





**GIDALARDA KULLANILMAK ÜZERE BAKTERİYOFAJ  
TEMELLİ ENKAPSÜLASYON YÖNTEMLERİNİN  
İNCELENMESİ, OPTİMİZASYON VE DEPOLAMA  
ETKİNLİĞİ TAYİNİ**

**INVESTIGATION, OPTIMIZATION AND STORAGE  
EFFICIENCY OF BACTERIOPHAGE BASED  
ENCAPSULATION METHODS FOR USE IN FOODS**

**BANU SEZER**

**PROF. DR. İSMAİL HAKKI BOYACI**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.









*“Rivers know this: there is no hurry. We shall get there some day”*

*— A.A. Milne, Winnie-the-Pooh*

Bu uzun yolda yanımda ve ailemden olanlara ...











# ÖZET

## GIDALARDA KULLANILMAK ÜZERE BAKTERİYOFAJ TEMELLİ ENKAPSÜLASYON YÖNTEMLERİNİN İNCELENMESİ, OPTİMİZASYON VE DEPOLAMA ETKİNLİĞİ TAYİNİ

**Banu SEZER**

**Doktora, Gıda Mühendisliği Bölümü**

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

**Temmuz 2023, 188 sayfa**

Bakteriyofajların, gıda muhafaza ve güvenliğine ilişkin biyokontrol uygulamalarında etkili antimikrobiyal potansiyelinden yararlanmak, heyecan verici bir gelecek beklentisi olmakla birlikte, başarı için, güvenli ve etkili bakteriyofaj ürünlerinin üretilmesine ihtiyaç vardır. Bakteriyofajların yaygın kullanımı, orta ve uzun süreli depolama ve kolay nakliye için gelişmiş metodolojiler gerektirmektedir. Seçilen yöntemin özellikleri, formülasyonlar, proses koşullarının işlem yapılacak bakteriyofaja yüksek özgünlük göstermesi, alternatif yöntemlerin üretilme ihtiyacını beraberinde getirmektedir. Bu tez kapsamında bakteriyofajların gıda örneklerinde biyokontrol ajanı olarak kullanımına ilişkin iki temel başlıkta araştırma gerçekleştirilmiştir; i) dondurarak kurutma (liyofilizasyon), püskürtmeli kurutma ve vakum küpük kurutma yöntemleri ile bakteriyofajların kurutulması, kurutma proses etkisinin izlenmesi ve depolama stabilitesinin incelenmesi, ii) kuru toz ve film formda hazırlanan bakteriyofaj

preparatlarının hayvansal ve bitkisel gıdalar üzerindeki etkinliğinin incelenmesi. Bu tez kapsamında literatürde ilk kez kurutma işlemi sonrası belirli süre ve sıcaklıkta depolama gerçekleştirilmiş toz bakteriyofaj formülasyonlarının etkinliği gerçek gıda örneklerinde test edilmiştir.

Tez kapsamında, bakteriyofaj tozlarının üretiminde liyofilizasyon ve püskürtmeli kurutma yöntemlerinin kullanımı, formülasyon tasarımı, proses kayıpları ve iki farklı sıcaklıkta depolama stabilitesi değerlendirilmiştir. Liyofilizasyon çalışması kapsamında sakkaroz, mannitol, polietilenglikol ve jelatin içeren sakkaroz karışımları ile bakteriyofaj kokteyli karıştırılarak hazırlanan 12 farklı formülasyon araştırılmıştır. Liyofilizasyon işlemi sırasında, kullanılan kriyoprotektanlarda bakteriyofaj titresinde 0,59-2,35 log POB arasında bir azalma gözlenmiştir. Liyofilizasyon çalışması sonucunda, 4±1°C ve 25±1°C'de bakteriyofaj yüklü 0,3 M sakkaroz jelatin karışımı, 12 ay depolama sonunda diğer kriyoprotektanlar ve sıvı bakteriyofaj kokteyline göre önemli ölçüde daha az bakteriyofaj titre kaybı ( $p<0,05$ ) sergilemiştir. Püskürtmeli kurutma çalışması kapsamında ise mannitol, kazein, yağsız süt tozu ve maltodekstrin içeren 12 formülasyonda bakteriyofaj kokteyli ile formülasyonlar hazırlanmıştır. Püskürtmeli kurutma işlemi sırasında, kullanılan ekspiyanlarda bakteriyofaj titresinde 1,19-1,95 log POB azalma gözlenmiştir. Seçilen ekspiyanlardan bakteriyofaj yüklü % 15 maltodekstrin ve % 5 kazein sırasıyla 4±1°C ve 25±1°C'de 12 ay depolama sonunda diğer ekspiyanlar ve sıvı bakteriyofaj kokteyline göre önemli ölçüde daha az bakteriyofaj titre kaybı ( $p<0,05$ ) göstermiştir. Vakum köpük kurutma kapsamında, farklı oranlarda sığır serum albumini+gliserol ve sığır serum albumini+sakkaroz formülasyonları kullanılarak *S. Enteritidis* F5-4 bakteriyofajının kurutulma süreci ve kurutma proses kayıpları incelenmiştir. Sığır serum albumini ve sakkaroz formülasyonu için üç farklı proses koşulunda bakteriyofaj titresindeki düşüş izlenmiş, optimum proses koşulları belirlenmiş ve Proses II (35°C , 0,06 MPa, 5 saat) koşullarında, % 15 (a/h) sığır serum albumini + % 10 (a/a) sakkaroz içeren formülasyonda 0,68 log POB titre düşüşü en başarılı sonuç olarak gözlenmiştir.

Liyofilizasyon ve püskürtmeli kurutma çalışmalarında en yüksek stabiliteye sahip toz formülasyonunun, çiğ tavuk eti örneklerinde 4±1°C'de 6 gün süreyle depolaması sonunda

antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, çiğ tavuk göğüs etinde depolama sonunda sırasıyla infeksiyon çokluğu (MOI) 100 ve 1000'de yeni hazırlanan bakteriyofaj tozları için 1,86 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 2,18 log KOB/cm<sup>2</sup>, 4±1°C'de 10 ay boyunca depolanan liyofilize bakteriyofaj tozları için 1,08 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 1,26 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 25±1°C'de 10 ay boyunca depolanan liyofilize bakteriyofaj tozları için 0,66 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 1,00 log KOB/cm<sup>2</sup> azalma sergileyerek *Salmonella* sayısında etkin bir düşüş ortaya koymuştur. Püskürtmeli kurutma çalışmasında elde edilen sonuçlara göre, çiğ tavuk göğüs etinde depolama sonunda sırasıyla MOI 100 ve 1000'de yeni hazırlanmış kuru tozlardan % 15 maltodekstrin için 1,85 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 2,13 log KOB/cm<sup>2</sup> ve % 5 kazein için 1,78 log KOB ve 2,09 log KOB/cm<sup>2</sup> azalma, 4±1°C'de 10 ay boyunca depolanan püskürtülerek kurutulmuş bakteriyofaj tozları için 1,09 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 1,30 log KOB/cm<sup>2</sup> azalma ve 25±1°C'de 10 ay boyunca depolanan tozlar için 0,72 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 0,95 log KOB/cm<sup>2</sup> azalma sergileyerek *Salmonella* sayısında etkin bir düşüş ortaya koymuştur. Film formda hazırlanan bakteriyofaj preparatlarının araştırılması kapsamında, 4±1°C'de 5 günlük depolama süresi boyunca dört farklı biyopolimer ve bakteriyofaj kokteyli kullanılarak daldırma yöntemi ile kaplanan çilek örneklerinin fizikokimyasal kalitesi, *Salmonella*'ya karşı antimikrobiyal aktivitenin etkinliği ve bakteriyofaj stabilitesi araştırılmıştır. Kullanılan biyopolimerler peynir altı suyu protein konsantresi (WPC), karboksimetil selüloz, kitosan ve sodyum aljinattır. Çilek örneklerinin renk, pH değeri ve titre edilebilir asitliği (TA) ile depolama sırasında bakteriyofajların stabilitesi ve antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Tüm biyopolimerler arasında, WPC kaplama, pH değerinde en az yükselme ve TA'da en az düşüşü göstermiştir. Depolama sırasında, bakteriyofaj kokteyli yüklenmiş WPC kaplanan örneklerde 0,7 log POB/g azalma gözlenmiştir. En yüksek antimikrobiyal aktivite, MOI 1000 olduğu durumda 5 gün sonra 3,1 log KOB/g azalma ile bakteriyofaj kokteyli yüklenmiş WPC kaplanmış örneklerinde gözlenmiştir. Sonuçlar ışığında, bakteriyofaj kokteyli yüklü WPC kaplamanın soğuk depolama süresince kaplanmamış örneklere kıyasla çok daha iyi fizikokimyasal ve mikrobiyolojik kaliteye sahip olduğu; bu nedenle, çileklerin hasat sonrası depolanmasında kullanılabilmesi gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Bakteriyofaj, dondurarak kurutma, püskürtmeli kurutma, antimikrobiyal etki, *Salmonella*

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION, OPTIMIZATION AND STORAGE EFFICIENCY OF BACTERIOPHAGE BASED ENCAPSULATION METHODS FOR USE IN FOODS**

**Banu SEZER**

**Doctor of Philosophy, Department of Food Engineering**

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

**July 2023, 188 pages**

It is known that bacteriophages are effective antimicrobial agents in biocontrol applications related to food preservation and safety. While exploiting this potential is an exciting future prospect, there is an urgent need to produce safe and effective bacteriophage products to be successful. The widespread use of bacteriophages requires advanced methodologies for medium and long-term storage and easy transportation. The characteristics of the chosen method, formulations, and high specificity of the process conditions to the bacteriophage to be treated bring the need to produce alternative methods. Within the scope of this thesis, research has been carried out under two main headings regarding the use of bacteriophages as biocontrol agents in food samples: i) drying of bacteriophages via freeze drying (lyophilization), spray drying and vacuum foam drying method, monitoring the drying process effect and investigation of storage stability, ii) investigation of antimicrobial activity of dried powders in raw chicken meat



and bacteriophage-based edible coating for the biocontrol of *Salmonella* in strawberry samples. Within the scope of this thesis, for the first time in the literature, the effectiveness of powder bacteriophage formulations, which were stored for a certain time and temperature after drying, was tested in real food samples.

In this study, it is aimed to evaluate the use of freeze drying, spray drying and vacuum foam drying methods in the production of bacteriophage powders, formulation design, storage stability and activity at two different temperatures. In the lyophilization, 12 different formulations containing bacteriophage cocktail were prepared and the cryoprotectants at different concentrations used can be listed as follows: sucrose, mannitol, polyethyleneglycol, and sucrose gelatin mixture. During the lyophilization process, a decrease in the bacteriophage titer of 0.59-2.35 log PFU was observed in the cryoprotectants used. The phage-loaded 0.3 M sucrose gelatin mixture at  $4\pm 1$  °C and  $25\pm 1$  °C displayed significantly less phage titer loss ( $p<0.05$ ) than the other excipients and liquid phage cocktail at the end of the 12 months storage. In the spray drying, phage cocktails containing different amounts of mannitol, casein, skimmed milk and maltodextrin was studied. During the spray drying process, 1.19-1.95 log PFU reduction in bacteriophage titer was observed in the excipients used. Among the excipients, the phage-loaded 15% maltodextrin and 5% casein displayed significantly less phage titer loss ( $p<0.05$ ) than the other excipients and liquid phage cocktail at the end of the 12 months storage period at  $4\pm 1$  °C and  $25\pm 1$  °C, respectively. The effect of vacuum foam drying process, which allows drying under mild conditions, on drying process losses and bacteriophage titer was investigated. In this study, drying of *S. Enteritidis* F5-4 bacteriophage in two different formulations was studied using bovine serum albumin+glycerol and bovine serum albumin+sucrose formulations. For bovine serum albumin+sucrose formulation, decrease in bacteriophage titer was observed in three different process conditions and 0.68 log PFU titer reduction in formulation containing 15% (a/h) bovine serum albumin + 10% (h/h) sucrose under Process II ( $35\pm 1$  °C, 0.06 MPa, 5 h) conditions observed as the most successful result.

The effect of the most stable bacteriophage powder formulation on the biocontrol of *Salmonella* was investigated after 6 days of storage at  $4\pm 1$  °C in raw chicken meat

samples. In the lyophilization study, the results showed that there were significant reductions of *Salmonella* at the end of the storage in chicken meat for newly prepared phage powder (1.86 log CFU/cm<sup>2</sup> and 2.18 log CFU/cm<sup>2</sup>), lyophilized phage powders stored at 4±1 °C (1.08 log CFU/cm<sup>2</sup> and 1.26 log CFU/cm<sup>2</sup>) and stored at 25±1 °C (0.66 log CFU/cm<sup>2</sup> and 1.00 log CFU/cm<sup>2</sup>) for 10 months at MOI 100 and 1000, respectively. In the spray drying study, the results showed that there were significant reductions of *Salmonella* at the end of the storage in chicken meat for newly prepared dried phage powder containing 15% maltodextrin (1.85 log CFU/cm<sup>2</sup> and 2.13 log CFU/cm<sup>2</sup>) and 5% casein (1.78 log CFU/cm<sup>2</sup> and 2.09 log CFU/cm<sup>2</sup>) and spray dried phage powders stored at 4±1 °C (1.09 log CFU/cm<sup>2</sup> and 1.30 log CFU/cm<sup>2</sup>) and 25±1 °C (0.72 log CFU/cm<sup>2</sup> and 0.95 log CFU/cm<sup>2</sup>) for 10 months at MOI 100 and 1000, respectively. Within the scope of the investigation of bacteriophage preparations prepared in film form, the physicochemical quality and the effectiveness of antimicrobial activity against *Salmonella* and phage stability of dip-coated strawberries were investigated using bacteriophage cocktail with four different biopolymers for a period of five days at 4±1°C. The biopolymers used in this study were whey protein concentrate (WPC), carboxymethyl cellulose, chitosan, and sodium alginate. The color, pH, and titratable acidity (TA) of strawberry samples and the stability and antimicrobial activity of bacteriophages during storage were also investigated. Amongst all the biopolymers, WPC coating showed the least escalation in pH and the least decrease in TA. During storage, 0.7 log PFU/g reduction in WPC coating with the bacteriophage cocktail was observed. The highest antimicrobial effect was observed in WPC with a reduction of 3.1 log CFU/g after 5 days at MOI 1000. In the light of the results, it was concluded that the phage loaded WPC coating had much better physicochemical and microbiological quality during refrigerated storage; therefore, it could be used effectively to extend the postharvest life of strawberries.

**Keywords:** Bacteriophage, freeze drying, spray drying, antimicrobial effect, *Salmonella*

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam, her aşamada ilgi, destek ve yardımını esirgemeyen değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI yönetiminde gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte göstermiş olduğu destek, ilgi, değerli katkıları, sabrı ve motivasyonu, her seferinde yeniden başlamaya yetecek gücü bulmam için gösterdiği gayretleri, bilime ve emeğe olan saygı ve rehberliği için değerli hocama en derin teşekkürlerimi sunarım.

Yürüttüğüm çalışmanın tüm aşamalarında ilgi, destek ve tecrübeleri ile süreç boyunca yanımda olan Sayın Doç. Dr. Esra ACAR SOYKUT ve Sayın Doç. Dr. Fahriye Ceyda DUDAK ŞEKER'e şükranlarımı sunarım.

Akademik hayatın ilk adımlarında tanışma şansına eriştiğim, ışığı ile etrafını aydınlatan, iyi ve kötü günlerde beraber yürüdüğümüz yolda ailemden olan, yol arkadaşım, dostum ve tanıdığım kalbi en güzel insanlar biri olan Emine Kübra TAYYARCAN'a çok teşekkür ederim. Yüksek lisans çalışmalarım kapsamında tanışma şansına eriştiğim, desteğini hep yanımda hissettiğim her zaman yanımda olan, yüzümü güldüren, yol arkadaşım, değerli dostum Doç. Dr. Gonca BİLGE'ye gönülden teşekkür ederim.

Doktora sürecimde, ilgi, destek, motivasyon ve bilgisini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan çok büyük keyif duyduğum, her zaman yanımda olduklarını hissettiğim değerli ekip arkadaşlarımlarım Eylül EVRAN, Pervin ARI AKIN, Burcu GÜVEN, Elif ERCİOĞLU BÜLBÜL, Esra EKİZ, Kübra GÜVEN, Zeyneb GÜNEYSU, Duygu ÖZER GENİŞ, Aybüke Ayşe ERTÜRK ve güverte laboratuvarının birbirinden sıcak ve güzel insanlardan oluşan ekibine çok teşekkür ederim. Süreç boyunca göstermiş oldukları destek ve yardımları için NANOSENS A.Ş.'de birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum tüm çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Bu uzun yolculukta her zaman yanımda olan, her şeyden çok sevdiğim biricik annem Ayhan SEZER, babam Tacettin SEZER ve abim Burak SEZER'e tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu tez çalışması süresince beni, YÖK 100/2000 Doktora Burs programı kapsamında destekleyen Yükseköğretim Kurulu'na saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xviii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Bakteriyofajlar.....	5
2.1.1. Bakteriyofajlar ve Kısa Tarihçesi.....	5
2.1.2. Temel Bakteriyofaj Biyolojisi.....	7
2.1.3. Bakteriyofajların Yaşam Döngüleri .....	10
2.1.4. Bakteriyofajların Kimyasal ve Fiziksel Ajanlara Karşı Hassasiyeti .....	11
2.2. Enfeksiyon Sürecine Genel Bakış .....	12
2.2.1. Adsorpsiyon .....	13
2.2.2. Penetrasyon .....	14
2.2.3. Konakçıdan Bakteriyofaj Yönlü Metabolizmaya Geçiş.....	14
2.2.4. Morfogenez .....	15
2.2.5. Hücre Lizizi.....	15
2.3. Bakteriyofajlar ve Güvenlik.....	16
2.4. Bakteriyofajlar ve Gıda .....	18
2.4.1. Patojenler için Biyokontrol Ajanları Olarak Bakteriyofajlar .....	20
2.4.2. Gıdalarda <i>Salmonella</i> ve Bakteriyofaj Uygulamaları .....	22
2.5. Gıdalarda için Yenilebilir Kaplama ve Bakteriyofaj Uygulamaları.....	26
2.5.1. Yenilebilir Kaplamanın İşlevleri.....	28
2.5.2. Yenilebilir Kaplama Yapımında Kullanılan Malzemeler .....	29

2.5.2.1. Bitkisel Kaynaklar .....	29
2.5.2.2. Hayvansal Kaynaklar .....	30
2.5.3. Yenilebilir Kaplama – Bakteriyofaj Çalışmaları .....	32
2.7. Bakteriyofaj Depolama ve Stabilite .....	44
2.7.1. Enkapsülasyon Yolu ile Bakteriyofajların Korunması ve Depolanması .....	46
2.7.1.1. Püskürtme ile Kurutma .....	50
2.7.1.2. Dondurarak Kurutma (Liyofilizasyon) .....	55
2.7.1.3. Vakum Köpük Kurutma.....	64
2.8. Bakteriyofajlar, Güvenlik ve Ticari Uygulamalar .....	72
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	81
3.1. Bakteriyofajların Farklı Enkapsülasyon Yöntemleri ile Kuru Formlarının Hazırlanması .....	81
3.1.1. Dondurarak Kurutma (Liyofilizasyon) ve Püskürtmeli Kurutma.....	81
3.1.1.1. Kimyasal Malzemeler .....	81
3.1.1.2. Bakteri Suşları ve Bakteriyofaj Kokteylinin Hazırlanması .....	81
3.1.1.3. Bakteriyofajların Konakçı Skalasının Belirlenmesi ve Morfolojik Karakterizasyonu .....	82
3.1.1.4. Dondurarak Kurutma (Liyofilizasyon) Formülasyonlarının Hazırlanması ve Liyofilizasyon İşlemi.....	83
3.1.1.5. Püskürtmeli Kurutma Formülasyonlarının Hazırlanması ve Püskürtmeli Kurutma İşlemi .....	84
3.1.2. Vakumla Köpük Kurutma.....	84
3.1.2.1. Kimyasal Malzemeler .....	84
3.1.2.2. Bakteri Suşu ve Bakteriyofajın Hazırlanması.....	85
3.1.2.3. Formülasyonların Hazırlanması.....	85
3.1.2.4. Proses Koşullarının İncelenmesi.....	87
3.1.3. İstatistiksel Analizler .....	88
3.2. Bakteriyofaj Preparatlarının Gıdalarda Kullanımı.....	89
3.2.1. Tavuk Etinde <i>Salmonella</i> 'ya Karşı Liyofilizasyon ve Püskürtmeli Kurutma ile Hazırlanan Bakteriyofaj Tozlarının Kullanımı.....	89
3.2.1.1. İstatistiksel Analizler .....	91

3.2.2. Çileklerde <i>Salmonella</i> 'nın Biyokontrolü için Bakteriyofaj Tabanlı Yenilebilir Kaplamaların İncelenmesi .....	91
3.2.2.1. Kimyasal Malzemeler .....	91
3.2.2.2. Meyve Temini .....	91
3.2.2.3. Kaplama Formülasyonlarının Hazırlanması .....	92
3.2.2.4. Çileklerin Kaplanması .....	93
3.2.2.5. Mikrobiyal Analizler .....	94
3.2.2.6. Çilek Örneklerinin Fizikokimyasal Analizleri .....	94
3.2.2.8. İstatistiksel Analizleri .....	95
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA .....	96
4.1. Bakteriyofajların Genel Özellikleri .....	96
4.2. Farklı Kurutma Yöntemleri ile Bakteriyofajların Kurutulması, Proses Kayıpları ve Depolama Stabilitésinin İncelenmesi .....	100
4.2.1. Dondurarak Kurutma ile Bakteriyofajların Kurutulması ve Depolama Sırasında Etkinliğinin İncelenmesi .....	100
4.2.2. Püskürtmeli Kurutma ile Bakteriyofajların Kurutulması ve Depolama Sırasında Etkinliğinin İncelenmesi .....	111
4.2.3. Vakum Köpük Kurutma ile Bakteriyofajların Kurutulması ve Etkinliğinin İncelenmesi .....	120
4.2.3.1. Kimyasalların Etkisinin Değerlendirilmesi .....	120
4.2.3.2. Köpük Oluşumu ve Vakumla Köpük Kurutma Etkisinin Değerlendirilmesi .....	123
4.2.4. Kurutma Yöntemlerine İlişkin Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi .....	137
4.3. Bakteriyofaj Preparatlarının Gıdalarda Kullanımının İncelenmesi .....	141
4.3.1. Tavuk Etinde Liyofilize Bakteriyofaj Tozunun Antimikrobiyal Etkinliğinin İncelenmesi .....	141
4.3.2. Tavuk Etinde Püskürtülerek Kurutulmuş Bakteriyofaj Tozunun Antimikrobiyal Etkinliğinin İncelenmesi .....	144
4.3.3. Çileklerde <i>Salmonella</i> 'nın Biyokontrolü için Bakteriyofaj Temelli Yenilebilir Kaplama Kullanımının İncelenmesi .....	148
4.3.3.1. Çilek Kalitesinin Değerlendirilmesi .....	148
4.3.3.2. Mikrobiyal Analizlerin Değerlendirilmesi .....	152

5. YORUM.....	158
6. KAYNAKLAR .....	164
EKLER.....	186
EK 1 – Tezden Türetilmiş Yayınlar.....	186
EK 2 – Tez Çalışması Orjinallik Raporu .....	187
ÖZGEÇMİŞ .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	Polistiren plaka üzerine yerleştirilmiş tavuk eti örnekleri.....	90
Şekil 3.2.	Kaplama için hazırlanan çilek örnekleri.....	93
Şekil 3.3.	Kaplama sonrası çilek örnekleri .....	94
Şekil 4.1.	<i>S. Enteritidis</i> F5-4 bakteriyofajına ait TEM görüntüsü .....	97
Şekil 4.2.	<i>S. Typhimurium</i> L2-1 bakteriyofajına ait TEM görüntüsü.....	97
Şekil 4.3.	<i>S. Typhimurium</i> ICB1-1 bakteriyofajına ait TEM görüntüsü .....	97
Şekil 4.4.	Liyofilizasyon sonrası sakkaroz (0,3 M) örnekleri .....	101
Şekil 4.5.	Liyofilizasyon sonrası sakkaroz (0,3 M) + %1 jelatin örnekleri.....	101
Şekil 4.6.	Liyofilizasyon sonrası PEG (%1) örnekleri .....	102
Şekil 4.7.	Liyofilizasyon sonrası mannitol (0,3 M) örnekleri .....	102
Şekil 4.8.	4±1°C’de 12 aylık depolama sırasında farklı kriyoprotektanların bakteriyofaj stabilitesi. (a) 0-4 ay (b) 5-12 ay. Her çubuktaki farklı harfler, $p<0,05$ ’te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farkı göstermektedir.....	105
Şekil 4.9.	25±1°C’de 12 aylık depolama sırasında farklı kriyoprotektanların faj stabilitesi. (a) 0-4 ay (b) 5-12 ay. Her çubuktaki farklı harfler, $p<0,05$ ’te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farkı göstermektedir.....	106
Şekil 4.10.	Püskürtmeli kurutma sonrası kazein (% 10) örnekleri .....	112
Şekil 4.11.	Püskürtmeli kurutma sonrası yağsız süt tozu (% 10) örnekleri.....	112
Şekil 4.12.	Püskürtmeli kurutma sonrası mannitol (0,5 M) örnekleri .....	112
Şekil 4.13.	Püskürtmeli kurutma sonrası maltodekstrin (% 15) örnekleri.....	113
Şekil 4.14.	4±1°C’de 12 aylık depolama sırasında farklı eksojenlerin bakteriyofaj stabilitesi. (a) 0-4 ay (b) 5-12 ay. Her çubuktaki farklı harfler, $p<0,05$ ’te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkı göstermektedir. ....	115
Şekil 4.15.	25±1°C’de 12 aylık depolama sırasında farklı eksojenlerin bakteriyofaj stabilitesi. (a) 0-4 ay (b) 5-12 ay. Her çubuktaki farklı harfler, $p<0,05$ ’te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkı göstermektedir. ....	116



Şekil 4.16.	Üç farklı köpükleştirici ajanın bakteriyofaj titresi üzerine etkisi .....	121
Şekil 4.17.	Üç farklı stabilizör ajanın bakteriyofaj titresi üzerine etkisi .....	121
Şekil 4.18.	İkili sölüsyonun (sığır serum albumini (BSA) ve gliserol (GLY)) bakteriyofaj titresi üzerine etkisi .....	122
Şekil 4.19.	İkili sölüsyonun (sığır serum albumini (BSA) ve sakkaroz) bakteriyofaj titresi üzerine etkisi.....	122
Şekil 4.20.	Proses I koşullarında solüsyon A, B ve C için vakum kurutma öncesi köpük görselleri .....	123
Şekil 4.21.	Proses I koşullarında solüsyon A, B ve C için vakum etüve yerleştirilen köpük görselleri .....	124
Şekil 4.22.	Proses I koşullarında solüsyon A, B ve C için vakum altında kurutma sırasında örneklere ait hacim değişikliği görselleri .....	124
Şekil 4.23.	Proses I koşullarında solüsyon A (% 10 BSA + % 10 GLY), solüsyon B (% 15 BSA + % 10 GLY), solüsyon C (% 20 BSA + % 10 GLY) için yaş köpük ve kurutma sonrası köpükte bakteriyofaj titre düşüşü .....	125
Şekil 4.24.	Proses I koşullarında solüsyon A, B ve C için vakum kurutma sonrası görselleri (soldan sağa: solüsyon A, solüsyon B, solüsyon C).....	125
Şekil 4.25.	Proses I koşullarında solüsyon D, solüsyon E, solüsyon F için yaş köpük ve kurutma sonrası köpükte bakteriyofaj titre düşüşü.....	126
Şekil 4.26.	Proses I koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum kurutma öncesi köpük görselleri .....	126
Şekil 4.27.	Proses I koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum etüve yerleştirilen köpük görselleri .....	127
Şekil 4.28.	Proses I koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum altında kurutma sırasında örneklere ait hacim değişikliği görselleri .....	127
Şekil 4.29.	Proses I koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum altında kurutma sırasında köpüklerin sönümlenmesi.....	127
Şekil 4.30.	Proses I koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum kurutma sonrası görselleri (soldan sağa: solüsyon D, solüsyon E, solüsyon F).....	128
Şekil 4.31.	Proses I koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum kurutma sonrası görselleri (soldan sağa: solüsyon D, solüsyon E, solüsyon F).....	128
Şekil 4.32.	Proses II koşullarında solüsyon D, solüsyon E, solüsyon F için yaş köpük ve kurutma sonrası köpükte bakteriyofaj titre düşüşü .....	129

Şekil 4.33.	Proses II koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum kurutma öncesi köpük görselleri.....	129
Şekil 4.34.	Proses II koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum etüve yerleştirilen köpük görselleri.....	130
Şekil 4.35.	Proses II koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum altında kurutma sırasında örneklere ait hacim değişikliği görselleri.....	130
Şekil 4.36.	Proses II koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum altında kurutma vakum kurutma sonrası görselleri (soldan sağa: solüsyon D, solüsyon E, solüsyon F).....	130
Şekil 4.37.	Proses III koşullarında solüsyon D, solüsyon E, solüsyon F için yaş köpük ve kurutma sonrası köpükte bakteriyofaj titre düşüşü .....	131
Şekil 4.38.	Proses III koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum kurutma öncesi köpük görselleri.....	131
Şekil 4.39.	Proses III koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum etüve yerleştirilen köpük görselleri.....	132
Şekil 4.40.	Proses III koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum altında kurutma sırasında örneklere ait hacim değişikliği görselleri.....	132
Şekil 4.41.	Proses III koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum altında kurutma sırasında köpüklerin sönümlenmesi .....	132
Şekil 4.42.	Proses III koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum altında kurutma vakum kurutma sonrası görselleri (soldan sağa: solüsyon D, solüsyon E, solüsyon F).....	133
Şekil 4.43.	Çiğ et örneklerine $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 6 gün süreyle uygulanan 0,3 M sakkaroz jelatin ile hazırlanmış bakteriyofaj tozlarının stabilitesi ve antimikrobiyal etkisi. (a) yeni hazırlanmış tozların etkisi, (b) yeni hazırlanmış tozlarının stabilitesi, (c) $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay süreyle depolanan tozların etkisi, (d) $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay boyunca depolanan tozların stabilitesi, (e) $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay süreyle depolanan tozların etkisi, (f) $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay süreyle depolanan tozların stabilitesi. (a), (c) ve (e) için: Her çubuktaki farklı harfler, $p<0,05$ 'te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkı göstermektedir. (b), (d) ve (f) için: Her çubuktaki farklı harfler, $p<0,05$ 'te analiz süresi boyunca uygulama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkı göstermektedir.....	143

- Şekil 4.44. Çiğ et örneklerine  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 6 gün uygulanan bakteriyofaj tozlarının stabilitesi ve antimikrobiyal etkisi. (a) % 15 maltodekstrin ile yeni hazırlanmış tozların etkisi, (b) % 15 maltodekstrin ile yeni hazırlanmış tozların stabilitesi, (c) % 5 kazein ile yeni hazırlanmış tozların etkisi, (d) % 5 kazein ile yeni hazırlanmış tozların stabilitesi, (e) % 15 maltodekstrin ile hazırlanan ve  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay depolanan tozların etkisi, (f) % 15 maltodekstrin ile hazırlanan ve  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay depolanan tozların stabilitesi, (g) % 5 kazein ile hazırlanan ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay depolanan tozların etkisi, (h) %5 kazein ile hazırlanan ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay depolanan tozun stabilitesi, (a), (c), (e) ve (g) için: Her bir çubuktaki farklı harfler,  $p<0,05$ 'te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında anlamlı bir farkı göstermektedir, (b), (d), (f) ve (h) için: Her çubuktaki farklı harfler,  $p<0,05$ 'te analiz süresi boyunca uygulama grupları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. .... 146
- Şekil 4.45. Yenilebilir kaplama işlemlerinin buzdolabında saklama sırasında  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , H, WI, YI,  $\Delta E$ , C ve H değerlerine etkisi. (a) kontrol numuneleri, (b) peynir altı suyu proteini konsantresi ile muamele edilmiş numuneler, (c) karboksimetil selüloz ile muamele edilmiş numuneler, (d) kitosan ile muamele edilmiş numuneler, (e) sodyum aljinatla muamele edilmiş numuneler. .... 149
- Şekil 4.46. Depolama sırasında farklı yenilebilir kaplamaların çilek meyvesinin pH'ına etkisi. Her çubuktaki farklı harfler,  $p<0,05$ 'te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. . 150
- Şekil 4.47. Depolama sırasında farklı yenilebilir kaplamaların çilek meyvesinin TA üzerindeki etkisi. Her çubuktaki farklı harfler,  $p<0,05$ 'te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. .... 151
- Şekil 4.48. Yenilebilir kaplanmış çilek örneklerinin bakteriyofaj stabilitesi. Her çubuktaki farklı harfler,  $p<0,05$ 'te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. .... 153
- Şekil 4.49. Bakteriyofaj yüklü kaplama yapılmış çilek örneklerinin antimikrobiyal aktivitesi. Kontrol: kaplanmamış ve *Salmonella* aşılınmış örnekler, PC: bakteriyofaj kokteyli, WPC+PC, CMC+PC, CH+PC, SA+PC: bakteriyofaj

yüklü yenilebilir kaplamalı numuneler. Her çubuktaki farklı harfler,  $p<0,05$ 'te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. ....154

Şekil 4.50. Bakteriyofaj içermeyen yenilebilir kaplı çilek örneklerinde *Salmonella* sayısı değişimi. Kontrol: kaplanmamış ve *Salmonella* aşılınmış örnekler. WPC, CMC, CH, SA: bakteriyofaj içermeyen yenilebilir kaplamalı örnekler. Her çubuktaki farklı harfler,  $p>0,05$ 'te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir. 155

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Yenilebilir filmler ve kaplamalarda bakteriyofaj kullanımı – <i>in-vitro</i> çalışmalar .....	36
Çizelge 2.2.	Yenilebilir filmler ve kaplamalarda bakteriyofaj kullanımı – meyve ve sebze çalışmaları .....	38
Çizelge 2.3.	Yenilebilir filmler ve kaplamalarda bakteriyofaj kullanımı – süt ürünleri çalışmaları .....	39
Çizelge 2.4.	Yenilebilir filmler ve kaplamalarda bakteriyofaj kullanımı – deniz ürünleri çalışmaları .....	39
Çizelge 2.5.	Yenilebilir filmler ve kaplamalarda bakteriyofaj kullanımı – kırmızı et çalışmaları .....	40
Çizelge 2.6.	Yenilebilir filmler ve kaplamalarda bakteriyofaj kullanımı –kanatlı eti çalışmaları .....	41
Çizelge 2.7.	Kapsülleme için kullanılan farklı teknikler .....	49
Çizelge 2.8.	Bakteriyofaj liyofilizasyon çalışmalarına genel bir bakış .....	59
Çizelge 2.9.	Gıda güvenliği uygulamaları için terapötik faj araştırması ve ticarileştirme ile ilgili şirketler .....	79
Çizelge 4.1.	Bakteriyofajların konakçı aralığı.....	98
Çizelge 4.2.	Farklı kriyoprotektanlar varlığında dondurarak kurutulmuş bakteriyofaj kokteylinin proses kayıpları .....	104
Çizelge 4.3.	Liyofilize bakteriyofaj tozları için su aktivitesi .....	107
Çizelge 4.4.	Liyofilize bakteriyofaj tozları için partikül boyutları.....	107
Çizelge 4.5.	Farklı ekspiyanlar malzemelerin varlığında püskürtülerek kurutulmuş bakteriyofaj kokteylinin proses kayıpları .....	117
Çizelge 4.6.	Püskürtmeli kurutma ile elde edilen bakteriyofaj tozları için su aktivitesi .....	118
Çizelge 4.7.	Püskürtmeli kurutma ile elde edilen bakteriyofaj tozları partikül boyutları .....	118
Çizelge 4.8.	Kurutma proseslerinin incelenmesi .....	139

