



**GIDA KAYNAKLI PATOJEN BAKTERİLERİN  
BİYOKONTROLÜNDE FAJ TERAPİ VE FİTOTERAPİNİN  
BİRLİKTE KULLANIMI**

**BIOCONTROL OF FOODBORNE PATHOGENIC  
BACTERIA BY USING THE COMBINATION OF PHAGE  
THERAPY AND PHYTOTHERAPY**

**EMİNE KÜBRA TAYYARCAN**

**PROF. DR. İSMAİL HAKKI BOYACI**

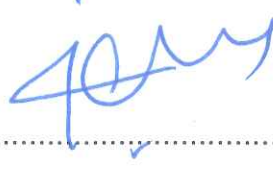
**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2017

Emine Kübra TAYYARCAN'ın hazırladığı "Gıda Kaynaklı Patojen Bakterilerin Biyokontrolünde Faj Terapi ve Fitoterapinin Birlikte Kullanımı" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

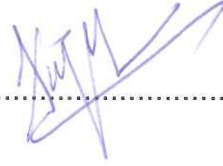
Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR  
Başkan



Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI  
Danışman Üye



Yrd. Doç. Dr. F. Ceyda DUDAK ŞEKER  
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU  
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumun 19/06/2019 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

19 / 06 / 2019  
K. TAYYARCAN

Emine Kübra TAYYARCAN



*Pakize-Abdullah TAYYARCAN'a...*

## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

19.06.2017  
Kübra

Emine Kübra TAYYARCAN

## ÖZET

# GIDA KAYNAKLI PATOJEN BAKTERİLERİN BİYOKONTROLÜNDE FAJ TERAPİ VE FİTOTERAPİNİN BİRLİKTE KULLANIMI

**EMİNE KÜBRA TAYYARCAN**

**Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı**

**Haziran 2017, 124 Sayfa**

Günümüzde patojen bakterilerin gittikçe artan antibiyotik direnci sebebiyle enfeksiyonların önüne geçilmesi zor bir hal alması araştırmacıları antibiyotiklere alternatif tedaviler bulmaya yönlendirmiştir. Bu alternatifler arasında bakterileri spesifik olarak enfekte eden bakteriyofajların kullanıldığı faj terapi ile bitki kaynaklı biyoaktif bileşenlerin kullanıldığı fitoterapi öne çıkmaktadır. Tez çalışması kapsamında, bu iki alternatif yöntem birbiriyle ilişkilendirilerek faj terapiye farklı bir yaklaşım getirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda çeşitli kaynaklardan faj izolasyonu yapılarak fajların patojen bakteriler üzerindeki aktivitesi tayin edilmiştir. Paralel şekilde nar kabuğu, üzüm çekirdeği, ayva ve çörek otundan fenolik maddelerin ekstraksiyonu gerçekleştirilerek bunların patojen bakteriler üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi saptanmıştır. Daha sonra en etkili faj ve fenolikler saptanarak ekstrakte edilen fenolik bileşenlerin fajların aktivitesi üzerine etkisi hem katı hem sıvı besiyeri ortamında incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda yalnızca çörek otunun faj aktivitesi üzerinde olumlu etki gösterdiği, nar kabuğu ve

üzüm çekirdeğinin ise faj aktivitesi üzerinde olumsuz etkileri olduğu saptanmıştır. Buna ek olarak fajlar ve fenolikler ile faj-fenolik karışımları, fizyolojik ortamlarda gördükleri zararı minimize edebilmek amacıyla püskürtmeli kurutma yöntemi kullanılarak biyopolimer matrislerde mikroenkapsüle edilmiş ve mikroenkapsüllerin mide ortamı ile safra tuzu varlığındaki stabiliteleri *in vitro* olarak kontrol edilmiştir. Mikroenkapsülasyon çalışmalarının sonucunda bu yöntemin özellikle fajların fizyolojik koşullardaki stabilitesini belirgin şekilde artırdığı ve simüle edilen fizyolojik koşullarda iki saat ve üstü inkübasyon sonucunda bile canlılığını çok yüksek şekilde koruduğu gözlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Bakteriyofaj, Patojen, Antimikrobiyal bileşenler, Mikroenkapsülasyon, Sinerjizm, Faj Terapi

## **ABSTRACT**

# **BIOCONTROL OF FOODBORNE PATHOGENIC BACTERIA BY USING THE COMBINATION OF PHAGE THERAPY AND PHYTOTHERAPY**

**EMİNE KÜBRA TAYYARCAN**

**Master of Science, Food Engineering Department**

**Supervisor: Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı**

**June 2017, 124 Pages**

Nowadays, the antibiotic resistance in pathogenic bacteria is rapidly increasing, which makes it difficult to prevent and treat bacterial infections. This led researchers to seek alternative treatment methods for antibiotics. Among these alternatives phage therapy using bacteriophages specifically infecting bacteria and phytotherapy using plant-derived bioactive components become prominent. Within the scope of the thesis study, it was aimed to bring a different approach to phage therapy by associating these two alternative methods. For this purpose phage isolation was performed from various sources and the activity of phages on pathogenic bacteria was determined afterwards. In parallel, extraction of phenolic compounds from pomegranate peels, grape seeds, quince and black cumin seeds was carried out and antimicrobial activity of phenolic compounds on pathogenic bacteria was determined. Later, the most effective phage and phenolics were detected and the effect of phenolic extracts on phage activity was examined in both solid and liquid media. As a result of the studies, it has been found that only the black cumin extract

seed extracts were found to inhibit phage activity. In addition, phages, phenolics, and phage-phenolic mixtures were microencapsulated in biopolymer matrices using spray dryer to minimize damage of physiological environment. The stability of the obtained microcapsules in simulated gastric fluid and bile salt presence was controlled *in vitro*. As a result of microencapsulation studies, it has been observed that this method significantly increased the stability of phages in physiological conditions and the phages maintain their viability at high titers even after two hours and more incubation in simulated gastric fluid and bile salts.

**Key Words:** Bacteriophage, Pathogen, Antimicrobial components, Microencapsulation, Synergism, Phage Therapy

## TEŞEKKÜR

Bilgisi ve tecrübesiyle her aşamada desteğini hissettiğim, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, birlikte çalışıyor olmaktan gurur duyduğum değerli danışmanım Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI'ya,

Tez çalışmamın tüm aşamalarındaki yardım ve desteğiyle bu süreci benim için keyifli ve verimli kılan, kendisinden çok şey öğrendiğim, sevgisini ve emeğini her zaman hissettiğim sevgili hocam Dr. Esra ACAR SOYKUT'a,

Tez çalışmama katkılarından ötürü Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR, Yrd. Doç. Dr. F. Ceyda DUDAK ŞEKER ve Prof. Dr. Sami FATTOUCH'a,

Deneysel aşamalardaki yardımları ve her türlü destekleri için Dr. Burcu GÜVEN, Gıda Müh. Şefika EVRAN, Gıda Müh. Tuğba YILDIRIM ve Gıda Müh. Tülin ERDİL'e,

Her aşamadaki desteklerinden ötürü Doç. Dr. Haslet EKŞİ KOÇAK ve Dr. Özay MENTEŞ YILMAZ'a,

Sağladıkları huzurlu ve keyifli çalışma ortamı, eşsiz dostlukları ve tüm yardımları için Yük. Gıda Müh. Banu SEZER, Gıda Müh. Esra Zeynep ARSLAN, Yük. Gıda Müh. Elif ERCİOĞLU, Yük. Gıda Müh. Nurdan ERSÖZ, Dr. Demet ATAMAN SADIK ve Dr. R. Selin UYSAL AFACAN ile RTMRG grubunun tamamına,

Sevgisi ve dostluğuyla her zaman yanımda olan annem Dilek TAYYARCAN ve kardeşim Sena'ya; emekleri, sevgileri ve destekleriyle bugünlere ulaşmamı sağlayan anneannem Pakize TAYYARCAN ve büyükbabam Abdullah TAYYARCAN'a,

Ve tez çalışmamı TÜBİTAK-MHESR ikili işbirliği projesi kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a,

teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

|  | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| ÖZET .....   | i            |
| ABSTRACT .....   | iii          |
| TEŞEKKÜR.....  | v            |
| ŞEKİLLER.....  | ix           |
| ÇİZELGELER.....  | x            |
| SİMGELER ve KISALTMALAR .....  | xii          |
| 1.GİRİŞ .....  | 13           |
| 2.GENEL BİLGİLER.....  | 16           |
| 2.1. Patojen Bakteriler .....  | 16           |
| 2.1.1. Gıda Kaynaklı Patojen Bakteriler, Bulaşı Kaynakları ve Sebep Oldukları Hastalıklar..... | 16           |
| 2.1.2. Gıdalardaki Patojenlerin Kontrolü .....   | 17           |
| 2.1.3. Patojenlerin Antibiyotik Direnci ve Yarattığı Riskler .....                             | 23           |
| 2.2. Fajlar .....  | 25           |
| 2.2.1. Fajlar ve Genel Özellikleri.....  | 25           |
| 2.2.2. Fajların Keşfi ve Sınıflandırılmaları.....  | 25           |
| 2.2.3. Fajların Yaşam Döngüleri .....  | 27           |
| 2.2.4. Faj Terapinin Tarihi ve Güncel Uygulamaları .....                                       | 29           |
| 2.2.5. Faj Terapinin Olumlu ve Olumsuz Yönleri .....   | 31           |
| 2.2.6. Faj Terapi ve Sinerjizm Çalışmaları.....  | 35           |
| 2.3. Fenolikler .....  | 36           |
| 2.3.1. Fenolik Bileşenler ve Yapıları .....  | 36           |
| 2.3.2. Fenolik Bileşenlerin Ekstrakte Edildiği Bitkisel Kaynaklar .....                        | 41           |
| 2.3.3. Fenolik Bileşenlerin Antimikrobiyal Aktiviteleri .....                                  | 44           |
| 2.4. Mikroenkapsülasyon .....  | 46           |
| 2.4.1. Mikroenkapsülasyonda Kullanılan Materyaller.....  | 47           |
| 2.4.2. Mikroenkapsülasyon Yöntemleri.....  | 48           |
| 2.4.3. Mikroenkapsülasyon Teknolojisinin Kullanım Alanları .....                               | 52           |
| 2.4.4. Fajların ve Fenolik Bileşenlerin Mikroenkapsülasyonu .....                              | 53           |
| 3. MATERYAL VE METOT .....   | 56           |

|  |    |
|--|----|
| 3.1. Materyal.....   | 56 |
| 3.1.1. Bakteriler .....  | 56 |
| 3.1.2. Faj İzolasyon Materyalleri .....  | 56 |
| 3.1.3. Fenolik Ekstraksiyonunda Kullanılan Materyaller .....   | 56 |
| 3.1.4. Besiyerleri ve Kimyasallar .....  | 57 |
| 3.2. Metot.....  | 57 |
| 3.2.1. Faj İzolasyonu, Saflaştırma ve Zenginleştirme .....   | 57 |
| 3.2.1.1. Fajların İzolasyonu .....   | 58 |
| 3.2.1.2. Tek Plak İzolasyonu ile Saflaştırma.....  | 60 |
| 3.2.1.3. Zenginleştirme ve Titre Belirlemesi.....  | 60 |
| 3.2.1.4. Konakçı Kültürlerin ve Fajların Saklanması .....  | 61 |
| 3.2.2. Fajların Cinsler ve Türler Arası Konakçı Özgüllüklerinin ve Aktivitelerinin Belirlenmesi .....                        | 61 |
| 3.2.3. Fajların Mikroenkapsülasyonu ve Mikroenkapsülasyon Etkinliğinin Saptanması .....                                      | 61 |
| 3.2.3.1. Fajların Mikroenkapsülasyonu .....  | 61 |
| 3.2.3.2. Mikroenkapsülasyon Etkinliğinin Saptanması.....   | 63 |
| 3.2.4. Fenolik Ekstraksiyonu ve Toplam Fenolik Madde ve Kuru Madde Miktarının Belirlenmesi .....                             | 63 |
| 3.2.4.1. Fenoliklerin Ekstraksiyonu .....  | 63 |
| 3.2.4.2. Toplam Fenolik Madde Tayini .....   | 64 |
| 3.2.5. Fenoliklerde Antimikrobiyal Aktivite Tayini.....  | 64 |
| 3.2.6. Fenoliklerin Mikroenkapsülasyonu .....  | 66 |
| 3.2.7. Fenoliklerin Mikroenkapsülasyon Etkinliğinin ve Mikroenkapsülasyon Sonrası Antimikrobiyal Aktivitenin Saptanması..... | 66 |
| 3.2.8. Fajlar ile Fenolikler Arasındaki Etkileşimlerin İncelenmesi .....   | 67 |
| 3.2.8.1. Fenoliklerin Fajların Plak Büyüklüğü Üzerine Etkisi .....   | 67 |
| 3.2.8.2. Faj-Fenolik Etkileşiminin Sıvı Ortamda İncelenmesi .....  | 67 |
| 3.2.9. Faj-Fenolik Karışımlarının Mikroenkapsülasyonu .....  | 69 |
| 3.2.10. Mikroenkapsüle Faj ve Fenoliklerin Mide Ortamı Denemeleri .....  | 69 |
| 3.2.11. Mikroenkapsüle Faj ve Fenoliklerin Safra Tuzu Ortamı Denemeleri .....  | 70 |
| 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....  | 71 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.1. Fajların İzolasyonu.....   | 71  |
| 4.2. Fajların Cinsler ve Türler Arası Konakçı Özgüllüklerinin ve Aktivitelerinin Belirlenmesi.....                      | 76  |
| 4.3. Fajların Mikroenkapsülasyon Etkinliğinin Saptanması .....  | 81  |
| 4.4. Fenolik Ekstraksiyonu ve Toplam Fenolik Madde ile Kuru Madde Tayini .....  | 83  |
| 4.5. Fenoliklerin Antimikrobiyal Aktivitesinin Saptanması .....   | 84  |
| 4.6. Fenoliklerin Mikroenkapsülasyon Veriminin ve Mikroenkapsülasyon Sonrası Antimikrobiyal Aktivitenin Saptanması..... | 86  |
| 4.7. Fajlar ile Fenolikler Arasındaki Etkileşimin İncelenmesi.....  | 88  |
| 4.7.1. Fenoliklerin Fajların Plak Büyüklüğü Üzerine Etkisi .....  | 88  |
| 4.7.2. Faj-Fenolik Etkileşiminin Sıvı Ortamda İncelenmesi .....   | 91  |
| 4.8. Faj-Fenolik Karışımlarının Mikroenkapsülasyonu .....   | 96  |
| 4.9. Mikroenkapsüle Faj ve Fenoliklerin Mide Ortamı Denemeleri .....  | 97  |
| 4.10. Mikroenkapsüle Faj ve Fenoliklerin Safra Tuzu Ortamı Denemeleri .....   | 99  |
| 5. SONUÇ VE YORUM .....   | 103 |
| KAYNAKLAR.....  | 108 |
| ÖZGEÇMİŞ .....  | 125 |

## ŞEKİLLER

### Sayfa

|   |     |
|---|-----|
| Şekil 2.1. temelinde T4 (A), λ (B), PM2(C), ΦX174(D), MS2(E) ve fd(F) fajları (Bradley tarafından yapılan sınıflamadan uyarlanmıştır [59].) .....   | 26  |
| Şekil 2.2. Flavonoidlerin ana sınıflarının kimyasal yapıları .....  | 39  |
| Şekil 2.3. Kondense tanenlere bir örnek (proantosiyanidin) .....  | 40  |
| Şekil 2.4. Kalkon ve kumarinlerin genel yapıları .....  | 40  |
| Şekil 2.5. Benzoik ve sinamik asitlerin genel yapıları .....  | 41  |
| Şekil 2.6. Nar ( <i>Punica granatum</i> ) .....   | 42  |
| Şekil 2.7. Üzüm ( <i>Vitis vinifera</i> ) ve üzüm çekirdekleri .....  | 43  |
| Şekil 2.8. Ayva ( <i>Cydonia oblonga</i> ) .....  | 43  |
| Şekil 2.9. Çörek otu tohumları (a) ve öğütülmüş halleri (b).....  | 44  |
| Şekil 2.10. Çeşitli mikrokapsül tipleri (Dubey vd.'den uyarlanmıştır [158].) .....  | 47  |
| Şekil 2.11. Jyothi vd.'den [164] uyarlanan püskürtmeli kurutma işleminin şematik gösterimi (a) ve tez çalışmalarında kullanılan püskürtmeli kurutucu (b) .....  | 51  |
| Şekil 4.1. <i>E. coli</i> tp3 fajının $10^{-2}$ (a), $10^{-3}$ (b), $10^{-4}$ (c) ve $10^{-5}$ (d) dilüsyonları .....   | 75  |
| Şekil 4.2. <i>S. Typhimurium</i> bakterisine <i>E. coli</i> tp1, tp2 ve tp3 ve <i>S. Typhimurium</i> tp1 fajlarının (a), <i>E. coli</i> O157:H7 iç bakterisine <i>E. coli</i> tp1, tp2, tp3 ve <i>Salmonella</i> tp1 fajlarının (b), <i>E. coli</i> bakterisi üzerine <i>Salmonella</i> tp1, tp2, tp3 ve <i>S. Typhimurium</i> tp1 ve tp2 fajlarının (c) ve <i>S. Typhimurium</i> bakterisi üzerine <i>Salmonella</i> tp1, tp2, tp3 ve <i>S. Typhimurium</i> tp2 fajlarının etkisi (d). ..... | 80  |
| Şekil 4.3. Gallik aside ait kalibrasyon eğrisi.....   | 83  |
| Şekil 4.4. Agar ortamında nar kabuğu (a), üzüm çekirdeği (b), ayva (c) ve çörek otu (d) ekstraktlarının <i>S. aureus</i> üzerindeki inhibisyonunu gösteren zonlar .....   | 85  |
| Şekil 4.5. Agar üzerinde hiçbir ekstrakt damlatılmayan (a), çörek otu ekstraktı damlatılan (b), nar kabuğu ekstraktı damlatılan (c) ve üzüm çekirdeği ekstraktı damlatılan (d) bölgelerde <i>S. aureus</i> 4a1 tp2 faj plakları. ....   | 91  |
| Şekil 4.6. NS ortamında, <i>S. aureus</i> 4a1 tp2 fajının gelişme eğrisindeki değişim..   | 93  |
| Şekil 4.7. NS ortamında, <i>S. aureus</i> 4a1 tp2 fajının gelişme eğrisindeki değişim..   | 94  |
| Şekil 4.8. Mide ortamı (a) ve safra tuzu ortamında (b) 120 dakikalık inkübasyon sonunda mikroenkapsüle çörek otu ekstraktının <i>S. aureus</i> üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi.....  | 102 |

# ÇİZELGELER

## Sayfa

|   |    |
|---|----|
| Çizelge 3.1. Fajların izolasyonu için kullanılan ticari faj mikslarının içerikleri .....  | 58 |
| Çizelge 3.2. Fajların mikroenkapsülasyonu için denenen örnek karışımları ve proses parametreleri .....  | 62 |
| Çizelge 3.3. Ekstraktların mikroenkapsülasyonu için denenen örnek karışımları ve proses parametreleri .....   | 66 |
| Çizelge 4.1. Konakçı bakteriler ile karşılaştırılan faj miksları .....  | 71 |
| Çizelge 4.2. Konakçı bakteriler ile karşılaştırılan faj mikslarından elde edilen ilk sonuçlar.....  | 71 |
| Çizelge 4.3. Farklı kaynaklardan alınan örnekler ile çeşitli hedef konakçılar arasında yapılan karşılaştırmaların sonuçları .....                             | 73 |
| Çizelge 4.4. Tez çalışması kapsamında izole edilerek saflaştırılan fajların tam listesi .....   | 73 |
| Çizelge 4.5. İzole edilen fajların çalışılan tüm bakteriler üzerindeki litik etkileri ....  | 76 |
| Çizelge 4.6. Çeşitli örnek karışımları ve proses parametrelerinde gerçekleştirilen mikroenkapsülasyon işlemi sonucunda faj titrelerinde görülen değişim. .... | 81 |
| Çizelge 4.7. Mikroenkapsüle edilen fajların işlem sonrasındaki titre değişimleri... ..  | 82 |
| Çizelge 4.8. Elde edilen ekstraktların toplam fenolik içeriği ve kuru madde miktarı .....   | 84 |
| Çizelge 4.9. Elde edilen ekstraktların çalışılan konakçı bakteriler üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri .....  | 84 |
| Çizelge 4.10. Nar kabuğu, üzüm çekirdeği, ayva ve çörek otu ekstraktlarının hedef bakterilere ait MIC ve MBC değerleri.....                                   | 86 |
| Çizelge 4.11. Mikroenkapsüle edilmiş fenolik ekstraktların mikroenkapsülasyon etkinliği .....   | 87 |
| Çizelge 4.12. Mikroenkapsüle edilmiş ekstraktların konakçı üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri .....   | 87 |
| Çizelge 4.13. Nar kabuğu, üzüm çekirdeği, ayva ve çörek otu ekstraktlarının çeşitli fajların plak büyüklüğü üzerine etkisi.....                               | 89 |
| Çizelge 4.14. Farklı MOI değerleri ve NS konsantrasyonlarında yapılan denemeler sonucunda elde edilen faj titreleri ve bakteri sayıları .....                 | 92 |

|  |     |
|--|-----|
| Çizelge 4.15. Farklı MOI değerleri ve P konsantrasyonları ile yapılan denemeler sonucunda elde edilen faj titreleri ve bakteri sayıları .....  | 95  |
| Çizelge 4.16. Farklı MOI değerleri ve GS konsantrasyonları ile yapılan denemeler sonucunda elde edilen faj titreleri ve bakteri sayıları ..... | 96  |
| Çizelge 4.17. Model mide ortamında 0, 15, 30, 60, 90 ve 120 dakikalık inkübasyonlar sonucunda mikroenkapsüle fajların titreleri .....          | 97  |
| Çizelge 4.18. Model mide ortamında 120 dakikalık inkübasyon sonucunda mikroenkapsüle ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri .....           | 98  |
| Çizelge 4.19. Safra tuzu içeren ortamda 60 ve 180 dakikalık inkübasyonlar sonucunda mikroenkapsüle fajların titreleri .....                    | 100 |
| Çizelge 4.20. Safra tuzu içeren ortamda 120 dakikalık inkübasyon sonucunda mikroenkapsüle ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri .....      | 101 |

## SİMGELER ve KISALTMALAR

### Simgeler

- $a_w$  : Su Aktivitesi  
 $R^2$  : Belirleme Katsayısı

### Kısaltmalar

- CDC : Hastalık Kontrol ve Koruma Merkez  
CDE : Karbapenem Dirençli Enterobacteriaceae  
FDA : Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi"  
FTS : Fizyolojik Tuzlu Su  
GAE : Gallik Asit Eşdeğerliği  
GRAS : Genellikle Güvenli Kabul Edilir  
GS : Üzüm Çekirdeği  
HTST : Yüksek Sıcaklık Kısa Süre  
ICTV : Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi  
LDL : Düşük Yoğunluklu Lipoprotein  
LTLT : Düşük Sıcaklık Uzun Süre  
MBC : Minimum Bakterisidal Konsantrasyon  
MHESR : Tunus Yüksek Eğitim ve Bilimsel Araştırma Bakanlığı  
MIC : Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu  
MOI : İnfeksiyon Çokluğu  
NCBI : Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi  
NS : Çörek Otu (*Nigella sativa*)  
P : Nar Kabuğu  
RES : Retikuloendotelial Sistem  
TÜBİTAK : Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu  
UHT : Ultra Yüksek Sıcaklık  
WHO : Dünya Sağlık Örgütü

## 1. GİRİŞ

Son yüzyılda doktorlar ve veteriner hekimler patojen bakterilerin yol açtığı hastalıkları tedavi etmek için çoğunlukla antibiyotikleri tercih etmektedir. Fakat antibiyotiklerin klinik, hayvansal ve tarımsal alandaki yaygın ve bilinçsiz kullanımı sonrasında bakterilerin antibiyotik direnci geliştirmesi, antibiyotiklerin gittikçe daha az etkili olmasına sebep olmuştur [1]. Antibiyotiklerin giderek daha çok risk teşkil etmesi nedeniyle bu kimyasallara alternatif yollar aranmaya başlanmıştır.

Bakterileri doğal ve spesifik olarak enfekte eden virüslerden olan bakteriyofajların antibiyotiklerin yerini alması ve insanlarda, hayvanlarda veya tarımsal öneme sahip bitkilerde bakteri enfeksiyonlarının kontrol edilmesine yardımcı olması öne çıkan alternatiflerden biri olmuş ve “faj terapi” kavramı önem kazanmıştır [2]. Bakteriyofajlar prokaryotik özellikte, tüm ortamlarda son derece yaygın bir şekilde bulunan virüsler olup en etkili doğal antibakteriyel ajan oldukları düşünülmektedir [3]. Fajlar, d’Herrele tarafından keşfedilip çeşitli çocuk dizanterisi vakalarında kullanıldığından beri insanlarda bakteriyel enfeksiyonlar için önerilen bir tedavi yöntemi olmuştur [4]. Bakteriyel virüslerin keşfini duyuran ilk çalışmaların hemen ardından, fajların terapötik kullanımı Batı’da hızla yayılmış ve çok çeşitli enfeksiyonlar, fajlar kullanılarak başarıyla tedavi edilmiştir. Memeli ve bitki hücrelerini değil, yalnızca bakteriyi hedef alan bu virüsler, Birleşik Devletler’de pek çok ilaç firması tarafından üretilerek satışa çıkarılmıştır [5]. Fakat 1940 ve 1950’lerde antibiyotiklerde seri üretime geçilmesi ve bunların giderek yayılması ile faj terapi neredeyse tamamen unutulmuştur. Buna rağmen Sovyetler Birliği, Polonya ve Çek Cumhuriyeti’nde fajların geliştirilmesi ve faj terapi çalışmaları duraklama göstermemiş, yıllar boyu güvenli ve etkili bir tedavi yöntemi olarak kullanılmıştır. Günümüzde, bu tip antimikrobiyal ilaçların seri üretimi Rusya ve Gürcistan’da devam etmektedir. Bu süreçte antibiyotiklerin yaygın ve bilinçsiz kullanımı sonucu bakterilerde gelişen antibiyotik direnci her yaş ve sosyoekonomik statüden insan için ciddi bir tehlike doğurmuştur [6]. Günümüzde antibiyotiklerin başarısı azalırken araştırmacılar onlara alternatif geliştirme amacıyla rotalarını antibiyotik öncesi döneme çevirmişler ve buradan da fajlara (faj terapi) bir yöneliş başlamıştır [7], [8]. İnsanlardaki, hayvanlardaki ve tarım ürünlerindeki bakteriyel enfeksiyonlarla savaşmak üzere pek çok faj uygulaması önerilmiştir [9], [10]. Hayvan modelleri ve insanlarda görülen enfeksiyonlarda pek çok kontrollü çalışma yürütülmüş ve

bunlarda fajların *in vivo* antibakteriyel terapi potansiyelini ortaya koyan başarılı sonuçlar elde edilmiştir [11].

Benzer şekilde, son yıllarda antibiyotiklere alternatif olabileceği düşünülen çeşitli fitokimyasalların antimikrobiyal potansiyeli çok sayıda bilimsel raporda vurgulanmıştır [12], [13]. Her ne kadar fitoterapi olarak bilinen bu bitkisel kür yöntemi insanlığın aşına olduğu en eski terapilerden biriye de, biyoaktif moleküllerin terapötik güçlerinin bilimsel olarak da ortaya konması onların geleneksel tıptaki kullanımını doğrulamıştır. Sıklıkla incelenmiş olan üzüm çekirdekleri (*Vitis vinifera*) ve çay yaprakları (*Camellia sinensis*) gibi örnekler başta olmak üzere, pek çok çalışmada bitkisel kaynakların hayli yüksek miktarlarda biyoaktif bileşen içerdiği ortaya konmuştur. Bu biyolojik materyaller sağlık açısından önemli biyomoleküller için ekonomik bir kaynak özelliği göstermektedir [14].

Tez çalışması kapsamında faj terapi ve fitoterapi ilişkilendirilerek bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirdiği dirençten kaynaklanan dezavantajı elimine etmek amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, antimikrobiyal potansiyeli artıracak bir sinerjistik etkinin araştırılması hedeflenmiş ve çalışma kapsamında izole edilen fajlar ile bitkisel kaynaklardan ekstrakte edilen fenolik bileşenler arasındaki etkileşim incelenmiştir. Buna ek olarak, daha sonraki uygulamalarda bakterilerin, özellikle de dirençli suşların, daha geniş bir yelpazede kontrol edilebilmesi amacıyla faj kokteyllerinin hazırlanması için konakçı bakteri ve faj koleksiyonlarının zenginleştirilmesi de hedeflenmiştir. Bu hedefler doğrultusunda, çalışma kapsamında farklı kaynaklardan fajlar izole edilerek saflaştırılmış ve zenginleştirilmiştir. Paralel şekilde nar kabukları, üzüm çekirdekleri, ayva ve çörek otu kullanılarak fenolik maddelerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu aşamayı takiben hem fajların, hem de fenolik maddelerin patojen bakteriler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Fajların ve fenolik bileşenlerin mikroenkapsülasyonu, geliştirilen preparatların fizyolojik sıvıların zorlu koşullarındaki (midenin asidik ortamı, enzimler ve safra tuzları gibi) stabilitesinin artırılmasına olanak sağlamaktadır [15]–[17]. Mikroenkapsülasyon, katı, sıvı ya da gaz halindeki maddeleri kontrollü oranlarda ve özel şartlar altında içeriklerini serbest bırakan minyatür kapsüllerde paketleyen bir teknoloji olarak tanımlanır [18], [19]. Bu çalışma kapsamında da, mikroenkapsülasyon ile faj ve polifenollerin, hedef bakterilerin inhibisyonunu

gerçekleştirecekleri *in vivo* ortamda göreceği zararın minimize edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda biyopolimer matrisleri kullanılarak, püskürtmeli kurutucu yardımıyla bakteriyofajların ve polifenollerin mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilmiş ve bu yapıların hedef bakteriler üzerindeki aktiviteleri saptanmıştır. Ardından hem katı ortamda, hem de sıvı besiyeri ortamında kurgulanan denemeler ile fenolik bileşenlerin fajların aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Pozitif etki görülen karşılaştırmalarda bir sonraki adıma geçilerek faj ve fenolikler optimum olduğu saptanan koşullarda karıştırılarak bir arada mikroenkapsüle edilmiştir. Son adım olarak mikroenkapsüle edilmiş örneklerin farklı fiziko-kimyasal koşullara (sıcaklık, pH, safra tuzları, proteazlar) karşı dirençleri kontrol edilerek *in vivo* denemeler için elverişlilikleri saptanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Patojen Bakteriler

#### 2.1.1. Gıda Kaynaklı Patojen Bakteriler, Bulaşı Kaynakları ve Sebep Oldukları Hastalıklar

Gıdalar sadece insanlar için değil bazı mikroorganizmalar için de yaşam kaynağıdır. Dolayısıyla patojen bakterilerin bulunduğu gıdaların tüketilmesi, gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonlara neden olmaktadır. Gıdanın, üzerinde çoğalmış olan bakteriler ile vücuda alınımı gıda kaynaklı enfeksiyonlar olarak tanımlanmaktadır. Gıda kaynaklı intoksikasyonlar ise, bu bakterilerin ürettiği toksinlerin vücuda alınması ile ortaya çıkmaktadır [20]. *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Coxiella*, *Listeria*, *Enterobacter*, *Vibrio*, *Enterococcus*, *Yersinia* cinsi bakterilerin bazı türleri gıda kaynaklı enfeksiyonlara ve intoksikasyonlara neden olan bakteriler arasındadır [21]–[24].

Gıda ile birlikte vücuda alınan bakteri sayısı ve/veya toksin miktarı çok önemlidir. Ancak insanların tükettiği diğer gıdalar ve bağışıklık sistemlerinin güçlü olup olmaması hastalıktan ne derece etkileneceklerinin belirleyen diğer bir faktördür. Gıda kaynaklı rahatsızlıklarda diğer hastalıklarda olduğu gibi hamileler, çocuklar ve yaşlılar büyük risk grubunu oluşturmaktadır [25].

Genel olarak bakıldığında gıda kaynaklı enfeksiyon ve ya intoksikasyona maruz kalındığında bulantı, kusma, baş ağrısı, baş dönmesi, boğaz ve burunda yanma, ishal, bitkinlik, boğazda ağrı, ateş, lenf düğümlerinde ödem, miğde ağrısı, ishal, kanlı veya mukoid ishal solunum zorluğu, kanlı gayta, gastroenterititis, refleks kaybı, solunum felci gibi hangi bakterinin ve/veya toksinin etkin olduğuna göre değişen belirtiler görülmektedir [24], [26].

Daha önce de belirtildiği gibi mikroorganizmalar, yaşam ve fonksiyonlarını devam ettirebilmek için gıdaya gereksinim duyarlar. Bir gıdada bulunabilecek mikroorganizmalar, o gıdanın türüne, yetiştiği ya da bulunduğu coğrafik bölgeye göre büyük çeşitlilik göstermektedir. Bu bitkinin ya da hayvanın taşıdığı doğal mikrofloradır. Buna ek olarak hava, toprak, su, kanalizasyon atıkları, insanlar, ekipmanlar gibi farklı faktörler nedeniyle de gıdaların taşıdığı mikroorganizmalar çeşitlenmekte ve miktarları artmaktadır [27].

Bazı patojen bakterilerin bulaşı kaynaklarını ayrı ayrı incelemek gerekirse;

*Staphylococcus aureus* bulaşışının en sıklıkla karşılaşıldığı gıdalar arasında tüketime hazır gıdalar (ready-to-eat) yer almaktadır. Ayrıca et ürünleri, tavuk, şambon, salam, süt ve süt ürünleri, pastacılıkta kullanılan kremler ve dondurmalar da *S. aureus* kontaminasyonun olabileceği gıdalardır. Gıda kaynaklı intoksikasyona neden olduğu bilinen *Clostridium botulinum* riski ile karşı karşıya kalınmasına en büyük neden konserveledir. Bunun yanında sebzeler, jambon, fermente ya da tütsü yoluyla üretilen balıklar, salamura et ürünleri bu bakteri tarafından üretilen toksine maruz kalınmasına neden olabilmektedir. İnsanlar için önemli derecede patojeniteye sahip olan *Listeria* türü, *Listeria monocytogenes*'tir. Bu bakterinin sıklıkla karşılaşıldığı gıdalar ise taze ve yumuşak peynirler, kanatlı etleri, çiğ kırmızı et ürünleri, jambon, sosis, salam gibi gıdalardır. Bir diğer yüksek patojeniteye sahip bakteri *Salmonella*'dır. Bulaşışının en yüksek olduğu gıdalar çiğ tavuk ve yumurtadır. Ayrıca süt ve süt ürünleri, deniz ürünleri, salatalar, çiğ et ürünleri, yarı pişirilmiş tüketime hazır gıdalar ve çocuk mamaları da *Salmonella* kontaminasyonu riski taşımaktadır. Fekal kontaminasyonun indikatörü olarak bilinen *Escherichia coli*'nin patojenik karakterde olmayan suşları olduğu gibi farklı virülens faktörlere sahip suşları da bulunmaktadır. *E. coli*'nin doğal ortamı sıcak kanlı hayvanların bağırsaklarıdır. Dolayısıyla dışkı ile kontamine olmuş tüm gıdalar, bu bakteriyi taşıyabilmektedir. Salataların, yeteri kadar ısıtılmamış ya da pişirildikten sonra tekrar ısıtılmayan gıdaların tüketilmesi sonucu, bu bakterinin neden olduğu enfeksiyon görülmektedir. Bunların dışında *Vibrio*, deniz sularında ve deniz ürünlerinde; *Yersinia*, domuz eti ve ürünlerinde, sütte; *Campylobacter*, büyük ve küçük baş hayvanlarda, tavuklarda, meyve ve sebzelerde; *Shigella*, kanalizasyon suyu ile kontamine olan gıdalarda, çiğ kıyma ve ıstiridyede sıklıkla ortaya çıkmaktadır [20], [21], [24], [25], [28]–[31].

### **2.1.2. Gıdalardaki Patojenlerin Kontrolü**

Gıdaların bozulmasına ve gıda kaynaklı hastalıklara neden olabilecek bakteriler söz konusu olduğunda hedef, bu bakterilerin sayılarını en aza indirmek yahut gıdalardaki varlıklarını tamamen yok etmektir. Bu hedefleri gerçekleştirmek için tek tek veya kombinasyon halinde uygulanabilen yöntemlerin temeli;

mikroorganizmaların gıdalara erişimini kontrol etme, gıdalarda bulunan mikroorganizmaları fiziksel olarak uzaklaştırma, gıdalardaki sporların çimlenmesi ve mikroorganizmaların üremesini önleme/azaltma ile gıdalardaki mikrobiyal hücreleri ve sporları öldürme şeklinde özetlenmektedir [27].

Bu denetim ve koruma yöntemleri 10 ana başlık altında incelenebilir:

Erişimin Kontrolü (Temizlik ve Sanitasyon): Hayvansal ve bitkisel gıdalara pek çok kaynaktan mikroorganizma bulaşısı olmaktadır. Mikroorganizmaların bu kaynaklardan gıdaya ulaşmasını tamamen engellemek mümkün olmasa da, başlangıç yükünü azaltmak ve mikrobiyal bozulma ile sağlık riskini en aza indirmek için gıdaya erişimlerini kontrol etmek mümkündür [27]. Sanitasyonun temel amacı, mikroorganizmaların gıdaya erişimini prosesin her aşaması için minimize edebilmektedir. Uygun şekilde gerçekleştirilen sanitasyon, işlenmiş gıdadaki mikroorganizma yükünü istenen seviyelere çekmeye yardımcı olduğu gibi, son ürünün raf ömrünün uzamasına da katkı sağlamaktadır [32]. Sanitasyonun önemli aşamalarından biri işletme tasarımı olup; bu aşama yeterli aydınlatma, havalandırma ve son ürün ile çiğ ürünün işlendiği alanların birbirinden ayrılması, atık sistemi gibi önemli noktalarda yapılan kontrolleri kapsamaktadır. İşletmede kullanılan suyun, buzun, salamura ve kütleme solüsyonlarının kalitesi ve içeriği de kontrol edilmekte, böylece proses esnasında çapraz kontaminasyon riski en aza indirilmektedir. Gıda işletmelerinde püskürtmeli kurutma gibi bazı proses aşamalarında gıdayla direkt olarak temasta bulunan yüksek hacimlerde hava kullanılmaktadır. Bu havanın filtrasyon gibi yöntemlerle temizlenmiş olması bu kaynaktan gelebilecek kontaminasyonu minimize etmektedir. Aynı şekilde personelin eğitilmiş olması ve işletme içerisindeki ekipmanların kolay temizlenebilen ve kontaminasyon riskini artırmayan yapı ve özellikte seçilmesi de bu aşamada alınan önlemler arasındadır. Gıda işleme ekipmanının sanitasyonu için çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Bu ekipmanların sanitasyonunda kullanılan fiziksel ajanlar sıcak su, buhar, sıcak hava ve UV ışınlamayı içerir. Fakat esas yaygın olarak kullanılanlar kimyasal dezenfektanlardır. Gıda işletmelerinde sıklıkla kullanılan dezenfektanlara örnek olarak klor bazlı dezenfektanlar, iyodoforlar, kuaterner amonyum bileşikler ve hidrojen peroksit verilebilir [33].

Fiziksel Eliminasyonla Kontrol: Mikroorganizmalar katı ve sıvı gıdalardan çeşitli yöntemlerle fiziksel olarak uzaklaştırılabilir. Genel olarak, bu yöntemler mikrobiyal yükü azaltarak sonraki adımların daha etkili hale gelmesine yardımcı olurlar. Bu yöntem genelde çiğ gıdalarda proses öncesi aşamada kullanılırlar. Fiziksel eliminasyonda kullanılan yöntemler arasında santrifüjleme (süt, meyve suları, şuruplar), filtrasyon (alkolsüz içecekler, bira, şarap, su ve püskürtmeli kurutma gibi proseslerde kullanılan hava), kesme (sebze ve meyvelerdeki hasarlı kısımların kesilmesi) ve yıkama sayılabilir [27].

Isıl İşlem ile Kontrol: Gıdalardaki ısı işlem uygulamalarının amacı mikroorganizmaların (küf, maya, bakteri ve bakteriyofajlar da dahil olmak üzere virüsler) vejetatif hücrelerini ve sporlarını yok etmektir. Sterilizasyon gibi çok etkili bir ısı işlemle gıdadaki tüm mikroorganizmaları yok etmek mümkün olsa da pek çok gıdaya yalnızca belirli bazı patojenleri ve bozulma etmeni mikroorganizmaları yok edecek şekilde ısı işlem uygulanmaktadır. Gıdalara uygulanan ısı işlemler ayrıca istenmeyen enzimlerin eliminasyonuna da yardımcı olmaktadır. Mikroorganizmaları yok etmek için uygulanan sıcaklık ve ısıtma süresi baz alındığında ısı işlemler iki ana gruba ayrılabilir. Bunların ilki düşük sıcaklık uygulamaları ya da pastörizasyon olup, bu uygulamalarda kullanılan sıcaklık 100°C'nin altındadır. Pastörizasyonun temel hedefi patojenlerin tüm vejetatif hücrelerini ve çoğu zaman bozulmaya neden olabilen çok sayıda mikroorganizmayı (maya, küf, bakteri ve virüs) yok etmektir. Sıcaklık ve zaman, hem mikrobiyolojik hedefleri karşılamak hem de ürünün kalitesini düşürebilecek termal hasarı en aza indirmek için optimum koşullarda ayarlanır. Sütün pastörizasyonunda düşük sıcaklık uzun süre (LTLT; Low Temperature Long Time) ve yüksek sıcaklık-kısa süre (HTST; High Temperature Short Time) olmak üzere iki temel norm yaygın şekilde kullanılmaktadır. Düşük sıcaklık-uzun süre uygulaması 62,8°C'de 30 dakika boyunca gerçekleştirilirken, yüksek sıcaklık-kısa süre uygulaması 71,7°C'de 15 saniye süreyle gerçekleştirilmektedir. Bazı gıdaları ısıtmak için sıcak su veya nemli ısı (örneğin et ürünleri için) kullanımına ilaveten, kurutulmuş yumurta akları ve kurutulmuş hindistancevizi gibi diğer ürünler kuru ısı ile pastörize edilmektedir. Bu ürünlerde de, ürünün özelliğine göre çeşitli pastörizasyon normları kullanılmaktadır. Gıdalara uygulanan ısı işlemlerde bir diğer temel uygulama yüksek sıcaklık uygulamasıdır. Bu uygulamalarda gıdalar 100°C üzerindeki sıcaklıklara ısıtılmaktadır. Çoğu ürün, normal depolama koşulları altında

içeriğinde çoğalabilecek mikroorganizmaları yok etmek için ticari olarak “steril” olacak şekilde işlem görür. Asiditesi düşük ( $\text{pH}>4.6$ ) gıdalar yüksek sıcaklık değerlerinde işlem görürken yüksek asiditeye ( $\text{pH}<4.6$ ) sahip gıdalar, asitliğin getirdiği koruyucu özellik nedeniyle daha düşük sıcaklıklarda işlem görmektedirler. Ticari sterilite, bir gıdayı çok yüksek sıcaklıklarda kısa bir süre ısıtarak da elde edilir. Bu işlem ultra yüksek sıcaklık (UHT) işlemi olarak belirlenmiştir. Süt,  $150^{\circ}\text{C}$ 'de 2-3 saniye işlem görerek oda sıcaklığında saklanabilir hale getirilmektedir. [34], [35].

