)$$

Püskürterek kurutma yöntemi ile elde edilen toz formundaki enkapsüle fajın enkapsülasyon etkinliğini belirlemek için Acar Soykut vd. (2019)'nin metodu kullanılmıştır. Öncelikle kapsüllerin 1:9 oranında SM tamponu içerisinde, 37°C'de 15 dk rehidrasyonu sağlanmıştır. Daha sonra kapsülleri çözerek fajları serbest bırakmak için 1:99 oranında MBS ilave edilmiş ve çalkalamalı inkübatörde 25°C'de 10 dk boyunca 100 rpm'de karışması sağlanmıştır. Hem serbest hem de salınan fajların titresi, yukarıda açıklandığı gibi çift tabaka agar plak yöntemiyle belirlenmiştir. Enkapsülasyon etkinliği (EE), denklem 3.1'e göre hesaplanmıştır.

Püskürterek kurutma yöntemi uygulandığında enkapsülasyon verimi, enkapsüle toz içindeki toplam katı madde kütlesinin, enkapsülasyon öncesinde faj ve kaplama maddesinden oluşan karışımdaki toplam katı madde kütlesine oranı ile belirlenmiştir (Acar Soykut vd., 2019).

3.2.5 Enkapsüle bakteriyofajın karakterizasyonu

Analizler, ekstrüzyon yöntemi kullanılarak optimize edilen koşullarda üretilen faj içeren aljinat boncukları üzerinde yürütülmüştür.

3.2.5.1 Morfoloji ve boyut dağılımı

Faj içeren boncukların morfolojileri ışık mikroskobu (Leica M165 C, Almanya) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM, Carl Zeiss, Zeiss EVO 40, Almanya) ile incelenmiştir. Görüntüleme için yeni üretilen aljinat boncukları kullanılmıştır. Numuneleri SEM'de görüntülemek amacıyla boncuklar vakum altında altın (Au) ile kaplanmıştır. Ardından boncukların yüzey morfolojileri 20 kV'de incelenmiştir. Boncukların boyutu, 0-25 mm ölçüm aralığına ve 0,001 mm hassasiyete sahip bir dijital mikrometre (Dasqua 4410-1105, İtalya) kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler rastgele seçilen en az yedi farklı numunede yapılmıştır.

3.2.6 Serbest ve enkapsüle bakteriyofajların stabilitesi

Analizler, ekstrüzyon yöntemi kullanılarak optimize edilen koşullarda üretilen faj içeren aljinat boncukları üzerinde yürütülmüştür.

3.2.6.1 pH ve sıcaklık stabilitesi

Serbest ve enkapsüle faj (faj içeren aljinat boncukları) örneklerinin farklı pH değerlerindeki (pH 1-13) stabilitesi Abdelsattar vd. (2019)'nin metoduna göre belirlenmiştir. Bu amaçla stok çözelti olarak %0,2 (m/v) NaCl çözeltisi kullanılmış olup stok çözeltinin pH değerleri 0,1 N NaOH veya 1 M HCl ile ayarlanmıştır. Serbest (1 mL) ve enkapsüle faj (1 g) numuneleri, pH'sı ayarlanan NaCl çözeltisi (9 mL) içerisinde 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından faj içeren boncuklar, saf su ile durularak faj titresi belirlenmek üzere MBS (25°C, 100 rpm, 10 dakika) içinde çözülme sağlanmıştır. Serbest ve enkapsüle faj örneklerinin titreleri, çift tabaka agar plak yöntemi ile belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak SM tamponu (pH 7,5) içerisinde tutulan örnekler kullanılmıştır.

Serbest ve enkapsüle fajların sıcaklık stabilitelerini incelemek için numuneler SM tampon çözeltisinde 50, 60, 70 ve 80°C'de 60 dk süreyle inkübe edilmiştir (Abdelsattar vd., 2019). Serbest ve enkapsüle fajın (faj içeren boncukların MBS içinde çözündürülmesinden sonra) 0, 15, 30, 45 ve 60. dk'daki faj titreleri, çift tabaka agar plak yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. 0. dk'da alınan örnekler kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

3.2.6.2 Yapay mide ortamında stabilite

Serbest ve enkapsüle fajların mide koşullarındaki stabilitesi, simüle edilen mide sıvısında (SGF) incelenmiştir. SGF, 3,2 mg/mL pepsinin (0,70 FIP-U/mg, Merck, Almanya) %0,2 (m/v) NaCl içerisinde çözündürülmesiyle hazırlanmıştır ve pH değeri 1 M HCl ile 2,0 veya 2,5'e ayarlanmıştır. SGF'de serbest ve enkapsüle fajın hayatta kalmasını belirlemek için önceden 37°C'ye ısıtılmış 9 mL SGF'ye 1 mL serbest faj veya 1 g boncuk eklenmiştir. Tüm numuneler 37°C'de 5, 15, 30, 60, 90 ve 120 dk süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra boncuklar MBS içinde çözündürülerek boncuklardan salınan fajın ve serbest fajın titreleri çift tabaka agar plak yöntemi ile belirlenmiştir (Samtlebe vd., 2016).

3.2.6.3 Depolama süresince stabilite

Serbest faj ve faj içeren boncuklar, aseptik koşullar altında 12 ay boyunca 4 ve 25°C'de steril falkon tüpler içerisinde depolanmıştır.

3.2.6.3.1 Hayatta kalım

Depolama süresince, her ay serbest form ve boncuk formunda faj titreleri belirlenmiştir. Faj örneklerinin biyolojik aktivitelerini belirlemek için, boncukların (1 g) MBS içinde çözülmesinden (25°C, 100 rpm, 10 dk) sonra salınan fajı içeren çözeltiden ve serbest faj örneğinden (1 mL) seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Daha sonra çift tabaka agar plak yöntemiyle faj titreleri belirlenmiştir (Kropinski vd., 2009). Kontrol grubu olarak 0. haftadaki örnekler kullanılmıştır.

3.2.6.3.2 Renk ölçümü

Depolama süresince, örneklerdeki renk değişimlerinin değerlendirilmesinde renk tayin cihazı (CR-400, Konica, Minolta, Japonya) kullanılarak CIELAB renk yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak 0. haftadaki örnekler kullanılmıştır. Lab renk uzayında L*, a*, b* parametrelerinden L*parlaklığı ifade ederken, a* ve b* parametreleri renklilik koordinatlarını ifade etmektedir. -a, +a, -b, +b sırasıyla yeşil, kırmızı, mavi ve sarı renk anlamına gelir. Örnekler üzerinde rastgele seçilen noktalarda bu parametreler ölçülerek toplam renk farkı (ΔE^*) denklem 2'ye göre hesaplanmıştır (Francis ve Clydesdale, 1975; Petsong vd., 2019).

$$\Delta E^* = [(L^* - L^*_{kont})^2 + (a^* - a^*_{kont})^2 + (b^* - b^*_{kont})^2]^{1/2} \quad (3.2)$$

3.2.6.3.3 Su aktivitesi

Depolama süresince, faj örneklerinin su aktivitesi ölçümleri 25°C'de su aktivitesi ölçüm cihazı (Novasina, LabTouch-a_w, İsviçre) kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.7 Enkapsüle bakteriyofajların salınımı

Aljinat boncuklarının simüle bağırsak sıvısı (SIF) ve model gıda olarak kullanılan süt içerisinde zamana bağlı olarak parçalanması ve dolayısıyla boncuklardan faj salınımı incelenmiştir.

3.2.7.1 Simüle bağırsak sıvısında salınım

SIF, 10 mg/mL pankreatinin (4 USP, Sigma-Aldrich, ABD) 50 mM KH₂PO₄ içerisinde pH 6,8'de çözündürülmesiyle hazırlanmıştır. 0,1 g boncuk örneği 0,9 mL SIF içeren tüplere aktarıldıktan sonra çalkalamalı inkübatörde 100 rpm'de sürekli karıştırılarak 37°C'de 240 dakikaya kadar inkübe edilmiştir. Faj titreleri 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 ve 240. dakikalarda çift tabaka agar plak yöntemi ile belirlenmiştir (Tang vd., 2013). Kontrol grubu için faj içeren kapsüller MBS içinde çözündürülerek faj titresi tespit edilmiştir.

3.2.7.2 Süt içinde salınım

Aljinat boncuklarından faj salınımını incelemek için yarım yağlı (en az %1,5 süt yağı) ultra yüksek sıcaklıkta (UHT) sterilize edilen süt kullanılmıştır. 0,1 g boncuk örneği 0,9 mL süt içeren tüplere aktarıldıktan sonra çalkalamalı inkübatörde 100 rpm'de sürekli karıştırılarak 37°C'de 240 dakikaya kadar inkübe edilmiştir. Faj titreleri 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 ve 240. dakikalarda çift tabaka agar plak yöntemi ile belirlenmiştir. Kontrol grubu için faj içeren kapsüller MBS içinde çözündürülerek faj titresi tespit edilmiştir.

3.2.8 Enkapsüle bakteriyofajın *S. Enteritidis*'e karşı litik aktivitesinin belirlenmesi

Aljinat boncukları içerisinde kapsüllenen fajın, simüle bağırsak sıvısı ve model gıda olarak kullanılan süt içerisinde *S. Enteritidis* METU-S1-411'e karşı litik aktivitesi analiz edilmiştir.

3.2.8.1 Simüle bağırsak sıvısında litik aktivite

Enkapsüle fajın *S. Enteritidis* METU-S1-411'e karşı litik aktivitenin test edilmesinde kullanılan SIF, yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. MOI 1000 ve 100000'de yürütülecek analizlerde 5 mL SIF içinde sırasıyla 10^5 ve 10^3 kob/mL seviyelerinde *S. Enteritidis* METU-S1-411 olacak şekilde inokülasyon yapılmıştır. Ardından 10^8 pob/g seviyesindeki enkapsüle faj (1 g) *S. Enteritidis* METU-S1-411 inoküle edilen SIF'a katılarak oda sıcaklığında homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Kontrol grubu olarak aynı şekilde *S. Enteritidis* METU-S1-411 ile aşılana ve enkapsüle faj eklenmeyen SIF örneği ile hem *S. Enteritidis* METU-S1-411 hem de enkapsüle faj içermeyen SIF örneği kullanılmıştır. Hazırlanan örnekler 37°C'de 24 saat boyunca 100 rpm'de karıştırılarak inkübe edilmiştir. *S. Enteritidis* METU-S1-411 hücre sayılarının tespiti için 0, 1, 4, 8, 12 ve 24. saatlerde örnekler alınıp dilüsyon hazırlanmıştır. Rappaport Vassiliadis Soy besiyerine ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübasyonun ardından gelişen koloniler sayılarak sonuç kob/mL olarak verilmiştir (Zhou vd., 2022).

3.2.8.2 Süt içerisinde litik aktivite

S. Enteritidis METU-S1-411'e karşı litik aktivitenin incelenmesinde yarım yağlı (en az %1,5 süt yağı) UHT süt kullanılmıştır. MOI 1000 ve 100000'de yürütülecek analizlerde 5 mL süt içinde sırasıyla 10^5 ve 10^3 kob/mL seviyelerinde *S. Enteritidis* METU-S1-411 olacak şekilde inokülasyon yapılmıştır. Ardından 10^8 pob/g seviyesindeki enkapsüle faj (1 g) *S. Enteritidis* METU-S1-411 inoküle edilen süte katılarak oda sıcaklığında homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Kontrol grubu olarak aynı şekilde *S. Enteritidis* METU-S1-411 ile aşılanan ve enkapsüle faj eklenmeyen süt örneği ile hem *S. Enteritidis* METU-S1-411 hem de enkapsüle faj içermeyen süt örneği kullanılmıştır. Hazırlanan örnekler ayrı ayrı 4 ve 25°C'de 24 saat boyunca bekletilmiştir. *S. Enteritidis* hücre sayılarının tespiti için 0, 1, 4, 8, 12 ve 24. saatlerde örnekler alınıp dilüsyon hazırlanmıştır. Rappaport Vassiliadis Soy selektif besiyerine ekim yapılarak 37°C'de 24 saat inkübasyonun ardından gelişen koloniler sayılarak sonuç kob/mL olarak verilmiştir (Petsong vd., 2019).

3.2.9 İstatistiksel Analiz

Deneyssel tasarımların (FFD ve FCCCD) oluşturulması ve deneyssel verilerin regresyon analizi Design Expert v7.7.0 sürümü (Stat-Ease, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Regresyon katsayısının istatistiksel anlamlılığı varyans analizi (ANOVA) kullanılarak Fisher (F) testi ile analiz edilmiştir. Uyarlanan modellerin yeterliliği uyum katsayısı (R^2) ve uyum eksikliği testi ile doğrulanmıştır. Faj içeren aljinat boncuklarının stabilitesi, boncuklardan faj salınımı ve litik aktivite verilerinin istatistiksel farkları, MINITAB 17 paket programı kullanılarak varyans analizi (ANOVA) ile analiz edilmiştir. Ortalama değerlerin karşılaştırılması Tukey testi kullanılarak yapılmıştır. Ortalamalar arasındaki anlamlı farklar %95 güven düzeyinde değerlendirilmiştir ($p<0,05$).

BÖLÜM IV

BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 SE-P47 fajının ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyonu

Salmonella Enteritidis patojen bakterisine özgü SE-P47 fajının ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyonunda deneysel tasarımlar ile etkili faktörler belirlenip etkili faktörler için seviyeler tespit edilmiştir. Ardından RSM yöntemi ile enkapsülasyon için optimum koşullar ortaya konulmuştur. Ayrıca, optimum noktada yürütülen enkapsülasyon işleminde üretilen aljinat boncuklarındaki faj canlılığı ve boncukların boyutları belirlenmiştir.

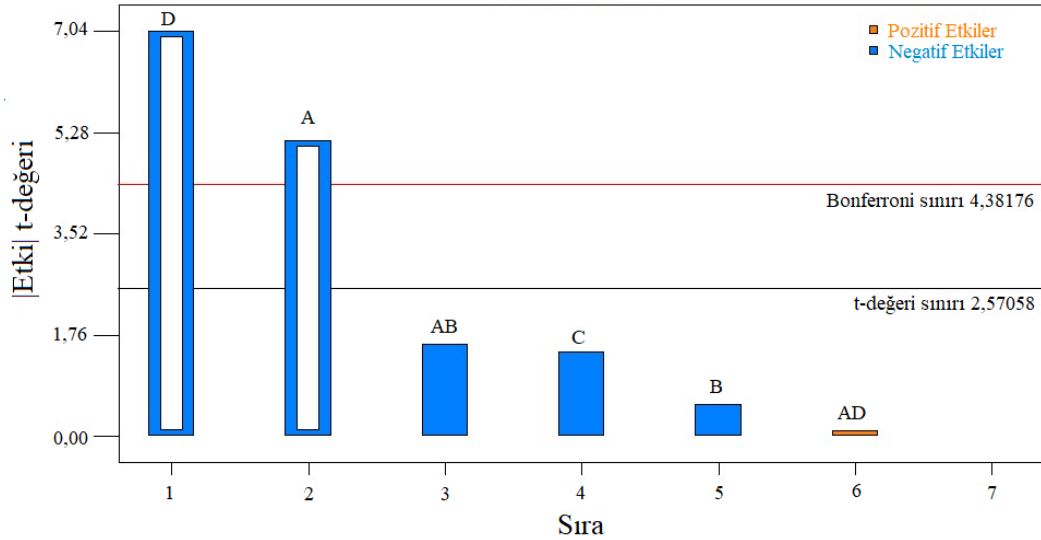
4.1.1 Fraksiyonel faktöriyel deneme tasarımı ile etkili faktörlerin taranması

Fajın ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyonunda etkili olabilecek dört bağımsız değişken belirlenmiştir. Aljinat konsantrasyonu (A), CaCl_2 konsantrasyonu (B), CaCl_2 /aljinat oranı (C) ve aljinat/faj oranı (D) bağımsız değişkenleri ile bunların etkileşimlerinin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkileri 2^{4-1} fraksiyonel faktöriyel deneme tasarımı (FFD) kullanılarak taranmıştır. Deneme matrisi ve sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir. Fraksiyonel faktöriyel deneme deseninden elde edilen sonuçlara göre fajın enkapsülasyon etkinlikleri (EE) ortalama %88,20 ile %99,79 arasında değişmektedir.

Çizelge 4.1. Fraksiyonel faktöriyel deneme tasarımı ve yanıt sonuçları

Deneme	Bağımsız değişkenler				Bağımlı değişken (Yanıt)
	A: Aljinat konsantrasyonu (% m/v)	B: CaCl_2 konsantrasyonu (M)	C: CaCl_2 /aljinat oranı	D: Aljinat/faj oranı	Enkapsülasyon etkinliği (%)
1	3	0,05	6	2	95,61±1,73
2	3	0,05	2	9	91,15±0,34
3	1,5	0,20	2	9	94,81±0,85
4	1,5	0,20	6	2	99,45±0,18
5	1,5	0,05	2	2	99,79±0,67
6	3	0,20	2	2	95,07±0,06
7	3	0,20	6	9	88,20±0,47
8	1,5	0,05	6	9	92,76±0,03

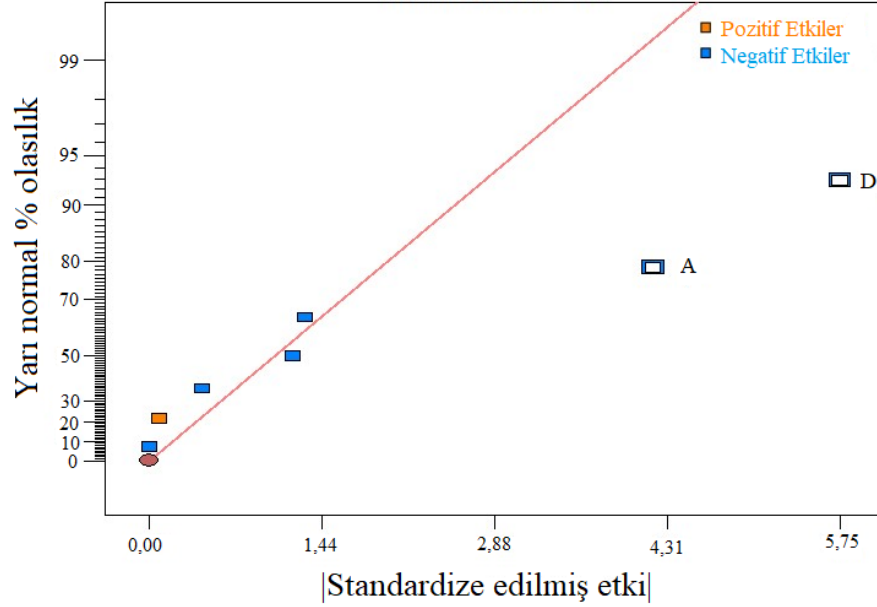
Bağımsız değişkenlerin ve bunların etkileşimlerinin enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkileri Pareto grafiğinde (Şekil 4.1) gösterilmiştir. Pareto grafiğindeki sütunlar, her değişkenin enkapsülasyon etkinliği üzerindeki standartlaştırılmış etkisini göstermektedir. Pareto grafiği, Bonferroni (4,38175) ve t değeri limitlerini (2,57058) kullanarak etkinin önemini belirtmektedir. t etki değeri, Bonferroni limitinin üzerinde olan sütunların etkisi istatistiksel olarak kesinlikle anlamlı ($p<0,05$); t etki değeri, Bonferroni ile t değeri limiti arasında olan sütunların etkisi muhtemelen anlamlı ($p<0,05$) ve t etki değeri, t değeri limitinin altında olan sütunların etkisi ise istatistiksel olarak anlamsız kabul edilmektedir ($p>0,05$) (Shah ve Pathak, 2010). Pareto grafiğine göre enkapsülasyon etkinliği üzerindeki kesinlikle önemli değişkenler aljinat konsantrasyonu ve aljinat/faj oranıdır.



Şekil 4.1. Pareto grafiği

Bağımsız değişkenlerin ve etkileşimlerinin enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkileri yarı normal grafik (Şekil 4.2) üzerinde de incelenmiştir. Grafikte, aljinat konsantrasyonu ve aljinat/faj oranı değişkenlerinin yarı normal çizgiden oldukça uzak olduğu görülmektedir. Bu durum, aljinat konsantrasyonu ve aljinat/faj oranı değişkenlerinin SE-P47 fajının kapsüllenmesinde en önemli faktörler olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte etkisiz olduğu belirlenen diğer faktör ve faktör etkileşimleri yarı normal çizgisi üzerinde ya da çizgiye oldukça yakındır. Önemli değişkenler, toplam varyasyonun %93,82'sini açıklamaktadır. Benzer şekilde (Ergin vd., 2021), sodyum aljinat konsantrasyonunun Felix O1 fajının kapsüllenmesi üzerinde

önemli bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda, diğer değişkenler (CaCl_2 konsantrasyonu ve CaCl_2 /aljinat oranı) ve bağımsız değişkenlerin etkileşimleri istatistiksel olarak anlamlı ($p>0,05$) bulunmamıştır. Bu nedenle, önemsiz değişkenler sonraki analizlerin dışında tutulmuştur.



Şekil 4.2. Yarı normal grafik

Fajın ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyonunda etkili faktörlerin etki yönü incelendiğinde negatif bir etki gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, aljinat/faj oranı ve aljinat konsantrasyonu birbirinden bağımsız olarak azaldıkça enkapsülasyon etkinliği artmaktadır. Bu iki faktörün etkileşimi ise enkapsülasyon etkinliğini pozitif yönde etkilemektedir. Yani, iki faktörün beraber azalması enkapsülasyon etkinliğini artırmaktadır. Ancak bu faktör etkileşiminin etkisi istatistiksel açıdan önemsizdir ($p>0,05$).