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

Ca	Kalsiyum
Mg	Magnezyum
CO <sub>2</sub>	Karbon dioksit
CaCO <sub>3</sub>	Kalsiyum karbonat
NaOCl	Sodyum hipoklorit
NaOH	Sodyum hidroksit
NaCl	Sodyum klorür
T <sub>g</sub>	Camsı geçiş sıcaklığı
R <sub>0</sub>	Temel üreme sayısı
a/a	Ağırlık/ağırlık
a/h	Ağırlık/hacim
h/h	Hacim/hacim
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\lambda$	Lamda
w/o/w	Su içinde yağ içinde su
w/o	Yağ içinde su
MPa	Megapaskal
M	Molar
kV	Kilovolt
mV	Milivolt

## Kısaltmalar

API	Aktif farmasötik bileşen (Active pharmaceutical ingredient)
BSA	Sığır serum albumini
KOB	Koloni oluşturan birim (Colony forming unit)
CH	Kitosan
CMC	Karboksimetil selüloz
DMSO	Dimetil sülfoksit
GLY	Gliserol
LSD	En küçük önemli fark (least significant difference)
MOI	İnfeksiyon çokluğu (Multiplicity of infection)
PEG	Polietikenglikol
POB	Plak oluşturan birim (Plaque forming unit)
PLS	Poli(laktit)asit
PPO	Polifenol oksidaz
PVA	Poli(vinil alkol)
PVP	Polivinilpirolidon
RTE	Tüketime hazır gıda (ready-to-eat)
SA	Sodyum aljinat
SGF	Simüle edilmiş mide sıvısı
SIF	Simüle edilmiş bağırsak sıvısı
WPC	Peynir altı suyu protein konsantratu
WPI	Peynir altı suyu protein izolatu
YBT	Pastörize yumurta beyazı tozu





# 1. GİRİŞ

Gıda kaynaklı bakteriyel patojenleri etkisiz hale getirmek için kullanılan mevcut teknolojilerin yeterli seviyede olmaması gıda güvenliğini iyileştirmek için yeni yaklaşımlara ihtiyaç olduğunu gündeme getirmektedir. Örneğin, çiğ taze meyve ve sebzeler için mevcut olan dezenfektan işlemlerinin çok az etkisi olduğu bilinmektedir [1, 2]. Bununla birlikte taze tavuk gibi pişirilmesi gereken diğer yiyecekler de patojenler tarafından kontamine olabilmektedir [3]. Pişirme genellikle gıdalardaki patojenleri yok etse de, gıdanın az pişirilmesi veya çapraz kontaminasyona maruz kalması durumunda bakteriyel üreme meydana gelebilmektedir. Her durumda, gıdanın kalitesini etkilemeden patojenleri etkisiz hale getirmek gıda kaybının azaltılması, tüketicilerin korunması ve sağlık risklerinin ortadan kaldırılması açısından kritik önem taşımaktadır. Bakterileri enfekte eden virüsler olan bakteriyofajların bu amaçla kullanılması, ilginç giderek arttığı bir araştırma konusudur. Doğal olarak oluşan bakteriyofajlar, 1915'ten 1917'ye kadar, keşfedildikten hemen sonra bakteriyel kökenli bulaşıcı hastalıkları önlemek ve tedavi etmek için kullanılmıştır [4]. Bununla birlikte, bakteriyofajların hayvanlarda ve insanlarda terapötik olarak kullanılmasına ilişkin uzun geçmişlerine rağmen, gıda güvenliğini iyileştirmeye yönelik potansiyel uygulamaları, giderek daha fazla tanınmakta ve nispeten yeni bir eğilim oluşturmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, gıda güvenliği temel bir halk sağlığı önceliğidir. Bu nedenle, preparasyonlarda bakteriyel kalıntıların (endotoksinler dahil) varlığı gibi, bakteriyofajların uygulanmasına ilişkin bazı sınırlamaların dikkate alınması önerilmektedir. Ancak bakteriyofaj tedavisinin şu ana kadar bilinen veya rapor edilen herhangi bir yan etkisine ait veri bulunmadığını vurgulamakta fayda vardır. Sınırlamalara rağmen, gıda endüstrisinde bakteriyofaj preparatlarının uygulanmasına yönelik önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Birkaç bakteriyofaj ürünü Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından genel olarak güvenli (GRAS) sınıfına tanımlanmış, Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından tescil edilmiş ve Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (USDA) tarafından kullanımı onaylanmıştır. Ayrıca, çeşitli gıdaların bakteriyel kontaminasyonunu azaltmak veya ortadan kaldırmak için farklı

bakteriyofajların kullanımının incelendiği hakemli dergilerdeki yayınların sayısı ve bu konuyla ilgili patent başvurularının sayısı son yıllarda giderek artmaktadır.

Gıda endüstrisi, gıda bozulmasına ve gıda kaynaklı hastalıklara neden olan mikrobiyal kontaminasyon sorunuyla karşı karşıyadır. ABD popülasyonunda 2000 ile 2008 yılları arasındaki verilere dayanarak, yılda 9,4 milyon gıda kaynaklı hastalığın meydana geldiği ve bunun % 39'unun bakterilerden kaynaklandığı tespit edilmiştir. Ayrıca, kontamine gıdalar yalnızca ABD'de yılda 55.961 hastaneye yatışa ve 1.351 ölüme neden olmuştur [5]. Mikrobiyolojik gıda bozulmaları, 2010 yılında yaklaşık 161,1 milyar dolar olarak tahmin edilen, toplam atılan gıdanın önemli bir bölümünü oluşturan ve ürünlerdeki duyuşal değişikliklerden kaynaklanan ekonomik kayıplara neden olmuştur [6]. Antibiyotiklerin yanlış kullanılması ve dirençli bakterilerin ortaya çıkması gıda güvenliği sorununu ağırlaştırmaktadır. İstenmeyen bakteri popülasyonlarının kontrolü ve azaltılmasındaki mevcut gelişmelere rağmen, gıda muhafaza teknolojisindeki yeni yaklaşımlar büyük ilgi görmektedir. Bakteriyofajların uygulanmasıyla gıda zincirinde elde edilebilecek faydalar; çiftlik hayvanlarında patojen kolonizasyonunun azaltılması (bakteriyofaj tedavisi), çiğ etlerin, taze ürünlerin ve hatta çiğ sütün dekontaminasyonu (biyokontrol), ekipman ve temas yüzeylerinin dezenfeksiyonu (biyosanitasyon), hazır ürünlerin raf ömrünün uzatılması (biyokoruma) [7] olarak sayılabilmektedir. Bakteriyofajların doğal antimikrobiyal maddeler olarak uygulanması, dünya çapında çok sayıda şirket tarafından bakteriyofaj bazlı ürünlerin üretilmesine yol açmıştır. FDA ve USDA, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Campylobacter* ve *Listeria* gibi en yaygın bakteriyel gıda kaynaklı patojenlerin üstesinden gelmek için tasarlanmış birkaç bakteriyofaj bazlı formülasyonu onaylanmış ve ürünlerde kullanımına izin vermiştir.

Bakteriyofajların potansiyelinden yararlanmak, heyecan verici bir gelecek beklentisidir. Bununla birlikte, başarılı olmak için, uygulamaya yönelik güvenli ve etkili bakteriyofaj ürünlerinin üretilmesine acil bir ihtiyaç vardır. Stabil bir katı kuru toz formu olarak bakteriyofaj preparatlarının ölçeklenebilir üretimi büyük bir önem taşımaktadır. Uygun ekşiyanlarla formüle edilmiş, saflaştırılmış bakteriyofaj süspansiyonlarının kurutulması, yüksek işlem hacmi ve nispeten düşük maliyetle gerçekleştirilmesi durumunda hem ticari hem de uygulama açısından büyük avantaj sağlanmaktadır.

Enkapsüle bakteriyofajların kuru toz formu, saha uygulamaları için kolaylık sağlamakla birlikte depolamayı ve taşıma maliyetlerini azaltmaktadır. Ortaya çıkan bakteriyofaj içeren tozlar, iyi bir depolama ve raf ömrüne sahip olmakla birlikte tozdaki son bakteriyofaj üzerinde kontrol ve çeşitli terapötik kullanımlar için uygun mikropartiküllerin üretimine izin vermektedir. Bakteriyofajların solüsyonda sınırlı bir stabiliteye sahip olmaları ve işleme ve depolama sırasında bakteriyofaj titresinde önemli bir düşüşe maruz kalmaları, stabil formların hazırlanmasına ihtiyacı ortaya koymaktadır. Formülasyon, enkapsülleme ve katı formlar için önemli bir itici güç, tekrarlanabilir dozajları sağlamak için bakteriyofajların raf ömrü ve depolanmasıdır. Diğer itici güçler arasında etkili dağıtım için mikro ve nanoparçacıklarda enkapsülleme için bakteriyofaj formülasyonunu, hedeflenen enfeksiyon bölgesinde tetiklenmiş kontrollü veya sürekli salınım için uyarılara yanıt veren sistemlerde enkapsüllemeyi içermektedir. Bakteriyofajların kuru toz formda enkapsülmesi, sistemik enfeksiyonları tedavi etmek, profilaktik tedavi veya hücre içi enfeksiyonları tedavi etmek amacıyla fajın dolaşım süresini arttırmak için de kullanılabilir. Dondurarak kurutma (liyofilizasyon), püskürterek kurutma, emülsiyonlar içinde mikro ve nanoyapılı malzemelerde bakteriyofajın depolanması ve kapsülmesi için bakteriyofajın formülasyonu ve stabilizasyonu gıda örneklerinin biyokontrolünde düzenli ve devamlı bir uygulama planı yapılmasına imkan vermektedir.

Seçilecek yöntem, işlem yapılacak bakteriyofaj için yüksek spesifikite göstermekte olup kullanılacak yardımcı kimyasallar, seçilecek proses koşulları, proses sonu seçilecek depolama koşulları gibi faktörlerin belirlenmesi gerekmektedir. Her bakteriyofaj için aynı yöntem ve koşulların kullanımı mümkün olmamakla birlikte her çalışmanın ayrı ayrı optimizasyonu sonrası kullanımı gerekmektedir. Büyük ölçekli üretim için ise laboratuvar ve pilot ölçekli çalışmaların tamamlandıktan sonra projeksiyonun gerçekleştirilmesi gerekliliği mevcuttur. Literatürde çok farklı biyo-preservant ve bakteriyofajların farklı proses koşullarında, farklı sürelerde depolama ve stabilite çalışmaları yapılması sebebiyle ortak düşünce, çalışılan bakteriyofajların aynı veya benzer familyadan olmasına rağmen kullanılan biyo-koruyucular, konsantrasyonlar ve proses koşulları sebebiyle bireysel çalışma bazlı incelenmesi gerektiği yönündedir. Bu aşamada kurutma işlemi gerçekleştirilecek bakteriyofaj için en uygun yöntemin seçilmesi ve optimizasyonu ile başlanabilir. En sık tercih edilen toz form oluşturma yöntemleri arasında bulunan

liyofilizasyon ve püskürterek kurutma fajların, sıvı süspansiyona kıyasla saklama koşullarında canlılığını koruduğunu ve aynı süre zarfında depolanan sıvı formülasyonlardan daha stabil olduğu gösterilmiştir. Liyofilizasyonda tipik olarak, konsantre çözeltinin viskozitesinde ve ozmolaritesinde bir artış meydana gelmekte, bu da daha fazla kristalleşmeyi engelleyerek ve sonunda donmuş bir amorf / kristalli faz ile sonuçlanmaktadır. Yüksek ozmotik basınç değişiklikleri nedeniyle bakteriyofaj kümeleşmesini ve inaktivasyonu önlemek için burada dikkatlice çalışılması gerekmektedir. Ozmotik hasar, bakteriyofajın dondurarak kurutma işleminden sağ kalmasını azaltan önemli bir faktördür. Bir diğer sorun ise düşük sıcaklıklarda hızla gerçekleşen dondurma işleminin bakteriyofaj canlılığını olumsuz etkileyerek azaltmasıdır. Bu sebeple liyofilizasyon çalışmalarında proses koşulları ve formülasyonun optimize edilerek proses kayıplarının minimize edilmesi gerekmektedir. Bir diğer sık tercih edilen yöntem olan püskürtmeli kurutma prosesinde ise çözünmüş katılar içeren bir sıvı atomize ederek, kurutma odası içinde sıcak kuru bir gazla (tipik olarak sıcak kuru hava) temas ettirilmekte ve ince partiküllü kuru toz formlara dönüştürülmektedir. Hem yüksek sıcaklık işlemi ile termal strese hem de yüksek kayma gerilimlerine maruz kalmaları sebebiyle proses kayıplarının optimize edilmesi gereken bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Her iki yöntem için yüksek enerji maliyetlerinin ve uzun kurutma sürelerinin olması maliyet ve süre gibi önemli bir kısıtlamayı açığa çıkarmaktadır. Endüstriyel ölçeklenebilir bu yöntemlerin işlem gerçekleştirilecek bakteriyofajlar için optimize edilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple alternatif bir yöntem olması muhtemel, vakum köpük kurutma işleminde düşük ve yüksek sıcaklık gereksinimi olmadan ılıman sıcaklıklarda kurutma işlemine izin vermesi ve daha ekonomik bir sistem olması ile büyük bir potansiyel taşımaktadır. Önemli avantajları arasında ölçeklendirilebilir ve türbülent bir proses olması, örneklerin önceden donma sıcaklığında işlem görme ve dondurulma ihtiyacı bulunmaması, etkili yüksek ortam sıcaklığı stabilizasyonu sağlayarak kurutma ve depolama sırasında minimum aktivite kaybı ile sonuçlanmasıdır. Fakat litertürde bakteriyofaj çalışmaları açısından kendisine yeterince yer bulamaması sebebiyle proses koşulları, optimizasyon ve bakteriyofajların kurutulması konularında geniş kapsamlı çalışılması gerekmektedir. Tüm bu veriler ışığında gıda ürünlerinde kullanılmak üzere uygun maliyetli bakteriyofaj temelli kuru preparatların formüle edilmesi, bu ürünlerin karakterizasyonu, depolama, taşıma vb. işlemler için stabiliteleri ve gıda üzerindeki etkinliklerinin incelenmesi hem bilimsel hem de endüstriyel açıdan büyük önem taşımaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Bakteriyofajlar

#### 2.1.1. Bakteriyofajlar ve Kısa Tarihçesi

Bakteriyofajlar, okyanuslar, toprak, derin denizler, su ve yiyecekler gibi her yerde bulunmaktadır. Yeryüzünde sayıca en yüksek canlı varlıklardır (tahminler toplamda  $10^{30}$  ile  $10^{32}$  arasında) ve keşfedilen her ekosistemde mikrobiyal dengenin düzenlenmesinde kilit rol oynamaktadırlar. Bakteriyofajların dağılımı, yaygınlığı ve dramatik tezahürleri, yaklaşık 1880’de Avrupa ve Amerika laboratuvarlarında ciddi bakteriyolojik çalışmaların başlamasından sonra yaklaşık 40 yıl boyunca tanınmamalarını şaşırtıcı kılmaktadır. Bakteriyofajların bakterisidal aktivitesi ilk olarak Hankin tarafından 1896’da, Hindistan’daki Ganj ve Jumna nehirlerinden filtrelenmiş suyun *Vibrio cholerae*’ye karşı antibakteriyel özelliklere sahip olduğu, ancak bu özelliklerin kaynatma ile ortadan kalktığı zaman gözlemlenmiştir [8]. Emmerich ve Löw, otolize kültürlerdeki bazı maddelerin çeşitli kültürlerin parçalanmasına neden olabildiğini, deneysel enfeksiyonları iyileştirebildiğini ve sonraki aşılamalara karşı profilaktik bağışıklık sağlayabildiğini bildirmiştir. Ancak bu noktada, bu ilk çalışmaların kesin yorumlarını sağlamak zordur. Bu gözlemlerden bazıları bakteriyofajların eylemiyle uyumlu olsa da, diğer araştırmacılar bakteriyosin etkilerini öne sürmekte ve litik enzim üretimine atfedilebilmektedir. Bu raporların tümü, sıvı kültürler üzerindeki deneyleri anlatmakta ve bakteriyolojinin bu döneminde, bir kültür, tek tek hücrelerin popülasyon dinamikleri açısından değil, kendi başına bir organizma olarak kavramsallaştırılmıştır. 1920’lere kadar bakteri hücresinin tüm kültür yerine organizma olarak yeniden kavramsallaştırılmasına izin veren önemli bir düşünce değişikliği olmamıştır [9]. Bakteriyofajlar üzerindeki ilk etkili ve net deneyler, katı ortam üzerinde kültürler kullanılmış ve bunlar, lokalize bakteriyolizin (yani plakların) gözlemlenmesine dayanmaktadır.

Frederick W. Twort tarafından yapılan bir gözlemin genellikle modern bakteriyofaj araştırmalarının başlangıcı olduğu kabul görmektedir. Ancak Félix d’Herelle’in öncü çalışmasından sonra, Twort’un raporunun bakteriyofajlarla ilgili olduğu kabul edilmiştir. Twort, Londra’daki Brown Enstitüsü’nde (bir veteriner hastanesi) çalışan ünlü bir İngiliz bakteriyolog olan William Bulloch’un öğrencisidir [10]. Twort, *Vaccinia virus* canlı

hücrelerini agar besiyerinde büyötmeye çalışırken, birçok mikrokok kolonisinin büyüdüğünü fark etmiş ve bu kolonileri, kullandığı Vaccinia posasında bakteriyel kontaminasyon olarak yorumlamıştır. Gözlemi, bazı kolonilerin mukoid, sulu veya camsı görünmesi olarak kaydedilmiştir. Twort camsı kolonileri mikroskop altında incelediğinde, bakterilerin Giemsa ile kırmızıya boyanmış küçük granüller halinde olduğunu fark etmiştir. Bu durumdan bağımsız ve oldukça farklı nedenlerle, Felix d’Herelle [11], bakterilere antagonisitik olan ve sıvı kültürde parçalanmalarına ve ayrı parçalar halinde (bunlara plak adını vermiştir) ölüme neden olan bir mikrop keşfetmiştir. d’Herelle, bu görünmez mikropları, bakterileri istila eden ve çoğalan ultravirüsler olarak tanımlamış ve bu nedenle onlara bakteriyofaj adını vermiştir. d’Herelle, savaş koşulları altında Paris’teki Pasteur Enstitüsü’nde çalışması sebebiyle burada bir grup Fransız askerinde ortaya çıkan basilli dizanteri salgınını araştırmak üzere çağrılmıştır [4]. Klinik görevlerine ek olarak, enterik bakterilerin neden bazen patojenik olup bazen olmadığı sorusuyla araştırma ilgisini sürdürmüştür. Yaklaşımını, filtrelenebilir bir virüsün neden olduğuna inanılan ancak *Salmonella choleraesuis* [12] adlı bir bakterinin varlığıyla şiddetlenen domuz kolerasının etiyojisi üzerine daha önce bildirilen çalışmalara dayandırarak, d’Herelle dizanteri hastalarından alınan bakterilerin büyümesini ve patojenitesini değiştirebilecek görünmez virüsler için filtrelenmiş dizanteri örneklerini incelemiştir. Sıvı kültürde parçalanmayı ve agarı kaplayan birleşik bakteri kültüründe berrak beneklerin (daha sonra bunlara *taches vierges* adını vermiştir) oluşumunu fark etmiştir. Araştırmaları bu varsayım üzerinde ilerlemiş ve görünmez ajanın sonsuza kadar çoğaldığını, çoğalmak için canlı hücrelere ihtiyaç duyduğunu ve çoğalma işlemi için hücre parçalanmasının gerekli görüldüğünü kaydetmiştir. d’Herelle, plak sayımının, partikül olarak tasarladığı bu görünmez ajanları saymak için bir yol sağladığını fark etmiştir. Fajın enfeksiyon, çoğalma, salıverme ve yeniden enfeksiyon döngülerini temsil ettiği şeklinde yorumladığı dalgalar veya adımlar halinde çoğaldığını gösterebilmiştir.

Bununla birlikte, bakteriyofajın biyolojik doğası üzerine yapılan bu araştırmalar, fajın terapötik potansiyeli tarafından gölgede bırakılmıştır. Bakteriyofajın biyolojik nesnelere olarak anlaşılmasına yönelik ilgi, bakteriyofajın ticari ve tıbbi olanaklarına yenik düşmüştür. d’Herelle’in dizanteri hastalarından alınan dışkı örneklerinde bakteriyofaj titrelerinin arttığına dair ilk gözlemlerinden, bakteriyofajın bulaşıcı hastalık seyrindeki rolü çok önemlidir. Bakteriyofajın terapötik kullanımına ilişkin ilk rapor, Louvain’dan

Bruynoghe ve Maisin'in [13] kutanöz çıbanların yerel bölgede bir stafilokok bakteriyofaj müstahzarını enjekte ettikleri bir nottur. Hem şişlikte hem de ağrıda azalmanın yanı sıra ateşte bir miktar azalma kaydetmişlerdir. 1930'larda bazı araştırmacılar bakteriyofajı kimyasal açıdan incelemeye başlamıştır. Bu araştırma programı, tütün moziak virüsü (TMV) ve çocuk felci gibi diğer virüslerin incelenmesiyle yakından bağlantılıdır [14]. Yeni ultrasantrifüjleme teknikleri, kollodion zarlarından süzme ve kimyasal analiz fajlar üzerinde uygulanmaya başlanmıştır. İngiltere'de Elford ve Andrews [15] ve Fransa'da d'Herelle'in meslektaşları tarafından yapılan çalışmalardan [16] farklı bakteriyofaj izolatlarının boyutlarının önemli ölçüde farklı olduğu anlaşılmıştır. Bununla birlikte, virüslerin boyutlarını belirlemeye yönelik bu yöntemler dolaylıdır ve kabul edilmiş herhangi bir standardizasyon yoktur. Önce Almanya'da, sonra İngiltere'de çalışan Max Schlesinger [17], bakteriyofaj kimyası üzerine ilgili yıllarda çalışan neredeyse tek biyokimyacıdır. Kısmen saflaştırılmış bakteriyofaj hazırlanması, boyutlarının tahmin edilmesi ve Feulgen reaksiyonu aracılığıyla DNA'nın varlığını göstermiştir. İlginç bir şekilde, 1940 yılında yeni icat edilen elektron mikroskobunun ilk bilimsel uygulamalarından biri, bakteriyofajların preparasyonlarını görselleştirmek ve bunların bakteri hücreleriyle etkileşimlerini incelemektir. Bu araştırma sonunda, bakteriyofajların doğasına ilişkin, partikül karakterlerini açıkça göstermekte ve belirli bakteriyofajların karakteristik morfolojilere sahip olduğunu göstermektedir [18-21]. Bakteriyofajın morfojenezi ve supramoleküler birleşimi ile bakteriyofaj DNA moleküllerinin konformasyonuna ilişkin daha sonraki araştırmalar, büyük ölçüde geliştirilmiş elektron mikroskopik yöntemlere dayanmaktadır [22-24]. Moleküler biyolojinin kökenlerine ilişkin kanonik açıklamalar, Alman fizikçi Max Delbrück'ün modern bakteriyofaj araştırmalarındaki ana geçiş olayı olarak göstermektedir [25].

### **2.1.2. Temel Bakteriyofaj Biyolojisi**

Prokaryotik virosferin bir çarpıcı özelliği de dikkate değer çeşitliliğidir. Bakteriyofaj viryonları boyut, şekil ve karmaşıklık bakımından büyük farklılıklar göstermektedir. Bakteriyofaj genomlarının boyutları 3,4 kb ile 500 kb arasında değişmekte ve bakterilerin aksine, tüm bakteriyofaj genomlarında tek bir gen (örn. 16S rRNA) yoktur. Bakteriyofaj genomları muhtemelen biyosferin herhangi bir yerinde keşfedilmemiş genlerin ve proteinlerin en büyük rezervuarını temsil etmektedir.

Her yerde bulunmaları ve çeşitlilikleri göz önüne alındığında, bakteriyofajların çeşitli biyolojik ve çevresel süreçlerde derin roller oynaması şaşırtıcı değildir. Bakteriyofajların her gün okyanus bakterilerinin %15 ile %40'ını parçaladığı tahmin edilmektedir, bu da partikülün çözülmüş karbona oranını, fitoplankton üretkenlik oranlarını ve oksijen üretimini ve hatta belki de küresel iklim ve hava durumunu etkilemektedir [26]. Dahası, bakteriyofajlar, hem bakterilerin viral yırtıcıları tarafından öldürülmekten kaçınmak için sürekli olarak evrim geçirmesi gerektiğinden hem de özellikle ılıman bakteriyofajlar (kendi genomlarını konakçı genomuna istikrarlı bir şekilde entegre edebilenler) öne çıktığı için, bakteriyel evrimin önemli itici güçleridir. Küresel olarak, bakteriyofajların bakteriler arasındaki gen transfer olaylarına (transdüksiyon) saniyede 20 milyon milyar defaya kadar aracılık ettiğine inanılmaktadır. Her biri kendi genomunu duyarlı bir bakteri hücresinden diğerine taşıyarak daha fazla bakteriyofaj üretimini yönlendirebilen karmaşık uzay gemileri gibidirler.

Her bakteriyofaj parçacığı (viryon), bir protein veya lipoprotein kılıf veya kapsid içine alınmış kendi nükleik asit genomunu (DNA veya RNA) içermekte; birleşik nükleik asit ve kapsid, nükleokapsidi oluşturmaktadır. Her bakteriyofaj için hedef konak, belirli bir bakteri grubudur. Bu grup genellikle bir türün bir alt kümesidir, ancak birkaç ilgili tür bazen aynı bakteriyofaj tarafından enfekte olabilmektedir. Tüm virüsler gibi bakteriyofajlar da mutlak parazitlerdir. Uygun bir konakçıda kendi üremelerini yönlendirecek tüm bilgileri taşımalarına rağmen, enerji üretecek makineleri ve protein yapacak ribozomları yoktur. Bakteriyofaj, ev sahiplerinin yaşadığı her yerde - kanalizasyonda ve dışkıda, toprakta, derin termal bacalarda ve doğal su kütlelerinde - çok sayıda bulunan, dünyadaki en bol canlı varlıklardır. Yüksek düzeyde özgüllükleri, uzun süreli hayatta kalmaları ve uygun konakçılarda hızla çoğalabilmeleri, herhangi bir doğal ekosistemdeki çok çeşitli bakteri türleri arasında dinamik bir dengenin korunmasına katkıda bulunmaktadır. Uygun konakçı bulunmadığında, dış etkenler tarafından zarar görmedikçe, birçok bakteriyofaj onlarca yıl boyunca enfekte etme yeteneklerini koruyabilmektedir. Bakteriyofajlar, bakteri virüsleri olmaları sebebiyle enfekte ettikleri bakterileri öldürmek için olağanüstü bir yeteneğe sahiptirler. Bugüne kadar literatürde tanımlanan bakteriyofajların % 95'inden fazlası Caudovirales'e (kuyruklu fajlar) aittir. Viryonları, yaklaşık olarak yarı çift sarmallı DNA ve kütle olarak yarı proteindir ve belirli bir veya iki proteinin birçok kopyasından oluşan ikosahedral başları vardır. Köşeler



genellikle bir proteinin pentamerlerinden oluşur ve her iki tarafın geri kalanı aynı veya benzer bir proteinin heksamerlerinden oluşmaktadır.

Bakteriyofajlar yaşam tarzına göre iki sınıfa ayrılabilir; öldürücü veya ılıman. Öldürücü bakteriyofajlar yalnızca bir litik döngü aracılığıyla çoğalabilir; bakteriyofaj viryonu, bir konakçı hücrenin yüzeyine adsorbe olmakta ve konakçı metabolizmasının çoğunu devralan ve daha fazla bakteriyofaj yapmak için moleküler makineyi kuran genomunu enjekte etmektedir. Konak hücre daha sonra dakikalar veya saatler sonra parçalanarak birçok yeni bakteriyofajı serbest bırakmaktadır. Virülan bakteriyofajların enfekte olmuş bakterileri hızlı bir şekilde öldürme ve parçalama yeteneği, belirli bakteriler için bakteriyofajların özgülüğü ve enfeksiyon süreci sırasında bakteriyofajların sayısının artması, bakteriyofajları bakteriyel hastalıklarla savaşmak için mükemmel potansiyel terapötik maddeler haline getirmektedir [27].

Virülan bakteriyofajların aksine, bir litik döngü indüklenene kadar, konakçı bakteri hücreleri ile süresiz olarak birlikte var olma yeteneğine sahip bakteriyofajlar da mevcuttur. İlimli bakteriyofajlar, yeni bir konakçı hücreyi enfekte ettiklerinde bir üreme modu seçeneğine sahiptir. Enfekte edici bakteriyofaj alternatif olarak bir lizogenik döngü başlatabilir; bakteriyofaj genomu, replike olmak yerine, profaj adı verilen, genellikle konak genomuna entegre olan ancak bazen bir plazmit olarak tutulan hareketsiz bir durum varsayar. Süresiz olarak bu durumda kalmakta ve konakçı hücresi, tamamı profaj içeren hücrelerin bir klonunu yapmak için çoğaldıkça kopyalanmaktadır. Bu hücrelerin lizogenize veya lizogenik (yani lizis üretebilen) olduğu söylenmesinin sebebi ara sıra bu hareketsiz durumundan çıkarak litik döngüye girmeleridir. Levin ve Lenski [28] tarafından ortaya konulduğu gibi, lizogenik durum, muhtemelen her ikisine de çeşitli avantajlar yansıtan virüs ve konakçının birlikte evrimini gerektiren, oldukça gelişmiş bir olgudur. İlimli bakteriyofajlar, konakçıları diğer bakteriyofajların neden olduğu enfeksiyondan korumaya yardımcı olabilmekte ve kısıtlama sistemleri ve antibiyotiklere ve diğer çevresel hakaretlere karşı direnç dahil olmak üzere konakçıların özelliklerinde önemli değişikliklere yol açabilmektedir.

Daha büyük öldürücü bakteriyofajlar genellikle birçok konak öldürücü proteini kodlamaktadır. Bazıları konakçı replikasyonunu, transkripsiyonunu bozmakta; ayrıca konak genomunu bozabilmekte, belirli konak enzimlerini yok edebilmekte, yeniden yönlendirebilmekte veya bakteri zararını değiştirebilmektedir. Buna karşılık, ılıman bakteriyofajlar genellikle konakçıyı çok daha az yeniden yapılandırmakta ve uzun vadeli lizogeni sırasında sıkı kontrol altında tutulması gereken konakçı-öldürücü proteinleri varsa bile çok az taşımaktadırlar. Diğer bakteriyofaj genlerinin transkripsiyonunu bloke etmek için birkaç operatör bölgesinde hareket eden bir baskılayıcı proteini kodlamaktadırlar. Bu reseptör, lizogenik durum sırasında üretilen tek bakteriyofaj kodlu protein olabilmekte, ancak genellikle konakçının hayatta kalması için faydalı olabilecek birkaç başka gen de profajlardan eksprese edilmektedir. Baskılayıcı, aynı bağışıklık grubunun diğer bakteriyofajlarının, yani genleri aynı baskılayıcı tarafından düzenlenebilen diğer bakteriyofajların neden olduğu litik enfeksiyonu da bloke etmektedir. Bu şekilde, ılıman bir bakteriyofaj genellikle konak bakterisini çeşitli bakteriyofaj türlerinin neden olduğu enfeksiyondan kormaktadır.

### **2.1.3. Bakteriyofajların Yaşam Döngüleri**

Bakteriyofajlar, tipik olarak bir protein kılıfı ile çevrili nükleik asitten oluşan mikroskop altı parçacıklardır. Bakteriyofajların morfolojisi, kuyruğu ve kuyruk lifleri olan çokyüzlü bir kafa içeren karmaşık yapılardan nispeten basit çokyüzlülere kadar büyük ölçüde değişmektedir. Bakteriyofajlar bir bakteri hücrelerini enfekte ettikten sonra çoğalabilmektedirler, ancak böyle bir enfeksiyonun sonucu, bakteri hücrelerinin parçalanarak yeni nesil bakteriyofajları serbest bırakması (litik yol), hücre ölümü olmadan bakteriyofajların sürekli ekstrüzyonu, bakteriyofaj nükleik asidinin bakteri kromozomuna veya diğer genetik elementlere entegrasyonu (lizogeni) veya bakteriyofaj nükleik asidinin konakçı içinde dengesiz bir ilişki içinde var olduğu bir durum (psödolizogeni) oluşabilmektedir [29].

Gıdalardan patojenleri uzaklaştırmak için litik bakteriyofajlar tercih edilmektedir. Litik yolda, bakteriyofajlar spesifik bakteri hücreleri yüzey moleküllerine bağlanmakta ve bakteriyofaj genomu hücreye taşınmakta ve daha sonra ekspres edilmektedir. Sonuç olarak hücre başına birkaç yüze kadar yeni bakteriyofaj üretilmekte ve bakteriyofaj kodlu enzimler hücre duvarını parçalayarak yeni bakteriyofajları serbest bırakmakta ve konakçı

organizmayı öldürmektedir. Bu süreçte, bakteri hücresi yok edilmekte ve bakteriyofaj sayısı artarak ve genel antibakteriyel etki artmaktadır.

Lizogenler kararlıdır ve gerekli koşullar (örneğin mitomisin C'ye maruz kalma veya UV radyasyonuna maruz kalma) [30] oluşana kadar bakteriyofaj çoğalmamaktadır, ancak bu bakteriyofajların çok küçük bir kısmı kendiliğinden bir litik döngüye geçebilmektedir. Bakteriyofaj nükleik asidi diğer genetik materyalle bütünleştiğinde, biyokontrol amacıyla kaybolabilmektedir, ancak gerektiğinde litik döngüleri açma yollarının geliştirilmesi, biyokontrol elde etmek için alternatif bir yaklaşımı temsil edebilmektedir.