Düşük Sıcaklık ile Kontrol: Gıdaları düşük sıcaklıklara maruz bırakarak koruma yönteminde temel amaç mikroorganizmaların üremesini önlemek veya azaltmaktır. Düşük sıcaklık, mikrobiyal enzimlerin, özellikle ısıya dayanıklı proteazların ve lipazların katalitik aktivitesini azaltmakta veya engellemektedir. Düşük sıcaklıklarda sporların çimlenmesi de azalmaktadır. Gıdalar, raf ömrünü uzatmak için düşük sıcaklıklarda farklı yollarla depolanmaktadır. Çoğu taze meyve ve sebze, metabolik hızlarını düşürmek için  $10-20^{\circ}\text{C}$  veya daha düşük sıcaklıklarda tutulmaktadır. Kolay bozulabilen ürünler genellikle  $7^{\circ}\text{C}$ 'nin altında düşük sıcaklıkta, genellikle diğer koruma yöntemleri de kullanılarak depolanır. Gıdaları korumak amacıyla uygulanan düşük sıcaklıkla kontrol yöntemlerinden biri buzda soğutmadır. Bu yöntem yiyeceklerin buz üzerinde tutulduğu perakende mağazalarda kullanılır. Buzla temas eden yüzeyin sıcaklığı  $0-1^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar düşebilmektedir. Taze balık, deniz ürünleri, etler, kesilmiş meyveler, sebze salataları ve hazır yemek çeşitleri gibi bazı gıdalarda bu yöntem uygulanmaktadır. Bir diğer yöntem ise soğutma olup, bozulabilen ürünler için  $4,4^{\circ}\text{C}$  ve altındaki sıcaklıklar istenen soğutma sıcaklığı olarak kabul edilmektedir. Ticari gıda işletmelerinde bozulabilen gıdaların soğutulması için (taze et ve balık gibi) yaklaşık  $1^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar düşen sıcaklıklar kullanılabilir. Çiğ ve işlenmiş bitki ve hayvan kökenli gıdalar ile tüketime hazır gıdalar artık sıklıkla soğutma yöntemiyle korunmaktadır. Bu gıdalardan bazılarının 60 gün veya daha fazla depolama ömrüne sahip olması beklenmektedir. Gıdaları korumada kullanılan düşük sıcaklık uygulamalarından biri de dondurma olup ev tipi dondurucularda kullanılan minimum sıcaklık  $-20^{\circ}\text{C}$ 'dir. Bu sıcaklık bir gıdanın içindeki serbest suyun çoğunun donmuş halde kalacağı bir sıcaklıktır. Donma için kuru buz ( $-78^{\circ}\text{C}$ ) ve sıvı azot ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) da kullanılabilir. Donmanın ardından gıdaların sıcaklığı yaklaşık  $-20$  ile  $-30^{\circ}\text{C}$  civarında kalmaktadır. Gıdaların türüne bağlı olarak dondurulmuş gıdalar aylarca hatta bir yıldan daha uzun bir süre bile depolanabilmektedir. Hammadde

(sebze, meyve), et, balık, işlenmiş ürünler ve pişmiş ürünler dondurma yöntemi ile korunabilmektedir [27], [34], [36].

**Azaltılmış Su Aktivitesi ile Kontrol:** Gıdaların su aktivitesi değeri ( $a_w$ ) içerdikleri serbest su seviyesi ile doğru orantılıdır. Mikroorganizma gelişimi, su aktivitesindeki hafif bir azalmayla bile olumsuz yönde etkilenebilmekte; bu da gıdalardaki bozulma etmeni olan bakterilerin üremesini geciktirmek ve önlemek için kullanılmaktadır. Kullanılan yöntemlerin temelinde bu serbest suyun uzaklaştırılması ya da mikroorganizmalar tarafından kullanılamayacak şekilde bağlanması yatmaktadır. Düşük  $a_w$  değerlerinde mikrobiyal hücreler canlılığı kaybedebilmekte ya da zaman içinde zarar görmektedir. Bununla birlikte, bu sadece patojenlerden gelen gıdanın güvenliğini sağlamak için kullanılamaz. Tek başına kullanılan etkili bir koruma yöntemi olmasa da, gıdaların raf ömrünü uzatabilmek amacıyla diğer yöntemlerle kombine halde kullanılabilir [27], [37].

**Düşük pH ve Organik Asitler ile Kontrol:** Gıdaları koruma amacıyla zayıf organik asitler kullanmanın başlıca amacı, gıdanın pH değerini mikrobiyal büyümeyi kontrol etmek için azaltmaktır. Minimum büyüme pH'sından daha düşük bir pH; enerji üretimi, enzimatik aktivite, besin maddelerinin taşınması gibi faktörleri etkileyerek mikrobiyal büyümeyi önlemektedir. Bunun yanında mikroorganizmalar düşük pH derecelerinde hasar görmekte ya da ölmektedirler. Gıdalarda kullanımına izin verilen asetik asit, propiyonik asit, laktik asit, sitrik asit ve sorbik asit gibi organik asitler gıdalardaki mikrobiyal üremeyi kontrol etmek için kullanılmaktadır [27], [38], [39].

**Modifiye Atmosfer ile Kontrol:** Modifiye atmosfer uygulamalarının amacı, gıda içindeki istenmeyen mikroorganizmaların büyümesini kontrol etmek veya azaltmaktır. Bu teknik ayrıca taze gıdaların enzimatik aktivitelerini geciktirmeye de yardımcı olur. Vakum ambalajlama yapılmış veya % 100 CO<sub>2</sub>, % 100 N<sub>2</sub> veya CO<sub>2</sub>-N<sub>2</sub> karışımı ile muamele edilen ürünlerdeki aerobların (küfler, mayalar ve aerobik bakteriler) büyümesi engellenir. Bununla birlikte, bu koşullar altında anaerobik ve fakültatif anaerobik bakterilerin üremelerini kontrol etmek için başka teknikler kullanılması gerekmektedir. Modifiye atmosfer ambalajlama uygulamalarından biri "Kontrollü Atmosfer Paketleme" olup bu yöntemde, bir depolama tesisindeki atmosfer değiştirilir ve gaz seviyeleri sürekli olarak izlenir, gerekirse ayarlanır.

Meyve ve sebzeleri taze tutmak için uzun vadeli depolamada kullanılır. Bir diğer yöntem "Modifiye Atmosfer Paketleme"dir. Bu yöntem, Kontrollü Atmosfer Paketleme'nin tersine, depolama süresinin tamamı boyunca gaz ortamının kontrol edilmesini gerektirmez. Bu yöntemde, gıdalar ambalaj malzemesi içerisine alınır, hava paketten çıkarılır ve daha sonra belirli bir gaz veya gaz kombinasyonu uygulanır ve paket hermetik olarak kapatılır. Vakum Ambalajlama gıdalarda kullanılan bir diğer yöntem olup, bu yöntemde havanın paketten çıkarılması ve daha sonra paketin hava geçirmez şekilde kapatılması esastır [27], [40], [41].

Antimikrobiyal Koruyucular ile Kontrol: Antimikrobiyal kimyasallar gıdalarda istenmeyen mikroorganizmaları öldürmek ya da üremelerini kısıtlamak amacıyla nispeten düşük dozlarda kullanılmaktadırlar. Farklı mikroorganizmalar üzerinde gösterdikleri etkiye göre çeşitlilik gösterebilmektedirler. Bunların bir kısmı pek çok mikroorganizmayı etkileyebilirken bir kısmı daha dar bir spektrumda ve daha spesifik etki gösterebilmektedir. Spesifik gruplara karşı etkilerinin özgüllüğüne bağlı olarak germisit (her çeşidi öldürür), fungusit, bakterisit, sporisit ve virisitler olarak gruplandırılırlar. Gıdalarda kullanılabilen antimikrobiyal koruculara örnek olarak nitrit, sülfür dioksit ve sülfidler, hidrojen peroksit, etilen ve propilen oksit, asitler, parabenler, diasetil, karbondioksit, kitozan, lizozim, gliserol monolaurat, tetrasiklin ve çeşitli baharatlar verilebilir [27].

Işınlama ile Kontrol: Gıdalarda ışınlanma ile koruma yöntemlerinin kullanılma sebebi iyonizasyonun gıdanın içerdiği mikroorganizmalar üzerindeki yok edici gücüdür. Kullanılan yöntemle bağlı olarak küfler, mayalar, bakteri hücreleri, sporlar ve virüsler bütünüyle ya da kısmen yok edilebilir. Bunlara ek olarak ışınlama ile gıdalarda bulunan kurt, böcek ve larvalar da yok edilir. Aynı şekilde patates ve soğan gibi bazı ürünlerdeki filizlenmenin de önüne geçilebilir. Fakat ışınlama toksin ve enzimler üzerinde etki göstermemektedir. Sıcaklık içeren bir uygulama olmadığından ısının gıdanın özellikleri üzerindeki negatif etkileri bu yöntemde ortaya çıkmamaktadır. Buna karşın ışınlama, yüksek dozajlarda uygulandığında lipidlerin oksidasyonu ile proteinlerin denatürasyonuna neden olabilmektedir. Işınlama güvenli bir yöntem olmasına karşın, genel tüketici kanısı nedeniyle çok yaygın kullanılamamaktadır [27], [42].

Gıdaların korunması ve gıda kaynaklı patojenlerin kontrolünde kullanılan ve 10 ana başlık altında incelenen bu klasik yöntemlerin dışında yenilikçi yöntemler de ortaya çıkmakta ve başarıyla uygulanmaktadır. Bu yöntemlere ohmik ve indüktif ısıtma, darbeli elektrik alan, yüksek basınç işlemi, salınımlı manyetik alan, ultrason ve darbeli x-Ray uygulamaları örnek olarak verilebilir [27].

### **2.1.3. Patojenlerin Antibiyotik Direnci ve Yarattığı Riskler**

Antimikrobiyal direnç bir mikroorganizmanın (bakteri, mantar, virüs veya parazit) başlangıçta duyarlı olduğu bir ilaca artık tepki vermemesi durumunda gelişir. Bu durumda o hastalığın standart tedavileri artık işe yaramamaktadır. Aynı zamanda enfeksiyonlar kontrol edilmesi zor ve hatta imkansız bir hal alırken, başkalarına enfeksiyon yayılması riski de artar. Bu risklerin artmasıyla ekonomik kayıpların da artması kaçınılmazdır. Günümüzde antimikrobiyal direnç, halk sağlığı için giderek daha ciddi bir tehdit halini almaktadır [43]

Bakterilerin geliştirdiği antibiyotik direncine çeşitli faktörler sebep olabilmektedir. Antibiyotik direncinin gelişimindeki genetik faktörler o bakteri için karakteristik bir özellik olabilir ve bu durumda direnç kendiliğinden gelişmiş olup mikroorganizmanın biyolojisine bağlıdır. Örneğin, *E. coli* vankomisine kendiliğinden dirençlidir [44]. Sonradan edinilmiş direnç ise dış genlerin plazmidlerle (konjugasyon veya transformasyon), transpozonlarla (konjugasyon), integronlar ve bakteriyofajlarla (transdüksiyon) edinimi, hücrel genlerin mutasyonu ve bu mekanizmaların kombinasyonu yoluyla oluşmaktadır [44]–[46]. Genetik direnç mekanizmalarında en önemli faktörlerden biri yatay gen transferidir. Bir bakteriden diğerine direnç genlerinin aktarımı, yatay gen transferi olarak adlandırılır [47]. Bir bakteride direnç geninin aktarımının temel mekanizmaları plazmid aktarımı, viral iletim yoluyla aktarım ve serbest DNA transferidir.

Genler üç ana yolla aktarılabilir [46], [48], [49] :

1. Transdüksiyon (bakteriyofajlar ve integronlar yoluyla),
2. Konjügasyon (plazmidler ve konjügatif transpozonlar yoluyla)
3. Transformasyon (kromozomal DNA ve plazmidlerin bir kromozom içine dahil edilmesiyle)

Bakterilerin ilaçlara direnç geliştirmesinde biyokimyasal mekanizmalar da rol oynayabilmektedir. nemli biyokimyasal direnç mekanizmalarından biri antibiyotik inaktivasyonu ya da modifikasyonudur. Antibiyotiklere etki ederek onların inaktivasyonuna yol açan üç ana enzim vardır. Bunlar  $\beta$ -laktamazlar, aminoglikozidaz modifiye eden enzimler ve kloramfenikol asetiltransferazlardır [44].

Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) ilaçlara dirençli 18 patojeni listeleyerek bunları Acil, Ciddi ve Endişe Verici tehditler olarak kategorize etmiştir. Acil sınıfına alınan üç tehditten ilki *Clostridium difficile* kaynaklı olup bu enfeksiyonların ölümcül ishallerine yol açabildiği ve çoğunlukla yakın zamanda medikal tedavi almış ve antibiyotik kullanmış kişilerde ortaya çıktığı belirtilmiştir. Yılda *C. difficile* kaynaklı 250 bin enfeksiyon grldği, ve yaklaşık 14 bin ölüm yaşandığı bildirilmiştir. Carbapenem-Dirençli Enterobacteriaceae (CDE) ise bu listede ikinci sırada yer almaktadır. Bu enfeksiyonlar iyileştirilmesi zor ya da iyileştirilemez enfeksiyonlar arasında yer almakta olup CDE neredeyse günümüzde kullanılan antibiyotiklerin tamamına direnç göstermektedir. Sunulan istatistiklere göre yılda CDE kaynaklı yaklaşık 9 bin enfeksiyon görünmekle birlikte, bunlardan 600 kadarı ölümle sonuçlanmaktadır. Acil tehditler sınıfında üçüncü sırada ise *Neisseria gonorrhoeae* kaynaklı enfeksiyonlar bulunmaktadır. *N. gonorrhoea* cinsel yolla bulaşan bir hastalık olan belsoğukluğuna sebep olmakta ve yılda yaklaşık olarak 246 bin antibiyotik dirençli belsoğukluğu enfeksiyonu görülmektedir. Ciddi tehditler sınıfında ise çoklu ilaç dirençli *Acinetobacter*, ilaç dirençli *Campylobacter*, flukonazol dirençli *Candida*, genişletilmiş spektrumlu Enterobacteriaceae, vankomisin dirençli *Enterococcus*, oklu ilaç dirençli *Pseudomonas aeruginosa*, ilaca dirençli tifoid-olmayan *Salmonella*, ilaca dirençli *Salmonella* serotype Typhi, ilaca dirençli *Shigella*, metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, ilaç dirençli *Streptococcus pneumoniae* ve ilaç dirençli tüberküloz yer almaktadır. Son sınıf olan “Endişe Verici” tehditlerde ise vankomisin dirençli *Staphylococcus aureus*, eritromisin dirençli Grup A *Streptococcus* ve klindamisin dirençli Grup B *Streptococcus* bulunmaktadır [50].

Bakterilerin antibiyotik direncinin yarattığı dezavantajların önüne geçmek için yapılan tüm çalışmalara karşın günümüzde antibiyotik direnci hala hayati önem taşıyan bir sorun halindedir. Bu da araştırmacıları antibiyotiklere alternatif tedavi yöntemleri bulmaya itmektedir.

## 2.2. Fajlar

### 2.2.1. Fajlar ve Genel Özellikleri

Bakteriyofajlar, kısaca faj olarak da adlandırılan sadece prokaryotik hücreleri enfekte eden viruslardır [51]. Diğer virüsler gibi fajlar da ancak etkili oldukları konakçı hücreleri bulduklarında aktif hale gelmektedirler. Dolayısıyla tek başlarına yaşamlarını sürdürebilecek hücre yapısına ve organellere sahip değildirler. Protein yapısında kapside, yine protein yapısında kontraktıl olan yada olmayan uzun ya da kısa kuyruğa sahiptirler. Bazıları ise polihedral, filamentöz veya pleomorfik yapıdadırlar. Kimisi lineer veya dairesel tek yada çift zincir DNA'ya sahipken kimisi de aynı özelliklerde RNA'ya sahiptirler. Ayrıca içlerinde lipid yapı taşıyanlarda bulunmaktadır [52].

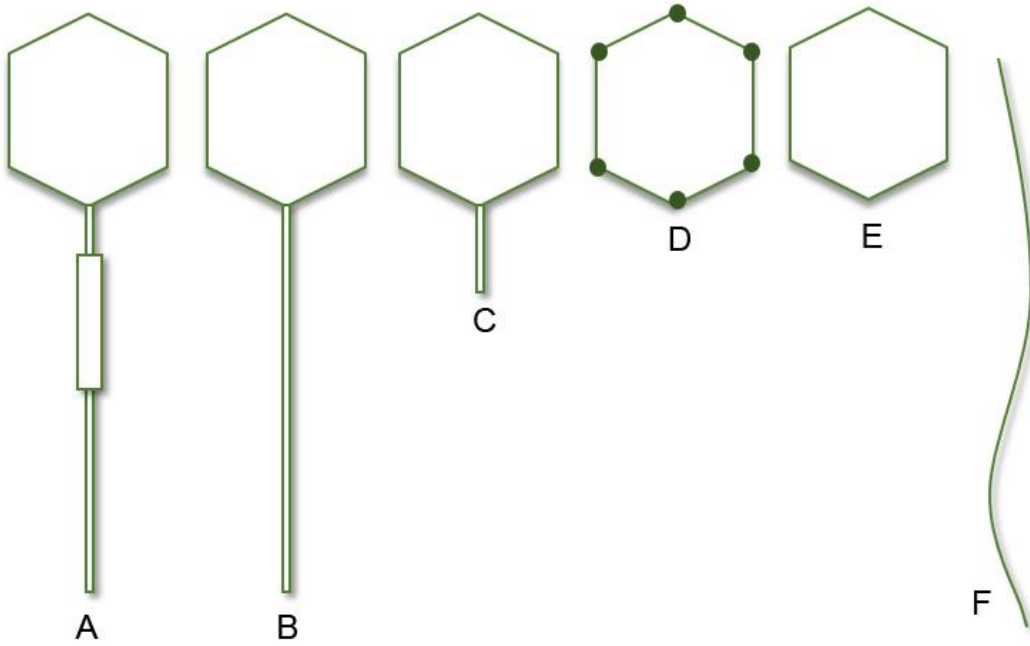
Fajlar, deniz suları da dahil çevremizde en çok bulunan bakterilere etkili parazitler olarak bilinmektedirler ve sayılarının  $10^{30}$ - $10^{32}$  civarında olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca konakçıları olan bakterilerden de 10 kat fazla oldukları tespit edilmiştir [53].

### 2.2.2. Fajların Keşfi ve Sınıflandırılmaları

Virüslerin varlığına dair ilk çalışma 1892 yılında Dimitri Iwanowski adlı bilim adamına aittir [52]. Bakterilere etkili virüslerin varlığı ise 1915 ve 1917 yıllarında sırasıyla Frederick W. Twort ve Felix d'Herelle tarafından ortaya konmuştur [54]. Pek çok kitapta ya da makalede, fajlar ile ilgili ilk bilginin bu araştırmacılara ait olduğu belirtilmiş olsa da fajların litik aktivitesine dair ilk bulgunun, 1896 yaptığı çalışma ile Ernest Hankin'e ait olduğu belirtilmektedir [55].

Elektron mikroskopunda elde edilen gelişmeler sayesinde, 1930'lu yıllarda fajlar, incelenmeye başlanmış fakat basit bir sınıflandırma kriteri bulunamadığından başarılı olunamamıştır [56]. Ancak daha sonra Avustralyalı bir araştırmacı 1937' de fajların büyüklüklerinin farklı olabildiğini ve farklı fajların farklı kimyasallara dirençli olup olmadığını ortaya koymuştur [57]. 1943 yılında Ruska, fajların morfolojik olarak çeşitlilik gösterdiğini, 1948 yılında ise Holmes, *Virales* takımı içinde tek bir aile (*Phagaceae*) ve tek bir cins (*Phagus*) içinde yer alabileceklerini belirtmiştir. Bu şekilde sınıflanmış 46 faj türü için konakçı spektrumu, plak ve partikül büyüklüğü, üre ve sıcaklığa dirençlilik kriterleri temel alınmıştır [58]. 1960'lı yıllarda ise virüsün yapısal özelliklerinin (kapsid şekline, zarfı olup olmamasına ve kapsomer sayısı) ve

taşıdıkları nükleik asitin baz alındığı bir sınıflama sistemi geliştirilmiştir. Ancak bu sistem terk edilmiştir. 1965 yılında virüslerin isimlendirilmesi için bir komite kurulmuş ve A Provisional Committee on Nomenclature of Viruses (PCNV) olarak adlandırılmıştır. Daha sonra bu komitenin adı Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (International Committee of Taxonomy of Viruses, ICTV) olarak değiştirilmiştir. Bu komitenin 1971 yılında ilk yayınladığı rapor ile altı cins faj (T-grup fajlar, I, lipid içeren faj PM2, f X grup, filamentöz faj, RNA içeren faj grubu) tanımlanmıştır [57], [58]. Bradley adlı araştırmacı ise, sadece fajların morfolojik yapısını ve taşıdıkları nükleik asiti baz alarak basit bir sınıflama yapmış ve fajları A'dan F' e kadar 6 gruba ayırmıştır (Şekil 2.1.). Bu sınıflamaya göre fajlar, A. kasılabilen kuyruğa, B. uzun kasılmayan kuyruğa, C. kısa kuyruğa sahip, D. kübik DNA içeren, E. kübik RNA içeren ve F. filamentöz fajlar olarak birbirinden ayrılmıştır [59].



**Şekil 2.1.** temelinde T4 (A),  $\lambda$  (B), PM2(C),  $\Phi$ X174(D), MS2(E) ve fd(F) fajları (Bradley tarafından yapılan sınıflamadan uyarlanmıştır [59].)

Sadece fajların değil tüm virüslerin sınıflandırılabilmesi için oluşturulmuş olan ICTV, çalışılan tüm virüslerin taşıdığı özellikleri belirlemektedir. Bu özellikleri dikkate alarak "Polythetical Species Definition" na göre sınıflandırmaya çalışmaktadır.

ICTV, "Polythetical Species Definition" yani tüm özellikleri değil de çoğu özellikleri ortak, taşınabilir kriter seti hazırlamaktadır ve GenBank (NCBI)'da yer alan genom dizilimlerini ve proteinleri kullanmaktadır. Fajlar söz konusu olduğunda en önemli özelliklerin nükleik asit doğası, morfolojik yapı, fizikokimyasal özellikler ve tüm genomik sekansın belirlenmesi olduğu anlaşılmaktadır. Dolayısıyla bu sınıflama sistemi ile bir faj, belirlenmiş özelliklerden tamamını veya bir kısmını taşıyarak tanımlanabilmektedir [57], [60]–[62].

Daha önce de bahsedildiği gibi fajların sınıflandırma çalışmalarına elektron mikroskobu ile başlanmıştır. Diğer alanlarda olduğu gibi elektron mikroskobunda da kaydedilen tüm teknolojik gelişmeler, fajların sınıflandırılmasında bugüne gelinmesini sağlamıştır [61]. 1959-1990 yılları arasında 3400 [63], 1990 ile 2000'li yılları arasında 5100 faj [64] tanımlanmış, 2007 yılında ise bu sayı 5500'e ulaşmıştır [65] ve çalışmalar devam etmektedir [61]. 2012 yılı itibariyle toplamda morfolojik olarak tanımlanmış prokaryotlara etkili 6300 virüs bulunmaktadır. Bunlardan yaklaşık % 96.3'ü kuyruklu fajlara ait olup geri kalan % 3.7'lik kısmı sadece 230 adet olan polihedral, filamentöz veya pleomorfik yapıda olan fajlar oluşturmaktadır. Kuyruklu fajların yer aldığı ailelerden biri olan *Siphoviridae* familyası da en büyük aileyi oluşturmaktadır. Sonuç olarak bugüne kadar tanımlanmış bakterilere ve arkelere etkili virüslerin tamamı 12 sınıf, 3 takım ve 65 familya içinde yer almaktadır. Sadece bakteriyofajlar düşünüldüğünde ise *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Padoviridae* familyalarını bünyesinde barındıran *Caudovirales* takımı ve ayrıca 7 familya içerisinde yer almaktadır [61].

### 2.2.3. Fajların Yaşam Döngüleri

Fajların buldukları ortamda etkili oldukları konakçıları olmadığı zaman aktivite göstermeleri ve çoğalmaları mümkün değildir. Çünkü diğer mikroorganizmalar gibi yaşamlarını sürdürebilecek gerekli metabolizmaya sahip değildirler. Fajların ortamda etkili oldukları konakçı ile karşılaşmaları durumunda takip ettikleri iki tip yaşam döngüsü vardır. Bunlar, litik ve lizogenik yaşam döngüsüdür. Litik yaşam döngüsü ile varlıklarını devam ettiren fajlara virulent faj, lizogenik yaşam döngüsü ile varlıklarını devam ettirenlere de temperent faj denilmektedir. *E. coli*'ye etkili olan

T4 ve  $\lambda$  fajlarının, sırasıyla litik ve lizogenik karakterdeki fajların model örnekleri olduğu bilinmektedir [60].

Litik Yaşam Döngüsü: Fajın seçtiği litik yaşam döngüsü 5 ana aşamadan oluşmaktadır:

1. Fajın bakteri yüzeyine adsorbsiyonu
2. Faj DNA'sının bakteri sitoplazmasına injeksiyonu
3. Faja ait genom ve proteinlerin sentezlenmesi
4. Faj bileşenlerinin montajı ve genomik materyalin kapsid içine paketlenmesi
5. Olgun fajların ortama salınması

Bakteri yüzeyinde bulunan polisakkaritler, pili ve flagella gibi bileşenler fajın bağlanması için gerekli reseptörlerdir. Faj yüzeyindeki bileşenlerin bu reseptörler ile buluşması sonucu bağlanma geri dönüşümsüz bir şekilde gerçekleşmektedir. Daha sonra kuyruklu fajlarda kuyruk plağının indüklediği bir mekanizma ile faj DNA'sı bakteri içine aktarılmaktadır. Faj DNA'sının hücre içine aktarımı tamamlandıktan sonra bakteriye ait DNA ve RNA polimerazlarını kullanarak kendine ait DNA replikasyonunu ve protein sentezini gerçekleştirmektedir. Sonrasında faj tarafından kodlanan protez enzimleri ile yapısal proteinlerin konformasyon değişimleri sağlanmaktadır. Konformasyonel değişime uğrayarak oluşturulan kapsid içinde replikasyonu tamamlanmış DNA paketlenmekte ve kuyruk kapside birleştirilmektedir. Fajların montaj işlemleri tamamlandıktan sonra faj tarafından sentezlenmiş olan lizin, holin gibi hidrolazlar hücre duvarının parçalanmasını dolayısıyla olgun fajların ortama salınmasını sağlamaktadır [54], [60], [66].

Lizogenik yaşam döngüsü: Bu yaşam döngüsünü seçen fajlarda da döngü, litik fajlarda olduğu gibi ilk olarak adsorbsiyon ve genomik materyalin hücre içine aktarılmasıyla başlamaktadır. Sonrasında ise hem fajın replikasyon modülünde bulunan proteinlerin hem de hücre içinin fizyolojik durumunun etkisiyle fajın ilk gen ürünü, faj genlerinin üretilmesini baskılayan represör proteinini indükler ve bu da faj sentezi için gerekli olan diğer bileşenlerin sentezinin durdurmaktadır. Dolayısıyla faja ait DNA hücre içinde sirküler formda plazmid gibi kalmakta ya da konakçı genomuna dahil olmaktadır. Bakteri genomuna dahil olan faj genomuna profaj denilmektedir. Bundan sonraki aşamada bakteri normal yaşam periyoduna devam etmekte, faj DNA'sı da bakteri DNA'sının bir parçası olarak çoğalmaktadır [54]. Bu

süreç profajı indükleyebilecek mutajenik ajanlar, sıcaklık değişimi gibi faktörlerin devreye girmesine kadar devam etmektedir [60].

#### **2.2.4. Faj Terapinin Tarihi ve Güncel Uygulamaları**

Faj terapinin tarihi dört ana döneme bölünebilir: erken dönem, eleştirel şüphencilik dönemi, terk etme dönemi, yakın ilgi ve yeniden değerlendirme dönemi. Faj terapiye karşı değişen tutumlar, hem bilimsel hem de kültürel etkilerin yansımasıdır [67].

Faj terapinin tarihi, fajların keşfinden hemen sonra başlamaktadır. Fajların keşfedilmesinin ardından bakteriyofajlar terapötik olarak ilk kez d'Herelle tarafından dizanteri tedavisinde kullanılmıştır. Hazırlanan fajlar 12 yaşındaki bir çocuğa uygulanmadan önce güvenliğini doğrulamak amacıyla d'Herelle, Hutinel ve bazı hastane çalışanlarına uygulanmış, fajların hastaya uygulanmasının ardından dizanteri belirtileri kesilmiş ve hasta birkaç gün içinde tamamen iyileşmiştir [68]. Bu konuda yayınlanan ilk çalışma ise 1921'de *Staphylococcus* kaynaklı cilt hastalıklarının tedavisinde fajları kullanan Richard Bruynoghe ve Joseph Maisin tarafından yapılmıştır [5].

Gittikçe yaygınlaşan faj terapi araştırmalarının yanı sıra, bu ilk dönemde ticari faj preparatları da üretilmeye başlanmıştır. Oswaldo Cruz Enstitüsü (Rio de Janeiro, Brezilya) 1924 yılında Latin Amerika ülkelerinde dizanteri ile mücadele etmek için bakteriyofaj üretimine başlamıştır [69], [70]. Buna ek olarak 1940'larda, Eli Lilly Company (Indianapolis, IN) Staphylococci, Streptococci, *Escherichia coli* gibi patojenlere karşı hazırlanan preparatlar da dahil olmak üzere insanlarda kullanılmak üzere çeşitli faj ürünleri üretmiş ve bu ürünler çok sayıda enfeksiyonu tedavi etmek için kullanılmıştır [5], [68].

Monroe Eaton ve Stanhope Bayne-Jones 1934'te faj tedavisi üzerine yapılmış bildirimleri inceleyerek ayrıntılı bir derleme yayınlamış ve faj terapiye pek çok eleştiri getirmiştir [71]. Bu raporun bir devamı niteliğinde olan ikinci bir rapor Albert Krueger ve Jane Scribner tarafından yayınlanmış ve bu raporda da faj terapiye olumsuz bir yaklaşım getirilmiştir [72]. Hem faj terapinin etkinliğine şüphyle yaklaşan bu gibi çalışmaların, hem de 2. Dünya Savaşı ve takip eden dönemde antibiyotiklerin üretim kolaylığı, nispeten geniş etki yelpazesi ve preparat stabilitesi gibi avantajlarının etkisiyle Batı'da antibiyotik kullanımı hızla artarken faj terapi ve ticari faj üretimi

popüleritesini kaybetmiştir. Bununla birlikte Sovyetler Birliği'nde fajlar kullanılmaya devam edilmiştir [67].

Faj terapi uygulamalarıyla ilgili detaylı bilginin büyük kısmı Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology (Tiflis, Gürcistan) ile Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy (Wroclaw, Polonya) merkezlerinden edinilmiştir. Gürcistan, faj terapinin standart tıp uygulamalarının bir parçası olduğu ve fajların hastanelerde rutin olarak kullanıldığı tek yerdir. Eliava Enstitüsü, fajla ilgili temel araştırmalarda büyük adımlar atmış, faj terapi için faj kokteylleri ile prostat ve sistik fibröz gibi hastalıklar için yeni ilaçlar geliştirmiştir. Ayrıca, bölgesel sularda kolera ve enterik patojenlerin izlenmesi ve şarbon ile brusellozun hızlı tespiti de dahil olmak üzere çevresel ve potansiyel biyoterörizm sorunlarıyla da uğraşmaktadırlar [73]. Günümüzde Eliava tarafından kurulan Eliava BioPreparations Ltd. tarafından ticari fajlar üretilmekte olup Gürcistan dışında Azerbaycan gibi başka ülkelere de satılmaya başlanmıştır. Bir başka şirket, Eliava Diagnostics, günde genellikle antibiyotik tedavilerinden fayda görememiş ortalama 50-60 hastayı tedavi etmektedir. Eliava, 2010 yılında yurtiçi ve yurtdışından gelen hastalara hizmet veren Eliava Faj Terapi Merkezi'nin de açılmasıyla faaliyetlerini büyütüştür. Öte yandan işbirlikçi projeler ile Batılı araştırmacılarla da faj preparatlarının geliştirilmesi ve uygulanmasına ilişkin bilgilerini paylaşmaktadırlar. 1995-2010 döneminde, 50'den fazla işbirliğine dayalı uluslararası proje gerçekleştirilmiş ve bunlar bir takım önemli yayınlarla sonuçlanmıştır [68], [73]–[78].

Hirszfeld Enstitüsü ise 1952'de kurumuş ve faj terapi araştırmalarına aktif şekilde dahil olarak terapötik fajları enfeksiyonların tedavisinde kullanmıştır. Enstitünün bakteriyofaj laboratuvarı, septisemi, füronkölöz ve akciğer ile idrar yolu enfeksiyonları gibi hastalıkların tedavisine yönelik fajların geliştirilmesinde ve üretilmesinde önemli bir araç işlevi görmüştür. Çoğu durumda, fajlar geleneksel antibiyotik tedavisine dirençli bakterilere karşı kullanılmıştır [5], [79].

1980'lerde Smith ve Huggins'in çalışması ile faj terapi İngilizce literatür tarafından yeniden keşfedilmiştir. Bu durum Sovyetler ve Polonya'nın yapmış olduğu çalışmalara erişimin artmasıyla 1990'lı yıllarda hız kazanmıştır. 2000'li yıllardan başlamak üzere, genetik ve yaygın ekoloji temelli faj araştırmalarının popülerlik kazanmasıyla bu alanda yapılan çalışmalar hem nicelik hem de nitelik açısından

zenginleşirken, faj terapi günümüzde hala etkin şekilde devam eden çalışmaları ile araştırmacılar için ilgi çekici bir konu haline almıştır [80], [81].

Son yıllarda faj terapinin tekrar gündeme gelmesiyle fajların ticari olarak üretimi de dünya çapında yaygınlaşmaya başlamıştır. İnsandaki faj terapinin yanı sıra bu ürünler çiftliklerde, gıda ürünleri ve ekipmanlarında, veterinerlik gibi farklı alanlarda da kullanılmaktadır. Ticari preparatlar üreten firmalara örnek olarak EBI Food Safety (Wageningen, Hollanda) verilebilir. Bu firmada gıda güvenliği temelli faj kokteylleri üretilmekte olup bunlar *Listeria*'ya karşı kullanılmaktadır. Biochimpharm (Tiflis, Gürcistan) dizanteri, dispepsi, kolit ve enterokolit gibi hastalıkların tedavisi için kullanılan, sıvı ya da tablet formunda olabilen çeşitli faj karışımları üretmektedir. Benzer şekilde, Omnilytics (Salt Lake City, Utah) domates ve biber bitkilerinde zararlı bakterileri önleyen ve kontrol eden, doğal, güvenli ve etkili bir tedavi yöntemi üzerinde çalışmaktadır. Biophage Pharma Inc. (Montreal, Kanada) çevresel terapi ve teşhis, antibakteriyel direnç sorunlarına yönelik faj ürünleri ve biyoterörizme karşı silah geliştirme gibi konularda araştırma-geliştirme çalışmaları yürütmektedir [82].

Günümüzde faj terapi, insan sağlığında olduğu kadar gıda endüstrisinde de önemli bir yaklaşım olarak görülmektedir. Fajların gıda güvenliği amacıyla kullanımına, hayvanlardaki mikrobiyal yükü azaltan faj terapi uygulamaları örnek gösterilebilir. Bunun dışında fajlar proses esnasında gıdalardaki mikrobiyal yükü azaltmada, gıdanın temas ettiği yüzey ve ekipmanların sanitasyonunda ve son ürünlerin depolama süresince patojenlerin kontaminasyonundan korunmasında kullanılabilir [83]. Benzer şekilde son zamanlarda fajların ve faj litik proteinlerinin gıda endüstrisinde sorun yaratan biyofilmlerin eliminasyonu için yapılan çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilmiştir [84].

#### **2.2.5. Faj Terapinin Olumlu ve Olumsuz Yönleri**

Antibiyotiğe dirençli türler ve bunlara bağlı enfeksiyonların giderek artmasıyla faj terapinin yeniden gündeme gelmesi, bu konudaki soru işaretleri ve tartışmaları da beraberinde getirmiştir. Fajların, antibiyotiğe dirençli türler üzerinde de etkili olabilme, doğal flora ya antibiyotiğe oranla çok daha az zarar verme, bakterilerin direnç geliştirmesi olasılığının daha düşük olması gibi avantajlarının yanı sıra insan

sağlığına etki, seri üretim zorluğu, konakçı skalası, vücuttan atılma süresi gibi bazı konularda çeşitli sorgulamalar ve kaygılar bulunmaktadır.

Fajların terapötik ajanlar olarak kullanılma potansiyeli, en başta insan sağlığına ne tip etkileri olabileceği sorusunu gündeme getirmektedir. Esasında fajların insanlar üzerindeki etkisinin ilk olarak kendilerini keşfeden d'Herelle tarafından, bugün kabul görececek bir yöntemle olmasa da, araştırıldığı söylenebilir [85]. d'Herelle, hazırladığı faj preparatlarının güvenliğini, kendisi, ailesi ve iş arkadaşları üzerinde denemiş ve hiçbir denek hastalık belirtisi göstermemiştir [86]. Faj terapi çok uzun yıllar boyunca insanlar üzerinde denenmiş olmasına rağmen, insan vücudunda belirgin ve önemli bir olumsuz etki yarattığına dair bir veri yoktur [82]. Kaldı ki fajlar, insan ağız florasından dışkısına kadar pek çok ortamda doğal olarak bulunmakta, bunun yanı sıra şehir içme sularında, gıdalarda ve hatta aşılarda bile faj varlığına rastlanabilmektedir [87]–[89]. Fajların güvenliği üzerinde geniş kapsamlı pek çok çalışma yapılmıştır. Örneğin, Delmont Laboratories Inc. (ABD) tarafından üretilmiş olan Staphage Lysate adlı ürün yüksek titrede faj içermesine ve insanlar üzerinde 12 yılı aşkın süredir kullanılmasına karşın, yalnızca minör yan etkiler gözlenmiştir [90]. Bruttin ve Brüssow tarafından (2005) gönüllü deneklerle yapılan çift-kör çalışmada ise, T4 fajının oral yolla alınımının hiçbir hastalık belirtisi oluşturmadığı belirtilmiştir [91]. Bunlara ek olarak FDA, Ağustos 2016 itibariyle Intralytix Incorporated (ABD) tarafından üretilen LMP-102 adlı faj preparatının tüketime hazır et ve kümes hayvanı ürünlerinde *Listeria monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal ajan olarak kullanılmasına izin verdiğini duyurmuştur. EBI Food Safety (Wageningen, Hollanda) isimli şirket, gıda patojenleri için faj ürünleri geliştirmekte ve satışa çıkarmaktadır. Bu şirketin ürünleri USDA ve FDA tarafından GRAS (Generally Recognised As Safe, Genellikle Güvenli Kabul Edilir) sınıfına dahil edilmiştir. (1B) Tüm bu gelişmeler, faj terapinin insan kullanımı için güvenli kabul edildiğini göstermektedir. Ancak yine de, fajların bazı virülans faktörleri ya da toksin genleri taşıyabildiği bilinmektedir [92]. Broudy ve Fischetti'nin yaptığı çalışmada (2003), lizogenik fajların toksin kodlayan genleri bakteriler arasında transfer edebildiği ve bu durumun da patojenisite ile sonuçlanabileceği ortaya konmuştur [93] fakat zaten faj terapi için lizogenik fajlar değil, litik özellikte fajlar tercih edilmektedir. Fajların tüm genom dizilimi ile ilgili bilgi sahibi olunması, faj terapinin olası komplikasyonlarının önüne geçmede yardımcı olacaktır [92].

Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotikler ile fajlar karşılaştırıldığında, fajların antibiyotiklere göre pek çok üstün yönü olduğu görülmektedir. Örneğin bazı antibiyotikler bakterileri öldürmektense yalnızca üremelerini durdurmakta, buna karşın fajlar hedef bakterileri öldürmede son derece etkin bir işlev görmektedirler. Antibiyotiklerin en önemli dezavantajlarından biri de, yalnızca hastalık etmeni olan bakteriyi değil, vücudun doğal florasında bulunan, hatta yararlı etkileri olan bakterileri de öldürmeleridir. Buna karşın fajlar son derece seçici olup, yalnızca spesifik patojenleri yok etmektedirler. Aynı şekilde antibiyotik kullanımı çeşitli alerjiler, ikincil enfeksiyonlar gibi güçlü yan etkiler gösterirken, faj terapi uygulamalarında yalnızca minör yan etkilerden söz edilmektedir. Ayrıca bakterilerin faja direnç mekanizması geliştirme potansiyeli, antibiyotiğe dirençli hale gelme potansiyelinden daha düşüktür [90]. Hatta bakteri faja direnç kazansa bile, direnç geliştirirken geçirdiği yapısal değişimler, patojenin etkinliğini ve virülens özelliğini azaltabilmektedir [92]. Fajların kanalizasyon sularından atık sulara pek çok ortamda yaygın olarak bulunabilmeleri nedeniyle kolay bir şekilde izole edilebilmeleri de avantajları arasında sayılabilir. Fajlar, formülasyon geliştirilmesi açısından çok yönlü olabilirler, örneğin belirli antibiyotiklerle kombine edilip kullanılmaya elverişlidirler. Aynı zamanda uygulama şekilleri de çok yönlü olabilmektedir; sıvı, krem, katı madde emdirilmiş formdaki uygulamalara rastlanabilmektedir. Faj içeren ürünlerin üretimindeki izolasyon ve saflaştırma gibi aşamaların nispeten ekonomik olduğu belirtilmekte ve teknolojideki gelişmelere paralel olarak bu aşamaların çok daha ucuza maledilebileceği öngörülmektedir [94]. Tüm bu avantajların yanında, fajların doğasından, faj biyolojisi ile faj-konakçı etkileşimlerinin henüz bütünüyle anlaşılammış olmasından ve *in vivo* ortamların fajlar üzerindeki etkisinden kaynaklanan bazı dezavantajlar ile uygulama kısıtlamaları ve zorlukları bulunmaktadır [94].

İlk olarak, tüm fajların ideal terapötikler olmadığını göz önünde bulundurmamak gerekmektedir. Daha önce de bahsedildiği gibi, faj terapide kullanacak fajların zorunlu litik olması, bakterisine ulaşma ve onu enfekte edebilme potansiyelinin yüksek olması, belirli depolama koşullarında ve vücut ortamında stabil kalabilmesi, pek çok etkinlik ve güvenlik testinden geçebilmiş olması gereklidir [94]. Fajların sınırlı bir konakçı aralığına sahip olması da onların verimli ve etkili bir şekilde kullanılabilmesi konusunda soru işaretleri yaratmaktadır. Fajların konakçıları

yalnızca birkaç suş, birkaç tür ya da nadir olarak birkaç cins olabilmekte [95], bu durum da uygulamada bazı kısıtlamalara yol açmaktadır. Bu probleme çözüm olaraksa “faj kokteylleri” denilen ve içinde birden çok faj içeren ürünler sunulmaktadır. Böylece farklı cins ve türlere etkili olan fajlar bir arada kullanılarak daha yaygın etki elde edilebilmektedir. Fakat ürünlere dahil olan faj sayısının artması beraberinde üretime ve kontrole dayalı bazı zorlukları getirmektedir. Modern biyoteknoloji ve biyomühendisliğin yardımı ile fajların konakçı skalasının çeşitli modifikasyonlar yapılarak genişletilebileceği, ve böylece mümkün olan en az sayıda faj ile en yaygın etkinin elde edilebileceği düşünülmektedir [96]. Örneğin Scholl ve arkadaşları (2005), yaptıkları çalışmada *E. coli* K1 suşunun kapsülünün T7 fajına karşı bir bariyer görevi gördüğünü keşfetmiş ve T7 fajını modifiye ederek K1’in kapsülünü degrade eden bir endosialaz salgılamasını sağlamışlardır. Böylece T7 fajı *E.coli* K1 suşunu enfekte edebilmiştir [97].