4.1.2 Yüzey merkezli merkezi kompozit tasarım ile optimizasyon ve doğrulama

FFD ile tespit edilen önemli bağımsız değişkenleri kullanarak optimum kapsülleme koşullarını belirlemek için yüzey merkezli merkezi kompozit tasarım (FCCCD) kullanılmıştır. FCCCD'ye göre aljinat konsantrasyonunun (A) ve aljinat/faj oranının (D) bağımlı değişkenler olan enkapsülasyon etkinliği (EE) ve boncuk boyutu (BB)

üzerindeki etkilerini analiz etmek için 13 deney rastlantısal olarak yürütülmüştür (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Yüzey merkezli merkezi kompozit deneme tasarımı ve sonuçlar

Deneme	Bağımsız değişkenler		Bağımlı değişkenler	
	Faktör 1	Faktör 2	Yanıt 1	Yanıt 2
	A: Aljinat konsantrasyonu (% , m/v)	B: Aljinat/faj oranı (mL/mL)	Enkapsülasyon etkinliği (EE) (%)	Boncuk boyutu (BB) (mm)
1	1,50	5,50	94,89±0,70	1,50±0,08
2	2,25	5,50	94,03±0,81	1,81±0,09
3	1,50	9,00	93,72±0,60	1,72±0,04
4	1,50	2,00	98,73±0,23	1,32±0,07
5	2,25	9,00	92,38±1,07	1,87±0,08
6	2,25	5,50	93,76±0,57	1,98±0,06
7	2,25	5,50	93,81±0,54	1,95±0,11
8	3,00	9,00	90,16±1,45	2,34±0,10
9	3,00	5,50	92,14±1,19	2,07±0,09
10	2,25	5,50	94,93±0,30	2,00±0,07
11	2,25	2,00	95,43±1,69	1,87±0,08
12	3,00	2,00	95,35±0,22	2,02±0,06
13	2,25	5,50	92,99±0,31	2,00±0,11

Deneme tasarımıdaki %1,5; %2,25 ve %3 konsantrasyondaki aljinat çözeltilerinin viskoziteleri sırasıyla 1241,00±15,56 cP, 6863,33±55,08 cP ve 18840,00±42,43 cP olarak ölçülmüştür. Tasarıma göre yürütülen deneylerde, en yüksek EE'ye ve en küçük BB'ye sahip olmak hedeflenmiştir. Çizelge 4.2'de gösterildiği gibi EE ve BB için sırasıyla %90,16-%98,73 ve 1,32-2,34 mm aralığında sonuçlar elde edilmiştir. Modellerin istatistiksel önemi ve ANOVA sonuçları ise Çizelge 4.3'te sunulmuştur. Optimizasyonda, tahmin edilen optimum koşullar altında yanıtın ölçülmesi ve gözlemlenen yanıt değerlerinin modeller aracılığıyla tahmin edilen yanıtlarla karşılaştırılması önemli bir noktadır (Yolmeh ve Jafari, 2017). Bu çalışmada, bağımsız değişkenlerin yanıtlar üzerindeki etkisini modellemede en iyi uyumu doğrusal model sağlamıştır. Sonuçların açıklanması için uygun modelin belirlenmesi için en yüksek değerlerdeki ayarlanmış ve tahmin edilen belirleme katsayısı (R^2) değerlerine odaklanılmıştır. Modellerin deneysel verilere uyumunu değerlendirmek için kullanılan R^2 değerleri EE ve BB için sırasıyla 0,8998 ve 0,8531 olarak bulunmuştur. Tahmin edilen R^2 değerlerinin, modellere ilişkin düzeltilmiş R^2 değerleri ile iyi bir uyum içinde olduğu gözlenmiştir. Ayrıca uyum eksikliği değerleri de istatistiksel olarak anlamsızdır

($p>0,05$). Dolayısıyla, kullanılan modellerin optimum parametre değerlerini tahmin etmek için yeterliliği ortaya konmuştur. EE ve BB için belirlenmiş faktörler açısından son model denklemleri sırasıyla Denklem (4.1) ve (4.2)'de verilmiştir.

$$EE = 94,02 - 1,62A - 2,21B \quad (4.1)$$

$$BB = 1,88 + 0,32A + 0,12B \quad (4.2)$$

Çizelge 4.3. ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler toplamı	sd	Ortalama kare	F-değeri	p-değeri	
EE için model	44,91	2	22,45	44,89	<0,0001	önemli
A-Aljinat konsantrasyonu	15,65	1	15,65	31,28	0,0002	
B-Aljinat/faj oranı	29,26	1	29,26	58,49	<0,0001	
Uyum eksikliği	3,07	6	0,51	1,06	0,5014	önemsiz
R ²	0,8998					
Ayarlanmış R ²	0,8797					
Tahmini R ²	0,8163					
Kaynak	Kareler toplamı	sd	Ortalama kare	F-değeri	p-değeri	
BB için model	0,68	2	0,34	29,05	<0,0001	önemli
A- Aljinat konsantrasyonu	0,60	1	0,60	50,69	<0,0001	
B- Aljinat/faj oranı	0,087	1	0,087	7,40	0,0216	
Uyum eksikliği	0,092	6	0,015	2,37	0,2113	önemsiz
R ²	0,8531					
Ayarlanmış R ²	0,8238					
Tahmini R ²	0,7501					

sd: serbestlik derecesi

Optimizasyon, çalışılan enkapsülasyon değişkenleri aralığında en yüksek EE ve en küçük BB hedeflenerek gerçekleştirilmiştir. Optimum deney koşulları %1,5 (m/v) aljinat konsantrasyonu ve 2 mL/mL aljinat/faj oranı şeklinde belirlenmiştir. Elde edilen bu koşullarda arzu edilebilirlik değeri 0,887 olarak bulunmuştur. Optimum koşullarda EE ve BB değerleri sırasıyla %97,85 ve 1,44 mm olarak tahmin edilmiştir. Tahmin edilen ve gözlemlenen değerler arasındaki fark mümkün olduğu kadar düşük olmalıdır. Bu durum, tahmin edilen optimum koşulların geçerli olduğunu göstermektedir (Yolmeh

ve Jafari, 2017). Tahmin edilen yanıt değerlerinin uygunluğunu doğrulamak için ek analizler (n=3) yapılmıştır. EE $98,52 \pm 0,34$ ve BB $1,28 \pm 0,05$ mm olarak tespit edilen değerlerin tahmin edilen değerlerle yakın uyum içerisinde olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmamızda kapsüllemeden önceki başlangıç faj titresi $10,46 \pm 0,03$ log pob/mL'dir. Ortalama $98,52$ enkapsülasyon etkinliği ile üretilen aljinat boncuklarındaki faj titresinin $10,31 \pm 0,06$ log pob/g seviyesinde olduğu belirlenmiştir. Böylece, optimum koşullar altında kapsülleme işleminde faj titresi kaybının oldukça düşük olduğu gözlenmiştir.

Ekstrüzyon yöntemiyle sadece aljinat ya da aljinat ile kitosan, karragenan ve peynir altı suyu proteininin farklı kombinasyonlarının kaplama maddesi olarak kullanıldığı bir çalışmada, $1,5$ (m/v) aljinat (1955.42 Pa.s) kullanılarak *E. coli* UFV-AREG1 fajının kapsüllemesinde (faj/kaplama maddesi oranı 1:9) enkapsülasyon etkinliği çalışmamıza benzer şekilde ortalama $99,7$ ($9,6-9,9$ log pob/g) olarak bulunmuştur (Batalha vd., 2021). Başka bir çalışmada bir kapsülleyici kullanılarak faj K'nin Na-aljinat matrisinde [2 (m/v), düşük viskoziteli] kapsüllemesiyle elde edilen mikrokürelerin enkapsülasyon etkinliklerinin 93 ile 95 ($8,48 \pm 0,19$ log pob/g) arasında değiştiğini bildirilmiştir (Ma vd., 2012). Bizim çalışmamızda enkapsülasyon etkinliği, fajların aynı yöntemle ve benzer matrislerle kapsüllendiği önceki bazı çalışmalara (Dini vd., 2012; Gomez-Garcia vd., 2021) göre daha yüksek bulunmuştur. Dini vd. (2012)'nin çalışmasında *E. coli* CA933P fajı, 2 (m/v) konsantrasyonda aljinat kullanarak ekstrüzyon tekniğiyle enkapsüle edilmiş ve etkinliğin yaklaşık 75 (başlangıç faj titresi 10^8 pob/mL, boncuğun faj titresi 10^6 log pob/boncuk) olduğu rapor edilmiştir. Bir başka çalışmada ise *Salmonella* S1 fajı 2 (m/v) aljinat matrisinde $88,09$ ($1,11 \times 10^{11}$ log pob/g) etkinlik değeriyle kapsüllemiş (Gomez-Garcia vd., 2021).

Farklı patojenlere karşı litik aktivite gösteren fajların aljinat kaplama malzemesi kullanılarak ekstrüzyon tekniğiyle kapsüllemesinin sıklıkla yüksek etkinlikle dolayısıyla yüksek faj canlılığı ile sonuçlandığı görülmektedir. Ancak kapsüller içindeki faj canlılığı, çeşitli proses parametrelerine göre değişiklik gösterebilmektedir. Bu nedenle çalışmamızın bulguları, faj içeren kapsüllerin gıda ve veterinerlik uygulamaları gibi alanlardaki potansiyel kullanımını artırmak için optimizasyon sürecinin önemini ortaya koymaktadır.

Optimizasyon için yürütülen analizlerden elde edilen bulgular, yüksek aljinat konsantrasyonunun boncukların boyutunda artışa neden olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.2). Benzer şekilde Shi vd. (2013), aljinat konsantrasyonundaki artışın kapsül boyutlarında artışa yol açtığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda, optimum koşullar altında kapsülleme işleminde boncukların çapı ortalama 1,28 mm olarak bulunmuştur. Benzer sonuçlar, %1,5 (m/v) aljinat ile enkapsülasyon yapılan Batalha vd. (2021)'nin çalışmasında da rapor edilmiştir. Bu çalışmada, aljinat boncuklarının çapları 1,39 ile 1,54 mm arasında değişmektedir. Fajların enkapsülasyonunda çoğunlukla küresel bir şekil ve küçük parçacıklar hedeflenmektedir (Choińska-Pulit vd., 2015). Ancak ortalama 780 µm boncukların üretildiği bir çalışma da dahil olmak üzere çeşitli çalışmalarda kapsüllerin boyutunun artırılmasıyla koruyucu etkinin artırılabilceği rapor edilmiştir (Ma vd., 2008; Shi vd., 2013; Tang vd., 2013). Faj enkapsülasyon çalışmalarında, 2,33; 2,8 ve 3,73 mm çaplarında kapsüller de üretilmiştir (Abdelsattar vd., 2019; Gomez-Garcia vd., 2021). Fakat aşırı büyük kapsüller, gıda uygulamalarında duyu kalite üzerinde olumsuz etkilere; hayvanlarda oral uygulamalarda fazla çiğneme ve midede uzun süre tutulma gibi kullanım kısıtlamalarına yol açabilmektedir (Hansen vd., 2002; Tang vd., 2013). Bu nedenlerden dolayı bu çalışmada elde edilen ortalama 1,28 mm boyutlarındaki aljinat boncuklarının gıdalarda veya faj terapisi uygulamalarında biyokoruyucu olarak kullanım potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

Literatürde, fajların ekstrüzyon ya da diğer yöntemlerle kapsüllenmesinin optimizasyonu üzerine sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Choi vd., 2023; Ergin vd., 2021; Petsong vd., 2021; Vinner ve Malik, 2018; Vinner vd., 2019). *Salmonella* Felix O1 fajının %10 Eudragit S100 ve farklı konsantrasyonlardaki (%0,5-2,0; m/v) sodyum aljinat karışımı kullanılarak ekstrüzyon yöntemiyle kapsüllendiği bir çalışmada, kaplama çözeltisinin formülasyonu ve akış hızı değiştirilerek optimize proses koşullarını belirlemek hedeflenmiştir. Optimum koşullar, simüle mide sıvısına (pH 1) 2 saat maruz kalma sonucunda en yüksek faj canlılığının elde edilmesine dayanarak %10 (m/v) Eudragit S100 ve %1 (m/v) aljinat içeren kaplama materyali formülasyonu ve fajı içeren faz akış hızı 100 Qd/µl h⁻¹ olarak belirlenmiştir. Ayrıca, bu koşullarda üretilen yaklaşık 100 µm boyutundaki mikropartiküllerin aynı formülasyon ile daha düşük akış hızı ile üretilen küçük boncuklarla (~50 µm) karşılaştırıldığında daha iyi asit koruması gösterdiği rapor edilmiştir (Vinner ve Malik, 2018). Ergin vd. (2021)'nin optimizasyon

çalışmasında, Felix O1 fajının ekstrüzyon metodu ile kapsüllenmesinde 3 ayrı yanıt üzerinde çalışılmıştır: (i) yüksek enkapsülasyon etkinliği, (ii) pH 2’de faj titresinde en düşük azalma ve (iii) yüksek enkapsülasyon etkinliği, pH 2’de faj titresinde en düşük azalma ve en küçük boncuk boyutlarının aynı anda elde edilmesi. Birinci yanıt için optimum kaplama malzemesi formülasyonu %1,86 sodyum aljinat ve %3,26 sodyum kazeinat, damlatma işlemindeki titreşim frekans değeri 1,61 kHz’dir. İkinci yanıt için optimum kaplama malzemesi formülasyonu %2,00 sodyum aljinat ve %2,69 sodyum kazeinat, frekans değeri 4,50 kHz ve son olarak üçüncü yanıt için belirlenen formülasyon %1,53 sodyum aljinat ve %2,72 sodyum kazeinat, frekans değeri ise 4,50 kHz olarak tespit edilmiştir. Bir başka çalışmada, T4 fajının püskürterek kurutma ile toz haline haline getirilmesi prosesinde yüksek litik aktiviteye ulaşılan en iyi sistemin %11 (m/m) maltodekstrin ve %4 (m/m) trehalozdan oluşan formülasyon olduğu rapor edilmiştir (Choi vd., 2023).

4.2 Bakteriyofajın ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyonunda kitosanın etkisi

Aljinat ve kitosan enkapsülasyon çalışmalarında sıklıkla kullanılan iki polimer maddedir. Kitosanın mikroorganizmaların kapsüllenmesinde kullanımı, genellikle üretilen aljinat boncuklarının kitosan ile kaplanması üzerine yoğunlaşmıştır. Bunun nedeni kitosanın aljinat gibi negatif yüklü bir polimer etrafında yarı geçirgen bir zar oluşturabilmesidir. Bu yolla kapsüllerin stabilitesinin artırılabilirliğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Kim vd., 2015; Ma vd., 2008, 2012). Bu tez çalışmasında, fajın enkapsülasyonunda kitosanın kaplama solüsyonu içine belli oranlarda ilavesinin kapsüllerin yapısına ve faj etkinliğine etkisi incelenmiştir.

Kaplama maddesi olarak kullanılmak üzere hazırlanan aljinat ve kitosan karışımından oluşan formülasyonlar, üretilen kapsüllerin enkapsülasyon etkinlikleri ve boyutları Çizelge 4.4’te verilmiştir. Kitosanın etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan enkapsülasyon işleminde kullanılan sıvı formdaki fajın titresini ortalama 10,21 log pob/mL değerindedir. Kitosan ile aljinatın 0,5:1; 0,75:1 ve 1:1 oranlarında karıştırıldığı formülasyonlarda karışımda tespit edilen faj titrelerinde sırasıyla ortalama 2,01; 3,29; 4,77 log pob/mL azalma meydana gelmiştir. Kaplama maddesi karışımında kitosan miktarındaki artış faj titresinde azalmalara yol açmıştır. Faj canlılığındaki bu azalmalar, aljinat ve kitosanın zıt yüklü olup tamamen homojen bir karışım elde etmenin zorluğuna

ve oluşan ipliksi yapının canlılığı olumsuz yönde etkilemesine bağlanabilmektedir. Kapsüllerdeki faj titreleri ise sırasıyla $7,51 \pm 0,08$; $6,49 \pm 0,26$ ve $5,30 \pm 0,14$ log pob/g olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte üç formülasyonda da enkapsülasyon etkinlikleri %90'ın üzerinde bulunmuştur. Kapsül boyutları ortalama 1,1 ile 1,45 mm arasında değişmekte olup sadece aljinat kullanılarak optimum koşullarda elde edilen boncuklarla benzerlik göstermektedir.

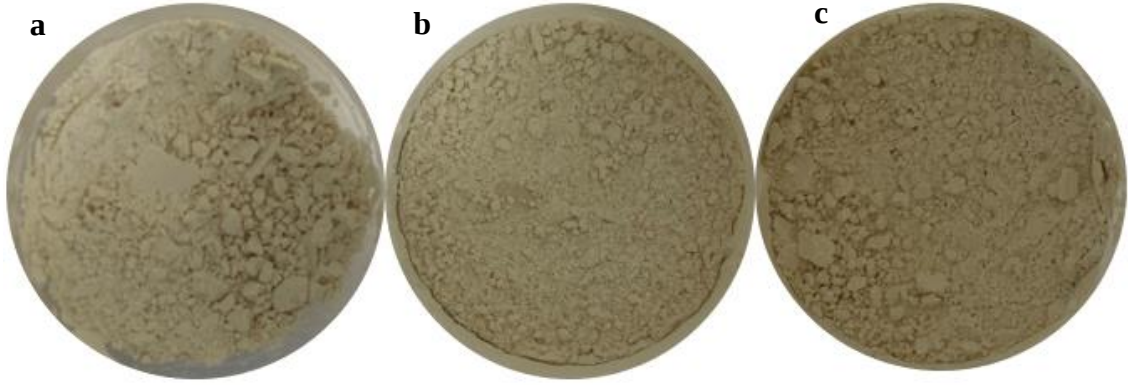
Çizelge 4.4. Kitosanın etkisini belirlemek için kullanılan kaplama maddesi formülasyonları ve sonuçlar

Aljinat konsantrasyonu (%)	Kitosan konsantrasyonu (%)	Karışımındaki kitosan/aljinat oranı	Enkapsülasyon etkinliği (%)	Kapsül boyutu (mm)
1,5	0,5	0,5:1	$91,07 \pm 0,26$	$1,45 \pm 0,08$
1,5	0,5	0,75:1	$95,30 \pm 0,94$	$1,1 \pm 0,19$
1,5	0,5	1:1	$96,15 \pm 0,47$	$1,18 \pm 0,08$

Farklı oranlarda ve kombinasyonlarda ticari bal, jelatin, Tris-HCl, NaCl ve $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ matrislerinin %1,5 konsantrasyonda aljinat ile karıştırılarak kaplama maddesi olarak kullanıldığı bir çalışmada kitosan (%0,4), son aşamada aljinat boncuklarının kaplanmasında kullanılmıştır. Üretilen kapsüllerdeki faj titresi incelendiğinde %100'e yakın enkapsülasyon etkinlikleri gözlemlendiği ifade edilmiştir. Kapsül yapılarının birçok kombinasyonda düzenli ve tek tipte olduğu, boyutlarının ise 2,33 ile 2,8 mm arasında değiştiği rapor edilmiştir (Abdelsattar vd., 2019). Literatür incelendiğinde, kitosan (orta moleküler ağırlık) ile aljinat (düşük viskozite) çözeltilerinin 1:1 oranında karıştırılarak fajın ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyonunda kaplama maddesi olarak kullanıldığı bir çalışmada, %0,75'lik aljinat + %0,5'lik kitosan ve %1'lik aljinat + %0,5'lik kitosan karışımları kullanılarak elde edilen boncukların enkapsülasyon etkinlikleri sırasıyla %101,3 ve %98,7 olarak belirlenmiştir. Bununla beraber enkapsülasyon öncesinde faj titresi 9,7-9,9 log pob/mL aralığında iken aljinat-kitosan kapsüllerindeki faj titreleri ortalama 7,8 log pob/g olduğu ve bizim çalışmamızdaki gibi canlılıkta bir miktar düşüş yaşandığı belirtilmiştir (Batalha vd., 2021).

4.3 Püskürterek kurutma yöntemi ile enkapsülasyon

Püskürterek kurutma yöntemi ile farklı sıcaklıklarda ayrı ayrı aljinat ve kitosan maddeleri kullanılarak toz formunda faj preparatlarının üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen tozlar Fotoğraf 4.1 ve Fotoğraf 4.2’de gösterilmiştir.



Fotoğraf 4.1. 90°C (a), 100°C (b) ve 110°C’de (c) üretilen faj içeren aljinat tozları



Fotoğraf 4.2. 90°C (a), 100°C (b) ve 110°C’de (c) üretilen faj içeren kitosan tozları

Sprey kurutucuda 90, 100 ve 110°C giriş sıcaklıklarında üretilen faj içeren aljinat tozlarının enkapsülasyon etkinlikleri sırasıyla $84,70 \pm 0,79$ (8,39 log pob/g); $83,92 \pm 1,24$ (8,31 log pob/g) ve $82,76 \pm 0,39$ (8,20 log pob/g) olarak belirlenmiştir. 3 farklı giriş sıcaklığında üretilen tozların faj titrelerinde başlangıçtaki kaplama çözeltisinin faj titresine göre anlamlı azalmalar meydana gelmiştir ($p < 0,05$). Giriş sıcaklıklarının faj titreleri üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında, 90 ve 100°C arasında önemli bir fark oluşmadığı ($p > 0,05$) ancak 110°C sıcaklıkta diğer iki sıcaklık derecesine göre istatistiksel olarak anlamlı farklar ($p < 0,05$) meydana geldiği belirlenmiştir. Aynı

şartlarda üretilen faj içeren kitosan tozlarının etkinlikleri ve faj titreleri daha düşük bulunmuştur. 90, 100 ve 110°C giriş sıcaklıklarında elde edilen enkapsülasyon etkinlikleri sırasıyla %63,79±1,10 (6,59 log pob/g); %61,30±1,20 (6,33 log pob/g) ve %61,83±1,39 (6,39 log pob/g)'dur. Tüm sıcaklık derecelerinde yapılan kurutma prosesleri sonucunda belirlenen faj canlılığındaki düşüşler, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$). 90°C'de üretilen kitosan tozlarının faj titresi diğer sıcaklıklardan önemli oranda farklılık gösterirken ($p<0,05$), 100 ve 110°C'de elde edilen faj preparatlarının titreleri arasında anlamlı bir fark meydana gelmemiştir ($p>0,05$). Sonuçlar, kaplama maddesi olarak aljinat ve kitosan kullanıldığında enkapsülasyon sonrası faj titresindeki azalmanın sırasıyla 1,55-1,71 log pob/g ve 3,75-4,00 log pob/g aralığında değiştiğini göstermektedir. Bu çalışmada, fajın stabilitesi üzerinde aljinat matrisinin kitosana göre daha üstün bir koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Aljinat kullanılarak faj tozları üretilirken en yüksek enkapsülasyon verimi ortalama %59,57 ile 90°C'de elde edilmiştir. 100 ve 110°C giriş sıcaklıklarındaki verim değerleri ise ortalama %57,29 ve %53,24'tür. Kaplama maddesi olarak kitosan kullanıldığında, elde edilen toz miktarının aljinata göre daha fazla olmasına bağlı olarak daha yüksek enkapsülasyon verim değerleri gözlemlenmiştir. Bu değerler 90, 100 ve 110°C giriş sıcaklıkları için sırasıyla ortalama %61,26; %77,82 ve %70,10 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda püskürterek kurutma sonrasında özellikle aljinat tozlarında elde edilen faj aktivitesi, bazı çalışmalarda bildirilenlere göre daha yüksek bulunmuştur (Choi vd., 2023; Vandenheuvel vd., 2013). Vandenheuvel vd. (2013)'nin çalışmasında, laktoz ve dekstran 35 kaplama maddeleri, fajların püskürterek kurutma yoluyla (hava giriş sıcaklığı 85°C) toz formuna getirilmesinde tatmin edici sonuçlar vermemiştir. *Staphylococcus* fajı (Romulus), bu iki materyal ile kurutma sürecinde hayatta kalamamış ve faj titresi tamamen kaybedilmiştir (8,40 log düşüş). *Pseudomonas* fajı (LUZ19) ise laktoz kullanıldığında 4 log düşüş, dekstran 35 kullanıldığında daha fazla titre kaybı sergilemiştir ve bu değerlerin kabul edilemeyecek derecede yüksek olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, çalışmamızdaki sonuçlara benzer olarak daha yüksek kurutma sıcaklığının faj partiküllerinin canlılığına daha fazla zarar verdiği gösterilmiştir. Acar Soykut vd. (2019), püskürterek kurutma metodu (hava giriş sıcaklığı 90°C) ile kaplama maddesi olarak aljinat kullanarak çeşitli patojen bakterilere özgü fajların

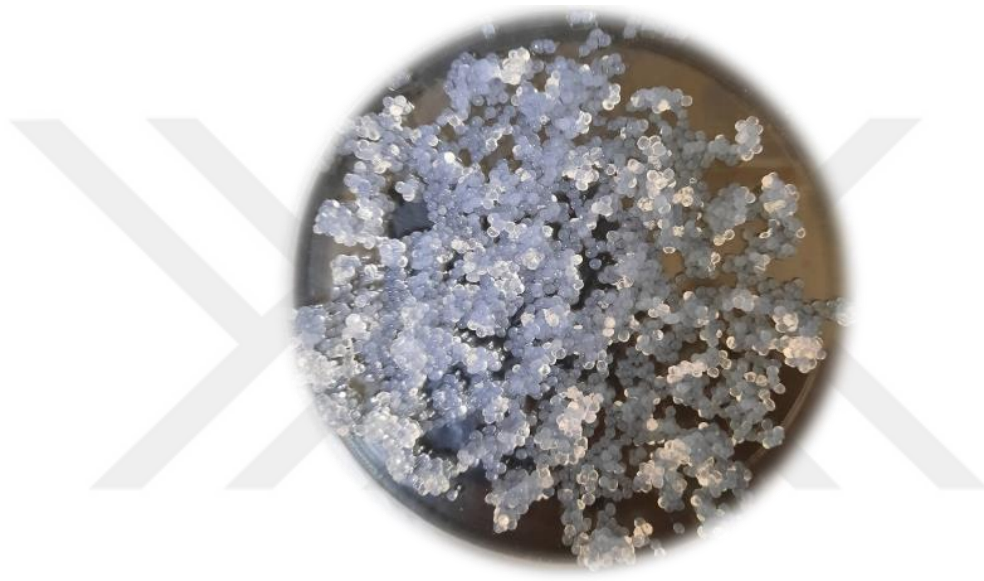
aktivitelerindeki değişimleri araştırmışlardır. *B. subtilis*, *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* fajlarının enkapsülasyon etkinliklerinin ortalama %73,46 ile %97,29 arasında değişiklik gösterdiği bildirilmiştir. Li vd. (2021)'nin çalışmasında ise *P. aeruginosa* bakterisi için bir faj kokteyli 60°C hava giriş sıcaklığı ile %80 (m/m) laktoz ve %20 (m/m) lösin bileşimi kullanılarak sprey kurutucuda toz formuna getirilmiştir. Kurutma sonrası faj titresinde 0,11-1,3 log pob/mL aralığında bir azalma rapor edilmiştir.