Psödolizogeni, bakterilerin var olabileceği birçok hücre [29] veya de-novo protein sentezini önleyen antibiyotiklerin varlığında [31] karşılaşılacağı gibi, konakçı besin sınırlamasına tabi olduğunda da ortaya çıkmaktadır. Koşullar bakteri büyümesi için daha uygun olacak şekilde değiştiğinde, bakteriyofaj genetik materyali daha sonra litik veya lizogenik döngülere girebilmektedir. Psödolizogeni, bakteriyofaj genomunun konak hücre replikonlarına entegre olmaması bakımından lizogeniden farklılık göstermektedir [32]. Yeterince yüksek sayıda bakteriyofaj hücreye yapıştığı ve hücre duvarını parçalayan enzimlerin aktivitesi yoluyla parçaladığında, bakteriyofaj replikasyonu olmadığında da konakçı parçalanması meydana gelebilmektedir. Bu işlem dışarıdan lizis olarak bilinir [33]. Konak hücreler, bakteriyofaj saldırısına karşı tamamen savunmasız değildir ve tanımlanmış direnç mekanizmaları esas olarak plazmit kodludur (en sık meydana gelen direnç şekli, bir hücre yüzeyi reseptörünün kaybıdır). Örnekler arasında kısıtlama ve modifikasyon sistemleri, abortif enfeksiyonlarla sonuçlanan protein üretimi [34] ve bakteriyofaj DNA'sının F plazmit içeren hücrelere tamamen girmesinin önlenmesi [35] yer almaktadır.

#### **2.1.4. Bakteriyofajların Kimyasal ve Fiziksel Ajanlara Karşı Hassasiyeti**

Bakteriyofajlar, çeşitli kimyasal ve fiziksel maddelere karşı duyarlılıklarında, genellikle öngörülemeyen ve her durumda deneysel olarak belirlenmesi gereken şekillerde büyük farklılıklar göstermektedir. Bununla birlikte, bazı genel ilkeler vardır. Örneğin, tüm bakteriyofajlar güneş ışığının genel etkilerine ek olarak 260 nm aralığındaki UV ışığına

olduğu kadar uzak UV'ye de çok duyarlıdır; floresan ışıklı buzdolaplarında bakteriyofaj koleksiyonlarının kaybolduğuna dair çok sayıda rapor vardır. Bakteriyofaj canlılığını potansiyel olarak etkileyen diğer faktörler arasında pH, askorbik asit, üre, üretan, deterjanlar, şelatlama maddeleri, hardal gazı, alkoller ve ısıyla etkisizleştirme yer almaktadır. Bakteriyofajlar genellikle pH 5 ile 8'de stabildir ve birçoğu pH 3 veya 4'e kadar stabildir; ancak her bakteriyofajın özel olarak karakterize edilmesi gerekmektedir. Bakteriyofajlar genellikle üre ve üretan gibi proteini denatüre edici maddelere karşı oldukça hassastır, ancak inaktivasyon seviyesi hem konsantrasyona hem de sıcaklığa bağlıdır ve farklı bakteriyofajlar için farklılık göstermektedir. Hardal gazı, nitrik oksit ve ultraviyole ışık gibi mutajenik maddeler bakteriyofajı etkisiz hale getirir ve birçok lizogende litik döngüyü indükleyebilmektedir. Litik bakteriyofajlar, enfeksiyondan sonra konakçı proteinlerin devam eden sentezini gerektirmediğinden, yakın zamanda UV veya diğer mutajenlerle inaktive edilmiş hücreleri genellikle hala enfekte edebilmektedir.

## **2.2. Enfeksiyon Sürecine Genel Bakış**

Bakteriyofajlar, düşük bir enfeksiyon çokluğunda (multiplicity of infection (MOI)) uygun konakçı bakterilerle karıştırılmaktadır. Adsorpsiyon için birkaç dakika sonra, enfekte olmuş hücreler seyreltilmekte (salınan bakteriyofajın enfekte olmamış hücrelere veya bakteriyel kalıntıya bağlanmasını önlemek için) ve enfekte merkezleri belirlemek için numuneler çeşitli zamanlarda toplanmaktadır. Bir enfektif merkez, ya tek bir bakteriyofaj parçacığı ya da tek bir plak üretmek için agar üzerinde patlayan enfekte bir hücredir. Plakların sayısı genellikle karakteristik bir süre, gizli dönem boyunca enfekte olmuş hücrelerin sayısında sabit kalır ve ardından keskin bir şekilde yükselir, her hücre parçalanıp tamamlanmış bakteriyofajı serbest bıraktıkça başlangıç değerinin birçok katına eşitlenmektedir. Parçalanmadan önce ve sonra elde edilen plak sayısı arasındaki orana patlama boyutu denir. Hem patlama boyutu hem de latent dönem, belirli koşullar altında her bakteriyofaj suşunun karakteristiğidir, ancak kullanılan konakçı, ortam ve sıcaklıktan etkilenmektedir. Yüksek bir MOI'de (5-10 faj/hücre) enfeksiyon, aynı zamanda öldürmenin etkililiğini (yani hayatta kalan bakteri sayısı) ve bakteriyofaj enfeksiyonunun, hücre kütesinin sürekli genişlemesi ve absorbands veya optik yoğunlukta yansıtıldığı gibi nihai hücre lizisi açısından etkisi ölçmeye olanak tanınmaktadır. Sürecin verimliliği, zamanlaması ve diğer yönleri, konağın metabolik durumundan çok fazla etkilenebilir ve çoğu durumda, bakteriyofaj hücreyi ele geçirdikten sonra konakçı, artık

büyük metabolik değişikliklere uyum sağlayamaz. Bu nedenle, örneğin, anaerobik enfeksiyon üzerine çalışmalar, yalnızca kendileri anaerobik olarak büyümüş olan konakçı hücrelerde gerçekleştirilebilmektedir.

### **2.2.1. Adsorpsiyon**

Kuyruklu bakteriyofajların neden olduğu enfeksiyon, lifler veya sivri uçlar gibi özel adsorpsiyon yapıları, hedef bakterileri üzerindeki belirli yüzey moleküllerine veya kapsüllere bağlandığında başlamaktadır. Gram-negatif bakterilerde, proteinlerin, oligosakkaritlerin ve lipopolisakkaritlerin hemen hemen her biri, bazı bakteriyofajlar için reseptör görevi görebilmektedir. Gram-pozitif bakterilerin daha karmaşık mureini, çok farklı bir dizi potansiyel bağlanma bölgesi sunmaktadır. Birçok bakteriyofaj, yüzey penetrasyonu için bakteriyofaj kuyruğunu uygun şekilde konumlandırmak için yüksek konsantrasyonda bulunan belirli bir molekül türünün kümelerini gerektirmektedir. Adsorpsiyon hızı ve etkinliği, belirli bir bakteriyofaj-konak sistemi için dış etkenlere ve konağın fizyolojik durumuna bağlı olarak değişebilen önemli parametrelerdir. Birçok bakteriyofaj,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  veya herhangi bir divalent katyon gibi spesifik kofaktörler gerektirmektedir.

Bakteriler genellikle belirli bir bakteriyofaja karşı, o bakteriyofaj tarafından kullanılan reseptörlerin mutasyonel kaybı veya değiştirilmesi yoluyla direnç geliştirmektedir. Bununla birlikte, bazı reseptörlerin kaybedilmesi, farklı hücre yüzeyi moleküllerini reseptör olarak kullanan diğer birçok bakteriyofaj türüne karşı koruma sağlamaz. Ayrıca çoğu durumda bakteriyofaj, değiştirilmiş hücre yüzeyi proteinini tanıyabilmeleri veya farklı bir reseptöre bağlanabilmeleri için kuyruk liflerini değiştiren uygun konakçı aralığı mutasyonları yoluyla dengeleyici bir adaptasyon elde edebilmektedir. Bu muhtemelen bakterilerin direnç kazanmasından daha az etkilidir, çünkü yeni reseptörlere bakteriyofaj adaptasyonu yeni bir işlevsel etkileşimin kurulmasını gerektirirken, konakçı direncinin gelişimi fonksiyon kaybını gerektiren negatif bir olaydır [36]. Kuyruk liflerinin yapışma bölgeleri, yeni, kimerik adezinlerin oluşumunu kolaylaştıran yüksek rekombinasyon oranları ile ilgili bakteriyofajlar arasında oldukça değişkendir. Taksonomik olarak uzaktaki konakçıları enfekte edebilmeleri için iyi karakterize edilmiş bakteriyofajların kuyruk liflerine yeni alıcı-tanımaya elemanları tasarlama konusuna büyük ilgi

bulunmaktadır. Bir hücrenin fizyolojik durumu, belirli hücre yüzeyi moleküllerinin konsantrasyonunu ve dolayısıyla belirli bakteriyofajların neden olduğu enfeksiyonun etkinliğini büyük ölçüde değiştirebilmektedir. Belirli bakteriyofajların reseptör olarak kullandığı yüzey moleküllerinin çoğu, en azından bazı çevresel koşullar altında bakteri hücresi için çok önemlidir, bu nedenle direnç, önemli işlevlerin kaybına ve rekabet gücünün azalmasına neden olabilmektedir.

### **2.2.2. Penetrasyon**

Geri dönüşümsüz bağlanmadan sonra, bakteriyofaj genomu kuyruktan konakçı hücreye geçmektedir. Bu durum her faj için spesifik DNA transfer mekanizmalarını içermektedir. Genel olarak kuyruk ucu, peptidoglikan tabakasına nüfuz etmek ve ardından DNA'yı doğrudan hücreye salmak için iç zara dokunmak veya nüfuz etmek için enzimatik bir mekanizmaya sahiptir; kuyruğun bağlanması aynı zamanda, DNA'nın kapsidden çıkışını potansiyel bir konakçı üzerinde uygun şekilde konumlanana kadar bloke eden bir mekanizmayı da serbest bırakır. DNA daha sonra, genellikle hücresel enerjiye bağlı olan, ancak birkaç faj dışında tam olarak anlaşılabilen işlemlerle hücreye çekilir (örneğin, T7 fajında DNA'nın girişine transkripsiyon süreci aracılık etmektedir). Hücre içine girdikten sonra, bakteriyofaj DNA'sı potansiyel olarak konakçı ekzonükleazlara ve restriksiyon enzimlerine duyarlıdır. Bu nedenle, birçok bakteriyofaj, DNA'larını yapışkan uçlar veya terminal fazlalıkları aracılığıyla hızla dairesel hale getirir veya doğrusal uçları korur. Diğer durumlarda, genomları, ortak konakçılarında bulunan restriksiyon enzimleri tarafından tanınabilecek bölgeleri ortadan kaldırmak için evrimsel zaman boyunca seçilmiştir.

### **2.2.3. Konakçıdan Bakteriyofaj Yönlü Metabolizmaya Geçiş**

İlk adım genellikle çok güçlü bakteriyofaj promotörlerinin konakçı RNA polimerazı tarafından tanınmasını içermekte ve bu da hemen erken genlerin transkripsiyonuna yol açmaktadır. Bu genlerin ürünleri bakteriyofaj genomunu koruyabilmekte ve konakçıyı bakteriyofajın ihtiyaçlarına uygun şekilde yeniden yapılandırabilmekte; konak proteazlarını inaktive edebilmekte ve kısıtlama enzimlerini bloke edebilmekte, çeşitli konak makromoleküler biyosentezlerini doğrudan sonlandırabilmekte veya bazı konak proteinleri yok edebilmektedir. T4, SPO1 ve Sb-1 gibi bakteriyofajlar, bu konak devralma

sürecine katılıyor gibi görünen, tek tek klonlandıklarında bile konakçı için öldürücü olan birçok proteini kodlamaktadır. Daha sonra, yeni bakteriyofaj DNA'sını sentezleyen ürünler üreten bir dizi orta gen, ardından bakteriyofaj partikülünün bileşenlerini kodlayan bir dizi geç gen kopyalanmaktadır. Bazı bakteriyofajlar için bu geçişler, konakçı RNA polimerazı yeniden programlamak için yeni sigma faktörlerinin veya DNA bağlayıcı proteinlerin sentezini içerir; diğer bakteriyofajlar kendi RNA polimerazlarını kodlar. Konak DNA'sının bozulması ve konakçı mRNA'ların translasyonunun inhibisyonu, hücrenin yeni bakteriyofaj sentezi için yeniden programlanmasına katkıda bulunabilen diğer mekanizmalardır.

#### **2.2.4. Morfogenez**

DNA, prokapsid adı verilen önceden birleştirilmiş ikosahedral protein kabuklarına paketlenmektedir. Çoğu bakteriyofajda, bunların montajı, spesifik yapı iskelesi proteinleri ile ana baş yapısal proteinler arasındaki karmaşık etkileşimleri, ardından hem yapı iskelesinin hem de ana baş proteinlerin N-terminalinin proteolitik bölünmesini içermektedir. Paketlemeden önce veya paketleme sırasında, DNA için artan iç hacimle birlikte kafa genişlemekte ve daha kararlı hale gelmektedir. Başın bir köşesinde yer alan portal kompleks, kafa montajı için başlangıç noktası, DNA paketleme enzimleri için kenetlenme bölgesi, DNA'nın geçişi için bir kanal ve miyovirüsler ve sifovirüsler için, ayrı olarak bir araya getirilen bakteriyofaj kuyruğu için bir bağlanma bölgesi olarak hizmet etmektedir.

#### **2.2.5. Hücre Lizisi**

Son adım olan konakçı hücrenin parçalanması, zamanlaması sıkı bir şekilde kontrol edilen ani bir olaydır. Parçalanma çok hızlı gerçekleşirse, döngüyü etkili bir şekilde sürdürmek için çok az sayıda yeni bakteriyofaj yapılmış olacaktır; lizis çok uzun süre ertelenirse, enfeksiyon fırsatları ve yeni bir patlayıcı üreme döngüsü kaybedilmiş olacaktır [37, 38]. Kuyruklu bakteriyofajların hepsi lizis için iki bileşen kullanır: peptidoglikan matrisindeki anahtar bağlardan birini parçalayabilen bir enzim olan lizin ve lizinin hareket etmesine izin vermek için uygun zamanda iç zardaki gözenekleri bir araya getiren bir protein olan holin peptidoglikan tabakasına ulaşır ve lizisi hızlandırmaktadır. Zamanlama, büyüme koşullarından ve genetikten etkilenir;

değiştirilmiş lizis sürelerine sahip mutantlar seçilebilir. Kuyruksuz bakteriyofajlar, konakçı peptidoglikan işleme enzimlerini çeşitli şekillerde bozan çeşitli tek proteinli lizis çökeltici proteinleri kodlar.

### 2.3. Bakteriyofajlar ve Güvenlik

Bakteriyofajların güvenli bir kullanım geçmişi vardır. Konak özgüllükleri, insan hücrelerinin enfeksiyonunun olası olmadığını düşündürür. Terapötik bakteriyofajların eski Sovyetler Birliği'nde ve Doğu Avrupa'daki ülkelerde kapsamlı tıbbi kullanımı, bakteriyofaj preparatlarının güvenle alınabileceğini düşündürmektedir [8, 39]. Hayvan deneyleri, konak adapte olmayan bakteriyofajların yüksek dozlarda bile ağızdan uygulanmasının, bakteriyofajların dolaşım sistemine girmesine izin vermediğini göstermiştir. Hayvanlarda intravenöz bakteriyofaj enjeksiyonu ile yapılan deneyler, bakteriyofajların dolaşım sistemine geçse bile retiküloendotelial sistem tarafından hızla temizlendiğini ortaya çıkarmıştır [40]. Bakteriyofajlar terapötik dozlarda kullanıldığında bile, insanlarda bakteriyofajlara karşı şiddetli bağışıklık reaksiyonları olduğuna dair çok az kanıt vardır. Tedavi hastalarının % 0,5'inden daha azında bazı hafif yan etkiler rapor edilmiş, ancak etkiler kolayca tersine çevrilmiştir [40]. Bakteriyofaj kullanımının potansiyel bir sorunu, parçalanmış bakteri hücrelerinden toksinlerin salınmasıdır, ancak bu salıverme, diğer kontrol uygulamalarında da meydana gelmiştir. Her yerde bulunan doğalını nedeniyle, bakteriyofajlar çeşitli gıdalarda düzenli olarak tüketilmektedir. Bakteriyofajlar çevrede bol miktarda bulunur; topraktaki doğrudan sayımlar ortalama  $1,5 \times 10^7$  POB/g bulmuştur [41]. İnsanlar muhtemelen yaşamları boyunca hem yutulan gıdalardan hem de gastrointestinal sistem, deri ve üst solunum sistemindeki endojen bakteriyofajlarla temas halindedir [8, 40].

*Konakçı Spesifikliğı:* Bakteriyofajlar tarafından bakteriyel patojen biyokontrolünün en önemli avantajlarından biri, belirli bir konakçı için özgüllüktür. Bir bakteriyofajın konak aralığı, hücre girişinde, bunun konak hücre reseptörleri ile etkileşimi ve ardından restriksiyon modifikasyon sistemleri tarafından belirlenmektedir. Bir bakteriyofajın bir konakçıya başarılı bir şekilde bağlanması, hücre yüzeyindeki spesifik reseptörler ile bakteriyofaj üzerindeki antireseptörler arasında bağlanmayı gerektirmektedir. Tipik reseptörler, dış zar taşıma proteinlerini, lipopolisakaritleri, karbonhidratları, flagella ve



pili gibi özelleşmiş yapıları içermektedir. Bazı bakteriyofajlar aynı anda birkaç farklı reseptöre veya birden fazla reseptöre bağlanabilmektedir [42-44]. Sonuç olarak, *E. coli* O157:H7 gibi bir patojen, belirli bir bakteriyofaj tarafından enfekte olabilmektedir, ancak yakından ilişkili patojenik olmayan serovarlar etkilenmeden kalabilmektedir.

*Minimum Konakçı Eşiği:* Diğer bir potansiyel problem, bakteriyofaj replikasyonuna izin vermek için minimum sayıda konakçının mevcut olması gerekliliğidir. Bu gereklilik, sütte *Pseudomonas* [45], kültürde *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ve *E. coli* [46] ve tavuk çekumunda *Salmonella*'yı enfekte eden bakteriyofajlar için gösterilmiştir [47]. Berchieri ve ark. [47], bakteriyofajların konakçılarını ancak konağın yoğunluğu belirli bir eşiği (yaklaşık  $10^4$  KOB/ml) aştığında etkileyeceği sonucuna varmıştır. Bununla birlikte, gıdada, konakçı yoğunluğunun  $cm^2$  başına 46 hücre olduğunda aktivite gözlemlenmiştir [48]. Bakteriyofajların biyokontrol için etkin bir şekilde kullanılması için yoğunluğa bağlı çeşitli eşikler ve kritik zaman noktaları dikkate alınmalıdır [49].

*Konakçı Olmayan Bakteri:* Bazı gıda sistemlerindeki diğer bir karmaşıklıklandırıcı faktör, önemli sayıda konakçı olmayan bakteri hücrelerinin varlığıdır. Biyokontrol için bakteriyofajların etkinliği, enfeksiyöz partikülleri bir konakçıya taşımak için pasif difüzyona güvenmekle sınırlıdır. Bir matematiksel model sisteminde [50], bakteriyofaj eyleminin hedef olmayan türlerin veya diğer parçacıklı maddelerin yüksek yoğunlukları tarafından engellenmesi, hedef organizmanın yok olma olasılığını azaltma eğilimindedir. Yalnızca diğer türlere kıyasla konakçı bol olduğunda, bakteriyofajın rakip tuzakların yokluğunda olduğu gibi aynı seviyelere ulaşacağı tahmin edilmektedir. Model bir gösterge olmasına rağmen, bildiğimiz kadarıyla, gıda bileşenlerinin veya hedef olmayan türlerin bakteriyofajın konakçılara taşınma kabiliyeti üzerindeki etkisini değerlendirmek için çok az veri mevcuttur. Besin matriksi ve bakteriyofajın her bir kombinasyonu, muhtemelen, biyokontrol parametrelerinin özel bir optimizasyonunu gerektiren, kendi benzersiz etkileşim setine sahip olacaktır.

*Kaçınma ve Direnç:* Bakteriyofajlar, konakçılarını enfekte etmede ve yok etmede etkilidir (istisna: lizogeni). Bununla birlikte, konakçıların, coğrafi [51] ve genetik [52] stratejiler de dahil olmak üzere avcılarından kaçmak için mekanizmaları vardır. Konakçı,

bakteriyofajların erişemeyeceği bir yer bulabilirse, o zaman açıkça enfekte olmayacaktır. Bu tür yerlerin sınırlı olması muhtemeldir ancak bazı biyofilmler [53] ve bakteriyofajları yok eden ancak konakçıya zarar vermeyen (örn. düşük pH [54]) durumlar oluşabilmektedir. Teorik olarak, konakçının bakteriyofajlara karşı direnci, DNA mutasyonu, yatay olarak hareketli genlerin edinilmesi veya bağışıklık kazandıran bir lizogenik bakteriyofajın enfeksiyonu ile geliştirilebilmektedir. Luria ve Delbruck [55] dönüm noktası niteliğindeki 1943 yılında yayınladıkları makalelerinde, *E. coli* B mutasyonunun bakteriyofaj T1 direncine olan sıklığını hücre bölünmesi başına  $2,45 \pm 3 \times 10^{-8}$  POB/ml olarak belirlemişlerdir. Ayrıca mutasyonların nadiren vahşi tipe döndüğünü de bulmuşlardır. Bakterilerin antibiyotiklere verdiği yanıtın aksine, bakteriyofaj tedavisi sonucunda ortaya çıkan dirençli organizmalar, kapsül ve diğer organellerin kaybı nedeniyle genellikle daha az öldürücüdür [56]. Daha yakın zamanlarda, bakteriyofaj ve konakçı arasındaki uzun vadeli etkileşimlerin modellenmesi, konakçının daha dirençli olma eğiliminde olması ve bakteriyofajın konak menziline daha geniş olma eğiliminde olmasıyla, antagonistik birlikte evrimin meydana gelebileceğini göstermektedir [57]. Bununla birlikte, çalışılan bazı gıdaların sonuçlarında öne sürdüğü gibi, bakteriyofajlar konakçının minimum büyüme sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda çoğalabiliyorsa, büyüme gerçekleşmeyeceği için dirençli bir alt popülasyonun gelişme olasılığı yoktur.

*Genlerin Hareketi:* Genelleştirilmiş transdüksiyon olarak bilinen bir süreçte, bazı bakteriyofajlar, konakçının kromozomundan veya hücre içindeki diğer mobil genetik elementlerden yeni bir konakçıya DNA yolları iletebilmektedir. İletilen DNA, toksin veya antibiyotik dirençli genler gibi patojen popülasyonu arasında yayılması istenmeyen genler içerebilmektedir. Bu nedenle, herhangi bir biyokontrol uygulamasında kullanılacak bakteriyofajların, genelleştirilmiş transdüksiyon gerçekleştirip gerçekleştiremeyecekleri veya ölümden önce konakçıda ifade edilebilecek herhangi bir virülans geni taşıyıp taşımadıklarını belirlemek için dikkatlice karakterize edilmelidir.

#### **2.4. Bakteriyofajlar ve Gıda**

Gıda kaynaklı hastalıklar dünya çapında büyük endişe kaynağıdır. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC), ABD’de her yıl yaklaşık 5.000 ölüme neden olan 76 milyon

gıda kaynaklı hastalık vakasının meydana geldiği tahmin edilmektedir [58]. Bakteriyofajların çeşitli gıdalardan izolasyonunu detaylandıran ve bakteriyofajların gıda ekosistemlerinin normal sakinleri olduğunu öne süren birçok rapor vardır. ABD'deki yerel pazarlardan satın alınan 45 soğutulmuş gıda örneğinin 22'sinden 38 bakteriyofaj ve konakçıları geri kazanılmıştır [59]. Bu tespit düzeyi, taksonomik olarak çeşitli konakçıların izole edilmesine izin vermek için seçici olmayan bir ortamın kullanıldığı, esasen rastgele bir yaklaşım kullanılarak elde edilmiştir. Bakteriyofajlar, salatalık fermantasyonu [60], salam fermantasyonu [61], marul [62, 63], kimchi, soğutulmuş ve dondurulmuş yengeçler, domuz eti [63], ıstiridye [63], midye, mantar [63], börek [63], bisküvi hamuru [63], şarküteri ekmeği [63], hindi ve tavuk kızartma [63], tavuk [63-65], peynir [66], yoğurt [66, 67], ayran [68] ve sığır eti [63, 65, 69] dahil olmak üzere çeşitli gıdalardan veya gıda işlemlerinden izole edilmiştir.

Gıdada bakteriyofajların varlığı, konakçının da mevcut olduğunu veya bir zamanlar mevcut olduğunu ancak işleme sırasında etkisiz hale getirildiğini göstermektedir. Bu nedenle, konakçısı *E. coli* olan kolifajların varlığı, bazı yiyeceklerde hoş karşılanmazken bazılarında (örneğin çiğ et) beklenmeyen bir durum olmayabilir. Bakteriyofajların konakçıların mevcudiyetinde oluşması muhtemel olduğundan ve bu nedenle normal mikrobiyotanın bir parçası olduklarından, gıda kalitesinin değerlendirilmesinde hijyen göstergeleri olarak belirli bakteriyofajların kullanılması önerilmiştir [63, 70]. İndikatör olarak bakteri yerine bakteriyofaj kullanmanın bir avantajı, sonuçların bakteri sayımı için kullanılan geleneksel tekniklerle mümkün olandan daha hızlı, yani 6 ile 8 saat içinde tespit edilebilmesidir [65].

Son 15 yılda, birçok araştırmacı enterik virüslerle [71-75] çevresel kontaminasyonun göstergesi olarak bakteriyofajların potansiyel kullanımını araştırmış ve EPA suda bakteriyofaj sayımı için protokoller yayınlamıştır. Bakteriyofajlar boyut, fiziksel özellikler ve davranış olarak enterik virüslere geleneksel bakteriyel gösterge olan *E. coli*'den daha benzerdir. Gıdalardaki bakteriyofajların stabilitesine ilişkin değerlendirmeler önemlidir, çünkü bakteriyofajların biyokontrol ajanları olarak başarılı olmaları için, uygulandıkları gıdanın fizyokimyasal koşulları (örneğin, pH ve su aktivitesi) altında stabil olmaları gerekebilir. Çeşitli gıdalardaki gıda kaynaklı bakteriyel

patojenlerin seviyelerini azaltmanın en etkili yollarından biri ürün paketlenmeden önce çiğ veya tüketime hazır (ready-to-eat (RTE)) gıdalara doğrudan bakteriyofaj uygulamak olarak değerlendirilebilir. Bu noktada, tüm büyük gıda üreticileri tarafından kullanılan mevcut gıda güvenliği müdahale uygulamalarının bir sonucu olarak, olağan gıda kaynaklı bakteriyel patojenlerle kontaminasyon genellikle aşgari düzeydedir. Bu nedenle, o sırada bakteriyofajların uygulanması, ürün temizliği için nihai bir yol sağlayabilir. Ayrıca, bakteriyofajları nihai ürünün ambalajına mümkün olduğu kadar yakın bir yere uygulamak, bunların işleme tesisine geri taşınmasını en aza indirecek ve bu da bakteriyofaja dirençli bakteriyel mutantların olası ortaya çıkışını azaltacaktır. Birkaç çalışma, çiğ veya hazır gıdaya bakteriyofaj uygulanmasının, bunların bakteriyel patojenlerle kontaminasyonunu önemli ölçüde azalttığını göstermektedir. Örneğin, Goode ve ark., çiğ tavuk üzerine *Campylobacter jejuni* ve *Salmonella*'ya özgü bakteriyofajların uygulanmasının kontaminasyonu sırasıyla 10 ile 100 kat ve % 99 oranında azalttığını bildirmiştir [76]. Leverentz ve ark., çeşitli RTE gıdalarında gıda kaynaklı patojenleri ortadan kaldırmak veya sayısını azaltmak için bakteriyofaj kullanmanın ilk inceleyenlerden biridir [77]. *Salmonella* bakteriyofajlarının canlı *Salmonella* konsantrasyonunu 5 ve 10°C'de saklanan deneysel olarak kontamine edilmiş tatlı kavun dilimlerinde 3,5 log birim ve yaklaşık 20°C'de saklanan dilimlerde 2,5 log birim azalma gözlenmiştir.

#### **2.4.1. Patojenler için Biyokontrol Ajanları Olarak Bakteriyofajlar**

Bakteriyofajlar, insan besin zincirindeki klasik tarladan sofraya sürekliliğinde üretimin tüm aşamalarında yiyeceklerdeki patojenlerle savaşmak için kullanılabilir. Buna göre, bakteriyofajların kullanımına örnek olarak aşağıdaki maddeler sunulabilmektedir:

- i. çiftlik hayvanlarında hastalıkları önlemek veya kolonizasyonu azaltmak için;
- ii. bakteriyel yükleri azaltmak için gıda materyalinde (karkas ve diğer ham ürünler gibi) veya ekipman ve temas yüzeylerinde;
- iii. raf ömrünü uzatmak için gıdalarda doğal koruyucu olarak.

Bakteriyofajları biyokontrol ajanları olarak kullanmanın en belirgin yolu, onları doğrudan gıdalara uygulamaktır. Birçok gıda buzdolabında saklandığından ve gıda kaynaklı patojenlerin çoğu bu koşullar altında gelişmediğinden, bakteriyofajların soğutulmuş

gıdadaki (yaklaşık 4°C) konakçılarını öldürüp öldüremeyeceğini belirlemek önemlidir. Bakteriyofaj-konak ilişkisi ile ilgili diğer hususlar arasında, konakçı olmayan organizmaların varlığının etkileri, gıdaların pH ve diğer fizyokimyasal özelliklerinin etkisi, katı bir substrat veya biyofilm üzerindeki aktivite, dirençli bakteriyel mutantların ortaya çıkışı ve replikasyona izin vermek için gereken bakteriyofajların ve konakçıların nispi sayıları yer almaktadır.

Cevaplanması gereken birincil soru, bakteriyofajlar gıdalardaki bakteriyel patojenleri kontrol edebilir mi? Şimdiye kadar bu sorunun cevabı evet olmakla birlikte en azından belirli durumlarda kontrol edebildiği ortaya konulmuştur. Kesin bir gıda güvenliği endişesi olmasa da, gıdaların raf ömrünün bakteriyofajlar tarafından bozulma organizmalarının kontrolü yoluyla uzatılması düşünülmüştür ve elde edilen bilgiler, fajların patojen biyokontrol ajanları olarak kullanımının anlaşılmasına ve geliştirilmesine yardımcı olmak için kullanılabilir. Bakteriyofaj biyokontrol yoluyla gıda güvenliğini artırmak için alınabilecek başka bir yaklaşım, gıda hayvanlarını kesimden önce bakteriyofajlarla tedavi etmek olabilir. Bakteriyel patojenler, sığır ve koyunlarda dışkıdan deriye doğrudan veya dolaylı çapraz kontaminasyon yoluyla karkaslara verilmektedir [78]. Kümes hayvanlarında, patojenler canlı kuş üzerinde ve bağırsak içeriğinde bulunur ve mekanik yolma sırasında doğrudan karkasa yayılmaktadır [79]. Patojenler hayvanın dışkısından uzaklaştırılabilir veya önemli ölçüde azaltılabilirse, bu kaynaktan kontaminasyon olasılığı en aza indirilmiş olacaktır.

Bakteriyofajlar kendi kendini kopyalayan farmasötikler olarak görülebilmektedir [49, 80]. Bu benzersiz özellik nedeniyle, patojenleri kontrol etmek için kullanılacakları iki olası yol vardır. Aktif bir tedavi yaklaşımında, çoğu bakteri komşu organizmalardan replikasyon ve bulaşma nedeniyle ikincil enfeksiyonlar tarafından öldürülmektedir. Bu durumda, patojenin etkili bir şekilde ortadan kaldırılması için nispeten küçük bir bakteriyofaj dozu gereklidir, çünkü konağın kendisi bakteriyofajları çoğaltmakta ve komşu hücrelere geçişlerini sürdürmektedir. Bakteriyofaj uygulamasının zamanlaması aktif tedavide önemli görünmektedir ve konakçı hücreler, tüm hedef hücreleri öldürmeye yetecek kadar faj yaymak için tahmin edilen kritik replikasyon eşiğini aşmalıdır. Bazı *in-vitro* deneyler için bir eşik noktasının varlığı tartışılmaktadır [49, 80], ancak kesin bir veri

sunulmamıştır. Sonuç olarak, bu aktif tedavi yaklaşımı, patojen sayılarının muhtemelen daha yüksek olduğu hasat öncesi müdahaleler için daha uygun olabilmektedir. Alternatif uygulama şekli pasif tedavidir; burada etki şekli, ikincil enfeksiyöz replikasyon bir gereklilik olmadığı için geleneksel ilaç rejimlerine daha benzerdir. Bu prosedürde, birincil enfeksiyon veya dışarıdan lizis yoluyla tüm hedef organizmaları alt etmek için yeterli miktarlarda bakteriyofajlar eklenmektedir. Daha fazla sayıda bakteriyofaj gerekmesine rağmen, patojenlerin seyrek popülasyonlarını bile ortadan kaldırabilmelidirler.

#### **2.4.2. Gıdalarda *Salmonella* ve Bakteriyofaj Uygulamaları**

Gıda kaynaklı hastalıklar ve *Salmonella*'nın en yaygın görülen ve yaygın olarak dağıtılan ajanlar olmasıyla dünya çapında büyüyen bir halk sağlığı sorunudur. Bu Gram-negatif bakteri, sıcakkanlı hayvanların, özellikle çiftlik hayvanlarının bağırsağında yaygın olarak bulunmakta ve insanlara öncelikle hayvansal kaynaklı kontamine gıdaların tüketimi yoluyla bulaşmaktadır. Kanatlı eti ve türevleri, insanlarda görülen salmonellozun en yaygın kaynağı olarak kabul edilmektedir. Bu tür patojenlerin yüksek prevalansına ve bunun sonucunda ortaya çıkan sağlık sorunlarına ek olarak, antibiyotiğe dirençli suşların ortaya çıkması nedeniyle bu patojenlerin kontrolü giderek zorlaşmaktadır. Bu ortaya çıkış, antimikrobiklerin hayvanlarında kötüye kullanılmasının bir sonucudur ve insanlarda gıda kaynaklı hastalıkların tedavisinde bir zamanlar etkili olan antibiyotiklerin etkisini tehlikeye atmaktadır. Bakteriyofajlar, ortamda her yerde bulunan, yüksek konak özgüllüğüne ve bakteriyel direncin üstesinden gelmek için gelişme kapasitesine sahip, onları patojenlerin kontrolü için çekici bir seçenek haline getiren, doğal olarak oluşan bakteri avcılarıdır.

Domuz vebası'nın etiyolojik etkeni üzerine yapılan araştırmalar Theobald Smith'i 1885'te *Bacterium suipestifer* adlı Gram-negatif bir basilin izolasyonuna götürmüştür. Bakteri ayrıca, *Salmonella* adının türetildiği D. E. Salmon tarafından karakterize edilmiştir. Spor oluşturmeyen hücreler, çapları 0,7 µm ile 1,5 µm ve uzunlukları 2 µm ile 5 µm arasında değişen boyutlarda düz çubuk şeklinde bir morfolojiye sahiptir. Bu hücreler genellikle peritriköz flagella sunan hareketlidir. *Salmonella* spp. *Enterobacteriaceae* familyasına aittir ve kemoorganotroflar (enerji kaynağı olarak

organik bileşikleri kullanan organizmalar), fakültatif anaeroblar ve hidrojen sülfid üreticileridir [81]. Hemen hemen tüm Gram-negatif bakterilerde olduğu gibi *Salmonella*'nın dış zarı, membran proteinleri ve lipopolisakkaritlerden oluşmaktadır. Lipopolisakkaritler, hücre yapısal bütünlüğünün korunmasında ve kimyasallardan korunmada önemli bir rol oynamaktadır. Konak organizmalarda endotoksinler ve güçlü bir bağışıklık tepkisi sergileyen bir pirojen gibi davranmaktadır. Yapısal olarak üç farklı bileşenden oluşurlar: lipid A, çekirdek oligosakarit ve O-polisakarit [82]. O-polisakarit (aynı zamanda O-antijeni veya O-yan-zincir) ile birlikte H-antijeni (flagella'dan) ve Vi (kapsüler antijenler), Kauffman-White sınıflandırma şemasının temelidir ve farklı *Salmonella*'nın spesifik ticari antiserumlarla reaksiyona girdiklerinde aglütinasyon paternlerine göre serotiplerde gruplanmasını sağlamaktadır [81, 83].