Faj terapiyle ilgili tartışılan konulardan biri de bakterilerin fajlara karşı geliştirdiği dirençtir. Bakteriler, faj adsorpsiyonunu bloklama, faj genomunun enjeksiyonunu inhibe etme, restriksiyon-modifikasyon gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla faj direnci geliştirebilmektedir [98]. Bu mekanizmaların bazen faj direnciyle birlikte bakterinin genel aktivitesinde azalmaya ya da bakterinin virülentliğinde ciddi bir düşüşe yol açabildiği belirtilmiştir [99]. Faj direnciyle ilgili önemli hususlardan biri de, in vitro ve in vivo denemelerdeki sonuçların birbiriyle uyumlu olmamasıdır [96]. Örneğin Caparelli ve arkadaşları, yaptığı çalışmada *S. aureus* A170 suşunun fajlarla *in vitro* etkileşimi sonucu direnç geliştiren suşlar tespit edebilmişken, fajlarla tedavi edilen farelerde hiçbir dirençli suş izole edememişlerdir [100]. Bazı araştırmacılara göre, bakterilerin faj direnci geliştirme oranı, antibiyotiklere geliştirme oranına göre 10 kat daha azdır [101]. Faj terapinin bu dezavantajına çözüm olarak araştırmacıların sunduğu öneriler arasında faj miksleri kullanmak, fajları diğer antibiyotik gibi diğer antimikrobiyal ajanlarla kombine halde kullanmak ve faj direnç mekanizmalarını hedef alan mühendislik çalışmalarına odaklanmak bulunmaktadır [5], [98].

Fajların antijenik olmaları sebebiyle retiküloendotelyal sistem tarafından elimine edilmeleri ve vücutta özellikle kan dolaşımıyla taşınamamaları bu alandaki majör problemlerden biridir [96]. Bunun bir sonucu olarak, yapılan çalışmaların çoğu yara enfeksiyonları ya da gastrointestinal enfeksiyonlar gibi sistemik olmayan hastalıkların tedavisine odaklanmıştır [5]. Bu sorunun çözümü için denenmiş

çalışmalardan birinde seri pasaj tekniği kullanılarak, vücuda uygulanması akabinde uzun süre dolaşımında kalabilen faj varyantları seçilmiş ve bu yöntem fajların kapsid proteinlerinde gerçekleşen mutasyon ile RES'ten kaçabilmesine olanak sağlamıştır [102]. Fakat bu yöntemin pratik olmadığı ve daha ileri çalışmaların yürütülmesi gerektiği düşünülmektedir [103]. Bunlar dışında, polimer kullanımı gibi ilaç taşıma teknolojileri de bu soruna getirilen alternatif çözümler arasındadır. Bu yöntemi kullanan çalışmaların birinde fajların polietilen glikol ile konjuge halde uygulanması immün reaksiyonlarını azaltmış olsa da, nötralize edilmelerini tamamen engelleyememiştir [104].

Fajların litik aktivitesi esnasında bakteriyi ani bir şekilde parçalaması ile endotoksin gibi vücutta inflamatuvar reaksiyon oluşturabilecek etmenlerin hücre dışına salınma ihtimali de faj terapinin *in vivo* uygulamalarına yönelik soru işaretlerinden biridir. Bu durumun gerçekleşme riskini en aza indirebilmek amacıyla fajların replikatif olmayan ya da hücreyi lize etmeyenlerinin seçilmesi ya da fajların bu doğrultuda hareket edecek şekilde modifiye edilmesi önerilmektedir [96].

Faj terapiyle ilgili tartışılmalı diğer konulara örnek olarak faj preparatlarının saflığı, vücut içerisindeki düşük stabilite, etki mekanizmalarının hala bütünüyle çözümlenememiş olması, faj terapi konusunda özellikle geçmiş yıllarda yapılan çalışmaların bilimsel açıdan yetersizliği (plasebo kontrolleri dahil edilmeden yapılmış olması gibi) verilebilir [5]. Tüm bu konularda eleştiriler olduğu kadar çözüm önerileri de bulunmakta, ve faj terapinin iyileştirilmesine yönelik çalışmalar hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak aktif bir şekilde devam etmektedir.

#### **2.2.6. Faj Terapi ve Sinerjizm Çalışmaları**

Günümüzde faj terapinin giderek daha fazla önem kazanmasıyla birlikte, faj terapinin eksik yönlerini giderme ve etkinliğini artırma çalışmaları da gündeme gelmiştir. Bu bağlamda öne çıkan yaklaşımlardan biri de faj terapi ile sinerjistik etki gösterebilecek yöntemlerin birlikte denenmesidir. Literatürde mevcut olan çalışmalar faj-antibiyotik sinerjizmini incelemiştir. Bu çalışmaların birinde çeşitli konsantrasyonlarda gentamisin, seftriakson, siprofloksasin ve polimiksin, *P. aeruginosa*'ya spesifik bakteriyofajlarla birlikte kullanılarak antimikrobiyal etkinlik belirlenmiştir. Yapılan denemelerde, bakteriyofajların seftriakson ile kombine halde

kullanılmasının genel olarak bakteriyel üremeyi azalttığı gözlenmiştir. Bütünüyle sinerjistik olarak tanımlanabilecek etkinin ise çalışmada kullanılan bir *Siphoviridae* fajı için 300 dakika inkübasyondan sonra görüldüğü belirtilmiştir [105]. Bir başka çalışmada antibiyotiklerle birlikte fajların *Staphylococcus aureus*'a karşı sinerjistik antimikrobiyal etkisi değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre faj ve antibiyotik arasındaki sinerjizmin, sefoksitin, kloramfenikol ve polimiksin varlığında SA11 fajı ile muamele edilen *S. aureus* KACC 13236 suşunda daha belirgin olduğunu ve uygulanan kombine tedavi ile hücrelerin tamamına yakınının zarar gördüğünü ya da öldüğünü belirtmişlerdir [106]. Nouraldin ve arkadaşlarının çalışmasında ise *P. aeruginosa* izolatlarının planktonik ve biyofilm formları için faj-antibiyotik kombinasyonu değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular ışığında, planktonik durumda amikasin-faj kombinasyonu ile meropenem-faj kombinasyonunun sinerjistik etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Buna ek olarak amikasin-faj kombinasyonunun da biyofilm üzerinde çok güçlü bir inhibe edici etkisi olduğu bildirilmiştir [107]. Benzer şekilde bir başka çalışmada faj terapi-antibiyotik sinerjizminin *P. aeruginosa* endokardit enfeksiyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Yapılan *in vitro* denemelerde faj tedavisi ile kolonilerde 6 saatte 7 log'luk bir azalma saptanmış fakat faja dirençli mutantların 24 saat sonra tekrar ortaya çıktığı belirlenmiştir. Bu durum fajın siprofloksasin ile kombine edilmesiyle önlenmiştir. *In vivo* denemelerde ise tek doz faj tedavisi ile 6 saatte 2.5 log birimlik vejetasyonun öldürüldüğü, buna karşılık faj-siprofloksasin kombinasyonları ile 6 saatte 6 log biriminden daha fazla vejetasyonun öldürüldüğü ve sıçanların % 64 oranında başarıyla tedavi edildiği bildirilmiştir [108]. Comeau ve arkadaşlarının çalışmasında ise inhibe edici olmayan konsantrasyonlarda kullanılan  $\beta$ -laktam ve kinolon antibiyotiklerinin konakçı bakteri hücresinden virü lent faj üretimini uyardığını ve böylece daha çok fajın ortaya çıkmasını stimüle ettiği belirtilmiştir [109]. Tüm bu çalışmalar antibiyotiklerin fajlar ile birlikte kullanımının faj terapinin ileriye dönük uygulamaları için önemli bir potansiyel taşıdığını göstermektedir. Böylelikle hem fajların mevcut etkisi artırılabilir hem de bakteri direnci gibi dezavantajlar giderilebilecektir.

### **2.3. Fenolikler**

#### **2.3.1. Fenolik Bileşenler ve Yapıları**

Bitkisel kökenli gıdaların neredeyse tamamında bulunan fenolik bileşenler, aromatik halka üzerinde bir aromatik grup ile bir veya daha fazla hidroksil grubu bulunduran

çok geniş bir molekül yelpazesi içerirler. Tanımlanmış olan fenolik bileşenlerin sayısı 8000'i aşmaktadır [110].

Bitkilerin metabolizmasının birincil ve ikincil metabolizma olarak ikiye ayrılmış olduğu bilinmektedir. Canlılar için ortak olan ve hücrelerin bakımı için esas olan maddeler (lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler) birincil metabolizma kaynaklıdır. Öte yandan, çeşitli biyosentetik mekanizmalardan kaynaklanan ve belirli organizmalar ile sınırlandırılan bileşenler, ikincil metabolizmanın sonucudur. Fenolik bileşikler, bitkilerdeki ve en yaygın ikincil metabolizma ürünlerindedir [111], [112].

Polifenoller genelde glikozitler olarak bulunurlar, karbonhidratlar hidroksil veya aromatik karbon parçalarına bağlıdır. Glukoz en yaygın konjugat iken galaktoz, ramnoz, ksiloz, arabinoz ve glukuronik veya galakturonik asitler de bulunmaktadır. Ayrıca, bazı polifenollerde karboksilik asitler, aminler ve lipitler gibi konjugatlar da bulunmuştur [113], [114].

Fenolikler, çeşitli klinik araştırmalarda gözlenen insan sağlığına olumlu etkilerinden ötürü 90'lı yıllardan beri önemli ve popüler bir araştırma konusu haline gelmiştir. Bu sağlık yararları genellikle anti-inflamasyon, anti-proliferasyon ve anti-enfeksiyon gibi etkilerine bağlıdır [113], [115]. En çok öne çıkan etkilerinden biri antioksidan aktiviteleri olup, oksidasyon sonucu ortaya çıkan serbest radikal hasarı, günlük gıda maddelerinde bulunan doğal antioksidan bileşiklerin, yani polifenollerin etkisiyle kısmen sınırlandırılabilir. Bazı sınıfların spesifik özellikleri dışında, antioksidan kapasitelerinde iki temel özellik bulunmaktadır. Bunlardan ilki proteinler veya iyonlar ile etkileşimleri; diğeri radikal temizleme aktiviteleridir. Polifenollerin antioksidan etkisi farklı şekillerde ortaya çıkabilmektedir. Bunlara örnek olarak fenoliklerin pro-oksidan proteinlerle moleküler kompleks oluşturma, potansiyel olarak pro-oksidan metal iyonlarının ( $Fe^{3+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) şelatlama veya reaktif oksijen türlerini doğrudan yakalama gibi etkileri verilebilir [18], [116].

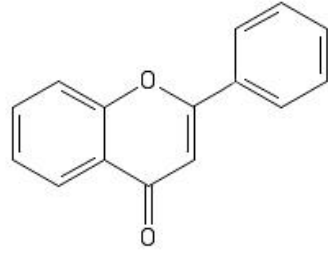
Fenolik bileşikler, taze ve işlenmiş bitkisel gıdaların duyu ve beslenme kalitesiyle yakından ilişkilidir. Polifenoloksidaz ile katalize edilen fenolik bileşiklerin enzimatik esmerleşme reaksiyonu, istenmeyen renk ve lezzet oluşumu ve besin maddeleri kaybı nedeniyle meyve ve sebze işlenmesi için hayati öneme sahiptir. Meyvelerdeki enzimatik esmerleşme reaksiyonu genelde fenolik içeriğin ve polifenoloksidaz

aktivitesi ile doğrudan ilişkilendirilmektedir [117]. Fenolik bileşikler aynı zamanda meyve ve sebzelerin kendilerine özgü tatlarının oluşumunda da rol sahibidirler. Tatlı kalkanlar ve bazı flavonoidlerden acı ve buruk tanen bileşiklerine kadar değişen çeşitli aromalar fenolik bileşenlerle ilişkilendirilebilmektedir [110].

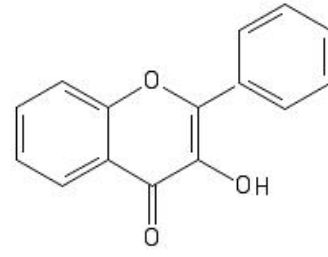
Bugüne kadar, bitkilerdeki bu binlerce polifenol bileşiği karakterize edilmiş ve çeşitli sınıflara ayrılmıştır. Bu sınıfların her birinde temel kimyasal iskelet etrafındaki oksidasyon, hidrosilasyon, metilasyon ya da glikozilasyonlar derecesi ile diğer moleküllere olan bağlantılar temel alınmıştır [18].

Fenolik bileşenler flavonoidler, tanenler, kalkanlar ve kumarinler ve fenolik asitler olmak üzere 4 ana sınıfa ayrılabilir.

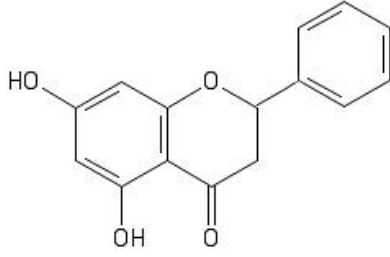
Flavonoidler: Flavonoidler, difenil propan ( $C_6-C_3-C_6$ ) iskeletine sahip olan polifenolik bileşiklerdir. hidrosilasyon derecesine ve heterosiklik piron halkasındaki  $C_2-C_3$  çift bağının varlığına göre 13 sınıfa ayrılmaktadırlar. Bu sınıflardan en önemlileri flavonoller (kuersetin, kaempferol), flavanoller (kateşin, epikateşin, gallokateşin, epigallokateşin), flavonlar (nobiletin, tangeritin, luteolin), izoflavonlar (daidzein, genistein), antosiyanidinler (peonidin, delfinidin, petunidin) ve flavanonlar (hesperidin, naringenin)dır. Bu sınıflar içinde, bu bileşiklerin halka sisteminin hidrojenasyon hidrosilasyon derecesine göre çok sayıda yapısal varyasyonları bulunmaktadır. Flavonoidler ayrıca sülfatlanmış ve metillenmiş türevler halinde, monosakkaritler ve disakkaritlerle konjuge durumda ya da oligosakaritler, lipidler, aminler, karboksilik asitler ve organik asitler ile kompleksler halindedeki bulunabilmektedirler. Flavonoidler beslenmemizdeki en yaygın polifenollerdir. Flavonoller elmada, çilekte, soğanda, brokolide, domateste, yeşil çayda, kırmızı şarapta bulunurlar. Flavonlara ise kerevizde, yeşil zeytin ve tatlı biberde rastlanmaktadır. Flavonoller elma ve erik gibi meyvelerin yanı sıra yeşil ve siyah çayda, kırmızı şarapta ve üzüm suyunda bulunmaktadır. Flavanonların rastlandığı gıdalara ise portakal, limon gibi meyveler örnek verilebilir. Antosiyaninler siyah üzümde, kırmızı şarap ve üzüm suyunda bulunurlar. İzoflavonlara ise soya fasulyesinde ve nohutta rastlanabilmektedir. [111], [118]–[120].



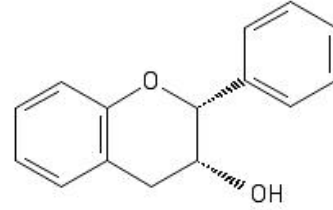
Flavonlar



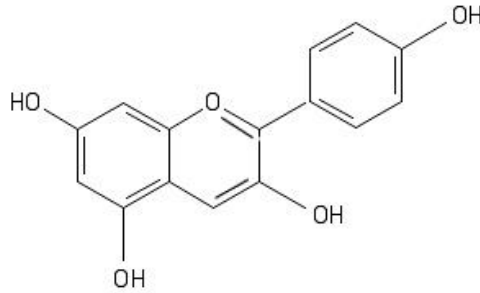
Flavonoller



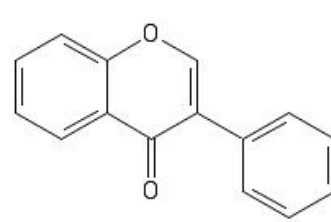
Flavanonlar



Flavanoller



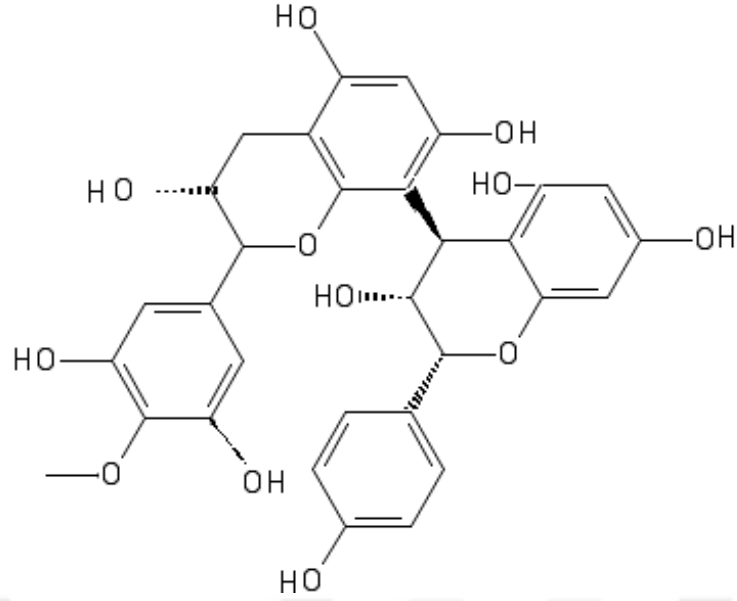
Antosiyandinler



İzoflavonlar

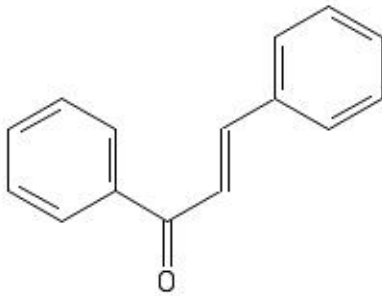
**Şekil 2.2.** Flavonoidlerin ana sınıflarının kimyasal yapıları

Tanenler: "Tanen", çözültüden jelatini çökeltme yeteneğine sahip bir grup polimerik fenolik madde için genel bir isimdir ve bu özellik de burukluk olarak bilinmektedir. Tanenlerin moleküler ağırlıkları 500 ila 3000 (87) arasında değişmekte ve kabuk, odun, yaprak, meyve ve kökler olmak üzere neredeyse bitkilerin bütün bölümlerinde bulunmaktadır (192). Hidrolize edilebilir ve kondense tanenler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Hidrolize olabilen tanenler gallik asit temellidir, genellikle D-glukozla çoklu esterler halindedirler. Kondense tanenler ise flavonoid monomerlerden türetilmiştir [121]–[123].

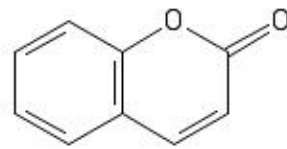


**Şekil 2.3.** Kondense tanenlere bir örnek (proantosiyanidin)

Kalkonlar ve kumarinler: Kalkonlar flavonoidlerin biyosentezindeki ara ürünlerdir. Floretin ve floridzin elmalarda, kalkonaringenin domateste ve arbutin armutta bulunan kalkonlara örnektir. Çileklerde, çay, kahve ve kırmızı şarapta da kalkon bileşiklerine rastlanabilmektedir [111], [118]. Kumarinler, diğer fenilpropanoidler gibi, o-kumarik asitin yan zincirinin siklizasyonu ile sinamik asitten bitki türevlerinin ikincil metabolitlerinin bir sınıfını oluştururlar. Bu maddeler doğada, umbeliferon, eskuletin ve skopoletin gibi glikozitler şeklinde daha yaygındır ve ağırlıklı olarak zeytinyağı, yulaf ve baharatlarda bulunurlar [111], [124].



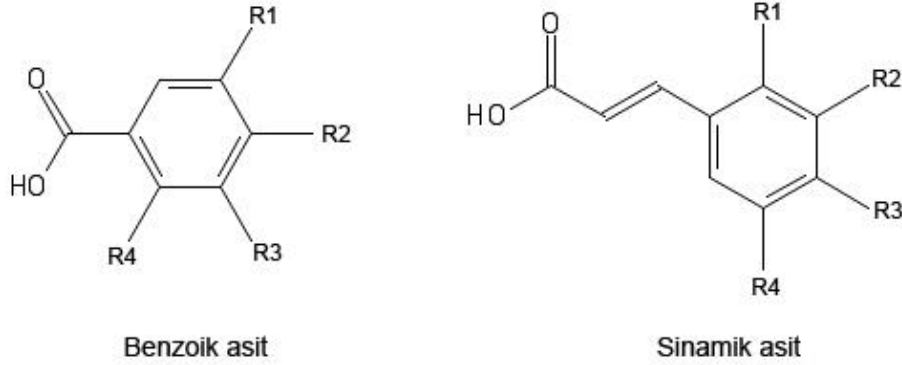
**Kalkonlar**



**Kumarinler**

**Şekil 2.4.** Kalkon ve kumarinlerin genel yapıları

Fenolik asitler: Hidroksibenzoik asitler ve hidroksisinnamik asitler gıdalarda bol miktarda bulunurlar ve insan beslenmesindeki fenolik bileşiklerin yaklaşık üçte birini oluşturabilirler. Bu bileşikler ester halde bulunur ve bu esterler çözünebilir formda vakuollerde birikebilirken çözünmez formda olup hücre duvarı bileşeni de olabilirler. En sık görülen hidroksisinnamik asitler kafeik ve ferulik asittir. Kafeik asit elma, erik ve üzüm gibi birçok meyvede bulunur. Ferulik asit ester bağları vasıtasıyla hücre çeperinin hemiselülozuna bağlanır ve buğday kepeği gibi besin kaynakları içinde bulunur. Hidroksisinnamik asit türevleri neredeyse her bitkide bulunur. Bunlara klorojenik asit ve curcumin örnek gösterilebilir. Klorojenik asit birçok meyve ve sebze ile kahvede bulunmakla birlikte özellikle elma ve armutlarda esmerleşmeye neden olan enzimatik oksidasyonun anahtar substratıdır. Curcumin, zerdeçal ve hardalın başlıca sarı pigmentidir. Gıdalarda koruyucu olarak ve ilaçlar ile kozmetik ürünlerde sarı renk maddesi olarak yaygın şekilde kullanılır [125].



Şekil 2.5. Benzoik ve sinamik asitlerin genel yapıları

### 2.3.2. Fenolik Bileşenlerin Ekstrakte Edildiği Bitkisel Kaynaklar

Polifenoller bitkilerin içeriğindeki en yaygın bileşenlerin başında gelmektedirler. Polifenolik bileşiklerin geniş bir yelpazede biyolojik aktiviteleri olduğu bildirilmiştir; bunların birçoğu geleneksel antioksidan etkileri ile ilgilidir; ancak bu konuda artan bilimsel çalışmalar fenolik bileşenlerin birçok hastalığın önlenmesindeki potansiyel etkinliğini vurgulamıştır [126]. Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için çok çeşitli bitkisel kaynaklar kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak mango, elma, muz,

portakal, limon, yeşil ve siyah çay, üzüm yaprakları, dut, manolya ve kara biber gibi doğal kaynaklar verilebilir [126], [127].

Tez çalışması kapsamında ise nar kabuğu, üzüm çekirdeği, ayva ve çörek otu ile çalışılmıştır.

Nar (*Punica granatum*) küçük çekirdeklerden ve meyve gövdesini oluşturan yüzlerce tanecikten oluşmuş dünya çapında tüketilen lezzetli bir meyvedir [128]. Nar meyvesi Punicaceae familyasına aittir ve Güney Doğu Asya, Akdeniz, Amerika gibi sıcak iklim bölgelerinde yetiştirilmektedir. Nar birçok ülkede yerel şifacılar tarafından bitkisel ilaçlarda yaygın olarak kullanılmaktadır [129]. Nar kabukları meyvenin toplam ağırlığının % 26-30 kadarını oluşturur ve flavonoidlerden (antosiyantinler, kateşinler ve diğer kompleks flavonoidler) tanenlere (punikalin, pedunkulagin, gallik ve ellagik asit) pek çok fenolik bileşen içermektedir [130], [131]. Nar meyveleri ve kabuğu yüksek bir antimikrobiyal ve antioksidan potansiyele sahiptir. Öksürük, kolon ve karaciğer kanseri, mide ülseri, kardiyovasküler hastalıklar ve sindirim bozuklukları gibi ciddi hastalıklara karşı etkileri kabul görmüştür [128].



**Şekil 2.6.**Nar (*Punica granatum*)

Üzüm (*Vitis vinifera*) çok yıllık, ağaçsı bir asma olup boyu 35 m uzunluğa kadar ulaşabilmektedir. Yapraklarının genişliği yaklaşık 5-23 cm arasındayken renkleri genellikle soluk yeşil, tatlı kokuludur. Meyvesi yumuşak ve etli olup oval veya oblong, elipsoid ya da küre şeklinde olabilmektedir. Meyveler yeşil, sarı, kırmızı veya morumsu-siyah renkte, büyük, uzun kümeler halinde bulunurlar. Tohumlar meyvenin içinde 2-3 adet bulunabileceği gibi, bazen hiç bulunmaya da bilirler [132]. Üzümdeki ekstrakte edilebilir fenoliklerin yalnızca % 10'luk bir kısmı meyvede

bulunmakta, kabukta bu oran % 28-35 arasında değişirken çekirdekte % 60-70'i bulmaktadır. Çekirdekten izole edilen fenoliklerin başında kateşin, epikateşin ve prosiyanidinler gelmektedir [133]–[135]. Üzüm çekirdeği ile yapılan çalışmalar onun antioksidan, antikaryojenik, antimikrobiyal ve antiviral, antidiyabetik özellikleri olduğunu doğrularken kalp ve karaciğer sağlığı için de önemli bir doğal kaynak olduğu ortaya konmuştur [132], [136], [137].



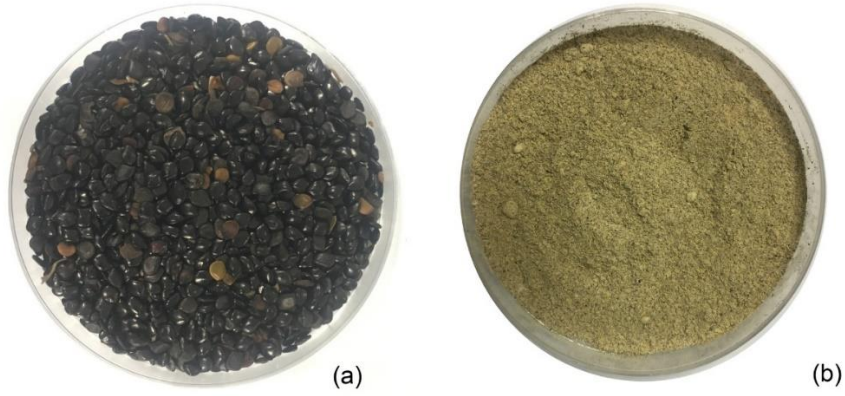
**Şekil 2.7.** Üzüm (*Vitis vinifera*) ve üzüm çekirdekleri

Ayva (*Cydonia oblonga*) Rosaceae familyasına ait 5-8 m yüksekliğinde küçük bir bitkidir. Meyvesi parlak sarı renklere olup, 7-12 cm uzunluk ve 6-9 cm genişliğe sahiptir. Kekremsi bir tadı ve karakteristik bir aroması olan bu meyve çok sayıda tohuma sahiptir [138]. Ayvada malik asit, indirgen şekerler, tanninler, C vitamini, pektin, mineraller, sodyum, kalsiyum ve fosfor gibi elementler bulunmaktadır [139]. Yapılan çok sayıda çalışma sayesinde, ayvanın önemli bir antioksidan kaynağı olduğu ortaya çıkmıştır [140]. Bu özelliğine ek olarak antimikrobiyal aktivite açısından da önem arz ettiği belirtilmiştir [140].



**Şekil 2.8.** Ayva (*Cydonia oblonga*)

Çörek otu (*Nigella sativa*) Ranunculaceae familyasına ait yıllık çiçekli bir bitkidir. Çiçeklerinde 5-10 yaprağı vardır ve genellikle sarı, beyaz, pembe, açık mavi veya açık mor renktedir. Bitkinin meyveleri büyüktür ve çok sayıdaki tohumu kapsül içinde olgunlaşmaktadır. Siyah renkli tohumlar düz, dikdörtgen ve açısız, huni şeklinde olabilmektedir. Çörek otunun bileşiminde doymuş ve doymamış yağ asitleri, alkaloidler, vitamin ve mineral elementleri ile esansiyel aminoasitler bulunmaktadır. Çörek otunun bakteriler, virüsler, funguslar ve parazitleri de içermek üzere pek çok patojene karşı antimikrobiyal etkisi olduğu doğrulanmıştır. Örneğin Hanafy ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada çörek otu ekstraktının hem Gram negatif (*E. coli* ve *P. aeruginosa*) hem gram pozitif (*S. aureus*) bakteriler ile patojen mayalardan *Candida albicans* üzerinde etkisi olduğu görülmüştür [141]–[143].



**Şekil 2.9.** Çörek otu tohumları (a) ve öğütülmüş halleri (b)

### 2.3.3. Fenolik Bileşenlerin Antimikrobiyal Aktiviteleri

Bitkilerde şifa arama fikrinin tarihi antik çağlara kadar uzanmaktadır. Tüm kıtalardaki insanlar tarih öncesi çağlardan beri yerli bitkileri kullanmışlardır. Bugünkü Irak'ta 60 bin yıl önce yaşayan Neandertallerin, hatmi çiçeği gibi bitkiler kullandığına dair kanıtlar vardır. Bu bitkiler tüm dünyada geleneksel tıpta hala yaygın olarak kullanılmaktadır [144]–[146].

İnsan beslenmesinde meyveler ve sebzeler fenolik bileşiklerin temel kaynaklarıdır. Fenolik bileşikler, özellikle antioksidan aktiviteleri nedeniyle pek çok olumlu etkiyle ilişkilendirilmiştir [147], [148]. Hastalıkların önlenmesinde antioksidan etkileriyle bitki polifenollerini oksidatif hasara karşı koruma sağlayabilmektedir [147]. Ayrıca fenolik

asitler ve flavonoidler gibi fenolik bileşenler, metabolik sendrom riskini ve tip 2 diyabetle ilgili komplikasyonları azaltarak sağlığa katkı sağlamaktadırlar. Yapılan pek çok çalışma, fenolik bileşenlerin antienflamatuar, antioksidan ve antiproliferatif ve yaşlanma karşıtı etkisini ortaya koymuştur [126]. Bunlara ek olarak fenolik bileşenlerin, özellikle LDL (Low Density Lipoprotein, Düşük Yoğunluklu Lipoprotein) oksidasyonunu engelleme yoluyla kardiyovasküler hastalıkları önlemede etkili olduğu ortaya çıkmıştır. Benzer şekilde ksantin oksidaz aktivitesini inhibe ederek ve süperoksit oluşumunu azaltarak tümör kaynaklı hastalıklar üzerinde de olumlu etki göstermektedirler [149].

Fenolik bileşenlerin tüm bu olumlu etkilerinin yanında, öne çıkan bir başka özellikleri de antimikrobiyal aktiviteye sahip olmalarıdır. Bitkisel kaynaklardan elde edilen antimikrobiyal etkili fitokimyasallar arasında fenolikler önemli bir yer tutmaktadır. Antimikrobiyal etkisi olduğu ortaya çıkmış fenolik bileşenler arasında fenolik asitler, kinonlar, flavon, flavonoid ve flavonoller, kumarinler ile tanenler yer almaktadır [146]. Fenoliklerin antimikrobiyal aktiviteleri üzerinde literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

Hufford ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, mor çayır yoncasının (*Petalostemum purpureum*) etanol ekstraktları, bakterilere ve mantarlara karşı antimikrobiyal etkinlik göstermiştir [150]. Jones ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise korunga bitkisinin yaprakları kullanılarak elde edilen tanenlerin, *Butyrivibrio fibrisolvens* A38 ve *Streptococcus bovis* 45S1'de büyüme ve proteaz aktivitesini inhibe ettiği, ancak *Prevotella ruminicola* B14 veya *Ruminobacter amylophilus* WP225 üzerinde çok az etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [151]. Pierson Ve Reddy'nin yaptığı çalışmada hallik, p-hidroksibenzoik asit ve ilgili fenoliklerin *Clostridium botulinum* tip A ve B'nin üremesini ve toksin üretimini geciktirdiği ya da kısmen inhibe ettiği bulunmuştur [152]. Bir başka çalışmada *Scrophularia frutescens* ve *S. sambucifolia* (Scrophulariaceae) türlerinin fenolik bileşenlerinin gram-pozitif bakterilere, özellikle de *Bacillus* sp.'e karşı aktivite gösterdiği bildirilmiştir [153]. Benzer şekilde sızma zeytin yağında bulunan fenolik bileşenlerin *Helicobacter pylori*, *Eschericia coli*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Enterococcus faecium* ve *Candida.albicans* gibi mikroorganizmalar üzerinde etkili olduğu bilinmektedir [154]. Fenolik bileşenler ayrıca antikaryojenik aktivite de göstermekte olup, *Streptococcus mutans*'a karşı

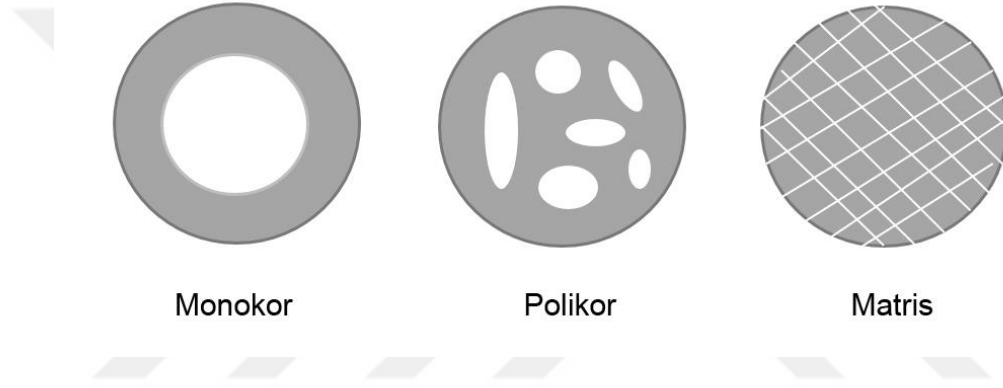
etkileri *in vitro* çalışmaların yanı sıra *in vivo* çalışmalarla da ortaya konmuştur. Bu konudaki literatürün analizi, polifenollerin karyojenik streptokoklar üzerindeki antibakteriyel etkisini doğrulamaktadır. Bu etki doğrudan *S. mutans* üzerinde görülebileceği gibi bakteri hücrelerinin dış yüzeyine yapışmasını önleyen mikrobiyal membran proteinleri ile etkileşim ve glukozil transferaz ve amilazın inhibisyonu yoluyla da ortaya çıkabilmektedir [126]. Fenolik bileşiklerin antiviral aktivitesi üzerinde de çalışmalar bulunmaktadır. Hu ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada bambu orkidesi (*Arundina graminifolia*) kullanılarak elde edilen fenolik bileşenlerin tütün mozaik virüsüne karşı antiviral etki gösterdiği, ayrıca bileşenlerden 3 tanesinin de HIV-1 virüsüne karşı etkili olduğu bildirilmiştir [155]. Ubillas ve arkadaşları ise, *Croton lechleri* bitkisinden bir tanen izole etmiş ve bu tanendeki proantosiyanidin oligomerinin RSV virüsü (Respiratory Syncytial Virus, Solunum Sinsityal Virüsü), FLU-A virüsü (Influenza A virüsü) ve PIV virüsüne (Parainfluenza virüsü) karşı antiviral aktivite gösterdiği ortaya konmuştur. Buna ek olarak, herpes virüs tip 1 ve 2 (HSV-1, HSV-2) ile hepatit A ve B virüslerinin inhibisyonu da gözlenmiştir [156].

#### **2.4. Mikroenkapsülasyon**

Mikroenkapsülasyon, temel olarak küçük parçacıkların veya damlacıkların bir kaplama ile çevrildiği veya homojen/heterojen bir matriste gömülü olduğu, birçok yararlı özelliği olan küçük kapsüllerin ortaya çıktığı bir süreç olarak tanımlanır [157]. Bu teknik, kimyasallar ve ilaçlardan kozmetik ve baskıya kadar çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır [158]. Mikroenkapsülasyon işlemi ilk olarak 1930'ların sonunda karbon kağıdı ve karbon şeritlerine daha temiz bir alternatif aranırken ortaya çıkmıştır [159]. Fakat bu teknik esas ilerlemesini 1950'li yıllarda Green ve Schleicher'in karbonsuz kopya kağıdı imalatı için jelatin ve arap gaminin kompleks koaservasyonu ile mikrokapsüllü boyalar üretmesiyle gösterir [160]. Hızla gelişen teknolojiyle birlikte mikroenkapsülasyon, günümüzde farmakolojiden kimya ve kozmetiğe, gıdadan ve boya ve savunma sanayiine farklı birçok alanda etkin şekilde kullanılmaktadır [161]–[163].

Mikroenkapsülasyon yöntemiyle elde edilen ürünler, morfolojileri ve iç yapılarındaki farklılıklara göre mikroparçacıklar, mikrokapsüller ya da mikroküreler olarak

adlandırılabilir. Parçacık boyutu 1  $\mu\text{m}$ 'nin altına düştüğü zaman nanoparçacıklar, nanokapsüller ya da nanoküreler olarak, parçacık boyutu 1000  $\mu\text{m}$ 'den büyük olduğunda ise makropartiküller olarak adlandırılırlar [164]. Mikrokapsüller monokor, polikor ve matris tipi olmak üzere üç temel kategoride sınıflandırılabilirler (Şekil 2.10). Monokor mikrokapsüllerin kapsül içinde tek bir boşluğu vardır. Polikor mikrokapsülleri, kabuk içinde bir dizi farklı boyutlu bölme sahiptir. Matris tipi mikrokapsülde, aktif maddeler kaplama malzemesinin matrisi içine entegre edilmiştir. Bununla birlikte, mikrokapsüllerin iç yapısı ve morfolojisi seçilen kaplama materyalleri ve kullanılan mikroenkapsülasyon yöntemlerine göre büyük ölçüde değişebilmektedir [158].



**Şekil 2.10.** Çeşitli mikrokapsül tipleri (Dubey vd.'den uyarlanmıştır [158].)

Mikroenkapsülasyonun tercih edilme nedenleri çok çeşitlidir. Çekirdek materyalin çevresinden ayrılmasını sağlamak, uçucu bir çekirdek materyalinin buharlaşmasını geciktirmek, yapışkan bir malzemenin tutunma özelliklerini geliştirmek gibi amaçlarla mikroenkapsülasyon yapılabilmektedir. Bazı durumlarda da, amaç mikroenkapsüle edilen materyalin kontrollü salınımını sağlamak olabilmektedir [165].

#### **2.4.1. Mikroenkapsülasyonda Kullanılan Materyaller**

Mikroenkapsülasyon işleminde iki temel materyalden bahsedilebilir. Bunlardan biri çekirdek materyal, diğeri ise kaplama materyalidir. Çekirdek materyal, kaplanacak spesifik materyal olarak tanımlanır ve katı ya da sıvı formda olabilir. Sıvı form, içerisinde dispers ya da çözünmüş bileşenler içerebildiğinden sıvı formdaki çekirdek

materyalin kompozisyonu çok çeşitli olabilmektedir. Sıvı formdaki çekirdek materyallere örnek olarak parfümler, solventler, sebze yağları, pestisitler, boyalar, asitler ve pigmentler verilebilir. Katı formdaki çekirdek materyallere ise dekstrinler, bazlar, herbisidler ve mineraller örnek verilebilir [166], [167].

Kaplama materyali, çekirdek materyal ile kohezif şekilde film oluşturabilen, kimyasal olarak uyumlu ve çekirdek materyalle reaksiyon vermeyen yapıda olmalıdır. Aynı şekilde güçlülük, esneklik, sızdırmazlık ve stabilite gibi gerekli özellikleri karşılayabilmelidir [168]–[170]. Mikroenkapsülasyon işlemlerinde, işlemin amacına göre çok farklı çekirdek materyaller ile kaplama materyalleri kullanılabilir. Kaplama materyalleri suda çözünen reçineler, suda çözünmeyen reçineler, lipid ve vakslar ve enterik reçineler olarak gruplandırılabilir. Suda çözünen reçinelere örnek olarak jelatin, Arap gamını, nişastayı, karboksimetilselülozu ve arabinogalaktanı verebiliriz. Etilselüloz, polietilen, poliamit, selüloz nitrat ve silikonsa, suda çözünmeyen reçinelere örnektir. Vaks ve lipid kategorisinde parafin, stearik asit, carnaubal ve balmumu gibi kaplama materyalleri bulunmaktadır. Enterik reçinelere ise selüloz asetat fitalat ya da zein örnek verilebilir [168].

#### **2.4.2. Mikroenkapsülasyon Yöntemleri**

Çekirdek malzemelerin mikroenkapsülasyonunda çeşitli yöntemler mevcuttur. Bu yöntemler genel olarak üç tipe ayrılmıştır [164]:

- Kimyasal yöntemler: Ara yüzey polimerizasyonu, *in situ* polimerizasyon, poli kondensasyon
- Fiziko-kimyasal yöntemler: Koaservasyon ve faz separasyonu, sol-jel enkapsülasyonu, süperkritik karbondioksit aracılığıyla mikroenkapsülasyon
- Fiziko-mekanik yöntemler: püskürtmeli kurutma, akışkan yatak kaplama, pan kaplama, solvent evaporasyonu

Solvent evaporasyonu: Solvent evaporasyonu temelde üç ana aşamadan oluşur. İlk aşama polimer ve aktif maddenin organik çözücünde eritilmesidir. İkinci aşama sürekli faz olarak adlandırılan bir sulu fazda dağılmış faz olarak adlandırılan bu organik fazın emülsiyon haline getirilmesidir. Son aşama ise çözücünün ekstrakte edilmesi ve buharlaştırılmasıdır. Bu işlem, aktif parçayı içeren katılaşmış mikro

küreler ile sonuçlanır. Bu teknikte çok çeşitli sıvı ya da katı çekirdek malzemeleri kullanılabilir. Çekirdek malzemeler suda çözünen ya da çözünmeyen malzemeler olabilmektedir. Kaplama materyali olarak çeşitli film oluşturu polimerler kullanılabilir [171], [172].

Arayüz polimerizasyonu: Arayüz polimerizasyonunda, bir polikondansasyonda bulunan iki reaktif, bir arayüzde buluşur ve hızla tepki verir. Bu yöntemin temeli, bir asit klorid ile bir amin veya alkol, polyesterler, poliüre, poliüretan gibi bir aktif hidrojen atomu içeren bir bileşik arasındaki klasik Schotten Baumann reaksiyonudur. Doğru koşullar altında, ince esnek duvarlar arayüzde hızlı bir şekilde oluşur. Pestisit ve bir diasit klorid çözeltisi su içerisinde emülsiyon haline getirilir ve bir amin ve bir çok fonksiyonlu izosiyanat içeren sulu bir çözelti ilave edilir. Reaksiyon sırasında oluşan asit nötralize etmek için baz mevcut. Yoğun polimer duvarlar, emülsiyon damlacıklarının arayüzünde anında oluşurlar [159], [173].

Koaservasyon ve faz separasyonu: Koaservasyon ve faz separasyonu işleminin ilk basamağı, birbirine karışmayan üç kimyasal fazın oluşumunu içerir. Bu fazlar: sıvı araç fazı, kaplama materyali fazı ve çekirdek malzeme fazı olarak tanımlanır. Üç faz, çekirdek maddenin bir kaplama polimer çözeltisine dağıtılmasıyla oluşturulur ve araç fazı polimer için bir çözücü olarak kullanılır. Kaplama materyali fazı, sıvı faz içindeki polimeri kapsar. İkinci aşama sıvı kaplama malzemesinin ve çekirdeğin kontrollü karıştırılmasıyla, çekirdek malzeme üzerine sıvı polimer kaplamanın çökmesini içerir. Eğer polimer çekirdek materyal ile sıvı faz arasında oluşan ara yüzeyde adsorbe edilirse sıvı kaplama polimeri çekirdek malzeme üzerine çöker. Son aşama bir mikrokapsül oluşması için kaplama malzemesinin termal, çapraz bağlama desolvasyon teknikleri ile sertleştirilmesini içerir [168].