Püskürterek kurutma işlemi sırasında fajlar termal strese, dehidrasyona ve kesme gerilimine maruz kalmaktadır. Sıvı damlacıkları katı toz parçacıklarına dönüştürmek için ısıtılmış hava kullanılır. Bu işlem milisaniyeler içinde gerçekleştiğinden ve çözücüyü buharlaştırmak için termal enerji kullanıldığından, fajlara etki eden gerçek termal stres sınırlı da olsa yoğun olmaktadır. Parçacıklar siklon tarafından kurutma havası akışından ayrılıp toplama kabında toplandıktan sonra püskürterek kurutma işleminin sonuna kadar 45-50°C civarındaki çıkış sıcaklığına tabi tutulur. Bu noktada da termal stres önemli hale gelebilmektedir. Sıvı beslemenin nozuldan püskürtülmesi ve küçük damlacıklar halinde atomize edilmesi halinde kesme gerilimi meydana gelir. Yüksek kesme kuvvetleri, faj partiküllerinin btnliğn olumsuz yönde etkileyebilir. Uzun, sert kuyruklar ve kuyruk lifleri gibi hassas yapılara sahip fajların bu kesme kuvvetlerine karşı daha duyarlı olduğu bildirilmektedir (Li vd., 2021; Vandenheuvel vd., 2013). Bu streslerin tümü potansiyel olarak faj canlılığını tehlikeye atabilir ve biyolojik aktivitelerinin yani bakterisidal etkinin kaybına neden olabilir. Çalışmamızda kullanılan SE-P47 faji, uzun kuyruğa sahip olması nedeniyle (Yildirim vd., 2019) dış uyarılarla kolayca büzülebilir ve parçalanabilir, bu da kısmen düşük faj aktivitesine yol açabilir (Choi vd., 2023). Püskürterek kurutma için kullanılan yüksek sıcaklıklar ve kesme hızları sebebiyle faj kapsidindeki protein denatürasyonu, özellikle ikincil yapıdaki değişiklik, proteinleri stabilize eden hidrojen bağlarını oluşturan suyun uzaklaştırılması nedeniyle meydana gelmektedir (Ameri ve Maa, 2006). Proteinleri denatürasyondan korumak için amorf bir faz oluşturabilen ve suyun yerini alarak proteinlerle hidrojen bağı kurabilen bir yardımcı maddenin kullanılması gerekir. Bu durum “su yerine geçme teorisi” olarak da adlandırılır (DePaz vd., 2002).

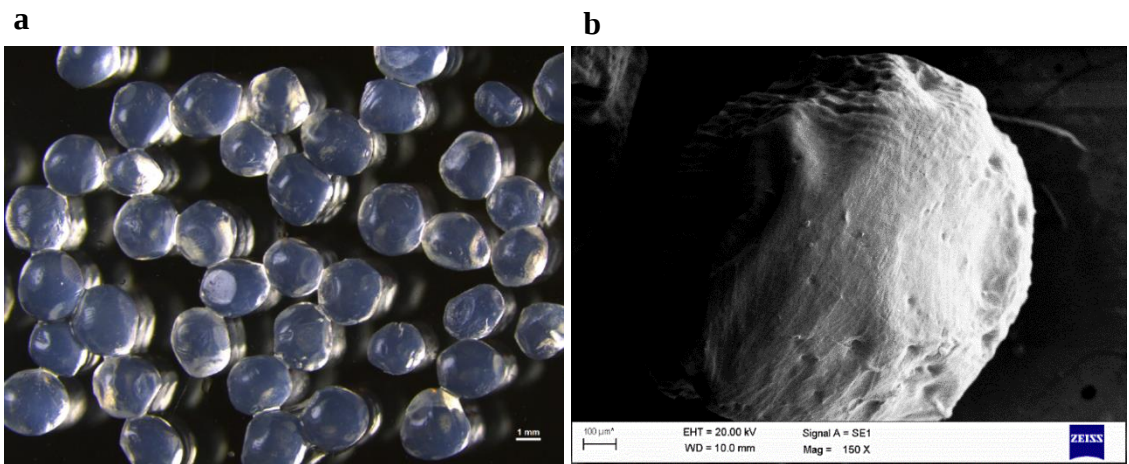
4.4 Ekstrüzyon yöntemiyle üretilen enkapsüle bakteriyofajın karakterizasyonu

4.4.1 Bakteriyofaj içeren kapsüllerin morfolojisi

Optimum koşullar altında üretilen faj yüklü aljinat boncukların morfolojileri, ışık mikroskopunda 1 mm'lik ölçekte ve SEM'de 100 μm 'lik ölçekte incelenmiştir. Petri kutusu içerisindeki boncukların görüntüsü Fotoğraf 4.3'te, ışık mikroskobu ve SEM görüntüleri ise Şekil 4.5'te gösterilmiştir.



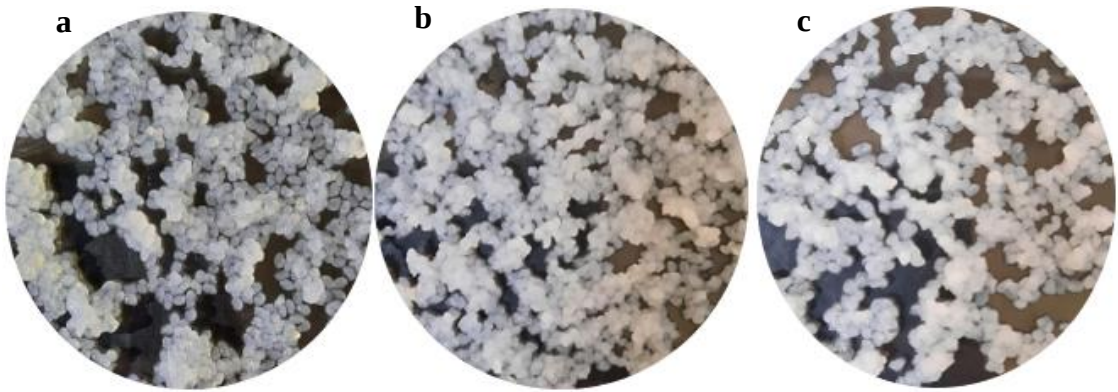
Fotoğraf 4.3. Optimum koşullarda ekstrüzyon yöntemiyle üretilen faj yüklü aljinat boncukları



Şekil 4.3. Aljinat boncuklarının morfolojisi. Optik (a) ve taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (b).

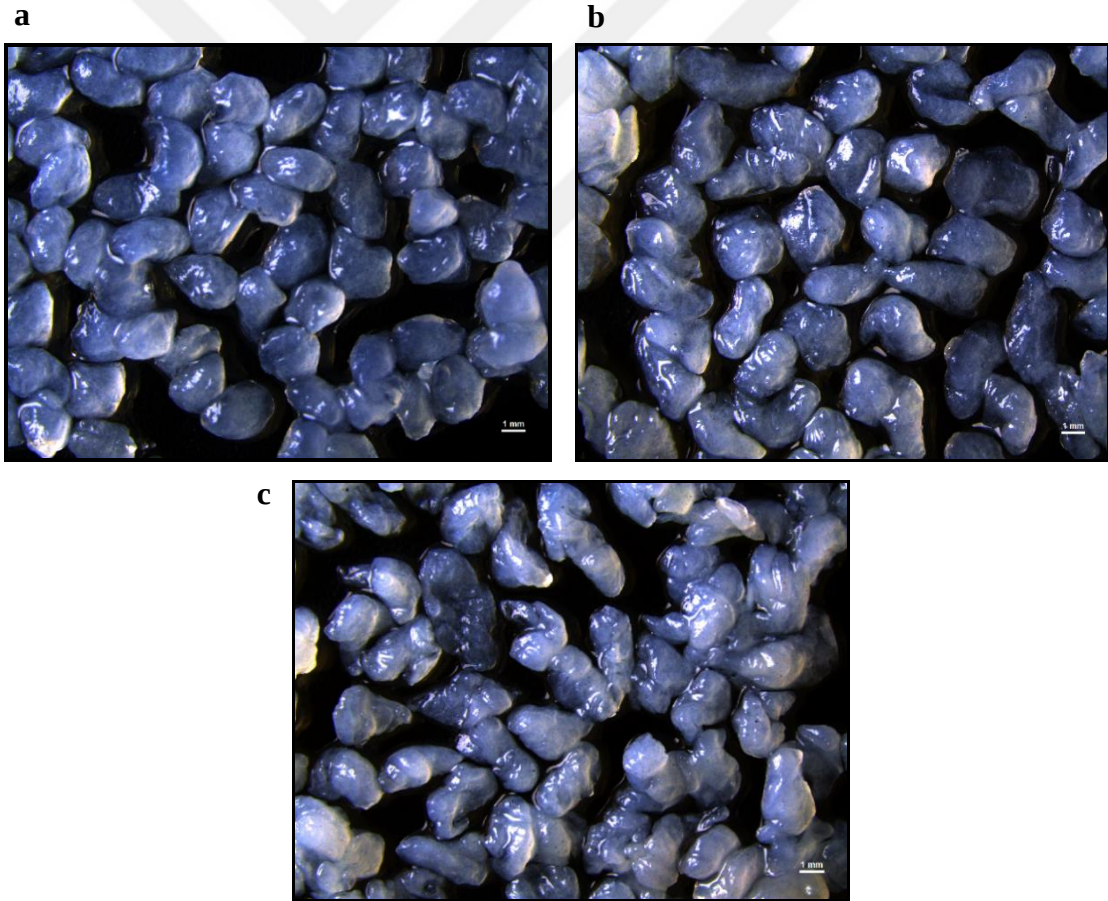
Boncukların küresel ve kısmen pürüzsüz bir yüzeye sahip oldukları gözlemlenmiştir. Üretilen kapsüllerin morfolojisi, kullanılan kaplama malzemesinin konsantrasyonu ve dolayısıyla viskozitesi ile yakından ilişkilidir. Çalışmamızda enkapsülasyon için optimum nokta olarak belirlenen %1,5 konsantrasyondaki aljinat çözeltisinin viskozitesi ortalama 1241,0 cp değerindedir. Aljinat çözeltisinin konsantrasyonu arttıkça viskozitesi de artmaktadır ve konsantrasyona bağlı olarak değişen viskozite, aljinat jelinin şeklini belirlemektedir (Ergin vd., 2021; Kusuktham vd., 2014). Yapılan ön denemelerde, aljinat çözeltisinin konsantrasyonu azaldıkça boncukların küreselliğinin önemli ölçüde azaldığı, düzensiz ve virgül benzeri kuyruklu bir şekle büründüğü gözlemlenmiştir. Küresel boncuk formunun oluşmaması durumu, jelleşme için yeterli karboksil gruplarının bulunmamasına bağlanmaktadır (Kusuktham vd., 2014). Ancak aljinat konsantrasyonunun artmasıyla küresellik artmıştır. Polimer konsantrasyonundaki artışın daha küresel mikrokürelerin üretilmesiyle sonuçlandığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Shi vd., 2013; Tang vd., 2015).

Kaplama maddesi olarak aljinat (%1,5) ve kitosanın (%0,5) farklı oranlarda (0,5:1, 0,75:1 ve 1:1) karışımları kullanılarak üretilen faj içeren kapsüllerin petri kutusu içerisindeki görüntüleri Fotoğraf 4.4'te verilmiştir. Ayrıca kapsüllerin morfolojileri ışık mikroskobu (Şekil 4.4) ve SEM'de (Şekil 4.5) incelenmiştir. Kitosan + aljinat karışımları kullanılarak elde edilen tüm kapsüllerin beyaz renge ve düzensiz yapıya sahip oldukları gözlemlenmiştir. Karışımdaki kitosan oranı arttıkça kapsüllerin yapısı küresellikten uzaklaşmaktadır. Bu durum, mevcut parametrelerle kitosan + aljinat karışımları ile standart bir kapsül üretimi yapılmasını güçleştirmektedir.

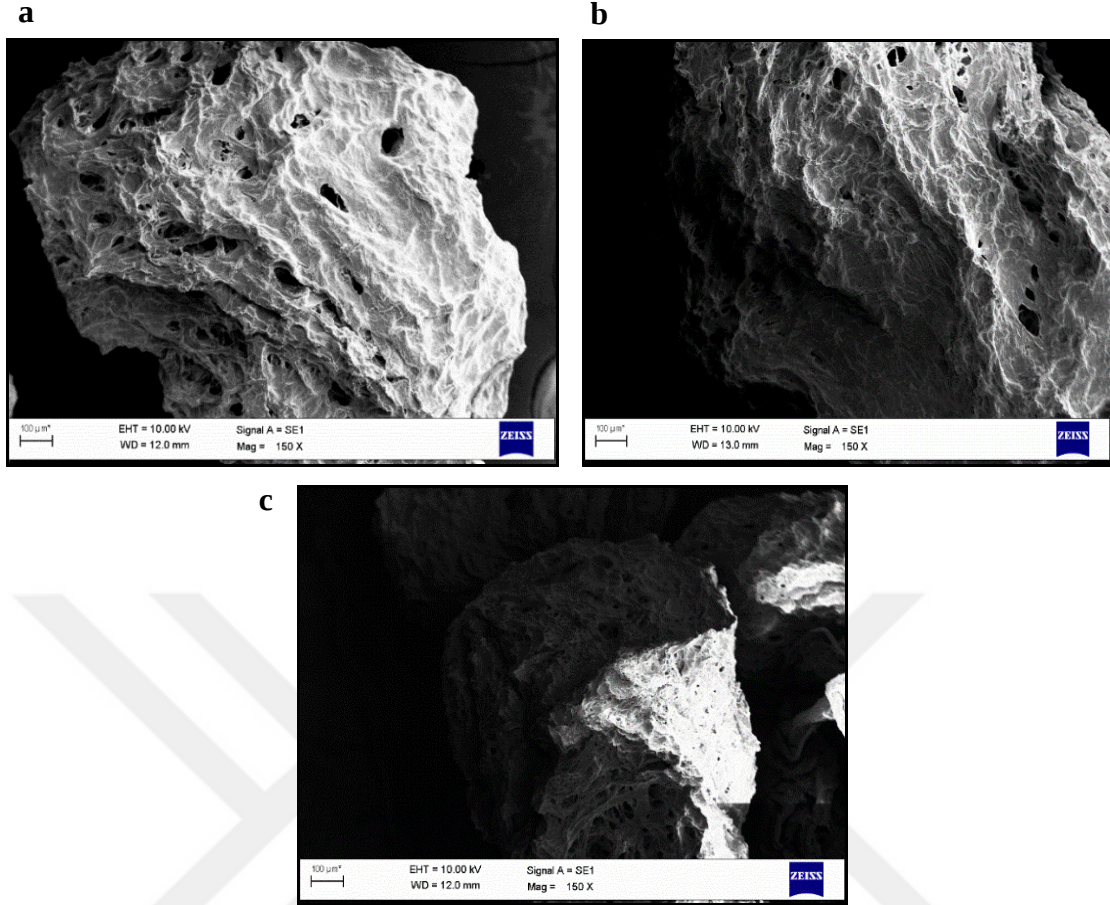


Fotoğraf 4.4. Kitosan (%0,5) + aljinat (%1,5) kapsüllerinin petri kutusundaki görüntüleri; 0,5:1 oranında kitosan + aljinat (a), 0,75:1 oranında kitosan + aljinat (b), 1:1 oranında kitosan + aljinat (c)

Ma vd. (2008)'nin çalışmasında, %2,2 (m/v) faj içeren boncukları kitosan çözeltisi (%0,4; m/v) içerisine daldırılarak boncukların yüzeyinin kaplanması sağlanmıştır. Elde edilen aljinat-kitosan boncuklarının tek düze boyutlarda ve yuvarlatılmış dış yüzeye sahip oldukları gösterilmiştir. Bizim çalışmamızın aksine düzgün yüzeyli boncukların varlığı, kitosanın aljinat boncuklarının kaplanmasında kullanılmasına bağlanmaktadır. Bir başka çalışmada, 1:1 oranında aljinat (%0,75 ve %1) ve kitosan (%0,50) karışımı ile kaplanarak üretilen faj yüklü boncukların küresele yakın formda oldukları belirtilmiştir. Bu çalışmada, kaplama çözeltilerinin viskoziteleri 1590-1733 Pa.s aralığında değişmektedir. Bizim çalışmamızda 0,5:1; 0,75:1 ve 1:1 oranlarında karıştırılarak hazırlanan kitosan + aljinat çözeltilerinin viskoziteleri sırasıyla ortalama 467,13; 326,0 ve 285,0 cp olarak ölçülmüştür. Buna göre, yüksek viskozite değerlerinin küreselliği olumlu anlamda etkilediğinden söz edilebilir (Batalha vd., 2021).



Şekil 4.4. Kitosan (%0,5) + aljinat (%1,5) kapsüllerinin ışık mikroskobu görüntüleri; 0,5:1 oranında kitosan + aljinat (a), 0,75:1 oranında kitosan + aljinat (b), 1:1 oranında kitosan + aljinat (c)



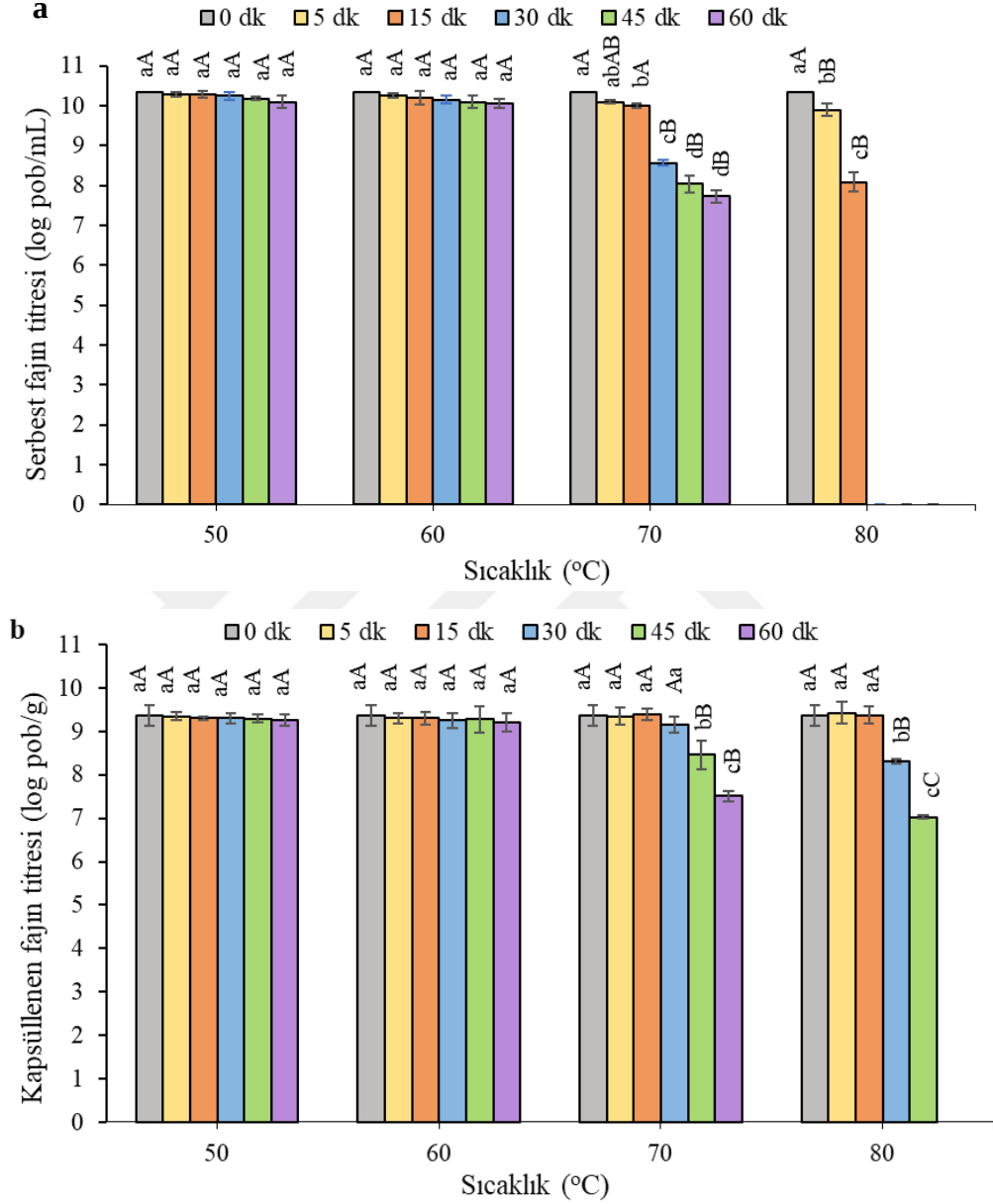
Şekil 4.5. Kitosan (%0,5) + aljinat (%1,5) kapsüllerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri; 0,5:1 oranında kitosan + aljinat (a), 0,75:1 oranında kitosan + aljinat (b), 1:1 oranında kitosan + aljinat (c)

4.3 Serbest ve enkapsüle bakteriyofajların stabilitesi

4.3.1 Sıcaklık ve pH stabilitesi

Birçok fajın asitlik, yüksek sıcaklık, organik çözücüler, enzimler, tuzlar ve ozmotik basınç gibi çevresel faktörlere duyarlı olabileceği bilinmektedir (Choińska-Pulit vd., 2015; Nechaeva, 2002). Yüksek faj titrelerinin sürdürülebilmesi için uygun pH ve sıcaklık değerleri gereklidir (Cooper, 2016). Ek olarak, fajların gıda endüstrisinde özellikle ısıl işleme tabi tutulacak gıdalarda biyokoruyucu olarak kullanılabilmesi için sıcaklığa dayanıklılık esastır. Serbest ve aljinatla kapsüllenen SE-P47 fajlarının termal stabiliteyi (Şekil 4.6), 50-80°C sıcaklık aralığında 5-60 dakika boyunca değerlendirilmiştir. Hem serbest hem de kapsüllenen faj, 50 ve 60°C'de 60 dakika boyunca ısıl işleme tabi tutulduğunda aktivitelerini tamamen korumuştur. Serbest faj titresindeki ilk önemli azalma (0,35 log pob/mL), 70°C'de 15 dakikalık ısıl işlem

sonra gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Serbest faj titresinde en yüksek düşüş 70°C 'de 60 dakikalık ısıl işlemden sonra meydana gelirken ($2,62 \log \text{pob/mL}$) ($p<0,05$); faj, 80°C sıcaklıkta 30 dakika sonra aktivitesini tamamen kaybetmiştir.