*Salmonella*'yı enfekte eden çok sayıda bakteriyofaj izole edilmiştir. Bir *Salmonella* bakteriyofajına ilişkin ilk rapor 1918 yılına dayanmaktadır ve Félix d'Hérelle tarafından tanımlanmıştır. *Salmonella* bakteriyofajları farklı kaynaklardan izole edilmiştir: atık su bitkileri, kanalizasyon, gübre, dışkı ve farklı hayvanlardan (ör. kümes hayvanları, hindi, domuz, insanlar), hayvanat bahçesi göletlerinden, kümes hayvanı çiftliklerinden yuvalardan vb. [84-86]. *Salmonella* bakteriyofajlarının çok sayıda ve farklı özgülüğü, Dünya Sağlık Örgütü tarafından önerilen daha yaygın *Salmonella enterica* serotiplerini (örneğin *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*) alt kategorilere ayırmak için yararlı bir tiplendirme aracı olan bakteriyofaj tiplendirme yoluyla *Salmonella* sınıflandırmasına olanak sağlamıştır. Muhtemelen en iyi bilinen *Salmonella* bakteriyofajları, litik bakteriyofaj Felix 01 ve ılıman virüs P22'dir. Felix 01, *Salmonella* arasında geniş litik spektrumu ile karakterize edilmiş ve *Salmonella*'nın tanımlanmasında bir teşhis aracı olarak kullanılmıştır. Son yıllarda, Felix 01'den daha geniş bir konakçı aralığına sahip olan ve yalnızca terapötik bir ajan olarak değil, aynı zamanda bir teşhis aracı olarak da büyük potansiyel sunan bir bakteriyofaj tanımlanmıştır [85-87]. Bazı gıdalarda *Salmonella*'nın biyokontrolü üzerine yapılan çalışmalar genel olarak olumlu sonuçlar vermiştir. Bu patojenin insanlara bulaşmasını önlemek amacıyla hayvanlarda ve gıda maddelerinde *Salmonella*'nın kontrolünde bakteriyofajların potansiyel kullanımını değerlendirmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Genel olarak, hedef bakterilerin yok edilmesi son derece olası olmayan bir olay olsa da, bakteriyofajların bu patojenlerin sayısını azaltabildiği ilkesinin kanıtı oluşturulmuştur.

Bakteriyofajların gıda güvenliğini artırmak için kullanılabileceği başka bir yol da onları doğrudan çiğ gıda ürünlerine uygulamaktır. Bu yaklaşımın pratik uygulanabilirliği, bakteriyofaj replikasyonu için gerekli olduğu öne sürülen konakçı hücrelerin minimum yoğunluğu nedeniyle tehlikeye girebilmektedir [49, 88]. Bununla birlikte, bakteriyofajların, konak hücre popülasyonu 46 KOB/cm<sup>2</sup> kadar düşük olduğunda etkili biyokontrol ajanları olabileceği gösterilmiştir [48]. Bu çelişkili sonuçlar, bakteriyofaj-konak kombinasyonlarındaki, kullanılan matristeki, konakçı olmayan tuzakların varlığında ve hatta uygulanan modellerdeki farklılıkların bir sonucu olabilmektedir. Bu nedenle, bakteriyofaj bazlı biyokontrolün etkinliği vaka bazında belirlenmelidir [89]. Örneğin, Cheddar peynirinin üretimi ve depolanması sırasında lux genini içeren bir *Salmonella* Enteritidis izolatının hayatta kalması üzerinde bakteriyofajların etkisi, sabit bir patojen/bakteriyofaj oranında değerlendirilmiştir [90]. Çiğ ve pastörize süt örnekleri, ml başına 10<sup>4</sup> *Salmonella* ve 10<sup>8</sup> bakteriyofaj ile aşılanmış ve işlem sırasında her ikisinin de sayıları belirlenmiştir. Hem çiğ hem de pastörize süt peynirinde, bakteriyofaj eklenmemiş üretim sırasında alınan örneklerde aşılanmış patojen sayısı artmış, ancak bakteriyofaj varlığında azalmıştır. Olgunlaşma sırasında, hiçbir bakteriyofaj bulunmadığında, *Salmonella* sayısı yaklaşık 2 log birim azalmıştır. Bakteriyofajların varlığında, pastörize süttten yapılan peynirde 89 günlük depolamanın ardından *Salmonella* saptanamaz hale gelmiş, ancak pastörize edilmemiş süttten yapılan peynirde yaklaşık 10<sup>2</sup> KOB/g'de varlığını sürdürmüştür. Bu nedenle yaklaşım, pastörize süttten yapılan peynir için, kullanılan inokulum seviyesinde daha etkilidir. Gıda maddelerinde *Salmonella* kontrolü sadece et ve türevleri ile sınırlı değildir. *Salmonella* Enteritidis'in kontrolü ayrıca 5, 10 ve 20°C'de saklanan yapay olarak yaralanmış elma ve kavun dilimleri üzerinde de çalışılmıştır ve etkinlik elmada gösterilmezken kavunda gösterilmiştir [77]. Bu çalışma, tek bir sabit oranlı bakteriyofaj ve patojen ile gerçekleştirilmiştir. Bakteriyofajlar, patojenin büyümesini 10 ve 20°C'de geciktirmiş, son sayımda (168 saat inkübasyon) kontrollere kıyasla bakteriyofajla muamele edilmiş kavun numunelerinde yara başına 1 ile 2 log birim daha az sayım elde edilmiştir. Elmalar için, işlenmiş ve işlenmemiş numuneler arasında fark yokken faj sayısı hızla azalarak 24 ile 48 saat içinde tespit edilemez hale gelmiştir. İki meyve arasındaki aktivite ve bakteriyofaj canlı kalımındaki fark, pH'daki bir farka bağlı olduğu belirtmiştir. Bakteriyofajların *Salmonella* serotiplerinin kontrolü üzerindeki etkisi deneysel olarak kontamine brokoli ve hardal



tohumlarında da araştırılmıştır [91]. İşlenmiş ve işlenmemiş örneklerde nihai *Salmonella* sayısında küçük azalmalar gözlenmiştir. Bununla birlikte, her durumda, kullanılan bakteriyofajların mevcudiyetinde *Salmonella* gelişebilmiştir. Sonuçlar, patojenlerin verimli biyokontrolünde konakçı özgülüğünün bir faktör olarak dikkate alınması gereğini vurgulamıştır.

Etlük piliç ve hindi karkaslarında *Salmonella*'yı kontrol etmek için bakteriyofajların etkinliği Higgins ve ark. tarafından test edilmiştir [92]. Bu çalışmada, karkaslara uygulanan  $10^6$  POB bakteriyofajın,  $10^3$ 'ün altındaki seviyelerde *S. Enteritidis*'in uzaklaştırılmasında yetersiz olduğu kabul edilmiştir. Bunun yerine,  $\geq 10^8$  POB uygulaması, geri kazanılabilir *Salmonella* içeren karkas sayısında belirgin bir azalma ile sonuçlandığı rapor edilmiştir. Higgins ve ark. ayrıca doğal olarak kirlenmiş hindi karkaslarını tedavi etmek için 72 farklı *Salmonella* bakteriyofajından oluşan bir kokteyl kullanmıştır. Sonuçlar, kokteylin kontamine karkaslardan *Salmonella* iyileşmesini etkili bir şekilde azalttığını gösteren umut vericidir. Bu çalışmalar, *Salmonella* ile kontamine olmuş karkasları verimli bir şekilde tedavi etmek için yüksek konsantrasyonda bakteriyofajın, tercihen farklı fajlardan oluşan bir kokteylin kullanılması gerektiğini göstermektedir.

Bakteriyofajların etkisiyle *Salmonella*'nın kontrolü, Bigwood ve ark. tarafından çiğ ve pişmiş sığır etinde de test edilmiştir [93]. Numuneler düşük veya yüksek yoğunluklarda (sırasıyla  $<10^2$  veya  $10^4$  KOB/cm<sup>2</sup>) *Salmonella* ile aşılmıştır. Daha sonra,  $10^1$  veya  $10^4$  MOI'de bakteriyofajlar eklenmiş ve soğutulmuş ve oda sıcaklığında saklamayı simüle etmek için farklı sıcaklıklarda (sırasıyla 5°C ve 24°C) inkübe edilen numuneler kullanılmıştır. Bakteriyofajlar, kontrollerle karşılaştırıldığında (bakteriyofajsız *Salmonella* ile aşılacak örnekler) 5°C'de inkübe edilen numuneler için *Salmonella* sayısını 2,3 log KOB/cm<sup>2</sup>'ye kadar ve 24°C'de inkübe edilen numuneler için 5,9 log KOB/cm<sup>2</sup>'den daha fazla düşürmeyi başarmıştır. Bu sonuçlar hem yüksek *Salmonella* yoğunlukları ( $10^4$  KOB/cm<sup>2</sup>) hem de 24 saat inkübe edilmiş örneklerle yüksek MOI'de ( $10^4$ ) uygulanan bakteriyofajlar için elde edilmiştir. Düşüşler, 8 günlük inkübasyondan sonra daha da yüksek kaydedilmiştir. Düşük *Salmonella* yoğunlukları için numunelerin

çoğu için azalmalar önemli değildir. İlginç bir şekilde, geri kazanılan *Salmonella* hücrelerinin bakteriyofaj enfeksiyonuna karşı hala hassas olduğu bulunmuştur.

## **2.5. Gıdalarda için Yenilebilir Kaplama ve Bakteriyofaj Uygulamaları**

Biyopolimerlerden oluşan ve gıdalarla birlikte tüketilebilen birincil ambalaj tabakası olan yenilebilir kaplama uzun yıllardır talep gören bir işlemdir. Polisakkaritler, proteinler ve lipitler, yenilebilir kaplamada kullanılan başlıca yenilebilir biyopolimerlerdir. Yenilebilir kaplamanın birincil işlevi, çevresiyle birlikte gıda yüzeylerindeki gaz ve su geçirgenliğini kontrol etmektir. İkincil işlev, ürünlerin mikrobiyal bozulma ve mekanik hasardan korunmasını içermektedir. Ek olarak, yenilebilir kaplama, kaplanmış gıdaların zenginleştirilmiş organoleptik ve duyuşsal özellikleri aracılığıyla tüketici kabulünü geliştirmektedir. Yenilebilir kaplama uygulaması, bütün ve taze kesilmiş meyve ve sebzelerin, deniz ürünlerinin, etin kaplanmasını ve fırıncılık ürünlerindeki son uygulamalarını içermektedir. Yenilebilir kaplama aynı zamanda besin kayıplarını ve kalite bozulmalarını önleyerek raf ömrünü uzatan taze ve işlenmiş gıdalar için aktif bir koruma tekniğidir. Bu biyopolimerler, gıda ürünlerinin güvenliğini artırmak için antioksidan, antimikrobiyal ve antiviral ajanlar için taşıyıcı malzeme görevi görmektedir. Yenilebilir kaplamalar, bozulabilir maddelerin hasat sonrası kayıplarına, gıda güvensizliğine ve artan çevresel kaygılara umut verici bir çözümdür.

Biyopolimer, bitkiler ve hayvanlar gibi biyolojik sistemlerden türetilen monomer kalıntıları zinciridir. Polisakkaritler ve proteinler, gıda endüstrilerinde kullanılan iki ana biyopolimerdir. Biyopolimerlerin gıda molekülleri ile etkileşimi, yenilebilir filmlerin ve kaplamaların geliştirilmesine yardımcı olan donma, doku modifikasyonu, jel ve ağ oluşumuna yardımcı olmaktadır [94]. Biyopolimerler ayrıca herhangi bir başka işlem veya yabancı madde olmaksızın kendi kendini parçalama potansiyeline sahip olan yeşil polimerler olarak da bilinir. Biyopolimerlerin çoğu, bir film matrisi ve kaplama ağı ile sonuçlanan bileşikler arasında moleküller arası etkileşimlerin oluşumu dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonel özelliklere sahip olan hidrokolloidlerdir. Biyopolimerler, taze ve işlenmiş gıdaların raf ömrünü uzatan kaplamalar ve filmler oluşturma potansiyeline sahiptir [95]. Ağ oluşturma kabiliyeti, besleyici kompozisyon, antioksidan ve antimikrobiyal ajanları tutma kabiliyeti, yenilenebilir kaynak, düşük maliyet, hazır

bulunabilirlik ve çevre üzerinde olumsuz bir etkisinin olmaması, biyopolimerlerin yenilebilir kaplamada kullanılmasının nedenleridir. Biyopolimerler, IV jenerasyon paketleme olarak adlandırılmaktadır [96].

Yenilebilir kaplama, yenilebilir olan ve gıdaların biyopolimer çözeltilisine daldırılmasıyla veya biyopolimer çözeltilisinin gıda yüzeyi üzerine püskürtülmesiyle doğrudan gıda yüzeyi üzerine kaplanan biyopolimerlerden oluşmaktadır. Bozulabilir ve yarı bozulabilir gıdaların çoğu için birincil ambalaj malzemesidir. Yenilebilirlik ve biyolojik olarak parçalanabilirlik, yenilebilir kaplamanın iki ana avantajıdır. Diğer avantajlar arasında, yenilebilir kaplamalı gıdaların yüksek tüketici kabul oranlarına yol açan gelişmiş estetik görünüm ve gelişmiş duyuşal özellikler yer almaktadır. Robertson [97] tarafından belirtildiği gibi yenilebilir kaplama/filmlerin sentetik üzerindeki umut verici özellikleri aşağıdaki gibidir:

- Ambalaj malzemesini gıda ile birlikte tüketerek israf oluşumunu engellemek.
- Tarım ve gıda endüstrilerinden yan ürün kullanım kaynağı olarak üretilebilmek.
- Renkendirici, tatlandırıcılar vb. ekleyerek kaplanmış ürünün duyuşal özelliklerini geliştirebilmek.
- Ürünün besin değerini artırabilmek.
- Pizza, börek, tatlı gibi heterojen gıdalardaki diğer bileşimler arasındaki migrasyonu engellemek.
- Aktif maddeler (antimikrobiyal ve antioksidan) taşımak.

Hasat sonrası kayıplar, meyve ve sebze üreticilerinin en büyük zorluklarından biridir. Bu kayıpların üstesinden gelmek için kimyasal muşlar ve fungusitler dahil olmak üzere geleneksel tedaviler uygulanmaktadır. Ancak bu kimyasallara sürekli maruz kalmak sağlık ve çevre için tehlikeli durumlara neden olmaktadır. Meyve ve sebzelerin tavsiye edilen tüketim oranları arasında artan tüketici farkındalığı ve aşırı ambalaj atığı oluşumunun ortadan kaldırılması ve depolama [98], yenilebilir kaplama gibi minimum işleme/koruma yöntemlerinin yolunu açmaktadır. Yenilebilir kaplamalı meyve ve sebzelerde, biyokimyasal değişikliklere ve kalite kaybına neden olan fizyolojik değişiklikler ve mikrobiyal büyüme geciktirilmektedir. Kolay bozulabilen meyveler, sorumlu besin içerikleri ve kısa raf ömürleri nedeniyle yenilebilir kaplama için en uygun

olanlardır [99]. Gıda matrisine antimikrobiyal ve antioksidan ajanların eklenmesi, gıda kontaminasyonunu önlemek için kullanılmıştır. Ancak bu ajanların doğrudan uygulanması, hızlı ve dengesiz salım mekanizmaları nedeniyle gıda yüzeyinde nötralize veya buharlaşmış veya azalmış etkili konsantrasyona yol açmaktadır [100]. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için, yenilebilir kaplama, aktif maddeleri kontrollü bir şekilde gıdaya taşıma ve salma potansiyeline sahiptir [101]. Taze kesilmiş meyve ve sebzelerin ürünleriyle ilgili en büyük dezavantaj, metabolik, fizikokimyasal ve dokusal değişikliklerle sonuçlanan doku bozulmasıyla ilişkili kalite bozulmasına neden olan işlenmesidir [102]. Antioksidan ve esmerleşme önleyici ajanlar taşıyan yenilebilir kaplama, taze kesilmiş ürünleri herhangi bir besin kaybı olmadan korumak için umut verici bir yöntemdir. Unlu mamul endüstrisinde bir uygulama olan hamur dondurma, ekonomik avantajlar için izlenmiştir [103]. Dondurma sırasında oluşan buz kristali, hamur mukavemetini ve CO<sub>2</sub> tutulmasını, uzun süreli fermantasyonu, canlılıkta azalmayı ve maya aktivitesini azaltmıştır. Bu unlu mamulün hacmini ve dokusunu azaltmaktadır [104]. Yenilebilir kaplama, hamurdan karbondioksit salınımına karşı gerekli gaz bariyerini sağlar, donma sırasında buz kristali oluşumunu önler ve nihai ürünün yapısını ve kalitesini korumaya yardımcı olmaktadır [105].

### **2.5.1. Yenilebilir Kaplamanın İşlevleri**

Yenilebilir kaplamanın birincil işlevleri, gaz (karbondioksit, oksijen ve uçucu maddeler) transferini önlemek ve değiştirilmiş bir atmosfer yaratmaktır. Böyle bir atmosfer meyve ve sebzelerin olgunlaşmasını geciktirir ve raf ömrünü uzatmaktadır. Ette lipid oksidasyonunun gecikmesine ve ayrıca oksijen alımının kontrol edilmesi, aerobik mikroorganizmaları etkiler ve et ve ürünlerinde bulunan bozulmaya neden olan mikroorganizmaların sayısını azaltmaktadır [106]. Ette olduğu gibi, peynirde de bozulma, yağ oksidasyonu ve kabul edilemez tat, koku ve görünüm değişiklikleri ile sonuçlanan mikroorganizmaların büyümesi nedeniyledir. Bu değişiklikler, yağların oksidasyonunu ve tat, koku ve görünümde değişikliklere neden olan istenmeyen mikroorganizmaların büyümesini önlemek için düşük oksijen geçirgenliğine sahip bir ambalaj uygulanarak kontrol edilebilmektedir [107]. Et ürünlerinde nem tutulması durumunda bile, biyopolimerler etkili bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır [106].

Meyve ve sebze dokularının yumuşaması duysal puanı ve tüketici kabulünü etkilemektedir. Yumuşama, selüloz, hemiselüloz ve pektinden oluşan hücre duvarı hasarına neden olmaktadır. Bu yumuşamadan sorumlu olan enzimler pektinmetilesteraz (PME) ve poligalakturanazdır (PG). Meyve ve sebzelerin depolanması sırasında doku hasarlarını en aza indirmek için yenilebilir kaplamalara doku arttırıcılar eklenmektedir [108]. Ek olarak, yenilebilir kaplama, antioksidanlar, antimikrobiyaller ve esmerleşme önleyici maddeler dahil olmak üzere koruyucuların aktif bir taşıyıcısı olarak işlev görmektedir. Bu ajanların doğal kaynakları, doğrudan biyopolimer çözeltilerine dahil edilebilen baharatlar, organik asitler, yağ asidi esterleri ve uçucu yağlardır [109]. Hasat sonrası işlemler sırasında renk değişiklikleri veya esmerleşme, enzim katalizli reaksiyonlardan kaynaklanmaktadır. Polifenol oksidaz (PPO), fenolik ve polifenolik bileşikleri parçalayan ve meyvelerin antioksidan aktivitesini azaltan başlıca esmerleşme enzimidir [110]. Askorbik asit, oksalik asit, sitrik asit, fenolik asit ve resorsinol, yenilebilir kaplamada kullanılan esmerleşmeyi önleyici maddelerden bazılarıdır [108, 111].

## **2.5.2. Yenilebilir Kaplama Yapımında Kullanılan Malzemeler**

Yenilebilir kaplama için kullanılan biyopolimerler, bitki ve hayvan kaynakları olmak üzere kökenlerine göre ayrılmaktadır. Bu, belirli bir kaplamanın ancak belirli bir gıda ürünü için uygun olana kadar dayanabileceği gerçeğiyle doğrulanabilmektedir.

### **2.5.2.1. Bitkisel Kaynaklar**

Nişasta, yenilebilir kaplamalar için en çok kullanılan tarımsal hammaddedir. Mısır, patates, buğday, yulaf, arpa ve soya fasulyesi gibi bitkiler başlıca nişasta kaynaklarından bazılarıdır [112]. Bu tür kaynaklar nişasta granüllerinin fiziksel ve kimyasal durumunu belirlemektedir [113]. Polimerik bir karbonhidrat olan nişasta, iki polisakaritten oluşmaktadır: amiloz ve amilopektin. Amiloz,  $\alpha$ -1,4 anhidroglikoz birimlerine sahip doğrusal bir polimer zinciridir ve nişastaların çapraz bağlanma yapısından sorumludur [114]. Amilopektin, kısa  $\alpha$ -1,4 birimlerinin  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağ yoluyla bağlandığı dallı bir zincirdir [115].

Yenilebilir kaplamada yaygın olarak kullanılan diğer ana polisakarit aljinatlardır. Aljinat, alglerden elde edilen bir polisakarittir. Aljinat, aljinik asit tuzlarını ve türevlerini temsil etmektedir. Aljinatların koloidal özellikleri, kalsiyum gibi çok değerlikli metal katyonları ile reaksiyona girdiğinde jel ve çözünmeyen polimer oluşturma yeteneğidir [116]. Sodyum aljinat kaplı mango meyvesi, kontrol meyvesinden daha yüksek antioksidan kapasite göstermektedir. Kaplanmış mangodaki polifenoloksidaz aktivitesi, sürekli arttığı gözlemlenen kontrolden (kaplanmamış mango) daha düşük kalmıştır [117]. Sodyum aljinatın askorbik ve sitrik asitlerle kombinasyonu, taze kesilmiş elmalarda, aynı maddelerle pektinden daha az esmerleşme üretmiştir [118].

Ahşap, pamuk ve bitki bazlı malzemeler gibi tüm yenilenebilir kaynaklarda bulunan en bol biyopolimer olan selüloz,  $\beta$ -(1-4) bağlantılı glikoz kalıntılarında oluşmaktadır [119]. Selüloz polimerlerinin zayıf çözünürlüğü ve yüksek kristalli doğası, ambalaj uygulamasında kullanımlarını zorlaştırmaktadır. Selülozun zayıf suda çözünürlüğü, alkali ile ıslatıldığında artmakta, şişmekte ve kloroasetik asit, metil klorür veya propilen oksit ile reaksiyona girerek karboksimetil selüloz, metil selüloz, hidroksipropil metilselüloz üretmektedir [120]. Bu nedenle, selüloz asetat, metilselüloz, hidroksipropil metilselüloz, taurin selüloz gibi selüloz türevleri çevre dostu biyopolimerler, [121] filtreler, emiciler ve taşıyıcı malzemelerdir [94]. Metilselüloz ve hidroksipropil metilselüloz, gaz transferine karşı mükemmel bir bariyer, ancak yüksek nem geçirgenliği sağlamaktadır [122]. Bu türevler, derin yağda kızartma ürünleri için kullanılan termal olarak kararlı kaplama oluşturma yeteneğine sahiptir [123]. Termal olarak kararlı kaplamaların prensibi, termo-jelleşme davranışı sergileyen metilselüloz ve hidroksipropil metilselüloz bileşiklerinden kaynaklanmaktadır [66]. Bu davranış, süspansiyonlar ısıtıldığında, jelleşme sıcaklığının altına dönen jel oluşumuna yol açtığında ortaya çıkar ve viskozite geri kazanılmaktadır [124].

### **2.5.2.2. Hayvansal Kaynaklar**

Son on yılda, deniz işleme endüstrisinin odak noktası, atığın işlenmesi sırasında oluşan karbon ayak izlerini karşılamak için atıklarının fizibilite daha iyi ve yaratıcı bir şekilde kullanılmasına yöneliktir. Bunlardan biri, kabuklu deniz hayvanlarının işlenmesi sırasında gelişen yüksek hacimli atıklardan sorumlu olan kabuklu deniz kabuklarının

kullanılmasıdır [128]. Bu atık doğrudan gıda amacıyla tüketilemez, ancak kasıtlı işleme kullanımı, biri onu yenilebilir bir kaplama olarak geliştirmek olan birkaç uygulamada hayati olabilmektedir.

Kabukluların dış iskeletlerinde bol miktarda bulunan biyopolimer olan kitin, yapısal olarak selülozla aynıdır.  $\beta$ -(1-4)-2-amino-D-glukoz ve  $\beta$ -(1-4)-2-asetamido-D-glukozun bir kopolimeri olduğu ortaya çıkan kitosan, kitinin deasetillenmiş formudur ve katyonik ve film oluşturucu özellikleriyle ilgili antimikrobiyal özellikleriyle bilinmektedir [129]. Çeşitli gıda matrisleri üzerinde yapılan birkaç *in vitro* deneme, doğal bir gıda koruyucusu olarak hareket etme yeteneğini kanıtlamıştır. Ancak kitosan kaplamaların su buharı limitlerine karşı oldukça geçirgen olması, nemi kontrol etmesi nedeniyle kullanılması, nemli ortamda saklanan gıdalarda kullanılan kaplamaların en çok arzu edilen özelliğidir [130]. Bu nedenle, kitosanın tek başına bir kaplama olarak kullanılmasının sınırlamalarını karşılamak için hala kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Et işleme endüstrisinde, jelatin, etkileyici fonksiyonel özellikleri nedeniyle bir biyopolimer olarak yaygın bir şekilde kullanılan kollajen türevlerinden biridir. Protein bazlı biyopolimer bölümüne girdiğinden, çeşitli etkileşimler tarafından yönetilen 3-D yapılarla sahiptir, aralarında en önemlisi kovalent olmayan kuvvetlerdir [155]. Bu tür polimerin et ve balık kesimleri gibi oldukça çabuk bozulan mallar için bir kaplama olarak kullanılması, maliyete, mevcudiyete, mekanik kapasiteye ve optik özelliklerine bağlıdır. Jelatin, iyi bilinen özelliklerinden biri olarak film oluşturma kapasitesi ile geniş bir uygulamaya sahiptir. Yiyecekleri kurumaya karşı koruma ve sergiden ışığa ve oksijene maruz kalmaya karşı koruma yeteneği açısından kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Ancak çapraz bağlayıcılar, plastikleştiriciler, yağlar ve diğer katkı maddeleri gibi maddelerin yanı sıra jelatin kaplamalar tüm dezavantajlarını ortadan kaldırmış ve gıda ürünlerine daha iyi stabilite sağlamıştır [159]. Hatta bazı literatürlerde peynir altı suyu proteinleri, nişasta, pektin ve kitosan gibi diğer biyopolimerlerle birlikte jelatinin kullanımının mekanik ve su direnci özelliklerini iyileştirmek için daha iyi bir strateji olduğu kanıtlanmıştır [160].

Süt proteini, biyopolimer olarak kullanılmaya uygun kılan çeşitli temel bileşenleri içermektedir. Kazein geviş getiren hayvanların süt proteinlerinde bol miktarda bulunurken, inek sütü peynir altı suyu proteininin yaklaşık % 18'ini vermektedir. Sınıflandırma kapsamında, peynir altı suyu protein izolatu (WPI) ve peynir altı suyu protein konsantreleri (WPC), kaplama malzemeleri olarak en yaygın şekilde kullanılanlardır. Kavrulmuş yer fıstığı taneleri [175], kesilmiş elmalar [176], turna levreği filetoları [177] ve hatta havuçlar üzerine kaplama uygulaması için bildirilen literatürler, WPI'nin etkili bir kaplama malzemesi olarak etkinliğini iddia etmektedir. WPI ayrıca ton balığı için değiştirilmiş atmosferler ve vakum paketleme altında kullanıldığında olumlu sonuçlar vermiştir [178].

### **2.5.3. Yenilebilir Kaplama – Bakteriyofaj Çalışmaları**

2006 yılında güvenli bir biyo-koruyucu olarak gıda güvenliğini artırmak için belirli gıda ürünlerinde bakteriyofaj kullanımına ilişkin FDA onayından bu yana, tavuk eti ve sığır eti, süt ürünleri, bebek maması ve taze meyvelerde gıda patojenlerine karşı daha fazla bakteriyofaj aktivitesi olup olmadığını araştırmak için gıda kaynaklı kontaminantlar üzerindeki bakteriyofaj etkisi üzerine kapsamlı bir araştırma yapılmıştır [125]. Bakteriyofajlar, konakçıları bulunduğu popülasyon sayılarını artırarak çoğaldıkları bir otomatik dozlama özelliğine sahiptir ve ayrıca biyofilmi depolimerize eden enzimler üreterek veya biyofilmden geçerek bazı biyofilm popülasyonlarını yok etme yeteneğine sahiptir [126].

Geleneksel olarak, gıdaya litik bakteriyofaj uygulaması, büyük miktarda gıdaya daldırma, püskürtme veya sıvı bir süspansiyon olarak verilmesiyle yapılabilmektedir. Bununla birlikte, bu yöntemlerin bakteriyofaj israfı olması ve bakteriyofajların sıvı-besleyici ortamlarda süspansiyonu nedeniyle bakteri üremesine katkıda bulunması gibi dezavantajları vardır. Ek olarak, operasyon alanlarında kullanılan dezenfektanların bakteriyofajları etkisiz hale getirme olasılığı, önceki yöntemlerin dezavantajlarından biri olarak görülmektedir. Bununla birlikte, gıda ürünlerinde kullanılmak üzere kuru bakteriyofaj elde edilmiş, ancak bu uygulama yöntemi için bakteriyofaj seyreltmesi ve konsantrasyonunun hesaplanması zorlukları sebebiyle özellikle düşük bakteriyofaj



konsantrasyonlarında bakteriler tarafından daha olası bakteriyofaj direncine neden olmuştur. Ancak çok yüksek konsantrasyon bunu engelleyebilmektedir.

Biyokoruyucu olarak serbest bakteriyofaj kullanımındaki bu zorluklar, bakteriyofajların fiziksel veya iyonik olarak bazı materyallerin bir yüzeyinde tutulduğu ve ardından tedavi edilen yüzeye maruz bırakıldığı immobilizasyon yönteminin kullanılmasına yol açmıştır. Gıda örneklerinde serbest bakteriyofaj kullanımındaki bu zorlukların önüne geçmenin bir yöntemi de yenilebilir biyofilm kaplamalarına gömülü bakteriyofaj formlarının kullanımınıdır. Biyolojik olarak parçalanabilen ambalaj malzemelerinin bir alt sınıfı olan yenilebilir daldırma kaplamalar, antimikrobialların taze ürünlere verilmesi için önerilen çözümlerden biridir. Yenilebilir kaplamalar, nem değişimini önlemek, gaz değişimini azaltmak ve gıdadan kaynaklanan aroma uçucularının kaybını kontrol altına almak için bariyer görevi görmekte, böylece gıda kalitesini ve raf ömrünü korumaktadır [127, 128]. Birçok çalışma, organik asitler, bitki esansiyel yağları, polipeptitler gibi antimikrobiyal maddeler içeren fonksiyonel yenilebilir kaplamaları rapor etmiş [129-131], ancak yalnızca sınırlı sayıda çalışma fajların yenilebilir ambalaj malzemeleriyle entegrasyonunu araştırmıştır. Yenilebilir kaplamaların işlevselliği, gıda güvenliğini güçlendirmeye katkıda bulunmak üzere gıda ürünlerini bakteriyel kontaminasyondan korumak için bakteriyofajlar dahil edilerek genişletilebilmektedir. Antimikrobiyal ajanların biyopolimer bazlı kaplamalara doğrudan dahil edilmesiyle yeni fonksiyonel gıda paketleme sistemlerinin geliştirilmesi, gıda güvenliğinin korunmasına önemli ölçüde katkıda bulunabilmektedir [132].

Son yıllarda tüketiciler daha doğal, kaliteli ve güvenli gıda ürünleri talep etmektedir. Ancak doğal gıda üretilmesine rağmen kalite ve gıda güvenliğini etkileyen en önemli konulardan biri de bozulmaya neden olan ve patojenik mikroorganizmaların varlığıdır [133]. Antimikrobiyal özelliklere sahip gıda ambalajları, bu özellikleri geliştirmek için önemli bir faktördür. Bu çabada gıda endüstrisi, gıda kalitesi sağlması, gıda bozulmalarını önlemesi, gıdaların raf ömrünü uzatması ve antimikrobiyal gibi aktif maddelerin taşıyıcısı olması nedeniyle yenilebilir film ve kaplamaların imalatına ağırlık vermiştir [134]. Antimikrobiyal ajanların taşıyıcıları olarak yenilebilir filmler ve kaplamalar ile ilgili araştırmalar son yıllarda artmıştır. Antimikrobiyal maddeler olarak

bakteriyosinler, esansiyel yağlar, organik asitler ve enzimlerin kullanımı geniş çapta incelenmiştir ve gıda ürünlerinde uygulanması bazı durumlarda iyi sonuçlar vermiştir [135]. Son on yılda, bakteriyofajların bakterileri enfekte ederek ve öldürerek doğal antibakteriyel ajanlar gibi davranmaları ve tat, aroma ve diğer antibakteriyel ajanlarla karşılaştırıldığında gıdanın besin değerini değiştirmemeleri gibi avantajlarından dolayı yenilebilir film ve kaplamalara dahil edilmesi önerilmiştir [136-138]. Bakteriyofaj eklenmiş yenilebilir filmlerin ve kaplamaların antimikrobiyal aktivitesini ele alan çalışmalar, bazıları çelişkili olsa da farklı sonuçlar bildirmiştir. Örneğin, Kalkan ve ark., çiğ balık filetolarında 6,46 log KOB/cm'ye kadar bakteri azalması bildirmiştir [139]. Aksine, Vonasek ve ark., bakteriyofaj eklenmiş filmleri salatalık örnekleri üzerinde test ettiğinde bakteri sayısında herhangi bir azalma bulunmadığını rapor etmiştir [140]. Gelecekteki uygulamalarda bu tedavilerin etkinliğini artırmak için, sadece filmler ve kaplamalar içindeki bakteriyofajların davranışını anlamak değil, aynı zamanda sınırlamalarını da değerlendirmek gerektiği açıkça gözlenmektedir.