Akışkan yatak kaplama: Akışkan yatak teknolojisi, katı parçacıkların üzerine düzgün bir kabuk malzeme tabakası uygulamak için çok etkili bir yoldur. Bu teknoloji, çekirdek materyalleri polisakaritler, proteinler, emülgatörler, yağlar, kompleks formülasyonlar, toz kaplamalar, maya hücre özütü vb. gibi her türlü kaplama materyaliyle enkapsüle edebilme olanağına sahip gelişmiş teknolojilerden biridir. Dolayısıyla, kontrollü salınım açısından diğer teknolojilere kıyasla oldukça daha kullanışlıdır. Sakızlar ve proteinler gibi hidrokolloidlerin sulu çözeltileri, sentetik polimerlerin etanolik çözeltileri ve eritilmiş yağ/mumlar bu işlemde kaplama

formülasyonları olarak kullanılmıştır. Püskürtmeli kurutulmuş mikro kapsüller, daha iyi koruma ve raf ömrü kazandırmak için yatak yöntemi ile bir kez daha kaplanabilmektedirler [157].

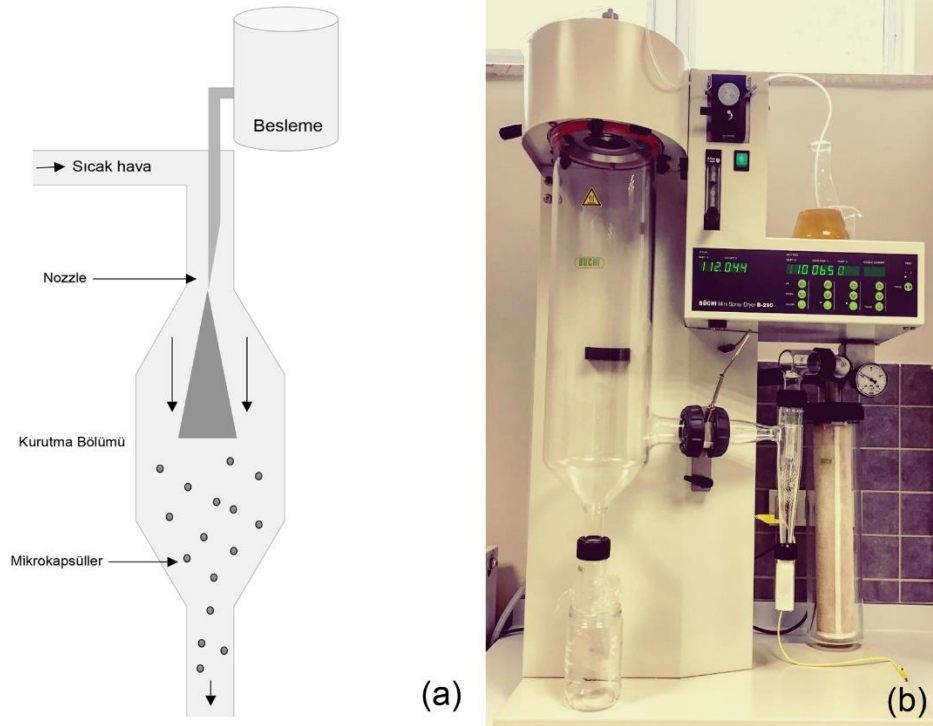
**Ekstrüzyon:** Gıda maddelerinin ekstrüzyon yoluyla enkapsüle edilmesi, püskürtterek kurutmaya kıyasla nispeten yeni bir işlemdir. Bu bağlamda kullanılan ekstrüzyon tahıl esaslı ürünlerin pişirilmesi ve tekstüre edilmesi için kullanılan ekstrüzyonla aynı işlem değildir. Esasında flavor enkapsülasyonlarında uygulanan ekstrüzyon, çekirdek materyalin camsı haldeki karbonhidrat matrisleri içerisinde enkapsülasyonuna olanak sağlayan ve nispeten düşük sıcaklıkta uygulanan bir yöntemidir. Kullanılan basınç ve sıcaklık tipik olarak 100 psi altında ve nadiren 115 °C'dir. Kaplama malzemesi sıvılarla temas edince sertleşir, çekirdek malzemeyi hapseden kapsülleyici bir matris oluşturur. Daha sonra ekstrüde filamentler sıvı banyodan ayrılır, kurutulur ve boyutlandırılır. Kullanılan taşıyıcı madde, sükröz, maltodekstrin, glukoz şurubu, gliserin ve glikoz gibi birden fazla bileşen içerebilir [174]–[176].

**In-Situ Polimerizasyon:** Genellikle nanokompozitlerin sentezi için kullanılan in-situ polimerizasyon işlemi, monomer bileşenini, çoğunlukla stiren veya metil metakrilat gibi vinil ve akrilik bileşikler, uygun bir yüzey aktif cismi ilave edilen sulu fazda emülsiyon haline getirmekten oluşur. Polimerizasyonun başlamasının ardından, suda çözünmeyen polimer mikroküreleri oluşturmaktadır [18].

**Pan kaplama:** Farmasötik endüstrisinde yaygın olarak kullanılan pan kaplama işlemi, küçük, kaplanmış partiküllerin veya tabletlerin oluşturulması için en eski endüstriyel prosedürler arasındadır. Kaplama malzemesi yavaşça uygulanırken parçacıklar uygun bir alette döndürülür. 600 mikrondan büyük katı partiküllerin etkili bir kaplama için gerekli olduğu düşünülür. [168]

**Püskürtmeli Kurutma:** Püskürtmeli kurutma, bir sıvı ürünü, sıcak bir gaz akımı içinde atomize ederek anında bir toz elde etmek için kullanılan bir temel işlemdir. Kullanılan gaz genellikle hava veya nadiren nitrojen gibi inert bir gazdır. Püskürtücüyü besleyen ilk sıvı bir solüsyon, emülsiyon veya süspansiyon olabilir. Püskürtme kurutma, başlangıç besleme materyaline ve proses koşullarına göre çok ince bir toz veya büyük ebatlı parçacıklar olabilmektedir [177]. Püskürtterek kurutma işlemi, atomizasyon, kurutma ve toz toplama içeren üç aşamada çalışır [178].

Başlangıçta bir sıvı besleme bir atomizer vasıtasıyla dağıtılır ve kurutma bölümünde ılık havada veya inert gazda ince damlacıklar halinde dağıtılır. Geniş partiküllü yüzey alanı nedeniyle, çözücü uzaklaştırma aşaması hızlıdır ve birkaç saniye ile on saniye arasında sürebilir [179]. Kurutulmuş parçacıklar daha sonra siklona geçer, burada santrifüj kuvveti altında ayrılma meydana gelir. Püskürtmeli kurutma ile yapılan mikroenkapsülasyon, çoğunlukla kokuların, yağların ve flavorların kapsülasyonu için kullanılan düşük maliyetli bir ticari prosestir [164]. Bu teknik, gıda endüstrisinde kullanılan en yaygın mikrokapsülasyon tekniğidir. İlk kullanımlarını takiben püskürtmeli kurutma tekniği, kuru aromalar yapmak için en önemli ticari işlem haline gelmiştir. Bu teknik kullanılarak vitaminler, mineraller, renklendiriciler, yağ ve yağ aromaları, aroma bileşikleri, oleoresinler ve enzimler enkapsüle edilmiştir. Malzemelerin korunması için hem ekonomik hem de etkili bir yöntemdir ve özellikle, özel ekipman gerektirmeyen aromalar için yaygın şekilde kullanılmaktadır [157].



**Şekil 2.11.** Jyothi vd.'den [164] uyarlanan püskürtmeli kurutma işleminin şematik gösterimi (a) ve tez çalışmalarında kullanılan püskürtmeli kurutucu (b)

### 2.4.3. Mikroenkapsülasyon Teknolojisinin Kullanım Alanları

Mikroenkapsülasyonun en yaygın kullanım alanlarından biri farmasötik ve biyomedikal uygulamalardır. Bu teknik özellikle ilaçların kontrollü ve sürdürülebilir taşınımı ile salınımlarında kullanılmaktadır [158]. Buna ek olarak ilaçların kullanıcıyı rahatsız eden organoleptik özelliklerini maskeleyerek, sıvı formdaki ilaçları toz forma dönüştürmek ya da nem, ışığa ya da oksijene karşı hassas olan ilaçları korumak için de mikroenkapsülasyon yöntemi tercih edilebilmektedir. Mikroenkapsülasyon ayrıca ilaçlarda bulunan ve oda sıcaklığında buharlaşabilen uçucu bileşenlerin korunması ve ilaçlar arasındaki uyumsuzluğun önlenmesi amacıyla da kullanılabilir [166], [180].

Mikroenkapsülasyonun bir başka kullanım alanı da tarım olup, bu yöntem mahsüllerin böcek tehlikesinden korunmasında önemli bir rol oynamaktadır [158]. Pestisitlere alternatif olarak yapay feromon formülasyonlarının kullanılması ve bu yapay feromonun dişiler tarafından salgılanan feromonu gizlemesi sayesinde böcek çiftleşmesi sınırlandırılmaktadır. Feromonların mikroenkapsüle edilmeleri ise verimi artırmakta ve feromonları diş etkenlere karşı korumaktadır [181].

Mikroenkapsülasyonun bir başka kullanım alanı da savunma sanayii olup başlıca çeken uygulamalardan biri "kendini iyileştirici" polimerler ve kompozitlerdir. Bunlar matris içine gömülü mikrokapsüle formda iyileştirici ajanlara sahiptir ve uzun ömürlü yapısal materyaller sağlamak için önemli bir potansiyel sunmaktadırlar. Ayrıca bu yöntem, askeri personel için geliştirilen ve kimyasal koruma amacıyla tasarlanan kumaşların üretiminde de kullanılır. Bu amaçla, kimyasal reaktiflerin nötrleştirilmesi için reaktif bölgeler temin etmek üzere, kumaşlara veya bitmiş giysilere uygulanabilen özel reaktif mikrokapsüller geliştirilmiştir [158], [182].

Mikroenkapsülasyonun gıda alanında da pek çok uygulaması bulunmaktadır. Sağlıklı beslenmeye olan ilginin artması ile fonksiyonel gıdalar beslenmenin önemli bir parçası haline gelmiştir. Fonksiyonel gıdaların üretiminde bileşime katılan ingredientler bazen zamanla degrade olmakta ve aktivitelerini kaybetmekte, ya da oksidatif reaksiyonlar sonucu zararlı hale gelmektedir. Bunun yanında ingredientlerle ilgili gıdadaki bileşenlerle reaksiyona girme ve biyoyararlanımın azalması gibi sorunlar yaşanabilmektedir. Mikroenkapsülasyon ile bu gibi sorunlara çözüm getirilmektedir [158]. Ayrıca gıda biyoteknolojisinde sıklıkla kullanılan

mikroorganizmalara da mikroenkapsülasyon işlemi uygulanarak hücrelerin uygun bağırsak bölmesinde doğru zamanda salınması sağlanmaktadır. Aynı şekilde probiyotikler de mikroenkapsüle edilerek hücrelerin olumsuz ortam koşullarına karşı korunmakta ve bağırsakta canlı ve metabolik açıdan aktif bir şekilde serbest bırakılmaktadırlar [183]. Çeşitli mikroenkapsülasyon tekniklerinin insan sağlığı açısından önemli bileşiklere uygulanmasında vitaminler, n-3 çoklu doymamış yağlı asitleri, kalsiyum, demir ve antioksidanlar kullanılmaktadır [184].

#### **2.4.4. Fajların ve Fenolik Bileşenlerin Mikroenkapsülasyonu**

Oral olarak vücuda alınan fajın aktivitesi midenin asidik koşulları altında ve enzimler ile safra gibi sindirim bileşenlerinin varlığında hızlı bir şekilde azalabilir [15]. Etkili bir korunma olmadan, faj gastrik geçişten sağ kurtulamayabilir ve böylece bağırsakta aktivite gösteremeyebilir [16]. Bu nedenle, oral yolla uygulanan fajın bağırsaktaki enfeksiyon bölgesine giden koşullarda korunması gerekmektedir. Fajları korumanın olası bir yolu da mikroenkapsülasyondur [185].

Fajların enkapsülasyonu için yapılmış olan çalışmalarda kullanılan yöntemler arasında emülsifikasyon, ekstrüzyon, püskürtmeli kurutma ve peynir altı protein filmleri yöntemleri bulunmaktadır [51].

Dini ve arkadaşları yaptıkları çalışmada fajları doğal biyopolimer matrislere mikroenkapsüle ederek mide ortamına karşı koruyucu bir bariyer oluşturmayı hedeflemişlerdir. Bu amaçla aljinat ve pektin kullanılmış ve oleik asit ile emülsifikasyon da uygulanmıştır. Sonuç olarak emülsifiye pektinin maksimum verimi ve asiditeye karşı en yüksek korumayı gösterdiği bulunmuştur. Bu yöntemle pH 1.6'ya 30 dakika maruz kaldıktan sonra fajların  $10^3$ 'ten fazlası aktif kalmış, ayrıca faj pepsin aktivitesinden de korunmuştur [186].

Ekstrüzyon yöntemi kullanılarak yapılan mikroenkapsülasyona Ma ve arkadaşlarının çalışması örnek gösterilebilir. Bu çalışmada bakteriyofaj Felix O1, bir kitozan-aljinat- $CaCl_2$  sistemi kullanılarak oral alım için mikrokapsülle edilmiş, sonrasında mide ortamı ve safra tuzu koşullarında serbest ve mikroenkapsüle fajın aktivitesi belirlenmiştir. Serbest faj Felix O1'in asidik ortamlara karşı çok hassas olduğu, buna karşılık mikrokapsüllenmiş fajların titresinin pH 2.4'de bile ancak 0.67 log birimi azaldığı belirlenmiştir. Mikroenkapsüle fajın titresinde mide ortamında 1

saatlik inkübasyon sonrasında yalnızca 2,58 log birimi azalma görülmüş ve benzer şekilde safra içeren ortamda 3 saat inkübasyondan sonra bile mikroenkapsüle fajların canlılığı muhafaza edilebilmiştir [185].

Matinkhoo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, düşük sıcaklıkta püskürtmeli kurutma yöntemi kullanılarak çeşitli *Myoviridae* fajları mikroenkapsüle edilmiştir. 40-45°C'lik çıkış sıcaklıklarının seçilmesi sonucu, mikroenkapsülasyon sonrasında fajlarda 1 log pfu/ml'den daha düşük bir titre kaybı görüldüğü bildirilmiş ve üretilen solunabilir tozların faj terapinin geleceği açısından umut verici olduğu görülmüştür [187]. Benzer şekilde, Vandenhuevel ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada fajlar laktoz, trehaloz ve dekstran 35 kullanılarak çeşitli proses parametrelerinde püskürtmeli kurutucudan geçirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre *Pseudomonas* podovirus LUZ19 fajının titresinde 1 logaritmik birimden daha az düşüş gözlenirken *Staphylococcus* faj Romulus içeren tozlarda faj titeri 2.5 logaritmik birimden daha fazla düşüş gözlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca düşük giriş sıcaklığı ve hava akış hızında fajların daha az zarar gördüğü belirtilmiştir [188]. Leung ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise *Pseudomonas* podoviridae fajı olan PEV2 trehaloz, mannitol ve L-lösin kullanılarak püskürtmeli kurutucudan geçirilmiş ve işlem sonunda 0.75 log biriminden daha düşük titre kaybı gözlenmiştir [189].

Fajların enkapsülasyonuna dair farklı bir yaklaşım Vonasek ve arkadaşlarının çalışmasında görülmektedir. Bu çalışmada peynir altı suyu protein izolatlarından üretilen filmlerin bakteriyofajların enkapsülasyonunda, stabilizasyonunda ve salınımindaki önemli bir potansiyeli olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma için *E. coli* ve T4 fajı kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite ölçümleri, enkapsüle edilmiş fajların uygulandığı grupla kontrol grubu arasında yaklaşık 5 log birimlik fark olduğunu ortaya koymuştur. Dahası, sonuçlar oluşturulan filmlerin, hem oda sıcaklığına yakın ve aydınlık ortamlarda hem de buzdolabı sıcaklığında ve karanlık ortamlarda ciddi bir kayba sebep olmadan bir ay süreyle fajları stabilize edebildiğini göstermiştir [190].

Tıpkı fajlar gibi fenoliklerde de *in vitro* olarak elde edilen başarılı sonuçlar *in vivo* ortamlarda aynı başarıyla tekrarlanamayabilmektedir [51]. Bunun temel sebebi, oral uygulamayı takiben gastrik ortama yetersiz direnç, bağırsaktaki düşük geçirgenlik ve/veya çözünürlük ile gıda işleme ve depolama koşullarının (sıcaklık, oksijen, ışık)

etkisi gibi sebeplerden ötürü moleküllerin yalnızca küçük bir kısmının kullanılabilir halde kalmasıdır. Aynı şekilde gastrointestinal sistemdeki pH, enzimler ve diğer besin maddelerinin varlığı da bu bileşenlerin aktivitesini ve potansiyel sağlık yararlarını sınırlamaktadır [191]. Enkapsüle edilmiş polifenollerin kullanımı ile belirtilen dezavantajların üstesinden gelinerek bileşenlerin biyoyararlanımı hem *in vivo* hem de *in vitro* için artırılabilceği ortaya konmuştur [192].

Fenolik bileşenlerin enkapsülasyonu için pek çok farklı yöntem kullanılabilir. Bu yöntemler arasında en çok tercih edilenlerden biri püskürtmeli kurutma yöntemidir. Püskürtmeli kurutma yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda kaplama materyali olarak maltodekstrin, kitozan ve sodyum kazeinat-soya lesitini gibi bileşenler kullanılmakta olup antosiyaninler, zeytin yaprağı ekstraktları, soya fasulyesi ekstraktları, üzüm çekirdeği ekstraktları bu yöntemle enkapsüle edilmiştir [193]–[196]. Çalışmalarda göze çarpan bir başka yöntem de koaservasyon olup, bu yöntemde kalsiyum aljinat, jelatin ve glukoz gibi materyaller kullanılarak yerba mate çayı ekstraktı, epigallokateşin-3-gallat, siyah kuşüzümü ekstraktı gibi polifenollerin enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir [197]–[199]. Dondurarak kurutma yöntemiyle yapılan enkapsülasyonlarda maltodekstrin DE20, pullulan gibi kaplama materyalleri kullanılarak antosiyanin ve Hibiscus antosiyanini gibi fenolik bileşenler enkapsüle edilmiştir [200], [201]. İnküzyon enkapsülasyonu yöntemiyle enkapsüle edilen fenolikler bileşenlere ise hesperidin, kuersetin, 3-hidroksiflavon, morin ve ferulik asit örnek verilebilir. Bu bileşenlerin enkapsülasyonu için kullanılan kaplama materyalleri arasında ise hidroksipropil- $\beta$ -siklodekstrin,  $\beta$ -siklodekstrin ve  $\alpha$ -siklodekstrin bulunmaktadır [202]–[205]. Fenolik bileşenlerin enkapsülasyonunda ayrıca nanoenkapsülasyon da tercih edilebilmektedir. Bu amaçla faz inversiyonu, nanopresipitasyon ve emülsiyon-difüzyon-evaporasyon gibi yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemlerle kuersetin, epigallokateşin-3-gallat, kuersetin, elagik asit gibi fenolikler enkapsüle edilebilmektedir [206]–[208].

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bakteriler

Tez kapsamında çeşitli kaynaklardan faj izole edilmesi ile izole edilen fajların litik aktivitelerinin tayini ve fenolik bileşenlerin antimikrobiyal aktivitesinin kontrolü aşamalarında, Hacettepe Üniversitesi Gıda Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜGAM)'nin kültür koleksiyonunda yer alan *Escherichia coli*, *Escherichia coli* K12, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615; Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR'dan temin edilerek "İÇ" ile kodlanan *Escherichia coli* O157:H7 İÇ, *Listeria monocytogenes* İÇ, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium İÇ, *Staphylococcus aureus* İÇ bakterileri ve Prof. Dr. Sami FATTOUCH'tan temin edilen *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ve *S. Typhimurium* bakterileri ile çalışılmıştır.

##### 3.1.2. Faj İzolasyon Materyalleri

Faj izolasyon materyali olarak George Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology (Tiflis, Gürcistan) tarafından hazırlanan ticari faj mikseri kullanılmıştır. Bunlar dışında çevre göletlerinden alınan su örnekleri ile kanalizasyon suyu örneklerinden de faj izolasyonu yapılmıştır. Tez kapsamında ayrıca, TÜBİTAK ile Tunus Yüksek Eğitim ve Bilimsel Araştırma Bakanlığı (MHESR) ile İkili İşbirliği Programı çerçevesinde desteklenen proje kapsamında, proje ortağı Prof. Dr. Sami FATTOUCH ve ekibi tarafından izolasyonunun ilk aşaması gerçekleştirilen altı adet faj ile de çalışılmıştır.

##### 3.1.3. Fenolik Ekstraksiyonunda Kullanılan Materyaller

Antimikrobiyal etkili fenolik maddelerin eldesi amacıyla kullanılan ayva (*Cydonia oblonga*) Migros Ticaret A.Ş. (Ankara, Türkiye)'den, kabuklarının kullanıldığı narlar (*Punica granatum*) CarrefourSA Carrefour Sabancı Ticaret Merkezi A.Ş (Ankara, Türkiye)'den, üzüm çekirdekleri (*Vitis vinifera*) ise Kavaklıdere Şarapları A.Ş. (Ankara, Türkiye)'den temin edilmiştir. Çörek otu (*Nigella sativa*) proje ortağı Prof. Dr. Sami FATTOUCH tarafından sağlanmıştır.

#### **3.1.4. Besiyerleri ve Kimyasallar**

Tez kapsamında çalışılan bakterilerin yeni stoklarının hazırlanmasında CASO Broth (Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Almanya); bu bakterilere özgül fajların izolasyonunda, titrelerinin yükseltilmesinde ve litik aktivitelerinin belirlenmesinde ise CASO Broth, CASO Yumuşak Agar (% 0,6 agar) ve CASO Agar (% 1,5 agar) kullanılmıştır.

Faj ve bakteri stoklarının muhafazası için kullanılan gliserol Merck Millipore Corporation (Darmstadt, Almanya)'dan temin edilmiştir.

Bitkisel kaynaklardan antimikrobiyal etkili fenolik maddelerin ekstraksiyonunda kullanılan etanol ve aseton Merck Millipore Corporation'dan, polifenollere ait kalibrasyon eğrisinin çıkarılmasında kullanılan gallik asit Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)'ten, metanol ise Merck Millipore Corporation'dan temin edilmiştir. Spektrofotometrik toplam fenolik madde analizinde kullanılan Folin-Cioacaltea reaktifi ve Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Sigma-Aldrich'ten alınmıştır.

Fajların ve polifenollerin mikroenkapsülasyonunda biyopolimer matriks oluşturmak amacıyla aljinat (Sigma-Aldrich) ve yağsız süt tozu (Atatürk Orman iftliği Süt Fabrikası, Ankara) kullanılmıştır.

Mikroenkapsüle edilerek toz haline getirilmiş faj ve polifenollerin antimikrobiyal aktivite tayini yapılırken çözücü olarak SM tamponu kullanılmıştır. SM tamponunun içeriğini oluşturan jelatin, NaCl ve MgSO<sub>4</sub> Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir.

Mikroenkapsllerin mide ortamı ve safra tuzu varlığındaki aktiviteleri kontrol edilirken oluşturulan model ortamlarda kullanılan pepsin ve domuz safra özütü ise Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir.

### **3.2. Metot**

#### **3.2.1. Faj İzolasyonu, Saflaştırma ve Zenginleştirme**

### 3.2.1.1. Fajların İzolasyonu

Ticari karışımlardan yapılan izolasyonda, George Eliava Enstitüsü tarafından üretilmiş olan 6 farklı faj miksi kullanılmıştır. Bu ürünlerin içeriği Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Fajların izolasyonu için kullanılan ticari faj mikslерinin içerikleri

| FAJ MİKSI                         | İÇERİK   |
|-----------------------------------|--|
| FERSISI BACTERIOPHAGE (1A)        | Streptococci; <i>S. pyogenes</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. salivarius</i><br>Staphylococci; <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermis</i>  |
| SEPTAPHAGE (1B)                   | <i>Shigella flexineri</i> 12346, <i>Shigella sonnei</i> , <i>Salmonella paratyphi A, B</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>Salmonella oranienburg</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>P. aeruginosa</i> |
| PHAGESTI (2)                      | <i>Shigella flexineri</i> 1, 2, 3, 4, 6; <i>Shigella sonnei</i> , <i>Salmonella paratyphi A, B</i> ; <i>S. Typhimurium</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>Salmonella oranienburg</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>E.coli</i> , <i>Proteus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>P. aeruginosa</i>  |
| PHAGYO (3)                        | <i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Proteus</i>  |
| STAPHYLOCOCCAL BACTERIOPHAGE (4A) | <i>Staphylococcus</i>  |
| PHAGESTAPH (4B)                   | <i>Staphylococcus</i>  |
| SES BACTERIOPHAGE (5)             | <i>Streptococcus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus</i>  |
| ENKO BACTERIOPHAGE (6)            | <i>Staphylococcus</i>  |

Fajların izolasyon, saflaştırma ve zenginleştirme adımlarını içeren çalışmaların tümünde, konakçı olabileceği düşünülen bakterilerin genç ve aktif kültürleri kullanılmıştır. Bunun için, deneylerde kullanılacak olan bakterilerin sıvı besiyerlerine inokülasyonu yapılarak 18-24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Bu inkübasyonun ardından kültürlerden tekrar sıvı besiyerine ekim yapılmış ve yaklaşık 4 saatlik inkübasyon sonunda gelişme eğrisinin logaritmik fazında ( $OD_{600}=0,5-0,7$ ) bulunan aktif kültürler ile çalışılmıştır [60].

Mikslерden faj izolasyonu yapılırken, her biri farklı türlere etkili faj karışımları içeren ticari preparatlardan 10'ar  $\mu$ L steril Eppendorf tüplere alınarak üzerlerine 4 saatlik konakçı bakteri kültürlerinden 10  $\mu$ L eklenmiştir. Faj-bakteri adsorpsiyonunun gerçekleşebilmesi için oda sıcaklığında 15-20 dakika beklenilmiş ve daha sonra bu

karışımların üzerine steril sıvı besiyeri eklenerek toplam hacim 1 mL'ye tamamlanmıştır. Hücre artıklarını uzaklaştırmak için, 37°C'de 18-24 saat süren inkübasyon sonunda 12000 rpm/dk'da 5 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş ve elde edilen süpernatantlar steril Eppendorf tüplere alınmıştır. Bu işlem, hedeflenen konakçıya etkili olan fajın ortamda hakim duruma gelebilmesi ve titresinin yükselmesi amacıyla, bir önceki günden elde edilen faj süpernatantı ve konakçı bakterilerin artan miktarları kullanılarak tekrarlanmıştır [60].

Faj varlığını belirlemek için, 3 mL steril yumuşak agar eritilerek içerisine 4 saatlik konakçı kültüründen 300 µL eklenmiş, önceden petrilere dökülmüş olan agar üzerine homojen bir şekilde yayılmıştır (çift tabaka agar yöntemi). Yumuşak agar soğuyup katılaştıktan sonra, elde edilen faj süpernatantlarından 10'ar µL agarlı katı besiyeri üzerine damlatılmıştır. 37°C'de gerçekleşen 18-24 saatlik inkübasyon sonucunda damlatma yapılan bölgelerde bakterilerin üremediği bölgeler (liziz) olup olmadığı kontrol edilerek faj varlığı saptanmıştır [209].

Göl ve kanalizasyon suyu örneklerinden yapılan izolasyonlarda ise, tüm su örnekleri ilk aşamada kaba filtre kağıdın geçirilerek gözle görünen kirliliklerin uzaklaşması sağlanmıştır. Elde edilen bu filtratlar 0,22 µm por çapına sahip filtrelerden geçirilerek olası bakteri ve bakteri artıkları uzaklaştırılmıştır. Bu örneklerden 50 mL alınarak içine hedef konakçı bakterilerin 4 saatlik kültürlerinden % 1 oranında inokülasyon yapılmış ve sonrasında örnekte bulunması muhtemel fajların kullanılan bakterilere adsorbsiyonu için oda sıcaklığında 15-20 dakika beklenmiştir. Süre bitiminde örneklerin üzerine çift kuvvet hazırlanmış 50 mL CASO sıvı besiyeri aktarılmıştır. Bakteri yüzeyine adsorbe olduğu düşünülen fajların etkilenmemesi için çok hafif bir karıştırma işlemi uygulanmış ve örnekler 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun ardından örnekler 12000 rpm/dk'da 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantlar steril tüplere aktarılmıştır. Faj varlığının tespiti için bakterilerin aktif kültürleri, eritilmiş 3 mL yumuşak agar içine aktarılıp daha önceden dökülmüş olan agar üzerine yayılmış ve örnekler 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilere bakteri lizizi olup olmadığı kontrol edilmiştir.

### 3.2.1.2. Tek Plak İzolasyonu ile Saflaştırma

Varlığı saptanan fajları saflaştırmak için tek plak izolasyonu yapılmıştır. Faj süspansiyonlarının steril serum fizyolojik (FTS, % 0,85 NaCl) ya da sıvı besiyerinde dilüsyonları hazırlandıktan sonra, fajın her bir dilüsyonundan 100'er µL ve fajın 4 saatlik konakçı kültüründen 150'şer µL, 3 mL yumuşak agara katıldıktan sonra hafifçe karıştırılarak karışım önceden hazırlanmış agarlı besiyeri üzerine dökülmüştür. İnkübasyon sonrasında (37°C'de 18-24 saat) oluşan plakların tek tek düştüğü bölgelerin birinden tek bir plak steril enjektör ucuyla kesilerek steril bir Eppendorf tüp içerisine alınmıştır. Bu faj plağının üzerine 100 µL sıvı besiyeri eklenip iyice karıştırılarak fajların besiyerine geçmesi sağlanmıştır. 4 saatlik konakçı kültürden 10 µL alınarak bu tüp içine eklenmiş ve adsorpsiyonun gerçekleşmesinden sonra üzerine son hacim 1 mL olacak şekilde steril CASO Broth eklenmiş ve 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda ortamdaki hücre artıkları 12000 rpm/dk'da 5 dakika santrifüj işlemi ile uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süpernatant, 0,45 µm porlu filtrelerden (Sartorius, Göttingen, Almanya) geçirilerek steril faj filtratı olarak kullanılmıştır. Bu işlem iki ya da üç kez tekrarlanmıştır. Böylece izole edilen fajın saflığından emin olunmuştur [60].

### 3.2.1.3. Zenginleştirme ve Titre Belirlemesi

İzole edilen fajların zenginleştirilmesi için faj ve aktif konakçı bakteri kültürü sıvı ortamda istenilen titreye ulaşmaya kadar pasajlar yapılarak karşılaştırılmıştır. Bu amaçla her pasajda 10 µL faj ile 10 µL konakçı bakteri karşılaştırılmış ve faj-bakteri adsorpsiyonunun sağlanması amacıyla oda sıcaklığında 15-20 dakika beklendikten sonra karışımın hacmi steril sıvı besiyeri ile 1 mL'ye tamamlanmıştır. Faj-bakteri karışımları 37°C'de 18-24 saat süreyle inkübasyona bırakılarak faj aktivitesi gözlenmiş ve faj istenen titreye ulaşana dek, bakteri miktarı bir önceki pasaja göre artırılarak zenginleştirmeye devam edilmiştir.

Faj titresinin belirlenmesinde yine çift tabaka agar yöntemi kullanılmış olup, bunun için son pasaja ait faj süspansiyonunun  $10^{-6}$ - $10^{-7}$ 'ye kadar FTS içerisinde dilüsyonları hazırlanmıştır. Dört saatlik konakçı kültüründen 300 µL alınarak 3 mL yumuşak agar ile karıştırılmış ve önceden hazırlanmış agarlı besiyeri üzerine yayılmıştır. Agarın katılmasından sonra faj dilüsyonlarından petride belirlenmiş

bölgelere 10'ar µL damlatılmıştır. 37°C'de 18-24 saat inkübasyon sonunda faj plakları damlatıldıkları bölgelerde sayılmıştır. Faj titresini hesaplanırken, damlatma yapılan bölgedeki plak sayısının dilüsyon faktörü ve 10<sup>2</sup> ile çarpılmasıyla pfu/mL (plak oluşturan birim/mL) olarak verilir. Örneğin, 10<sup>-6</sup> dilüsyonundan damlatılmış bölgede 5 faj plağı görülmüşse titre, 5×10<sup>6</sup>×10<sup>2</sup>=5×10<sup>8</sup> pfu/mL olarak saptanmıştır.

#### **3.2.1.4. Konakçı Kültürlerin ve Fajların Saklanması**

Tüm bakteri kültürleri ve izole edilip saflaştırılan fajlar, üzerlerine % 15-20 gliserol eklenip karıştırıldıktan sonra -18°C'de muhafaza edilmiştir.

#### **3.2.2. Fajların Cinsler ve Türler Arası Konakçı Özgüllüklerinin ve Aktivitelerinin Belirlenmesi**

İzolasyon, saflaştırma ve zenginleştirme aşamaları tamamlanan fajlar, çalışmada kullanılan bakterilerin tümü ile karşılaştırılmış ve bu bakteriler üzerinde kendi homolog konakçıları dışında litik aktivite gösterip göstermedikleri spot test ile araştırılmıştır [209]. Bunun için yine çift tabaka agar yöntemi uygulanmış olup; 300 µL bakteri 3 mL yumuşak agara eklenerek önceden dökülmüş olan agar üstüne yayılmış ve agar kuruduktan sonra belirlenen bölgelere her bir fajdan 10'ar µL damlatılmıştır. 37°C'de 18-24 saat inkübasyon sonucunda damlatma yapılan bölgelerdeki lizis oluşumu gözlenerek izole edilen fajların çalışılan diğer bakteriler üzerindeki litik aktivite gösterip göstermediği belirlenmiştir.

#### **3.2.3. Fajların Mikroenkapsülasyonu ve Mikroenkapsülasyon Etkinliğinin Saptanması**

##### **3.2.3.1. Fajların Mikroenkapsülasyonu**

Fajların mikroenkapsülasyonu için öncelikle ilgili faj, yüksek hacimde hazırlanmıştır. Fajların zenginleştirilmesi bölümünde anlatılan prosedür kullanılarak yüksek hacim ve titrede fajlar hazırlanmıştır. Mikroenkapsülasyon için zenginleştirme yapılmadan önce, stokta bulunan fajlar kullanılarak her birinden 2'şer mL faj süpernatantı hazırlanmıştır. Daha sonra 500 µL faj ile 8 mL 4 saatlik konakçı kültür karşılaştırılmış ve adsorpsiyonun gerçekleşebilmesi için oda sıcaklığında 15-20 dakika beklenmiş ve ardından bu karışım 100 mL'lik steril besiyerine eklenerek 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında bakteri artıklarını uzaklaştırmak

amacıyla 13000 rpm/dk'lık santrifüj işlemi 4°C'de 10 dakika boyunca uygulanmıştır. Elde edilen süpernatantlara, konakçıya ait DNA ve RNA genomik materyallerinin parçalanması için DNase ve RNase eklenmiştir [210]. 37°C'de 1 saat süreyle beklenerek genomik materyallerin parçalanması sağlanmıştır. Daha sonra faj süpernatantları sırasıyla 0,45 µm ve 0,22 µm por çapına sahip filtrelerden (Sartorius, Göttingen, Almanya) geçirilmiştir. Böylece bakteri ve bakteri artıkları ortamdaki tamamen uzaklaştırılmıştır.

Mikroenkapsülasyonun gerçekleşeceği biyopolimer matriks olarak sodyum aljinat çözeltisi kullanılmış olup bu çözelti % 2'lik ve % 3'lük (w/v) olarak, distile suda sabit karıştırma hızıyla hazırlanmıştır [211], [212]. Ayrıca alternatif matriks olarak da yine distile suda hazırlanmış %25'lik (w/v) yağsız süt tozu çözeltisi kullanılmıştır [213]. Mikroenkapsülasyon öncesi faj filtratı ile aljinat veya süt tozu çözeltisi, sabit karıştırma hızında 1:2 (v/v) oranında 20-30 dakika karıştırılmıştır. Mikroenkapsülasyon işlemi iki-akışkan nozzle (0,7 mm) ile birleştirilmiş Buchi Mini Spray Dryer B-290 (BÜCHI Labortechnik AG, İsviçre) ile basınçlı kuru havanın hızı 473 L/h olacak şekilde, çeşitli proses parametreleri denenerek gerçekleştirilmiştir. Proses parametrelerinin optimizasyonu için *E. coli* ve *S. aureus* fajları kullanılmıştır (Çizelge 3.2.).

**Çizelge 3.2.** Fajların mikroenkapsülasyonu için denenen örnek karışımları ve proses parametreleri

| DENEME NO | ÖRNEK ÖZELLİKLERİ       |                |                         | PÜSKÜRTMELİ KURUTUCU PARAMETRELERİ |               |                |                 |
|-----------|-------------------------|----------------|-------------------------|------------------------------------|---------------|----------------|-----------------|
|           | FAJ                     | MATRIKS        | FAJ:MATRIKS ORANI (v/v) | Giriş S.(°C)                       | Çıkış S. (°C) | Aspirasyon (%) | Besleme (mL/dk) |
| 1         | <i>E. coli</i> tp3      | % 2 aljinat    | 1:2                     | 90                                 | 45            | 60             | 2,4             |
| 2         | <i>E. coli</i> tp3      | % 2 aljinat    | 1:2                     | 110                                | 49            | 75             | 3,0             |
| 3         | <i>S. aureus</i> İÇ tp2 | % 2 aljinat    | 1:2                     | 90                                 | 45            | 60             | 2,4             |
| 4         | <i>S. aureus</i> İÇ tp2 | % 25 skim milk | 1:2                     | 80                                 | 40            | 80             | 2,4             |

Fajların mikroenkapsülasyonunda, faj kaybını en aza indirebilmek amacıyla mümkün olduğunca düşük çıkış sıcaklıkları elde edecek şekilde çalışılmıştır [214].

### **3.2.3.2. Mikroenkapsülasyon Etkinliğinin Saptanması**

Mikroenkapsüle edilmiş fajların titreleri belirlenirken, Ma ve arkadaşlarının (2008) önermiş olduğu yöntem baz alınmıştır. Bunun için toz formda olan mikroenkapsüle fajlar, SM tamponuna (% 0,1 jelatin [w/v], 100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) eklendikten sonra 37°C'de 15 dakika kadar inkübe edilmiştir. Çözünmüş faji içeren karışımlara bu çözeltilerden eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika süreyle sabit hızda karıştırılmıştır. Serbest hale geçen fajların titreleri, daha önce anlatıldığı gibi çift tabaka agar yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

### **3.2.4. Fenolik Ekstraksiyonu ve Toplam Fenolik Madde ve Kuru Madde Miktarının Belirlenmesi**

#### **3.2.4.1. Fenoliklerin Ekstraksiyonu**

Fenolik ekstraksiyonlarının gerçekleştirilmesinde ilk aşama kurutma ve öğütme aşaması olmuştur. Nar örneklerinin meyve kısımları ayrıldıktan sonra kabukları liyofilizatörde dondurularak kurutulmuş ve öğütücüde öğütülmüştür. Taze üzüm çekirdekleri ise ayıklandıktan sonra 2 gün boyunca 45°C'de etüvde kurutulmaya bırakılmış ve ardından öğütücüden geçirilmiştir. Ayvaların çekirdekleri çıkarıldıktan sonra, kabuklarıyla birlikte küçük parçalara ayrılıp liyofilizatörde dondurularak kurutulmuş ve daha sonra öğütülmüştür. Çörek otu (NS) örnekleri proje ortağından öğütülmüş formda temin edilmiştir.

Ekstraksiyon işlemi için öğütülen üzüm çekirdeklerine 1:10 (w/v) oranında %50 (v/v) etanol:su eklenerek karışım homojen hale getirilmiş ve ardından oda sıcaklığında 1 saat boyunca 200 rpm'de karıştırılarak fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu karışım kaba filtre kâğıdından süzülerek elde edilen süzüntü birinci ekstrakt olarak alınmış, kalan pelletin üzerine tekrar aynı oranda çözücü eklenerek ekstraksiyona 1 saat daha devam edilmiştir. 1 saat sonunda karışım tekrar filtre kâğıdından süzülerek elde edilen süzüntü 1. ekstrakt ile karıştırılmış ve bu karışım rotary evaporatörde yoğunlaştırılmıştır. Elde edilen ekstrakt, oksidasyonu engellemek amacıyla azot gazıyla muamele edilerek -18°C'de dondurularak saklanmıştır.

Aynı şekilde nar kabukları ve ayva da 1:10 (w/v) oranında % 50 (v/v) etanol:su çözeltisi eklenerek homojen hale getirilmiş ve homojen karışım oda sıcaklığında nar

kabukları için 4, ayva içinse 1 saat boyunca 200 rpm'de karıştırılarak fenolik bileşenlerin ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sonrasında karışımlar kaba filtre kağıdından süzülerek elde edilen süzüntü rotary evaporatörde yoğunlaştırıldıktan sonra azot gazıyla muamele edilerek -18°C'de dondurulup saklanmıştır [215].

Öğütülmüş halde temin edilen örneklerden olan çörek otunun ekstraksiyonu için, örneklere 1:10 (w/v) oranında % 70 (v/v) aseton:su eklenerek karışım homojen hale getirilmiş ve ardından oda sıcaklığında yarım saat boyunca 200 rpm'de karıştırılarak fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstrakt rotary evaporatörde yoğunlaştırıldıktan sonra karışım kaba filtre kâğıdından süzülerek elde edilen süzüntü 1000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Alınan süpernatant daha sonra 0,45 µm por çapına sahip filtrelerden geçirilerek steril falkon tüplerine alınmış ve -18°C'de muhafaza edilmiştir.

#### **3.2.4.2. Toplam Fenolik Madde Tayini**

Elde edilen ekstraktlarda toplam fenolik madde miktarı Yu vd. (2002) tarafından önerilen yöntem baz alınarak, spektrofotometrik olarak belirlenmiştir [216]. % 35 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi hazırlanmış ve bir gece karanlıkta bekletilmiştir. Örnek ekstraktlarından 100'er µL alınarak üzerine 8,4 mL saf su ve 500 µL Folin–Ciocalteu çözeltisi ilave edilmiştir. 3 dakika beklendikten sonra % 35'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisinden 1 mL ilave edilerek vorteksle karıştırılmıştır. Karışım 1 saat boyunca karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda çözeltilerin absorpsiyon değerleri 760 nm dalga boyunda Agilent 8453 UV–Visible spektrofotometre (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) ile ölçülmüştür. Standart çözelti için 200-1000 ppm arasında hazırlanan gallik asit çözeltileri kullanılmıştır. Örneklerin toplam fenolik madde miktarı standartlardan elde edilen kalibrasyon grafiği yardımıyla hesaplanarak sonuçlar mg gallik asit/l olarak verilmiştir.

#### **3.2.5. Fenoliklerde Antimikrobiyal Aktivite Tayini**

Ekstrakte edilen fenolik maddelerin antimikrobiyal aktivitesi tayin edilirken, agar üzerine farklı miktarlarda (20-30 µL) ekstrakt damlatılarak agara emdirilmiştir. Sonra 4 mL olarak hazırlanan yumuşak agarlara her bir konakçının 4 saatlik kültüründen

150'şer µL eklenerek, polifenollerin emdirilmiş olduğu agarın üzerine homojen bir şekilde yayılıp kurumaya bırakılmıştır. Petriler 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonrasında ekstraktların damlatıldığı bölgelerde oluşan inhibisyon zonları değerlendirilerek antimikrobiyal aktivite tayin edilmiştir [217].