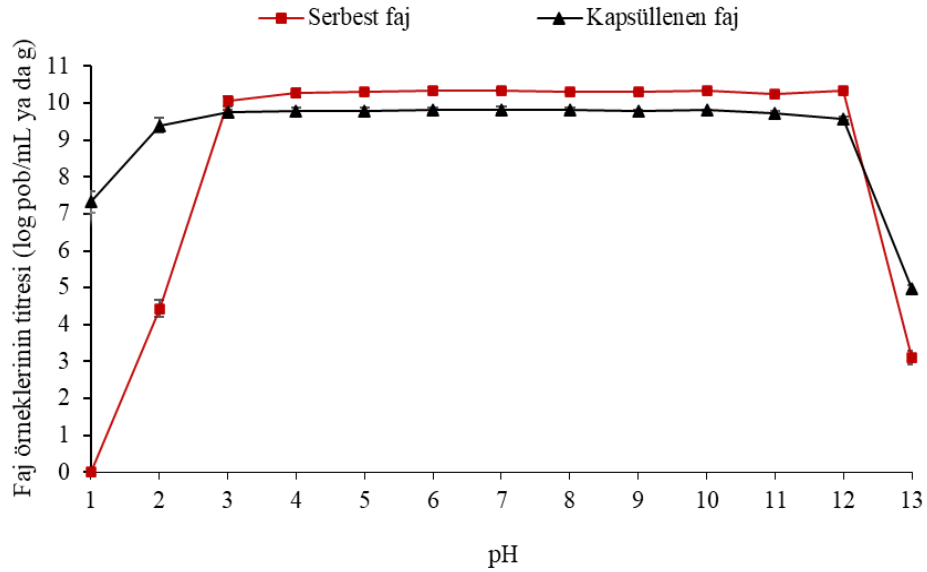
Şekil 4.6. Serbest (a) ve kapsüllenen fajların (b) termal stabilitesi

* farklı küçük harfler, örneklerde her bir sıcaklık derecesinde zamana bağlı olarak ortaya çıkan istatistiksel olarak anlamlı farkları ifade ederken farklı büyük harfler, farklı sıcaklıklarda aynı sürede ortaya çıkan anlamlı farkları ifade etmektedir ($p<0,05$).

Kapsüllenen fajın titresinde meydana gelen ilk azalma, 70°C 'de 45 dakika ısıl işlem sonrasında ($0,9 \log \text{pob/g}$) tespit edilmiştir ($p<0,05$). Serbest fajın aksine, kapsüllenen fajın titresi 80°C 'de 15 dakika işlemten sonra tamamen korunmuştur. Kapsüllenen faj, 80°C 'de 60 dakika sonra aktivitesini kaybetmiştir. Çalışmamızda faj örneklerinin 50, 60,

70 ve 80°C'deki stabiliteleri her zaman dilimi için kendi aralarında da karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalar Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Buna göre, 70°C-5 dk maruz kalma ile 80°C-5 dk maruz kalma arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmazken ($p>0,05$), 70°C-15 dk ile 80°C-15 dk ısı işlem arasına anlamlı bir fark oluşmuştur ($p<0,05$).

Geniş pH stabilitesi, fajların asidik, nötr ve alkali gıdalarda biyokoruyucu olarak kullanım potansiyelini değerlendirmek için olması istenen bir özelliktir. Asidik koşullara karşı dayanıklılık, terapötik uygulamalar için de önem arz etmektedir (Yıldırım vd., 2019). Bu çalışmada, serbest ve kapsüllenen fajlar geniş bir pH aralığında (pH 1-13), 37°C'de 1 saat boyunca tutularak stabiliteleri incelenmiştir (Şekil 4.7). pH 7,5'e ayarlanmış SM tamponu içinde tutulan serbest ve kapsüllenen faj numuneleri kontrol numuneleri olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.7. Serbest ve kapsüllenen fajların pH stabilitesi

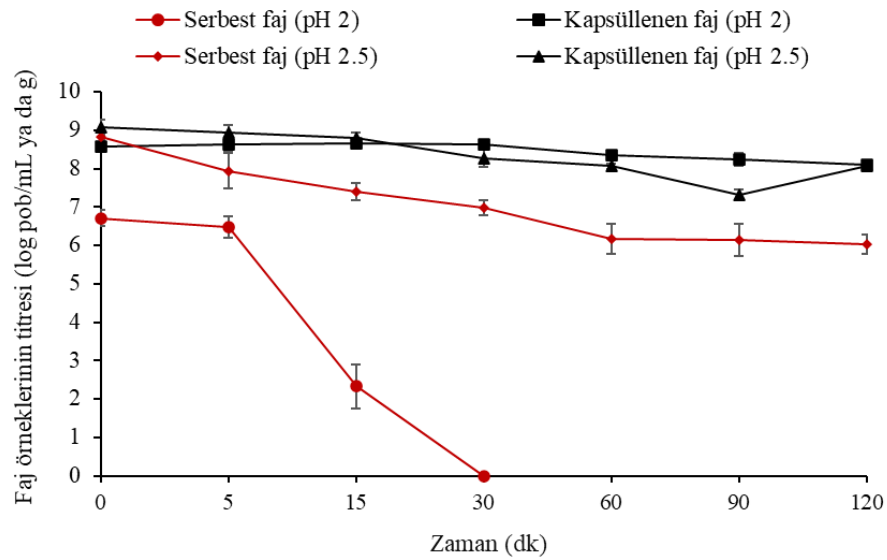
Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kapsüllenen fajın, pH 3-12 aralığında aktivitesini tamamen koruduğu gözlemlenmiştir. pH 2'de, serbest faj titresinde 5,96 log pob/mL'lik bir azalma meydana gelirken ($p<0,05$); kapsüllenen faj titresindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). pH 1 değerindeki ortama 1 saat maruz kalma sonucunda serbest faj, aktivitesini kaybetmesine rağmen kapsüllenen faj yüksek titreye sahiptir. Ayrıca kuvvetli alkali ortam olan pH 13'te de kapsüllenmiş fajlar, canlılıklarını serbest fajlardan daha iyi korumuşlardır. pH 13'te serbest ve kapsüllenen fajların

titresinde sırasıyla 7,25 ve 4,85 log pob/g azalma meydana gelmiştir. Analiz bulguları, yüksek sıcaklık ve ekstrem pH koşullarına karşı aljinatla kapsüllenene fajların serbest fajlara göre daha dirençli olduğunu göstermektedir. Sıcaklık ve pH değerlerine karşı gözlemlenen bu koruyucu etki, aljinatın kalsiyum iyonlarının varlığında hızlı çapraz bağlanmasıyla oluşturulan jel ağ matrisinden kaynaklanan bariyere atfedilebilir. Muhtemelen fajlar ve asitler arasındaki doğrudan temas önlenerek veya geciktirilerek fajların korunması sağlanmıştır (Batalha vd., 2021).

Önceki bazı çalışmalar, yüksek sıcaklık ve ekstrem pH koşullarında serbest fajların canlılığının azaldığını göstermiştir. İslam vd., (2020), pH<4 ile pH>12 değerlerindeki ortamda *Salmonella* LPST94 fajının titresinde önemli düşüşlerin meydana geldiğini ve pH 2 ile pH 3 değerlerinde aktivitesini tamamen kaybettiğini belirtmişlerdir. Aynı çalışmada serbest formdaki faj, 60°C kadar olan sıcaklıklarda yüksek termal stabiliteye sahipken 70°C (yaklaşık 3,5 log pob/mL azalma) ve 80°C'de (yaklaşık 7 log pob/mL azalma) stabilitesi oldukça azalmıştır. Başka bir çalışmada beş farklı *E. coli* fajının serbest formdaki sıcaklık ve pH stabilitesi değerlendirilmiştir. pH 2, 3, 11 ve 12 değerlerinde faj titrelerinde önemli azalmalar olmuş, 70°C ve daha yüksek sıcaklıklarda ise sıcaklık stabiliteyi düşmüştür (Yıldırım vd., 2021). Çalışmamız, ekstrüzyon yöntemiyle aljinat ile kaplamanın fajın yüksek sıcaklıklara, düşük ve yüksek pH değerlerine karşı hayatta kalma direncini artırdığını göstermiştir. Ayrıca elde edilen bulgular, aynı yöntemler kullanılarak fajların kapsüllenmesi üzerine yapılan önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında daha yüksek asit toleransı ve sıcaklık direnci elde edilmiştir. Abdelsattar vd. (2019)'nin çalışmasında, 60 dk boyunca pH 2'ye maruz bırakılan boncukların faj titresinde 1 log pob azalma meydana gelmiştir. Ek olarak boncukların faj titresinde 80°C'de 3 dk içinde 1 log pob azalma gözlemlenmiştir. Aljinat bazlı boncukların 25 ve 37°C'de 30 dk boyunca pH 1,6'ya maruz bırakıldığı bir çalışmada ise faj aktivitesinin 25°C'de kısmen korunduğu ve 37°C'de tamamen kaybolduğu bildirilmiştir (Dini vd., 2012). Literatürde, aljinat ile kapsüllenene fajların alkali ortamda stabilitesini değerlendiren bir araştırmaya rastlanmamıştır. Ancak Petsong vd. (2021), fajın dondurarak kurutma işlemi uygulanarak peynir altı suyu proteini izolatu veya trehaloz ile kaplanması alkali ortamda (pH 9,5) direnci artırdığını rapor etmişlerdir.

4.3.2 Simüle mide ortamında stabilite

S. Enteritidis SE-P47 fajının oral faj tedavisinde kullanılması durumunda hayatta kalma potansiyelini değerlendirmek için serbest ve kapsüllenen formdaki faj, 37°C’de pH değerleri 2,0 ve 2,5’e ayarlanan SGF’de test edilmiştir. Kapsülleme işlemi sayesinde hem pH 2 hem de pH 2,5 değerlerinde SGF’de daha yüksek stabilite elde edildiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.8). pH’nın 2 olduğu SGF’de 120 dakikalık inkübasyondan sonra kapsüllenen faj titresi yaklaşık 1 log pob/g azalırken ($p<0,05$) serbest fajın titresi 30 dakikalık inkübasyondan sonra tespit edilemeyen seviyeye düşmüştür ($p<0,05$). pH 2,5’e ayarlanan SGF’de daha düşük pH değerine göre serbest fajın stabilitesinde artış olduğu saptanmıştır ancak kapsüllenen faj canlılığını daha yüksek oranda korumuştur.



Şekil 4.8. 37°C’de pH 2 ve 2,5’te simüle mide sıvısına maruz bırakıldıktan sonra serbest ve kapsüllenen fajların canlılığı

Tang vd. (2005), aljinatın asit ve pepsin difüzyonunu önemli ölçüde sınırladığını bildirmiştir. Kapsülleme işleminde aljinat ve kalsiyum iyonları tarafından oluşturulan jel ağı, mide koşullarında protonların difüzyon hızını etkili bir şekilde azaltır ve böylece fajın korunması sağlanır (Ma vd., 2008). Ma vd. (2008)’nin çalışmasında, Felix O1 fajı içeren kitosan kaplı aljinat taneciklerinin pH 2 değerindeki SGF’de 30 dakika inkübasyondan sonra canlılığın saptanamayan bir seviyeye düştüğü ancak pH 2,4’te faj canlılığının korunabildiği rapor edilmiştir. Bir başka çalışmada, kitosan kaplı aljinat mikroküreleri 60 dk boyunca SGF’ye maruz bırakıldığında *E. coli* O157:H7 faj titreleri,

pH 2,5 ve 2'de sırasıyla yaklaşık 1 ve 2 log pob/g azalmıştır (Kim vd., 2015). Ayrıca Ergin vd. (2021), optimize koşullar altında üretilen faj Felix O1 mikrokapsüllerinin titresinin, pH değeri 2 olan SGF çözeltisinde 120 dk süreyle inkübe edildikten sonra 1,25–2,02 log pob/g azaldığını belirtmiştir. Çalışmamızdaki bulgular, önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında yüksek bir asit ve pepsin direnci elde edildiğini ve aljinat ile kaplanmış formun serbest forma kıyasla fajı mide koşullarında etkili bir şekilde koruyabileceğini göstermektedir.

4.3.3 Depolama süresince stabilite

4.3.3.1 Canlılık

Faj uygulamalarında yeterli sayıda canlı fajın muhafaza edilebilmesi için saklama koşulları önemlidir (Cooper, 2016). Çalışmamızda, sıvı formdaki fajın ve ekstrüzyon yoluyla geliştirilen aljinat boncukları içindeki fajın buzdolabı sıcaklığında (4°C) ve oda sıcaklığında (25°C) 12 aylık depolama sırasında hayatta kalma yetenekleri karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.5). Elde edilen veriler hem serbest hem de kapsüllenmiş fajların, 4°C'de 12 ay boyunca depolama sırasında biyolojik aktivitelerini tamamen koruduğunu göstermiştir. 12. ayda serbest ve kapsüllenmiş formdaki faj titrelerinde sırasıyla yalnızca 0,17 log pob/mL ve 0,07 log pob/g kayıp meydana gelmiştir ($p>0,05$). 4°C'de serbest ve kapsüllenmiş fajın canlılıkları kendi aralarında karşılaştırıldıklarında da önemli bir fark meydana gelmediği gözlemlenmiştir ($p>0,05$). Serbest faj numunesi titresini 25°C'de 12 ay boyunca ($p>0,05$) korurken, kapsüllenmiş faj numunesinin titresini 10 ve 12 ay sonra sırasıyla 0.79 ve 0.4 log pob/g azalmıştır ($p<0,05$). Elde edilen veriler, *S. Enteritidis*'e özgü SE-P47 fajının kapsüllenmiş formda, 4°C ve 25°C sıcaklık değerlerinde metabolik olarak aktif ve yüksek titre değerlerini koruyarak başarılı bir şekilde muhafaza edilebileceğini göstermektedir. Ayrıca sonuçlarımız enkapsüle SE-P47 fajı için en uygun depolama sıcaklığının 4°C olduğunu göstermiştir. Oda sıcaklığında (25°C) muhafaza, aljinat tanecik yapısının gevşemesine bağlı olarak faj titresinde kısmi bir azalmaya neden olmuştur.

Çizelge 4.5. Farklı sıcaklıklarda depolama boyunca serbest ve kapsüllenen fajların canlılığı (log pob/mL ya da g)

Aylar	4°C		25°C	
	Serbest faj	Kapsüllenen faj	Serbest faj	Kapsüllenen faj
0	10,51±0,15 ^a	10,37±0,07 ^{abcd}	10,51±0,15 ^a	10,37±0,07 ^{ab}
1	10,41±0,07 ^{ab}	10,41±0,05 ^{abcd}	10,45±0,12 ^{ab}	10,38±0,10 ^a
2	10,38±0,10 ^{ab}	10,32±0,05 ^{abcd}	10,22±0,10 ^{bc}	10,33±0,06 ^{ab}
3	10,40±0,15 ^{ab}	10,52±0,12 ^{ab}	10,32±0,10 ^{abc}	10,33±0,09 ^{ab}
4	10,18±0,07 ^b	10,25±0,03 ^{cd}	10,27±0,06 ^{abc}	10,24±0,02 ^{abc}
5	10,43±0,02 ^{ab}	10,34±0,09 ^{abcd}	10,39±0,09 ^{abc}	10,23±0,12 ^{abc}
6	10,36±0,06 ^{ab}	10,44±0,06 ^{abc}	10,46±0,01 ^{ab}	10,27±0,16 ^{abc}
7	10,24±0,16 ^{ab}	10,20±0,09 ^{cd}	10,23±0,11 ^{bc}	10,08±0,10 ^{abcd}
8	10,41±0,02 ^{ab}	10,20±0,04 ^{cd}	10,42±0,05 ^{ab}	10,17±0,12 ^{abc}
9	10,35±0,02 ^{ab}	10,57±0,07 ^a	10,42±0,16 ^{abc}	10,03±0,15 ^{bcd}
10	10,15±0,16 ^b	10,15±0,16 ^d	10,15±0,03 ^c	9,58±0,08 ^e
11	10,17±0,04 ^b	10,22±0,04 ^{cd}	10,34±0,06 ^{abc}	9,81±0,23 ^{de}
12	10,34±0,04 ^{ab}	10,30±0,16 ^{bcd}	10,24±0,04 ^{abc}	9,97±0,11 ^{cd}

*Aynı sütundaki farklı harfler, aylara göre faj örnekleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ifade eder (p<0,05).

Depolama stabilitesi, farklı yapısal özelliklerine bağlı olarak faja göre farklılık gösterebilmektedir. Bununla beraber enkapsülasyon yöntemi, depolama sıcaklığı ve depolama yapılan materyal stabilite üzerinde etkili olmaktadır (Petsong vd., 2019). Daha önce yapılan bir çalışmada, kuru bir toz halinde mikrokapsüllenmiş *Salmonella* faj kokteylinin, 4°C'de 12 hafta boyunca faj titresinde hafif bir kayıpla (yaklaşık 0,5 log pob/g) stabilitenin korunduğu ancak 25°C'de 7 hafta sonra fajların canlılığının tamamen kaybolduğu bildirilmiştir. Faj kokteyli lizati için, 4°C'de 12 hafta sonra 4 log pob/mL'lik bir azalma gözlemlenirken 25°C'de 4 haftalık muhafazanın ardından faj tespit edilememiştir (Petsong vd., 2019). El Haddad vd. (2018)'nin çalışmasında 4°C'de *Staphylococcus*'a ait serbest fajların canlılığı 3 aylık depolamadan sonra önemli ölçüde (6 log pob/mL'den fazla) azalırken mikro aljinat boncukları içinde kapsüllenen fajın titresinin 2 haftalık depolamadan sonra 1,5 log pob/mL, 3 aylık depolamadan sonra ise 4 log pob/mL civarı azaldığı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte -20°'de stabilitesinin daha iyi korunduğu bildirilmiştir. Daha önceki bu çalışmaların sonuçları incelendiğinde, çalışmamızda gerek 4 gerek 25°C'de aljinat matrisinin faj canlılığı üzerinde üstün bir koruma sağladığını söylemek mümkündür.

4.3.3.2 Renk

Renk, gıda kalitesiyle ilgili en önemli özelliklerden biridir ve tüketicinin diğer duyuşsal özelliklere ilişkin yargısını etkileyebilmektedir (Petsong vd., 2019). Serbest ve kapsüllenen faj örneklerinin steril konik tüplerde 15 hafta depolama süresince renk değişimlerinin değerlendirilmesi için ölçülen L^* , a^* , b^* parametreleri kullanılarak hesaplanan toplam renk farkları (ΔE) Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı sıcaklıklarda depolama boyunca serbest ve kapsüllenen faj örneklerinin renk değerleri (ΔE)

Hafta	4°C		25°C	
	Serbest faj	Kapsüllenen faj	Serbest faj	Kapsüllenen faj
1	0,25±0,04 ^b	5,64±0,41 ^{CD}	0,25±0,03 ^c	6,58±0,69 ^{abD}
3	0,38±0,03 ^b	6,89±0,21 ^{aABC}	0,39±0,05 ^{bc}	7,73±0,50 ^{aA}
5	0,45±0,06 ^b	5,80±0,43 ^{bcCD}	0,52±0,11 ^{abc}	6,54±0,27 ^{abABCD}
7	0,35±0,18 ^b	5,85±0,12 ^{bcCD}	0,39±0,17 ^{bc}	6,02±0,22 ^{bBCD}
9	0,73±0,03 ^a	7,10±0,43 ^{aAB}	0,67±0,15 ^{ab}	7,06±0,14 ^{abAB}
12	0,74±0,04 ^a	6,90±0,46 ^{aABC}	0,76±0,05 ^a	7,33±0,69 ^{abA}
15	0,74±0,02 ^a	6,67±0,37 ^{abABCD}	0,73±0,05 ^a	7,70±0,57 ^{aA}

*Aynı sütundaki farklı küçük harfler örneklerin zamana bağlı istatistiksel olarak önemli farklılıklarını ifade ederken aynı satırdaki farklı büyük harfler 4 ve 25°C’de aynı zaman diliminde enkapsüle fajların özelliklerindeki istatistiksel farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

4°C’de, serbest fajın 1 ve 15. hafta ΔE değerleri arasında meydana gelen 0,49 birimlik fark, istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Aynı sıcaklıkta, enkapsüle faj örneklerinde, 1 ve 3. haftada gözlemlenen ΔE değerleri arasındaki 1,25 birimlik fark anlamlı bulunurken ($p<0,05$), 3 ve 15. hafta arasında önemli bir değişiklik meydana gelmemiştir ($p>0,05$). 25°C’de depolanan kapsüllenmiş fajda ilk ve son haftadaki ΔE değerleri göz önüne alındığında oluşan renk farkının önemsiz olduğu saptanmıştır ($p>0,05$). Bununla birlikte, serbest faj örneklerinde ΔE değerleri arasında 0,48 birimlik anlamlı bir fark meydana gelmiştir ($p<0,05$). Ayrıca, 4 ve 25°C’de depolanan kapsül formlarının ΔE değerleri her hafta için ayrı ayrı kendi arasında kıyaslanmıştır ve renkte tüm haftalarda sıcaklığa bağlı önemli bir değişimin olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0,05$). Sonuçlarımız, faj içeren boncuk formun konik tüplerde her iki sıcaklık değerinde de belirli bir süre renk stabilitesini koruyabildiğini göstermektedir.