Gıda güvenliği çerçevesinde, litik fajlar, yüksek özgüllük, toksik olmayan maddeler, gıdaya veya tüketiciye zarar vermeme ve gıdanın organoleptik özelliklerini değiştirmeme dahil olmak üzere birçok avantaja hitap etmektedir. Bakteriyofajların antibakteriyel aktivitesi, meyveler, sebzeler, et, kümes hayvanları, domuz, deniz ürünleri ve süt ürünleri gibi çok çeşitli gıda ürünlerinde gösterilmiştir [141]. Çeşitli bakteriyofaj ürünleri gıda güvenliği uygulamaları için onaylanmıştır (örn. Secure Shield E1, EcolicidePX™, EcoShield™, ListShield™, SalmoFresh™, ShigaShield™, PhageGuard Listex™, PhageGuard S™, Finalyse®, AgriPhage™, SalmoPro®), ve bazıları GRAS olarak FDA tarafından onaylanmıştır. Bu ürünler, gıda üretimi sırasında doğrudan uygulama teknikleriyle veya gıda yüzeyine bir bakteriyofaj solüsyonu püskürtülerek nihai üründe uygulanmıştır [142]. Bununla birlikte, doğrudan uygulama fajların kurumasına veya inhibisyonuna neden olarak antibakteriyel aktivitesinin kaybına neden olabilmektedir [143]. Bu problemin üstesinden gelmek için, hem stabilitesini hem de uzun vadeli bir koruma sağlamak için aktivitesini geliştirmek amacıyla gıda ambalajına (örneğin, gıda pedleri ve yenilebilir filmler) bakteriyofajlar dahil edilmiştir.

Yenilebilir film ve kaplama kavramını tanımlamak için, ana farkın uygulama biçiminden kaynaklandığını anlamak gerekmektedir. Kaplama, genel olarak, sıvı formda doğrudan gıda yüzeyine püskürtme, daldırma, kaydırma veya fırçalama yoluyla uygulanan film oluşturuvcu bir çözelti olarak tanımlanmaktadır. Kaplama kurduğunda, gıdanın bir parçası olarak çıkarılabilen veya tüketilebilen ince bir yenilebilir malzeme tabakası oluşturmaktadır. Buna karşılık, bir film, katı ve esnek levhalar olarak kalıplanan ve kurutulan bir film oluşturuvcu çözülden önceden oluşturulmuş ince bir tabaka malzemesidir. Daha sonra, bu önceden şekillendirilmiş filmler, gıdayı sarmak için kullanılır ve ayrıca bunların bir parçası olarak çıkarılabilir veya tüketilebilir [144]. Bu yenilebilir ambalajların en önemli amaçları gıdaların bozulmasını önlemek ve gıdaların raf ömrünü uzatmaktır. Güvenlik açısından, yenilebilir filmler ve kaplamalar FDA tarafından GRAS olarak onaylanmıştır. Bakteriyofajların yenilebilir filmlere ve kaplamalara eklenmesine ilişkin sınırlı sayıda *in-vivo* ve *in-vitro* çalışma rapor edilmiştir. *In-vitro* çalışmalar üç önemli sonuca ulaşmıştır: 1) bakteriyofajların yenilebilir filmlerde ve kaplamalarda kullanılması iyi antibakteriyel özelliklere sahiptir; 2) filmlerin antimikrobiyal aktivitesini iyileştirmenin bir alternatifi, sinerjistik bir etki elde etmek için bakteriyofajların ve diğer antimikrobiyal ajanların kombinasyonudur; ve 3) bakteriyofaj eklenmiş filmlerin antibakteriyel etkisi, patojenin ilk aşılmasına bağlıdır [145, 146]. Bununla birlikte, gıda matrislerinin büyüme ortamlarından daha karmaşık olduğu iyi bilinmektedir ve gıda uygulamalarında benzer sonuçlar elde etmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bakteriyofaj ilaveli yenilebilir filmlerin ve kaplamaların uygulanması, daldırma veya sarma gibi teknikler kullanılarak sebzeler, meyveler, et, kümes hayvanları ve peynir dahil olmak üzere farklı gıda ürünlerinde değerlendirilmiştir. Çizelge 2.1 ile Çizelge 2.6 arasında gösterildiği gibi, bu çalışmalar *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus* ve *Listeria monocytogenes* gibi gıda kaynaklı patojenlerin kontrolüne odaklanmıştır.

Çizelge 2.1. Yenilebilir filmler ve kaplamalarda bakteriyofaj kullanımı – *in-vitro* çalışmalar

Gıda	Bakteriyofaj (inokulum)	Mikroorganizma (inokulum)	Yenilebilir Kaplama	Kaplama Yöntemi	Log (kontrol ile kıyaslanmış)	Düşüş ile	Kaynak
<i>in-vitro</i>	Coliphage T4	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (3 log KOB/ml)	Peynir altı suyu protein izolatu (% 5 a/h)	Film ile temas halinde	22°C'de 24 saat sonra 2 log KOB/ml		[147]
<i>in-vitro</i>	BFSE16, BFSE18, PaDTA1, PaDTA9, PaDTA10 ve PaDTA11. (10 log POB/ml)	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028 (4 log KOB/ml)	Selüloz asetat (% 10 a/h)	1 cm <sup>2</sup> asetat film içeren diskler, <i>S. typhimurium</i> içeren plakalara yerleştirildi.	35°C'de 24 saat sonra 0,23–0,35 cm inhibisyon haleleri		[148]
<i>in-vitro</i>	Sodyum aljinat ile enkapsüle <i>V. parahaemolyticus</i> (9 log POB/ml)	<i>V. parahaemolyticus</i> (3 log KOB/cm <sup>2</sup> )	Metilselüloz (% 8 a/h)	<i>V. parahaemolyticus</i> filmle temas halinde	25°C'de 24 saat sonra 3,99 log KOB/ml		[139]

Çizelge 2.1 (devam) Yenilebilir filmler ve kaplamalarda bakteriyofaj kullanımı – in-vitro çalışmalar

Gıda	Bakteriyofaj (inokulum)	Mikroorganizma (inokulum)	Yenilebilir Kaplama	Kaplama Yöntemi	Log Düşüş (kontrol ile kıyaslanmış)	Kaynak
<i>in-vitro</i>	vB_EcoS-EC4 (9 log POB/ml)	<i>E. coli</i> (6 log KOB/ml)	Sodyum aljinat (% 1 a/h)	<i>E. coli</i> kültürü filmin üstüne ekleme	20°C'de 24 saat sonra 1,4 log KOB/ml	[145]
<i>in-vitro</i>	φ135 (9 log POB/ml)	<i>S. enteritidis</i> (6 log KOB/ml)	Sodyum aljinat (% 1 a/h)	<i>S. enteritidis</i> kültürü filmin üstüne ekleme	20°C'de 24 saat sonra 5,1 log KOB/ml.	[145]
<i>in-vitro</i>	Listex P100 (9 log POB/ml)	<i>L. monocytogenes</i> (3–6 log KOB/ml)	1. Sodyum kazeinat (% 4 a/h) 2. Jelatinle+ sodyum aljinat (% 1 ve %4 a/h) 3. Polivinil alkol (PVOH) (% 2 a/h)	<i>L. monocytogenes</i> filmle temas halinde	30°C'de 48 saat sonra ~1,2–9 log KOB/ml.	[146]

\*a/h: ağırlık/hacim

Çizelge 2.2. Yenilebilir filmler ve kaplamalarda bakteriyofaj kullanımı – meyve ve sebze çalışmaları

Gıda	Bakteriyofaj (inokulum)	Mikroorganizma (inokulum)	Yenilebilir Kaplama	Kaplama Yöntemi	Log Düşüş (kontrol ile kıyaslanmış)	Kaynak
Salatalık	T7 (7 log POB/ml)	<i>E. coli</i> BL1 (5 log KOB/ml)	Peynir altı suyu protein izolatu (% 10 a/h)	Daldırma	4°C’de 24 saat sonra 0 log KOB/ml	[140]
Elma	T7 (8 log POB/m)	<i>E. coli</i> BL1 (7 log KOB/ml)	Peynir altı suyu protein izolatu (% 10 a/h)	Daldırma	4°C’de 24 saat sonra 2 log KOB/ml	[140]
Çeri domates	T7 (7 log POB/ml)	<i>E. coli</i> BL1 (6 log KOB/ml)	Peynir altı suyu protein izolatu (% 10 a/h)	Daldırma	4°C’de 24 saat sonra 4 log KOB/ml	[140]
Domates	vB_EcoMH2W (6 log POB/ml)	<i>E. coli</i> O157:H7 (7 log KOB/ml)	Kitosan	Daldırma (1 dakika)	20°C’de 6 gün sonra 3 log KOB/ml	[149]

Çizelge 2.3. Yenilebilir filmler ve kaplamalarda bakteriyofaj kullanımı – süt ürünleri çalışmaları

Gıda	Bakteriyofaj (inokulum)	Mikroorganizma (inokulum)	Yenilebilir Kaplama	Kaplama Yöntemi	Log Düşüş (kontrol ile kıyaslanmış)	Kaynak
Peynir	piIPLA-RODI (7-8 log POB/ml)	<i>S. aureus</i> (3 log KOB/ml)	Jelatin (% 10 a/h)	Daldırma	4°C'de 6 gün sonra 1 log KOB/ml	[150]
Peynir	piIPLA-RODI (7-8 log POB/ml)	<i>S. aureus</i> (4 log KOB/ml)	Jelatin (% 10 a/h)	Kaplama	4°C'de 6 gün sonra ~0-1,5 log KOB/ml	[150]

Çizelge 2.4. Yenilebilir filmler ve kaplamalarda bakteriyofaj kullanımı – deniz ürünleri çalışmaları

Gıda	Bakteriyofaj (inokulum)	Mikroorganizma (inokulum)	Yenilebilir Kaplama	Kaplama Yöntemi	Log Düşüş (kontrol ile kıyaslanmış)	Kaynak
Çiğ balık filetosu	Sodyum aljinat ile enkapsüle <i>parahaemolyticus</i> (9 log POB/ml)	<i>V. V. parahaemolyticus</i> (4-5 log KOB/ml)	Metilselüloz (% 8 a/h)	Kaplama	4°C'de 14 gün sonra 6,46 log KOB/ml	[139]

Çizelge 2.5. Yenilebilir filmler ve kaplamalarda bakteriyofaj kullanımı – kırmızı et çalışmaları

Gıda	Bakteriyofaj (inokulum)	Mikroorganizma (inokulum)	Yenilebilir Kaplama	Kaplama Yöntemi	Log Düşüş (kontrol ile kıyaslanmış)	Kaynak
Sığır eti	Lipozom enkapsüle <i>E. coli</i> (11 log POB/ml)	<i>E. coli</i> O157:H7 (3 log KOB/ml)	Kitosan (% 1 a/h)	Kaplama	25°C'de 15 gün sonra 4,5 log KOB/ml	[151]
Sığır eti	<i>E. coli</i> (11 lo POB/ml)	<i>E. coli</i> O157:H7 (3 log KOB/ml)	Kitosan (% 1 a/h)	Kaplama	25°C'de 15 gün sonra 0,29 log KOB/ml	[151]
Et	6 bakteriyofajlı koktey (DT1'den DT6'ya) (7 log POB/ml)	<i>E. coli</i> (DH5α, EPEC, non-O157 STEC, O157:H7 STEC) (2-3 log KOB/ml)	Peynir altı suyu protein konsantratu	Gıda üzerine yerleştirilen film	4°C'de 24 saat sonra 2 log KOB/ml ; 24°C'de 24 saat sonra 0,6-3,5 log KOB/ml ve 37°C'de 1 saat sonra 2 log KOB/ml	[152]



Çizelge 2.6. Yenilebilir filmler ve kaplamalarda bakteriyofaj kullanımı – kanatlı eti çalışmaları

Gıda	Bakteriyofaj (inokulum)	Mikroorganizma (inokulum)	Yenilebilir Kaplama	Kaplama Yöntemi	Log Düşüş (kontrol ile kıyaslanmış)	Kaynak
Ön pişirme yapılmış, kesilmiş hindi göğüs eti	Felix 01 (12 log POB/ml)	<i>S. typhimurium</i> DT104 (3 log KOB/ml)	Ksantan gam ve polilaktik asit (% 2 a/h)	Gıda üzerine yerleştirilen film	Anaerobik paketlenme, 4°C’de 30 gün sonra 0,83 log KOB/ml ; 10°C’de 30 gün sonra 1,3 log KOB/ml	[153]
Ön pişirme yapılmış, kesilmiş hindi göğüs eti	A511 (12 log POB/ml)	<i>S. typhimurium</i> DT104 (3 log KOB/ml)	Ksantan gam ve polilaktik asit (% 2 a/h)	Gıda üzerine yerleştirilen film	Aerobik paketlenme, 4°C’de 14 gün sonra 3,79 log KOB/ml ; 10°C’de 14 gün sonra 2,19 log KOB/ml Anaerobik paketlenme, 4°C’de 30 gün sonra 6,31 log KOB/ml ; 10°C’de 30 gün sonra 1,52 log KOB/ml	[153]
Tavuk göğüs filetosu	φIBB-PF7A (8 log POB/ml)	<i>P. fluorescens</i> (6 log KOB/ml)	Sodyum aljinat (% 1 a/h)	Gıda üzerine yerleştirilen film	4°C’de 5 gün sonra 1 log KOB/ml	[154]

Bakteriyofajları yenilebilir filmlerde ve kaplamada katkı maddesi olarak kullanmanın başlıca zorlukları arasında bakteriyofaj stabilitesi, bakteriyofajın salınması, bakteriyofaj hareketliliği ve bakteriyel mevcudiyet yer almaktadır. Antibakteriyel ambalaj malzemelerindeki bakteriyofajların iyi bir stabilitesi, gıda sistemlerinde uygulanması için çok önemli bir faktördür. Önceki çalışmalar, bakteriyofajların polimerik matrislere dahil edilmesinin sadece iyi bir stabilite sağlamakla kalmayıp aynı zamanda inhibisyonuna ve hatta inaktivasyonuna da yol açabileceğini göstermiştir. Bu inhibisyon veya inaktivasyonun arkasındaki neden belirsizdir, ancak bakteriyofaj tuzağı, kesme ve kuruma stresi, kullanılan biyopolimerin antiviral etkisi ve gıda üzerindeki asitlik dahil olmak üzere çeşitli faktörler öne sürülmüştür [140, 145, 155]. Bazı araştırmalar, bakteriyofajların uzun depolama süreleri boyunca filmlerin içinde sabit kalabileceğini göstermiş olsa da, başka bir çalışma, iki haftalık depolamanın ardından asetat filmlerde altı fajlı bir kokteylin tamamen inaktivasyonunu bulmuştur [148]. Yazarlar bu etkiyi, filmin gıda yüzeyi ve dolayısıyla konakçı bakteri ile temas halinde olmamasına bağlamıştır. Bununla birlikte, film formülasyonu aseton içerdiğinden ve bu solvent, bakteriyofaj canlılığının kaybıyla ilişkili olduğundan, diğer faktörler etkilemiş olabileceği rapor edilmiştir [156].

Farklı daldırma yöntemi ile kaplanmış gıdaların yüzeyindeki bakteriyofaj yaşayabilirliğini araştırmak için çok az çalışma yapılmıştır ve burada bakteriyofaj sayılarında 0,6'dan 5 log POB'ya kadar düşüşler gözlemlenmiştir [140, 149, 153]. Hatta bu çalışmalar arasında WPI kaplamaların bakteriyofajlar üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu kaydedilmiştir. Bu, Vonasek ve ark. tarafından WPI kaplamasında ve bir su çözeltisinde T7 fajının stabilitesini araştırılması ile desteklenmektedir [140]. Her iki solüsyon da yaklaşık 7 log POB'luk bir nihai bakteriyofaj konsantrasyonu ile hazırlanmış ve salatalık, elma ve domatesleri daldırma yöntemi ile kaplanmıştır. Daha sonra örnekler 4°C'de saklandı ve 7 günlük bir süre boyunca faj sayıları belirlenmiştir. Sonuçlar, kaplanmış salatalık örneklerinde bakteriyofajların daha stabil olduğunu, WPI kaplama ve su çözeltisi ile kaplanmış örnekler için sırasıyla 0,6 ve 0,7 log POB/cm<sup>2</sup>'lik azalmalar gösterdiğini göstermiştir. Bu azalma, sadece WPI kaplama ile daldırılan elma dilimlerinde benzer şekilde 0,7 log POB/cm<sup>2</sup>'lik bir azalma göstermiştir. Salatalık ve elmanın aksine, domates numuneleri bakteriyofaj canlılığı üzerinde önemli bir etki göstermiştir ve ayrıca su kaplı domateslerde bakteriyofaj azalması, WPI kaplı

domateslere göre daha belirgin olmuştur (4.6'ya karşı 2.1 log POB/cm<sup>2</sup>). Bakteri varlığı, bakteri lizisi ve yeni bakteriyofajların salınması nedeniyle bakteriyofaj popülasyonunun artmasına yardımcı olan bir faktördür. Bu bağlamda Amarillas ve ark., *E. coli* varlığında ve yokluğunda kitosan daldırma kaplı domateslerin yüzeyinde vB\_EcoMH2W fajının canlılığını incelemiştir. Bakteri içeren örneklerde bakteriyofaj titresinin hızla arttığı, ancak bakteri içermeyen örneklerde bakteriyofajın 20°C'de 6 gün sonra 2 log POB/ml azaldığı rapor edilmiştir [149].

Yenilebilir filmlerden ve kaplamalardan bakteriyofaj salımı, gıda ürünlerini bakteriyel büyümeye karşı korumak için kritik bir gerekliliktir, çünkü bu salınma, onların konak hedefle temas kurmasına izin verecektir. Yenilebilir film ve bakteriyofajlı kaplamalar üzerine araştırmalar yapılmış olmasına rağmen, filminden yiyeceğe bakteriyofaj salma mekanizmaları hala tam olarak anlaşılamamıştır. Alves ve ark., filmlerden bakteriyofaj salımınının, bakteriyofaj boyutu veya filmlerin şişme kapasitesi gibi faktörlere bağlı olduğu öne sürülmüştür [154]. Çalışmalar kapsamında bakteriyofajların sulu sistemlere kıyasla gıda yüzeylerine maruz kaldıklarında daha yavaş salındıklarını da ortaya koymuştur. Bu bir avantaj olabilmektedir, çünkü bakteriyofajların yavaş salınması, gıda kaynaklı bakterilere karşı koruma sağlamak için bunların yeterli konsantrasyonlarının korunmasına yardımcı olacaktır.

Bakteriyofaj hareketliliği de tedavi etkinliğinde belirleyici bir anahtardır. Gıda ürünlerine bakteriyofaj hareketliliğine müdahale etmekten sorumlu olarak bazı faktörler tanımlanmıştır, bunlar arasında su aktivitesi, gıda yapısı ve çevre ile etkileşimler yer almaktadır [157-159]. Örneğin, Lu ve ark, her iki sistemdeki *E. coli* azaltımını karşılaştırdıklarında bakteriyofaj hareketliliğinin marul yapraklarında sıvı kültüre göre daha kısıtlı olduğunu gözlemiştir [158]. Bakteri mevcudiyeti, bakteriyofajlar ve bakteriler arasındaki fiziksel teması teşvik etmek için önemli bir faktördür. Bununla birlikte, konakçı bakteri, bakteriyofajlar için erişilemez hale gelen gıda ağına gömülebilmektedir. Hickeyve ark., bakterilerin yağ ve proteinler dahil olmak üzere gıda bileşikleriyle etkileşime girebileceğini bildirmiştir [160]. Bununla birlikte, bakteriyofajların, gıda bileşiklerine bağlı olduklarında bakteri hücrelerini enfekte edip edemeyecekleri bilinmemektedir, bu nedenle bu soruyu cevaplamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç

vardır. Öte yandan, gıda ürünleri, yalnızca bakteriyofaj hareketliliğini değil, aynı zamanda bakteriyel yerleşimi de etkileyebilecek farklı yapılara (örneğin, sıvı, emülsiyon, jel veya katı formda) sahiptir.

Tüm bu durum değerlendirildiğinde bakteriyofaj ilaveli yenilebilir filmler ve kaplamalar, gıda ambalajlarına bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Bunun için bakteriyofajlar, yenilebilir filmler ve kaplamalar üretmek için polisakkaritlere veya proteinlere dahil edilmiştir. Yenilebilir filmlere bakteriyofajların eklenmesi, gıdanın fizikokimyasal özelliklerini değiştirmedeği ancak bu filmlerin mekanik özelliklerinden minimum düzeyde etkilendiği görülmektedir. Bakteriyofaj eklenmiş yenilebilir filmlerin ve kaplamaların antibakteriyel etkinliği, meyve, sebze, et, kümes hayvanları ve deniz ürünleri gibi farklı gıda ürünlerinde test edilmiştir. Bu çalışmaların sonuçları tutarsız olmuştur ve bakteriyofajların antimikrobiyal maddeler olarak birçok avantajı olmasına rağmen, bu yenilebilir ambalajlarda kullanıldıklarında hala bazı zorluklar vardır. Bu zorluklar arasında filme bakteriyofaj stabilitesi, filmde gıdaya bakteriyofaj salınımı ve ayrıca fiziksel teması teşvik etmek için bakteriyofaj hareketliliği ve bakteriyel mevcudiyet yer almaktadır. Yenilebilir filmlerde ve kaplamalarda bakteriyofaj stabilitesi değişkendir ve hatta bunların inaktivasyonu bildirilmiştir. Bakteriyofaj inhibisyonunun veya inaktivasyonunun arkasındaki neden belirsizdir. Bu sorunları azaltmak için iki strateji kullanılmıştır. Birincisi, stabilitesini artırmak için bakteriyofaj kapsülleme ve ikincisi, sinerjistik bir etki elde etmek için iki antimikrobiyal ajanın kombinasyonu. Ayrıca, virüs stabilize edici ajanların eklenmesi gibi stratejiler birkaç yazar tarafından önerilmiştir. Filmde bakteriyofaj salımı, gıda sistemlerinde sulu sistemlere göre daha yavaştır. Bu, antibakteriyel aktivitesini sürdürmek için bir avantaj sağlasa da, sadece bakteriyofaj salma mekanizmalarının incelenmesi konusunda değil, aynı zamanda bakteriyofaj stabilitesini geliştirmek için film oluşturma yöntemleri üzerinde de daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

## **2.7. Bakteriyofaj Depolama ve Stabilite**

Terapötik veya biyokontrol ajanları olarak bakteriyofajlara artan ilgi ve bir bakteriyofaj veya bakteriyofaj bazlı ürünü ticari olarak dağıtma niyeti, geleneksel çift agar kaplama yöntemiyle uyumlu olmayan büyük ölçekli bir üretim gerektirmektedir. Sonuç olarak,

bakteriyofaj üretimi kesinlikle biyoreaktörlerden yararlanacak ve bakteriyofaj üretiminin kontrolü ve optimizasyonu önemli bir rol oynayacaktır. İyi üretim uygulaması gereklilikleri, bakteriyofaj preparasyonlarının yüksek düzeyde saflaştırılmış, bakteri, toksin, pirojenik madde ve diğer zararlı bileşenlerden arınmış olmasını sağlayan yöntemlerin geliştirilmesini gerektirmektedir. Hayvan çalışmalarının çoğunda bakteriyofajlar, hayvan için olumsuz bir etki olmaksızın ham lizatlar olarak uygulanmış olsa da, endotoksinlerin, ekzotoksinlerin ve hücre kalıntılarının uzaklaştırılması, bakteriyofaj ürününün güvenliği ve ayrıca tüketiciler tarafından daha kolay kabulü için çok önemlidir. Bir seçenek, bakteriyofajların patojenik olmayan veya toksin üretici olmayan bir konakçıda çoğaltılması olabilmektedir [85]. Preparatların hedef bakterileri enfekte edebilen canlı bakteriyofaj partikülleri içerdiğinden emin olmak için depolama ayrıca doğrulanmış ve ilgili bakteriyofaj için uygun olmalıdır. Ayrıca, müstahzarın kararlılığı ve pH kontrolü, geçmişte bu gerçekler göz ardı edildiğinde artan problemlerin gösterdiği gibi önemlidir [161].

Bakteriyofaj ürünlerinin iyi bilimsel sonuçlarına ve ekonomik uygulanabilirliğine rağmen unutulmaması gereken önemli bir konu da, bakteriyofajların gıdaya girişinin önünde ciddi bir engel teşkil edebilen halkın kabulüdür. Tüketicilerin, gıdalarına canlı virüslerin eklendiğini ve onlar tarafından yutulacağını bildiklerinde antipati hissetmeleri muhtemeldir. Her şeyden önce bakteriyofajlar, insan hücreleri gibi ökaryotik hücreleri değil, yalnızca bakterileri enfekte eden virüslerdir. Ayrıca, bu şekilde disbiyozdan kaçınan hedef bakterilere çok özeldir. Bir virüsün bir patojenle savaşmak için kullanılmasının o kadar da garip olmadığına dikkat etmek de önemlidir, çünkü bazı aşılar zayıflatılmış da olsa canlı ökaryotik virüsler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. İçme suyunda ve yoğurt ve salam gibi gıdalarda bakteriyofajlar tespit edildiğinden, genellikle güvenli kabul edilmektedirler [162]. Ayrıca bu, sadece bakteriyofajların zaten vücudumuzda olduğu anlamına gelmez, aynı zamanda sürekli olarak yutuldukları anlamına da gelmektedir. Doğu Avrupa’da bakteriyofaj tedavisinin uzun tarihi boyunca insanlara farklı uygulama yolları kullanılarak farklı dozlarda uygulanan farklı bakteriyofajlar ciddi komplikasyonlara yol açmamıştır [8]. Ayrıca, gönüllüler tarafından bakteriyofaj T4 alımını içeren dikkatli bir şekilde kontrol edilen çift kör bir çalışmada hiçbir yan etki bildirilmemiştir [163]. Bu gerçekler, bakteriyofajların hayvanlar ve bitkiler için toksik olmadığını ve klinik açıdan görünüşte zararsız olduğunu göstermektedir. Bu

doğrultuda, bakteriyofajların canlı hayvanlarda veya karkaslarda biyokontrol ajanları olarak kullanılması yoluyla insan besin zincirine sokulmasının güvenli kabul edilebileceği ve hayvansal üretimde antibiyotik kullanımına değerli bir alternatif olarak görülebileceği sonucuna varılabilmektedir.

### **2.7.1. Enkapsülasyon Yolu ile Bakteriyofajların Korunması ve Depolanması**

Bakteriyofajların insan ve hayvanlarda kullanımı, oral veya lokal uygulama için uygun formülasyonlar geliştirilmesini gerektirmektedir. Farklı gıda yüzeyleri, mide-bağırsak koşulları gibi çevresel etmenlerin değişken olduğu ortamlar bakteriyofajların hayatta varlığı olumlu ve olumsuz etkenlere sahiptir [164, 165]. Bakteriyofajları olumsuz koşullara karşı korumanın en yaygın yöntemleri kapsülleme teknolojileridir. Kapsüllemenin amacı, bakteriyofajların yalnızca zorlu mide-bağırsak koşullarında değil, aynı zamanda işleme ve depolama koşullarında veya kuru gıda ürünleri için kuruma koşullarında da hayatta kalacağı bir mikro ortam yaratmaktır. Bu nedenle tarım, biyoteknoloji, ilaç ve gıda endüstrisi dahil olmak üzere çeşitli endüstriler, kendilerini olumsuz çevre koşullarından ve teknolojik faktörlerden koruyan en iyi sistemi aramaktadır.

Mikrokapsülleme, aktif maddelerin sürekli, yarı geçirgen bir membran kaplama ile kontrollü bir şekilde salınan küçük kapsüller halinde paketlenmesi veya kaplanması teknolojisidir [166-168]. Daha geniş bir anlamda, mikrokapsülleme aynı zamanda aktif maddelerin polimerik matris içinde veya boyunca gömülü olduğu ve aktif maddenin bir kısmını partiküllerin yüzeyinde bırakan mikropartiküllerin üretimini de içermektedir. Buna ek olarak, bazı literatürde hareketsizleştirme teknolojisi olarak da anılmaktadır. Mikrokapsülasyon teknolojisi, ilaç ve aşuların insanlarda ve hayvanlarda hedeflenen iletimi için farmasötik sektöründe kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve kullanılmıştır. Son 20 yılda bu teknolojiler, probiyotik bakteriler ve proteinler gibi biyolojik malzemeleri gıda işleme, depolama ve sindirim faaliyetinin neden olduğu hasarlardan korumak için uygulanmaktadır [169].

Kapsülleme işleminin ürünü genellikle mikrokapsül olarak adlandırılır. Bunun nedeni, mikrometre boyutunda (>1 mm) olan kapsüllerin boyutundan kaynaklanmaktadır.

Mikrokapsüller ideal veya ideale yakın bir küresel şekle veya düzensiz bir şekle sahip olabilmektedir. Tipik olarak bir mikrokapsül, çekirdeği kalıcı veya geçici olarak dış atmosferden korumak için bir kabukla (bir kaplama malzemesi) çevrili bir çekirdeğe (mikroorganizma veya aktif madde içerir) sahiptir. Çok sayıda literatür kaynağı, immobilizasyon ve kapsülleme kelimelerini birbirinin yerine kullanılmaktadı. Bununla birlikte, bu iki işlem arasında büyük bir fark vardır: kapsülleme, bir çekirdeğin etrafında bir kaplama oluşturmayı içerirken, immobilizasyon, bir çekirdeğin bir matris içinde hapsedilmesine dayanmaktadır. Sabitlenmiş malzemenin (çekirdek) küçük bir yüzdesi yüzeyde açığa çıkabilir, ancak bu, kapsüllemede meydana gelmez [170]. Mikrokapsüllerin morfolojisi esas olarak çekirdek aktif maddeye ve kabuğun kapsüllenmesinin teknolojik sürecine bağlıdır. Mikrokapsüller ayrıca mononükleer, polinükleer (kabuk içine alınmış birden fazla çekirdek ile) ve matris tiplerine ayrılabilir ve ayrıca çoklu kabuklarla mononükleer olabilir veya mikrokapsül kümeleri oluşturabilmektedir.

Endüstriyel üretim miktarlarındaki artış değerlendirildiğinde, en önemli şeylerden biri, parçacıkların belirli boyutudur. En çok talep edilen, ideal bir küresel şekil ve çok küçük parçacıklardır. Kapsülleme teknolojisine bağlı olarak, kapsüller aşağıdaki şekilde ayırt edilebilmektedir [171, 172]:

- parçacık boyutu 1 mm'nin altında olduğunda, nanoparçacıklar, nanokapsüller, nanoküreler olarak bilinmektedir (bu terminoloji, kapsülleme alanındaki birçok araştırmacı tarafından kabul edilir, ancak Roco, Mirkin ve Hersam'a göre nanoölçek boyut aralığı yaklaşık 1 nm ve 100 nm) [173];
- çapı 3-800 µm arasında olan parçacıklar, mikro parçacıklar, mikro kapsüller veya mikro küreler olarak bilinmektedir;
- 1000 µm'den büyük parçacıklar makro parçacıklar olarak bilinmektedir.

Mikrokapsülleme, birçok yazar tarafından bahsedilen birçok ilginç avantaja sahiptir [170, 172, 174]:

- mikroorganizma veya hassas bileşiklerin korunması;
- fiziksel ve teknik özellikleri iyileştirmek (çözünürlük, dağılılabilirlik, akışkanlık);
- küçük çaplı kapsüller, kütle transfer sınırlamalarını azaltmaya yardımcı olur;

- oksidasyon koruması;
- aktif bileşenlerin kontrollü salınımı;
- toksik maddelerin güvenli ve rahat kullanımı;
- maddenin rengi, tadı ve kokusu gibi organoleptik özelliklerin maskelenmesi;
- ilacın gastrik tahrişi gibi olumsuz etkilerden kaçınılması;
- Besinlerin ve metabolitlerin yarı geçirgen zardan difüzyonunu kolaylaştırır.

Mikroorganizmaların kapsüllenmesi için kullanılan pek çok teknik ve işlem arasında en yaygın olanları solvent buharlaştırma veya ekstraksiyon, püskürterek kurutma, ekstrüzyon kompleksleme, emülsiyon, polimerizasyon teknikleridir. Genel olarak, mikroenkapsülasyon teknikleri kimyasal ve fiziksel yöntemler olarak ayrılır, ancak fiziksel yöntemler daha spesifik olarak fiziko-kimyasal ve fiziko-mekanik teknikler olarak ayrılmaktadır. Çizelge 2.7’de farklı kapsülleme teknikleri sunulmuştur. Farklı kapsülleme terminolojisinin nedeni, birkaç aşamadan oluşan sürecin karmaşıklığıdır. Bir kapsülleme yöntemini tanımlamak için kullanılan terimler, genellikle, çeşitli terminolojiyle sonuçlanan sürecin ana aşamasının terminolojisine dayanmaktadır. Genel olarak literatürde iki ana teknik ayırt edilir: emülsifikasyon ve ekstrüzyon [175-177]. Bununla birlikte, bazı durumlarda, bu teknikler, belirli bir kapsülleme yönteminin hazırlık aşaması olabilmektedir. Bir örnek, ekstrüzyon yoluyla mikrokapsüllemeyi, bir emülsiyon çekirdeğini ve kaplama malzemesini yüksek basınçta bir nozülde geçirmeyi içeren bir süreç olarak tanımlayan Kailasapathy’nin çalışmasıdır [170]. Bu durumda ekstrüzyon, kapsüllemenin ana aşaması olarak ele alınmış ve emülsifikasyon, bir ön adım olarak ele alınmıştır. Bazı makalelerde liyofilizasyon, tartışmalı olan enkapsülasyon olarak da tanımlanmaktadır. Bununla birlikte, liyofilizasyon genellikle farklı kapsülleme tekniklerinden önce gelir veya tamamlanmaktadır. Kapsülleme tekniklerinin bazı adları birbirinin yerine kullanılmaktadır.



Çizelge 2.7. Kapsülleme için kullanılan farklı teknikler

Kimyasal Prosesler	Fiziko-Kimyasal Prosesler	Fiziko-Mekanik Prosesler
Süspansiyon, dispersiyon, emülsiyon polimerizasyonu	Koaservasyon ve faz ayrımı	Sprey kurutma ve dondurma
Polikondenzasyon	Sol-jel kapsülleme (iyotropik jelleşme)	Vakum enkapsülasyon
Yerinde (doğal durumda) polimerizasyon	Süperkritik CO <sub>2</sub> destekli mikrokapsülleme	(Ko-) ekstrüzyon damlaması
	Katman katman (L-B-L) mikrokapsülleme	Akışkan yataklı kaplama
		Emülsiyon karıştırma
		Ultrasonik atomizör
		Santrifüjleme
		Tava kaplama
		Elektrospun nanolifler

Vakum ile kapsülleme ve akışkan yataklı kaplama sıklıkla çözücü buharlaştırma, gömme veya daldırma yöntemleri olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca, damlatma yöntemlerine dayalı teknolojilerle mikrokapsül üretimi, diğer işlemler ve cihazlar tarafından büyük ölçüde desteklenir, örneğin: çoklu meme, titreşim mekanizması, kesme yöntemi (jet parçalama sistemi), koaksiyel hava akışı, elektrostatik potansiyel, dönen disk atomizasyonu. Mikrokapsüller üretmek için nispeten basit yöntemler olduğundan, ekstrüzyon damlatma yöntemlerine önemli bir ilgi ve genişleme vardır. Bakteriyofajların ve diğer biyolojik malzemelerin mikrokapsüllemesi için polimerlerin ve ilgili teknolojilerin seçimini bir dizi faktör belirlemektedir. İlk olarak, polimerler, kapsüllenecek maddelerle uyumlu olmalı ve işlem, bunların biyoaktivitesini önemli ölçüde azaltmamalıdır. Aşırı sıcaklık, pH ve basınçtan kaçınılmalıdır. Mikrokapsül boyutu da oldukça önemlidir.