Antimikrobiyal aktivitesi olduğu saptanan ekstraktların en yoğun çalışılan bakteriler üzerindeki etkisini daha net bir şekilde ortaya koyabilmek için, MIC ve MBC değerleri belirlenmiştir. Bu değerlerin belirlenmesinde mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır [218]. Test edilecek olan fenolikler hazırlanmış ve bunu takiben sıvı besiyerinde iki kat azalan seyreltmeleri yapılmıştır. Orijinal konsantrasyon "d" olarak adlandırılmıştır. Mikroorganizmaların 4 saatlik kültürlerinden, son hacimdeki bakteri sayısı hepsinde aynı olacak şekilde ELISA plate kuyucuklarına dağıtılmıştır. Fenoliklerin de d'den d/32'ye kadar farklı dilüsyonları bu kuyucuklara eşit miktarlarda eklenmiştir. Ayrıca 4 saatlik kültürlerden, fenolik madde içermeyen, üremenin göstergesi olan kontrol kuyucuğuna da eklenmiştir. Her bir bakteri için sadece sıvı besiyeri ve sadece fenolik eklenmiş kuyucuklar, kontaminasyonu kontrol edebilmek amacıyla hazırlanmıştır. Her bir deneme 3 paralel şeklinde yapılmıştır. Mikroplateler 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra bakteri üremesini gösteren bulanıklık yönünden incelenmiştir. Bakterilerin üremesini önleyen, gözle görünür bir bulanıklığın olmadığı en düşük fenolik konsantrasyonu, MIC (Minimum Inhibitory Concentration) olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. Yalnız bu noktada, fenolik maddelerin filtre edilmiş olmasına rağmen, besiyeri ile bir araya geldiğinde bulanıklık ve çökme oluşması, gözle gözlemlenen sonuçların güvenilir olmadığını düşündürmüştü, bu yüzden tüm kuyucuklardan alınan örneklerin, uygun dilüsyonları hazırlanarak yüzeye yayma yöntemiyle ekim yapılmış, ekim sonuçlarından yapılan sayımlarla her bir fenolik konsantrasyonundaki canlı bakteri sayısı belirlenmiştir. Üremenin 4-5 log düşüş gösterdiği konsantrasyonlar MBC (Minimum Bactericidal Concentration) olarak değerlendirilmiş, MIC değerlerine ise, hem bu sayım sonuçları hem de yapılan görsel incelemeler sonucunda karar verilmiştir.

### 3.2.6. Fenoliklerin Mikroenkapsülasyonu

Çeşitli bitkisel kaynaklardan elde edilen ekstraktların mikroenkapsülasyonunda biyopolimer matris olarak distile suda sabit karıştırma hızıyla hazırlanmış % 2'lik (w/v) aljinat çözeltisi, ayrıca buna alternatif olarak da yine distile suda hazırlanmış % 25'lik (w/v) yağsız süt tozu çözeltisi kullanılmıştır. Ekstraktlar ile aljinat ve süt tozu çözeltileri, sabit karıştırma hızında 1:2 (v/v) oranında karıştırılmıştır [211], [213]. Mikroenkapsülasyon işlemi iki-akışkan nozzle (0,7 mm) ile birleştirilmiş Buchi Mini Spray Dryer B-290 (BÜCHI Labortechnik AG, İsviçre) ile 473 l/h basınçlı kuru hava akışında çeşitli proses parametreleri denenerek gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.3.).

**Çizelge 3.3.** Ekstraktların mikroenkapsülasyonu için denenen örnek karışımları ve proses parametreleri

| DENEYE<br>NO | ÖRNEK ÖZELLİKLERİ |                   |                    | PÜSKÜRTMELİ KURUTUCU<br>PARAMETRELERİ |                 |                   |                    |
|--------------|-------------------|-------------------|--------------------|---------------------------------------|-----------------|-------------------|--------------------|
|              | EKSTRAKT          | MATRİKS           | E:M<br>ORANI (v/v) | Giriş<br>S. (°C)                      | Çıkış<br>S.(°C) | Aspirasyon<br>(%) | Besleme<br>(mL/dk) |
| 1            | Nar kabuğu        | % 2 aljinat       | 1:2                | 90                                    | 45              | 70                | 2,4                |
| 2            | Nar kabuğu        | % 3 aljinat       | 1:2                | 90                                    | 45              | 70                | 2,4                |
| 3            | Nar kabuğu        | % 25 skim<br>milk | 1:2                | 80                                    | 40              | 70                | 2,4                |
| 4            | Üzüm<br>çekirdeği | % 2 aljinat       | 1:2                | 90                                    | 45              | 75                | 2,4                |
| 5            | Ayva              | % 2 aljinat       | 1:2                | 90                                    | 45              | 70                | 2,4                |

### 3.2.7. Fenoliklerin Mikroenkapsülasyon Etkinliğinin ve Mikroenkapsülasyon Sonrası Antimikrobiyal Aktivitenin Saptanması

Mikroenkapsülasyon etkinliği hesaplanırken Cilek vd. (2012) tarafından kullanılan yöntem temel alınmıştır [219]. Bunun için ilk önce mikrokapsüllerin yüzey fenolik içeriği belirlenmiştir. Bunun için mikroenkapsüle ekstraktlar, ekstraksiyonda kullanılan orandaki solventte çözülerek toplam fenolik içeriği bölümünde tarif edilen spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür. Mikroenkapsülasyon Etkinliği (ME), mikroenkapsüle fenolik içeriğin toplam fenolik içeriğe oranıdır. Mikroenkapsüle edilmiş fenolik içerik (MFI), toplam fenolik içeriğin (TFI) ve yüzey fenolik içeriğin (YFI) farkı alınarak belirlenir. Mikrokapsüllerin kapsülleme verimi aşağıdaki denklemde verildiği şekilde hesaplanmıştır:

$$ME (\%) = \frac{MFI}{TFI} \times 100 = \frac{TFI - YFI}{TFI} \times 100$$

Mikroenkapsüle edilerek toz haline getirilmiş ekstraktların mikroenkapsülasyon işlemi sonrasındaki antimikrobiyal aktivitesi belirlenirken, toz örnekler ilk önce SM tamponuna eklenerek 37°C'de bir süre bekletilmiş ve rehidrasyon sağlanmıştır. Daha sonra sıvı haldeki örnekler SM tamponu ile karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dakika boyunca bekletilmiştir [220]. Ardından bu karışımdan 30-40 µL kadar alınarak agar üzerine damlatılıp agara emdirilmiştir. Damlatılan örnekler agar tarafından emildikten sonra 3 mL yumuşak agara konakçının 4 saatlik kültüründen 300 µL eklenerek, agarın üzerine homojen bir şekilde yayılmış ve kurumaya bırakılmıştır. 37°C'de 18-24 saat süren inkübasyon sonrasında polifenollerin damlatıldığı bölgelerde oluşan inhibisyon zonları değerlendirilerek antimikrobiyal aktivite tayin edilmiştir.

### **3.2.8. Fajlar ile Fenolikler Arasındaki Etkileşimlerin İncelenmesi**

#### **3.2.8.1. Fenoliklerin Fajların Plak Büyüklüğü Üzerine Etkisi**

Fenolik maddelerin faj aktivitesi üzerindeki etkisi, Comeau vd. tarafından önerilen yöntem baz alınarak belirlenmiştir [109]. Bunun için ekstraktların her birinden 20-30'ar µL agara damlatılmış ve ekstrakt agar tarafından tamamen emilene kadar beklenmiştir. Ardından, 150 µL konakçı bakteri ile  $10^3$ - $10^4$  pfu/mL titre olacak şekilde dilüsyonu yapılan fajlardan 100 µL, 4 mL yumuşak agara ilave edilip karıştırılarak ekstrakt damlatılan agarın üzerin homojen bir şekilde yayılmıştır. Agar kuruduktan sonra petriler 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi tamamlandığında, fenoliklerin agardaki difüzyon zonuna düşmüş olan faj plakları, hiçbir fenolik damlatılmamış bölgelerdeki faj plaklarıyla karşılaştırılmıştır.

#### **3.2.8.2. Faj-Fenolik Etkileşiminin Sıvı Ortamda İncelenmesi**

Fenolik maddelerin fajlar üzerindeki etkisinin sıvı ortamdaki kontrolü için çeşitli MOI (Multiplication of infection) değerlerindeki faj-bakteri karışımları farklı konsantrasyonlardaki ekstraktlar ile karşılaştırılmıştır. NS için, MOI değerleri 0,1, 1, 10 olarak ayarlanmış ve her bir MOI değeri için, NS'nin d/4 ve d/8 konsantrasyonları denenmiştir. İlgili MOI ve konsantrasyon değerlerine göre hazırlanan karışımlar 37°C'de yaklaşık 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında numuneler 6000

rpm/dk'da 6 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve süpernatantlar steril Eppendorf tüplerine alınmıştır. Bu süpernatantların steril FTS ile dilüsyonları hazırlanmış ve faj titreleri çift tabaka agar yöntemi ile belirlenmiştir. Bakteri sayısının belirlenmesi için ise, santrifüjden sonra tüp içerisinde kalan pelet, son hacim aynı olacak şekilde steril besiyerinde çözdürülmüş ve seyreltmeler steril FTS kullanılarak hazırlanmıştır. Bakteri sayısının belirlenmesinde yüzeye yayma yöntemi kullanılmış olup, uygun dilüsyonlardan alınan 100'er µL örnek agar yüzeyine aktarılmış ve drigalski özesi yardımıyla örneğin tüm agar yüzeyine homojen bir şekilde yayılması sağlanmıştır. 37°C'de yaklaşık 24 saat süren inkübasyon sonucunda bakteri kolonileri sayılarak bakteri sayısı cfu/mL (colony forming unit, koloni oluşturan birim) olarak verilmiştir. Nar kabukları için, MOI değerleri 0,01, 0,1, 1 olarak ayarlanmış ve her MOI değeri için ekstraktın d/16 ve d/32 konsantrasyonları yukarıda tarif edilen yöntem kullanılarak denenmiştir. Üzüm çekirdeği içinse MOI 0,01, 0,1 ve 1 olarak ayarlanmış ve her MOI değeri için ekstraktın d/8 ile d/16 konsantrasyonları kullanılarak, aynı işlem basamaklarıyla denemeler gerçekleştirilmiştir.

Sıvı ortam denemelerindeki sonuçlar göz önünde bulundurularak, seçilen bazı fenolikler fajlarla karıştırılarak fajların gelişme eğrileri çıkarılmıştır. Bu eğriler, Reyes-Gavilan vd. (1990) ile Suarez vd. (2002) tarafından önerilen yöntem kullanılarak elde edilmiştir [221], [222]. Bunun için, MOI değeri 0,1 ve NS'nin nihai konsantrasyonu d/4 ve d/8 olacak şekilde faj-bakteri-NS karışımları hazırlanmış ve bu karışımlar 37°C'de 120 dakikayla inkübe edilerek standart faj gelişme eğrisi çıkarma aşamaları uygulanmıştır. Karışıma uygun miktarda konakçı bakteri, faj ve NS eklenerek adsorpsiyonun gerçekleşmesi için oda sıcaklığında 20 dakika boyunca beklenmiştir. Adsorbe olmayan fajların 12500 rpm/dk'da 4 dakika süreyle santrifüj işlemi ile ayrılması sonrasında, tüpte kalan pellet 10 mL CASO sıvı ortam içinde çözüldürülerek 37°C'de inkübasyon başlatılmıştır. Sıfırdan başlayarak, 30 dakikaya kadar her 5 dakikada bir ve daha sonra ise 20-30 dakikada bir karışımlardan örnek alınmış ve yine 12500 rpm/dk'da 4 dakika süreyle santrifüj edilerek süpernatantta bulunan faj sayısı, çift tabaka agar yöntemi ile belirlenmiştir.

### **3.2.9. Faj-Fenolik Karışımlarının Mikroenkapsülasyonu**

Faj-fenolik etkileşimlerinin incelenmesinin ardından, pozitif etki görülen ikililerin bir arada mikroenkapsüle edilmesi basamağına geçilmiştir. Bunun için seçilen fajlar yüksek hacimde daha önce anlatıldığı şekilde çoğaltılarak bakteriden arındırılmıştır. Mikroenkapsülasyon işlemi için seçilen ekstraktın son konsantrasyonu maksimum etkinin görüldüğü konsantrasyon olacak şekilde 50 mL'lik örnek faj/fenolik oranı 1/1 olacak şekilde hazırlanmış ve 100 mL % 2'lik aljinat çözeltisi ile karıştırılarak Buchi Mini Spray Dryer B-290 (BÜCHI Labortechnik AG, İsviçre) ile daha önceki parametreler kullanılarak mikroenkapsüle edilmiştir.

### **3.2.10. Mikroenkapsüle Faj ve Fenoliklerin Mide Ortamı Denemeleri**

Mikroenkapsüle edilmiş fajların mide ortamındaki stabilitelerini kontrol etmek amacıyla, Ma ve arkadaşları tarafından önerilmiş olan yöntem kullanılmıştır. Buna göre, gastrik koşullar simüle edilerek model bir mide ortamı oluşturulmuştur. Model mide ortamı % 0,2 (w/v) NaCl ve 3,2 mg/mL pepsin içerecek ve pH:2,4 olacak şekilde hazırlanarak deney tüplerine bu sıvıdan 10'ar mL dağıtılmıştır. Mikroenkapsüle edilmiş toz formdaki fajların her birinden 160 mg tartılarak önceden 37°C'de bekletilmiş model sıvılara eklenmiş ve örnekler 37°C'de 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 0, 15, 30, 60 ve 90. dakikalarında bu karışımdan 500'er µL örnek alınmış ve 1:1 oranında SM tamponu ile karıştırılarak inkübasyon sonlandırılmıştır. Elde edilen son örneklerdeki fajların titreleri çift tabaka agar yöntemi ile belirlenmiştir.

Mikroenkapsüle edilmiş fenoliklerin mide ortamındaki stabilitelerini kontrol etmek amacıyla benzer bir yöntem kullanılmış olup, fajlar için hazırlanmış olan model ortamla aynı formülasyonda mide ortamı oluşturulmuştur. Toz haldeki mikroenkapsüle fenolik ekstraktları mide ortamına eklerek 37°C'de 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında alınan örnekler 1:1 oranında SM tamponu ile karıştırılarak anitimikrobiyal aktiviteleri 3.2.5. numaralı bölümde anlatılan yöntem kullanılarak belirlenmiştir [185], [223].

### **3.2.11. Mikroenkapsüle Faj ve Fenoliklerin Safra Tuzu Ortamı Denemeleri**

Mikroenkapsüle edilmiş faj, fenolik ve faj-fenolik karışımlarının safra tuzu varlığındaki stabilitelerini kontrol etmek amacıyla yapılan denemelerde, Ma ve arkadaşları (2008) tarafından önerilmiş olan yöntem kullanılmıştır [185]. Bunun için, toz formdaki mikroenkapsüle örneklerden 160'ar mg tartılarak, önceden 37°C'de bekletilmiş % 2 (w/v) domuz safra özütü içeren test tüplerine ilave edilmiştir. Bu karışımlar 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun birinci ve üçüncü saatlerinde bu karışımlardan örnekler alınarak SM tamponu ile karıştırılmıştır. Fajın titresini çift tabaka agar yöntemiyle saptanmıştır.

Mikroenkapsüle edilmiş fenoliklerin safra tuzu ortamında stabilitelerini kontrol etmek amacıyla mikrokapsüller % 2 domuz safra özütü içeren ortama eklenerek 37°C'de 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında alınan örnekler 1:1 oranında SM tamponu ile karıştırılarak anitimikrobiyal aktiviteleri 3.2.5. numaralı bölümde anlatılan şekilde belirlenmiştir [185], [223].

## 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Fajların İzolasyonu

Faj izolasyonunda ilk olarak George Eliava Enstitüsü (Tiflis, Gürcistan) tarafından hazırlanmış olan ticari faj miksleri kullanılmıştır. Bu mikslerin herbirinin içeriğindeki fajların etkili olduğu cins ve türler göz önünde bulundurularak mikslere çeşitli konakçı bakterilerle karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırmalar Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Konakçı bakteriler ile karşılaştırılan faj miksleri

| BAKTERİ                    | FAJ MİKSİ    |
|----------------------------|--------------|
| <i>L. monocytogenes</i> İÇ | 3, 6         |
| <i>L. monocytogenes</i>    | 3, 6         |
| <i>E. coli</i> O157:H7 İÇ  | 3, 5, 6      |
| <i>E. coli</i>             | 3, 5, 6      |
| <i>S. pyogenes</i>         | 1A, 3, 6     |
| <i>S. aureus</i> İÇ        | 3, 4A, 4B, 6 |
| <i>S. aureus</i>           | 3, 6         |
| <i>P. aeruginosa</i>       | 3, 6         |
| <i>Salmonella</i>          | 3, 6         |
| <i>S. Typhimurium</i> İÇ   | 3, 6         |

Bakteri-faj karışımlarının inkübasyonu tamamlandıktan sonra, karışımlardaki bakteri üremesine işaret eden bulanıklık gözlemlenmiştir. Üremenin daha az olduğu karışımlar için, kullanılan konakçı miktarı artırılarak zenginleştirmeye gidilmiştir. Bulanıklığın fazla olduğu karışımlarda ise bakteri miktarı sabit tutularak denemelere devam edilmiştir. Deneme sonuçlarında fajların etkinliği, ilgili bakteriler üzerinde çift tabaka agar yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Karşılaştırmalardan elde edilen ilk sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Konakçı bakteriler ile karşılaştırılan faj mikslерinden elde edilen ilk sonuçlar

| BAKTERİ                    | FAJ MİKSİ | SONUÇ |
|----------------------------|-----------|-------|
| <i>L. monocytogenes</i> İÇ | 3         | -     |
|                            | 6         | -     |
| <i>L. monocytogenes</i>    | 3         | -     |
|                            | 6         | -     |
| <i>E. coli</i> O157:H7 İÇ  | 3         | +     |
|                            | 6         | +     |
|                            | 5         | +     |
| <i>E. coli</i>             | 3         | +     |
|                            | 6         | +     |
|                            | 6         | +     |
| <i>S. pyogenes</i>         | 1         | -     |
|                            | 3         | +     |
|                            | 6         | -     |

|                          |    |   |
|--------------------------|----|---|
| <b>S. aureus İÇ</b>      | 3  | + |
|                          | 6  | + |
| <b>S. aureus</b>         | 3  | + |
|                          | 4A | + |
|                          | 4A | - |
|                          | 6  | + |
| <b>P. aeruginosa</b>     | 3  | - |
|                          | 6  | - |
| <b>Salmonella</b>        | 3  | + |
|                          | 6  | + |
| <b>S. Typhimurium İÇ</b> | 3  | + |
|                          | 6  | + |

“+”: Faj/fajların bakteri üzerinde litik etkisi vardır.

“-” : Faj/fajların bakteri üzerinde litik etkisi yoktur.

Denenen bakteri-faj karışımları içinde *Salmonella*, *S. Typhimurium İÇ*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7 İÇ, *S. aureus* ve *S. aureus İÇ*'ye etkili fajlar olduğu tespit edilmiş, ve bu örneklerden tek plak izolasyonuna gidilerek saflaştırma ve zenginleştirme yapılabilmektedir. Aynı denemelerde *S. pyogenes* ve *P. aeruginosa* üzerinde etki gösteren mikslar de bulunmasına rağmen, devam eden zenginleştirmeler sonucu üremeye bağlı bulanıklıkta bir azalma görülmemiştir. Sonuç olarak bu konakçı kültürlerin söz konusu fajlara karşı dirençli oldukları tespit edilmiş, dolayısıyla ticari faj mikslarından bu bakterilere özgül faj ya da fajlar izole edilememiştir.

Daha sonra Prof. Dr. Sami FATTAOUCH'tan temin edilen 3 adet bakteri ve bu bakteriler ile izole edilmiş 6 adet fajla çalışmalar yapılmıştır. Bu fajların tek plak izolasyonu aşamasına geçmemiş olduğu belirtildiğinden öncelikle fajlar, plakları tek tek düşecek şekilde dilüsyonları hazırlanarak çift tabaka agar yöntemiyle yayılmıştır. Plak morfolojileri dikkate alınarak toplam 23 adet faj seçilmiş, birinci ve ikinci tek plak izolasyonlarının tamamlanmasından sonra stoğa alınarak çalışmalara dahil edilmişlerdir.

Tez kapsamında ayrıca çevre göller ile kanalizasyondan su örnekleri toplanarak faj izolasyon çalışmalarına devam edilmiştir. Bu aşamada mümkün olduğunca öncekinden farklı konakçılarla çalışılmış ve farklı bakterilere etkili fajların izolasyonu amaçlanmıştır.

Farklı kaynaklardan alınan örnekler ile hedef bakterilerin ilk karşılaştırmalarına ait sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Farklı kaynaklardan alınan örnekler ile çeşitli hedef konakçılar arasında yapılan karşılaştırmaların sonuçları

| BAKTERİLER                 | ÖRNEKLER |        |                   |
|----------------------------|----------|--------|-------------------|
|                            | Göl B1   | Göl B2 | Kanalizasyon Suyu |
| <i>E. coli</i> K12         | -        | -      | -                 |
| <i>E. coli</i> TP          | -        | -      | -                 |
| <i>E. coli</i> O157:H7 İÇ  | -        | -      | -                 |
| <i>L. monocytogenes</i>    | -        | -      | +                 |
| <i>L. monocytogenes</i> İÇ | -        | -      | -                 |
| <i>S. aureus</i>           | -        | -      | -                 |
| <i>S. aureus</i> İÇ        | -        | -      | -                 |
| <i>S. Typhimurium</i> İÇ   | +        | -      | +                 |
| <i>S. Typhimurium</i>      | +        | +      | +                 |
| <i>S. Enteritidis</i>      | +        | +      | +                 |
| <i>Salmonella</i> TP       | -        | -      | +                 |
| <i>Bacillus subtilis</i>   | -        | -      | -                 |
| <i>S. pyogenes</i>         | -        | -      | -                 |
| <i>M. luteus</i>           | -        | -      | -                 |

“+”: Faj/fajların bakteri üzerinde litik etkisi vardır.

“-”: Faj/fajların bakteri üzerinde litik etkisi yoktur.

Bu çalışmalar sonucunda faj varlığı kesin olarak saptanan örneklerde tek plak izolasyonuna gidilmiştir. İzolasyonun ardından saflaştırma ve zenginleştirme ile titre yükseltme aşamalarına geçilmiştir. Tez kapsamında tüm izolasyon, saflaştırma ve zenginleştirme aşamaları tamamlanan fajlar Çizelge 4.4’te sıralanmıştır.

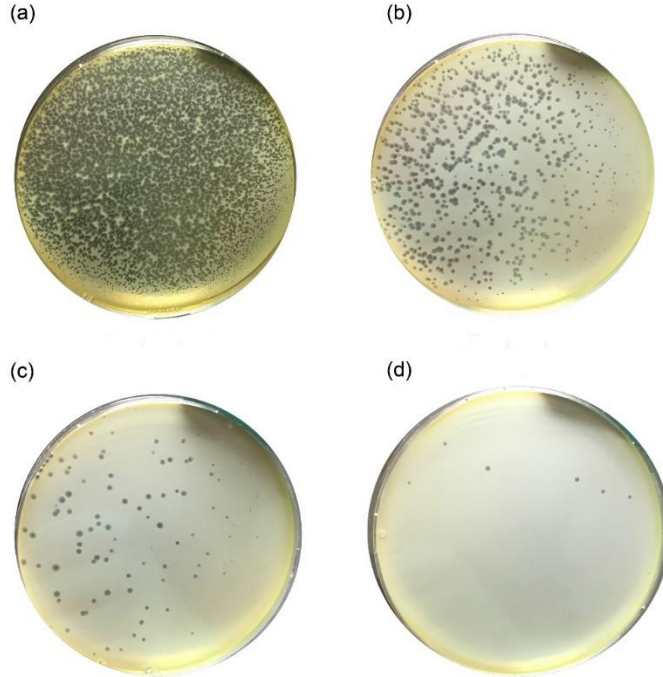
**Çizelge 4.4.** Tez çalışması kapsamında izole edilerek saflaştırılan fajların tam listesi

| BAKTERİLER                | FAJLAR                        |
|---------------------------|-------------------------------|
| <i>E. coli</i>            | <i>E. coli</i> tp1            |
|                           | <i>E. coli</i> tp2            |
|                           | <i>E. coli</i> tp3            |
| <i>E. coli</i> O157:H7 İÇ | <i>E. coli</i> O157:H7 İÇ tp1 |
|                           | <i>E. coli</i> O157:H7 İÇ tp2 |
|                           | <i>E. coli</i> O157:H7 İÇ tp3 |
|                           | <i>E. coli</i> O157:H7 İÇ tp4 |
|                           | <i>E. coli</i> O157:H7 İÇ tp5 |
|                           | <i>E. coli</i> O157:H7 İÇ tp6 |
| <i>Salmonella</i>         | <i>Salmonella</i> tp1         |
|                           | <i>Salmonella</i> tp2         |
|                           | <i>Salmonella</i> tp3         |
| <i>S. Typhimurium</i> İÇ  | <i>S. Typhimurium</i> İÇ tp1  |
|                           | <i>S. Typhimurium</i> İÇ tp2  |
| <i>S. aureus</i> İÇ       | <i>S. aureus</i> İÇ tp1       |
|                           | <i>S. aureus</i> İÇ tp2       |
|                           | <i>S. aureus</i> İÇ tp3       |
|                           | <i>S. aureus</i> İÇ tp4       |
| <i>S. aureus</i> 4a1      | <i>S. aureus</i> 4a1 tp1      |
|                           | <i>S. aureus</i> 4a1 tp2      |

|  |  |
|--|--|
|  | <i>S. aureus</i> 4a1 tp3                 |
|  | <i>S. aureus</i> 4a1 tp4                 |
|  | <i>S. aureus</i> 4a2 tp1                 |
| <b>S. aureus 4a2</b>                             | <i>S. aureus</i> 4a2 tp2                 |
|  | <i>S. aureus</i> 4a2 tp3                 |
|  | <i>S. aureus</i> 4a2 tp4                 |
|  | <i>S. Enteritidis</i> F5 tp1             |
| <b>S. Enteritidis (F5)</b>                       | <i>S. Enteritidis</i> F5 tp2             |
|  | <i>S. Enteritidis</i> F5 tp3             |
|  | <i>S. Enteritidis</i> F5 tp4             |
|  | <i>S. Typhimurium</i> Tunus $\phi$ 5 tp1 |
|  | <i>S. Typhimurium</i> Tunus $\phi$ 5 tp2 |
| <b>S. Typhimurium Tunus (<math>\phi</math>5)</b> | <i>S. Typhimurium</i> Tunus $\phi$ 5 tp3 |
|  | <i>S. Typhimurium</i> Tunus $\phi$ 5 tp4 |
|  | <i>S. Typhimurium</i> Tunus $\phi$ 5 tp5 |
|  | <i>S. Typhimurium</i> Tunus F4 tp1       |
| <b>S. Typhimurium Tunus (F4)</b>                 | <i>S. Typhimurium</i> Tunus F4 tp2       |
|  | <i>B. subtilis</i> F11 tp1               |
| <b>B. subtilis (F11)</b>                         | <i>B. subtilis</i> F11 tp2               |
|  | <i>B. subtilis</i> F11 tp3               |
|  | <i>B. subtilis</i> F11 tp4               |
|  | <i>B. subtilis</i> F11 tp5               |
|  | <i>B. subtilis</i> $\phi$ 19 tp1         |
| <b>B. subtilis (<math>\phi</math>19)</b>         | <i>B. subtilis</i> $\phi$ 19 tp2         |
|  | <i>B. subtilis</i> $\phi$ 19 tp3         |
|  | <i>B. subtilis</i> $\phi$ 19 tp4         |
|  | <i>B. subtilis</i> $\phi$ 19 tp5         |
| <b>B. subtilis (F6 ile)</b>                      | <i>B. subtilis</i> F6 tp1                |
|  | <i>B. subtilis</i> F6 tp2                |
|  | <i>S. Typhimurium</i> Göl1 tp1           |
| <b>S. Typhimurium (Göl1)</b>                     | <i>S. Typhimurium</i> Göl1 tp2           |
|  | <i>S. Typhimurium</i> Göl1 tp3           |
|  | <i>S. Typhimurium</i> Göl2 tp1           |
| <b>S. Typhimurium (Göl2)</b>                     | <i>S. Typhimurium</i> Göl2 tp2           |
|  | <i>S. Typhimurium</i> Göl3 tp1           |
| <b>S. Typhimurium (Göl3)</b>                     | <i>S. Typhimurium</i> Göl3 tp2           |
|  | <i>S. Typhimurium</i> Göl4 tp1           |
| <b>S. Typhimurium (Göl4)</b>                     | <i>S. Typhimurium</i> İÇ B1 tp1          |
| <b>S. Typhimurium İÇ (B1 )</b>                   | <i>S. Typhimurium</i> İÇ B1 tp2          |
|  | <i>S. Typhimurium</i> İÇ B2 tp1          |
| <b>S. Typhimurium İÇ (B2 )</b>                   | <i>S. Typhimurium</i> İÇ B2 tp2          |
|  | <i>S. Enteritidis</i> Göl1 tp1           |
| <b>S. Enteritidis (Göl1)</b>                     | <i>S. Enteritidis</i> Göl1 tp2           |
|  | <i>S. Enteritidis</i> Göl1 tp3           |
|  | <i>S. Enteritidis</i> Göl2 tp1           |
| <b>S. Enteritidis (Göl2)</b>                     | <i>S. Enteritidis</i> Göl2 tp2           |
|  | <i>S. Enteritidis</i> Göl2 tp3           |
|  | <i>S. Enteritidis</i> Göl2 tp4           |
| <b>S. Enteritidis (Göl3)</b>                     | <i>S. Enteritidis</i> Göl3 tp1           |

|   |                                |
|---|--------------------------------|
| <b>S. Enteritidis (Göl4)</b>                  | S. Enteritidis Göl3 tp2        |
|   | S. Enteritidis Göl4 tp1        |
|   | <i>Salmonella</i> AK tp1-1     |
|   | <i>Salmonella</i> AK tp1-2     |
|   | <i>Salmonella</i> AK tp1-3     |
| <b><i>Salmonella</i> (Kanalizasyon)</b>       | <i>Salmonella</i> AK tp2-1     |
|   | <i>Salmonella</i> AK tp2-2     |
|   | <i>Salmonella</i> AK tp3-1     |
|   | <i>Salmonella</i> AK tp3-2     |
| <b>S. Enteritidis (Kanalizasyon)</b>          | S. Enteritidis AK tp1          |
|   | S. Enteritidis AK tp2          |
|   | S. Enteritidis AK tp3          |
|   | S. Enteritidis AK tp4          |
| <b>S. Typhimurium (Kanalizasyon)</b>          | S. Typhimurium AK tp1          |
|   | S. Typhimurium AK tp2          |
|   | S. Typhimurium AK tp3          |
| <b><i>L. monocytogenes</i> (Kanalizasyon)</b> | <i>L. monocytogenes</i> AK tp1 |
|   | <i>L. monocytogenes</i> AK tp2 |

Tek plak izolasyonu sürecine örnek olarak, *E. coli* tp3 fajından hazırlanan dilüsyonlar Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Fajın  $10^{-5}$ 'e kadar dilüsyonları hazırlanmış ve her bir dilüsyon çift tabaka agar yöntemi kullanılarak agar yüzeyine yayılmıştır. Şekil incelendiğinde faj miktarının fazla olduğu  $10^{-2}$  dilüsyonundan yapılan ekimde üreyebilen bakteri miktarının çok az olduğu, diğer dilüsyonlarda ise faj miktarının giderek azaldığı faj plaklarının rahatlıkla sayılabildiği görülmektedir.



**Şekil 4.1.** *E. coli* tp3 fajının  $10^{-2}$  (a),  $10^{-3}$  (b),  $10^{-4}$  (c) ve  $10^{-5}$  (d) dilüsyonları

Tez çalışması kapsamında, içinde farklı suşlara etkili alt grupları da barındıran 9 adet *E. coli*, 12 adet *S. aureus*, 52 adet *Salmonella*, 12 adet *B. subtilis* ve 2 adet *L. monocytogenes* olmak üzere toplam 87 adet faj izole edilmiştir.

#### 4.2. Fajların Cinsler ve Türler Arası Konakçı Özgüllüklerinin ve Aktivitelerinin Belirlenmesi

Çizelge 4.4'te sıralanan fajlar izole edildikten sonra çalışılan bakteri tür ve cinslerinin bu fajlara olan duyarlılıklarını belirlemek amacıyla çift tabaka agar yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonuçları Çizelge 4.5'te verilmiştir.

**Çizelge 4.5.** İzole edilen fajların çalışılan tüm bakteriler üzerindeki litik etkileri

| FAJLAR                        | BAKTERİLER |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |
|-------------------------------|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|
|                               | 1          | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| <i>E. coli</i> tp1            | +          | + | + | - | - | - | - | - | - | +  | -  | -  | -  | -  |
| <i>E. coli</i> tp2            | +          | + | + | - | - | - | - | - | - | +  | -  | -  | -  | -  |
| <i>E. coli</i> tp3            | +          | + | + | - | - | - | - | - | - | +  | -  | -  | -  | -  |
| <i>E. coli</i> O157:H7 iç tp1 | +          | + | + | - | - | - | - | - | - | +  | -  | -  | -  | -  |
| <i>E. coli</i> O157:H7 iç tp2 | +          | + | + | - | - | - | - | - | - | +  | -  | -  | -  | -  |
| <i>E. coli</i> O157:H7 iç tp3 | +          | + | + | - | - | - | - | - | - | +  | -  | -  | -  | -  |
| <i>E. coli</i> O157:H7 iç tp4 | +          | + | + | - | - | - | - | - | - | +  | -  | -  | -  | -  |
| <i>E. coli</i> O157:H7 iç tp5 | +          | + | + | - | - | - | - | - | - | +  | -  | -  | -  | -  |
| <i>E. coli</i> O157:H7 iç tp6 | +          | + | + | - | - | - | - | - | - | +  | -  | -  | -  | -  |
| <i>Salmonella</i> tp1         | +          | - | - | + | + | - | - | + | - | +  | -  | +  | +  | +  |
| <i>Salmonella</i> tp2         | +          | - | + | + | + | - | - | + | - | +  | -  | +  | +  | +  |
| <i>Salmonella</i> tp3         | +          | - | + | + | + | - | - | + | - | +  | -  | +  | +  | +  |
| <i>S. typhimurium</i> tp1     | +          | - | - | + | + | - | - | + | - | +  | -  | +  | +  | +  |
| <i>S. typhimurium</i> tp2     | -          | - | - | + | + | - | - | + | - | +  | -  | +  | +  | +  |
| <i>S. aureus</i> iç tp1       | -          | - | - | - | - | + | + | - | - | +  | -  | -  | -  | -  |
| <i>S. aureus</i> iç tp2       | -          | - | - | - | - | + | + | - | - | +  | -  | -  | -  | -  |
| <i>S. aureus</i> iç tp3       | -          | - | - | - | - | + | + | - | - | +  | -  | -  | -  | -  |
| <i>S. aureus</i> iç tp4       | -          | - | - | - | - | + | + | - | - | +  | -  | -  | -  | -  |
| <i>S. aureus</i> 4a1 tp1      | -          | - | - | - | + | + | + | - | - | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>S. aureus</i> 4a1 tp2      | -          | - | - | - | - | + | + | - | - | -  | -  | +  | -  | -  |
| <i>S. aureus</i> 4a1 tp3      | -          | - | - | - | + | + | + | - | - | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>S. aureus</i> 4a1 tp4      | -          | - | - | - | - | + | + | - | - | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>S. aureus</i> 4a2 tp1      | -          | - | - | - | - | + | + | - | - | -  | -  | +  | -  | -  |

|                                  |   |     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |   |     |
|----------------------------------|---|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|---|-----|
| <i>S. aureus</i> 4a2 tp2         | - | -   | - | - | + | + | + | - | - | - | - | +   | - | -   |
| <i>S. aureus</i> 4a2 tp3         | - | -   | - | - | + | + | + | - | - | - | - | -   | - | -   |
| <i>S. aureus</i> 4a2 tp4         | - | -   | - | - | + | + | + | - | - | - | - | -   | - | -   |
| <i>S. Enteritidis</i> tp1        | - | -   | - | + | + | - | - | + | - | - | - | N/A | + | +   |
| <i>S. Enteritidis</i> tp2        | - | -   | - | + | + | - | - | + | - | - | - | N/A | + | +   |
| <i>S. Enteritidis</i> tp3        | - | -   | - | + | + | - | - | + | - | - | - | N/A | + | +   |
| <i>S. Enteritidis</i> tp4        | - | -   | - | + | + | - | - | + | - | - | - | N/A | + | +   |
| <i>S. TympTunus</i> $\phi$ 5 tp1 | - | -   | - | + | + | - | - | + | - | - | - | +   | + | +   |
| <i>S. TympTunus</i> $\phi$ 5 tp2 | - | -   | - | + | + | - | - | + | - | - | - | +   | + | +   |
| <i>S. TympTunus</i> $\phi$ 5 tp3 | - | -   | - | + | + | - | - | + | - | - | - | +   | + | +   |
| <i>S. TympTunus</i> $\phi$ 5 tp4 | - | -   | - | + | + | - | - | + | - | - | - | +   | + | +   |
| <i>S. TympTunus</i> $\phi$ 5 tp5 | - | -   | - | + | + | - | - | + | - | - | - | +   | + | +   |
| <i>S. TympTunus</i> F4 tp1       | - | -   | - | + | + | - | - | + | - | - | - | +   | + | +   |
| <i>S. TympTunus</i> F4 tp2       | - | -   | - | + | + | - | - | + | - | - | - | +   | + | +   |
| <i>B. subtilis</i> F11 tp1       | - | -   | - | + | + | - | - | - | - | - | - | +   | + | N/A |
| <i>B. subtilis</i> F11 tp2       | - | N/A | - | + | + | - | - | - | - | - | - | +   | + | N/A |
| <i>B. subtilis</i> F11 tp3       | - | -   | - | + | + | - | - | - | - | - | - | +   | + | N/A |
| <i>B. subtilis</i> F11 tp4       | - | -   | - | + | + | - | - | - | - | - | - | +   | + | N/A |
| <i>B. subtilis</i> F11 tp5       | - | N/A | - | + | + | - | - | - | - | - | - | +   | + | N/A |
| <i>B. subtilis</i> $\phi$ 19 tp1 | - | -   | - | + | + | - | - | - | - | - | - | +   | + | N/A |
| <i>B. subtilis</i> $\phi$ 19 tp2 | - | -   | - | + | + | - | - | - | - | - | - | +   | + | N/A |
| <i>B. subtilis</i> $\phi$ 19 tp3 | - | -   | - | + | + | - | - | - | - | - | - | +   | + | N/A |
| <i>B. subtilis</i> $\phi$ 19 tp4 | - | -   | - | + | + | - | - | - | - | - | - | +   | + | N/A |
| <i>B. subtilis</i> $\phi$ 19 tp5 | - | -   | - | + | + | - | - | - | - | - | - | +   | + | N/A |
| <i>S. Typhimurium</i> Göl1 tp1   | - | -   | - | + | + | - | - | - | - | - | - | -   | + | +   |
| <i>S. Typhimurium</i> Göl1 tp2   | - | -   | - | + | + | - | - | - | - | - | - | +   | + | +   |
| <i>S. Typhimurium</i> Göl1 tp3   | - | -   | - | + | + | - | - | - | - | - | - | +   | + | +   |
| <i>S. Typhimurium</i> Göl2 tp1   | - | -   | - | + | + | - | - | - | - | - | - | -   | + | +   |
| <i>S. Typhimurium</i> Göl2 tp2   | - | -   | - | + | + | - | - | - | - | - | - | +   | + | +   |
| <i>S. Typhimurium</i> Göl3 tp1   | - | -   | - | + | + | - | - | - | - | - | - | -   | + | +   |
| <i>S. Typhimurium</i> Göl3 tp2   | - | -   | - | + | + | - | - | - | - | - | - | -   | + | +   |
| <i>S. Typhimurium</i> Göl4 tp1   | - | -   | - | + | + | - | - | - | - | - | - | -   | + | +   |
| <i>S. Typhimurium</i> İÇ B1 tp1  | - | -   | - | + | + | - | - | - | - | - | - | -   | + | +   |
| <i>S. Typhimurium</i> İÇ B1 tp2  | - | -   | - | + | + | - | - | - | - | - | - | -   | + | +   |

|                                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| <b>S. Typhimurium İÇ B2 tp1</b> | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| <b>S. Typhimurium İÇ B2 tp2</b> | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| <b>S. Enteritidis Göl1 tp1</b>  | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| <b>S. Enteritidis Göl1 tp2</b>  | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <b>S. Enteritidis Göl1 tp3</b>  | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <b>S. Enteritidis Göl2 tp1</b>  | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| <b>S. Enteritidis Göl2 tp2</b>  | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <b>S. Enteritidis Göl2 tp3</b>  | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <b>S. Enteritidis Göl2 tp4</b>  | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| <b>S. Enteritidis Göl3 tp1</b>  | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| <b>S. Enteritidis Göl3 tp2</b>  | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| <b>S. Enteritidis Göl4 tp1</b>  | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| <b>Salmonella AK tp1-1</b>      | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <b>Salmonella AK tp1-2</b>      | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <b>Salmonella AK tp1-3</b>      | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <b>Salmonella AK tp2-1</b>      | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <b>Salmonella AK tp2-2</b>      | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <b>Salmonella AK tp3-1</b>      | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <b>Salmonella AK tp3-2</b>      | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <b>S. Enteritidis AK tp1</b>    | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <b>S. Enteritidis AK tp2</b>    | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <b>S. Enteritidis AK tp3</b>    | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <b>S. Enteritidis AK tp4</b>    | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <b>S. Typhimurium AK tp1</b>    | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <b>S. Typhimurium AK tp2</b>    | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <b>S. Typhimurium AK tp3</b>    | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| <b>L. monocytogenes AK tp1</b>  | - | - | - | + | + | - | - | + | + | - | - | - | - | + |
| <b>L. monocytogenes AK tp2</b>  | - | - | - | + | + | - | - | + | + | - | - | - | - | + |

“+”: Fajın bakteri üzerinde litik etkisi vardır.

“-” : Fajın bakteri üzerinde litik etkisi yoktur.

“N/A”: Belirgin sonuç saptanamamıştır.

Çizelgede her bir bakteri bir sayı ile kodlanmıştır: 1: *E. coli*, 2: *E. coli* K12, 3: *E.coli* O157:H7 İÇ, 4: *Salmonella*, 5: *S. Typhimurium* İÇ, 6: *S. aureus*, 7: *S. aureus* İÇ, 8: *L. monocytogenes*, 9: *L. monocytogenes* İÇ, 10: *S. pyogenes*, 11: *M. luteus* 12: *B. subtilis* 13: *S. Enteritidis* 14: *S. Typhimurium*

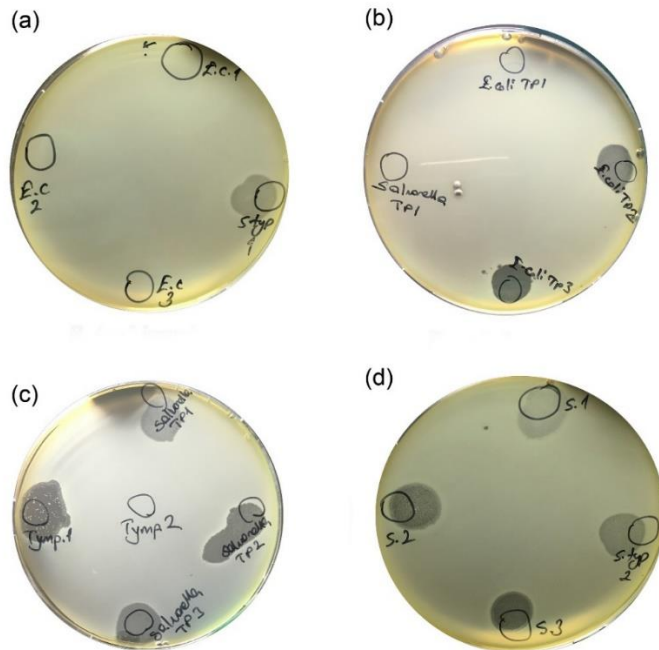
Karşılaştırma sonuçlarına göre, izole edilen tüm *E. coli* fajlarının, çalışmada kullanılan tüm *E. coli* suşlarına ve *S. pyogenes*'e etkili olduğu görülmektedir. İzolasyonları tamamlanan *Salmonella* ve *S. Typhimurium* fajlarının, kendi konakçılarının yanında *L. monocytogenes*'e de etkili oldukları gözlemlenmiştir. Fakat bu etkiye dair kesin sonuç vermek ancak bu bakterilerin 16S ribozomal DNA analizlerinin yapılmasıyla mümkün olacaktır. Benzer şekilde *S. aureus* İÇ fajlarının, kendi konakçıları haricinde *S. pyogenes*'i de lize edebildiği görülmüştür. *S. Typhimurium* tp1 *E. coli*'ye etkiliyken, *S. Typhimurium* tp2'nin etkili olmaması, bir faj miksi içinden birbirinden farklı iki fajın izole edildiğini doğrulamaktadır. Tüm bakteriler arasında, *S. pyogenes*'in izole edilen fajların tümüne duyarlı olabileceği düşünülmüştür. Ancak bunu kesin olarak söyleyebilmek için fajlar ile *S. pyogenes*'i sıvı ortamda karşılaştırıp faj titresinde artış olup olmadığının kontrol edilmesi gerekmektedir.