4.3.3.3 Su aktivitesi

Su aktivitesi (a_w), gıdaların kimyasal, biyokimyasal ve mikrobiyolojik stabilitesi açısından kritik öneme sahip bir parametredir. Gıda güvenliği açısından, mikroorganizmaların büyümesi için suyun kullanılabilirliğini gösterir (Parreidt vd., 2019). Çalışmamızda, serbest ve kapsüllenmiş formdaki fajın steril konik tüplerde, 4 ve 25°C’de 15 hafta depolama boyunca ölçülen su aktivitesi (a_w) değerleri Çizelge 4.7’de verilmiştir. 4°C’de 15 hafta süresince serbest ve kapsüllenen faj örneklerinin a_w değerleri sırasıyla 0,960-0,965 ve 0,957-0,963 arasında değişmektedir. Örnekler, 25°C sıcaklıkta depolandığında ise benzer olarak serbest ve kapsüllenen faj örneklerinin a_w değerleri sırasıyla 0,961-0,964 ve 0,958-0,963 aralığında elde edilmiştir. Bu çalışmada, hem 4°C hem de 25°C’de tüm örnekler için 0. hafta (kontrol) ve 15. hafta arasında anlamlı bir fark oluşmamıştır ($p>0,05$). Ayrıca, 4 ve 25°C’de depolanan kapsül formlarının a_w değerleri kendi arasında kıyaslanmış ve tüm haftalarda sıcaklığa bağlı önemli bir değişimin olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0,05$). Faj içeren aljinat boncuklarında gözlemlenen yüksek a_w değerleri, aljinat matrisinin yüksek oranda serbest suya sahip olduğunu göstermektedir. Hidrofilik aljinat matrisi, hidroksil kalıntıları ile yüksek oranda serbest su molekülünü koordine edebilir (Dini vd., 2014).

Çizelge 4.7. Farklı sıcaklıklarda depolama boyunca serbest ve kapsüllenen faj örneklerinin su aktivitesi (a_w) değerleri

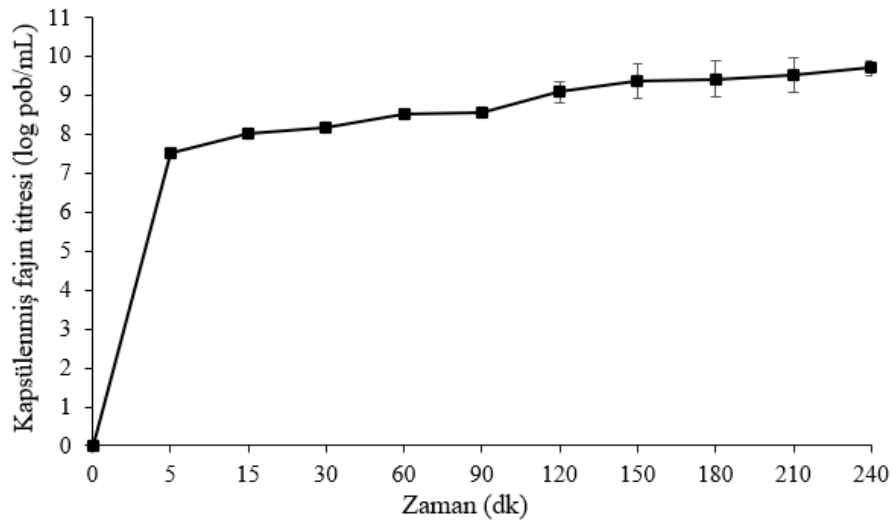
Hafta	4°C		25°C	
	Serbest faj	Kapsüllenen faj	Serbest faj	Kapsüllenen faj
0	0,963±0,002 ^{ab}	0,961±0,001 ^{abABC}	0,963±0,002 ^{ab}	0,961±0,001 ^{abABC}
1	0,961±0,001 ^b	0,963±0,002 ^{aA}	0,962±0,001 ^{ab}	0,961±0,001 ^{bcABC}
3	0,961±0,001 ^b	0,957±0,001 ^{cE}	0,962±0,001 ^{ab}	0,959±0,001 ^{cdCDE}
5	0,960±0,001 ^{ab}	0,959±0,002 ^{bcBCDE}	0,961±0,001 ^b	0,958±0,001 ^{dDE}
7	0,964±0,001 ^a	0,962±0,001 ^{abABC}	0,964±0,002 ^{ab}	0,961±0,001 ^{abABC}
9	0,965±0,001 ^a	0,962±0,001 ^{abAB}	0,964±0,001 ^a	0,963±0,000 ^{aA}
12	0,964±0,001 ^a	0,958±0,001 ^{cDE}	0,963±0,002 ^{ab}	0,960±0,001 ^{bcABCD}
15	0,963±0,001 ^{ab}	0,963±0,001 ^{aA}	0,963±0,001 ^{ab}	0,962±0,001 ^{abABC}

*Aynı sütundaki farklı küçük harfler örneklerin zamana bağlı istatistiksel olarak önemli farklılıklarını ifade ederken aynı satırdaki farklı büyük harfler 4 ve 25°C’de aynı zaman diliminde enkapsüle fajların özelliklerindeki istatistiksel farklılıkları göstermektedir ($p<0,05$).

4.4 Kapsülden bakteriyofajın salınımı

4.4.1 Simüle bağırsak sıvısında salınım

Kapsül yapısı, fajları olumsuz koşullardan etkili bir şekilde korumaya ilaveten fajın istenen bölgede canlı bir biçimde salınmasına da izin vermelidir. Fajın bağırsaklara canlı olarak geçişinin sağlanması ve orada salınması faj tedavisi uygulamalarında önem arz etmektedir. Bu durumda kapsülleme materyalleri, mide sıvısında stabil kalarak fajı asit ve enzimlere karşı korurken zayıf alkali bir bağırsak ortamında da kolayca çözünerek veya şişerek fajı serbest bırakmalıdır (Ma vd., 2008). Çalışmamızda 37°C’de, SIF (pH 6,8) ortamında SE-P47 fajının aljinat taneciklerinden salınım profili incelemiştir. Bu amaçla 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 ve 240 dk inkübasyon süreleri sonunda belirlenen faj titreleri Şekil 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.9. Simüle bağırsak sıvısında (37°C) aljinat boncuklarından faj salınımı

Analizde kullanılan kapsüller içerisindeki fajın titresi MBS içinde kapsüllerin çözündürülmesiyle ortalama 9,72 log pob/g olarak tespit edilmiştir. Bu örnekler, kontrol grubu olarak kabul edilerek fajın salınım profili belirlenirken karşılaştırmalarda kullanılmıştır. Belirtilen inkübasyon süreleri sonunda faj salınımının zamana bağlı olarak artış gösterdiği gözlemlenmiştir. SIF ortamında 5 dakikalık inkübasyonun ardından fajın salınım oranının %77 olduğu belirlenmiştir. Kontrol örneği ile 5 dk sonundaki faj titreleri arasında önemli bir fark vardır ($p<0,05$). 1 saatin sonunda kapsülden ortama salınan faj titresi, ortalama 8,53 log pob/g’a ulaşmıştır ($p<0,05$). SIF

ortamında 2 saat inkübasyonun ardından %93 salınım oranıyla faj titresi ortalama 9,09 log pob/g olup kontrol örneğiyle aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0,05$), yani tam salınıma yaklaşılmıştır. 2-4 saat arasında zamana bağlı olarak kapsülden faj salınımının devam ettiği gözlemlenmiştir. 4 saat inkübasyondan sonra ise salınım oranı %100 (9,79 log pob/g)'e ulaşmıştır ($p>0,05$).

Mikrokapsüllerden benzer bir faj salınım profili Ergin vd. (2021) tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışmada, sodyum aljinat ve sodyum kazeinat içeren 3 farklı mikrokapsülden Felix O1 fajının SIF çözeltisinde 5 dakika içinde salınımının %60 ile %80 arasında değiştiği ve 120 dakika sonrasında salınan faj titrelerinin 6,51-6,68 log pob/g aralığındaki değerler ile kapsülde tutulan faj titresine yaklaştığı rapor edilmiştir. Daha önce yapılan bir başka çalışmada, kitosan-aljinatla kaplanmış Felix O1 fajının SIF çözeltisinde 5 saat inkübasyonunun ardından kademeli olarak neredeyse tam bir salınıma ($1,6 \times 10^7$ pob) ulaşılmıştır (Ma vd., 2008). Dört farklı matrisle kitosan-aljinat kaplı boncukların üretildiği bir çalışmada, 1 saatlik inkübasyonun sonunda 5,3-5,8 log pob/mL aralığında, 5 saatlik inkübasyonun sonunda ise 7,4-7,5 log pob/mL aralığında faj titresi elde edildiği ve tam olarak salınıma yaklaşıldığı bildirilmiştir (Abdelsattar vd., 2019).

Enkapsüle virüslerin hücre ortamında salınımı birçok yolla tetiklenebilir. Bunlar pH, sıcaklık ve basınç değişikliği, polimerlerin enzimler veya organizmalar tarafından parçalanması veya kesme kuvvetlerinin neden olduğu parçalanma olarak sıralanabilir (Wang ve Sabour, 2010). Aljinat boncuklarından salınımın incelendiği daha önceki çalışmalara göre, düşük pH değerine sahip çözeltelerde aljinat taneciklerinden makromoleküllerin salınması önemli ölçüde azaltılır ve bu da aljinat matrisinin bir oral dağıtım sisteminin geliştirilmesinde avantajlı olmasını sağlar. Aljinat molekülleri mide ortamı gibi düşük pH değerlerinde büzülme ve daha yüksek pH değerlerinde (ince bağırsak ortamı gibi) çözünme eğilimindedir (Chen vd., 2004). Böylece mide ortamındaki asit ve enzimlerin zararlı etkilerinden korunan kapsüllenmiş faj, bağırsaklarda serbest forma geçebilmektedir. George ve Abraham (2006)'ne göre; aljinat-Ca jel matrislerinde kapsüllenmiş protein yapıda moleküller iki mekanizma ile salınabilmektedir. Bu mekanizmalar: (1) proteinin polimer ağının gözeneklerinden difüzyonu ve (2) polimerik ağın bozulmasıdır. Jel ağının bozulması, kapsüllenmiş fajın hızla salınmasına neden olabilmektedir. Çalışmamızda SIF ortamında 5 dakika içinde

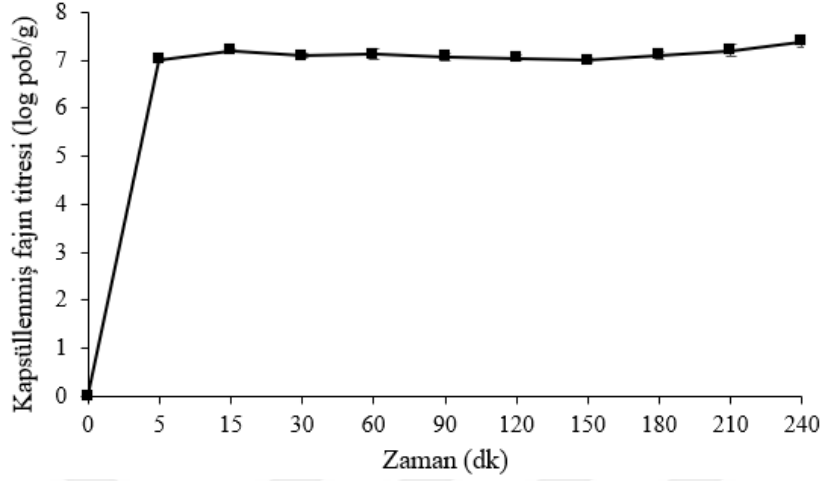
gözlemlenen yüksek faj titresi göz önüne alındığında fajın salınımı polimerik ağın bozulmasına bağlanmaktadır. Ayrıca, aljinatla kaplanan SE-P47 fajının bağırsak ortamında hızlı salınımı ve uzun süreli aktivitesini koruması, konakçıyı öldürme kabiliyetinde muhtemel bir azalmanın önüne geçeceği ve faj direnci gelişimini azaltma potansiyeline sahip olacağı düşünülmektedir.

Polimerik bir materyalin vücuttaki mukozal membrana yapışması anlamına gelen mukoadezyon, özellikle farmasötik araştırmalarda büyük ilgi görmektedir. Mukoadezif ilaç dağıtım sistemleri, bağırsakların bir kısmına veya diğer mukozalara (bukkal kavite, nazal, vb.) yapışacak şekilde tasarlanır ve ilacın rezorpsiyon bölgesinde kalma süresini uzatıp biyoyararlanımı artırarak çalışırlar (Cook vd., 2017). Karboksil uç gruplarına sahip anyonik bir polimer olan aljinat, iyi bir mukoadezif ajandır. Yapılan çalışmalar; polistiren, kitosan, karboksimetilselüloz ve poli(laktik asit) gibi polimerlerle karşılaştırıldığında aljinatın en yüksek mukoadezif kuvvete sahip olduğunu göstermiştir (Ch'Ng vd., 1985). Bu nedenle aljinat, mide-bağırsak sistemi gibi mukozal dokularda ilaçlar için potansiyel bir dağıtım aracı olarak görülmektedir.

4.4.2 Süt içerisinde salınım

Enkapsülasyon ile üretilen partiküller, gıdaya uygulandığında fajın gıda içerisinde kendiliğinden salınması, faj dağıtımı ve biyokoruyucu etkinin sağlanabilmesi için önemlidir (González-Menéndez vd., 2018). Bu çalışmada, kapsüllenen faj biyokoruyucu ajan rolüyle model gıda olarak süt içerisinde kullanılacağı için 25°C'de yarım yağlı UHT süt içinde aljinat boncuklarından zamana bağlı faj salınımı incelenmiştir (Şekil 4.13). Süt içinde kapsüllerden salınarak serbest forma geçen faj sayısı, biyokoruyucu ajan olarak kullanımı açısından oldukça önemlidir. Faj titresi ne kadar fazla olursa hedef patojen bakteri üzerindeki litik aktivitenin o kadar yüksek olması beklenir. Kapsüllenen SE-P47 fajının titresi, MBS içinde boncukların çözündürülmesiyle ortalama 9,84 log pob/g olarak bulunmuş olup bu örnekler kontrol grubu olarak salınım yüzdesinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Faj içeren kapsüllerin süt içinde 5 dk inkübasyonu sonrasında %71,31 salınım ile elde edilen 7,02 log pob/g faj titresi, hızlı bir salınım gerçekleştiğini göstermektedir. 5 ile 210 dk arasında sütte salınan fajın titresinde anlamlı bir fark meydana gelmemiştir ($p>0,05$). Süt içinde 240 dk inkübasyonun

ardından %75 salınım ile faj titresi ortalama 7,38 log pob/g'a ulaşmıştır ve diğer zaman dilimleri ile karşılaştırıldığında önemli bir artış elde edilmiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.10. Yarım yağlı sütte (25°C) aljinat boncuklarından faj salınımı

Ayrıca, çalışmamızda yapılan ön denemelerde aynı şartlarda, tam yağlı (%3,5 yağlı) süt örneklerinde faj salınımı incelenmiştir. 5 ve 240 dk sonunda elde edilen faj titreleri %66,78 salınım ile sırasıyla ortalama 6,18 ve 6,16 log pob/mL (MBS içinde kapsüllerden salınan faj titresi ortalama 9,23 log pob/mL) olarak belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, süütün yağ oranı arttıkça faj salınımının azaldığını göstermektedir.

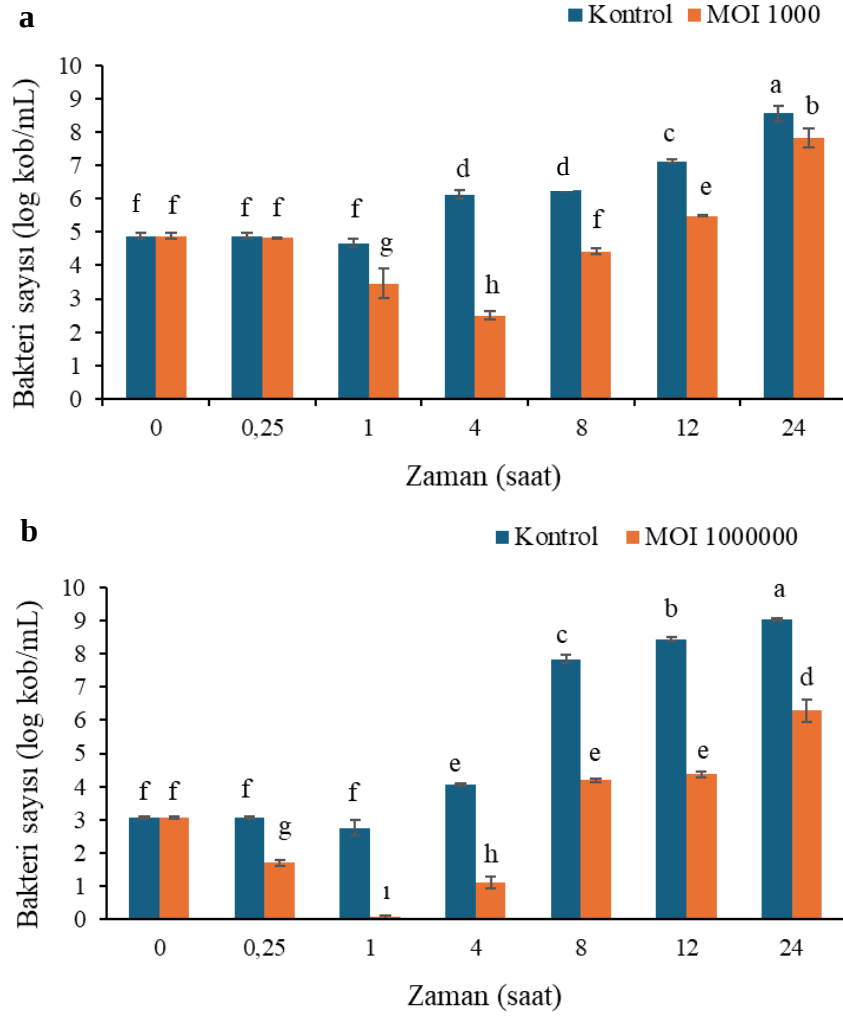
Sodyum aljinat, süt proteini, süksinik asit ve kalsiyum hidrojen fosfat dihidrat karışımı ile sprey kurutucuda kapsüllenen *E. coli* K5 fajlarının yağsız (%0,3 yağlı) ve tam yağlı (%3,5 yağlı) süt örneklerinde stabilitesinin korunamadığını bildiren çalışmanın (Schubert vd., 2022) aksine bizim çalışmamızda 4 saat boyunca aljinat boncuklarından salınan fajlarda yüksek canlılık elde edilip stabilitenin korunduğu gösterilmiştir. Literatürde enkapsüle fajın sütte hayatta kalımı veya salınım profiline dair başka bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Sadece kapsüllenen probiyotik bakterilerin süt ve ürünlerinde stabilitelerinin değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur. Hansen vd., (2002), süt içinde (4°C) probiyotik bakteri yüklü aljinat mikrokürelerinin stabilitesini değerlendirdikleri çalışmasında, 12. günde mikrokapsüle *Bifidobacterium longum* Bb-46 bakterisinde (başlangıç bakteri yükü 4×10^7 kob/mL) 100 kat azalma olurken mikrokapsüle *B. lactis* Bb-12 bakterisi (başlangıç bakteri yükü 2×10^8 kob/mL) aktivitesini sürdürmüştür. Krasaekoopt vd. (2004), kitosan kaplı aljinat taneciklerinde

kapsüllenmiş probiyotik bakterilerin (*Lactobacillus acidophilus* 547, *L. casei* 01 ve *B. bifidum* 1994) UHT sütte hayatta kalımlarını incelemişlerdir. Bu çalışmada, kapsüllenmiş bakterilerin serbest hücrelere göre yaklaşık 1 log daha yüksek bir hayatta kalım sergiledikleri rapor edilmiştir.

4.5 Enkapsüle bakteriyofajın *S. Enteritidis*'e karşı litik aktivitesinin belirlenmesi

4.5.1 Simüle bağırsak sıvısında litik aktivite

Enkapsüle fajın *S. Enteritidis* METU-S1-411'e karşı litik aktivitesi, 37°C'de SIF ortamında MOI 1000 ve 100000'de 15. dk (0,25 saat), 1., 4., 8., 12. ve 24. saatlerde belirlenmiştir (Şekil 4.11). SIF'da 24 saat boyunca aljinat boncuklarından salınan fajın titresini ortalama 8,49 log kob/mL'dir. Analiz başlangıcında (kontrolde) 10^3 veya 10^5 kob/mL olarak ayarlanan bakteri yükünün zamana bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir. MOI 1000'de bakteri sayısında 0,07-3,63 log kob/mL aralığında azalma meydana geldiği belirlenmiştir ve log azalmaları, 15. dk hariç tüm zaman dilimleri için kontrol grubu (sadece *S. Enteritidis* içeren SIF) ile kıyaslandığında anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). En yüksek log azalması (3,63 log kob/mL) 4. saatte elde edilmiştir ancak sonrasında bakteri sayısında artış meydana gelmiştir. MOI 100000'de yapılan analizlerde, *S. Enteritidis* sayısında en düşük (1,37 log kob/mL) ve en yüksek (4,09 log kob/mL) log azalmaları sırasıyla inkübasyon işleminin 15. dk ile 12. saatinde gözlenmiştir ($p<0,05$). MOI 1000'e göre başlangıç bakteri sayısının düşük olmasına bağlı olarak kapsüller daha iyi bir litik aktivite sergilemişlerdir. 1 saat inkübasyonun ardından bakteri sayısı tespit edilemeyecek seviyelere düşse de 4. saatte bakterinin tekrar çoğaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum 1. saat sonunda hasarlı hücrelerin tespit edilememesi ve ilerleyen zaman diliminde bu bakterilerin aktif üreme sürecine girmiş olmalarına bağlanmaktadır. 24 saat sonunda bakteri sayısı, faj içeren boncuklarla muamele edilmeyen örneklerde ortalama 9,06 log kob/mL iken faj içeren boncukların ilave edildiği SIF ortamında ortalama 6,29 log kob/mL bulunmuştur.