Bakteriyofajların mikroenkapsülasyonu hakkında sınırlı sayıda rapor vardır. Bakteriyofajlar, ilgili akciğer hastalıklarının tedavisi için *S. aureus* veya *P. aeruginosa*'nın kontrolü için tasarlanmış bir inhalasyon dozaj formunda PLG mikroküreleri içine kapsüllemiştir [178]. Bu çalışmada, modifiye edilmiş bir çift emülsiyon ve solvent ekstraksiyon protokolü kullanılmış olup, burada fajların solvent

arayüzüne maruz kalmasını en aza indirmek için bakteriyofajlar harici sulu faza eklenmiştir. Mikroküreler, bir kuru toz soluma cihazı yoluyla solumayı kolaylaştırmak için uygun bir boyuta ve yoğunluğa sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. İşlemin, bakteriyofajların sudiklorometan arayüzüne maruz kalmasına atfedilen bakteriyofajların canlılığının kısmen kaybına neden olduğu gösterilmiş; 4 veya 22°C'de 7 günlük depolamanın ardından litik aktivite tamamen kaybolmuştur. Ürün, uygulama üzerine fajların % 60'ının ilk yarım saatte salındığı ve ardından yaklaşık 6 saat süren bir sürekli salım sergilediği bir ani salım fazı sergilemiştir. Formülasyonun raf ömrünü uzatmak için daha fazla geliştirme gereklidir. Bakteriyofajlar ayrıca, antibiyotiğe dirençli bakterilerin neden olduğu topikal enfeksiyonları tedavi etmek için bir yara iyileştirici müstahzar (PhagoBioDerm; Intralytix, Inc., Baltimore, MD) olarak bir antibiyotikle birlikte biyolojik olarak parçalanabilen poli(esteramid) içinde kapsüllenmiştir [179, 180].

#### **2.7.1.1. Püskürtme ile Kurutma**

Püskürtmeli kurutma ile kapsülleme, gıda endüstrisinde kuru ve kararlı gıda katkı maddelerinin ve tatların hazırlanması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde, çoğunlukla kokuların, yağların ve aromaların kapsüllemesinde kapsülleme uygulaması için tavsiye edilmiştir. Bu yöntemde, kapsülleme için bileşen ya taşıyıcı polimerlerin solüsyonunda süspansiyon edilir ya da önce gerekli katkı maddeleriyle (emülsifiye ediciler, stabilizatörler) sulu bir solüsyonda süspansiyon edilerek ve ardından bir w/o emülsiyonu oluşturmak için taşıyıcı polimerler içeren bir organik faz ile daha fazla karıştırılmaktadır. Karışım (çözelti, süspansiyon veya emülsiyon formunda) daha sonra püskürtmeli kurutucunun ısıtılmış bölmesine beslenmekte, yüksek hızlı dönen bir disk aracılığıyla pompalanmakta ve sıcak hava ile birlikte bir odaya püskürtülmektedir. Bu işlem sırasında karışım milyonlarca ayrı damlacık halinde atomize edilmekte ve çözücü kuvvetli bir şekilde buharlaştırılmaktadır. Damlacıklar, püskürtmeli kurutucudan üretilen bir siklon akımı kullanılarak kurutulmakta ve toplanmaktadır. Çok küçük atomize damlacıkların yüksek yüzey alanı/hacim oranı nedeniyle, çözücü hızla buharlaşır ve her damlacık uçucu olmayan bileşenleri (bakteriyofaj ve eksojenler içeren katı fraksiyon) içeren bir parçacık oluşturmaktadır. Parçacıklar, kurutucudan çıkan hava akımından ayrılmakta ve bunun için tipik olarak siklonlar veya torba filtreler kullanılmaktadır. Püskürtme kurutma, ölçeklendirilebilir bir endüstriyel proses teknolojisidir ve kuru toz inhalatörleri yoluyla pulmoner uygulama dahil olmak üzere farmasötik uygulamalar için

biyolojik maddeler içeren ince tozlar üretmek için yaygın olarak kullanılmaktadır [181]. Kuru tozlar, soğuk tedarik zinciri ve soğutma gerektirmeden nispeten uzun depolama stabilitesi gösterdikleri için bakteriyofaj ilaç ürünleri için giderek daha fazla değerlendirilmektedir [182]. Bakteriyofajların yüksek kesme gerilimine çok uzun süre dayanmadığı gösterilmiştir. Nebulizasyon işleminin bakteriyofaj titresinde kayıpla sonuçlandığı gösterilmiştir [183]. Bakteriyofajlar ayrıca termal streslere karşı hassastır ve 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda kısmen aktivitelerini kaybettiği gösterilmiştir [184]. Düşük püskürtmeli kurutma sıcaklıklarının (~40°C çıkış havası sıcaklığı), daha yüksek sıcaklıklarda gözlemlenen yüksek bakteriyofaj titresini kaybı ile daha yüksek faj titresine neden olduğu gösterilmiştir.

Bakteriyofaj süspansiyonlarının püskürtülerek kurutulması, tipik olarak, bakteriyofajları termal ve kuruma streslerinden korumak için formülasyonda ekşiyanlar içermektedir. Trehaloz, sukroz ve laktoz, yüksek camsı geçiş sıcaklığı ve su değiştirme özelliklerinden dolayı trehalozun ön sıralarda yer almasıyla, püskürterek kurutma bakteriyofaj süspansiyonları için en umut verici ekşiyanlar olarak ortaya çıkmıştır [185]. Püskürterek kurutma üzerine, şeker ekşiyanları, yüksek camsı geçiş sıcaklıklarına sahip amorf yapılar oluşturmaktadır. Camsı geçiş sıcaklığının altında, ekşiyan nedeniyle vitrifikasyon, kapsüllenmiş biyoaktif maddeyi stabilize eder ve ortam veya daha düşük sıcaklıklarda uzun süreler boyunca depolamaya izin vermektedir [184]. % 20'yi aşan bağıl nemde püskürtülerek kurutulmuş tozların buzdolabında saklanması bakteriyofaj titresinde kayba neden olduğu, düşük nemde saklanan numunelerin ise stabil olduğu gösterilmiştir [184]. Püskürterek kurutulmuş bakteriyofaj içeren tozların dağılılırılığını geliştirmek için kullanılmış olan diğer ekşiyanlar arasında dekstranlar, laktoz (Kuru solunabilen tozlar (DPI) tozları için kullanılan yaygın ekşiyan), glikoz, sukroz, mannitol ve lösin yer almaktadır [183, 186]. Laktoz gibi şekerler, indirgeyici özellikleri ve higroskopik yapıları nedeniyle bakteriyofajlar için uygun olmayan ekşiyanlar olabilmektedir [187]. Literatürde mannitol gibi alternatifler önerilmiştir, ancak mannitol şekilsiz kalmak yerine yeniden kristalleşme eğilimindedir [188]. Mannitol kullanılarak yapılan bakteriyofaj püskürtmeli kurutma çalışmaları, geliştirilmiş parçacık dağılım özellikleri rapor edilmiştir. Proteinlerin eklenmesi, örn. trehaloz ile kombinasyon halinde kazein, fajların termal stresten korunmasına atfedilen iyi sonuçlar göstermiştir [186].

Püskürterek kurutma koşullarının, son ilaç ürününde püskürtülerek kurutulan bakteriyofajların yaşayabilirliğini sağlamak için dikkatlice optimize edilmesi gerekmektedir. Püskürtmeli kurutma için bakteriyofaj süspansiyonlarının atomizasyonu için tipik olarak kullanılan 2-sıvı nozüllerinin kesme kaynaklı hasar ve faj titresi kaybı oluşturduğu gösterilmiştir [183, 187]. Bakteriyofajlar, yüksek püskürtmeli kurutma sıcaklıklarında (eş akımlı kurutucular için, çıkış sıcaklıkları 60°C'yi aşan) bakteriyofaj aktivitesinde kayıpla sonuçlanan termal streslere karşı oldukça hassastır [189]. Tipik olarak, bakteriyofajlarla yapılan püskürtmeli kurutma çalışmaları, düşük püskürtmeli kurutma çıkış sıcaklıklarında (~40-50°C çıkış havası sıcaklıkları) çalışan eş akımlı kurutucular kullanmış, bu da tozlarda daha yüksek bakteriyofaj titrelerine ve püskürtmeli kurutmadan hemen sonra toplam bakteriyofaj kayıplarının azalmasına neden olmuştur [184]. Daha yüksek püskürtme kurutma sıcaklıklarında bakteriyofaj titrelerinde yüksek kayıp gözlenmiştir. Bununla birlikte, düşük kurutma sıcaklıkları (40-50°C kurutucu çıkış sıcaklıkları) nedeniyle püskürtülerek kurutulmuş tozlarda kalan nem içeriği, camsı geçiş sıcaklığının (Tg) düşmesine neden olabilmektedir [190]. Şekilsiz bir farmasötik katının camsı geçiş sıcaklığı, viskoelastik özelliklerinin yanı sıra kimyasal ve fiziksel stabilitesini de önemli ölçüde etkileyebilen kritik bir fiziksel özelliktir. Su, nemli bir atmosfere maruz kalması nedeniyle depolama üzerine suyu adsorbe edebilen spreyle kurutulmuş tozlarda plastikleştirici görevi görmektedir. Püskürterek kurutulmuş bakteriyofaj içeren tozlar, üretim üzerine amorf olma eğilimindedir, ancak depolama koşulları, malzemeyi cam geçiş hattının üzerinde uzanan sıcaklıklara ve nem koşullarına maruz bırakabilmektedir. Camların kristalleşme oranları, Tg ile ilişkili olarak depolama sıcaklığına bağlıdır. Püskürterek kurutulmuş tozlarda amorf şekerin yeniden kristalleştirilmesi, şeker molekülleri artık kristalleşme üzerine protein konformasyonunu korumak için proteinlerle hidrojen bağı yoluyla etkileşime giremediğinden, belki de bakteriyofaj reseptör proteinlerinin denatürasyonu nedeniyle bakteriyofaj yaşayabilirliğini olumsuz etkilemektedir. Depolama sıcaklığı ve bağıl nem, püskürtülerek kurutulmuş tozlarda bakteriyofaj stabilitesini etkilediği gösterilen iki ana faktördür. Kuru toz farmasötik biyolojiklerin amorf formları, düzensiz durumdaki moleküler hareket anlamlı bir farmasötik zaman çerçevesi boyunca geciktirildiğinde en kararlıdır [191]. Farmasötik ürünün tipik olarak birkaç yıl mertebesinde olan ömrü boyunca ilaç ürününün kimyasal ve fiziksel kararsızlığının meydana gelmeyeceği şekilde moleküler hareketi yavaşlatmak için saklama sıcaklığının amorf toz malzemenin Tg'sinin önemli ölçüde altında olması gerekmektedir. Camsı geçiş sıcaklığının 50°C altındaki depolama sıcaklıklarının

moleküler hareketi önemli ölçüde azalttığı ve bakteriyofaj tozu depolama raf ömrünün uzamasına yardımcı olduğu düşünülmektedir [191]. Trehaloz, sukroz ve laktoz gibi disakkaritler, kuru halde bakteriyofajların biyoaktivitesini korumaktadır [184]. Püskürterek kurutulmuş tozların buzdolabında saklanması, ortam koşulları altında depolamaya kıyasla uzun süreli saklama sırasında daha yüksek faj titreleri verdiği rapor edilmiştir. Aynı koşullar altında formüle edilen ve püskürtülerek kurutulan farklı bakteriyofaj suşları, elde edilen bakteriyofaj titresinde önemli farklılıklar gösterdi; bu da, bir bakteriyofaj kokteylinde kullanılacak her bir fajın ayrı ayrı formüle edilmesi ihtiyacını ortaya koymuştur [187].

Çözücü buharlaştırma yöntemiyle karşılaştırıldığında, püskürterek kurutma yöntemi daha güvenilirdir, daha yüksek yükleme verimliliği sağlamak ve daha kolay seri üretime olanak tanımaktadır. Üretim maliyeti diğer kapsülleme yöntemlerine göre nispeten düşüktür. Ancak bu uygulamanın oral uygulama amaçlı kullanımı çok sınırlı olmuştur. Bunun başlıca nedeni, geleneksel püskürterek kurutma teknolojisinin biyolojik materyalleri etkisiz hale getirebilecek yüksek sıcaklık ve kesme kuvveti kullanmasıdır. Son zamanlarda, pH'a bağlı bir dizi enterik polimerin, düşük sıcaklıklarda (60°C) püskürterek kurutma yoluyla mikrokapsüller oluşturduğu ve farklı bakteriyel antijenlerin kapsüllemesinde başarıyla uygulandığı bulunmuştur [192, 193].

Kapsüllenmiş bakteriyofajların kuru toz formu, hayvansal üretimde saha uygulamaları için kolaylık sağlar ve depolama ve nakliye maliyetlerini azaltmaktadır. Islak mikrokürelerdeki bakteriyofaj canlılığı, 4°C'de 6 haftalık bir test süresi boyunca değişmeden kaldığı ancak canlılık, kurutma işlemi ve ardından oda ve donmuş sıcaklıklarda saklama sırasında kademeli olarak kaybolduğu gözlenmiştir. Şekerler, proteinler ve polisakkaritler gibi koruyucu katkı maddelerinin eklenmesi, dehidrasyon sırasında bakteriyofajları stabilize edebilmektedir. Havayla kurutma sırasında bakteriyofaj K'nın stabilizasyonu için birkaç koruyucu değerlendirilmiş ve sonuçlar, sakkaroz, trehaloz, maltodekstrin ve yağsız sütün, kuruduktan sonra bakteriyofaj K canlılığının tutulmasını değişken bir ölçüde artırabildiğini göstermiştir. Sakkaroz ve trehaloz ile karşılaştırıldığında maltodekstrin, düşük fiyatı ve geniş ticari bulunabilirliği nedeniyle daha uygun bir koruyucu katkı maddesi gibi görünmektedir [194]. Bu hidrofilik

maddelerin koruyucu etkilerini su moleküllerini ikame ederek ve kapsid proteinleri etrafında hidrojen bağları oluşturarak sağladıkları ve böylece su yokluğunda doğal yapılarını stabilize ettikleri ileri sürülmektedir [194]. Bakteriyofajların mikrokapsüllenmesinin ve müteakip kurutmanın, fajların canlılığını konsantre ve katı bir biçimde korumamıza izin vermektedir. Bu tür bakteriyofaj preparasyonları, fajların depolanması, taşınması ve saha uygulamaları için kolaylık sağlamaktadır. Bu yöntemin dezavantajı, suyun buharlaşmasını kolaylaştırmak için gereken yüksek sıcaklığın mikroorganizmaların kapsüllenmesi için uygun olmayabilmesidir. Isıtma faktörleri ve dehidrasyon, nihai üründeki hücre canlılığını ve aktivitesini azaltabilir [170, 175]. Bununla birlikte, püskürterek kurutmanın probiyotik hücreleri [195] veya nitrojen sabitleyici bakterileri [196] korumada etkili olduğu bulunmuştur.

Vandenheuvel ve ark., uzun süreli depolama sırasında püskürterek kurutma bakteriyofajlarının stabilitesini ve matrisin kristalleşmesinin canlılıkları üzerindeki etkisini araştırmıştır. *P. aeruginosa* faj LUZ19 ve *S. aureus* bakteriyofaj Romulus'un faj-trehaloz süspansiyonu, daha önce tarif edildiği gibi kurutulmuştur [187]. İşlemden sonra, toz formülasyonlar farklı sıcaklıklarda ve kontrollü bağıl nemde saklanmıştır. Toz parçacıklarının kristal oluşumunu önlemek için özel depolama koşulları gerektirdiği gösterilmiştir. Matrisin kristalleşmesi mikrokapsüllü bakteriyofajların yıkımına ve daha yüksek sıcaklığa yol açmaktadır. Bakteriyofajların püskürterek kurutma yoluyla mikroenkapsülasyonu ve depolama sistemlerinin optimizasyonu, mide asiditesinden koruma sağlamak ve enfeksiyon bölgesinde kontrollü salımı sağlamak için umut verici bir yol sunmaktadır. Pasternack ve Sulakvelidze, patentlerinde, *E. coli* O157:H7 suşlarına karşı litik aktivite sergileyen ECML-4 olarak adlandırılan yeni bir bakteriyofajı tarif etmişlerdir. Bu çalışmada, saklama amacıyla bakteriyofaj bileşimleri yapmak için alternatif bir yöntem olarak püskürterek kurutma ve kapsüllemeden bahsedilmiştir. Buluşu yapanlara göre, bakteriyofaj bileşimleri ve preparasyonları, gıda ürünlerinin muhafazası, örn. uygun bir sulu çözelti veya liyofilize veya dondurularak kurutulmuş toz içinde dağıtılarak ve gıda ürünlerinin yüzeyine uygulanarak [197] gerçekleştirilmelidir.

### **2.7.1.2. Dondurarak Kurutma (Liyofilizasyon)**

Dondurarak kurutma (liyoofilizasyon), farmasötik endüstrisinde [198] proteinleri, aşuları, peptitleri veya lipozomlar, nanopartiküller ve nanoemülsiyonlar gibi koloidal taşıyıcıları kurutmak için rutin olarak kullanılmaktadır [199]. Dondurarak kurutma tipik olarak çözeltinin dondurma aşamasını takiben bir kurutma aşamasını içermektedir. Dondurma adımı sırasında, faj içeren çözelti soğutulmakta ve kalan sıvının konsantrasyonuyla sonuçlanan saf su buz kristalleri oluşmaktadır. Bu tipik olarak konsantre çözeltinin viskozitesinin yanı sıra ozmolaritesinde bir artışa meydana gelmekte, bu da daha fazla kristalleşmeyi engelleyerek ve sonunda donmuş amorf/kristal faz ile sonuçlanmaktadır. Donma aşamasının sonunda, zamanla numuneden su çeken çok düşük sıcaklıktaki bir kondensörün çalıştırılması sonucunda kurutma başlamaktadır. Kondansatöre kütle transferini yavaşlatan havayı çıkarmak için bir vakum da çekilmektedir. Bir birincil kurutma aşaması, buz kristallerinin doğrudan süblimleşmesiyle sonuçlanmakta ve geri kalan su, bir ikincil kurutma aşamasında çıkarılmaktadır. Dondurularak kurutulmuş durumda, çoğu kimyasal ve fiziksel bozunma reaksiyonlarının hız sabitleri önemli ölçüde azalmakta ve böylece buzdolabında veya ortam sıcaklıklarında (25°C) uzun süreli depolamaya izin verilmektedir. Geleneksel dondurarak kurutma, yavaş bir süreçtir çünkü liyoofilizasyon, maksimum dondurarak konsantre edilmiş bakteriyofaj-kriyoprotektan çözeltisinin (T<sub>g</sub>) cam geçiş sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda ve numunenin çökme sıcaklığının (T<sub>c</sub>) altındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilerek gözenekli kurumaya elverişli mikroyapıya bir malzeme sahiptir. Dondurularak kurutulmuş malzeme tipik olarak daha fazla işlem gerektiren kuru solunabilir inhalörlerine yüklenmeye uygun ince parçacıklar elde etmek için öğütme işlemi gibi bir kekle sonuçlanmaktadır [200].

Bakteriyofajların dondurarak kurutulması hakkındaki makaleler, esas olarak fajın depolama için stabilize edilmesi amacıyla formülasyonların değerlendirilmesine odaklanmıştır [201-203]. Bir dizi makale, formülasyona amino asitlerin (örn. sodyum glutamat [203]), peptidlerin (örn. pepton [189]) ve proteinlerin (kazein ve laktoferrin [204]) eklenmesinin, dondurarak kurutma ve ardından rehidrasyon sonrasında bakteriyofaj canlılığını iyileştirdiğini göstermiştir. Literatür, disakkaritlerin ör. laktoz [204], sakkaroz [201] ve trehaloz [205] dondurma ve ardından gelen liyoofilizasyon sırasında fajın canlılığını iyileştirdiğini rapor etmiştir. Ozmotik hasar, dondurarak kurutma prosesinde hayatta kalan fajları azaltan önemli bir faktördür [189]. Bu durum,

hidrasyon ortamına şekerlerin eklenmesiyle iyileştirilebilen hidrasyon stresleri ile giderilmeye çalışılmıştır [206]. Farklı bakteriyofajların yüksek veya düşük konsantrasyonları tercih ettiği görülse de, birçok makale, formülasyondaki sakkaroz konsantrasyonunun dondurarak kurutma ve müteakip rehidrasyon sırasında faj canlılığını etkilediğini göstermiştir [201, 205]. Nispeten düşük sıcaklıklarda (<-20°C) hızlı dondurma oranlarının, yavaş dondurmaya kıyasla daha iyi bakteriyofaj canlılığı sağladığı bulunmuştur. Bu, ozmotik hasarın meydana gelmesi için daha az zamana sahip olmasına bağlanmıştır [189].

Engel ve ark. [203] dondurarak kurutma kullanarak mikobakteriyofajların depolama stabilitesini araştırmıştır. Sodyum glutamat (jelatinli ve jelatinsiz), jelatin, pepton (sorbitollü ve sorbitolsüz), dekstran (glukozlu), sığır serumu ve yağsız süt dahil olmak üzere çeşitli kriyoprotektanların ve liyoprotektanların değişen faj titrelerindeki ( $10^4$ ,  $10^5$  ve  $10^9$  POB/ml, faj BK1) etkisi araştırılmıştır. 53 farklı bakteriyofaj, sodyum glutamat (% 5 (a/a) jelatin ile % 0,5 (a/a) jelatin) kullanılarak test edilmiştir. Dondurularak kurutulmuş fajın oda sıcaklığında karanlıkta 2,5 yıl kadar saklanması, bakteriyofaj canlılığında orta düzeyde bir değişikliklerle sonuçlanmıştır. Puapermpoonsiri ve ark. [207], dondurarak kurutma sırasında sakkaroz, PEG ve jelatinin, 30 günlük bir süre boyunca *S. aureus* ve *P. aeruginosa* bakteriyofajının kısa vadeli canlılığı üzerindeki etkisini değerlendiren nitel bir çalışma gerçekleştirmiştir. Birincil kurutmanın (donmuş suyun -30°C'de 1000 dakika süreyle dondurulması ve süblimleştirilmesi) ardından, adsorbe edilmiş suyu desorbe etmek için ikincil bir kurutma döngüsü (25°C'de 6 saat süreyle yüksek sıcaklıkta) izlemiştir. Dondurularak kurutulmuş tozun kalıntı nem içeriğinin (ağırlıkça % 4-6) daha iyi bakteriyofaj canlılığı ile ilişkili olduğu bulunmuş; ancak bu çalışmanın doğası nedeniyle, daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyan bu etkinin büyüklüğünü doğru bir şekilde değerlendirmek zor olduğu vurgulanmıştır. Jelatinin, liyofilizasyonun ardından bakteriyofaj canlılığının korunmasında hiçbir rol oynamadığı bulunduğu raporlanmıştır. Liyofilize malzemede kalan nem içeriğinin kontrolünün, bakteriyofajın kimyasal (amino asitlerin reaktivitesi) ve fiziksel stabilitesini (kuyruk proteinlerin açılması) dengelemek ve litik aktivite kaybına neden olmak için önemli olduğu bulunmuştur. 25°C'de ikincil kurutma nedeniyle dondurularak kurutulmuş keklerin çökmesini önlemek için yüksek konsantrasyonlarda sakkaroz ve polietilen glikol (PEG) gerekliliği belirtmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda kimyasalların (örn. sakkaroz),



bakteriyofaj titresinde bir azalmaya yol açtığı ve daha düşük sakkaroz konsantrasyonlarında daha iyi sonuçlar verdiği rapor edilmiştir. 4°C’de 30 günlük depolamadan sonra canlı bakteriyofaj varlığı rapor edilmiştir.

Dini ve Urraza, dondurarak kurutma ve depolama (-80°C, 24 saat) sırasında bir Podovirüs kolifaj stabilitesi üzerinde tampon sistemlerinin (fosfat tamponlu salin (PBS) ve SM), yağsız süt içeren/içermeyen tamponların ve disakkaritlerin (sakkaroz veya trehaloz) eklenmesinin etkisini araştırmıştır. SM tamponunda dondurularak kurutulan kolifaj, sırasıyla yağsız süt ve PBS ile karşılaştırıldığında en yüksek titreyi verdiği gözlenmiş ve PBS’ye trehaloz veya sukroz eklenmesi, bakteriyofaj titresini iyileştirmediği rapor edilmiştir. Bu, dondurarak kurutma işleminden ziyade ozmotik şoktan kaynaklanan hidrasyon streslerinden kaynaklanıyor olabileceği belirtilmiştir. Dondurularak kurutulmuş numuneler, ozmotik şoku önlemek için sakkaroz eklenmiş bir tampon yerine basit bir tampon kullanılarak yeniden hidrasyon işlemi uygunlanmıştır. PBS’ye sakkaroz eklenmesi, 120 gün boyunca (4°C’de) depolamanın ardından bakteriyofaj titresini stabilize etmiş ve yalnızca PBS içinde dondurularak kurutulmuş bakteriyofaj, 120 günlük depolama boyunca bakteriyofaj titresinde ilerleyici bir düşüş göstermiştir (ilk liyofilize edilen ürün ile karşılaştırıldığında ~2,5 log kayıp). SM tamponunda düşük konsantrasyonlarda (0,1 M) sakkaroz ilavesinin, donma sonrası kurutmada (dondurma aşamasından ziyade kurutma aşamasına atfedilen titrede yalnızca ~0,5 log düşüş) yüksek bir bakteriyofaj titresine yol açtığı ve titrenin depolamadan sonra 120 güne kadar sabit kalmasıyla sonuçlandığı raporlanmıştır. SM tamponundaki sakkaroz konsantrasyonunun 0,3 M veya 0,5 M’ye yükseltilmesi, 0,1 M sakkaroz örneğine kıyasla ~0,5 log daha düşük titre ile sonuçlandığı rapor edilmiştir. Sakkaroz içeren tozlar, PBS veya yağsız süt kullanılarak kurutulan numunelerle karşılaştırıldığında daha yüksek artık nem içeriğine sahiptir. Toplam bakteriyofaj titresini kaybının (~0,3 log) yalnızca küçük bir kısmı, ~1,5 log bakteriyofaj titresini kaybının çoğunluğunu oluşturan liyofilizasyon ile dondurma aşamasına (0,5 M sakkaroz-SM tampon numunesi için) atfedilmiştir. Bunun rehidrasyon adımına atfedilip atfedilemeyeceği daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyduğu rapor edilmiştir.

Merabishvili ve ark. [205], dondurarak kurutmadan sonra bir *S. aureus* bakteriyofaj ISP'nin stabilitesini araştırmıştır. İki farklı konsantrasyonda bakteriyofaj titeri ( $10^8$  ve  $10^9$  POB/ml) içeren, farklı ekspiyanlarla (her ekspiyan 0,1 M veya 0,5 M konsantrasyonda: sakkaroz, trehaloz, mannitol, glisin ve polivinilpirolidon (PVP) ve PEG 6000 (% 1 ve % 5)) hazırlanmıştır. Birincil kurutma  $-30^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirilirken, ikincil kurutma için sıcaklık  $\sim 10$  saatlik bir süre boyunca kademeli olarak  $25^{\circ}\text{C}$ 'ye yükseltilmiş ve ardından izotermal kurutma yapılmıştır. Bazı yardımcı maddeler (PVP, mannitol ve PEG 6000) başarısız olduğu rapor edilmiştir. PVP'nin donmadan önce bile bakteriyofajı etkisiz hale getirdiği bulunmuştur. Yardımcı madde olarak kullanılan glisin, liyofilizasyondan sonra bakteriyofaj ISP'nin tamamen canlılığını kaybettiği rapor edilmiştir. 0,1 M'de şeker alkol mannitol kullanılarak bakteriyofaj ISP aktivitesinin tamamen kaybı, 0,5 M konsantrasyon kullanılarak 4 log titre azalmasıyla gözlendiği rapor edilmiştir. Bundan sonra bakteriyofaj titresinin 37 aylık depolamanın ardından 2 log azalma ile 27 aylık bir süre boyunca sabit kaldığı rapor edilmiştir. PEG 6000'deki bakteriyofaj ISP titresini, liyofilizasyonun ardından 1,8 log (% 1 PEG) ve 5 log (% 5 PEG) azalma gösterdiği rapor edilmiştir. 37 aylık depolamanın ardından, ilave titre kaybı 3 log (%1 PEG) ve 1,7 log (% 5 PEG) olarak hesaplanmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda (0,5 M) trehaloz ve sakkarozun faj ISP'si için en etkili dengeleyiciler olduğu bulunmuştur. Liyofilizasyondan hemen sonra bakteriyofaj titresinde 1 log kayıp ve 37 aylık saklamanın ardından 1 log kayıp gözlenmiştir. Farklı trehaloz ve sukroz konsantrasyonları (0,3 M, 0,5 M, 0,8 M ve 1,0 M) ayrıca incelenmiştir. 0,8 M ve 1,0 M şeker zeltelerinden dondurularak kurutulan faj ISP, kurutmadan hemen sonra ( $\sim 0,5$  log) en kk titre azalmasını gösterdiği rapor edilmiştir. Sonraki 27 aylık depolamada faj ISP titresini sabit kalmıştır ( $\sim 1$  log değişkenlik, 3, 7, 12 ve 27 aylık zaman periyodunda llmştir). Bakteriyofaj ISP stabilitesi, aynı süre boyunca (37 ay sonra)  $4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan LB besiyeri (1 log azalma) ve % 0,9 NaCl ( $\sim 2$  log azalma) içinde saklanan bakteriyofaj için de kaydedildiği belirtilmiştir.

Malenovsk [208] yapısal olarak farklı hayvan virüslerinin liyofilizasyonu sırasında jelatin ile kombinasyon halinde sakkaroz ile iyi sonuçlar bildirmiştir. Ticari olarak temin edilebilen dondurularak kurutulmuş bir faj kokteylinin sakkaroz ve jelatin içermesi bu sebeple önem taşımaktadır [179].

Çizelge 2.8. Bakteriyofaj liyofilizasyon çalışmalarına genel bir bakış

Kaynak	Bakteri, bakteriyofaj	Liyofilizasyon yöntemi	Duvar malzemesi	Depolama (°C)	Süre	Başlangıç titre (log)	Kalan titre (log)	% Kayıp
[209]	22 farklı faj	[210]	% 50 yağsız süt	4, 26	2 yıl	7-10	6-9	(-)
[189]	<i>Corynebacterium</i> faj H1	[211]	% 20 pepton	OS	3 ay	(-)	(-)	25
[189]	<i>Corynebacterium</i> faj H1	[211]	% 20 pepton + % 10 sakkaroz	OS	3 ay	(-)	(-)	18
[189]	<i>Corynebacterium</i> faj H1	[211]	% 20 pepton + % 10 sakkaroz + % 2 sodyum glutamat	OS	3 ay	(-)	(-)	46
[212]	<i>Escherichia coli</i> faj T4	[212]	Pepton	NA	NA	6-8	(-)	18-99
[213]	<i>Corynebacterium</i> fajları	[211]	% 20 pepton + % 10 sakkaroz + % 2 sodyum glutamat	Min. 25	2,5 yıl	7-10	7-10	(-)

Çizelge 2.8. (devam) Bakteriyofaj liyofilizasyon çalışmalarına genel bir bakış

Kaynak	Bakteri, bakteriyofaj	Liyofilizasyon yöntemi	Duvar malzemesi	Depolama (°C)	Süre	Başlangıç titre (log)	Kalan titre (log)	% Kayıp
[206]	<i>E. coli</i> faj T3	[214]	Luria-Bertani besiyeri	sıvı (-)	(-)	12	(-)	87
[206]	<i>E. coli</i> faj T3	[214]	0,05 M sakkaroz	(-)	(-)	12	(-)	51
[206]	<i>E. coli</i> faj T7	[214]	Luria-Bertani besiyeri	sıvı (-)	(-)	12	(-)	99
[206]	<i>E. coli</i> faj T7	[214]	0,05 M sakkaroz	(-)	(-)	12	(-)	87
[214]	<i>E. coli</i> faj T4	[215]	-	Min. 20	0-7 gün	9,9	(-)	99,8500
[214]	<i>E. coli</i> faj T4	[215]	Glukoz 4000 mg/ml	Min. 20	0-7 gün	9,9	(-)	99,9500

Çizelge 2.8. (devam) Bakteriyofaj liyofilizasyon çalışmalarına genel bir bakış

Kaynak	Bakteri, bakteriyofaj	Liyofilizasyon yöntemi	Duvar malzemesi	Depolama (°C)	Süre	Başlangıç titre (log)	Kalan titre (log)	% Kayıp
[214]	<i>E. coli</i> faj T4	[215]	Jelatin 20 mg/ml	Min. 20	0-7 gün	9,9	(-)	99,9600
[214]	<i>E. coli</i> faj T4	[215]	Jelatin 200 mg/ml	Min. 20	0-7 gün	9,9	(-)	99,9200
[214]	<i>E. coli</i> faj T4	[215]	Fosfat tamponlu salin	Min. 20	0-7 gün	9,9	(-)	99,9920
[214]	<i>E. coli</i> faj T4	[215]	% 0,9 NaCl	Min. 20	0-7 gün	9,9	(-)	99,9997
[216]	<i>Staphylococcus aureus</i> fajları	[217]	% 100 yağsız süt	Min. 20	12-18 yıl	2-3	1-3	(-)
[202]	Caudovirales	(-)	% 50 gliserol	4	20	(-)	Canlı	(-)

Çizelge 2.8. (devam) Bakteriyofaj liyofilizasyon çalışmalarına genel bir bakış

Kaynak	Bakteri, bakteriyofaj	Liyofilizasyon yöntemi	Duvar malzemesi	Depolama (°C)	Süre	Başlangıç titre (log)	Kalan titre (log)	% Kayıp
[207]	<i>S. aureus</i> Siphovirus	[178]	1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 8 mM MgSO <sub>4</sub> , 0,1 g/l jelatin	NA	NA	9,7, 7,8, 3,7	(++p), (+p), (-p)	(-)
[178]	<i>S. aureus</i> Siphovirus ve <i>P.aeruginosa</i> Myovirus	[178]	0,1 M ve 0,5 M sakkaroz, % 1 ve % 5 PEG 6000	4	2, 7, 14, 30 gün	8	(++p), (+p)	- (-)
[218]	<i>S. aureus</i>	[178]	1 ml HPMC + % 1 mannitol	4	6-12 ay	8	5-6	(-)
[219]	<i>E. coli</i> faj T4	[219]	% 0,5 maltoz	NA	NA	(-)	(-)	(-)*
[219]	<i>E. coli</i> faj T4	[219]	% 5 maltoz	NA	NA	(-)	(-)	(-)*

Çizelge 2.8. (devam) Bakteriyofaj liyofilizasyon çalışmalarına genel bir bakış

Kaynak	Bakteri, bakteriyofaj	Liyofilizasyon yöntemi	Duvar malzemesi	Depolama (°C)	Süre	Başlangıç titre (log)	Kalan titre (log)	% Kayıp
[219]	<i>E. coli</i> faj T4	[219]	% 0,3 çözünür nişasta	NA	NA	(-)	(-)	(-)*
[219]	<i>E. coli</i> faj T4	[219]	-	NA	NA	(-)	(-)	(-)*

(-): Belirtilmemiş, NA: Uygulanabilir düzeyde değil, OS: Oda sıcaklığı

(++p): Konfluent lizis (parçalanmış bakteri parçaları)

(+p): Sayılamayacak kadar çok bireysel plak (plaka başına >400)

(-p): Plak yok

(-)\* : Anlamlı azalma yok ( $p<0,05$ )

### 2.7.1.3. Vakum Köpük Kurutma

Farmasötik kurutma teknolojileri, termal olarak labil biyofarmasötik ürünlerin depolama stabilitesini ve aynı zamanda bitmiş ürünün taşıma verimliliğini veya dağıtım kolaylığını arttırmak için sıklıkla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, belirli bir kurutma yöntemi tarafından sağlanan termal geçmişin, bir biyofarmasötik ürünün hem katı hal özellikleri hem de depolama stabilitesi üzerinde büyük bir etkiye sahip olabileceği daha iyi anlaşılmaktadır [220]. Her biri kendi avantaj ve dezavantajlarına sahip, farklı olgunluk seviyelerinde çok sayıda kurutma teknolojisi geliştirilmiş olsa da, biyolojik ilaçların biyoaktivitesini koruma becerisini sergileyen yalnızca seçilmiş birkaçı ticari olarak uygulanmıştır. Bu tür teknolojiler, yani liyofilizasyon ve çok daha sınırlı bir ölçüde püskürterek kurutmadır. Daha az bilinen ve daha az gelişmiş kurutma teknolojisi arasında vakumla köpük kurutma vardır. Bazı dezavantajları olmakla birlikte, bazı biyolojik maddelere sağladığı yüksek sıcaklıklarda depolama stabilitesindeki önemli gelişmeden kaynaklanan bazı çok zorlayıcı yararları da vardır.