Daha sonraki aşamalarda izole edilen *S. Enteritidis* fajlarının kendi konakçıları dışında *Salmonella* tp, *L. monocytogenes* ve *S. Typhimurium*'a etkili olduğu, aynı şekilde *S. Typhimurium* fajlarının da *Salmonella* tp, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes* ve diğerlerinden farklı olarak *B. subtilis* üzerinde etki gösterdiği saptanmıştır. İzole edilen *B. subtilis* fajları ise, kendi konakçıları dışında çalışmada kullanılan *Salmonella* suşlarına da etki göstermektedirler. *B. subtilis* genel olarak laboratuvar çalışmalarında kullanılan test mikroorganizmasıdır. Metabolizması ve ürettiği pek çok enzim nedeniyle de oldukça popüler bir canlıdır [224], [225]. Toksik ve patojenik özellik taşımayanları tarafından üretilen enzimlerin gıdalarda kullanılmasına izin verilmektedir [226]. Bu açıdan bakıldığında bu bakterinin canlılığını sürdürmesi önemlidir. Ama toksik ve patojenik olanların yok edilmesi için faj terapi uygulanabilecektir. Ayrıca bu fajlar, homolog konakçıları *B. subtilis* olsa da, *Salmonella* enfeksiyonlarında kullanılabilirlerdir.

Bazı fajların, bakterilere cins bazında ve hatta tür bazında spesifik olabildiği bilinmektedir. Ancak bunun tam tersi olan durumların da söz konusu olduğu çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, geniş konakçı aralığına sahip fajlar incelenmiş olup, bu çalışma kapsamında *Sphaerotilus natans* ATCC 13338 suşundan izole edilen SN kodlu fajların 4 tanesinin *Pseudomonas aeruginosa* PAO303 ve *Pseudomonas aeruginosa* OT684 suşları üzerinde de etkili olduğu

saptanmıştır [227]. Comeau ve arkadaşlarının 2005 yılında yayınladıkları çalışmalarında ise *Vibrio* ile fajları arasındaki ilişki incelenmiş ve *Vibrio parahaemolyticus* üzerinde etkili olan fajların bazılarının *V. aginolyticus* veya *V. vulnificus* gibi başka suşlar üzerinde de etkili olabildiklerini ortaya koymuşlardır [228]. Bir diğer çalışmada ise *Salmonella* Enteritidis üzerine etkili olan fajlar kullanılmış olup, bu fajların *Klebsiella* ve 3 farklı *Escherichia* izolatı ile de başarılı bir şekilde çoğaltılabildiği gösterilmiştir. *Klebsiella* ve *Escherichia* üzerinde etkili olduğu doğrulanan bu fajlar ile bu kez tekrar 10 farklı *Salmonella* serovarı üzerinde çalışılmış ve bu fajlardan birinin 6 farklı, diğerinin ise 2 farklı *Salmonella* serovarını etkileyebildiği saptanmıştır. Bu çalışma ile fajların konakçı aralığının her zaman belirli bir cins ile sınırlı kalmayabileceği, alternatif cinsler üzerinde de etkili olabilen geniş konakçı aralıklı fajların patojenlerle mücadelede etkili bir araç olabileceği ortaya konmuştur [229]. Tez çalışması kapsamında izole edilen fajların bir kısmı da geniş konakçı skalasına sahip olmaları nedeniyle bu avantajı sağlamaktadır.

Çizelge 4.5'te sonuçları verilen faj-bakteri karşılaştırmalarından bazı örnekler Şekil 4.2'de verilmiştir.



**Şekil 4.2.** *S. Typhimurium* bakterisine *E. coli* tp1, tp2 ve tp3 ve *S. Typhimurium* tp1 fajlarının (a), *E. coli* O157:H7 iç bakterisine *E. coli* tp1, tp2, tp3 ve *Salmonella* tp1 fajlarının (b), *E. coli* bakterisi üzerine *Salmonella* tp1, tp2, tp3 ve *S. Typhimurium*

tp1 ve tp2 fajlarının (c) ve *S. Typhimurium* bakterisi üzerine *Salmonella* tp1, tp2, tp3 ve *S. Typhimurium* tp2 fajlarının etkisi (d).

### 4.3. Fajların Mikroenkapsülasyon Etkinliğinin Saptanması

Materyal ve metot bölümünde anlatıldığı üzere, fajların mikroenkapsülasyonu için çeşitli örnek karışımları ve proses parametrelerini içeren denemeler yapılmıştır. Yapılan ilk denemeler sonucunda fajların titrelerinde görülen değişim Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

**Çizelge 4.6.** Çeşitli örnek karışımları ve proses parametrelerinde gerçekleştirilen mikroenkapsülasyon işlemi sonucunda faj titrelerinde görülen değişim.

| DENEME NO | FAJ                        | MİKROENKAPSÜLASYON ÖNCESİ TİTRE<br>log(pfu/mL) | MİKROENKAPSÜLASYON SONRASI TİTRE<br>log(pfu/mL) | FARK<br>log(pfu/mL) |
|-----------|----------------------------|--|---|---------------------|
| 1         | <i>E. coli</i><br>tp3      | 9,00   | 7,00  | 2,00                |
| 2         | <i>E. coli</i><br>tp3      | 9,00   | 6,00  | 3,00                |
| 3         | <i>S. aureus</i><br>İÇ tp2 | 8,30   | 7,70  | 0,60                |
| 4         | <i>S. aureus</i><br>İÇ tp2 | 8,48   | 7,00  | 1,48                |

Bu sonuçlara göre, *E. coli* tp3 fajının, püskürtmeli kurutucu ile gerçekleştirilen mikroenkapsülasyon işlemine *S. aureus* İÇ fajına göre daha dayanıksız olduğu görülmektedir. Titrede yaklaşık 2-3 log birimlik düşüş görülmesine rağmen litik aktivitenin etkinliği devam etmektedir. Ayrıca *E. coli* için yapılan 1 ve 2 nolu denemeler değerlendirildiğinde, proses esnasındaki giriş sıcaklığının artmasının faj titresindeki düşüşü artırdığı gözlenmiştir. *S. aureus* İÇ fajı için en başarılı mikroenkapsülasyon sonucu, 3 nolu deneme parametrelerinde (90°C giriş sıcaklığı, 45°C çıkış sıcaklığı, % 60 aspirasyon, % 8 Pompa) alınmıştır.

Tez çalışması kapsamında izole edilen diğer faj gruplarından da örnekler seçilerek daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere mikroenkapsüle edilmiştir. Mikroenkapsülasyon için faj seçiminde hem konakçı skalası göz önünde bulundurulmuş, hem de mümkün olduğunca doğal kaynaklardan izole edilen fajlar tercih edilmiştir. Mikroenkapsüle edilen bu fajların mikroenkapsülasyon öncesi ve sonrasındaki titre değişimi Çizelge 4.7'de verilmiştir.

**Çizelge 4.7.** Mikroenkapsüle edilen fajların işlem sonrasındaki titre değişimleri

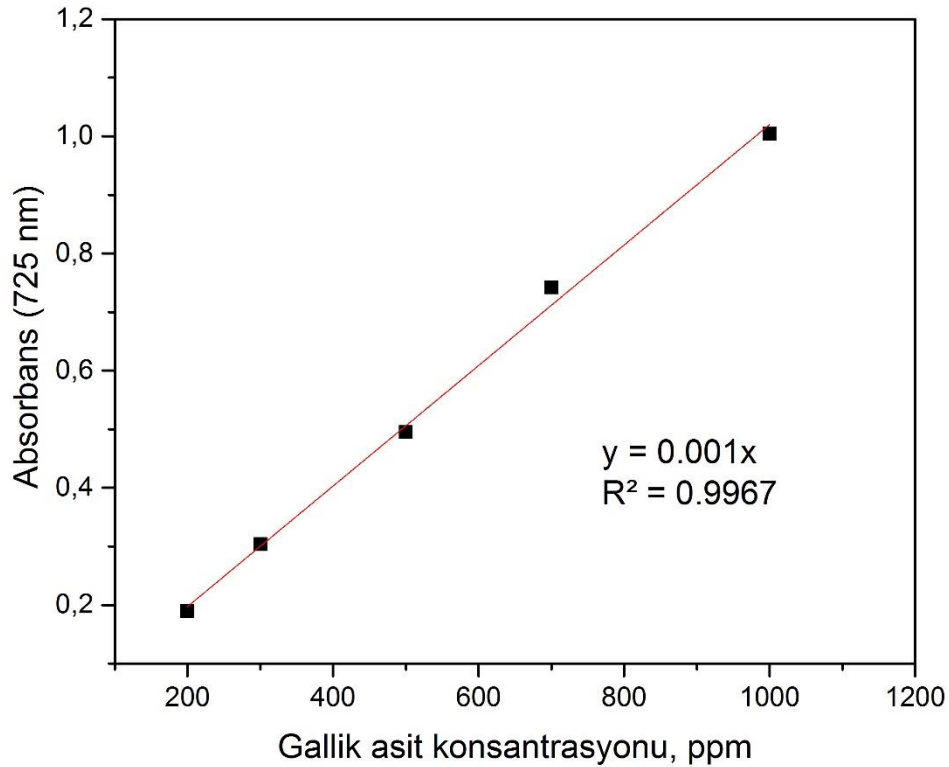
| FAJ                                | MİKROENKAPSÜLASYON<br>ÖNCESİ TİTRE<br>log(pfu/mL) | MİKROENKAPSÜLASYON<br>SONRASI TİTRE<br>log(pfu/mL) | FARK<br>log(pfu/mL) |
|------------------------------------|---|--|---------------------|
| <i>B. subtilis</i> φ19 tp5         | 10,00   | 9,30   | 0,70                |
| <i>S. Typhimurium</i><br>φ5 tp2    | 12,00   | 9,00   | 3,00                |
| <i>S. Enteritidis</i> F4<br>tp3    | 11,00   | 9,00   | 2,00                |
| <i>S. Enteritidis</i> F4<br>tp4    | 11,00   | 10,00  | 1,00                |
| <i>S. Typhimurium</i><br>φ5 tp1    | 9,00  | 8,48   | 0,52                |
| <i>S. Typhimurium</i><br>F4 tp2    | 9,00  | 8,00   | 1,00                |
| <i>B. subtilis</i> F11 tp1         | 11,50   | 9,95   | 1,55                |
| <i>B. subtilis</i> 6 tp1           | 11,00   | 10,00  | 1,00                |
| <i>S. Typhimurium</i><br>φ5 tp4    | 9,00  | 8,30   | 0,70                |
| <i>B. subtilis</i> 6 tp2           | 10,00   | 9,90   | 0,10                |
| <i>S. Enteritidis</i> tp1          | 12,00   | 9,00   | 3,00                |
| <i>S. Enteritidis</i> tp1          | 11,00   | 10,00  | 1,00                |
| <i>S. Typhimurium</i><br>Göl2 tp2  | 10,48   | 10,00  | 0,48                |
| <i>S. Typhimurium</i><br>Göl2 tp1  | 10,00   | 9,00   | 1,00                |
| <i>S. Typhimurium</i> İÇ<br>B1 tp1 | 10,30   | 10,00  | 0,30                |
| <i>Salmonella</i> AK<br>tp2-1      | 10,00   | 8,00   | 2,00                |
| <i>S. Enteritidis</i> AK<br>tp3-1  | 10,00   | 10,00  | -                   |
| <i>Salmonella</i> AK<br>tp1-3      | 10,00   | 9,00   | 1,00                |
| <i>S. Enteritidis</i> Göl2<br>tp2  | 10,48   | 8,48   | 2,00                |
| <i>S. aureus</i> 4a1 tp2           | 8,00  | 7,00   | 1,00                |

Bu sonuçlara göre, *B. subtilis* fajlarında mikroenkapsülasyon sonrası titre düşüşü 0,10-1,55 log birimi arasında değişirken, bu aralık *S. Typhimurium* fajlarında 0,30-3,00 log birimi, *S. Enteritidis* fajlarında 0-3,00 log birimi, *Salmonella* fajlarında ise 1,00-2,00 log birimi olarak gözlenmiştir. *S. aureus* fajının titresinde ise 1,00 log birimlik bir düşüş görülmüştür. Literatürde fajların püskürtmeli kurutma yoluyla mikroenkapsülasyonuna yönelik yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar alınmıştır.

Vandenheuvel ve arkadaşlarının (2013) yaptığı çalışmada, LUZ19 fajının titresinde çeşitli proses parametreleri sonucu 0,02-0,65 log arası düşmeler görülürken Romulus fajındaki titre düşüş aralığı 2,58-4,72 log olarak saptanmıştır [188]. Bir başka çalışmada ise kullanılan tüm *Myoviridae* fajları 1 log pfu/mL'den daha düşük bir titre kaybıyla mikroenkapsüle edilebilmiştir [187]. Çalışma kapsamında mikroenkapsüle edilen fajların büyük çoğunluğunda titre düşüşünün 2 log biriminin altında kalması ileriki aşamalar için önemli bir avantaj teşkil etmektedir.

#### 4.4. Fenolik Ekstraksiyonu ve Toplam Fenolik Madde ile Kuru Madde Tayini

Toplam fenolik madde içeriği analizi için standart gallik asit çözeltisinin 200-1000 ppm aralığındaki 5 farklı konsantrasyonu UV-Vis spektrofotometrede 760 nm dalga boyunda ölçülerek bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Şekil 4.3.). Sonuçlar elde edilen eğrinin regresyon eşitliğinden yararlanılarak hesaplanmış ve mg gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edilmiştir.



Şekil 4.3. Gallik aside ait kalibrasyon eğrisi

Standart gallik asit çözeltileri kullanılarak hazırlanan kalibrasyon grafiğinden hesaplanan toplam fenolik madde içerikleri ile hesaplanan kuru madde miktarları Çizelge 4.8’de verilmiştir.

**Çizelge 4.8.** Elde edilen ekstraktların toplam fenolik içeriği ve kuru madde miktarı

| EKSTRAKT       | TOPLAM FENOLİK MADDE<br>(mg GAE/g) | KURU MADDE<br>(mg/mL) |
|----------------|------------------------------------|-----------------------|
| Nar kabuğu     | 330                                | 114                   |
| Üzüm çekirdeği | 66,02                              | 11                    |
| Ayva           | 16,90                              | 71                    |
| Çörek otu      | 110                                | 27                    |

Kullanılan örnekler için hesaplanan toplam kuru madde ve toplam fenolik madde miktarları miktarları çizelgede verilmiştir. Bu sonuçlar, damlatma yapılan petrilere alınan sonuçlar ile paraleldir. Üzüm çekirdeği ve ayva da antimikrobiyal etkili polifenolik maddeler içermesine rağmen, bunların kaynaktaki konsantrasyonunun daha düşük olması sebebiyle, nar kadar etkin bir antimikrobiyal aktivite gösterememişlerdir.

#### 4.5. Fenoliklerin Antimikrobiyal Aktivitesinin Saptanması

Nar kabuğu, üzüm çekirdeği, ayva ve çörek otu gibi bitkisel kaynaklardan ekstrakte edilen polifenollerin antimikrobiyal aktivitesi, materyal-metot bölümünde anlatıldığı şekilde çalışılan konakçı bakteriler üzerinde test edilmiştir. Bu karşılaştırmalardan alınan sonuçlar Çizelge 4.9’da gösterilmiştir.

**Çizelge 4.9.** Elde edilen ekstraktların çalışılan konakçı bakteriler üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri

| BAKTERİLER                | FENOLİK EKSTRAKTLARI |                   |      |           |
|---------------------------|----------------------|-------------------|------|-----------|
|                           | NAR<br>KABUĞU        | ÜZÜM<br>ÇEKİRDEĞİ | AYVA | ÇÖREK OTU |
| <i>E. coli</i>            | +                    | +                 | -    | -         |
| <i>E. coli</i> O157:H7 İÇ | +                    | +                 | -    | -         |
| <i>E. coli</i> K12        | +                    | -                 | -    | -         |
| <i>Salmonella</i>         | +                    | +                 | -    | -         |
| <i>S. Typhimurium</i> İÇ  | +                    | +                 | -    | -         |
| <i>S. aureus</i>          | +                    | +                 | -    | +         |
| <i>S. aureus</i> İÇ       | +                    | +                 | +    | +         |
| <i>L. monocytogenes</i>   | +                    | +                 | -    | -         |

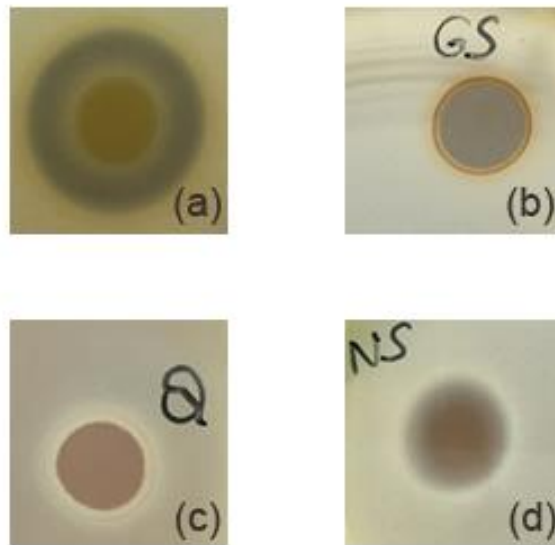
|                            |   |   |   |   |
|----------------------------|---|---|---|---|
| <i>L. monocytogenes</i> İÇ | + | - | - | - |
| <i>S. pyogenes</i>         | + | + | + | + |
| <i>M. luteus</i>           | + | + | + | - |
| <i>B. subtilis</i>         | + | + | + | - |
| <i>S. Enteritidis</i>      | + | - | - | - |
| <i>S. Typhimurium</i>      | + | - | - | - |

“+”: Ekstraktın bakteri üzerinde antimikrobiyal etkisi vardır.

“-”: Ekstraktın bakteri üzerinde antimikrobiyal etkisi yoktur.

Elde edilen sonuçlara göre, polifenol ekstrakte edilen kaynaklar arasında en yüksek antimikrobiyal aktivite göstereni, nar kabuklarıdır. Üzüm çekirdeği ekstraktı ise bakterilerin bir kısmı üzerinde etki göstermiştir. Ayva ve çörek otu ekstraktları ise yalnızca sınırlı sayıda bakteri üzerinde etkili olabilmektedir. Beta hemoliz yapması nedeniyle ciddi boğaz enfeksiyonuna ve ileri seviyelerde kızılı neden olan yüksek patojeniteye sahip *S. pyogenes* ile *S. aureus* İÇ bakterileri elde edilen tüm fenollere duyarlılık göstermiştir.

Fenolik ekstraktlarının bakteriler üzerindeki antimikrobiyal aktivitesine örnek olarak; nar kabuğu, üzüm çekirdeği, ayva ve çörek otunun *S. aureus* bakterisine etkisi Şekil 4.4'te verilmiştir.



**Şekil 4.4.** Agar ortamında nar kabuğu (a), üzüm çekirdeği (b), ayva (c) ve çörek otu (d) ekstraktlarının *S. aureus* üzerindeki inhibisyonunu gösteren zonlar

Buradan elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurularak, ekstraktların antimikrobiyal aktivitelerini daha spesifik ve belirgin bir şekilde saptayabilmek için ekstraktların hedef bakterilere ait MIC ve MBC değerleri belirlenmiştir. Fenoliklerle karşılaştırılan bakteri sayısının, başlangıçtaki bakteri sayısına göre 4-5 log düştüğü konsantrasyonlar, MBC olarak yorumlanmıştır. MIC değerlerine ise, hem bakteri sayım sonuçları yorumlanarak, hem de görsel olarak yapılan inceleme sonucu karar verilmiştir. Ekstraktlara ait saptanan MIC ve MBC değerleri Çizelge 4.10'da verilmiştir.

**Çizelge 4.10.** Nar kabuğu, üzüm çekirdeği, ayva ve çörek otu ekstraktlarının hedef bakterilere ait MIC ve MBC değerleri

| BAKTERİLER                 | EKSTRAKTLAR |     |                |     |      |     |           |     |
|----------------------------|-------------|-----|----------------|-----|------|-----|-----------|-----|
|                            | NAR KABUĞU  |     | ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ |     | AYVA |     | ÇÖREK OTU |     |
|                            | MIC         | MBC | MIC            | MBC | MIC  | MBC | MIC       | MBC |
| <i>E. coli</i> tp          | d/4         | d/4 | d/4            | d/4 | D    | D   | D         | D   |
| <i>E. coli</i> O157:H7 İÇ  | d/4         | d/4 | d/4            | d/4 | D    | D   | D         | D   |
| <i>E. coli</i> K12         | d/4         | d/4 | D              | D   | D    | D   | D         | D   |
| <i>Salmonella</i>          | d/2         | d/2 | d/2            | d/2 | D    | D   | D         | D   |
| <i>S. Typhimurium</i> İÇ   | d/4         | d/4 | d/4            | d/4 | D    | D   | D         | D   |
| <i>S. aureus</i>           | d/8         | d/8 | d/2            | d/2 | D    | D   | d/4       | d/2 |
| <i>S. aureus</i> İÇ        | d/8         | d/8 | d/4            | d/4 | d/2  | d/2 | d/4       | d/2 |
| <i>L. monocytogenes</i>    | d/4         | d/4 | d/2            | d/2 | D    | D   | D         | D   |
| <i>L. monocytogenes</i> İÇ | d/4         | d/4 | D              | D   | D    | D   | D         | D   |
| <i>M. luteus</i>           | d/8         | d/8 | d/4            | d/4 | d/2  | d/2 | D         | D   |
| <i>B. subtilis</i>         | d/4         | d/4 | d/2            | d/2 | d/2  | d/2 | D         | D   |
| <i>S. Enteritidis</i>      | d/4         | d/4 | D              | D   | D    | D   | D         | D   |
| <i>S. Typhimurium</i>      | d/4         | d/4 | D              | D   | D    | D   | D         | D   |

"D": dirençli

#### 4.6. Fenoliklerin Mikroenkapsülasyon Veriminin ve Mikroenkapsülasyon Sonrası Antimikrobiyal Aktivitenin Saptanması

Nar kabuğu, üzüm çekirdeği, ayva ve çörek otu gibi bitkisel kaynaklardan elde edilen ekstraktlar püskürtmeli kurutucu yardımıyla materyal-metod bölümünde anlatıldığı şekilde mikroenkapsüle edilmiş ve mikroenkapsülasyon işleminin verimi ile mikroenkapsüle formdaki fenoliklerin çalışılan konakçı bakteriler üzerindeki

aktiviteleri test edilmiştir. Böylece püskürtmeli kurutma işleminin ekstraktların antimikrobiyal aktivitesine olan etkisi saptanmıştır. Fenoliklerin mikroenkapsülasyon verimleri Çizelge 4.11’de, antimikrobiyal aktivite sonuçları ise Çizelge 4.12’de gösterildiği gibidir.

**Çizelge 4.11.** Mikroenkapsüle edilmiş fenolik ekstraktların mikroenkapsülasyon etkinliği

| MİKROENKAPSÜLE EKSTRAKTLAR | MİKROENKAPSÜLASYON ETKİNLİĞİ (%) |
|----------------------------|----------------------------------|
| Nar Kabuğu                 | 96,37                            |
| Üzüm Çekirdeği             | 82,55                            |
| Ayva                       | 75,74                            |
| Çörek otu                  | 69,09                            |

**Çizelge 4.12.** Mikroenkapsüle edilmiş ekstraktların konakçı üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri

| BAKTERİLER                 | FENOLİK EKSTRAKTLARI |                |      |           |
|----------------------------|----------------------|----------------|------|-----------|
|                            | NAR KABUĞU           | ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ | AYVA | ÇÖREK OTU |
| <i>E. coli</i>             | +                    | -              | -    | -         |
| <i>E. coli</i> O157:H7 İÇ  | +                    | -              | -    | -         |
| <i>E. coli</i> K12         | +                    | -              | -    | -         |
| <i>Salmonella</i>          | +                    | -              | -    | -         |
| <i>S. Typhimurium</i> İÇ   | +                    | -              | -    | -         |
| <i>S. aureus</i>           | +                    | -              | -    | +         |
| <i>S. aureus</i> İÇ        | +                    | +              | -    | +         |
| <i>L. monocytogenes</i>    | +                    | -              | -    | -         |
| <i>L. monocytogenes</i> İÇ | +                    | -              | -    | -         |
| <i>S. pyogenes</i>         | +                    | +              | -    | +         |
| <i>M. luteus</i>           | +                    | +              | -    | -         |
| <i>B. subtilis</i>         | +                    | -              | -    | -         |
| <i>S. Enteritidis</i>      | +                    | -              | -    | -         |
| <i>S. Typhimurium</i>      | +                    | -              | -    | -         |

Elde edilen sonuçlara göre nar kabuğu hem mikroenkapsüle edilmemiş ekstraktıyla, hem de püskürtmeli kurutucuda yapılan mikroenkapsülasyon işlemi sonrasında

çalışılan hedef bakterilerin tamamı üzerinde etkili olmuştur. Fakat püskürtmeli kurutma işlemi sonrasında nar kabuğu ekstraktının oluşturduğu inhibisyon zonunun küçüldüğü, dolayısıyla antimikrobiyal aktivitenin azaldığı gözlenmiştir.

Üzüm çekirdeği ekstraktı bazı *E. coli* ve *Salmonella* suşları üzerinde etki gösterirken, mikroenkapsülasyon işlemi sonrasında bu etkiyi kaybettiği görülmüştür. Ayva ekstraktı ise püskürtmeli kurutma işlemi sonrasında tüm bakteriler üzerindeki aktivitesini kaybetmiştir. Çörek otu ise, *S. aureus* suşları ve *S. pyogenes* üzerinde gösterdiği güçlü antimikrobiyal aktiviteyi mikroenkapsülasyon işlemi sonrasında da korumuştur. Ekstraktların mikroenkapsülasyon işlemi sonrasında antimikrobiyal etkisinde görülen azalmanın püskürtmeli kurutma koşullarıyla ilişkili olduğu düşünülmüştür. Ilımlı proses koşulları bile aktivitenin tamamen korunmasını sağlayamamıştır. Literatürde de püskürtmeli kurutma işlemi sonucu benzer etkilerin gözlemlendiği çalışmalar bulunmaktadır. Akkaya ve arkadaşları (2012), pekmez ile yaptıkları çalışmada püskürtmeli kurutma sonrası proses koşullarına bağlı olarak pekmezin toplam fenolik içeriğinde yaklaşık % 10 ve antioksidan aktivitesinde yaklaşık % 20 değişim gördüklerini bildirmiştir [230].

#### **4.7. Fajlar ile Fenolikler Arasındaki Etkileşimin İncelenmesi**

##### **4.7.1. Fenoliklerin Fajların Plak Büyüklüğü Üzerine Etkisi**

Fenolik ekstraktları ile fajlar arasındaki etkileşimin incelenmesinde ilk aşamada, ekstraktların fajların aktivitesi üzerindeki etkisi agar ortamında denenmiştir. Agarda ekstrakt damlatılan bölgelerin üzerine, çift tabaka agar yöntemiyle fajlar yayılmış ve fenoliklerin difüzyon zonlarındaki faj büyüklükleri, hiçbir fenolik içermeyen bölgedekilerle karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonuçları Çizelge 4.13'te verilmiştir.

**Çizelge 4.13.** Nar kabuğu, üzüm çekirdeği, ayva ve çörek otu ekstraktlarının çeşitli fajların plak büyüklüğü üzerine etkisi

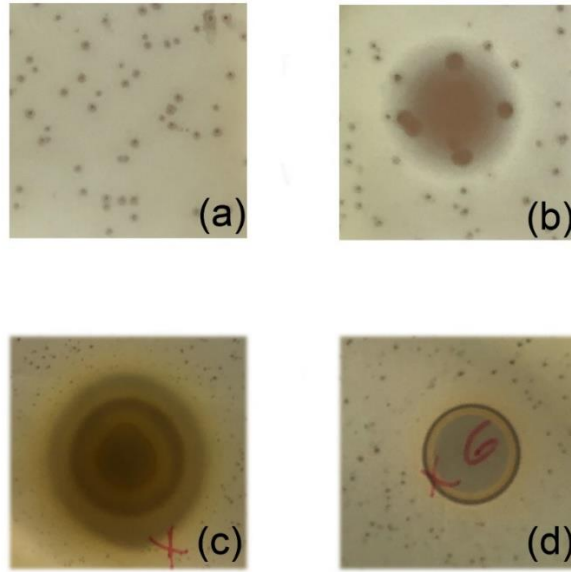
| FAJLAR                       | EKSTRAKTLAR |                |      |           |
|------------------------------|-------------|----------------|------|-----------|
|                              | NAR KABUĞU  | ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ | AYVA | ÇÖREK OTU |
| <i>S. aureus</i> 4a1 tp2     | ↓           | ↓              | ↓    | ↑         |
| <i>S. aureus</i> İÇ tp3      | ↓           | ↓              | ↓    | ↑         |
| <i>E.coli</i> tp2            | ↓           | ↓              | ↓    | -         |
| <i>E.coli</i> tp3            | ↓           | ↓              | ↓    | ↓         |
| <i>S. Typhimurium</i> İÇ tp1 | ↓           | ↓              | -    | -         |
| <i>S. Typhimurium</i> İÇ tp2 | ↓           | ↓              | -    | -         |
| <i>S. Typhimurium</i> φ5 tp1 | ↓           | ↓              | -    | -         |
| <i>S. Typhimurium</i> φ5 tp2 | ↓           | -              | -    | -         |
| <i>S. Typhimurium</i> φ5 tp3 | ↓           | -              | -    | -         |
| <i>S. Typhimurium</i> φ5 tp4 | ↓           | -              | -    | -         |
| <i>S. Typhimurium</i> φ5 tp5 | ↓           | ↓              | -    | -         |
| <i>S. Typhimurium</i> F4 tp1 | ↓           | -              | -    | -         |
| <i>S. Typhimurium</i> F4 tp2 | ↓           | ↓              | -    | ↓         |
| <i>B. subtilis</i> φ19 tp4   | ↓           | -              | -    | -         |
| <i>B. subtilis</i> φ19 tp5   | ↓           | -              | -    | -         |
| <i>B. subtilis</i> F11 tp2   | ↓           | -              | -    | -         |
| <i>B. subtilis</i> F11 tp3   | ↓           | -              | -    | -         |
| <i>B. subtilis</i> F11 tp4   | ↓           | -              | -    | -         |
| <i>B. subtilis</i> F11 tp5   | ↓           | -              | -    | -         |
| <i>S. Enteritidis</i> F5 tp1 | ↓           | ↓              | -    | -         |
| <i>S. Enteritidis</i> F5 tp2 | ↓           | ↓              | -    | ↓         |
| <i>S. Enteritidis</i> F5 tp3 | ↓           | ↓              | -    | ↓         |
| <i>S. Enteritidis</i> F5 tp4 | ↓           | ↓              | -    | -         |

|                                 |   |   |   |   |
|---------------------------------|---|---|---|---|
| <b>S. Enteritidis Göl3 tp1</b>  | ↓ | ↓ | - | - |
| <b>S. Enteritidis AK tp3</b>    | ↓ | ↓ | - | - |
| <b>Salmonella AK tp1-1</b>      | ↓ | ↓ | - | - |
| <b>Salmonella AK tp2-2</b>      | ↓ | ↓ | ↓ | - |
| <b>Salmonella AK tp3-1</b>      | ↓ | - | - | - |
| <b>S. Typhimurium Göl1 tp1</b>  | ↓ | ↓ | ↓ | - |
| <b>S. Typhimurium İÇ B2 tp2</b> | ↓ | ↓ | - | - |
| <b>S.Typhimurium AK tp2</b>     | ↓ | ↓ | ↓ | - |

“↓” : Faj plaklarının boyutu küçülmüştür.  
“–” : Faj plaklarının boyutu değişmemiştir.  
“↑” : Faj plaklarının boyutu büyümüştür.

Çizelge 4.13 incelendiğinde sadece çörek otu ekstraktının faj-bakteri etkileşiminde olumlu sonuç verdiği ve plak çapını arttırdığı görülmüştür. Nar kabuğu ve üzüm çekirdeği ekstraktaları ise faj plaklarını ağırlıklı olarak küçültmüştür. Ayva ekstraktının ise fajlarının birçoğunun plak büyüklüğünü etkilemediği, etki gösterdiği sınırlı sayıdaki fajınsa plak boyutunu küçülttüğü gözlenmiştir.

*S. aureus* 4a1 tp2 fajı ile belirgin etkinin görüldüğü çörek otu, nar kabuğu ve üzüm çekirdeği ekstraktlarının bir arada kullanıldığı denemelere ait sonuçlar Şekil 4.4'te verilmiştir.



**Şekil 4.5.** Agar üzerinde hiçbir ekstrakt damlatılmayan (a), çörek otu ekstraktı damlatılan (b), nar kabuğu ekstraktı damlatılan (c) ve üzüm çekirdeği ekstraktı damlatılan (d) bölgelerde *S. aureus* 4a1 tp2 faj plakları.

Literatürde fenolik bileşenlerin faj aktivitesi etkisi üzerinde yapılmış sınırlı sayıda çalışmalardan ikisi Lee vd. (1985) ile Morita (1988)'ya aittir. Lee ve arkadaşlarının çalışmasında çeşitli fenolik bileşenlerin *Lactobacillus casei* S suşu üzerinde etkili PL-1 fajına etkisi incelenmiştir. Çalışmaların sonucunda ticari olarak üretilen kırmızı, beyaz ve şampanya tanenleri, kateşin, kafeik ve gallik asitlerin plak oluşumunu engellediği bildirilmiştir. Ticari olarak temin edilen oenosiyaninde ise etki görülmemiştir [231]. Morita'nın çalışmasında ise polifenollerin, fajların plak oluşturan aktivitelerini bakır iyonu varlığında inaktive ettiği tespit edilmiştir [232].

#### 4.7.2. Faj-Fenolik Etkileşiminin Sıvı Ortamda İncelenmesi

Agar ortamında yapılan çalışmalarda, çörek out (NS) damlatılan bölgelerde faj plaklarının büyüdüğü gözlenmiş ve bir sinerjistik etkinin var olabileceği düşünülmüştür. Yapılan denemelerde pozitif olarak yorumlanabilecek tek etki NS ile *S. aureus* fajı arasında görülmüştür. Bu sonuçtan hareketle, farklı ekstraktların faj aktivitesi üzerindeki farklı etkilerini sıvı ortamda da gösterebilmek adına, pozitif etkinin görüldüğü *S. aureus* 4a1 tp2 fajı ile bunun konakçı bakterisi olan *S. aureus*

model olarak seçilmiş ve aynı bakteri ve faj üzerinde farklı ekstraktların etkilerinin ortaya konması hedeflenmiştir.

Agar ortamında yapılan çalışmalarda, NS söz konusu olduğunda bir sinerjistik etkinin var olabileceği düşünülmüştür. Bu olası sinerjizmin sıvı besiyeri ortamında kontrolü için yapılan çalışmalarda, farklı MOI değerleri ve NS konsantrasyonları denenerek bu koşullardaki *S. aureus* 4a1 tp2 fajının ve *S. aureus* bakterisinin sayıları karşılaştırılmıştır. Denemeler sonucunda elde edilen faj titreleri ve bakteri sayıları Çizelge 4.14'te verilmiştir.

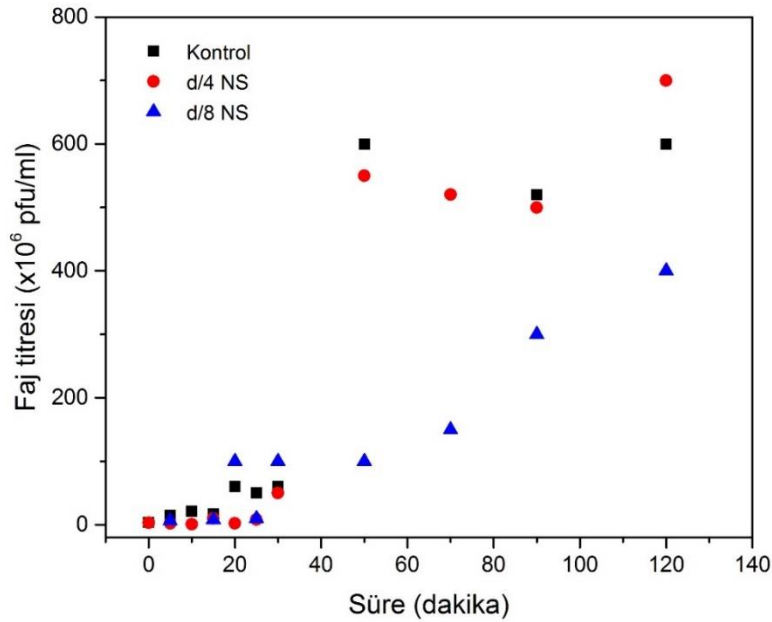
**Çizelge 4.14.** Farklı MOI değerleri ve NS konsantrasyonlarında yapılan denemeler sonucunda elde edilen faj titreleri ve bakteri sayıları

| NS<br>KONSANTRASYONU | FAJ TİTRESİ log(pfu/mL) |       |        | BAKTERİ SAYISI log(cfu/mL) |       |        |                |
|----------------------|-------------------------|-------|--------|----------------------------|-------|--------|----------------|
|                      | MOI:0.1                 | MOI:1 | MOI:10 | MOI:0.1                    | MOI:1 | MOI:10 | Yalnızca<br>NS |
| 0                    | 8,70                    | 8,90  | 8,28   | 2,11                       | 4,28  | 2,04   | -              |
| d/4                  | 5,00                    | 5,95  | 6,30   | 6,61                       | 5,30  | 4,23   | 2,00           |
| d/8                  | 8,30                    | 7,00  | 6,78   | 5,54                       | 4,70  | 4,90   | 3,66           |

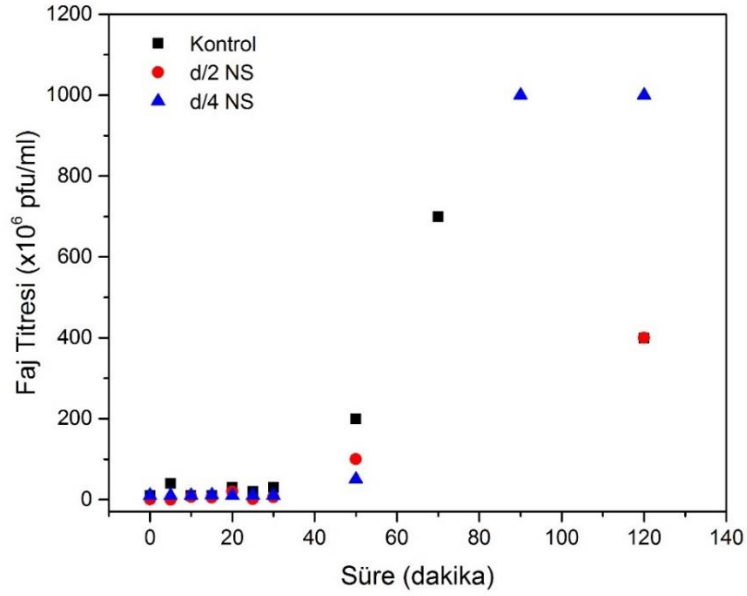
Bu deneylerin sonucunda NS içeren tüplerdeki faj sayısının hiç NS içermeyen kontrol tüpüne nazaran daha yüksek olmadığı, hatta bu kontrol değerinden bile düşük olduğu saptanmıştır. Bunun NS'nin antimikrobiyal etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. NS, ortamda bulunan bakterilerin ölmesine neden olduğundan, faj ortamda enfekte edip sonrasında çoğalacağı bakteri bulamadığından titresini yeterince yükselmemiştir. Bu sonuçlar, 18 saat inkübasyondan sonra elde edilmiştir. Bu nedenle, NS'nin faj plaklarının büyümesine etkisini daha iyi açıklayabilmek için, NS'nin faj-bakteri karışımı ile daha kısa sürede etkileşimde kalabileceği bir deneme kurgulanmış ve fajla tek aşamalı gelişme eğrisi deneyi yapılmıştır.

Bu aşamada, faj-bakteri karışımının tek aşamalı gelişme eğrisi gibi kısa bir süre boyunca NS ile birlikte kalması sağlanmıştır. Şekil 4.5'te NS bulunmayan kontrol tüpünde *S. aureus* 4a1 tp2 fajının latent döneminin 15 dakika olduğu görülmektedir. Fajın patlama büyüklüğü ise 40 faj/hücre olarak hesaplanmıştır. NS konsantrasyonu d/4 olduğunda, fajın latent dönemi 25 dakikaya uzamış, ancak patlama büyüklüğü

130 faj/bakteri olmuştur. d/8 ile yapılan denemeler ise sonlandırılmıştır, çünkü bu konsantrasyonda 120. dakikada dahi faj sayısının çok yüksek olmadığı görülmüştür. Bunun üzerine bir sonraki çalışmaya d/8 yerine d/2 konsantrasyonu dahil edilmiştir (Şekil 4.6.). Bu çalışmada, kontrol grubunda latent dönem ve patlama büyüklüğü sırasıyla 15 dakika ve 31 faj/bakteri olarak bulunmuştur. d/2 konsantrasyonunda latent dönem uzamış ve patlama büyüklüğü 70 faj/bakteri olarak bulunmuştur. Bununla birlikte yine en iyi sonuç d/4 konsantrasyonuyla elde edilmiştir. Bu çalışmada latent dönemin 30 dakika, ancak patlama büyüklüğünün 98 faj/bakteri olduğu tespit edilmiştir. İki gün arasında oluşan bu fark dikkate alınmamıştır, çünkü ortam koşullarına bağlı olarak bu değerlerin günlük deneylerde değişebileceği bilinmektedir [233]. Bu sonuçlar, agar ortamında NS içeren bölgelerdeki plak boyutlarının artma sebebini açıklamaktadır. NS, fajların patlama büyüklüklerini artırmakta fakat son durumdaki faj titresi ya da bakteri sayısı üzerinde sinerjistik bir etki göstermemektedir.



Şekil 4.6. NS ortamında, *S. aureus* 4a1 tp2 fajının gelişme eğrisindeki değişim



**Şekil 4.7.** NS ortamında, *S. aureus* 4a1 tp2 fajının gelişme eğrisindeki değişim

Plak çapındaki artış literatürdeki bazı çalışmalarda da faj patlama büyüklüğünün artışı ile ilişkilendirilmiştir. Faj-antibiyotik sinerjizmine dair yapılan bu çalışmalarda antibiyotik ile fajın birlikte uygulanması durumunda fajın patlama büyüklüğünde artış olduğu tespit edilmiştir [107], [109], [234].

Agar ortamında yapılan çalışmalarda, nar kabuğu ekstraktı damlatılan bölgelerde *S. aureus* faj plaklarının küçüldüğü gözlenmiştir. Bu etkinin sıvı besiyeri ortamında kontrolü için yapılan çalışmalarda, farklı MOİ değerleri ve nar kabuğu ekstraktı (P) konsantrasyonları denenerek bu koşullardaki faj ve bakteri sayıları karşılaştırılmıştır. Denemeler sonucunda elde edilen faj titreleri ve bakteri sayıları Çizelge 4.15'te verilmiştir.