Şekil 4.11. Kapsüllenen fajın simüle bağırsak sıvısında (37°C) *S. Enteritidis*'e karşı MOI 1000 (a) ve MOI 100000 (b)'de litik aktivitesi

Kapsüllenen fajın litik aktivitesinin SIF ortamında (37°C) MOI 0,01'de değerlendirildiği bir çalışmada, *Salmonella*'nın inhibe edilebildiği ve canlı bakteri sayısının 2 saatte yaklaşık 1 log kob/mL azaldığı rapor edilmiştir. Lizis süresindeki artışla birlikte, kapsüllenmiş faj grubundaki örneklerde inhibe edilen bakteri sayısı artmış ve 6. saatte bakteri sayısındaki azalma yaklaşık 2 log kob/mL'ye ulaşmıştır (Zhou vd., 2022). Literatürde enkapsüle fajın SIF ortamında tedavi edici etkisinin değerlendirildiği başka çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte, kapsüllenmiş fajın hücre dışında konakçı bakteriyi inhibe etme yeteneği besiyeri ortamında da değerlendirilebilmektedir. Vinner vd. (2019)'nin çalışmasında, 10^4 pob/mL'lik dozlarda kapsüllenmiş fajların LB besiyerine eklenmesi, başlangıçta 10^8 kob/mL seviyesinde olan *E. coli* bakteri kültürlerinin optik yoğunluğunda ilk saat boyunca sürekli bir artışa ve ardından bir düşüşe yol açtığı belirlenmiştir. 10^2 ve 10^4 pob/mL'de düşük faj dozları

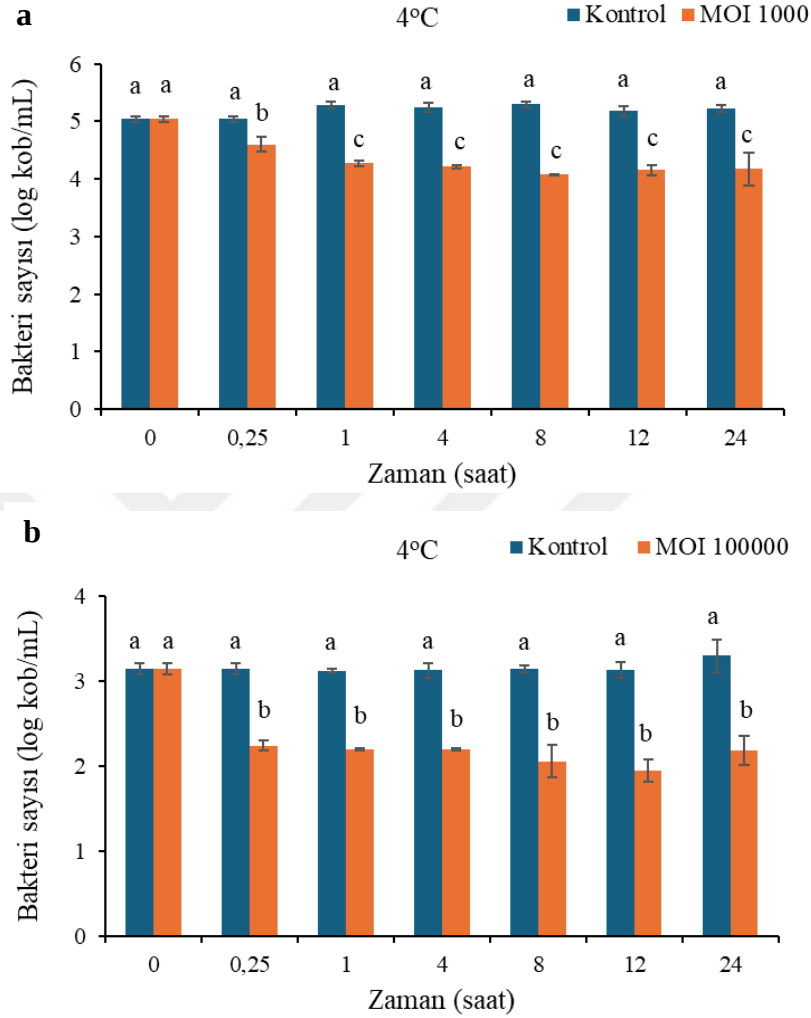
ilave edilen ortamda kültürlerdeki faj amplifikasyonunun, 10^6 ve 10^8 pob/mL dozlarının eklendiği kültürlerle göre geciktiği dolayısıyla kullanılan farklı faj dozlarının litik aktiviteyi etkilediği ortaya konmuştur. Bu çalışmalara ilaveten, farklı tekniklerle kapsüllenen fajların civciv, tavuk, domuz gibi hayvanlarda patojen kolonizasyonunu azaltmada etkili bir şekilde kullanıldığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Gomez-Garcia vd., 2021; Mao vd., 2023; Zhang vd., 2023).

4.5.2 Süt içerisinde litik aktivite

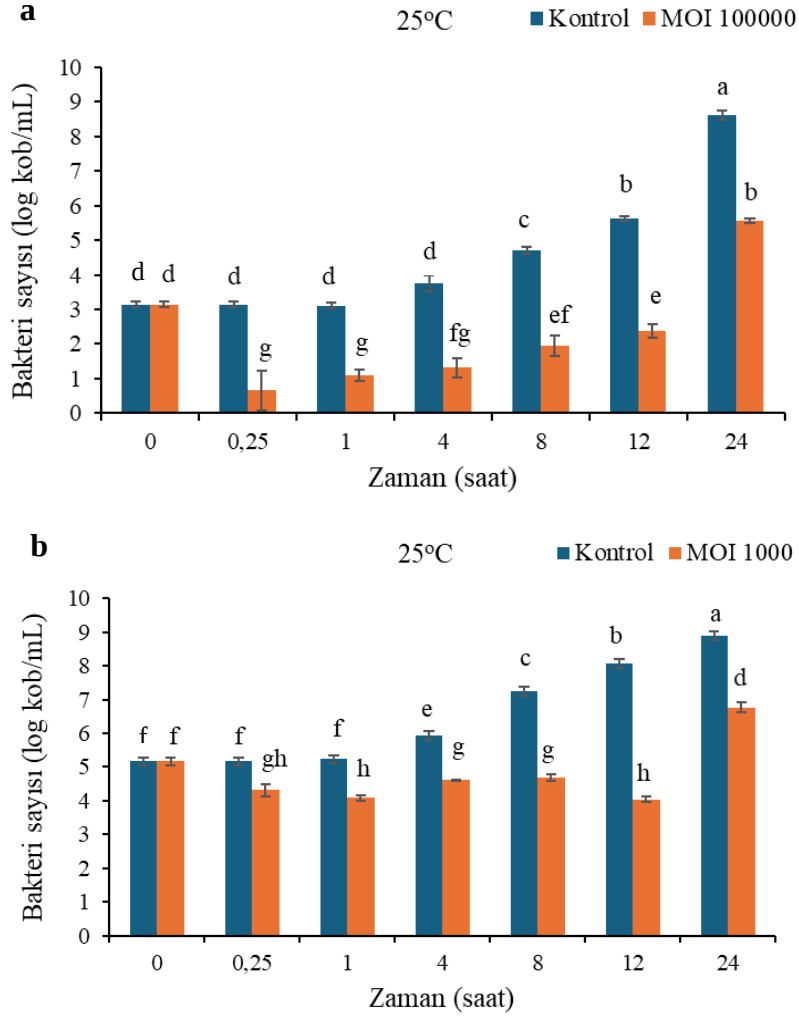
Süt ve ürünleri, toplumda yaygın olarak tüketilen gıdalardır ve *Salmonella* gibi gıda kaynaklı patojenler tarafından kolayca kontamine olarak gıda kaynaklı hastalıklara yol açabilmektedir (Zhao vd., 2023). Kapsüllenen SE-P47 fajının farklı sıcaklıklarda gıda matrisinde *S. Enteritidis* METU-S1-411 üzerindeki antibakteriyel etkisini araştırmak için model olarak yarım yağlı süt kullanılmıştır. Süt; karbonhidrat, protein, lipit, vitamin ve mineral içeriği bakımından mikroorganizmalar için besleyici bir ortamdır. Bundan dolayı, sütün mikroflorasında bozulmaya neden olan çeşitli mikroorganizmalar bulunabilir (Claeys vd., 2013). Bu mikroorganizmaları elimine etmek için analizlerde, UHT yöntemiyle sterilize edilmiş süt örnekleri kullanılmıştır. Litik aktiviteyi belirlemek için paketlenme ve depolama öncesinde gıda işleme koşullarını simüle etmek için oda sıcaklığı ve depolama sıcaklığını temsil etmek üzere sırasıyla 25 ve 4°C seçilmiştir. Analizler MOI değeri 1000 ve 100000'de, 24 saat süresince yürütülmüştür. Elde edilen bulgular Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te sunulmuştur.

İnkübasyon işleminin 15. dk (0,25. saat)'sında, 1, 4, 8, 12 ve 24. saatlerinde enkapsüle faj ilave edilen süt örneklerinde aljinat boncuklarından salınan fajın titresi ortalama 8,18 log pob/mL olarak bulunmuştur. 4°C'de MOI 1000 ve 100000'de meydana gelen log azalmalarının sırasıyla 0,45-1,22 log kob/mL ve 0,91-1,18 log kob/mL aralığında olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). 4°C'de enkapsüle faj ile muamele edilen örnekler ve kontrol örneklerinin bakteri sayıları arasında anlamlı bir fark elde edilmiştir ($p < 0,05$). Ancak enkapsüle faja maruz bırakılan örneklerin bakteri sayıları, zamana bağlı olarak kendi içinde karşılaştırıldığında önemli bir fark meydana gelmediği gözlemlenmiştir ($p > 0,05$). 25°C'de ise MOI 1000 ve 100000'de bakteri sayılarında sırasıyla 0,85-4,03 log kob/mL ve 2,01-3,27 log kob/mL aralığında düşüş elde edilmiştir ($p < 0,05$). 25°C'de enkapsüle faj ilave edilmiş süt örnekleri ve kontrol örneklerinin bakteri yükleri

arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Sütte kapsüllenen fajın litik aktivitesinin iki MOI değerinde de 25°C’de 4°C’ye göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.12. Enkapsüle fajın süt içinde *S. Enteritidis* METU-S1-411’e karşı 4°C’de MOI değeri 1000 (a) ve 100000 (b)’de litik aktivitesi



Şekil 4.13. Kapsüllenen fajın süt içinde *S. Enteritidis* METU-S1-411'e karşı 25°C'de MOI değeri 1000 (a) ve 100000 (b)'de litik aktivitesi

Daha önce yapılan bir çalışmada, MOI 100 ve 1000 değerlerine göre *S. Enteritidis* veya *S. Typhimurium* et yüzeyine aşılandıktan sonra liyofilizasyon ile mikrokapsüllenmiş faj kokteyli çiğ tavuk etinin her yerine eşit miktarda serpilmiştir. Liyofilize faj tozu uygulamasında, 4°C'de 6 günlük depolama sonunda MOI 100 ve 1000 değerlerine göre aşılana örneklerde sırasıyla 1,86 log kob/cm² ve 2,18 log kob/cm² azalma gözlemlenmiştir. Yüksek MOI değerinde bakteri sayısında daha fazla düşüş elde edilmiştir (Sezer ve Boyacı, 2024). Bizim çalışmamızda da 25°C'de yürütülen analizlerde 12. saat hariç MOI 100000'de MOI 1000 değerine göre daha yüksek log azalmaları meydana gelmiştir. Genellikle yüksek MOI değerlerinin yüksek faj etkinliği sağladığı bildirilse de ortamdaki bakteri sayısının düşük olması, bakteri ve fajın karşılaşmasını olumsuz etkileyerek fajın litik performansının azalmasına da neden

olabilmektedir. Dolayısıyla ortamda konakçı bakteri sayısı fazla olduğunda faj daha yüksek litik aktivite sergileyebilmektedir (Huang vd., 2018; Spricigo vd., 2013).

Mikrokapsüllenmiş faj kokteylinin *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium*'u kontrol etmedeki etkinliğinin değerlendirildiği bir başka çalışmada, faj içeren tozlar (10^8 pob/g), daha önce 10^5 log kob seviyesinde *S. Enteritidis* veya *S. Typhimurium* ile aşılana steril kilitli torba içindeki her bir tavuk parçasına ve ayçiçeği filizine serpilerek uygulanmıştır. Kontrol grubundaki çiğ tavuk eti ve ayçiçeği filizinde 4°C'de 4 günlük depolama sırasında *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* sayısının sırasıyla 9 log kob/cm² ve 7 log kob/g olduğu gözlenmiştir. Faj kokteyli tozu uygulanan çiğ tavuk etinde, 4 günlük depolamanın ardından *S. Enteritidis*'te 0,57 log kob/cm² ve *S. Typhimurium*'da 1,78 log kob/cm² azalma meydana gelmiştir. Ayçiçeği filizinde ise *S. Enteritidis*'te 0,86 log kob/g ve *S. Typhimurium*'da 1,2 log kob/g azalma olmuştur. *S. Enteritidis* bakterisi için gözlemlenen canlılık kaybı çalışmamızdaki bulgularla benzerlik göstermektedir (Petsong vd., 2019).

Li vd. (2021)'nin *Salmonella*'ya özgü T156 fajını ekstrüzyon metodu ile kapsülleyerek kuruttukları çalışmalarında, yağsız süt ve marulda litik aktivite belirlenmiştir. 10^3 ve 10^4 kob/mL seviyelerinde *S. Typhimurium* ile aşılana gıda örneklerine mikrokapsüllenmiş fajlar, mikrokürelere kırıcı çözeltide çözündürölüp SM tamponunda yeniden süspanse edilerek uygulanmıştır. Çalışmadan elde edilen verilere göre; sütte MOI 1000'de 4°C ve 25°C sıcaklıklarda 12 saatlik inkübasyonun ardından *S. Typhimurium* sayısında sırasıyla 0,65 ve 4,15 log kob/mL aralığında azalma meydana gelmiştir. MOI 10000'de aynı şartlarda 4 ve 25°C'de bakteri sayılarında sırasıyla 0,91 ve 4,73 log kob/mL azalma elde edilmiştir. Marul örneklerinde 12 saatlik inkübasyonun ardından MOI 1000'de 4 ve 25°C'de *S. Typhimurium* sayısında sırasıyla 0,52 log ve 2,49 log kob/mL, MOI 10000'de 0,74 ve 3,18 log kob/mL azalma sağladığı gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda model gıda olarak kullanılan yarım yağlı süt, daha önceki çalışmalarda kullanılan gıda matrislerinden farklıdır. Elde edilen bulgular, önceki çalışmalarla karşılaştırılabilir olsa da başta kullanılan faj olmak üzere, enkapsülasyon koşulları ve gıda örneğine bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilmesi beklenen bir durumdur. 4°C sıcaklıkta, enkapsüle faj uygulaması yapılan yarım yağlı sütteki bakteri sayısındaki

düşüşlerin daha önce yağsız sütte yapılan çalışmalarda elde edilen veriler ile benzerlik gösterdiği ancak 25°C’de elde edilen bakteri sayısındaki düşüşlerin, önceki çalışmalara göre nispeten düşük olduğu gözlemlenmiştir (Choi vd., 2023; Li vd., 2021). Gıdada bulunan besin maddeleri (proteinler, yağlar, şekerler ve inorganik tuzlar) bakteri büyümesi için arzu edilen bir ortam sağlasa da özellikle yağ bileşeni bakteri ve faj arasındaki etkileşimleri önleyerek/kısıtlayarak faj enfeksiyonunu etkileyebilir (González-Menéndez vd., 2018; Zhao vd., 2023). Faj litik döngüsünün ilk adımı olan faj adsorpsiyonu, muhtemelen bakteri hücrelerinin aglütinasyonuna neden olan süt bileşenleri tarafından engellenmektedir (Angelopoulou vd., 2019). Dolayısıyla, fajların gıda matrisi boyunca yayılma potansiyelleri litik aktivite üzerinde etkili olmaktadır (Spricigo vd., 2013). Bu çalışmada, yarım yağlı sütte özellikle yağ globüllerinin varlığının sütte faj enfeksiyonunu azalttığı düşünülmektedir. Bu durum, süt içinde aljinat boncuklarından faj salınımının incelendiği bölümde yağ oranındaki artışın faj salınımını olumsuz yönde etkilediği belirtilmiştir.

Çalışmamızda yarım yağlı sütte, 4 ve 25°C’de değerlendirilen antibakteriyel aktivitede düşük sıcaklıkta daha düşük log azalmaları meydana gelmiştir. Buzdolabı sıcaklıklarında düşük antimikrobiyal aktivite, daha önce yapılan bazı çalışmalarda da gözlemlenmiştir (Choi vd., 2023; Li vd., 2021). Sıvı formdaki fajın süt, sosis ve marulda biyokoruyucu olarak değerlendirildiği bir çalışmada da benzer olarak, 4 ve 28°C’deki faj etkinlikleri karşılaştırıldığında, 4°C’de nispeten daha düşük etkinlik olduğu rapor edilmiştir (Huang vd., 2018). Genel olarak düşük sıcaklıklar, faj tarafından indüklenen bakteriyel lizis oranını azaltır ve ilk hücre lizisi süresini nispeten artırır (Choi vd., 2023). Bu durum, 4°C’de konakçı bakterilerin çoğalmasının kısıtlanmış olmasına bağlanmaktadır. Çünkü faj etkinliği konakçı bakterilerin varlığına bağlıdır ve bakterinin gelişiminin kısıtlanmasıyla fajın etkinliğinde azalma meydana gelebilmektedir.

Büyük ve hassas virion yapılarına ve uzun kuyruklara sahip fajların, farklı stres türlerine karşı daha duyarlı olduğu öne sürülmektedir. Yapılarında meydana gelebilecek küçük bir hasar fajın bulaşıcı olmasını engelleyebilir (Choińska-Pulit vd., 2015). Uzun kuyruk yapısının farklı stres unsurlarına karşı daha hassas olduğu ve buna bağlı olarak enfeksiyon kapasitesinde düşüş yaşandığı bildirilmektedir (Vandenheuvel vd., 2013). Süt içerisinde aljinat boncuklarından salınan fajın titresinin yüksek olmasına rağmen, S.

Enteritidis'i tamamen inhibe edememesinin, salınım esnasında olası bir kuyruk hasarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.



BÖLÜM V

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında, *S. Enteritidis* METU-S1-411'e özgü SE-P47 fajının enkapsülasyonu, enkapsülasyon sürecinin optimizasyonu, optimize koşullarda üretilen faj içeren aljinat boncuklarının çeşitli koşullarda stabilitelerinin belirlenmesi, boncuklardan faj salınımının incelenmesi ve gıda zincirinin farklı aşamalarında kapsüllenen fajın kullanım olanaklarının değerlendirilmesine dair analizler yürütülmüştür.

Öncelikle, aljinat kaplama maddesi ile ekstrüzyon yöntemiyle kapsül üretiminde, fraksiyonel faktöriyel deneme tasarımı ile enkapsülasyon etkinliği üzerine etkili faktörler taranmıştır. Aljinat konsantrasyonu ve aljinat/faj oranının istatistiksel olarak önemli değişkenler olduğu belirlenmiştir. Bu faktörlerin etki yönü negatif olup aljinat/faj oranı ve aljinat konsantrasyonu azaldıkça enkapsülasyon etkinliğinde artış meydana gelmektedir. CaCl_2 konsantrasyonu ve CaCl_2 /aljinat oranının enkapsülasyon etkinliği üzerine etkilerinin ihmal edilebilir düzeyde olduğu tespit edilmiştir.

Etkili faktörlerin belirlenmesinin ardından, yüzey merkezli merkezi kompozit deneme tasarımı ve yanıt yüzey metodu kullanılarak optimum enkapsülasyon koşulları belirlenmiştir. En yüksek enkapsülasyon etkinliği ve en küçük boncuk boyutuna sahip faj içeren aljinat boncuklarının üretimi için optimum enkapsülasyon koşulları, %1,5 (m/v) aljinat konsantrasyonu ve 2 mL/mL aljinat/faj oranıdır. Optimum koşullarda enkapsülasyon etkinliği ve boncuk boyutu sırasıyla %97,85 ve 1,44 mm olarak tahmin edilmiştir. Doğrulama analizlerinde ise enkapsülasyon etkinliği ortalama %98,52 ve boncuk boyutu ortalama 1,28 mm olarak tespit edilmiş olup bu değerlerin tahmin edilen değerlerle yakın uyum içerisinde olduğu gözlemlenmiştir. Aljinat boncuklarındaki faj titresini ortalama 10,31 log pob/g olarak belirlenmiştir.

Ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyonda belirlenen optimum koşullarda, %1,5'lik aljinat kaplama maddesine %0,5 konsantrasyonda kitosanın farklı oranlarda ilavesinin faj canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, karışımdaki kitosan miktarının artmasıyla faj titrelerinde düşüş gözlemlenmiştir. 0,5:1; 0,75:1 ve 1:1 oranlarında kitosan ve aljinat

karışımı kullanılarak üretilen kapsüllerin enkapsülasyon etkinlikleri sırasıyla ortalama %91,07; %95,30 ve %96,15 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte kapsüller içine hapsedilen fajın titreleri 5,30-7,51 log pob/g arasında değişmiştir. Dolayısıyla aljinat boncuklarında olduğu gibi yüksek faj canlılıkları elde edilememiştir.

Ekstrüzyon yöntemiyle üretilen kapsüller morfolojik açıdan incelendiğinde, aljinat boncuklarının şeffaf renkte, küresel ve kısmen pürüzsüz bir yüzeye sahip oldukları; aljinat-kitosan kapsüllerinin ise beyaz renkte ve düzensiz yapıda oldukları ortaya konmuştur. Aljinat-kitosan karışımlarında kitosan miktarındaki artış, kapsüllerin küresellikten uzaklaşmasına sebep olmuştur.

Ekstrüzyon yöntemiyle enkapsülasyonda elde edilen faj canlılıklarını karşılaştırmak üzere sprey kurutucuda 90, 100 ve 110°C sıcaklıklarda üretilen kapsüllerde daha düşük faj titreleri ve enkapsülasyon etkinlikleri meydana gelmiştir. Aljinat tozlarında %82,76 ile %84,70 aralığında, kitosan tozlarında ise %61,30 ile %63,79 aralığında enkapsülasyon etkinlikleri elde edilmiştir. Sprey kurutucunun giriş sıcaklık derecesi arttıkça faj titrelerinde istatistiksel olarak önemli azalmalar gözlemlenmiştir. Elde edilen toz miktarlarına göre; enkapsülasyon verimleri aljinat tozları için %53,24-59,57 aralığında, kitosan tozları için %61,26-77,82 aralığında değişmiştir. Elde edilen verilere göre, püskürterek kurutma prosesinde aljinat matrisinin kitosana göre daha koruyucu olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca yüksek faj titresine sahip kapsüllerin üretimi için ekstrüzyon yönteminin daha uygun olduğu gösterilmiştir.

Ekstrüzyon yöntemiyle optimum enkapsülasyon koşullarında üretilen faj içeren aljinat boncuklarının ve serbest formdaki fajın sıcaklık, pH, simüle edilen mide sıvısında stabilitesi ve depolama stabilitesi (4 ve 25°C’de) belirlenerek karşılaştırılmıştır. Faj örnekleri ayrı ayrı 70 ve 80°C’ye maruz bırakıldıklarında kapsüllenmiş fajın serbest faja göre daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. Faj örneklerinin pH stabilitesinin incelendiği analizlerde, ekstrem koşullarda (pH 2 ve pH 13) aljinat matrisinin fajı korumada oldukça başarılı olduğu gözlemlenmiştir. Simüle mide sıvısında pH 2 ve pH 2,5 değerlerinde, aljinat ile kaplanan fajlarda stabilite önemli düzeyde artmıştır. 4 ve 25°C’de 15 hafta depolama boyunca hem serbest hem de kapsüllenmiş faj örneklerinin renk değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişimler meydana gelirken su aktivitesi değerlerinde önemli bir değişim gözlemlenmemiştir. 4°C’de her iki formdaki faj

stabilitesini tamamen korurken 25°C’de aljinat yapısının gevşemesine bağlı olarak kapsüllerdeki faj titresinde 1 log pob/g’den daha düşük bir azalma olmuştur.