Vakum kurutma, vakum uygulamasıyla nemin uzaklaştırıldığı bir vitrifikasyon işlemidir. Köpük bir katı mutlaka nihai ürün değildir ve örneğin film kurutma ve hatta dondurarak kurutma işlemlerini içerebilmektedir. Köpük kurutma, bir ara ürün veya son ürün olarak köpüklü bir durumu içeren herhangi bir işleme atıfta bulunabilir ve ayrıca çalkalama yoluyla hava dahil edilerek köpüklü sıvı üretebilir. Bu bağlamda benzer üç kurutma yöntemi arasında ayırım yapmak önemlidir: vakumla kurutma, köpükle kurutma ve vakumla köpükle kurutma. Vakumla köpük kurutma, özellikle biyofarmasötikler için geçerli bir yöntemdir. Vakumla köpük kurutma, kaynamaya neden olmak için basıncı sıvının buhar basıncının altına düşürmek için sıvının vakum uygulanmasıyla “köpürtüldüğü” genel köpük kurutmanın bir alt kümesidir. Önemli ölçüde buharlaşmalı soğutma mevcut olduğunda, buharlaşma ve hatta süblimasyon yoluyla nemin giderilmesi için artan yüzey alanı nedeniyle, genel vakumlu kurutmadan daha hızlı kuruma sağlamaktadır. Vakumla köpük kurutma aynı zamanda köpüklerin üretilmesi için kaynama için daha düşük bir sıcaklık sağlar ve her ikisi de genel köpük kurutma işlemlerine uygun olması gerekmeyen ticari olarak temin edilebilen dondurarak kurutucularda aseptik işlemeyi mümkün kılabilir.



Bu yaklaşım, dondurarak kurutmaya benzerdir, ancak birincil kurutma aşaması tamamen süblimasyon ile gerçekleştirilmez. Burada su, katı yapılar kilitlenmeden önce vakum uygulanarak en azından kısmen uzaklaştırılmaktadır. Bu yaklaşım, genellikle ortam koşullarına yakın olan raf sıcaklıkları ile mümkün olmaktadır. Nem içeriği düştükçe formülasyon daha viskoz hale gelmekte ve statik bir köpük oluşturmaya başlamaktadır. Daha fazla vakum uygulaması ve hafif yükseltilmiş sıcaklıklar ek nem giderme sağlamaktadır (ikincil kurutma). Dondurarak kurutmada elde edilen mikro yapılı ürünün aksine, elde edilen kurutulmuş ürün tipik olarak makroskobik yapılara sahip kapalı hücreli bir köpüktür.

Köpük kurutma için, proses, tipik olandan daha düşük, yani % 20'den daha az katı içeriği ile başlamakta ve düşük vakum ve ortam sıcaklıklarına yakın uygulama ile bir konsantrasyon aşaması gerektirmektedir. Bu süre zarfında numune sıcaklığı, nem uzaklaştırıldıkça azalan raf sıcaklığı ve/veya buharlaşmalı soğutma nedeniyle düşebilmektedir. Ürün solüsyonu yeterince konsantre ve daha viskoz hale geldiğinde, aşırı kaynama/sıçrama riski olmadan yüksek vakum uygulanabilmektedir. Ortaya çıkan hızlı su tahliyesi, gizli buharlaşma ısısı nedeniyle ürün sıcaklığında keskin bir düşüş üretmekte ve geçici ürünün donmasına ve köpük yapısında kilitlenmesine yol açmaktadır. Dondurma işlemi sırasında, nem giderimi aynı zamanda yüksek bir yüzey alanı altında ilerleyen süblimleşmeyi de içerebilmektedir. Hızlı buharlaşma durduğunda, ürün ısınmaya başlamakta ve süblimleşme ve buharlaşmanın bir kombinasyonu ile ilave nem giderilmekte ve sonunda, nemin birincil olarak buharlaşma yoluyla giderildiği raf sıcaklığına yaklaşmaktadır. Raf sıcaklığında ortam koşullarının üzerine bir artış, ürünün Tg'si raf sıcaklığına yaklaşıncaya kadar ek nem giderimi sağlamaktadır. Ürün daha sonra oda sıcaklığına soğumaktadır.

Köpük kurutma, bir biyofarmasötik ürünün biyolojik aktivitesinin korunması için hem dondurarak kurutmaya hem de püskürterek kurutmaya göre, özellikle termal kararsız ürünler ve faz ara yüzlerinde hasara karşı hassas olanlar için bir dizi avantaj sunmaktadır. Dondurarak kurutma ile karşılaştırıldığında, köpük kurutmanın birincil avantajı, ürünün birincil kurutma sırasında donmaması ve dolayısıyla buz kristali oluşumuyla ilişkili kararsızlıkların önlenmesidir. Bu aynı zamanda, örneğin pH'ta büyük değişimlere ve

biyolojik üründe hasara yol açabilen çözünen maddelerin donma konsantrasyonunu da önlemektedir [221]. Ek olarak, dondurarak kurutma sırasında donmuş buz kristalleri ile konsantre sıvı arasındaki faz ara yüzlerinde biyolojik malzemenin denatürasyonu için yerler sunan daha geniş bir yüzey alanı vardır. Ayrıca, nem süblimasyondan ziyade kaynatma ile giderildiği için, birçok durumda köpükle kurutma, liyofilizasyondan daha kısa kurutma döngüleri sunabilmektedir.

Püskürterek kurutma ile karşılaştırıldığında, köpük kurutmanın avantajı, kurutma sırasında hava-su arayüzü miktarındaki önemli azalmadır. Bu arayüz, biyolojik yüzey aktif bölgelerini çekebilmekte ve hem kurutma sürecinde hem de depolama sırasında ürünün bozulmasına yol açabilmektedir. Çalışmalar, kurutulmuş ürünün spesifik yüzey alanı (SSA) ile dahil edilen biyoaktif ajanın stabilitesi arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir [222, 223]. Ek olarak, köpük kurutma, püskürtmeli kurutma sırasında ürün ön ısıtması ve sıvı formülasyonun yüksek basınç altında boşaltılması sırasında aerosolizasyon nozulu tarafından üretilen termal ve yüksek kesme gerilimlerini önlemektedir.

Köpük kurutma, ortam koşullarına yakın çalıştığı için, işleme ile ilgili enerji tüketim maliyetlerinin diğer kurutma işlemlerinden daha düşük olması beklenmektedir [224]. Ek olarak, köpük kurutma, yüksek konsantrasyonda çözülmüş katı içeren formülasyonlarla gerçekleştirilebilmektedir, örn. işleme sırasında biyolojik ajanda daha iyi korunmasını sağlayan şekerler. Dondurarak kurutma, etkili kurutma ve iyi kek yapısı için süblimasyon gereklilikleri nedeniyle başlangıçtaki katı konsantrasyonunda sınırlıdır, püskürtmeli kurutma ise nozül basıncı ve parçacık boyutu üzerindeki kısıtlamalar nedeniyle benzer şekilde sınırlanabilmektedir. Ek olarak, az çözünür aktif farmasötik bileşenlere (API'ler) köpükle kurutma uygulaması, tablet çözünmesini ve oral biyoyararlanımı artırmak için kullanılmıştır [225, 226]. Köpük kurutmaya ilişkili yukarıdaki avantajların çoğu (ortam işleme sıcaklıkları, daha düşük SSA, en aza indirilmiş buz kristali oluşumu), dondurarak veya püskürterek kurutmaya göre hem işlemeyi takiben hem de depolama sırasında biyolojik aktivitenin üstün korunmasıyla sonuçlanmaktadır. Bir dizi çalışma bunu bakteriyel ve viral aşuların yanı sıra monoklonal antikorlar için göstermiştir [222, 223, 227-229].

Endüstriyel bir ortamda köpük kurutma uygulamasının belki de en eski kaydı, yirminci yüzyılın başlarında köpükle kurutulmuş süt üretimi ile ilişkilidir. Bu erken süreçte köpük, arttırılmış viskoziteye sahip önceden konsantre edilmiş bir stoğun çalkalanmasıyla üretilmiştir [230]. Nem daha sonra yükseltilmiş sıcaklıklarda, örneğin ısıtmalı tamburlu kurutmaya giderilmiştir. 1940'ların başlarında, yalnızca hızlı bir şekilde sulandırılan değil, aynı zamanda orijinal tat profilini de koruyan, rafta dayanıklı bir ürünün daha iyi üretilmesi hedefiyle, vakum kullanımıyla köpükle kurutulmuş gıda ürünleri üretme süreçleri geliştirilmeye başlanmıştır [231]. Yaklaşım, 1950'lerden başlayarak, büyük ölçüde ABD Tarım Bakanlığı'nın bir araştırma ve geliştirme bölümü tarafından kaliteli bir köpükle kurutulmuş süt ürünü üretme hedefinden hareketle, üretim maliyetlerini düşürmek için sürekli süreçlere doğru rafine edilmiştir [232].

Köpükle kurutulmuş biyolojik ürünlerin en eski kayıtları, bakterilerin korunması için olduğu düşünülmektedir. 1930'larda Rus biyolog Olga Lepeshinskaya, bakterilerin köpüklü bir katı içinde günlerce bekletilip sonra su ile sulandırıldıktan sonra aktivitelerini geri kazandığına dair bulgusunu yayınlamıştır [233, 234]. Daha sonra, 1940'larda, mikrobiyolog Lord Stamp, liyofilizasyona göre bakteriyel aktivitenin korunmasında büyük bir gelişme sağlayan, birkaç gün boyunca bir kurutucu madde ile birlikte hafif bir vakum uygulanmasını içeren bir köpükle kurutma işlemini tanımlamıştır [235]. Daha kapsamlı bir çabayla, mikrobiyolog Douglas Annear 1950'lerin ortalarından 1970'lere kadar bir dizi makale yayınlamıştır [236, 237]. Hücrelerin korunmasına yönelik bu öncü çalışma, biyolojik aktivitenin tutulmasında önemli bir gelişmenin camsı bir matriste köpükle kuruyan bakteriler tarafından sağlanabileceğini göstermiştir. Kurutulmuş köpüğün 100°C'de günlerce saklanmasıyla sonra bile yeniden hidratlanması üzerine, birkaç bakterinin aktivitesinin önemli bir kısmının korunduğu bulunmuştur. Bu teknolojiye yeniden ilgi, bu yaklaşımın hem bakteriyel hem de viral aşılarda kullanılmasıyla 1990'lara kadar yeniden ortaya çıkmamıştır. Hem Roser hem de Gribbon ve Victor Bronstein, virüsler ve bakteriler gibi gücünü koruyan köpükle kurutulmuş biyolojik ürünler üretmek için bir vakum sürecinin patentini almıştır [238-240]. Truong ve ark. 2000'lerde, canlı zayıflatılmış grip virüsü ve parainfluenza virüsü gibi viral aşılarda potensinin korunması için, liyofilizasyon gibi diğer geleneksel yöntemlere göre depolama stabilitesinde önemli bir gelişme gösteren bir vakumlu köpük kurutma işleminin geliştirilmesi izlemiştir [241].

Köpükle kurutulmuş farmasötik bir ürünün pazara ulaşmasından önce aşılması gereken bir takım zorluklar vardır. Bunlar;

- Proses: Sıvının köpürmesi veya kaynamasıyla ilişkili yüzey gerilimi veya kayma gerilimleri, özellikle arayüzlerdeki proteinlerin denatürasyonundan kaynaklanan bir biyofarmasötik maddeye potansiyel olarak zarar verebilmektedir. Ek olarak, dehidrasyon streslerinin genel etkisi protein agregasyonuna yol açabilmektedir. Bununla birlikte, uygun cam oluşturucuların, yüzey aktif maddelerin ve diğer stabilizatörlerin kullanılması bu sorunları en aza indirebilmektedir.
- Ölçeklenebilirlik ve süreç devamlılığı: Liyofilizasyonun tersine, köpükle kurutmanın ardından köpük yapısı tekdüze olmayabilmekte ve görünüm kek yüksekliği açısından oldukça değişken olabilmekte ve bir parti içinde şişeden şişeye değişebilmektedir. Bazı şişeler hiç köpürmeyebilmekte ve bunun yerine kurumuş viskoz bir film oluşmaktadır. Bazı durumlarda, şişeler arasındaki ve içindeki köpük yoğunluğu ve nemdeki homojensizlik, bazı şişelerin işlem sırasında veya sonrasında köpük çökmesine neden olabilmektedir. Bu homojen olmama biyolojik stabilitede de değişkenliğe yol açabilmektedir. Ölçeklenebilirlik, köpürme eyleminin kontrol edilmesiyle iyileştirilebilmektedir. Bu, raf sıcaklık profilini ayarlarken daha kademeli, kontrollü bir vakum düşüş oranıyla bir dereceye kadar elde edilebilmektedir. Zaman/sıcaklık/basınç parametrelerinde dikkatli bir şekilde optimize etmek, liyofilizasyona göre köpük kurutmanın düşük döngü süresi avantajından çok fazla ödün vermemek için gereklidir.
- Aktif bileşen taşıma: Köpükle kurutulmuş bir ürünün yüzey/hacim oranı daha düşük olduğu için, liyofilize veya püskürtülerek kurutulmuş muadili ile karşılaştırıldığında daha uzun sulandırma sürelerine sahip olabilmektedir. Bununla birlikte, çoğu köpükle kurutulmuş ürün için sulandırma süresi genellikle bir dakikadan azdır. Köpük kurutma için bir zorluk, nihai ürünü bir toza dönüştürmektir; flakon formatı buna elverişli değildir. Köpük mat kurutma gibi alternatif yöntemler, tozların üretilmesi için bir öğütme aşamasını kolaylaştırabilir; ancak bunu aseptik bir süreç haline getirmek (genellikle biyolojik için gereklidir) zorlayıcı olabilmektedir. Püskürtmeli kurutma doğrudan tozlar üretilse de, bu sorun liyofilize ürünler için de geçerlidir.

Köpük kurutmanın sunduğu başlıca avantaj, diğer farmasötik kurutma işlemleriyle sıklıkla rakipsiz olan, biyoaktif maddelerin gelişmiş termal stabilizasyonudur. Birkaç bakterinin başarılı bir şekilde korunduğu, yarım yüzyıl önce Annear tarafından köpükle kurutma ile gösterildiğinden, birkaç araştırmacı bu yaklaşımı, kurutulmuş halde bir dizi biyolojik maddenin stabilizasyonu için kullanmıştır. Örneğin, sığır vebası ve peste des petits ruminant virüsleri [242], Newcastle hastalığı virüsü [243], parainfluenza virüsü [222], *Francisella tularensis* bakterisi [228], *Salmonella Typhi* bakterisi [229], kuduz virüsü [244] için canlı zayıflatılmış aşılarda, domuz üreme ve solunum sendromu virüsü [245] ve grip virüsü [227], liyofilizasyon ve/veya sprey kurutmaya göre üstün stabilizasyon göstererek başarıyla köpükle kurutulmuştur.

Kurutma yönteminin stabil bir ürün üretmesi ne kadar önemliyse, optimum stabilite ancak farmasötik yardımcı maddelerin uygun kombinasyonu ile elde edilebilmektedir. Aslında, kurutma işlemleri için daha iyi dengeleyicilerin kullanımındaki ilerleme, biyolojik aktivitenin korunması için dondurarak kurutma ekipmanındaki gelişmeler kadar önemli olmuştur. Genellikle köpükle kurutulmuş bir formülasyona dahil edilen ekşiyanlar, diğer farmasötik kurutma işlemlerinde nadir değildir ve tamponları, cam oluşturmaları, polimerleri, plastikleştiricileri, proteinleri, yüzey aktif maddeleri, amino asitleri vb. içermektedir. Bununla birlikte, baz stabilizatörün, yani cam oluşturmalarının veya poliollerin konsantrasyonu, önemli ölçüde daha yüksek konsantrasyonda kullanılmaktadır.

Su, şekilsiz bir camın Tg'sini düşüren ve moleküler hareketliliğini artıran çok etkili bir plastikleştirici görevi görmektedir [246]. Bu nedenle nem, kurutulmuş bir katı formülasyonun depolama kararlılığını belirleyen en önemli bileşen olabilir, ancak yukarıda bahsedildiği gibi, her zaman tek başına depolama kararlılığının güvenilir bir göstergesi değildir. Belki de başka hiçbir kurutma işlemi yöntemi bu istisnayı köpük kurutma kadar vurgulamamıştır, çünkü nem içeriğini en aza indirmek (Tg'yi en üst düzeye çıkarmak amacıyla) kararlılığı monoton bir şekilde iyileştirmez [227]. Herhangi bir formülasyon geliştirme sürecinde olduğu gibi, uygun bir tamponlama sistemi ve pH bulmak genellikle ilk adımdır. Tamponlar, pH'ı kontrol etmenin yanı sıra bir stabilizatör veya çözücü görevi görebilir ve köpürme işleminin kendisine katılabilmektedir. Formülasyonun pH'ı genellikle fizyolojik bir aralıktadır, örn. pH 6–8. Köpük kurutma

ortam koşullarına yakın olduğundan, buz kristalleri oluşturma, ekşiyanları dondurma-konsantre etme ve büyük pH kaymaları yaratma eğilimi en aza indirilmektedir. Bu nedenle, dondurarak kurutma için tampon seçimi üzerindeki kısıtlamalar genellikle köpük kurutma için mevcut değildir. Köpükle kurutulmuş sığır serum albüminiyle [247] ilgili bir çalışmada, sodyum fosfatın potasyum fosfattan daha stabilize edici olduğu bulunmuş [221]; bu, işleme sırasında sodyum fosfat tamponlu formülasyonlarda gözlenen pH kayması nedeniyle dondurularak kurutulmuş bir ürün için beklenmeyecek bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Cam oluşturuçular, biyolojik alanı şekilsiz bir katı ortamla çevreleyerek ve moleküler hareketliliği azaltarak proteinin açılmasını ve yavaş bozunma reaksiyonlarını engellemektedir. Daha yaygın olarak kullanılan amorf ekşiyanlar, sakaroz veya trehaloz gibi, hem kurutma sırasında hem de elde edilen camsı matris içinde kaplandığında nihai üründe biyolojik stabilize eden disakaritlerdir. Sakkaroz ve diğer polioller ayrıca, proteinin yüklü bölgelerine hidrojen bağı yoluyla hidrasyonun kaybolan suyunu değiştirerek biyolojik olanı kurumaya bağı denatürasyona karşı koruyabilmektedir. Mannitol gibi şeker alkollerini, şekilsiz bir cam oluşturmaya yerine kristalleşme eğilimleri nedeniyle, köpükle kurutulmuş tozlarda genellikle biyolojik maddeleri sakaroz kadar etkili bir şekilde stabilize etmezler [248]. Bununla birlikte, diğer şeker alkollerini ile kombinasyon halinde, mannitolün şekilsiz kaldığı ve vakumla kurutulmuş köpüklerde trehalozdan daha üstün enzim ve protein depolama stabilitesi sağladığı gösterilmiştir [249]. Cam oluşturuçular aynı zamanda, kabarcık oluşumunu ve stabilizasyonu geliştirmek için formülasyonu kalınlaştırır ve sonuç olarak kabarcık arayüzlerini oluşturan ince filmlere yapısal bütünlük sağlamaktadır.

Bazı araştırmacılar, daha kontrollü ve tekrarlanabilir bir süreç için köpük oluşumunu geliştirmek üzere yüzey aktif maddeler veya köpük stabilizatörleri gibi köpürtücü ajanları dahil etmişlerdir. Sürfaktanlar, köpürme eylemini kolaylaştırmanın yanı sıra, büyük kek hacmi ve daha büyük köpük kabarcıkları sağlar. Sürfaktanlar ayrıca (i) protein/biyolojik maddenin yüzey adsorpsiyonunu azaltarak (onları yer değiştirme yoluyla içeriye doğru iterek), (ii) cam faz dinamiklerini değiştirerek ve (iii) SSA'yı düşürerek stabiliteyi geliştirebilmektedir. Ek olarak, yüzey aktif maddeler belirli bileşenlerin çözünürlüğünü

artırabilmektedir. Tween® ve Pluronic® yüzey aktif maddeler, biyolojik formülasyonlarda % 1'den daha düşük konsantrasyonlarda yaygındır. Bununla birlikte, bazı durumlarda yüzey aktif maddelerin eklenmesi, örneğin bakterilerin lipit zarını dengesizleştirerek belirli biyolojik maddelerin kararlılığını azaltabilmektedir [228]. Karboksimetil selüloz (CMC) [250] ve PVP [247] gibi köpük stabilizatörleri, köpüğün çökmesini önleyerek ve nihai köpük kırılabilirliğini azaltırken aynı zamanda kurutma sürecini kolaylaştırarak köpük stabilitesi sağlamaktadır. Guar sakızı gibi viskozite düzenleyiciler de benzer bir amaca hizmet etmektedir [238]. Çözünmüş gazlar, askıda kalan kabarcıklar veya gaz oluşturucu kimyasallar gibi diğer köpürtücü maddeler köpürtme işlemini başlatmaya hizmet etmektedir. Gıda endüstrisindeki araştırmacılar, bir köpük-mat-kurutma uygulaması için bir köpürtme maddesi olarak yumurta akı (albümin) kullanmıştır [251].

Polimerler genellikle formülasyon viskozitesini arttırmakta ve bu nedenle köpürebilirliği geliştirmektedir. Jelatin (bir peptit veya protein polimeri), genellikle depolama stabilitesini iyileştirmek için biyolojik formülasyonlara dahil edilmektedir [227-229]. PVP gibi polimerler, biyolojik maddelerin işlemeden geri kazanımını artırmak için cam oluşturucularla etkileşime girebilmektedir. Pluronic gibi bazı düşük molekül ağırlıklı polimerler, yüzey gerilimine bağlı denatürasyonun meydana gelebileceği köpüğün faz arayüzlerinden biyolojikleri çıkararak hem yüzey aktif madde bazlı bir köpürme maddesi hem de stabilizatör olarak ikili bir rol üstlenirler. Bir plastikleştiricinin eklenmesi, sadece kurutulmuş katının camsı geçiş sıcaklığını düşürmekle kalmaz, aynı zamanda cam matrisinin moleküler hareketliliği ile bağlantılı hızlı dinamikleri de sönmeye hizmet edebilmektedir. Sorbitol, gliserol veya dimetil sülfoksit (DMSO) gibi daha düşük molekül ağırlıklı katkı maddeleri, cam oluşturuculara göre doğru miktarda dahil edildiğinde, bu amaçlar için biyolojik katkı dozaj formunun depolama stabilitesini geliştirmek için başarıyla kullanılmıştır [229, 252, 253]. Jelatin de bu kategoriye girerken, insan albümini veya fetal sığır serumu gibi diğer proteinler de çeşitli kuru aşı formülasyonlarına dahil edilmiştir [254]. Glutamat [237] gibi amino asitler geçmişte cam oluşturucu olarak köpük kurutmada kullanılmış olsa da, arginin [227] gibi amino asitlerin de grip virüsünün ve bir bakteriyel aşının [228] stabilizasyonunu sağladığı gösterilmiştir.

## 2.8. Bakteriyofajlar, Güvenlik ve Ticari Uygulamalar

Bakteriyofajların güvenliği konusundaki otoritelerden biri olan FDA tarafından gerçekleştirilen inceleme ve onay sürecinin temel amacı, ürünün amaçlanan kullanım koşullarında güvenliğini sağlamaktır. FDA, bakteriyofaj bazlı bir ürünün güvenliğini değerlendirirken, yalnızca aktif bileşenini (örneğin bakteriyofajı) değil, aynı zamanda son üründe bulunabilecek diğer maddeleri de dikkate alır; örneğin tuzlar ve bakteriyel toksinlerin ve/veya bakteriyel toksinlerin kalıntı miktarları, kültür ortamının bileşenleri. Bakteriyofaj bazlı ürünlerin aktif bileşeni ile ilgili olarak, çok sayıda gözlem ve büyük miktarda veri, bakteriyofajların oldukça güvenli olduğunu güçlü bir şekilde göstermektedir.

Bakteriyofaj bazlı ürünler (ve gıda işleme ortamlarında kullanılması amaçlanan diğer ürünler) için yasal değerlendirme sürecinin bir kısmı, ürünün kullanım amacının çevreyi etkileyip etkilemeyeceğini belirlemek ve etkiliyorsa, titiz bir çevre değerlendirme analizi yapmaktadır. 2006 yılında FDA, LMP-102'yi çeşitli RTE gıdalarında *L. monocytogenes* seviyelerini azaltmak için bir gıda katkı maddesi olarak onaylamıştır. LMP-102'lerin gıda işleme tesislerinde kullanılması sonucunda çevreye yayılan *L. monocytogenes* faj miktarının, çeşitli en kötü durum senaryolarına dayanılarak  $6 \times 10^{11}$  POB olduğu tahmin edilmiştir. Bu sayı, çevrede doğal olarak bulunan tahmini  $10^{32}$  fajın % 0,000000000000000000006'sını temsil eder, bu ihmal edilebilir bir miktardır. Ortama salınan LMP-102 fajlarının sayısı 1.000 kat eksik tahmin edilmiş ve aynı zamanda ortamda doğal olarak bulunan fajların sayısı 1.000 kat fazla tahmin edilmiş olsa bile, LMP-102 bakteriyofajlarının konsantrasyonu LMP-102'nin kullanımının bir sonucu olarak çevreye salınan miktar çevrede doğal olarak bulunan fajların yalnızca % 0,000000000000006'sı kadar olacaktır. Bu hesaplamalara ve LMP-102 için gıda katkı maddesi dilekçesinde yer alan diğer bilgilere dayanarak FDA, "insan çevresi üzerinde önemli bir etkisi olmadığını ve çevresel etki beyanının gerekli olmadığını" belirlenmiştir.

EPA, başka bir bakteriyofaj bazlı ürün olan Agri-Phage'i inceledikten sonra, yukarıdaki paragrafta belirtilenle temelde aynı olan bir sonuca varmıştır. AgriPhage, tarlalarda veya seralarda yetişen bitkilere püskürtülerek "bakteriyel hastalıkların, yani bitki patojeninin neden olduğu lezyonların önlenmesini optimize etmek için" kullanılmaktadır. Ürün  $4 \times 10^9$



faj/ml içermekte ve uygulama rejimleri haftada iki kez, 1 litre/dönüm, 9.600 ft<sup>2</sup> alan başına yaklaşık 200 ml'dir. EPA, ürün ve önerilen uygulamaları hakkında bir inceleme yürütmüş ve tescil ettiren tarafından sağlanan literatür alıntılarına dayalı olarak bir çevresel risk değerlendirme analizi gerçekleştirmiştir. EPA, çalışmalarını gerçekleştirdikten sonra "AgriPhage'in önerilen kullanımının kuş türleri, vahşi memeliler, balıklar, suda yaşayan omurgasızlar ve bal arısı dahil böcekler üzerinde hiçbir olumsuz etkisi olmayacağı" sonucuna varmıştır. Ayrıca EPA, AgriPhage'in önerilen kullanım oranlarında vahşi yaşam için bir tehlike oluşturmadığı sonucuna varmış ve ABD Balık ve Yaban Hayatı Servisi tarafından listelenen tehlike altındaki/tehdit altındaki türlerle bağlantılı olarak bir "Etkisi Yok" bulgusu yayınlamıştır. Bu nedenle, diğer faj bazlı ürünlerin, gıda güvenliği, *in vivo* veya çevresel uygulamalara yönelik olup olmadığına bakılmaksızın, çevresel etki veya tam çevresel değerlendirme analizi gerektirmeyecek gibi görünmektedir.

Gıda işleyicileri tarafından kullanılan maddeler veya ürünler, (i) gıda katkı maddesi olarak onaylandıklarından veya (ii) GRAS oldukları için gıda katkı maddesi olarak onaylanma zorunluluğundan muaf olduklarından, genellikle Federal Gıda, İlaç ve Kozmetin Aksiyonu (Federal Food, Drug, and Cosmetic Act – FFDCA) gerekliliklerine uygundur. Faj bazlı ürünler, belirli koşullar altında gıda ile temas eden maddeler olarak düzenlenebilse de, faj bazlı gıda güvenliği ürünleri için düzenleyici onayların çoğunun (i) doğrudan gıda katkı maddeleri, (ii) GRAS, (iii) diyet takviyeleri ve/veya (iv) işleme yardımcıları olarak takip edilmesi muhtemeldir. Bu dört kategori için özel düzenlemeler aşağıda kısaca gözden geçirilmektedir.

Gıda katkı maddesinin yasal tanımı, FDA tarafından belirtildiği gibi, "amaçlanan kullanımı - doğrudan veya dolaylı olarak - bir bileşen haline gelmesiyle veya herhangi bir gıdanın özelliklerini başka bir şekilde etkilemesiyle sonuçlanan veya sonuçlanması beklenebilecek herhangi bir maddedir" [255]. Bu tanım, gıdanın üretiminde, işlenmesinde, paketlenmesinde, taşınmasında veya depolanmasında kullanılan herhangi bir maddeyi içermektedir. Ancak, Federal İsektisit, Fungisit ve Rodentisit Yasası'nı ve FFDCA'yı tadil eden 1996 tarihli Gıda Kalitesini Koruma Yasası'nın bir sonucu olarak, özellikle pestisit kimyasallarını ve pestisit kimyasal kalıntılarını hariç tutmaktadır. Gıda

katkı maddeleri ayrıca iki geniş kategoriye ayrılır: (i) doğrudan gıda katkı maddeleri ve (ii) dolaylı gıda katkı maddeleri. Bir gıdaya, o gıdada belirli bir amaca hizmet etmesi için bir madde veya ürün ekleniyorsa, doğrudan gıda katkı maddesi olarak adlandırılmaktadır. Doğrudan gıda katkı maddelerine bir örnek, çeşitli gıdalara düşük kalorili bir tatlandırıcı olarak eklenen aspartamdır. Dolaylı gıda katkı maddeleri, ambalajlanması, depolanması veya diğer işlemlerden dolayı bir gıdanın eser miktarlarda parçası haline gelenlerdir. FDA'nın Gıda Güvenliği ve Uygulamalı Beslenme Merkezi, Gıda Katkı Maddelerinin Önceliğe Dayalı Değerlendirmesi olarak bilinen devam eden bir program kapsamında dolaylı gıda katkı maddelerinin bir listelemektedir. Gıda ile temas eden madde bildirim programının bir parçası olarak onaylanan veya gıda katkı maddesi olarak düzenlemeden muaf olan ilave dolaylı katkı maddeleri (21 CFR bölüm 170.39 uyarınca) diğer envanterlerde listelenir [256].

LMP-102, bir ABD düzenleyici kurumu (21 CFR bölüm 172.785) tarafından onaylanan, gıda güvenliğini artırmak için tasarlanmış ilk bakteriyofaj bazlı üründür [256]. FDA, ürünün "*Listeria monocytogenes*'e özgü bir antimikrobiyal ajan olarak" kullanılmasına izin vermiş ve güvenli kullanımı için bir dizi koşul ortaya koymuştur. Bunlar, (i) ürünün ortalama faj konsantrasyonunun en az  $1 \times 10^9$  POB/ml olması; (ii) preparasyonda canlı *L. monocytogenes*'in yanı sıra *E. coli*, *Salmonella* dahil olmak üzere yaygın olarak kullanılan bakteriyolojik kültür ortamlarında (örn. Luria-Bertani) büyüeyebilen herhangi bir gram-negatif ve gram-pozitif bakteri bulunmaması ve koagülaz pozitif stafilocoklar; (iii) listeriolizin O'nun (*L. monocytogenes* tarafından üretilen zara zarar veren bir toksin) mevcudiyetinin 5 hemolitik birim/ml'yi aşmayacak bir konsantrasyonla sınırlandırılması; ve (iv) ürünün toplam organik karbon konsantrasyonunun 36 mg/kg olmasıdır. Ayrıca FDA, onaylı LMP-102 faj kokteylinin altı monofajdan oluşması gerektiğini belirtti ve bileşen bakteriyofajların özellikleri için, örneğin genomlarında istenmeyen genlerin bulunmaması gibi özel gereksinimleri listelenmiştir. LMP-102'nin ve diğer mevcut ve gelecekteki faj bazlı gıda güvenliği ürünlerinin gelecekteki etkinliğini korumak için kritik derecede önemli bir husus, FDA'nın, geliştiricinin, ürünün orijinal monofajları tarafından karşılanan aynı sıkı güvenlik kriterlerini karşılaması koşuluyla, onaylı kokteyldeki fajların yerine başka bakteriyofajlar koymasına izin vermesidir. Bakteriyofaj bazlı bir ürünün ticarileştirilmesine yönelik alternatif bir yaklaşım, FFDCa'nın 201 ve 409. bölümleri altında [257] FDA tarafından tanımlandığı gibi, GRAS olarak kabul

edilmesidir: “gıdaya kasıtlı olarak eklenen herhangi bir madde nitelikli uzmanlar arasında, amaçlanan kullanım koşulları altında güvenli olduğunun yeterince kanıtlandığı genel olarak kabul edilmedikçe veya maddenin kullanımı başka türlü olmadıkça, FDA tarafından pazar öncesi incelemeye ve onaya tabi olan gıda katkı maddesi gıda katkı maddesi tanımının dışında tutulmuştur” [258]. FDA’nın herhangi bir ürünün GRAS tanımını onaylaması için resmi bir gereklilik yoktur; yani, kendiliğinden bir “GRAS onayı” yoktur. Bunun yerine, GRAS bildirim programı, 1997’de yayınlanan önerilen bir kural altında işleyen gönüllü bir prosedürdür [259]. Her üretici, ürününün GRAS tanımını karşılayıp karşılamadığını belirlemekte ve FDA’ya uygun bir bildirim göndermektedir. Bildirim tipik olarak, maddenin kısa bir tanımını (kimliği, özellikleri vb.), önerilen/beklenen kullanım koşullarını ve GRAS belirlemesinin gerekçesini içermektedir. FDA bildirimini incelemekte ve ajans, ürünün GRAS tanımına uyduğunu onaylarsa, genellikle (180 gün içinde) “İtiraz Yok” veya “Soru Yok” mektubu ile yanıt vermektedir. FFDCA’nın 201(s) ve 409. bölümleri uyarınca [257], bir gıda katkı maddesinin GRAS olarak değerlendirilebilmesi için, kullanımının genel olarak yayınlanmış bilimsel çalışmaların sonuçlarına göre güvenli olarak kabul edilmesi veya 1958’ten önce gıdalarda kullanılan ürünler için, çok sayıda tüketici tarafından önemli bir güvenli tüketim geçmişine bağlıdır.