**Çizelge 4.15.** Farklı MOI değerleri ve P konsantrasyonları ile yapılan denemeler sonucunda elde edilen faj titreleri ve bakteri sayıları

| P<br>KONSANTRASYONU | FAJ TİTRESİ<br>log pfu/mL) |         |       | BAKTERİ SAYISI log(cfu/mL)<br>(Başlangıç sayısı: 8,32) |         |       |             |
|---------------------|----------------------------|---------|-------|--|---------|-------|-------------|
|                     | MOI:0,01                   | MOI:0,1 | MOI:1 | MOI:0,01   | MOI:0,1 | MOI:1 | Sadece<br>P |
| 0                   | 8,70                       | 8,90    | 8,28  | 6,71   | 6,62    | 2,22  | -           |
| d/16                | -                          | -       | -     | 5,33   | 4,92    | 4,87  | 4,82        |
| d/32                | -                          | -       | -     | 5,77   | 5,32    | 4,92  | 5,70        |

Nar kabuğu ekstraktı ile yapılan çalışmalar, bu fenoliğin fajlar üzerinde kuvvetli bir antiviral etkiye sahip olduğunu göstermiştir. d/16 ve d/32 gibi düşük konsantrasyonlarda bile her üç MOI değerinde de faj titresi saptanamayacak kadar düşük çıkmıştır. Bakteri sayıları incelendiğinde de benzer bir sonuç çıkmakta olup, nar kabuğu ekstraktının faj ile birlikte kullanılması ile oluşan herhangi bir sinerjistik etkiden söz edilememektedir.

Bu çalışmalar dışında, nar ekstraktı ile titresi yaklaşık olarak  $10^{10}$  pfu/mL olan *E. coli* tp3 fajı da denenmiş ve nar ekstraktı ile sırasıyla 1-0; 0,9-0,1; 0,8-0,2; 0,7-0,3; 0,6-0,4; 0,5-0,5; 0,4-0,6; 0,3-0,7; 0,2-0,8; 0,1-0,9; 0-1 oranlarında karıştırılmıştır. Bu oranlarda hazırlanan nar-faj karışımlarının  $10^{-6}$ 'ya kadar dilüsyonları hazırlanmış ve yine çift tabaka agar yöntemi ile nar-faj etkinliği saptanmaya çalışılmıştır. 1 mL narın dilüsyonlarından yapılan damlatma sonuçlarına göre narın  $10^{-2}$  dilüsyonunda bile az da olsa bakteri gelişimini engellediği görülmektedir. Daha sonra nar miktarı azaltılıp faj miktarı 100 µL'den başlayarak 100'er µL artırılmıştır. Denemelere  $10^{10}$  pfu/mL faj titresi ile başlanmasına rağmen nar-faj oranı 0,9-0,1 yani faj titresi  $10^9$  pfu/mL olduğunda bile nar olan ortamda fajın aktivite gösteremediği tespit edilmiştir. Tüm bu damlatma sonuçlarına göre narın, faj aktivitesini düşük konsantrasyonda bile çok güçlü bir şekilde düşürdüğü ortaya çıkmıştır.

Son aşama olarak aynı denemeler üzüm çekirdeği ekstraktı (GS) ile de yapılmıştır. Agar ortamında yapılan çalışmalarda, üzüm çekirdeği ekstraktı damlatılan bölgelerde *S. aureus* faj plaklarının küçüldüğü gözlenmiştir. Bu etkinin sıvı besiyeri ortamında kontrolü için yapılan çalışmalarda, farklı MOI değerleri ve GS

konsantrasyonları denenerek bu koşullardaki faj ve bakteri sayıları karşılaştırılmıştır. Denemeler sonucunda elde edilen faj titreleri ve bakteri sayıları Çizelge 4.16'da verilmiştir.

**Çizelge 4.16.** Farklı MOI değerleri ve GS konsantrasyonları ile yapılan denemeler sonucunda elde edilen faj titreleri ve bakteri sayıları

| GS<br>KONSANTRASYONU | FAJ TİTRESİ<br>log(pfu/mL) |         |       | BAKTERİ SAYISI log(cfu/mL)<br>(Başlangıç sayısı: 8,32) |         |       | Sadece<br>GS |
|----------------------|----------------------------|---------|-------|--|---------|-------|--------------|
|                      | MOI:0,01                   | MOI:0,1 | MOI:1 | MOI:0,01   | MOI:0,1 | MOI:1 |              |
| 0                    | 8,70                       | 8,90    | 8,28  | 6,71   | 6,62    | 2,22  | -            |
| d/8                  | -                          | -       | -     | 6,22   | 5,12    | 5,62  | 5,00         |
| d/16                 | 4,70                       | 3,00    | 5,00  | 7,34   | 6,64    | 7,04  | 7,40         |

Elde edilen sonuçlar, üzüm çekirdeği ekstraktının da faj aktivitesi üzerinde olumsuz etkisi olduğunu doğrulamaktadır. d/8 konsantrasyonunda her üç MOI değerinde de faj titresinin saptanamayacak kadar düştüğü görölmektedir. d/16 konsantrasyonunda bile faj titresinde ciddi bir düşüşe yol açmasına ek olarak, her iki konsantrasyonda da son durumdaki bakteri sayısını sinerjizm olarak kabul edilebilecek şekilde düşürmemiştir.

#### 4.8. Faj-Fenolik Karışımlarının Mikroenkapsölasyonu

Agar ve sıvı besiyeri ortamında yapılan çalışmalar sonucunda, fajın aktivitesine olumlu katkıda bulunan tek fenoliğin çörek otu olduğu ve onun da yalnızca *S. aureus* fajları üzerinde etkili olduğu saptanmıştır. Bu sonucun ardından bu fenolik ile fajın bir arada mikroenkapsüle edilmesi basamağına geçilmiştir. Mikroenkapsölasyon işlemi için çörek otunun son konsantrasyonu d/4 olacak şekilde 50 mL'lik örnek bir faj+fenolik karışımı hazırlanmış ve daha önce belirtilen işlem basamakları kullanılarak mikroenkapsüle edilmiştir. Çörek otu ile bir arada gerçekteşen mikroenkapsölasyon sonucunda, fajın titresinde ciddi bir düşüş meydana gelmediği görölmüştür.

#### 4.9. Mikroenkapsüle Faj ve Fenoliklerin Mide Ortamı Denemeleri

Mikroenkapsülasyon işlemi uygulanan fajların *in vivo* denemeler için elverişli olup olmadığını anlayabilmek için mikrokapsüllerin litik potansiyelinin çeşitli fizyolojik sıvıları simüle eden koşullar altında değerlendirilmesi gerekmektedir. Bunun ilk aşamasında mikrokapsüllerin proteaz, asit pH ve sıcaklık gibi etkenlere karşı dayanıklılığını saptamak amacıyla model mide ortamı oluşturulmuş ve mikrokapsüllerin bu ortamdaki 120 dakikalık inkübasyonu boyunca belirli zaman aralıklarıyla örnekler alınarak aktivite tayini yapılmıştır. Mikroenkapsüle fajların mide ortamındaki titre değişimleri Çizelge 4.17’de verilmiştir.

**Çizelge 4.17.** Model mide ortamında 0, 15, 30, 60, 90 ve 120 dakikalık inkübasyonlar sonucunda mikroenkapsüle fajların titreleri

| FAJ                              | MODEL MİDE ORTAMINDA FAJ TİTRESİ (pfu/mL) |       |       |       |      |        |
|----------------------------------|---|-------|-------|-------|------|--------|
|                                  | t0  | t15   | t30   | t60   | t90  | t120   |
| <b>S. Typhimurium T göl2 tp2</b> | 10,0                                      | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 9,30 | 9,30   |
| <b>S. Typhimurium T göl2 tp1</b> | 6,30                                      | 6,30  | 7,30  | 6,30  | 7,30 | 6,30   |
| <b>S. Typhimurium İÇ B1 tp1</b>  | 10,00                                     | 10,00 | 10,00 | 1,00  | 9,30 | 9,30   |
| <b>Salmonella tp AK tp2 -1-</b>  | 7,90                                      | 7,90  | 7,90  | 7,90  | 7,90 | 7,92,0 |
| <b>S. Enteritidis AK tp3-1</b>   | 10,00                                     | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 9,30 | 9,15   |
| <b>Salmonella tp AK tp1 -3-</b>  | 8,30                                      | 8,30  | 8,30  | 8,30  | 8,30 | 8,30   |
| <b>B. subtilis 6 tp1</b>         | 10,00                                     | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 9,30 | 8,30   |
| <b>B. subtilis 6 tp2</b>         | 8,30                                      | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 8,30 | 8,30   |
| <b>S. Enteritidis göl2 tp2</b>   | 6,30                                      | 6,30  | 6,30  | 6,30  | 6,30 | 6,30   |
| <b>S. Enteritidis tp2</b>        | 9,00                                      | 10,00 | 10,00 | 10,00 | 9,30 | 8,60   |
| <b>S. Enteritidis tp1</b>        | 8,08                                      | 8,30  | 8,30  | 8,30  | 8,30 | 7,30   |
| <b>B. subtilis F11 tp1 -k-</b>   | 7,30                                      | 8,30  | 8,30  | 8,30  | 8,30 | 7,30   |
| <b>B. subtilis φ19 tp5</b>       | 10,30                                     | 10,30 | 10,30 | 8,00  | 8,30 | 8,30   |
| <b>S. aureus 4a1 tp2 + NS</b>    | 2,00                                      | 2,00  | 2,00  | 2,00  | 2,00 | 2,00   |
| <b>S. Enteritidis F4 tp3</b>     | 9,30                                      | 9,30  | 9,30  | 9,30  | 9,30 | 8,30   |
| <b>S. Enteritidis tp4</b>        | 9,30                                      | 9,30  | 9,30  | 8,90  | 8,30 | 8,30   |
| <b>S. Typhimurium IC B2 tp2</b>  | 5,30                                      | 6,60  | 6,78  | 6,78  | 6,30 | 6,30   |

“t” : zaman, dk

Bu sonuçlara göre, mikroenkapsülasyon işleminin denenen fajların büyük çoğunluğunu mide ortamına karşı koruduğu saptanmıştır. Fajların pek çoğunda 2 saatlik inkübasyon sonunda titre düşüşü 1 log civarında seyretmiştir. Ma ve arkadaşlarının (2008) yaptığı çalışmada, mikroenkapsüle edilmiş Felix O1 faji, aynı deney tasarımı ve inkübasyon süreleri ile model mide ortamında denenmiş ve pH 2.4 iken 90 dakikalık inkübasyon sonunda faj titresinin yaklaşık olarak 3 log, 120 dakikalık inkübasyon sonunda ise yaklaşık olarak 7 log düştüğü görülmüştür [185]. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile Ma ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçlar karşılaştırıldığında, püskürtmeli kurutucu ile yapılan mikroenkapsülasyonun fajları mide ortamında korumada çok daha etkili olduğu ortaya çıkmaktadır. Çörek otu ve *S. aureus* faji karışımının mide ortamı denemeleri ise olumsuz sonuç vermiştir. Mikroenkapsül yapısına rağmen, fajın mide ortamı koşullarına karşı son derece dayanıksız olduğu saptanmıştır. Simüle edilen mide ortamındaki 2 saate varan inkübasyon sonucunda, fajın büyük miktarının kaybedildiği gözlenmiştir. Bu sonuç, elde edilen karışımın *in vivo* şartlardaki kullanımının kısıtlı olacağına bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Mikroenkapsüle fajlar için yapılan mide ortamı denemesi, mikroenkapsüle edilmiş ekstraktlar için de tekrarlanmıştır. Mide ortamını simüle edilen koşullarda gerçekleşen 120 dakikalık inkübasyon sonunda mikroenkapsüle ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri Çizelge 4.18'de verilmiştir.

**Çizelge 4.18.** Model mide ortamında 120 dakikalık inkübasyon sonucunda mikroenkapsüle ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri

| BAKTERİLER                 | MİKROENKAPSÜLE EDİLMİŞ<br>FENOLİK EKSTRAKTLARI |                   |           |
|----------------------------|--|-------------------|-----------|
|                            | NAR KABUĞU                                     | ÜZÜM<br>ÇEKİRDEĞİ | ÇÖREK OTU |
| <i>E. coli</i>             | -  | -                 | -         |
| <i>E. coli</i> O157:H7 İÇ  | -  | -                 | -         |
| <i>E. coli</i> K12         | -  | -                 | -         |
| <i>Salmonella</i>          | -  | -                 | -         |
| <i>S. Typhimurium</i> İÇ   | +  | -                 | -         |
| <i>S. aureus</i>           | +  | -                 | -         |
| <i>S. aureus</i> İÇ        | +  | -                 | -         |
| <i>L. monocytogenes</i>    | +  | -                 | -         |
| <i>L. monocytogenes</i> İÇ | +  | -                 | -         |

|                       |   |   |   |
|-----------------------|---|---|---|
| <i>S. pyogenes</i>    | + | - | - |
| <i>M. luteus</i>      | - | - | - |
| <i>B. subtilis</i>    | - | - | - |
| <i>S. Enteritidis</i> | - | - | - |
| <i>S. Typhimurium</i> | - | - | - |

“+”: Bakteri üzerinde antimikrobiyal etki vardır.

“-” : Bakteri üzerinde antimikrobiyal etki yoktur.

Elde edilen sonuçlara göre, fenolik bileşenlerin mikroenkapsüle edilmiş dahi olsalar mide ortamından zarar gördükleri gözlenmiştir. Mikroenkapsüle üzüm ve çörek otu ekstraktları, mide ortamına maruz kalmadan önce etki gösterdikleri bakteriler üzerindeki aktivitelerini, mide ortamında 2 saatlik inkübasyon sonrasında kaybetmişlerdir. Nar kabuğu ekstraktı ise, mide ortamı öncesinde etkili olduğu 8 bakteriye mide ortamı sonrasında etki göstermemiştir.

#### 4.10. Mikroenkapsüle Faj ve Fenoliklerin Safra Tuzu Ortamı Denemeleri

Mikroenkapsülasyon işlemi tamamlanmış faj ve fenoliklerin *in vivo* denemelerdeki elverişliliğini test etmede bir diğer önemli aşama da safra tuzu ortamındaki stabilitenin kontrol edilmesidir. Çizelge 4.19’da sunulan sonuçlar, mikroenkapsüle edilmiş fajların safra tuzu varlığında belirtilen inkübasyon süreleri sonundaki titrelerini göstermektedir.

**Çizelge 4.19.** Safra tuzu içeren ortamda 60 ve 180 dakikalık inkübasyonlar sonucunda mikroenkapsüle fajların titreleri

| FAJLAR                           | SAFRA TUZU İÇEREN ORTAMDA FAJ TİTRESİ (pfu/mL) |       |      |
|----------------------------------|--|-------|------|
|                                  | t0   | t60   | t180 |
| <i>S. Typhimurium</i> T göl2 tp2 | 10,00  | 10,00 | 9,30 |
| <i>S. Typhimurium</i> T göl2 tp1 | 9,00   | 9,30  | 9,30 |
| <i>S. Typhimurium</i> IC B1 tp1  | 10,00  | 9,30  | 9,30 |
| <i>Salmonella</i> tp AK tp2 -1-  | 8,00   | 8,00  | 8,00 |
| <i>S. Enteritidis</i> AK tp3-1   | 10,00  | 10    | 10,3 |
| <i>Salmonella</i> tp AK tp1 -3-  | 9,00   | 8,00  | 8,00 |

|  |       |       |       |
|--|-------|-------|-------|
| <b><i>B. subtilis</i> 6 tp1</b>        | 10,00 | 9,30  | 9,30  |
| <b><i>B. subtilis</i> 6 tp2</b>        | 10,00 | 10,30 | 8,60  |
| <b><i>S. Enteritidis</i> göl2 tp2</b>  | 8,48  | 8,60  | 8,30  |
| <b><i>S. Enteritidis</i> tp2</b>       | 10,00 | 10,30 | 10,00 |
| <b><i>S. Enteritidis</i> tp1</b>       | 9,00  | 8,15  | 8,60  |
| <b><i>B. subtilis</i> F11 tp1 -k-</b>  | 9,95  | 7,78  | 7,30  |
| <b><i>B. subtilis</i> φ19 tp5</b>      | 9,30  | 8,26  | 9,30  |
| <b><i>S. Enteritidis</i> F4 tp3</b>    | 9,00  | 8,55  | 8,90  |
| <b><i>S. Enteritidis</i> tp4</b>       | 10,00 | 10,30 | 8,00  |
| <b><i>S. Typhimurium</i> IC B2 tp2</b> | 7,00  | 7,00  | 6,55  |

“t” : zaman, dk

Fajlarla yapılan çeşitli çalışmalarda bazı fajların safra tuzu etkisine karşı direnç gösterdiği [235], bazılarının daha duyarlı olduğu ve mikroenkapsülasyon yoluyla safra tuzlarının etkisinden korunabildiği [185] tespit edilmiştir. Yine bir başka çalışmada safra tuzlarının T7 fajının doğal ve mutant formuna olan etkileri karşılaştırılmış ve 1 saatlik inkübasyon sonucu mutant fajın safra tuzundan daha az etkilendiği, fakat 3 saatlik inkübasyon sonucu faj sayısındaki azalmanın yaklaşık olarak eşit olduğu belirlenmiştir [236]. Bu çalışma kapsamında da, mikroenkapsüle edilen fajlar safra tuzu ortamında bir ve üç saat süreyle inkübe edilerek belirtilen süreler sonundaki faj titreleri saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, bazı fajların üç saatlik inkübasyon sonunda bile titre kaybı yaşamadığı gözlenmiştir. Bunun dışındaki titre düşüşlerinin birçoğu 1 log'un altında kalmaktadır. Faj sayısındaki en fazla kayıp ise 2,65 log'luk düşüş ile *B. subtilis* F11 tp1 -k- fajında görülmüştür. Çizelgedeki değerlere bakıldığında *Bacillus* fajlarının safra tuzu ortamına *Salmonella* fajlarına göre daha duyarlı olduğu görülmektedir. Faj terapi uygulamaları düşünüldüğünde, fajların mikroenkapsüle formda ciddi bir titre kaybı yaşamamaları önemli bir avantaj sağlamaktadır.

Mikroenkapsüle fajlar için yapılan safra tuzu denemesi, mikroenkapsüle edilmiş ekstraktlar için de tekrarlanmıştır. Safra tuzu içeren koşullarda gerçekleşen 120 dakikalık inkübasyon sonunda mikroenkapsüle ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri Çizelge 4.20'de verilmiştir.

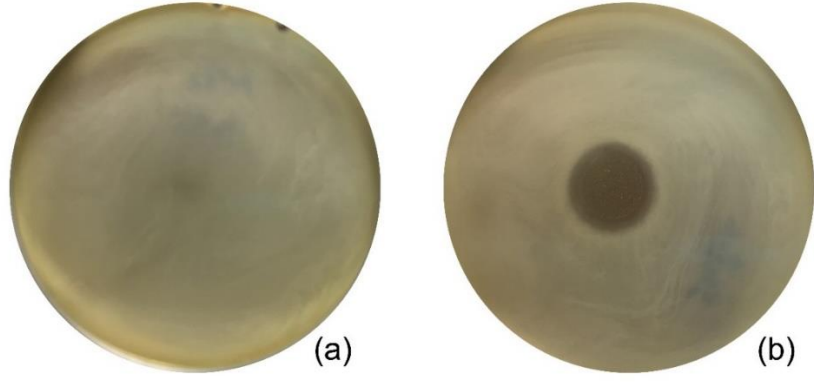
**Çizelge 4.20.** Safra tuzu içeren ortamda 120 dakikalık inkübasyon sonucunda mikroenkapsüle ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri

| BAKTERİLER                 | MİKROENKAPSÜLE EDİLMİŞ FENOLİK EKSTRAKTLARI |                |           |
|----------------------------|---|----------------|-----------|
|                            | NAR KABUĞU                                  | ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ | ÇÖREK OTU |
| <i>E. coli</i>             | -   | -              | -         |
| <i>E. coli</i> O157:H7 İÇ  | +   | -              | -         |
| <i>E. coli</i> K12         | +   | -              | -         |
| <i>Salmonella</i>          | +   | -              | -         |
| <i>S. Typhimurium</i> İÇ   | +   | -              | -         |
| <i>S. aureus</i>           | +   | -              | +         |
| <i>S. aureus</i> İÇ        | +   | +              | +         |
| <i>L. monocytogenes</i>    | +   | -              | -         |
| <i>L. monocytogenes</i> İÇ | +   | -              | -         |
| <i>S. pyogenes</i>         | +   | +              | +         |
| <i>M. luteus</i>           | +   | +              | -         |
| <i>B. subtilis</i>         | -   | -              | -         |
| <i>S. Enteritidis</i>      | +   | -              | -         |
| <i>S. Typhimurium</i>      | +   | -              | -         |

“+”: Bakteri üzerinde antimikrobiyal etki vardır.

“-” : Bakteri üzerinde antimikrobiyal etki yoktur.

Elde edilen sonuçlara göre, safra tuzu ortamında bulunan mikroenkapsüle ekstraktların bir kısmının bazı bakteriler üzerindeki aktivitesini kaybettiği gözlenmiştir. Fakat safra tuzu ortamının etkisi, mide ortamıyla karşılaştırıldığında çok daha düşük kalmaktadır. Mikroenkapsüle ekstraktların birçoğu, safra tuzu ortamında iki saatlik inkübasyon sonunda antimikrobiyal aktivitesini bir kayıp olmaksızın koruyabilmiştir. Mide ortamı ve safra tuzunun mikrokapsüller üzerindeki etkisi Şekil 4.7.'de gösterilmiştir. Mide ortamı ile muamele edilen mikroenkapsüle çörek otu ekstraktı *S. aureus* üzerindeki aktivitesini kaybederken, safra tuzu ile muamele edilen mikrokapsülün antimikrobiyal aktivitesini koruduğu görülmektedir.



**Şekil 4.8.** Mide ortamı (a) ve safra tuzu ortamında (b) 120 dakikalık inkübasyon sonunda mikroenkapsüle çörek otu ekstraktının *S. aureus* üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi

## 5. SONUÇ VE YORUM

Tez çalışması kapsamında, patojen bakterilere karşı antibiyotiklere alternatif olabileceği düşünülen iki farklı yaklaşımın, faj terapi ve fitoterapinin, üzerinde çalışılarak bu iki yaklaşımın bir arada kullanılması ile ortaya çıkan etkileşimler incelenmiştir.

İlk aşama olarak, hem ticari faj karışımlarından hem de göl ve kanalizasyon suları gibi doğal örneklerden, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. aureus*, *B. subtilis* ve *L. monocytogenes* gibi bakterilerin konakçı olduğu 87 adet faj izole edilmiştir. Bu fajlar, saflaştırma ve zenginleştirme aşamalarının da tamamlanmasıyla gelecekteki çalışmalarda da kullanılabilir zengin bir stok oluşturulmuştur.

İzole edilen fajların konakçı skalalarını belirlemek amacıyla bu fajlar, çalışma kapsamına alınan tüm bakteriler ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalar sonucunda spesifitesi yüksek fajlar olduğu kadar, cins ve tür bazında daha geniş konakçı skalasına sahip fajların da olduğu saptanmıştır. Konakçı skalası daha geniş fajlar faj terapi uygulamalarında avantaj teşkil etmekte olup, çeşitli faj kokteyllerinin hazırlanması ile izole edilen fajların aktivitesinin ve etki alanının artırılabilmesine olanak sağlamaktadırlar. Örneğin tez çalışması kapsamında *S. pyogenes* fajı izole edilmemiş olsa da, oluşturulacak herhangi bir faj kokteyline farklı konakçıdan izole edilse de *S. pyogenes* üzerinde de etki gösteren fajların eklenmesiyle çok daha etkili bir ürün ortaya konabilecektir.

Fajların konakçı skalası belirlendikten sonra mikroenkapsülasyon işlemine geçilmiştir. Faj terapinin *in vivo* uygulamalarında karşılaşılan en büyük sorunlardan biri fajların insan vücudundaki fiziksel ve kimyasal koşullara direnç gösterememesi ve bakteriyi etkin şekilde lize edebilecek miktara ulaşmadan etkisiz hale gelmesidir. Mikroenkapsülasyon bu olumsuz etkinin azaltılması için uygulanan çözüm yollarından biri olarak görülmektedir. Çalışma kapsamında, izole edilen fajlar arasından seçilen örnekler püskürtmeli kurutucu kullanılarak mikroenkapsüle edilmiştir. Proses parametrelerine karar vermeden önce ufak bir optimizasyon çalışması yapılarak hem kullanılacak biyopolimer matriks hem de püskürtmeli kurutucu parametreleri netleştirilmiştir. Çalışmalar sonucunda % 2'lik sodyum aljinat çözeltisinin fajların mikroenkapsülasyonu için ideal olduğuna karar verilmiştir. Sprey

kurutucuda ise giriş sıcaklığın mümkün olduğunca düşürülmesi ile faj kaybının minimize edilmesi amaçlanmıştır. İdeal olduğu düşünülen biyopolimer matriks, faj-matriks oranı ve püskürtmeli kurutma parametreleri kullanılarak fajlar mikroenkapsüle edilmiş ve ardından mikroenkapsülasyon işleminin etkinliğini ortaya koyabilmek adına mikrokapsüllerde titre belirlemesine gidilmiştir. Mikroenkapsülasyon işlemi sonrasında fajların titresinde ciddi bir düşüş yaşanmaması *in vivo* uygulamalar için önemli bir avantaj teşkil etmektedir.

Faj çalışmalarına paralel olarak, tez kapsamında nar kabuğu, üzüm çekirdeği, ayva ve çörek otu gibi bitkisel kaynaklardan ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Elde edilen ekstraktların toplam fenolik içeriği ve kuru madde miktarı belirlenerek karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu ekstraktlar, çalışma kapsamında kullanılan bakteriler üzerinde denenerek antimikrobiyal aktiviteleri test edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar arasında en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olan nar kabuğu ekstraktı olmuş ve test edilen bakterilerin tümüne etkili olduğu saptanmıştır. Onu takip eden üzüm çekirdeği ekstraktı da birçok bakteri üzerinde etki gösterirken, ayva ve çörek otu ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin daha kısıtlı olduğu görülmüştür. Nar kabuğu ekstraktının toplam fenolik içeriğinin çok yüksek oluşu da elde edilen bu sonuçla örtüşmektedir. Ekstraktların antimikrobiyal etkisini daha belirgin şekilde gösterebilmek için ayrıca bu ekstraktların hedef bakterilere ait MIC ve MBC değerleri de belirlenmiştir. Bu değerlerden daha sonra faj-fenolik etkileşimleri incelenirken de yararlanılmış ve MIC ile MBC'den daha düşük konsantrasyon değerleri kullanılarak bunların fajlar ve son bakteri sayısı üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Fenolik ekstraktlarının karakterizasyonu ve bakteriler üzerindeki etkilerinin incelenmesi tamamlandıktan sonra bu ekstraktların mikroenkapsüle edilme aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada proses parametreleri saptanırken daha önce fajların mikroenkapsülasyonundan elde edilen sonuçlar da göz önünde bulundurulmuş ve optimum koşullara karar verilmiştir. Aynı şekilde % 2'lik sodyum aljinat çözeltisi biyopolimer matriks olarak kullanılmış ve ekstraktların mikroenkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Mikroenkapsülasyon sonrasında ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri aynı bakteriler üzerinde tekrar test edilmiştir. Fajlardaki titre düşüşüne benzer şekilde, fenolik ekstraktlarında da mikroenkapsülasyon sonrasında proses koşullarına bağlı olarak aktivite kaybı

yaşanmıştır. Bu kayıp nar kabuğu ekstraktında diğerlerine oranla çok daha azdır. Çörek otu ekstraktı da benzer şekilde mikroenkapsülasyon sonrasında aktivite göstermeye devam etmiştir. Ayva ve üzüm çekirdeği ekstraktları ise mikroenkapsülasyon sonrasında bazı bakteriler üzerindeki aktivitelerini tamamen kaybetmişlerdir. Proses esnasında kullanılan sıcaklık ve diğer parametreler mümkün olduğunca kaybı azaltmaya yönelik ayarlanmış olsa da fenoliklerin fajlara göre püskürtmeli kurutma işlemine daha duyarlı olduğu görülmüştür.

Fajlar ve fenolikler üzerinde ayrı ayrı gerçekleştirilen bu denemelerin ardından bu iki antimikrobiyal ajanın birlikte denenmesi aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada ilk denemeler agar ortamında yapılmış olup fenoliklerin faj plakları üzerindeki etkisi incelenmiştir. Agar üzerinde görülebilecek olası bir inhibisyon zonu artışı ya da faj plağı büyümesinin sinerjistik etki işareti olabileceği düşünülmüştür. Fenolik ekstraktları ve fajlar ile yapılan denemeler sonucunda inhibisyon zonlarında belirgin bir değişim olmamıştır. Fakat fenoliklerin difüzyon zonları üzerine düşen faj plaklarında belirgin değişimler gözlenmiştir. Bu aşamada fenoliklerin faj plakları üzerinde çoğunlukla olumsuz bir etki gösterdiği ya da plak büyüklüğünü hiç etkilemediği görülmüştür. Fenoliklerin faj plaklarını büyüttüğü tek deneme çörek otu ve *S. aureus* fajı ile yapılan deneme olmuştur. Bu sonuçtan hareketle sinerjistik bir etki olabileceği düşünülmüş ve bu ikili ile sıvı besiyeri ortamında denemelere geçilmiştir. Sıvı ortamda farklı çörek otu konsantrasyonları ve MOI değerleri ile yapılan çalışmalarda, agar ortamında görülen etkinin aksine sinerjistik bir etkiden söz edilemeyeceği sonucuna varılmıştır. Bunun esas sebebinin çörek otunun düşük konsantrasyonlarda bile bakteriler üzerinde etkili olması sebebiyle, fajların kendilerini çoğaltacak sayıda bakteriyi enfekte edememesi ve titresini artıramaması, sonuç olarak da bakteri sayısında belirgin bir düşüş görülememesi olduğu düşünülmüştür. Bu aşamada sinerjistik bir etkiden söz edilemese de, agar ortamında görülen etkiyi açıklayabilmek adına çeşitli NS konsantrasyonlarında fajın tek aşamalı gelişme eğrisi çıkarılmış, NS'nin sadece fajın bakteriye adsorbe olduğu sürece ortamda olması sağlanmış, süre sonundaki santrifügasyon işlemi ile ortamdaki ayrılmıştır. Böylece NS'nin konakçı bakteriler üzerindeki öldürücü etkisi kaldırılmış hatta NS'nin etkisiyle fajın patlama büyüklüğünde artış ve dolayısıyla faj plaklarında büyüme saptanmıştır. *S. aureus* fajının plak büyüklüklerine etki gösteren diğer ekstraktlar da nar kabuğu ve üzüm çekirdeği ekstraktları olmuştur. Bu faj

model seçilerek diğer iki fenolik bileşenle etkileşimi de sıvı besiyeri ortamında denenmiş ve sonuç olarak bu iki ekstraktın da düşük konsantrasyonlarda bile fajlar üzerinde olumsuz etkiye sahip olduğu saptanmıştır.

Elde edilen mikrokapsüllerin fizyolojik koşulları simüle eden ortamlardaki stabilitelerinin saptanması da tez çalışmasının son aşaması olmuştur. Bu aşamada ilk olarak yapay mide ortamı oluşturulmuş ve mikrokapsüllerin hem düşük pH'ya hem de proteaz aktivitesi ve sıcaklığa karşı dirençleri incelenmiştir. Yüz yirmi dakikalık inkübasyon sonucunda mikrokapsüllerin çoğunda ciddi bir aktivite kaybı görülmemiştir. Aynı şekilde safra tuzu ortamında da 180 dakikalık inkübasyon sonunda denenen örneklerin birçoğunda önemli bir kayıp yaşanmamıştır. Bu sonuçlar, kullanılan mikroenkapsülasyon yönteminin etkinliğini doğrulamış ve mikrokapsüllerin *in vivo* koşullarda da kullanıma elverişliliğini ortaya koymuştur.

Şüphesiz ki antibiyotik kullanımı yıllar boyunca çok önemli hastalıkların iyileştirilmesine ve insan sağlığının korunmasına büyük katkı sağlamıştır. Bununla birlikte günümüzde dirençli bakterilerin ortaya çıkışı, çok sayıda bilim adamının ve sağlık uzmanının çözmeye kararlı olduğu endişe verici bir problem haline almıştır. Faj terapi ve fitoterapi de, bu problemin çözümünde günümüzde öne çıkan alternatiflerden ikisidir. Faj terapi ve fitoterapi ile ilgili literatür taraması yapıldığında, bunların ayrı ayrı çalışılan konular olduğu fakat bir arada kullanımına dair yapılan çalışmaların son derece sınırlı olduğu görülmüştür. Ayrıca ülkemizde faj terapi konusunda gerek bilimsel, gerekse pratik uygulama açısından büyük bir eksiklik göze çarpmaktadır. Faj terapi uygulamaları hem bilimsel anlamda, hem de sağlık ve gıda alanlarında literatüre ve endüstriye yeni bir yaklaşım getirecektir. Sağlık alanında yaygın antibiyotik kullanımının getirdiği dezavantajları elimine edebilmek için bir alternatif oluşturmakla birlikte, gıda güvenliği hususunda da mevcut yöntemlerle aşılamayan sorunlar için yeni bir çözüm yolu önermektedir. Bu alandaki çalışmaların odak noktası, teknolojik araçların geliştirilmesi yoluyla hem insan ve hayvan sağlığının korunması, hem de bitkilerin verimlerini artırmaktır. Mikroenkapsüle edilmiş fajlar/polifenoller özellikle insan ve hayvanların tedavi edilmesinde, tarımsal ve çevresel biyoteknoloji uygulamalarında yüksek potansiyele sahip olacaktır. Litik fajların kullanılmasının en büyük avantajlarından biri konakçı patojen bakteri türlerine karşı yüksek bir spesifikliğe sahip olmasıdır. Fajlar, insanlarda alerjiye neden olmaz ya da gıda ürünlerinin tekstürel özelliklerini, koku

ve flavorunu etkilemezler. Fajlar pek çok ülkede ilaç sanayiinde kullanılmaktadır ve 2006 yılında FDA tarafından gıda katkı maddesi olarak kullanımları genellikle güvenli olarak bilinen (GRAS) sınıfına dahil edilmiştir. Tarımsal uygulamaları da bulunan fajlar, hem üretim ve taşıma hatlarında hem de ürünlerde patojenlerin gelişimini engellemek amacıyla kullanılabilir. Bu uygulama örneklerinden yola çıkılarak tez kapsamında ortaya konan yeni yaklaşım ile bakteri kontrol ajanı olarak yalnızca fajların değil ayrıca fitoterapötik bileşenlerin de kullanımı öne çıkarılarak kamu kurumları ve özel sektör tarafından kabul edilebilir bir strateji oluşturulabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, bu teknoloji veterinerlerin veya tarım alanında çalışanların geliştireceği yeni yöntemler için kaynak teşkil edebilecektir. Bir örnek olarak, kümes hayvanlarının tıbbi bakımında, ekonomik kayıpların azaltılması ve tüketici memnuniyetini geliştirmek açısından, mevcut çalışmanın sonuçlarından yararlanılabileceği düşünülmektedir. Çalışma kapsamında kullanılan ekstraktlardan belirgin bir sinerjizm yakalanamamış olsa da bitkisel kaynaklardan elde edilen fenoliklerin bu konuda potansiyeli olduğu açıktır. İlerleyen çalışmalarda denenen bitkisel kaynakların ve fajların çeşitlendirilmesiyle farklı sonuçların da elde edilebileceği düşünülmektedir. Bunun yanında, fajlar üzerinde güçlü inhibe edici özelliği olan fenolikler başka bir yaklaşımla önemli bir potansiyeli ortaya koymaktadır. Antiviral etkileri göz önünde bulundurulduğunda, fajların sorun teşkil ettiği gıda alanlarında, örneğin süt ve süt ürünleri endüstrisinde, fenoliklerin fajlara karşı kullanılması önemli bir alternatif olabilecektir. Örneğin nar kabuğu ekstraktının düşük konsantrasyonlarda bile fajlar üzerinde etki gösterebilmesi, gıdaya prosesin belirli aşamalarında eklenmesiyle gıdanın özellikleri üzerinde belirgin bir etki yaratmadan fajları etkisiz hale getirebileceğini göstermektedir. Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar ile faj terapi ve fitoterapinin önemi ve uygulanabilirliği ortaya konmuş olup bu iki yaklaşım arasındaki etkileşimlerin incelenmesiyle faj terapinin geleceğine dair yeni bir yaklaşım sunulmuştur.

## KAYNAKLAR

- [1] V. A. Fischetti, "Bacteriophage lysins as effective antibacterials," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 11, no. 5, pp. 393–400, Oct. **2008**.
- [2] B. Bigot, W.-J. Lee, L. McIntyre, T. Wilson, J. A. Hudson, C. Billington, and J. A. Heinemann, "Control of *Listeria monocytogenes* growth in a ready-to-eat poultry product using a bacteriophage," *Food Microbiology*, vol. 28, no. 8, pp. 1448–1452, Dec. **2011**.
- [3] M. Kutateladze and R. Adamia, "Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics," *Trends in Biotechnology*, vol. 28, no. 12, pp. 591–595, **2010**.
- [4] S. T. Abedon, S. J. Kuhl, B. G. Blasdel, and E. M. Kutter, "Phage treatment of human infections," *Bacteriophage*, vol. 1, no. 2, pp. 66–85, Mar. **2011**.
- [5] A. Sulakvelidze, Z. Alavidze, and J. G. Morris, "Bacteriophage therapy.," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 45, no. 3, pp. 649–59, Mar. **2001**.
- [6] J. L. Martinez, "Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants," *Environmental Pollution*, vol. 157, no. 11, pp. 2893–2902, Nov. **2009**.
- [7] J.-P. Pirnay, G. Verbeken, T. Rose, S. Jennes, M. Zizi, I. Huys, R. Lavigne, M. Merabishvili, M. Vaneechoutte, A. Buckling, and D. De Vos, "Introducing yesterday's phage therapy in today's medicine," *Future Virology*, vol. 7, no. 4, pp. 379–390, Apr. **2012**.
- [8] G. Trigo, T. G. Martins, A. G. Fraga, A. Longatto-Filho, A. G. Castro, J. Azeredo, and J. Pedrosa, "Phage Therapy Is Effective against Infection by *Mycobacterium ulcerans* in a Murine Footpad Model," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 7, no. 4, p. e2183, Apr. **2013**.
- [9] D. Goode, V. M. Allen, and P. A. Barrow, "Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages.," *Applied and environmental microbiology*, vol. 69, no. 8, pp. 5032–6, Aug. **2003**.
- [10] J. Mahony, O. McAuliffe, R. P. Ross, and D. van Sinderen, "Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 22, no. 2, pp. 157–163, Apr. **2011**.
- [11] K. A. Soni and R. Nannapaneni, "Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue.," *Journal of food protection*, vol. 73, no. 1, pp. 32–8, Jan. **2010**.
- [12] N. Aissani, V. Coroneo, S. Fattouch, and P. Caboni, "Inhibitory Effect of Carob ( *Ceratonia siliqua* ) Leaves Methanolic Extract on *Listeria monocytogenes*," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, no. 40, pp. 9954–9958, Oct. **2012**.
- [13] H. Najjaa, S. Fattouch, and E. Ammar, "Antimicrobial potentials of *Allium roseum*: Recent Advances and Trends," *Science against microbial*, **2011**.
- [14] L. Bren, "Bacteria-eating virus approved as food additive.," *FDA consumer*,

- vol. 41, no. 1, pp. 20–2. **2007**.
- [15] R. D. Joerger, “Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages.,” *Poultry science*, vol. 82, no. 4, pp. 640–7, Apr. **2003**.
- [16] S. Chibani-Chennoufi, J. Sidoti, A. Bruttin, E. Kutter, S. Sarker, and H. Brüssow, “In vitro and in vivo bacteriolytic activities of Escherichia coli phages: implications for phage therapy.,” *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 48, no. 7, pp. 2558–69, Jul. **2004**.
- [17] M. B. Marcó, J. A. Reinheimer, and A. Quiberoni, “Phage adsorption to Lactobacillus plantarum: Influence of physiological and environmental factors,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 138, no. 3, pp. 270–275, Apr. **2010**.
- [18] A. Munin and F. Edwards-Lévy, “Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review.,” *Pharmaceutics*, vol. 3, no. 4, pp. 793–829, Nov. **2011**.
- [19] A. K. Anal and H. Singh, “Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery,” *Trends in Food Science & Technology*, vol. 18, no. 5, pp. 240–251, **2007**.
- [20] N. Tunail, “Mikrobiyal Enfeksiyonlar ve İntoksikasyonlar,” in *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Ankara: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Yayını, pp. 81–184. **2000**.
- [21] P. Arora, A. Sindhu, N. Dilbaghi, and A. Chaudhury, “Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 28, no. 1, pp. 1–12, Oct. **2011**.
- [22] J. C. Buzby and T. Roberts, “Economic costs and trade impacts of microbial foodborne illness.,” *World health statistics quarterly. Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales*, vol. 50, no. 1–2, pp. 57–66, **1997**.
- [23] D. Dussault, K. D. Vu, and M. Lacroix, “In vitro evaluation of antimicrobial activities of various commercial essential oils, oleoresin and pure compounds against food pathogens and application in ham,” *Meat Science*, vol. 96, no. 1, pp. 514–520, Jan. **2014**.
- [24] Centers for Disease Control and Prevention, “A-Z Index for Foodborne Illness | Food Safety | CDC,” 2017. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/index.html>. [Accessed: 09-Jun-**2017**].
- [25] U.S. Food And Drug Administration Center for Food Safety & Applied Nutrition, “People at Risk of Foodborne Illness - Food Safety: It’s Especially Important for At-Risk Groups,” 2017. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/peopleatrisk/ucm352830.htm>. [Accessed: 09-Jun-**2017**].
- [26] K. Halkman and H. B. Doğan, “Gıda Kaynaklı Hastalık ve Zehirlenme Semptomları,” in *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Ankara: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Yayını, pp. 489–494. **2000**.
- [27] B. Ray, *Fundamental Food Microbiology*. **2005**.
- [28] M. F. LYNCH, R. V. TAUXE, and C. W. HEDBERG, “The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and

- opportunities,” *Epidemiology and Infection*, vol. 137, no. 3, p. 307, Mar. **2009**.
- [29] V. Velusamy, K. Arshak, O. Korostynska, K. Oliwa, and C. Adley, “An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors,” *Biotechnology Advances*, vol. 28, no. 2, pp. 232–254, **2010**.
- [30] C. E. Woteki and B. D. Kineman, “CHALLENGES AND APPROACHES TO REDUCING FOODBORNE ILLNESS,” *Annual Review of Nutrition*, vol. 23, no. 1, pp. 315–344, Jul. **2003**.
- [31] P. L. White, A. R. Baker, and W. O. James, “Strategies to control Salmonella and Campylobacter in raw poultry products.,” *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, vol. 16, no. 2, pp. 525–41, Aug. **1997**.
- [32] B. R. Cords, S. L. Burnett, J. Hilgren, M. Finley, and J. Magnuson, “Sanitizers: halogens, surface-active agents, and peroxides,” *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, vol. 145, p. 507, **2005**.
- [33] J. A. Troller, *Sanitation in food processing*. Academic Press, **1993**.
- [34] J. C. Olson and N. P.M., “Temperature,” in *Microbial Ecology of Foods*, J. H. Silliker, Ed. New York: Academic Press, **1980**.
- [35] G. W. (Grahame W. Gould, “Mechanisms of action of food preservation procedures,” in *Mechanisms of action of food preservation procedures*, G. W. (Grahame W. Gould, Ed. New York: Elsevier Applied Science, p. 11. **1989**.
- [36] A. A. Kraft, “Refrigeration and freezing,” in *Psychotropic Bacteria in Foods: Disease and Spoilage*, CRC Press, p. 241. **1992**.
- [37] W. H. Sperber, “Influence of water activity on foodborne bacteria—a review,” *Journal of Food Protection®*, vol. 46, no. 2, pp. 142–150, **1983**.
- [38] B. Ray and W. E. Sandine, *Acetic, propionic, and lactic acids of starter culture bacteria as biopreservatives*. CRC Press, Boca Raton, FL, **1992**.
- [39] I. R. Booth and R. G. Kroll, “The preservation of foods by low pH,” *Mechanisms of action of food preservation procedures*, vol. 1, p. 119, **1989**.
- [40] J. M. Farber, “Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology-a review,” *Journal of Food Protection®*, vol. 54, no. 1, pp. 58–70, **1991**.
- [41] I. J. Church and A. L. Parsons, “Modified atmosphere packaging technology: a review,” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 67, no. 2, pp. 143–152, **1995**.
- [42] W. Urbain, *Food irradiation*. Elsevier, **2012**.
- [43] W. H. Organization, “Antimicrobial resistance: global report on surveillance,” *Who*, p. 8, **2014**.
- [44] A. Giedraitienė, A. Vitkauskienė, R. Naginienė, and A. Pavilonis, “Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria,” *Medicina (kaunas)*, vol. 47, no. 3, pp. 137–146, **2011**.
- [45] L. B. Rice and R. A. Bonomo, “Mechanisms of resistance to antibacterial agents,” in *Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition*, American Society of Microbiology, pp. 1082–1114. **2011**.