Ekstrüzyon yöntemiyle optimum enkapsülasyon koşullarında üretilen aljinat boncuklarından simüle edilen bağırsak sıvısı ve yarım yağlı sütte faj salınımı incelemiştir. Bu analizlerde, kapsüllenen fajın terapötik veya biyokoruyucu ajan olarak kullanımlarında hedef ortama zamana bağlı faj salınımını belirlenmiştir. Simüle bağırsak sıvısında 5 dk içinde %77 salınım elde edilmiş ve 4 saat sonunda tam salınıma ulaşılmıştır. Yarım yağlı sütte ise 5 dk ve 4 saat sonunda sırasıyla %71,31 ve %75 oranında faj salınımı elde edilmiştir. Yapılan analizler doğrultusunda, sütün yağ oranındaki artışın faj salınımını olumsuz etkilediği sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızın son aşamasında, simüle edilmiş bağırsak sıvısı ve yarım yağlı sütte, faj yüklü aljinat boncuklarının *S. Enteritidis* METU-S1-411’e karşı litik aktivitesi değerlendirilmiştir. Simüle bağırsak sıvısında (37°C’de), *S. Enteritidis* sayısında MOI 1000’de 0,07-3,63 log kob/mL aralığında, MOI 100000’de ise 1,37-4,09 log kob/mL aralığında düşüş meydana gelmiştir. Yarım yağlı sütte 4 ve 25°C olmak üzere iki farklı sıcaklık değerinde yapılan analizlerde, bakteri gelişiminin faj etkinliğini artırmasına bağlı olarak 25°C’de daha iyi bir litik aktivite gözlemlenmiştir. Ayrıca genel olarak, MOI 100000 değerinde daha yüksek log azalmaları elde edilmiştir. 25°C’de MOI 100000’de yürütülen analizlerde bakteri sayısında 2,01-3,27 log kob/mL aralığında azalma meydana gelirken MOI 1000’de 12. saatte 4,03 log kob/mL ile daha yüksek bir log azalmasına ulaşılmıştır.

Fajları çeşitli amaçlarla kapsüllemek ve serbest bırakmak için duvar malzemesi olarak kullanılacak biyomateryalin seçimi ile prosesin tasarımı, fajların başarılı bir şekilde kapsüllenmesinde önemli bir noktadır. Sonuçlarımız, ekstrüzyon tekniğiyle üretilen aljinat bazlı kapsüllerin, gıda işleme koşulları sırasında (yüksek sıcaklık, asidik veya alkali ortam) veya gastrointestinal sistemde faj stabilitesinin korunmasına uygun olduğunu göstermektedir. Ayrıca, faj içeren aljinat boncuklarının *S. Enteritidis* üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur. Mevcut litik etkinlik, süt veya diğer gıdalarda faj salınımını artırmaya yönelik yapılan çalışmalarla geliştirilmelidir. Ayrıca, bu formülasyonları gıda endüstrisinde kullanılabilecek gerçek bir alternatif haline

getirmek için daha büyük ölçeklerde üretim yapılacak çalışmalara ve pilot tesislere ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

Abdelsattar, A. S., Abdelrahman, F., Dawoud, A., Connerton, I. F. ve El-Shibiny, A., "Encapsulation of *E. coli* phage ZCEC5 in chitosan–alginate beads as a delivery system in phage therapy", **AMB Express**, 9(1), 1–9, 2019.

Abedon, S. T., "Lysis from without", **Bacteriophage**, 1(1), 46–49, 2011.

Abedon, S. T., Thomas-Abedon, C., Thomas, A. ve Mazure, H., "Bacteriophage prehistory", **Bacteriophage**, 1(3), 174–178, 2011.

Acar Soykut, E., Tayyarcı, E. K., Evran, Ş., Boyacı, İ. H., Çakır, İ., Khaaladi, M. ve Fattouch, S., "Microencapsulation of phages to analyze their demeanor in physiological conditions", **Folia Microbiologica**, 64(6), 751–763, 2019.

Ackermann, H. W., "Bacteriophage observations and evolution", **Research in Microbiology**, 154(4), 245–251, 2003.

Adhya, S. ve Merril, C., "The road to phage therapy", **Nature**, 443, 754–755, 2006.

Ahmadi, M., Amir Karimi Torshizi, M., Rahimi, S. ve Dennehy, J. J., "Prophylactic bacteriophage administration more effective than post-infection administration in reducing *Salmonella enterica* serovar Enteritidis shedding in Quail", **Frontiers in Microbiology**, 7, 1253, 2016.

Akhtar, M., Viazis, S., Christensen, K., Kraemer, P. ve Diez-Gonzalez, F., "Isolation, characterization and evaluation of virulent bacteriophages against *Listeria monocytogenes*", **Food Control**, 75, 108–115, 2017.

Alasalvar, H. ve Yildirim, Z., "Ultrasound-assisted extraction of antioxidant phenolic compounds from *Lavandula angustifolia* flowers using natural deep eutectic solvents: An experimental design approach", **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, 22, 100492,

2021.

Alves, D., Cerqueira, M. A., Pastrana, L. M. ve Sillankorva, S., "Entrapment of a phage cocktail and cinnamaldehyde on sodium alginate emulsion-based films to fight food contamination by *Escherichia coli* and *Salmonella* Enteritidis", ***Food Research International***, 128, 108791, 2020.

Alves, D., Marques, A., Milho, C., Costa, M. J., Pastrana, L. M., Cerqueira, M. A. ve Sillankorva, S. M., "Bacteriophage ϕ IBB-PF7A loaded on sodium alginate-based films to prevent microbial meat spoilage", ***International Journal of Food Microbiology***, 291, 121–127, 2019.

Amarillas, L., Lightbourn-Rojas, L., Angulo-Gaxiola, A. K., Basilio Heredia, J., González-Robles, A. ve León-Félix, J., "The antibacterial effect of chitosan-based edible coating incorporated with a lytic bacteriophage against *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of tomatoes", ***Journal of Food Safety***, 38(6), e12571, 2018.

Ameri, M. ve Maa, Y. F., "Spray drying of biopharmaceuticals: Stability and process considerations", ***Drying Technology***, 24(6), 763–768, 2006.

Anal, A. K. ve Singh, H., "Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery", ***Trends in Food Science & Technology***, 18(5), 240–251, 2007.

Angelopoulou, A., Warda, A. K., Hill, C. ve Ross, R. P., "Non-antibiotic microbial solutions for bovine mastitis – live biotherapeutics, bacteriophage, and phage lysins", ***Critical Reviews in Microbiology***, 45(5–6), 564–580, 2019.

Ansari, J. A., Ismail, M. ve Farid, M., "Investigate the efficacy of UV pretreatment on thermal inactivation of *Bacillus subtilis* spores in different types of milk", ***Innovative Food Science & Emerging Technologies***, 52, 387–393, 2019.

Augst, A. D., Kong, H. J. ve Mooney, D. J., "Alginate hydrogels as biomaterials", ***Macromolecular Bioscience***, 6(8), 623–633, 2006.

Bamidele, O. P. ve Emmambux, M. N., "Encapsulation of bioactive compounds by "extrusion" technologies: A review", ***Critical Reviews in Food Science and Nutrition***, 61(18), 3100–3118, 2021.

Barba, F. J., Esteve, M. J. ve Frígola, A., "High pressure treatment effect on physicochemical and nutritional properties of fluid foods during storage: A review", ***Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety***, 11(3), 307–322, 2012.

Baş, D. ve Boyacı, I. H., "Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology", ***Journal of Food Engineering***, 78(3), 836–845, 2007.

Basdew, I.H. ve Laing, M.D., "Investigation of the lytic ability of South African bacteriophages specific for *Staphylococcus aureus*, associated with bovine mastitis", ***Biocontrol Science and Technology***, 25(4), 429–443, 2015.

Batalha, L.S., Pardini Gontijo, M.T., Vianna Novaes de Carvalho Teixeira, A., Meireles Gouvêa Boggione, D., Soto Lopez, M. E., Renon Eller, M. ve Santos Mendonça, R. C., "Encapsulation in alginate-polymers improves stability and allows controlled release of the UFV-AREG1 bacteriophage", ***Food Research International***, 139, 109947, 2021.

Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S. ve Escaleira, L.A., "Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry", ***Talanta***, 76(5), 965–977, 2008.

Bradley, D. E., "Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins.", ***Bacteriological Reviews***, 31(4), 230, 1967.

Broncano-Lavado, A., Santamaría-Corral, G., Esteban, J. ve García-Quintanilla, M., "Advances in bacteriophage therapy against relevant multidrug-resistant pathogens", ***Antibiotics***, 10(6), 672, 2021.

Brüssow, H., Canchaya, C. ve Hardt, W.-D., "Phages and the evolution of bacterial pathogens: From genomic rearrangements to lysogenic conversion", ***Microbiology and Molecular Biology Reviews***, 68(3), 560–602, 2004.

Bu, Y., He, W., Zhu, L., Zhu, W., Li, J., Liu, H. ve Li, X., "Effects of different wall materials on stability and umami release of microcapsules of maillard reaction products derived from Aloididae aloidi", *International Journal of Food Science & Technology*, 56(12), 6484–6496, 2021.

Calderón-Oliver, M. ve Ponce-Alquicira, E., "The role of microencapsulation in food application", *Molecules*, 27(5), 1499, 2022.

Calinoiu, L. F., Ștefanescu, B. E., Pop, I. D., Muntean, L. ve Vodnar, D. C., "Chitosan coating applications in probiotic microencapsulation", *Coatings*, 9(3), 194, 2019.

Cappato, L. P., Ferreira, M. V. S., Guimaraes, J. T., Portela, J. B., Costa, A. L. R., Freitas, M. Q., R.L. Cunha, R. L., Oliveira, C. A. F., Mercali, G. D., Marzack, L. D. F. ve Cruz, A. G., "Ohmic heating in dairy processing: Relevant aspects for safety and quality", *Trends in Food Science & Technology*, 62, 104–112, 2017.

Ch'Ng, H. S., Park, H., Kelly, P. ve Robinson, J. R., "Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery II: Synthesis and evaluation of some swelling, water-insoluble bioadhesive polymers", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(4), 399–405, 1985.

Chen, S. C., Wu, Y. C., Mi, F. L., Lin, Y. H., Yu, L. C. ve Sung, H. W., "A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery", *Journal of Controlled Release*, 96(2), 285–300, 2004.

Choi, I., Lee, J. S. ve Han, J., "Maltodextrin-trehalose miscible system-based bacteriophage encapsulation: Studies of plasticizing effect on encapsulated phage activity and food application as an antimicrobial agent", *Food Control*, 146, 109550, 2023.

Choińska-Pulit, A., Mituła, P., Śliwka, P., Łaba, W. ve Skaradzińska, A., "Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications", *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 212–221, 2015.

Claeys, W. L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., De Zutter, L., Huyghebaert, A., Imberechts, H., Thiange, P., Vandenplas, Y. ve Herman, L., "Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits", *Food Control*, 31(1), 251–262, 2013.

Colom, J., Cano-Sarabia, M., Otero, J., Aríñez-Soriano, J., Cortés, P., Maspoch, D. ve Llagostera, M., "Microencapsulation with alginate/CaCO₃: A strategy for improved phage therapy", *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–10, 2017.

Colom, J., Cano-Sarabia, M., Otero, J., Cortés, P., Maspoch, D. ve Llagostera, M., "Liposome-encapsulated bacteriophages for enhanced oral phage therapy against *Salmonella* spp.", *Applied and Environmental Microbiology*, 81(14), 4841–4849, 2015.

Cook, S. L., Bull, S. P., Methven, L., Parker, J. K. ve Khutoryanskiy, V. V., "Mucoadhesion: A food perspective", *Food Hydrocolloids*, 72, 281–296, 2017.

Cooper, I. R., "A review of current methods using bacteriophages in live animals, food and animal products intended for human consumption", *Journal of Microbiological Methods*, 130, 38–47, 2016.

Coutinho, N. M., Silveira, M. R., Rocha, R. S., Moraes, J., Ferreira, M. V. S., Pimentel, T. C., Freitas, M. Q., Silva, M. C., Raices, R. S. L., Ranadheera, C. S., Borges, F. O., Mathias, S. P., Fernandes, F. A. N., Rodrigues, R. ve Cruz, A. G., "Cold plasma processing of milk and dairy products", *Trends in Food Science & Technology*, 74, 56–68, 2018.

Cristobal-Cueto, P., García-Quintanilla, A., Esteban, J. ve García-Quintanilla, M., "Phages in food industry biocontrol and bioremediation", *Antibiotics*, 10(7), 786, 2021.

Cui, H., Yuan, L. ve Lin, L., "Novel chitosan film embedded with liposome-encapsulated phage for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7 in beef", *Carbohydrate Polymers*, 177, 156–164, 2017.

D'Herelle, F., "Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques", *CR*

Academy of Sciences (Paris), 165, 373–375, 1917.

Da Cruz, A. G., Fonseca Faria, J. de A., Isay Saad, S. M., André Bolini, H. M., SantAna, A. S. ve Cristianini, M., "High pressure processing and pulsed electric fields: potential use in probiotic dairy foods processing", *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 483–493, 2010.

de Farias, S. T., Jheeta, S. ve Prosdocimi, F., "Viruses as a survival strategy in the armory of life", *History and Philosophy of the Life Sciences*, 41(4), 1–11, 2019.

Değirmencioğlu, A. ve Yazgı Z., "Tepki yüzeyleri metodolojisi “optimizasyon esaslı çalışmalara ilişkin teorik esaslar ve tarımsal mekanizasyon uygulamaları”", *Tarım Makinaları Bilimi Dergisi*, 2(2), 111–115, 2006.

DePaz, R. A., Dale, D. A., Barnett, C. C., Carpenter, J. F., Gaertner, A. L. ve Randolph, T. W., "Effects of drying methods and additives on the structure, function, and storage stability of subtilisin: Role of protein conformation and molecular mobility", *Enzyme and Microbial Technology*, 31(6), 765–774, 2002.

Dini, C., Islan, G. A. ve Castro, G. R., "Characterization and stability analysis of biopolymeric matrices designed for phage-controlled release", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(6), 2031–2047, 2014.

Dini, C., Islan, G. A., de Urraza, P. J. ve Castro, G. R., "Novel biopolymer matrices for microencapsulation of phages: Enhanced protection against acidity and protease activity", *Macromolecular Bioscience*, 12(9), 1200–1208, 2012.

Dlamini, S. B., Gigante, A. M., Hooton, S. P. T. ve Atterbury, R. J., "Efficacy of different encapsulation techniques on the viability and stability of diverse phage under simulated gastric conditions", *Microorganisms*, 11(10), 2389, 2023.

European Food Safety Authority (EFSA) ve European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), "The European Union one health 2022 zoonoses report", *EFSA Journal*, 21(12), e8442, 2023.

El-DougDoug, N. K., Cucic, S., Abdelhamid, A. G., Brovko, L., Kropinski, A. M., Griffiths, M. W. ve Anany, H., "Control of *Salmonella* Newport on cherry tomato using a cocktail of lytic bacteriophages", **International Journal of Food Microbiology**, 293, 60–71, 2019.

El Haddad, L., Lemay, M. J., Khalil, G. E., Moineau, S. ve Champagne, C. P., "Microencapsulation of a *Staphylococcus* phage for concentration and long-term storage", **Food Microbiology**, 76, 304–309, 2018.

Endo, E. H., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V. ve Filho, B. P. D., "Activity of Spray-dried microparticles containing pomegranate peel extract against *Candida albicans*", **Molecules**, 17(9), 10094–10107, 2012.

Eng, S. K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N. S., Ser, H. L., Chan, K. G. ve Lee, L. H., "*Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance", **Frontiers in Life Science**, 8(3), 284–293, 2015.

Ergin, F., Atamer, Z., Comak Göcer, E. M., Demir, M., Hinrichs, J. ve Kucukcetin, A., "Optimization of *Salmonella* bacteriophage microencapsulation in alginate-caseinate formulation using vibrational nozzle technique", **Food Hydrocolloids**, 113, 106456, 2021.

Erol, H. B. ve Kaskatepe, B., "Effect of phage and rhamnolipid on *Salmonella* Infantis biofilm removal and biological control of phage on food deterioration", **International Journal of Food Science & Technology**, 59(1), 120–128, 2024.

World Health Organization (WHO), "Interventions for the control of non-typhoidal *Salmonella* spp. in beef and pork", **Microbiological Risk Assessment Series 30**, Rome, Italy, 2016.

Fernández, L., Gutiérrez, D., García, P. ve Rodríguez, A., "The perfect bacteriophage for therapeutic applications - A quick guide", **Antibiotics**, 8(3), 126, 2019.

Francis, F. J. ve Clydesdale, F. M., "*Food colorimetry: theory and applications*". USA:

AVI Publishing Co. Inc.1975.

George, M. ve Abraham, T. E., "Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - A review", *Journal of Controlled Release*, 114(1), 1–14, 2006.

Gomez-Garcia, J., Chavez-Carbajal, A., Segundo-Arizmendi, N., Baron-Pichardo, M. G., Mendoza-Elvira, S. E., Hernandez-Baltazar, E., Hynes, A. P. ve Torres-Angeles, O., "Efficacy of *Salmonella* bacteriophage S1 delivered and released by alginate beads in a chicken model of infection", *Viruses*, 13(10), 1932, 2021.

González-Menéndez, E., Fernández, L., Gutiérrez, D., Pando, D., Martínez, B., Rodríguez, A. ve García, P., "Strategies to encapsulate the *Staphylococcus aureus* bacteriophage phiIPLA-RODI", *Viruses*, 10(9), 495, 2018.

Gökbulut, İ. ve Öztürk, F. S., "Gıda mikroenkapsülasyonunda aljinat kullanımı", *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 8(1/2), 16-28, 2018.

Greer, G. G., "Bacteriophage control of foodborne bacteria", *Journal of Food Protection*, 68(5), 1102–1111, 2005.

Guimarães, J. T., Balthazar, C. F., Scudino, H., Pimentel, T. C., Esmerino, E. A., Ashokkumar, M., Freitas, M. Q. ve Cruz, A. G., "High-intensity ultrasound: A novel technology for the development of probiotic and prebiotic dairy products", *Ultrasonics Sonochemistry*, 57, 12–21, 2019.

Hankin, E., "L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera", *Ann Inst Pasteur*, 10, 511, 1896.

Hanlon, G. W., "Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections", *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(2), 118–128, 2007.

Hansen, L. T., Allan-Wojtas, P. M., Jin, Y. L. ve Paulson, A. T., "Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal

conditions", *Food Microbiology*, 19(1), 35–45, 2002.

Harada, L. K., Silva, E. C., Campos, W. F., Del Fiol, F. S., Vila, M., Dąbrowska, K., Krylov, V. N. ve Balcão, V. M., "Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art", *Microbiological Research*, 212, 38–58, 2018.

Heredia, N. ve García, S., "Animals as sources of food-borne pathogens: A review", *Animal Nutrition*, 4(3), 250–255, 2018.

Huang, C., Shi, J., Ma, W., Li, Z., Wang, J., Li, J. ve Wang, X., "Isolation, characterization, and application of a novel specific *Salmonella* bacteriophage in different food matrices", *Food Research International*, 111, 631–641, 2018.

Humagain, S., "Bacteriophages (morphology and uses)", <https://onlinesciencenotes.com/bacteriophages-morphology-and-uses/>, 13 Eylül 2024.

Islam, M. S., Zhou, Y., Liang, L., Nime, I., Yan, T., Willias, S. P., Mia, Md. Z., Bei, W., Connerton, I. F., Fischetti, V. A. ve Li, J., "Application of a broad range lytic phage LPST94 for biological control of *Salmonella* in foods", *Microorganisms*, 8(2), 247, 2020.

Jaffee, S., Henson, S., Unnevehr, L., Grace, D. ve Cassou, E., The safe food imperative: Accelerating progress in low-and middle-income countries, World Bank Publications, Washington, 2018.

Jegat, C. ve Taverdet, J. L., "Stirring speed influence study on the microencapsulation process and on the drug release from microcapsules", *Polymer Bulletin*, 44(3), 345–351, 2000.

Joerger, R. D. , "Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages", *Poultry Science*, 82(4), 640–647, 2003.

Jończyk-Matysiak, E., Łodej, N., Kula, D., Owczarek, B., Orwat, F., Międzybrodzki, R., Neuberg, J., Bagińska, N., Weber-Dąbrowska, B. ve Górski, A., "Factors

determining phage stability/activity: Challenges in practical phage application", **Expert Review of Anti-infective Therapy**, 17(8), 583–606, 2019.

Kasman, L. M. ve Porter, L. D., "Bacteriophages", **Brenner's Encyclopedia of Genetics**, 2nd Edition, 280–283, 2022.

Keen, E. C., "Paradigms of pathogenesis: targeting the mobile genetic elements of disease.", **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 2, 161, 2012.

Khanal, D., Chang, R. Y. K., Hick, C., Morales, S. ve Chan, H. K., "Enteric-coated bacteriophage tablets for oral administration against gastrointestinal infections", **International Journal of Pharmaceutics**, 609, 121206, 2021.

Kidane, S. W., "Application of response surface methodology in food process modeling and optimization", **Response Surface Methodology in Engineering Science**, IntechOpen, 2021.

Kim, K. H., Ingale, S. L., Kim, J. S., Lee, S. H., Lee, J. H., Kwon, I. K. ve Chae, B. J., "Bacteriophage and probiotics both enhance the performance of growing pigs but bacteriophage are more effective", **Animal Feed Science and Technology**, 196, 88–95, 2014.

Kim, S., Jo, A. ve Ahn, J., "Application of chitosan–alginate microspheres for the sustained release of bacteriophage in simulated gastrointestinal conditions", **International Journal of Food Science & Technology**, 50(4), 913–918, 2015.

Korf, I. H. E., Meier-Kolthoff, J. P., Adriaenssens, E. M., Kropinski, A. M., Nimtz, M., Rohde, M., van Raaij, M. J. ve Wittmann, J., "Still something to discover: Novel insights into *Escherichia coli* phage diversity and taxonomy", **Viruses**, 11(5), 454, 2019.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. ve Deeth, H., "Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt", **International Dairy Journal**, 13(1), 3–13, 2003.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B. ve Deeth, H., "The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria", *International Dairy Journal*, 14(8), 737–743, 2004.

Krishnamurthy, K., Demirci, A. ve Irudayaraj, J. M., "Inactivation of *Staphylococcus aureus* in milk using flow-through pulsed UV-light treatment system", *Journal of Food Science*, 72(7), M233–M239, 2007.

Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E. ve Johnson, R. P., "Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay", *Bacteriophages: Methods and Protocols*, Humana Press, New York, 501, 69–76, 2009.

Kusuktham, B., Prasertgul, J. ve Srinun, P., "Morphology and property of calcium silicate encapsulated with alginate beads", *Silicon*, 6(3), 191–197, 2014.

Kutter, E. ve Sulakvelidze, A., "Bacteriophages: Biology and applications", CRS Press, 382–426, 2004.

Lamas, A., Miranda, J. M., Regal, P., Vázquez, B., Franco, C. M. ve Cepeda, A., "A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*", *Microbiological Research*, 206, 60–73, 2018.

Lang, L. H., "FDA approves use of bacteriophages to be added to meat and poultry products", *Gastroenterology*, 131(5), 1370, 2006.