- [46] M. N. Alekshun and S. B. Levy, "Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance," *Cell*, vol. 128, no. 6, pp. 1037–1050, **2007**.
- [47] P. M. Bennett, "Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria," *British journal of pharmacology*, vol. 153, no. S1, pp. S347–S357, **2008**.
- [48] S. Džidić, J. Šušković, and B. Kos, "Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects," *Food Technology and Biotechnology*, vol. 46, no. 1, pp. 11–21, **2008**.
- [49] P. M. Hawkey, "Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes," *British journal of pharmacology*, vol. 153, no. S1, pp. S406–S413, **2008**.
- [50] Centers for Disease Control and Prevention, "Biggest Threats | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC," 2017. [Online]. Available: [https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest\\_threats.html](https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html). [Accessed: 09-Jun-2017].
- [51] A. Choińska-Pulit, P. Mituła, P. Śliwka, W. Łaba, and A. Skaradzińska, "Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 45, no. 2, pp. 212–221, **2015**.
- [52] N. Tunail, *Mikrobiyoloji*. Danone Enstitüsü Derneği, **2009**.
- [53] M. B. Marcó, S. Moineau, and A. Quiberoni, "Bacteriophages and dairy fermentations.," *Bacteriophage*, vol. 2, no. 3, pp. 149–158, Jul. **2012**.
- [54] J. Maniloff, "Bacteriophages," in *eLS*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, **2012**.
- [55] H.-W. Ackermann, "Bacteriophage Electron Microscopy," in *Advances in virus research*, vol. 82, pp. 1–32. **2012**.
- [56] A. S. Tikhonenko, *Ultrastructure of bacterial viruses*. Springer Science & Business Media, **2012**.
- [57] H. W. Ackermann, "Bacteriophage taxonomy," *Microbiology Australia*, vol. 32, no. 2, pp. 90–94, **2011**.
- [58] H.-W. Ackermann, "Bacteriophage classification," *Bacteriophages: Biology and applications*, pp. 67–89, **2005**.
- [59] D. E. Bradley, "Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins.," *Bacteriological reviews*, vol. 31, no. 4, p. 230, **1967**.
- [60] E. Acar Soykut, "Streptococcus thermophilus ve Lactobacillus bulgaricus virulent fajlarının replikasyon parametreleri, kapsid protein profilleri ve restriksiyon endonükleaz analizleri esas alınarak tanımlanmaları ve sınıflandırılmaları," *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Müh. Ana Bilim Dalı Doktora Tezi*, vol. 176, **2007**.
- [61] H.-W. Ackermann and D. Prangishvili, "Prokaryote viruses studied by electron microscopy," *Archives of Virology*, vol. 157, no. 10, pp. 1843–1849, Oct. **2012**.
- [62] S. Sharma, S. Chatterjee, S. Datta, R. Prasad, D. Dubey, R. K. Prasad, and M. G. Vairale, "Bacteriophages and its applications: an overview," *Folia Microbiologica*, pp. 1–39, **2016**.

- [63] H. W. Ackermann, "Phagentaxonomie: Stand und Probleme in 1990," *Bioforum*, vol. 14, pp. 419–426, **1991**.
- [64] H.-W. Ackermann, "Classification of bacteriophages," *The bacteriophages*, vol. 635, pp. 8–16, **2006**.
- [65] H.-W. Ackermann, "5500 Phages examined in the electron microscope," *Archives of virology*, vol. 152, no. 2, pp. 227–243, **2007**.
- [66] W. S. Klug, *Concepts of genetics*. Pearson Education, **2012**.
- [67] W. C. Summers, "BACTERIOPHAGE THERAPY," *SGM ARv2 GJB Annu. Rev. Microbiol*, vol. 1705, no. 55, pp. 437–51, **2001**.
- [68] N. Chanishvili, *Phage Therapy-History from Twort and d'Herelle Through Soviet Experience to Current Approaches*, 1st ed., vol. 83. Elsevier Inc., **2012**.
- [69] F. d'Herelle, "Bacteriophage and phenomenon of recovery." TSU Press, Tbilisi, Georgia, **1935**.
- [70] A. Dublanchet and S. Bourne, "The epic of phage therapy," *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, vol. 18, no. 1, pp. 15–18, **2007**.
- [71] M. D. Eaton and S. Bayne-Jones, "Bacteriophage therapy: review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections," *Journal of the American Medical Association*, vol. 103, no. 23, pp. 1769–1776, **1934**.
- [72] A. P. KRUEGER and E. J. Scribner, "The bacteriophage: its nature and its therapeutic use," *Journal of the American Medical Association*, vol. 116, no. 20, pp. 2269–2277, **1941**.
- [73] E. Kutter, D. De Vos, G. Gvasalia, Z. Alavidze, L. Gogokhia, S. Kuhl, and S. Abedon, "Phage Therapy in Clinical Practice: Treatment of Human Infections," *Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 11, no. 1, pp. 69–86, **2010**.
- [74] P.-J. Ceysens, T. Glonti, R. Lavigne, N. Chanishvili, L. Kulakov, N. Lashkhi, M. Tediashvili, and M. Merabishvili, "Phenotypic and genotypic variations within a single bacteriophage species," *Virology journal*, vol. 8, no. 1, p. 134, **2011**.
- [75] T. Glonti, N. Chanishvili, and P. W. Taylor, "Bacteriophage-derived enzyme that depolymerizes the alginate capsule associated with cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*," *Journal of applied microbiology*, vol. 108, no. 2, pp. 695–702, **2010**.
- [76] A. Khawaldeh, S. Morales, B. Dillon, Z. Alavidze, A. N. Ginn, L. Thomas, S. J. Chapman, A. Dublanchet, A. Smithyman, and J. R. Iredell, "Bacteriophage therapy for refractory *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infection," *Journal of medical microbiology*, vol. 60, no. 11, pp. 1697–1700, **2011**.
- [77] K. Markoishvili, G. Tsitlanadze, R. Katsarava, J. Glenn, and A. Sulakvelidze, "A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly (ester amide)s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds," *International journal of dermatology*, vol. 41, no. 7, pp. 453–458, **2002**.

- [78] J. Pirnay, D. De Vos, G. Verbeken, M. Merabishvili, N. Chanishvili, M. Vaneechoutte, and M. Zizi, "The Phage Therapy Paradigm : Prêt-à-Porter or Sur-mesure ?," pp. 934–937, **2011**.
- [79] S. Slopek, B. Weber-Dabrowska, M. Dabrowski, and A. Kucharewicz-Krukowska, "Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986.," *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, vol. 35, no. 5, p. 569, **1987**.
- [80] S. T. Abedon, S. J. Kuhl, B. G. Blasdel, and E. M. Kutter, "Phage treatment of human infections," *Bacteriophage*, vol. 1, no. 2, pp. 66–85, **2011**.
- [81] H. W. Smith, M. B. Huggins, and K. M. Shaw, "The control of experimental Escherichia coli diarrhoea in calves by means of bacteriophages," *Microbiology*, vol. 133, no. 5, pp. 1111–1126, **1987**.
- [82] J. N. Housby and N. H. Mann, "Phage therapy," *Drug Discovery Today*, vol. 14, no. 11–12, pp. 536–540, **2009**.
- [83] S. M. Sillankorva, H. Oliveira, and J. Azeredo, "Bacteriophages and their role in food safety," *International Journal of Microbiology*, vol. 2012, **2012**.
- [84] D. Gutiérrez, L. Rodríguez-Rubio, B. Martínez, A. Rodríguez, and P. García, "Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry," *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, no. JUN, pp. 1–15, **2016**.
- [85] V. A. Fischetti, D. Nelson, and R. Schuch, "Reinventing phage therapy: are the parts greater than the sum?," *Nature Biotechnology*, vol. 24, no. 12, pp. 1508–1511, **2006**.
- [86] W. C. Summers, *Felix dHerelle and the Origins of Molecular Biology*. Yale University Press, **1999**.
- [87] M. Breitbart, I. Hewson, B. Felts, J. M. Mahaffy, J. Nulton, P. Salamon, and F. Rohwer, "Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces," *Journal of bacteriology*, vol. 185, no. 20, pp. 6220–6223, **2003**.
- [88] G. Bachrach, M. Leizerovici-Zigmond, A. Zlotkin, R. Naor, and D. Steinberg, "Bacteriophage isolation from human saliva," *Letters in applied microbiology*, vol. 36, no. 1, pp. 50–53, **2003**.
- [89] C. R. Merrill, "Phage in human vaccines," *Science*, vol. 188, no. 4183, p. 8, **1975**.
- [90] A. Sulakvelidze and E. Kutter, "14 Bacteriophage Therapy in Humans," *Bacteriophages: biology and applications*, p. 381, **2004**.
- [91] A. Bruttin and H. Brüßow, "Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy," *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 49, no. 7, pp. 2874–2878, **2005**.
- [92] M. Skurnik and E. Strauch, "Phage therapy: Facts and fiction," *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 296, no. 1, pp. 5–14, **2006**. doi: 10.1016/j.ijmm.2005.09.002, pp. 5–14, **2006**.
- [93] T. B. Broudy and V. A. Fischetti, "In vivo lysogenic conversion of Tox- Streptococcus pyogenes to Tox+ with lysogenic streptococci or free phage,"

- Infection and Immunity*, vol. 71, no. 7, pp. 3782–3786, **2003**.
- [94] C. Loc-Carrillo and S. T. Abedon, “Pros and cons of phage therapy,” *Bacteriophage*, vol. 1, no. 2, pp. 111–114, **2011**.
- [95] P. Hyman and S. T. Abedon, “Bacteriophage host range and bacterial resistance,” *Advances in applied microbiology*, vol. 70, pp. 217–248, **2010**.
- [96] T. K. Lu and M. S. Koeris, “The next generation of bacteriophage therapy,” *Current Opinion in Microbiology*, vol. 14, no. 5, pp. 524–531, **2011**.
- [97] D. Scholl, S. Adhya, and C. Merrill, “Escherichia coli K1’s capsule is a barrier to bacteriophage T7,” *Applied and environmental microbiology*, vol. 71, no. 8, pp. 4872–4874, **2005**.
- [98] S. J. Labrie, J. E. Samson, and S. Moineau, “Bacteriophage resistance mechanisms,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, no. 5, pp. 317–327, **2010**.
- [99] B. R. Levin and J. J. Bull, “Population and evolutionary dynamics of phage therapy,” *Nature reviews. Microbiology*, vol. 2, no. 2, pp. 166–173, **2004**.
- [100] R. Capparelli, M. Parlato, G. Borriello, P. Salvatore, and D. Iannelli, “Experimental phage therapy against Staphylococcus aureus in mice,” *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 51, no. 8, pp. 2765–2773, **2007**.
- [101] R. M. Carlton, “Phage therapy: past history and future prospects,” *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, vol. 47, no. 5, pp. 267–274, **1999**.
- [102] C. R. Merrill, B. Biswas, R. Carlton, N. C. Jensen, G. J. Creed, S. Zullo, and S. Adhya, “Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 8, pp. 3188–3192, **1996**.
- [103] J. M. Inal, “Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics,” *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, vol. 51, pp. 237–244, **2003**.
- [104] K. Kim, J. Cha, E. Jang, J. Klumpp, S. Hagens, W. Hardt, K. Lee, and M. J. Loessner, “PEGylation of bacteriophages increases blood circulation time and reduces T-helper type 1 immune response,” *Microbial biotechnology*, vol. 1, no. 3, pp. 247–257, **2008**.
- [105] P. Knezevic, S. Curcin, V. Aleksic, M. Petrusic, and L. Vlaski, “Phage-antibiotic synergism: A possible approach to combatting Pseudomonas aeruginosa,” *Research in Microbiology*, vol. 164, no. 1, pp. 55–60, **2013**.
- [106] A. Jo, T. Ding, and J. Ahn, “Synergistic antimicrobial activity of bacteriophages and antibiotics against Staphylococcus aureus,” *Food Science and Biotechnology*, vol. 25, no. 3, pp. 935–940, **2016**.
- [107] A. A. M. Nouraldin, M. M. Baddour, R. A. H. Harfoush, and S. A. M. Essa, “Bacteriophage-antibiotic synergism to control planktonic and biofilm producing clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa,” *Alexandria Journal of Medicine*, vol. 52, no. 2, pp. 99–105, **2016**.
- [108] F. Oechslin, P. Piccardi, S. Mancini, J. Gabard, P. Moreillon, J. M. Entenza, G. Resch, and Y.-A. Que, “Synergistic interaction between phage therapy and antibiotics clears Pseudomonas aeruginosa infection in endocarditis and

- reduces virulence,” *Journal of Infectious Diseases*, no. Xx Xxxx, p. jiw632, **2016**.
- [109] A. M. Comeau, F. Tétart, S. N. Trojet, M. F. Prère, and H. M. Krisch, “Phage-antibiotic synergy (PAS):  $\beta$ -lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth,” *PLoS ONE*, vol. 2, no. 8, pp. 8–11, **2007**.
- [110] A. Soto-vaca, J. N. Losso, Z. Xu, and J. W. Finley, “Evolution of good polyphenolics from color and flavor problems to health benefits Evolution of Phenolic compounds from Color and Flavor Problems to Health Benefits,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, no. 2, p. 6658–6677, **2012**.
- [111] M. de L. Reis Giada, “Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power,” *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*, pp. 87–112, **2013**.
- [112] A. Scalbert and G. Williamson, “Dietary intake and bioavailability of polyphenols,” *The Journal of nutrition*, vol. 130, no. 8, p. 2073S–2085S, **2000**.
- [113] G. R. Velderrain-Rodríguez, H. Palafox-Carlos, A. Wall-Medrano, J. F. Ayala-Zavala, C.-Y. O. Chen, M. Robles-Sánchez, H. Astiazaran-García, E. Alvarez-Parrilla, and G. A. González-Aguilar, “Phenolic compounds: their journey after intake,” *Food Funct.*, vol. 5, no. 2, pp. 189–197, **2014**.
- [114] L. Das, E. Bhaumik, U. Raychaudhuri, and R. Chakraborty, “Role of nutraceuticals in human health,” *Journal of food science and technology*, vol. 49, no. 2, pp. 173–183, **2012**.
- [115] F. Visioli, C. A. D. La Lastra, C. Andres-Lacueva, M. Aviram, C. Calhau, A. Cassano, M. D’Archivio, A. Faria, G. Favé, and V. Fogliano, “Polyphenols and human health: a prospectus,” *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 51, no. 6, pp. 524–546, **2011**.
- [116] M. Leopoldini, N. Russo, and M. Toscano, “The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants,” *Food Chemistry*, vol. 125, no. 2, pp. 288–306, **2011**.
- [117] C.-T. Ho, “Phenolic compounds in food,” ACS Publications, **1992**.
- [118] S. KARAKAYA, “Bioavailability of Phenolic Compounds,” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 44, no. 6, pp. 453–464, **2004**.
- [119] G. G. Duthie, P. T. Gardner, and J. A. M. Kyle, “Plant polyphenols: are they the new magic bullet?,” *Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 62, no. 3, pp. 599–603, **2003**.
- [120] A. Scalbert and G. Williamson, “Chocolate: Modern Science Investigates an Ancient Medicine,” *Journal of Medicinal Food*, vol. 3, no. 2, pp. 121–125, **2000**.
- [121] E. Haslam, “Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action,” *Journal of natural products*, vol. 59, no. 2, pp. 205–215, **1996**.
- [122] A. Scalbert, “Antimicrobial properties of tannins,” *Phytochemistry*, vol. 30, no. 12, pp. 3875–3883, **1991**.

- [123] M. M. Cowan, "Plant products as antimicrobial agents," *Clinical microbiology reviews*, vol. 12, no. 4, pp. 564–582, **1999**.
- [124] U. Matern, P. Lürer, and D. Kreuzsch, "Biosynthesis of coumarins," *Comprehensive natural products chemistry*, vol. 1, pp. 623–637, **1999**.
- [125] C. S. Yang, J. M. Landau, M.-T. Huang, and H. L. Newmark, "Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds," *Annual review of nutrition*, vol. 21, no. 1, pp. 381–406, **2001**.
- [126] G. F. Ferrazzano, I. Amato, A. Ingenito, A. Zarrelli, G. Pinto, and A. Pollio, "Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: A review," *Molecules*, vol. 16, no. 2, pp. 1486–1507, **2011**.
- [127] S. Parashar, H. Sharma, and M. Garg, "Antimicrobial and Antioxidant activities of fruits and vegetable peels: A review," *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry JPP*, vol. 3, no. 31, pp. 160–164, **2014**.
- [128] T. Ismail, P. Sestili, and S. Akhtar, "Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 143, no. 2, pp. 397–405, **2012**.
- [129] N. S. Al-Zoreky, "Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 134, no. 3, pp. 244–248, **2009**.
- [130] F. Afaq, M. Saleem, C. G. Krueger, J. D. Reed, and H. Mukhtar, "Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF- $\kappa$ B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice," *International Journal of Cancer*, vol. 113, no. 3, pp. 423–433, Jan. **2005**.
- [131] P. S. Negi and G. K. Jayaprakasha, "Antioxidant and Antibacterial Activities of *Punica granatum* Peel Extracts," *Food Microbiology and Safety*, vol. 68, no. 4, pp. 1473–1477, **2003**.
- [132] N. S. S. A. V. Kanagarla, L. J. Kuppast, T. Veerashekar, and C. L. Reddy, "A review on benefits and uses of *Vitis vinifera* (Grape)," *Research & Reviews in BioSciences*, vol. 7, no. 5, pp. 3–8, **2013**.
- [133] J. Shi, J. Yu, J. E. Pohorly, and Y. Kakuda, "Polyphenolics in Grape Seeds—Biochemistry and Functionality," *Journal of Medicinal Food*, vol. 6, no. 4, pp. 291–299, **2003**.
- [134] J. M. R. Da Silva, J. Rigaud, V. Cheynier, A. Cheminat, and M. Moutounet, "Procyanidin dimers and trimers from grape seeds," *Phytochemistry*, vol. 30, no. 4, pp. 1259–1264, **1991**.
- [135] C. Prieur, J. Rigaud, V. Cheynier, and M. Moutounet, "Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds," *Phytochemistry*, vol. 36, no. 3, pp. 781–784, **1994**.
- [136] A. V. S. Perumalla and N. S. Hettiarachchy, "Green tea and grape seed extracts - Potential applications in food safety and quality," *Food Research International*, vol. 44, no. 4, pp. 827–839, **2011**.
- [137] G. K. Jayaprakasha, T. Selvi, and K. K. Sakariah, "Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts," *Food Research International*, vol. 36, no. 2, pp. 117–122, **2003**.

- [138] M. U. Ashraf, G. Muhammad, M. A. Hussain, and S. N. A. Bukhari, "Cydonia oblonga M., A medicinal plant rich in phytonutrients for pharmaceuticals," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 7, no. JUN, pp. 1–20, **2016**.
- [139] O. Rop, J. Balík, V. Řezníček, T. Juríková, P. Škardová, P. Salaš, J. Sochor, J. Miček, and D. Kramářová, "Chemical characteristics of fruits of some selected quince (*Cydonia oblonga* Mill.) cultivars," *Czech Journal of Food Sciences*, **2011**.
- [140] S. Fattouch, P. Caboni, V. Coronea, C. Tuberoso, A. Angioni, S. Dessi, N. Marzouki, and P. Cabras, "Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia oblonga* Mill.) pulp and peel polyphenolic extracts.," *Journal of Agricultural and Food chemistry*, vol. 55, pp. 963–969, **2007**.
- [141] M. S. M. Hanafy and M. E. Hatem, "Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin)," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 34, no. 2–3, pp. 275–278, **1991**.
- [142] F. Forouzanfar, B. S. Fazly Bazzaz, and H. Hosseinzadeh, "Black cumin (*Nigella sativa*) and its constituent (thymoquinone): A review on antimicrobial effects," *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, vol. 17, no. 12, pp. 929–938, **2014**.
- [143] W. G. Goreja, *Black seed: nature's miracle remedy*. Karger Publishers, **2003**.
- [144] W. A. R. Thomson and R. E. Schultes, *Medicines from the Earth*. McGraw-Hill, **1978**.
- [145] C. Stockwell, *Nature's pharmacy: a history of plants and healing*. Random House (UK), **1988**.
- [146] S. M. Evans and M. M. Cowan, "Plant Products as Antimicrobial Agents," *Cosmetic science and technology series*, vol. 31, no. 4, pp. 205–232, **2006**.
- [147] D. Lin, M. Xiao, J. Zhao, Z. Li, B. Xing, X. Li, M. Kong, L. Li, Q. Zhang, Y. Liu, H. Chen, W. Qin, H. Wu, and S. Chen, "An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes," *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 21, no. 10, **2016**.
- [148] K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, and D. J. Bobilya, "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships," *The Journal of nutritional biochemistry*, vol. 13, no. 10, pp. 572–584, **2002**.
- [149] E. Tripoli, M. Giammanco, G. Tabacchi, D. Di Majo, S. Giammanco, and M. La Guardia, "The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health," *Nutrition Research Reviews*, vol. 18, no. 1, p. 98, **2005**.
- [150] C. D. Hufford, Y. Jia, E. M. Croom, I. Muhammed, A. L. Okunade, A. M. Clark, and R. D. Rogers, "Antimicrobial Compounds from *Petalostemum purpureum*," *Journal of Natural Products*, vol. 56, no. 11, pp. 1878–1889, Nov. **1993**.
- [151] G. A. Jones, T. A. McAllister, A. D. Muir, and K. J. Cheng, "Effects of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) Condensed Tannins on Growth and Proteolysis by Four Strains of Ruminant Bacteria.," *Applied and environmental microbiology*, vol. 60, no. 4, pp. 1374–8, Apr. **1994**.

- [152] S. Umar Lule and W. Xia, "Food Phenolics, Pros and Cons: A Review," *Food Reviews International*, vol. 21, no. 4, pp. 367–388, **2005**.
- [153] M. A. Fernández, M. D. García, and M. T. Sáenz, "Antibacterial activity of the phenolic acids fractions of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 53, no. 1, pp. 11–4, Jul. **1996**.
- [154] S. Cicerale, L. J. Lucas, and R. S. J. Keast, "Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 23, no. 2, pp. 129–135, **2012**.
- [155] Q. F. Hu, B. Zhou, J. M. Huang, X. M. Gao, L. D. Shu, G. Y. Yang, and C. T. Che, "Antiviral phenolic compounds from *Arundina graminifolia*," *Journal of Natural Products*, vol. 76, no. 2, pp. 292–296, **2013**.
- [156] R. Ubillas, S. D. Jolad, R. C. Bruening, M. R. Kernan, S. R. King, D. F. Sesin, M. Barrett, C. A. Stoddart, T. Flaster, J. Kuo, F. Ayala, E. Meza, M. Castañel, D. Mcmeekin, E. Rozhon, M. S. Tempesta, D. Barnard, J. Huffman, D. Smee, R. Sidwell, K. Soike, A. Brazier, S. Safrin, R. Orlando, P. T. M. Kenny, N. Berova, and K. Nakanishi, "SP-303, an antiviral oligomeric proanthocyanidin from the latex of *Croton lechleri* (Sangre de Drago)," *Phytomedicine*, vol. 1, no. 2, pp. 77–106, Sep. **1994**.
- [157] a Poshadri and A. Kuna, "Microencapsulation technology: A review," *The Journal of Research ANGRAU*, vol. 38, no. 1, pp. 86–102, **2010**.
- [158] R. Dubey, T. C. Shami, and K. U. Bhasker Rao, "2009 Microencapsulation technology and applications," *Defence Science Journal*, vol. 59, no. 1, pp. 82–95, **2009**.
- [159] N. Agnihotri, R. Mishra, C. Goda, and M. Arora, "Microencapsulation – A Novel Approach in Drug Delivery: A Review," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 2, no. 1, pp. 1–20, **2012**.
- [160] B. K. Green, "Oil-containing microscopic capsules and method of making them." Google Patents, 23-Jul-**1957**.
- [161] M. Koç, M. Sakin, and F. K. Ertekin, "Mikroenkapsülasyon ve Gıda Teknolojisinde Kullanımı," *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, vol. 16, no. 1, pp. 77–86, **2010**.
- [162] M. A. Augustin and Y. Hemar, "Nano-and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients," *Chemical society reviews*, vol. 38, no. 4, pp. 902–912, **2009**.
- [163] C. Heinzen, "Microencapsulation solve time dependent problems for foodmakers," *European Food and Drink Review*, vol. 3, no. 1, pp. 27–30, **2002**.
- [164] N. V. N. Jyothi, P. M. Prasanna, S. N. Sakarkar, K. S. Prabha, P. S. Ramaiah, and G. Y. Srawan, "Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency," *Journal of microencapsulation*, vol. 27, no. 3, pp. 187–97, **2010**. 7, no. 3, pp. 187–97, **2010**.
- [165] P. Venkatesan, R. Manavalan, and K. Valliappan, "Microencapsulation: a vital technique in novel drug delivery system," *Journal of Pharmaceutical Sciences*

and Research **2009**.

- [166] A. Gupta and B. Dey, "Microencapsulation for Controlled Drug Delivery: A Comprehensive Review," *Sunsari Technical College Journal*, vol. 1, no. 1, pp. 48–54, **2012**.
- [167] M. N. Singh, K. S. Y. Hemant, M. Ram, and H. G. Shivakumar, "Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery," *Research in pharmaceutical sciences*, vol. 5, no. 2, p. 65, **2010**.
- [168] K. Malleswari, R. B. D. Reddy, and M. Swathi, "Microencapsulation: a Review a Novel Approach in Drug Delivery," *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, vol. 3, no. 6, pp. 186–194, **2016**.
- [169] T. Higuchi, "Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 52, no. 12, pp. 1145–1149, **1963**.
- [170] G. Murtaza, M. Ahamd, N. Akhtar, and F. Rasool, "A comparative study of various microencapsulation techniques: Effect of polymer viscosity on microcapsule characteristics," *Pak. J. Pharm. Sci*, vol. 22, no. 3, pp. 291–300, **2009**.
- [171] P. B. O'Donnell and J. W. McGinity, "Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 28, no. 1, pp. 25–42, **1997**.
- [172] R. Langer and J. Folkman, "Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules," **1976**.
- [173] T. Nagai, Y. Machida, Y. Suzuki, and H. Ikura, "Method and preparation for administration to the mucosa of the oral or nasal cavity." Google Patents, 07-Oct-**1980**.
- [174] K. G. H. Desai and H. Jin Park, *Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients*, vol. 23, no. 7. **2005**.
- [175] G. A. Reineccius, "Flavor encapsulation," *Food Reviews International*, vol. 5, no. 2, pp. 147–176, **1989**.
- [176] F. Shahidi and X. Han, "Encapsulation of food ingredients," *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, vol. 33, no. 6, pp. 501–547, **1993**, no. 6, pp. 501–547, **1993**.
- [177] A. Gharsallaoui, G. Roudaut, O. Chambin, A. Voilley, and R. Saurel, "Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview," vol. 40, no. 9, pp. 1107–1121. **2007**.
- [178] Y.-F. Maa, P.-A. Nguyen, J. D. Andya, N. Dasovich, T. D. Sweeney, S. J. Shire, and C. C. Hsu, "Effect of spray drying and subsequent processing conditions on residual moisture content and physical/biochemical stability of protein inhalation powders," *Pharmaceutical research*, vol. 15, no. 5, pp. 768–775, **1998**.
- [179] Y.-F. Maa and S. J. Prestrelski, "Biopharmaceutical powders particle formation and formulation considerations," *Current pharmaceutical biotechnology*, vol. 1, no. 3, pp. 283–302, **2000**, 1, no. 3, pp. 283–302, **2000**.

- [180] J. Swarbrick, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York: Marcel Dekker, **2002**.
- [181] Z. Chen, Y. Fang, and Z. Zhang, "Synthesis and assessment of attractiveness and mating disruption efficacy of sex pheromone microcapsules for the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.)," *Chinese Science Bulletin*, vol. **2007** no. 10, pp. 1365–1371, **2007**.
- [182] D. R. Cowsar, "Novel fabric containing microcapsules of chemical decontaminants encapsulymers." Google Patents, 06-May. **1980**.
- [183] F. Nazzaro, P. Orlando, F. Fratianni, and R. Coppola, "Microencapsulation in food science and biotechnology," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 23, no. 2, pp. 182–186, **2012**.
- [184] P. M. M. Schrooyen, R. van der Meer, and C. G. De Kruif, "Microencapsulation: its application in nutrition," *Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 60, no. 4, pp. 475–479, **2001**.
- [185] M. Yongsheng, J. C. Pacan, Q. Wang, Y. Xu, X. Huang, A. Korenevsky, and P. M. Sabour, "Microencapsulation of bacteriophage felix o1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, no. 15, pp. 4799–4805, **2008**.
- [186] C. Dini, G. A. Islan, P. J. de Urraza, and G. R. Castro, "Novel biopolymer matrices for microencapsulation of phages: Enhanced protection against acidity and protease activity," *Macromolecular Bioscience*, vol. 12, no. 9, pp. 1200–1208, **2012**.
- [187] S. Matinkhoo, K. H. Lynch, J. J. Dennis, W. H. Finlay, and R. Vehring, "Spray-dried Respirable Powders Containing Bacteriophages for the Treatment of Pulmonary Infections," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 100, no. 12, pp. 5197–5205, Dec. **2011**.
- [188] D. Vandenheuvel, A. Singh, K. Vandersteegen, J. Klumpp, R. Lavigne, and G. Van Den Mooter, "Feasibility of spray drying bacteriophages into respirable powders to combat pulmonary bacterial infections," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 84, no. 3, pp. 578–582, **2013**.
- [189] S. S. Y. Leung, T. Parumasivam, F. G. Gao, N. B. Carrigy, R. Vehring, W. H. Finlay, S. Morales, W. J. Britton, E. Kutter, and H. K. Chan, "Production of Inhalation Phage Powders Using Spray Freeze Drying and Spray Drying Techniques for Treatment of Respiratory Infections," *Pharmaceutical Research*, vol. 33, no. 6, pp. 1486–1496, **2016**.
- [190] E. Vonasek, P. Le, and N. Nitin, "Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release," *Food Hydrocolloids*, vol. 37, pp. 7–13, **2014**.
- [191] L. N. Bell, "Stability testing of nutraceuticals and functional foods," in *Handbook of nutraceuticals and functional foods*, CRC Press, **2000**.
- [192] Z. Fang and B. Bhandari, "Encapsulation of polyphenols - A review," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 21, no. 10, pp. 510–523, **2010**.
- [193] S. Ersus and U. Yurdagel, "Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier," *Journal of Food Engineering*,

- vol. 80, no. 3, pp. 805–812, **2007**.
- [194] S. L. Kosaraju, L. D'ath, and A. Lawrence, "Preparation and characterisation of chitosan microspheres for antioxidant delivery," *Carbohydrate polymers*, vol. 64, no. 2, pp. 163–167, **2006**.
- [195] S. R. Georgetti, R. Casagrande, C. R. F. Souza, W. P. Oliveira, and M. J. V. Fonseca, "Spray drying of the soybean extract: Effects on chemical properties and antioxidant activity," *LWT-Food Science and Technology*, vol. 41, no. 8, pp. 1521–1527, **2008**.
- [196] S. L. Kosaraju, D. Labbett, M. Emin, I. KONCZAK, and L. Lundin, "Delivering polyphenols for healthy ageing," *Nutrition & Dietetics*, vol. 65, no. s3, pp. S48–S52, **2008**.
- [197] L. Deladino, P. S. Anbinder, A. S. Navarro, and M. N. Martino, "Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*," *Carbohydrate Polymers*, vol. 71, no. 1, pp. 126–134, **2008**.
- [198] T. G. Shutava, S. S. Balkundi, and Y. M. Lvov, "(–)-Epigallocatechin gallate/gelatin layer-by-layer assembled films and microcapsules," *Journal of colloid and interface science*, vol. 330, no. 2, pp. 276–283, **2009**.
- [199] S. Xiong, L. D. Melton, A. J. Easteal, and D. Siew, "Stability and antioxidant activity of black currant anthocyanins in solution and encapsulated in glucan gel," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 54, no. 17, pp. 6201–6208, **2006**.
- [200] F. Delgado-Vargas, A. R. Jiménez, and O. Paredes-López, "Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability," *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 40, no. 3, pp. 173–289, **2000**.
- [201] G. Gradinaru, C. G. Biliaderis, S. Kallithraka, P. Kefalas, and C. Garcia-Viguera, "Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition," *Food Chemistry*, vol. 83, no. 3, pp. 423–436, **2003**.
- [202] S. Tommasini, M. L. Calabro, R. Stancanelli, P. Donato, C. Costa, S. Catania, V. Villari, P. Ficarra, and R. Ficarra, "The inclusion complexes of hesperetin and its 7-rhamnoglucoside with (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 39, no. 3, pp. 572–580, **2005**.
- [203] M. T. Mercader-Ros, C. Lucas-Abellán, M. I. Fortea, J. A. Gabaldón, and E. Núñez-Delicado, "Effect of HP- $\beta$ -cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols," *Food Chemistry*, vol. 118, no. 3, pp. 769–773, **2010**.
- [204] M. L. Calabrò, S. Tommasini, P. Donato, D. Raneri, R. Stancanelli, P. Ficarra, R. Ficarra, C. Costa, S. Catania, and C. Rustichelli, "Effects of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroxyflavones," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 35, no. 2, pp. 365–377, **2004**.
- [205] C. Anselmi, M. Centini, M. Maggiore, N. Gaggelli, M. Andreassi, A. Buonocore, G. Beretta, and R. M. Facino, "Non-covalent inclusion of ferulic acid with  $\alpha$ -cyclodextrin improves photo-stability and delivery: NMR and

- modeling studies,” *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 46, no. 4, pp. 645–652, **2008**.
- [206] A. Barras, A. Mezzetti, A. Richard, S. Lazzaroni, S. Roux, P. Melnyk, D. Betbeder, and N. Monfilliette-Dupont, “Formulation and characterization of polyphenol-loaded lipid nanocapsules,” *International journal of pharmaceuticals*, vol. 379, no. 2, pp. 270–277, **2009**.
- [207] T.-H. Wu, F.-L. Yen, L.-T. Lin, T.-R. Tsai, C.-C. Lin, and T.-M. Cham, “Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles,” *International journal of pharmaceuticals*, vol. 346, no. 1, pp. 160–168, **2008**.
- [208] I. Bala, V. Bhardwaj, S. Hariharan, S. V. Kharade, N. Roy, and M. N. V Ravi Kumar, “Sustained release nanoparticulate formulation containing antioxidant-ellagic acid as potential prophylaxis system for oral administration,” *Journal of drug targeting*, vol. 14, no. 1, pp. 27–34, **2006**.
- [209] R. J. Martha and A. M. Clokie, “Bacteriophages: methods and protocols, volume 1: isolation, characterization, and interaction.” USA: Human Press, **2008**.
- [210] J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual.*, no. Ed. 2. Cold spring harbor laboratory press, **1989**.
- [211] E. H. Endo, T. Ueda-Nakamura, C. V. Nakamura, and B. P. D. Filho, “Activity of spray-dried microparticles containing pomegranate peel extract against *Candida albicans*,” *Molecules*, vol. 17, no. 9, pp. 10094–10107, **2012**no. 9, pp. 10094–10107, **2012**.
- [212] K. E. Bowey, “Alginate microparticles produced by spray drying for oral insulin delivery,” M.Sc. Thesis, Queetario, Canada. **2009**.
- ck, “Methods for drying bacteriophage and bacteriophage-containing compositions, the resulting dry compositions, and methods of use.” Google Patents, 06-Aug. **2013**.
- [214] M.-C. Chopin, “Resistance of 17 mesophilic lactic *Streptococcus* bacteriophages to pasteurization and spray-drying,” *Journal of Dairy Research*, vol. 47, no. 1, pp. 131–139, **1980**.
- [215] Ö. Menteş Yılmaz, “Türkiye’de Yetiştirilen Başlıca Buğday Çeşitlerinin Antioksidan Aktivitelerinin Ve Fenolik Asit Dağılımlarının Belirlenmesi Ve Ekmeğin Nar Kabuğu Ekstraktı İle Zenginleştirilmesi,” Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara. **2011**.
- [216] L. Yu, S. Haley, J. Perret, and M. Harris, “Antioxidant properties of hard winter wheat extracts,” *Food Chemistry*, vol. 78, no. 4, pp. 457–461, Sep. **2002**.
- [217] D. a. Samac, A. M. Willert, M. J. McBride, and L. L. Kinkel, “Effects of antibiotic-producing *Streptomyces* on nodulation and leaf spot in alfalfa,” *Applied Soil Ecology*, vol. 22, no. 1, pp. 55–66, **2003**.
- [218] M. Balouiri, M. Sadiki, and S. K. Ibsouda, “Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review,” *Journal of Pharmaceutical Analysis*, vol. 6, no. 2, pp. 71–79, **2016**.
- [219] B. Cilek, A. Luca, V. Hasirci, S. Sahin, and G. Sumnu, “Microencapsulation of

- phenolic compounds extracted from sour cherry pomace: Effect of formulation, ultrasonication time and core to coating ratio," *European Food Research and Technology*, vol. 235, no. 4, pp. 587–596, **2012**.
- [220] H. Adi, P. M. Young, H. Chan, P. Stewart, H. Agus, and D. Traini, "Cospray dried antibiotics for dry powder lung delivery," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 97, no. 8, pp. 3356–3366, **2008**.
- [221] C. G. de Los Reyes-Gavilán, G. K. Limsowtin, L. Séchaud, M. Veaux, and J. P. Accolas, "Evidence for a Plasmid-Linked Restriction-Modification System in *Lactobacillus helveticus*," *Applied and environmental microbiology*, vol. 56, no. 11, pp. 3412–9, Nov. **1990**.
- [222] V. B. Suárez, A. Quiberoni, A. G. Binetti, and J. A. Reinheimer, "Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinian dairy industries.," *Journal of food protection*, vol. 65, no. 10, pp. 1597–604, Oct. **2002**.
- [223] B. Çilek, "Microencapsulation Of Phenolic Compounds Extracted From Sour Cherry (*Prunus Cerasus* L.) Pomace," M.Sc. thesis, The Graduate School Of Natural And Applied Sciences Of Middle East Technical University, Ankara. **2012**.
- [224] A. M. Earl, R. Losick, and R. Kolter, "Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*," *Trends in microbiology*, vol. 16, no. 6, pp. 269–75, Jun. **2008**.
- [225] J. M. van Dijl and M. Hecker, "Bacillus subtilis: from soil bacterium to super-secreting cell factory," *Microbial Cell Factories*, vol. 12, no. 1, p. 3, Jan. **2013**.
- [226] U.S. Food And Drug Administration Center for Food Safety & Applied Nutrition, "Partial List of Microorganisms And Microbiological-Derived Ingredients That Are Used In Foods," **2001**.
- [227] E. C. Jensen, H. S. Schrader, B. Rieland, T. L. Thompson, K. W. Lee, K. W. Nickerson, and T. A. Kokjohn, "Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*," *Applied and environmental microbiology*, vol. 64, no. 2, pp. 575–80, Feb. **1998**.
- [228] A. M. Comeau, E. Buenaventura, and C. A. Suttle, "A persistent, productive, and seasonally dynamic vibriophage population within Pacific oysters (*Crassostrea gigas*)," *Applied and environmental microbiology*, vol. 71, no. 9, pp. 5324–31, Sep. **2005**.
- [229] L. Bielke, S. Higgins, A. Donoghue, D. Donoghue, and B. M. Hargis, "Salmonella Host Range of Bacteriophages That Infect Multiple Genera," *Poultry Science*, vol. 86, no. 12, pp. 2536–2540, Dec. **2007**.
- [230] Z. Akkaya, J. Schröder, S. Tavman, S. Kumcuoglu, H. P. Schuchmann, and V. Gaukel, "Effects Of Spray Drying On Physical Properties, Total Phenolic Content And Antioxidant Activity Of Carob Molasses," *International Journal of Food Engineering*, vol. 8, no. 4, **2012**.
- [231] A. Lee, R. Eschenbruch, and J. Waller, "Effect of phenolic compounds, ethyl alcohol, and sodium metabisulphite on the lytic activity of phage PL-1 on a *Lactobacillus casei* S strain," *Canadian journal of microbiology*, vol. 31, no. 9, pp. 873–875, **1985**.

- [232] J. Morita, "Inactivation of bacteriophages by polyphenols in the presence of cupric ion," *Agricultural and biological chemistry*, vol. 52, no. 7, pp. 1669–1673, **1988**.
- [233] E. L. Ellis and M. Delbrück, "THE GROWTH OF BACTERIOPHAGE.," *The Journal of general physiology*, vol. 22, no. 3, pp. 365–84, Jan. **1939**.
- [234] E. M. Ryan, M. Y. Alkawareek, R. F. Donnelly, and B. F. Gilmore, "Synergistic phage-antibiotic combinations for the control of *Escherichia coli* biofilms in vitro," *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, vol. 65, no. 2, pp. 395–398, **2012**.
- [235] J. Koo, A. DePaola, and D. L. Marshall, "Effect of simulated gastric fluid and bile on survival of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio vulnificus* phage.," *Journal of food protection*, vol. 63, no. 12, pp. 1665–9, **2000**.
- [236] F. L. Nobrega, A. R. Costa, J. F. Santos, M. F. Siliakus, J. W. M. van Lent, S. W. M. Kengen, J. Azeredo, and L. D. Kluskens, "Genetically manipulated phages with improved pH resistance for oral administration in veterinary medicine," *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, p. 39235, **2016**.

# ÖZGEÇMİŞ

## Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Emine Kübra TAYYARCAN

Doğum Yeri : Altındağ/Ankara

Medeni Hali : Bekar

E-posta : [gdkbr09@hacettepe.edu.tr](mailto:gdkbr09@hacettepe.edu.tr)

Adresi : Hacettepe Üniversitesi Beytepe Kampüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Araştırma Laboratuvarı 1

## Eğitim

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Lise : Betül Can Anadolu Lisesi

## Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (YDS:89)

## İş Deneyimi

2013 - Arolez Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş. (Stajyer)

2012 - Türk Standardları Enstitüsü Gıda Laboratuvarı (Stajyer)

## Deneyim Alanları

Mikrobiyoloji, Biyoteknoloji

## Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

2510 - TUBITAK-MHESR Ortaklık Programı, "Investigation of the Synergism between Phage-mediated Biocontrol of Bacteria (PHAGOTHERAPY) and Plant Bioactive Antimicrobials (PHYTOTHERAPY): *in vitro* and *in vivo* Trials". Proje No: 114Z680. Bütçe: 260.360 TL.

## Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

**Tezden Üretilmiş, Tebliğ ve /veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar**

TAYYARCAN, Emine Kubra, ACAR-SOYKUT, Esra, HAMILA, Altaf, BOYACI, İsmail Hakkı, FATTOUCH, Sami. "The use of phenolic compounds with phage therapy". Phage Therapy 2016 World Congress. Haziran 2-3, 2016 - Paris, Fransa. (Sözlü sunum)





HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 18/06/2017

Tez Başlığı / Konusu: GIDA KAYNAKLI PATOJEN BAKTERİLERİN BİYOKONTROLÜNDE FAJ TERAPİ VE FİTOTERAPİNİN BİRLİKTE KULLANIMI

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 94 sayfalık kısmına ilişkin, 18/6/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 1 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: EMİNE KÜBRA TAYYARCAN  
Öğrenci No: N14121915  
Anabilim Dalı: GIDA MÜHENDİSLİĞİ  
Programı: GIDA MÜHENDİSLİĞİ  
Statüsü:  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

18.6.2017

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR.

(Unvan, Ad Soyad, İmza)