Leiman, P. G., Kanamaru, S., Mesyanzhinov, V. V., Arisaka, F. ve Rossmann, M. G., "Structure and morphogenesis of bacteriophage T4", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(11), 2356–2370, 2003.

Lerner, K. L. ve Wilmoth Lerner, B., "World of microbiology and immunology". New York, Thompson Gale, 2003.

Leung, S. S. Y., Parumasivam, T., Gao, F. G., Carrigy, N. B., Vehring, R., Finlay, W. H., Morales, S., Britton, W. J., Kutter, E. ve Chan, H. K., "Production of inhalation phage powders using spray freeze drying and spray drying techniques for treatment of

respiratory infections", *Pharmaceutical Research*, 33(6), 1486–1496, 2016.

Li, J., Li, Y., Ding, Y., Huang, C., Zhang, Y., Wang, J. ve Wang, X., "Characterization of a novel Siphoviridae *Salmonella* bacteriophage T156 and its microencapsulation application in food matrix", *Food Research International*, 140, 110004, 2021.

Li, M., Chang, R. Y. K., Lin, Y., Morales, S., Kutter, E. ve Chan, H. K., "Phage cocktail powder for *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections", *International Journal of Pharmaceutics*, 596, 120200, 2021.

Liu, G., Carøe, C., Qin, Z., Munk, D. M. E., Crafsack, M., Petersen, M. A. ve Ahnén, L., "Comparative study on quality of whole milk processed by high hydrostatic pressure or thermal pasteurization treatment", *LWT-Food Science and Technology*, 127, 109370, 2020.

Loc-Carrillo, C. ve Abedon, S. T., "Pros and cons of phage therapy", *Bacteriophage*, 1(2), 111–114, 2011.

Lone, A., Anany, H., Hakeem, M., Aguis, L., Avdjian, A. C., Bouget, M., Atashi, A., Brovko, L., Rochefort, D., Griffiths, M. W. ve Griffiths, M. W., "Development of prototypes of bioactive packaging materials based on immobilized bacteriophages for control of growth of bacterial pathogens in foods", *International Journal of Food Microbiology*, 217, 49–58, 2016.

Lorenzo-Rebenaque, L., Malik, D. J., Catalá-Gregori, P., Torres-Boncompte, J., Marin, C. ve Sevilla-Navarro, S., "Microencapsulated bacteriophages incorporated in feed for *Salmonella* control in broilers", *Veterinary Microbiology*, 274, 109579, 2022.

Ma, Y., Pacan, J. C., Wang, Q., Sabour, P. M., Huang, X. ve Xu, Y., "Enhanced alginate microspheres as means of oral delivery of bacteriophage for reducing *Staphylococcus aureus* intestinal carriage", *Food Hydrocolloids*, 26(2), 434–440, 2012.

Ma, Y., Pacan, J. C., Wang, Q., Xu, Y., Huang, X., Korenevsky, A. ve Sabour, P. M., "Microencapsulation of bacteriophage Felix O1 into chitosan-alginate microspheres for

oral delivery", *Applied and Environmental Microbiology*, 74(15), 4799–4805, 2008.

Malik, D. J., "Bacteriophage encapsulation using spray drying for phage therapy", *Current Issues in Molecular Biology*, 40(1), 303–316, 2021.

Malik, D. J., Sokolov, I. J., Vinner, G. K., Mancuso, F., Cinquerrui, S., Vladislavljevic, G. T., Clokie, M. R. J., Garton, N. J., Stapley, A. G. F. ve Kirpichnikova, A., "Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy", *Advances in Colloid and Interface Science*, 249, 100–133, 2017.

Mao, X., Wu, Y., Ma, R., Li, L., Wang, L., Tan, Y., Li, Z., Liu, H., Han, K., Cao, Y., Li, Y., Peng, H., Li, X., Hu, C. ve Wang, X., "Oral phage therapy with microencapsulated phage A221 against *Escherichia coli* infections in weaned piglets", *BMC Veterinary Research*, 19(1), 1–14, 2023.

Matak, K. E., Sumner, S. S., Duncan, S. E., Hovingh, E., Worobo, R. W., Hackney, C. R. ve Pierson, M. D., "Effects of ultraviolet irradiation on chemical and sensory properties of goat milk", *Journal of Dairy Science*, 90(7), 3178–3186, 2007.

Mayer, G., "Bacteriophage", *Microbiology and Immunology*, 2016.
<https://www.microbiologybook.org/mayer/phage.htm>

Mejares, C. T., Huppertz, T. ve Chandrapala, J., "Thermal processing of buffalo milk – A review", *International Dairy Journal*, 129, 105311, 2022.

Miller, B. M., Sauer, A. ve Moraru, C. I., "Inactivation of *Escherichia coli* in milk and concentrated milk using pulsed-light treatment", *Journal of Dairy Science*, 95(10), 5597–5603, 2012.

Mortazavian, A., Razavi, S. H., Ehsani, M. R. ve Sohrabvandi, S., "Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms", *Iranian Journal Of Biotechnology*, 5(1), 1-18, 2007.

Moye, Z. D., Woolston, J. ve Sulakvelidze, A., "Bacteriophage applications for food

production and processing", *Viruses*, 10(4), 205, 2018.

Mukhopadhyay, S., Tomasula, P. M., Luchansky, J. B., Porto-Fett, A. ve Call, J. E., "Removal of *Salmonella* Enteritidis from commercial unpasteurized liquid egg white using pilot scale cross flow tangential microfiltration", *International Journal of Food Microbiology*, 142(3), 309–317, 2010.

Nechaeva, E., "Development of oral microencapsulated forms for delivering viral vaccines", *Expert Review of Vaccines*, 1(3), 385–397, 2002.

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S. ve Bugarski, B., "An overview of encapsulation technologies for food applications", *Procedia Food Science*, 1, 1806–1815, 2011.

Olszak, T., Latka, A., Roszniowski, B., Valvano, M. A. ve Drulis-Kawa, Z., "Phage life cycles behind bacterial biodiversity", *Current Medicinal Chemistry*, 24(36), 3987-4001, 2017.

Orlova, E. V., "Bacteriophages and their structural organisation", *Bacteriophages*, 1st ed., IntechOpen: London, UK, 3-30, 2012.

Otero, J., García-Rodríguez, A., Cano-Sarabia, M., MasPOCH, D., Marcos, R., Cortés, P. ve Llagostera, M., "Biodistribution of liposome-encapsulated bacteriophages and their transcytosis during oral phage therapy", *Frontiers in Microbiology*, 10, 689, 2019.

Parreidt, T. S., Lindner, M., Rothkopf, I., Schmid, M. ve Müller, K., "The development of a uniform alginate-based coating for cantaloupe and strawberries and the characterization of water barrier properties", *Foods*, 8(6), 203, 2019.

Pereira, L. M. S., Milan, T. M. ve Tapia-Blácido, D. R., "Using response surface methodology (RSM) to optimize 2G bioethanol production: A review", *Biomass and Bioenergy*, 151, 106166, 2021.

Petsong, K., Benjakul, S. ve Vongkamjan, K., "Evaluation of storage conditions and

efficiency of a novel microencapsulated *Salmonella* phage cocktail for controlling *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* in-vitro and in fresh foods", *Food Microbiology*, 83, 167–174, 2019.

Petsong, K., Benjakul, S. ve Vongkamjan, K., "Optimization of wall material for phage encapsulation via freeze-drying and antimicrobial efficacy of microencapsulated phage against *Salmonella*", *Journal of Food Science and Technology*, 58(5), 1937–1946, 2021.

Pui, C. F., Wong, W. C., Chai, L. C., Nillian, E., Ghazali, F. M., Cheah, Y. K., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Radu, M. ve Radu, S., "Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR", *Food Control*, 22(2), 337–342, 2011.

Rahman, H. S. ve Othman, H. H., "A review of history, definition, classification, source, transmission, and pathogenesis of *Salmonella*: A model for human infection", *Article in Journal of Zankoy Sulaimani*, 20(3-4), 11-19, 2018.

Rakhuba, D. V., Kolomiets, E. I., Szwajcer Dey, E. ve Novik, G. I., "Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell", *Polish Journal of Microbiology*, 59(3), 145–155, 2010.

Rathore, S., Desai, P. M., Liew, C. V., Chan, L. W. ve Heng, P. W. S., "Microencapsulation of microbial cells", *Journal of Food Engineering*, 116(2), 369–381, 2013.

Richards, K. ve Malik, D. J., "Bacteriophage encapsulation in pH-responsive core-shell capsules as an animal feed additive", *Viruses*, 13(6), 1131, 2021.

Roos, W. H., Ivanovska, I. L., Evilevitch, A. ve Wuite, G. J. L., "Viral capsids: Mechanical characteristics, genome packaging and delivery mechanisms", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(12), 1484–1497, 2007.

Sabaghi, M., Maghsoudlou, Y., Khomeiri, M. ve Ziaifar, A. M., "Active edible coating

from chitosan incorporating green tea extract as an antioxidant and antifungal on fresh walnut kernel", *Postharvest Biology and Technology*, 110, 224–228, 2015.

Saez, A. C., Zhang, J., Rostagno, M. H. ve Ebner, P. D., "Direct feeding of microencapsulated bacteriophages to reduce *Salmonella* colonization in pigs", *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(12), 1269-1274, 2011.

Salmond, G. P. C. ve Fineran, P. C., "A century of the phage: past, present and future", *Nature Reviews Microbiology*, 13(12), 777–786, 2015.

Samtlebe, M., Ergin, F., Wagner, N., Neve, H., Küçükçetin, A., Franz, C. M. A. P., Heller, K. J., Hinrichs, J. ve Atamer, Z., "Carrier systems for bacteriophages to supplement food systems: Encapsulation and controlled release to modulate the human gut microbiota", *LWT - Food Science and Technology*, 68, 334–340, 2016.

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Mahon, B. E., Jones, T. F. ve Griffin, P. M., "An assessment of the human health impact of seven leading foodborne pathogens in the United States using disability adjusted life years", *Epidemiology & Infection*, 143(13), 2795–2804, 2015.

Schubert, C., Fischer, S., Dorsch, K., Teßmer, L., Hinrichs, J. ve Atamer, Z., "Microencapsulation of bacteriophages for the delivery to and modulation of the human gut microbiota through milk and cereal products", *Applied Sciences*, 12(13), 6299, 2022.

Seo, B. J., Song, E. T., Lee, K., Kim, J. W., Jeong, C. G., Moon, S. H., Son, J. S., Kang, S. H., Cho, S. H., Jung, B. Y. ve Kim, W.-II, "Evaluation of the broad-spectrum lytic capability of bacteriophage cocktails against various *Salmonella* serovars and their effects on weaned pigs infected with *Salmonella* Typhimurium", *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(6), 851–860, 2018.

Sezer, B. ve Boyaci, I. H., "Evaluation of long- and short-term storage conditions and efficiency of a novel microencapsulated *Salmonella* phage cocktail for controlling *Salmonella* in chicken meat", *Food Science and Biotechnology*, 33(2), 475–483, 2024.

Sezer, B., Tayyarcı, E. K. ve Boyacı, I. H., "The use of bacteriophage-based edible coatings for the biocontrol of *Salmonella* in strawberries", *Food Control*, 135, 108812, 2022.

Shah, M. ve Pathak, K., "Development and statistical optimization of solid lipid nanoparticles of simvastatin by using 2^3 full-factorial design", *AAPS PharmSciTech*, 11(2), 489–496, 2010.

Shahdadi, M., Safarirad, M., Berizi, E., Hosseinzadeh, S., Phimolsiripol, Y. ve Mousavi Khaneghah, A., "Investigating the effect of phage on reducing *Salmonella* spp. in poultry meat: A systematic review and meta-analysis", *Food Control*, 160, 110380, 2024.

Sharma, S., Chatterjee, S., Datta, S., Prasad, R., Dubey, D., Prasad, R. K. ve Vairale, M. G., "Bacteriophages and its applications: An overview", *Folia Microbiologica*, 62(1), 17–55, 2016.

Shi, L. E., Li, Z. H., Li, D. T., Xu, M., Chen, H. Y., Zhang, Z. L. ve Tang, Z. X., "Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate–milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions", *Journal of Food Engineering*, 117(1), 99–104, 2013.

Sillankorva, S. M., Oliveira, H. ve Azeredo, J., "Bacteriophages and their role in food safety", *International Journal of Microbiology*, 2012(1), 863945, 2012.

Sillankorva, S., Oliveira, R., Vieira, M. J., Sutherland, I. ve Azeredo, J., "*Pseudomonas fluorescens* infection by bacteriophage Φ S1: The influence of temperature, host growth phase and media", *FEMS Microbiology Letters*, 241(1), 13–20, 2004.

Simmonds, P. ve Aiewsakun, P., "Virus classification – where do you draw the line?", *Archives of Virology*, 163(8), 2037–2046, 2018.

Śliwka, P., Mituła, P., Mituła, A., Skaradziński, G., Choińska-Pulit, A., Niezgoda, N., Weber-Dąbrowska, B., Żaczek, M. ve Skaradzińska, A., "Encapsulation of

bacteriophage T4 in mannitol-alginate dry microspheres and survival in simulated gastrointestinal conditions", *LWT- Food Science and Technology*, 99, 238–243, 2019.

Soykut, E. A. ve Tunail, N., "Termofilik faj taksonomisi", *Gıda*, 34(4), 251–258, 2009.

Spicigo, D. A., Bardina, C., Cortés, P. ve Llagostera, M., "Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry", *International Journal of Food Microbiology*, 165(2), 169–174, 2013.

Stanford, K., McAllister, T. A., Niu, Y. D., Stephens, T. P., Mazzocco, A., Waddell, T. E. ve Johnson, R. P., "Oral delivery systems for encapsulated bacteriophages targeted at *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle", *Journal of Food Protection*, 73(7), 1304–1312, 2010.

Sultana, M., Chan, E. S., Pushpamalar, J. ve Choo, W. S., "Advances in extrusion-dripping encapsulation of probiotics and omega-3 rich oils", *Trends in Food Science & Technology*, 123, 69–86, 2022.

Tang, M., Dettmar, P. ve Batchelor, H., "Bioadhesive oesophageal bandages: Protection against acid and pepsin injury", *International Journal of Pharmaceutics*, 292(1–2), 169–177, 2005.

Tang, Z., Huang, X., Baxi, S., Chambers, J. R., Sabour, P. M. ve Wang, Q., "Whey protein improves survival and release characteristics of bacteriophage Felix O1 encapsulated in alginate microspheres", *Food Research International*, 52(2), 460–466, 2013.

Tang, Z., Huang, X., Sabour, P. M., Chambers, J. R. ve Wang, Q., "Preparation and characterization of dry powder bacteriophage K for intestinal delivery through oral administration", *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 263–270, 2015.

Teklemariam, A. D., Al Hindi, R., Qadri, I., Alharbi, M. G., Hashem, A. M., Alrefaei, A. A., Basamad, N. A., Haque, S., Alamri, T. ve Harakeh, S., "Phage cocktails – an emerging approach for the control of bacterial infection with major emphasis on foodborne pathogens", *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 1-29, 2023.

Timilsena, Y. P., Haque, M. A., Adhikari, B., Timilsena, Y. P., Haque, M. A. ve Adhikari, B., "Encapsulation in the food industry: A brief historical overview to recent developments", ***Food and Nutrition Sciences***, 11(6), 481–508, 2020.

Turner, D., Shkoporov, A. N., Lood, C., Millard, A. D., Dutilh, B. E., Alfenas-Zerbini, P., van Zyl, L. J., Aziz, R. K., Oksanen, H M., Poranen, M. M., Kropinski, A. M., Barylski, J., Brister, J. R., Chanisvili, N., Edwards, R. A., Enault, F., Gillis, A., Knezevic, P., Krupovic, M., Kurtböke, I., Kushkina, A., Lavigne, R., Lehman, S., Lobočka, M. ve Adriaenssens, E. M., "Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee", ***Archives of Virology***, 168(2), 1–9, 2023.

Twort, F. W., "An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses", ***Lancet***, 2, 1241–1243, 1915.

Valdivia-Rivera, S., Ayora-Talavera, T., Lizardi-Jiménez, M. A., García-Cruz, U., Cuevas-Bernardino, J. C. ve Pacheco, N., "Encapsulation of microorganisms for bioremediation: Techniques and carriers", ***Reviews in Environmental Science and Bio/Technology***, 20(3), 815–838, 2021.

Vandenheuvel, D., Singh, A., Vandersteegen, K., Klumpp, J., Lavigne, R. ve Van Den Mooter, G., "Feasibility of spray drying bacteriophages into respirable powders to combat pulmonary bacterial infections", ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, 84(3), 578–582, 2013.

Vinner, G. K. ve Malik, D. J., "High precision microfluidic microencapsulation of bacteriophages for enteric delivery", ***Research in Microbiology***, 169(9), 522–530, 2018.

Vinner, G. K., Rezaie-Yazdi, Z., Leppanen, M., Stapley, A. G. F., Leaper, M. C. ve Malik, D. J., "Microencapsulation of *Salmonella*-specific bacteriophage Felix O1 using spray-drying in a pH-responsive formulation and direct compression tableting of powders into a solid oral dosage form", ***Pharmaceutics***, 12(1), 43, 2019.

Vinner, G. K., Richards, K., Leppanen, M., Sagona, A. P. ve Malik, D. J.,

"Microencapsulation of enteric bacteriophages in a pH-responsive solid oral dosage formulation using a scalable membrane emulsification process", *Pharmaceutics*, 11(9), 475, 2019.

Vonasek, E., Le, P. ve Nitin, N., "Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release", *Food Hydrocolloids*, 37, 7–13, 2014.

Vu, N. T., Kim, H., Lee, S., Hwang, I. S., Kwon, C. T. ve Oh, C. S., "Bacteriophage cocktail for biocontrol of soft rot disease caused by *Pectobacterium* species in Chinese cabbage", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 1–15, 2024.

Wang, Q. ve Sabour, P. M., "Encapsulation and controlled release of bacteriophages for food animal production", *Bacteriophages in the Control of Food- and Waterborne Pathogens*, ASM Press, Washington, DC, 237–255. 2010.

World Health Organization (WHO), "Salmonella (non-typhoidal)", *World Health Organization*, [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)), 05 Ağustos 2024.

World Health Organization (WHO), Regional Office for South-East Asia, "Food safety: What you should know (No. SEA-NUT-196)", *World Health Organization*, 2015a. <https://iris.who.int/handle/10665/160165>

World Health Organization (WHO), "WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015", *World Health Organization*, Geneva, Switzerland, 2015b.

Wildy, P., "List of officers and members of the international committee on nomenclature of viruses", *Classification and Nomenclature of Viruses: 1st Report of the International Committee on Nomenclature of Viruses*, Karger, Basel, 5, 1-6, 1971.

Xu, Y., Yan, X., Zheng, H., Li, J., Wu, X., Xu, J., Zhen, Z. ve Du, C., "The application of encapsulation technology in the food industry: Classifications, recent advances, and perspectives", *Food Chemistry: X*, 101240, 2024.

Yang, B., Shi, Y., Xia, X., Xi, M., Wang, X. ve Ji, B., Meng, J., "Inactivation of foodborne pathogens in raw milk using high hydrostatic pressure", *Food Control*, 28(2), 273–278, 2012.

Yang, Y., Du, H., Zou, G., Song, Z., Zhou, Y., Li, H., Tan, C., Chen, H., Fischetti, V. A. ve Li, J., "Encapsulation and delivery of phage as a novel method for gut flora manipulation in situ: A review", *Journal of Controlled Release*, 353, 634–649, 2023.

Yildirim, Z., Sakin, T., Akçelik, M. ve Akçelik, N., "Characterization of SE-P3, P16, P37, and P47 bacteriophages infecting *Salmonella* Enteritidis", *Journal of Basic Microbiology*, 59(10), 1049–1062, 2019.

Yildirim, Z., Sakin, T. ve Çoban, F., "Isolation of lytic bacteriophages infecting *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis", *Acta Biologica Hungarica*, 69(3), 350–369, 2018.

Yıldirim, Z., Sakin, T., Akçelik, M. ve Akçelik, N., "Identification and characterization of lytic bacteriophages specific to foodborne pathogenic *Escherichia coli* O157:H7", *Food Science and Technology International*, 27(1), 56–72, 2021.

Yolmeh, M. ve Jafari, S. M., "Applications of response surface methodology in the Food Industry Processes", *Food and Bioprocess Technology*, 10(3), 413–433, 2017.

Zhang, B., Wang, Y., Wang, F., Zhang, Y., Hao, H., Lv, X., Hao, L. ve Shi, Y., "Microencapsulated phage composites with increased gastrointestinal stability for the oral treatment of *Salmonella* colonization in chicken", *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 1101872, 2023.

Zhao, J., Lin, Y., Wang, C., Zayda, M., Maung, A. T., Mohammadi, T. N., Duc, H. M., Yu, P., Ma, M., Gong, D., Sato, J., Masuda, Y., Honjoh, K., Miyamoto, T. ve Zeng, Z., "Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in milk, lettuce, raw pork meat and ready-to-eat steamed-chicken breast by using a novel bacteriophage with broad host range", *International Journal of Food Microbiology*, 402, 110295, 2023.

Zhou, Y., Xu, D., Yu, H., Han, J., Liu, W. ve Qu, D., "Encapsulation of *Salmonella* phage SL01 in alginate/carrageenan microcapsules as a delivery system and its application in vitro", ***Frontiers in Microbiology***, 13, 906103, 2022.

Zhu, Y., Shang, J., Peng, C. ve Sun, Y., "Phage family classification under Caudoviricetes: A review of current tools using the latest ICTV classification framework", ***Frontiers in Microbiology***, 13, 2022.



ÖZ GEÇMİŞ

Gamze KOÇER ALAŞALVAR **.**.**** tarihinde *****'ta doğdu. Lise öğrenimini Sivas Selçuk Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2014 yılında Erciyes Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden mezun oldu. Aynı yıl içerisinde Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde başlamış olduğu tezli yüksek lisans eğitimini 2017 yılında tamamladı. Doktora eğitimine, 2018 yılında Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde başladı. 2019-2022 yılları arasında Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Bölümü'nde Öğretim Görevlisi olarak görev yaptı. 2022 yılından itibaren ise Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Bor Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Bölümü'nde Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktadır. Yüksek lisans ve doktora eğitimi süresince 5 tanesi SCI kapsamında taranan dergilerde olmak üzere toplam 8 adet ulusal ve uluslararası makale yayınlamıştır. Ayrıca ulusal ve uluslararası kongrelerde sunulmuş 6 adet bildirisi bulunmaktadır.

TEZ ÇALIŞMASINDAN ÜRETİLEN ESERLER

Bu tez çalışmasından, 1 (bir) adet SCI-E kapsamında uluslararası makale ile 1 (bir) adet ulusal bildiri üretilmiştir. İlgili çalışmalar aşağıda sunulmuştur.

Koçer Alaşalvar, G., & Yıldırım, Z., “Encapsulation of SE- P47 phage specific to *Salmonella* Enteritidis and evaluation of its stability”. ***Journal of Food Safety***, 44(1), e13103, 2024.

Koçer Alasalvar, G., Yıldırım, Z., "Bakteriyofajların Enkapsülasyonu ve Potansiyel Uygulamaları", **13. Gıda Kongresi**, Çanakkale, Türkiye, s 383, 21-23 Ekim, 2020.