GRAS tanımı bakteriyofajlar için geçerlidir ve gıda güvenliği uygulamaları için tasarlanmış faj bazlı ürünlerin ticarileştirilmesi için bir strateji olarak kullanılabilir. Faj bazlı bir ürün için GRAS atamasında FDA’ya başarılı bir şekilde dilekçe veren ilk şirket EBI Food Safety (Çizelge 2.9). Ekim 2006’da FDA, EBI’nin peynirlerde doğrudan uygulama için kullanılmak üzere tasarlanmış P100 faj bazlı bir ürün olan LISTEX için GRAS ataması talebiyle ilgili olarak bir “Soru Yok” mektubu yayınlamıştır. Bu, faj bazlı bir ürün için ilk GRAS tanınmasıdır ve kısa süre sonra (Temmuz 2007) LISTEX’in yaygın olarak *L. monocytogenes* kontaminasyonu riskiyle ilişkili diğer gıdalar, örneğin sığır eti, kümes hayvanları ve balıklar için kullanımını içerecek şekilde genişletilmiştir. GRAS bildirim sürecinin görece basitliği göz önüne alındığında, faj bazlı ürünlere sahip olan diğer şirketlerin de bu stratejiyi izlemesi beklenmektedir. Bu nedenle, işleme yardımcıları olarak pazarlanan faj müstahzarlarının olası istisnası dışında, GRAS tarafından belirlenen, gıda güvenliğine yönelik faj ürünlerinin sayısı, muhtemelen diğer yasal tanımlamalara sahip gıda güvenliğine yönelik diğer faj müstahzarlarının sayısından daha hızlı artması beklenmektedir.

Bakteriyofaj bazlı gıda güvenliği ürünlerinin yasal onayını almak için başka bir potansiyel strateji, onları “diyet takviyeleri” veya “gıda bileşenleri” olarak adlandırmaktır. Diyet takviyesi, diyet takviye amaçlı bir “diyet içeriği” içeren ağızdan alınan bir üründür. Geleneksel bir yiyecek veya içecek olarak tanıtılırsa, bir diyet içeriğine uygulanan özel kurallar geçerli olmaz ve içeriğin bir gıda katkı maddesi dilekçesine veya bir GRAS dilekçesine konu olması gerekmektedir. 1994 tarihli Takviye Edici Diyet Sağlık ve Eğitim Yasası (DSHEA) uyarınca, bir takviyenin piyasaya sürülmeden önce güvenli olmasını sağlamaktan gıda takviyesi üreticisi sorumludur ve FDA, pazara ulaştıktan sonra güvenli olmayan herhangi bir gıda takviyesine karşı önlem almaktan sorumludur. Genel olarak, üreticilerin diyet takviyeleri üretmeden veya satmadan önce ürünlerini FDA’ya kaydettirmeleri veya FDA onayı almaları gerekmez. DSHEA, FFDCA’yı, diyet bileşenlerinin pazarlanması için daha az talepkar bir yol sağlamak üzere değiştirmiştir. Üretici veya distribütör, diyet içeriğinin makul olarak güvenli olmasının bekleneceği sonucuna varmalıdır. Pazarlama başlamadan en az 75 gün önce FDA’ya sunulmalıdır. Genellikle FDA, bir NDIN dilekçesiyle ilgili olarak, dilekçenin ajansa [21 CFR bölüm 350(b)] [256] sunulduğu tarihten itibaren 180 gün içinde bir karar verir ve bu, potansiyel olarak hızlı ticarileştirmeye yol açabilmektedir. Diyet takviyeleri, etiketleme gerekliliklerine tabidir. Bir besin takviyesinin etiketinde bulunması gereken bilgiler şunları içermektedir: (i) ürün için “ek” olduğunu gösteren açıklayıcı bir ad; (ii) imalatçının, paketleyicinin veya distribütörün adı ve iş yeri; (iii) bileşenlerin eksiksiz bir listesi; (iv) ürünün net içeriği; ve (v) “Ek Bilgiler” panelindeki beslenme verileri (bazı küçük hacimli ürünler veya uygun küçük işletmeler tarafından üretilenler hariç). NDIN uygulama sürecinin nispeten kolay ve hızlı olması nedeniyle besin takviyesi yolu, faj bazlı gıda güvenliği ürünlerinin pazarlanması için çekici bir seçenektir. Öte yandan, faj bazlı bir ürünün besin takviyesi olarak belirlenmesi, nasıl tanıtılabileceği ve etiketinde hangi iddiaların yer alabileceği konusunda sınırlamalar getirmektedir. Örneğin, ürünün etiketinin, belirli bir hastalık veya durumun tedavisi, önlenmesi veya iyileştirilmesi için etkili olduğunu tanıtmaya izin verilmez - bu genellikle faj bazlı gıda güvenliği ürünleri için ilgili iddialardır. Genel olarak, diyet takviyesi olarak onaylanan ürünler için aşağıdaki üç tür beyana izin verilmektedir: (i) sağlık beyanları, (ii) yapı/fonksiyon beyanları ve (iii) besin içeriği beyanları. Bunlardan sağlıklı ilgili iddialar, diyet takviyeleri olarak pazarlanan faj bazlı müstahzarlar için

muhtemelen en uygun olanıdır. FDA'nın 2003 Daha İyi Beslenme Girişimi için Tüketici Sağlığı Bilgileri, bir besin takviyesi kullanımı ile bir hastalık veya sağlıkla ilgili durum riskinin azalması arasında bir ilişki olduğuna dair ortaya çıkan kanıtlar olduğunda sağlıkla ilgili iddialarda bulunulabileceğini şart koşmaktadır [260]. Bu nedenle, genel sağlık durumlarını iyileştirmek için insanlar tarafından düzenli olarak tüketilecek bir besin takviyesi (veya probiyotik preparatların bileşenleri) olarak faj bazlı müstahzarların pazarlanması izin verilebilir ve etkili bir yaklaşım olabilmektedir. Bununla birlikte, izin verilen iddialar (yani sağlık iddiaları) ile izin verilmeyen iddialar (yani belirli bir hastalığın tedavisi, önlenmesi veya iyileştirilmesi) arasındaki boşluk biraz belirsizdir; bu nedenle, faj bazlı ürünlerini besin takviyesi olarak pazarlamak isteyen şirketler, ürünlerinin etiketlerinin 1994 tarihli DSHEA hükümleriyle tutarlı olmasını sağlamak için ilgili düzenlemeleri dikkatle incelemelidir.

Federal Yönetmelikler Yasası [21 CFR bölüm 101.100(a)(3)] [256], “işleme yardımcılarını” et ve/veya kümes hayvanı ürünlerinin işlenmesi sırasında mevcut olan bileşenler olarak tanımlar, ancak mamul gıdada önemsiz düzeyde bulunan ve o gıdada herhangi bir teknik veya fonksiyonel etkiye sahip olmayan maddelerdir. Bir işleme yardımcısının, kullanıldığı et veya kümes hayvanı ürünlerinin etiketindeki içindekiler beyanında beyan edilmesi zorunlu değildir. Ancak, bir işleme yardımcısı olarak nitelendirilebilmesi için birkaç kriterden en az birini karşılaması gerekir. Örneğin, (i) gıdaya işleme sırasında eklenmekte, ancak gıda nihai şekline getirilmeden önce çıkarılmakta; (ii) işleme sırasında gıdaya eklenir, ancak gıdada normal olarak bulunan bileşenlere dönüştürülmekte ve gıdada doğal olarak bulunan bileşenlerin miktarını önemli ölçüde artırmamakta; (iii) gıdanın işlenmesi sırasındaki teknik veya fonksiyonel etkisinden dolayı gıdaya eklenmekte, ancak nihai gıda ürünü, sürekli bir teknik veya fonksiyonel etkiye sahip olmayan yalnızca önemsiz düzeyler içermekte; veya (iv) işleme ekipmanından veya nihai ürünün ambalajından gıdaya aktarılmaktadır, ancak nihai ürün üzerinde teknik bir etkisi yoktur. İşleme yardımcıları ya (FFDCA'nın 201 bölümünde tanımlandığı gibi) gıda katkı maddesi olarak kabul edilmezler ya da FFDCA'nın 409. maddesine uygun olarak oluşturulan düzenlemelere uygun olarak kullanılan gıda katkı maddeleri olabilirler.

Gıda güvenliği uygulamaları için bakteriyofaj bazlı ürünler, tam olarak “teknik veya fonksiyonel etkileri”, yani bu gıdalardaki hedeflenen bakteriyel patojenlerin seviyelerini ortadan kaldırma veya önemli ölçüde azaltma yetenekleri nedeniyle gıdalara eklenmektedir. Bu nedenle, işleme yardımcısı olarak kabul edilip edilemeyeceklerinin tespiti, “bitmiş gıdada önemsiz düzeyde bulunmalarına ve o gıdada herhangi bir teknik veya fonksiyonel etkiye sahip olmamalarına” dayanacaktır (21 CFR kısmı 101.100(a)(3)(c)) [256]. Örneğin, bakteriyofajlar, daha sonra işlenen, paketlenen ve artık fajlardan tamamen arınmış olduğu gösterilen çiğ gıdaları işlemek için kullanılıyorsa, işleme yardımcısı olarak kabul edilebilirler. Ayrıca, hedeflenen bakteriyel patojenle yeniden kontaminasyondan korumak için yeterli faj içermemesi şartıyla, paketlenmiş gıda artık miktarda faj içeriyorsa bile işleme yardımcısı tanımlaması uygulanabilir. Böyle bir senaryonun bir örneği, sığır etinin, ögütülmeden önce deneysel olarak kontamine olmuş sığır etindeki canlı *E. coli* O157:H7 konsantrasyonunu ortadan kaldırdığı veya önemli ölçüde azalttığı bildirilen bir *E. coli* O157:H7’ye özgü bakteriyofaj preparasyonu ile işlenmesi olabilir [261]. Kıymada bulunan artık faj seviyesi, onu yeniden kontaminasyondan korumak için yeterli değilse (yani, artık bir etki veya sürekli koruma gözlenmezse), faj preparasyonu, bir işleme yardımcısı atamasını garanti edebilir. Bir işleme yardımcısının tanımları Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa’da oldukça benzerdir. Örneğin, AB Üye Devletleri Katkı Maddeleri Direktifi no. 89/107/EEC’nin 1(3)(a) Maddesi (güncel regülasyon no. (EC) No 1333/2008) [262], işleme yardımcısını “kendi başına bir gıda bileşeni olarak tüketilmeyen, ham gıdaların işlenmesinde kasıtlı olarak kullanılan herhangi bir madde” olarak tanımlar. İşleme veya işleme sırasında belirli bir teknolojik amacı yerine getirmek için ve nihai üründe istemeden ancak teknik olarak kaçınılmaz olarak madde veya türevlerinin kalıntılarının bulunmasına yol açabilecek malzemeler, gıdalar veya içerikleri, bu kalıntıların herhangi bir sağlık teşkil etmemesi koşuluyla riski ve bitmiş ürün üzerinde herhangi bir teknolojik etkisi yoktur. Etiketleme gereksinimleri de benzerdir; örneğin, AB Üye Devletleri Direktifi no. 2000/13/EC’nin 6(4)(c)(iv) maddesine göre [263], işleme yardımcısı içerik olarak kabul edilmez ve bu nedenle bir ürünün etiketinde listelenmesi gerekmez. Gıda güvenliği müdahalesi için bakteriyofaj bazlı ürünlerin çeşitli uygulamalarına ilişkin AB düzenlemelerinin bir incelemesi yakın zamanda yayınlanan incelemeye göre En azından bazı gıda güvenliği müdahaleleri için faj bazlı gıda güvenliği ürünlerinin Avrupa’da işleme yardımcısı olarak belirlenmesi mümkün olmalıdır [264].

Çizelge 2.9. Gıda güvenliği uygulamaları için terapötik faj araştırması ve ticarileştirme ile ilgili şirketler

Şirket	Web Adresi	Lokasyon	Ürünler ve regülasyon stratejisi
Biophage Pharma, Inc.	www.biophagepharma.net	Montreal, Quebec, Kanada	Bakteriyofaj bazlı Coli-Pro™ ve Salmo-Pro™ sırasıyla domuz ve kümes hayvanlarında <i>E. coli</i> ve <i>Salmonella</i> enfeksiyonlarını tedavi etmeye yöneliktir.
EBI Food Safety, Inc.	www.ebifoodsafety.com	Wageningen, Hollanda	GRAS ataması alan ilk bakteriyofaj bazlı ürün olan LISTEX™ P100'ü geliştirmiştir.
Exponential Biotherapies, Inc.	www.expobio.com	McLean, VA, ABD	ABD'de kurulan ilk bakteriyofaj tedavisi şirketlerinden biridir. Şu anda yan şirketi EBI Food Safety, Inc.'in ana işlevi olan terapötik bakteriyofaj araştırma ve üretimi ile artık ilgilenmemektedir.
Gangagen, Inc.	www.gangagen.com	ABD ve Hindistan	2000 yılında Hindistan'da kurulan şirket, 2001 yılında Palo Alto, Kaliforniya'da bulunan ana ofisi ile bir Delaware Corporation olmuştur. Şirket içi araştırmaların çoğu Gangagen Biotechnologies PVT, Ltd.'de (Bangalore, Hindistan) yapılmaktadır.
InnoPhage, Ltd.	www.innophage.com	Porto, Portekiz	Porto'daki Katolik Üniversitesi'nden bir yan şirket olarak, şu anda çevresel ve kozmetik uygulamalar ve bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için ürünler geliştirmeye yöneliktir. Şu anda bakteriyofaj bazlı ürünleri veya düzenleyici onayları yoktur.

Çizelge 2.4. (devam) Gıda güvenliği uygulamaları için terapötik faj araştırması ve ticarileştirme ile ilgili şirketler

Şirket	Web Adresi	Lokasyon	Ürünler ve regülasyon stratejisi
Intralytix, Inc.	www.intralytix.com	Baltimore, MD, ABD	1998 yılında kurulan şirket, 2006 yılında LMP-102TM için FDA'dan gıda katkı maddesi onayı alan ilk şirket olmuştur. Ayrıca EPA onayı da bulunmaktadır. Doğrudan gıda uygulamaları için <i>E. coli</i> O157:H7'ye özgü bakteriyofaj bazlı bir ürün olan ECP-100TM için beklemede olan bir FDA dilekçesi bulunmaktadır.
Novolytics, Ltd.	www.novolytics.co.uk	Coventry, İngiltere	Yiyecek ve içecek endüstrisi ekipmanlarının dezenfeksiyonu için bakteriyofaj ürünleriyle de ilgilenmektedir. Şu anda, gıda güvenliği ürünlerine veya yasal onaylara sahip değildir.
OmniLytics, Inc.	www.omnilytics.com	Salt Lake City, UT, ABD	Daha önce AgriPhi, Inc. olarak bilinen şirket, AgriPhageTM'i geliştirmiştir. AgriPhageTM, EPA onayı alan ilk bakteriyofaj bazlı üründür.
Phage Biotech, Ltd.	www.phage-biotech.com	Rehovot, İsrail	Çoğunlukla kulak ve göz enfeksiyonlarına karşı bakteriyofaj bazlı ürünler geliştirmeye odaklanır; ancak bakteriyofajlar için gıda güvenliği uygulamaları geliştirmeye de ilgi duymaya başlamıştır. Halihazırda gıda güvenliği ürünleri veya düzenleyici onayları bulunmamaktadır.

\*Tablo, gıda güvenliği uygulamaları için faj bazlı ürünleri ticarileştiren en bilinen "faj tedavisi" şirketlerini içermektedir. Kapsamlı olması, yani insan terapötik, teşhis veya diğer gıda dışı güvenlik uygulamaları için fajları veya faj türevli proteinleri kullanan tüm şirketleri içermesi amaçlanmamıştır.



### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Bakteriyofajların Farklı Enkapsülasyon Yöntemleri ile Kuru Formlarının Hazırlanması

##### 3.1.1. Dondurarak Kurutma (Liyofilizasyon) ve Püskürtmeli Kurutma

###### 3.1.1.1. Kimyasal Malzemeler

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Mikrobiyal analizlerde Xylose-Lysine-Deoxycholate Agar (XLD) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) ve CASO Broth (Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Almanya) kullanılmıştır. Liyofilizasyon çalışması kapsamında kriyoprotektan olarak sakkaroz, mannitol, polietilen glikol 8000 (PEG) ve jelatin kullanılmıştır (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD). Püskürtmeli kurutma çalışması kapsamında ekspiyan olarak mannitol, kazein, yağsız süt tozu, and maltodekstrin kullanılmıştır (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD). Serbest klorin reaktifi (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) kullanılmıştır. Çalışma kapsamında deiyonize su kullanılmıştır.

###### 3.1.1.2. Bakteri Suşları ve Bakteriyofaj Kokteylinin Hazırlanması

Bu çalışmada, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovarları Enteritidis (ATCC BAA-1045) ve Typhimurium (ATCC ATCC BAA-190) Soykut ve ark. tarafından belirtilen yöntem ile hazırlanmıştır [265]. Her inokulumun konsantrasyonu, XLD agar üzerine uygun dilüsyonlar hazırlanarak kontrol edilmiştir. Petriler 24 saat  $37\pm 1^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Bu çalışma kapsamında kullanılan *S. Enteritidis* F5-4, *S. Typhimurium* L2-1 ve *S. Typhimurium* ICB1-1 bakteriyofajları Ankara çevresindeki göllerden izole edilmiş ve önceki çalışmalarda kısmen karakterize edilmiştir [265-267]. Kısaca, çift katmanlı agar yöntemi kullanılarak bakteriyofaj varlığı tespit edildikten sonra bakteriyofajları saflaştırmak için tek plak izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bakteriyofajların çoğaltılması için, log fazındaki konak bakteriler bakteriyofaj lizatları ile karıştırılmış ve  $37\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından  $4^\circ\text{C}$ 'de 5 dakika  $12000\times g$ 'de santrifüjlenmiş ve süpernatantlar  $0,22\ \mu\text{m}$  filtrelerden (Sartorius, Göttingen, Almanya) geçirilmiştir. Bakteriyofaj lizatları, çift katmanlı agar yöntemi [268] kullanılarak titreler belirlendikten sonra  $4^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

*S. Enteritidis* F5–4, *S. Typhimurium* L2–1 ve *S. Typhimurium* ICB1–1 bakteriyofajları kullanılarak bakteriyofaj kokteyli (1:1:1 (h/h)) hazırlanmıştır. Hazırlanan stok  $3,2 \times 10^{11}$  POB/ml'dir. Bu çalışmada kullanılan tüm bakteriyofajların çoğaltılması Acar-Soykut ve ark. tarafından belirtilen yöntem ile gerçekleştirilmiştir. CASO Broth, CASO Soft Agar (% 0,6 agar) ve CASO Agar (% 1,5 agar) litik aktivitelerinin ve titrelerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Bakteriyofaj titresini belirlemek için çift katmanlı agar yöntemi kullanılmıştır. Bakteri ve bakteriyofaj sayım deneyleri dört paralel petri ekimi şeklinde gerçekleştirilmiştir.

### **3.1.1.3. Bakteriyofajların Konakçı Skalasının Belirlenmesi ve Morfolojik Karakterizasyonu**

Bakteriyofajların kendi homolog konakçıları dışında litik aktivite gösterip göstermedikleri spot test ile araştırılmıştır [269]. Bu kapsamda 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 bakteriyofajdan 10 µl damlatılmıştır. 37°C'de 18-24 saat inkübasyon sonucunda damlatma yapılan bölgelerdeki liziz oluşumu gözlenerek izole edilen bakteriyofajların çalışılan diğer bakteriler üzerindeki litik aktivite gösterip göstermediği belirlenmiştir. Bakteriyofajlar için berrak plaklar litik fajın bir göstergesi olarak kabul edilirken bulanık plaklar (özellikle merkezlerinde bulanık olanlar) lizogenik bakteriyofaj ihtimali olarak değerlendirilmektedir. Bu kapsamda ilk aşamada spot test ile bakteriyofaj plakları incelenmiş ve berrak/bulanık olma durumlarına göre sınıflandırılmıştır [270].

Morfolojik karakterizasyonun gerçekleştirilmesi için, bakteriyofajlar  $25.000 \times g$ 'de 2 saat santrifüjlendikten sonra 0,1 M amonyum asetat (pH 7,0) ile iki kez yıkanmış, ardından % 1-2'lik uranil asetat ile boyanmıştır. Daha sonra 15 dakika bekleme işlemi gerçekleştirilmiş ve fazla boya uzaklaştırılarak elektron mikrografları transmisyon elektron mikroskobu (TEM, Tecnai G2 F20 S Twin, FEI Company, Oregon, ABD) kullanılarak bakteriyofaj morfolojisi analiz edilmiştir. Adsorpsiyon oranı, Kropinski tarafından önerilen protokol kullanılarak belirlenmiştir [271]. Buna göre, log fazla bakteriler ve bakteriyofaj süspansiyonu 0,01 MOI'de karıştırılarak 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubu olarak sadece bakteriyofaj içeren besiyeri kullanılmıştır. 1 dakika aralıklarla 50 µl numune 10 dakika boyunca alınmış ve birkaç damla kloroform

eklendikten sonra buz üzerinde bekletilen 950 µl CASO besiyerinde seyreltilmiştir. Bakteriyofaj titresi, çift tabaka agar yöntemi kullanılarak belirlenmiş ve adsorpsiyon hız sabiti şu formülle hesaplanmıştır:  $k=(2,3/B_t) \times \log (P_0/P)$  burada k, adsorpsiyon hız sabitini; B bakteri konsantrasyonunu; ve t, titrenin P<sub>0</sub>'dan (orijinal) P'ye (son) düştüğü zaman aralığını temsil etmektedir [271].

#### **3.1.1.4. Dondurarak Kurutma (Liyofilizasyon) Formülasyonlarının Hazırlanması ve Liyofilizasyon İşlemi**

Dondurarak kurutma işlemi için verilen konsantrasyonlarda dört set kriyoprotektan solüsyon hazırlanmıştır:

- (i) 0,3 M, 0,5 M ve 0,8 M sakkaroz;
- (ii) 0,3 M, 0,5 M ve 0,8 M mannitol;
- (iii) % 0,5, % 1,0 ve % 1,5 (a/h) PEG;
- (iv) her çözeltide % 1 (a/h) jelatin içeren 0,3 M, 0,5 M ve 0,8 M sakkaroz jelatin karışımı.

Daha sonra kaplama karışımına % 10 (h/h) bakteriyofaj kokteyli eklenmiştir. Karışım -18°C'de 24 saat dondurulmuştur. Dondurulmuş karışım, laboratuvar ölçekli bir liyofilizatör (Martin Christ, Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Almanya) kullanılarak 72 saat boyunca -50°C'de ve 0,040 mbar'da liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Liyofilizasyon işleminin bitiminden hemen sonra bakteriyofaj titresi belirlenerek t=0 olarak kaydedilmiştir. Ayrıca su aktivitesi (a<sub>w</sub>) ve partikül boyutu ölçümü gerçekleştirilmiştir. Liyofilize faj tozunun a<sub>w</sub> değerini belirlemek için 25°C'de bir tezgah üstü su aktivitesi ölçer (Aqualab PRE, Metre, Pullman, WA, ABD) kullanılmıştır. Liyofilize bakteriyofaj kokteylinin partikül boyutu ölçümü Zetasizer (Malvern Instruments Ltd., Birleşik Krallık) ile gerçekleştirilmiştir. Liyofilizasyon işleminin ardından örnekler 4°C ve 25°C'de 12 ay süreyle cam şişelerde saklanmış ve ilk üç ay iki haftalık periyotlarda ve daha sonra ise aylık aralıklarla bakteriyofaj titreleri belirlenmiştir. Bakteriyofaj titre sayımı işleminde her deney dört paralel halinde gerçekleştirilmiştir.

### **3.1.1.5. Püskürtmeli Kurutma Formülasyonlarının Hazırlanması ve Püskürtmeli Kurutma İşlemi**

Püskürtmeli kurutma işlemi için verilen konsantrasyonlarda dört set ekspiyan solüsyonları hazırlanmıştır:

- (i) 0,3 M, 0,5 M ve 0,8 M mannitol;
- (ii) % 5, % 10 ve % 15 (a/h) kazein,
- (iii) % 5, % 10 ve % 15 (a/h) yağsız süt tozu;
- (iv) % 5, % 10 ve % 15 (a/h) maltodekstrin.

Daha sonra kaplama karışımına %10 (h/h) bakteriyofaj kokteyli eklenmiştir. Çözelti, Mini Püskürtmeli Kurutucu (B-290, BUCHI Labortechnik AG, İsviçre) kullanılarak iki akışkanlı nozul (0,7 mm) ile 473 l/sa basınçlı kuru hava, 85°C giriş sıcaklığı ve 45°C çıkış sıcaklığı proses parametrelerinde çalıştırılmıştır. Püskürtmeli kurutma sonunda bakteriyofaj titresi belirlenmiş ve t=0 olarak kaydedilmiştir. Püskürtmeli kurutucu ile kurutulmuş bakteriyofaj tozunun  $a_w$  değerini belirlemek için 25°C'de bir tezgah üstü su aktivitesi ölçer (Aqualab PRE, Metre, Pullman, WA, ABD) kullanılmıştır. Püskürtmeli kurutucu ile kurutulmuş bakteriyofaj kokteylinin partikül boyutu ölçümü Zetasizer (Malvern Instruments Ltd., Birleşik Krallık) ile gerçekleştirilmiştir. Püskürtmeli kurutma işleminin ardından örnekler  $4\pm 1^\circ\text{C}$  ve  $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 12 ay süreyle cam şişelerde saklanmış ve ilk üç ay iki haftalık periyotlarda ve daha sonra aylık aralıklarla bakteriyofaj titreleri belirlenmiştir. Bakteriyofaj titre sayımı işleminde her deney dört paralel halinde gerçekleştirilmiştir.

### **3.1.2. Vakumla Köpük Kurutma**

#### **3.1.2.1. Kimyasal Malzemeler**

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Mikrobiyal analizde XLD Agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) ve CASO Broth (Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Almanya) kullanılmıştır. Stabilizör olarak kullanılan sakkaroz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD), gliserol (GLY) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD), sorbitol (Alfasol, Kimbiyotek, İstanbul, Türkiye) ve köpükleştirici ajan olarak sığır serum albümin (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD), pastörize yumurta

beyazı tozu (YBT) (Alfasol, Kimbiyotek, İstanbul, Türkiye), peynir altı suyu protein konsantratu (WPC) (Alfasol, Kimbiyotek, İstanbul, Türkiye) kullanılmıştır. Sodyum fosfat dibazik heptahidrat ve sodyum fosfat monobazik monohidrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) ile pH 7,4 fosfat tamponu hazırlanılmasında kullanılmıştır.

### **3.1.2.2. Bakteri Suşu ve Bakteriyofajın Hazırlanması**

Bu çalışmada, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovarları Enteritidis Soykut ve ark. tarafından belirtilen yöntem ile hazırlanmıştır [265]. *S. Enteritidis* F5–4 bakteriyofajı Ankara'daki çevre gölden izole edilmiş ve önceki çalışmalarda kısmen karakterize edilmiştir [265-267]. Her inokulumun konsantrasyonu, XLD agar üzerine uygun dilüsyonlar ekilerek kontrol edilmiştir. Petriler 24 saat  $37\pm 1^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. *S. Enteritidis* F5–4 bakteriyofajının çoğaltılması Soykut ve ark. tarafından belirtilen yöntem ile gerçekleştirilmiştir. CASO Broth, CASO Soft Agar (% 0,6 agar) ve CASO Agar (% 1,5 agar) litik aktivitelerinin ve titrelerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Bakteriyofaj titresini belirlemek için çift katmanlı agar yöntemi kullanılmıştır. Bakteri ve bakteriyofaj sayım deneyleri paralel petri ekimi şeklinde gerçekleştirilmiştir.

### **3.1.2.3. Formülasyonların Hazırlanması**

Vakumla köpük kurutma için seçilen üç farklı köpükleştirici ajan ile stabilizör malzemenin bakteriyofaj titresini üzerine etkisinin incelenmesi için tekli solüsyon-bakteriyofaj ve ikili solüsyon-bakteriyofaj etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla tekli solüsyon-bakteriyofaj etkisinin incelenmesi için aşağıda verilen konsantrasyonlarda altı farklı kimyasal kullanılarak solüsyon hazırlanmıştır. İlgili solüsyonlar % 10 bakteriyofaj (h/h) ( $3,4 \times 10^{11}$  POB/ml stok) içerek şekilde hazırlanmış olup,  $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 2, 4 ve 6 saat süre ile bakteriyofaj titre sayımı gerçekleştirilmiştir.

- (i) % 10, % 15 ve % 20 (a/h) sakkaroz;
- (ii) % 10, % 15 ve % 20 (h/h) gliserol;
- (iii) % 10, % 15 ve % 20 (h/h) sorbitol,
- (iv) % 10, % 15 ve % 20 (a/h) sığır serum albumini,
- (v) % 10, % 15 ve % 20 (a/h) pastörize yumurta beyazı tozu,
- (vii) % 10, % 15 ve % 20 (a/h) peynir altı suyu protein konsantratu.

İkili solüsyon-bakteriyofaj etkisinin sığır serum albumini ve gliserol karışımlarında incelenmesi için Çizelge 3.1’de verilen konsantrasyonlarda altı farklı kimyasal kullanılarak solüsyon hazırlanmıştır. İlgili solüsyonlara % 10 (h/h) ( $3,1 \times 10^{11}$  POB/ml stok) bakteriyofaj içerecek şekilde hazırlanmış olup,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ’de 2, 4 ve 6 saat süre ile bakteriyofaj titre sayımı gerçekleştirilmiştir. Bakteri ve bakteriyofaj sayım deneyleri dört paralel petri ekimi şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. İkili solüsyon-bakteriyofaj etkisinin incelenmesi sığır serum albumini ve gliserol ile oluşturulan formülasyonlar

<b>Solüsyon numarası</b>	<b>Köpükleştirici ajan</b>	<b>Stabilizör</b>
1	% 10 (a/h) sığır serum albumini	% 10 (h/h) gliserol
2	% 15 (a/h) sığır serum albumini	% 10 (h/h) gliserol
3	% 20 (a/h) sığır serum albumini	% 10 (h/h) gliserol
4	% 10 (a/h) sığır serum albumini	% 15 (h/h) gliserol
5	% 15 (a/h) sığır serum albumini	% 15 (h/h) gliserol
6	% 20 (a/h) sığır serum albumini	% 15 (h/h) gliserol
7	% 10 (a/h) sığır serum albumini	% 20 (h/h) gliserol
8	% 15 (a/h) sığır serum albumini	% 20 (h/h) gliserol
9	% 20 (a/h) sığır serum albumini	% 20 (h/h) gliserol

İkili solüsyon-bakteriyofaj etkisinin sığır serum albumini ve sakkaroz karışımlarında incelenmesi için Çizelge 3.2’de verilen konsantrasyonlarda altı farklı kimyasal kullanılarak solüsyon hazırlanmıştır. İlgili solüsyonlara % 10 (h/h) ( $6 \times 10^{10}$  POB/ml stok) bakteriyofaj içerecek şekilde hazırlanmış olup,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ’de 2, 4 ve 6 saat süre ile bakteriyofaj titre sayımı gerçekleştirilmiştir. Bakteri ve bakteriyofaj sayım deneyleri dört paralel petri ekimi şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. İkili solüsyon-bakteriyofaj etkisinin incelenmesi sığır serum albumini ve sakkaroz ile oluşturulan formülasyonlar

<b>Solüsyon numarası</b>	<b>Köpükleştirici ajan</b>	<b>Stabilizör</b>
1	% 10 (a/h) sığır serum albumini	% 10 (a/h) sakkaroz
2	% 15 (a/h) sığır serum albumini	% 10 (a/h) sakkaroz
3	% 20 (a/h) sığır serum albumini	% 10 (a/h) sakkaroz
4	% 10 (a/h) sığır serum albumini	% 15 (a/h) sakkaroz
5	% 15 (a/h) sığır serum albumini	% 15 (a/h) sakkaroz
6	% 20 (a/h) sığır serum albumini	% 15 (a/h) sakkaroz
7	% 10 (a/h) sığır serum albumini	% 20 (a/h) sakkaroz
8	% 15 (a/h) sığır serum albumini	% 20 (a/h) sakkaroz
9	% 20 (a/h) sığır serum albumini	% 20 (a/h) sakkaroz

#### 3.1.2.4. Proses Koşullarının İncelenmesi

Vakumla köpük kurutma için sığır serum albumin kullanılarak gliserol ve sakkaroz ile oluşturulan farklı formülasyonları üç farklı proses koşulunda gerçekleştirilen kurutma sonunda bakteriyofaj titresindeki etkisi incelenmiştir. Kullanılan solüsyonlar fosfat tamponu ile hazırlanmıştır (Çizelge 3.3). İlgili solüsyonların herbiri % 10 (h/h) ( $6 \times 10^{10}$  POB/ml stok) bakteriyofaj içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3. Köpük formülasyonları

<b>Solüsyon</b>	<b>Köpükleştirici ajan</b>	<b>Stabilizör</b>
A	% 10 (a/h) sığır serum albumini	% 10 (h/h) gliserol
B	% 15 (a/h) sığır serum albumini	% 10 (h/h) gliserol
C	% 20 (a/h) sığır serum albumini	% 10 (h/h) gliserol
D	% 10 (a/h) sığır serum albumini	% 10 (h/h) sakkaroz
E	% 15 (a/h) sığır serum albumini	% 10 (h/h) sakkaroz
F	% 20 (a/h) sığır serum albumini	% 10 (h/h) sakkaroz

Köpük yapımı aşamasında manuel bir el çırpıcısı (Homend, Karaca, İstanbul, Türkiye) kullanılmıştır. Solüsyon A, B, C, D, E, F el çırpıcısı yardımı ile 20 dakika boyunca stabil köpük oluşumu sağlanan kadar çırpma işlemi gerçekleştirilmiştir. Karşılaştırılabilir koşullarda köpük üretebilmek için her numune için 100 ml çözelti hazırlanmıştır. Hemen ardından yaklaşık 2 g köpük, d = 90 mm, h = 15,9 mm cam petriye yavaşça aktarılır. Daha sonra numune hemen vakum etüvde (OV-12, Jeiotech, Kore) Çizelge 3.4'te belirtilen sıcaklık ve basınç parametrelerinde üç farklı kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kurutma bitişi ardışık tartımlar arası anlamlı ağırlık kaybı görülmeyen süre belirlenerek (örneklerin sabit tartıma ulaşması ile) sonlandırılmıştır. Köpük oluşumu sonrası yaş köpük ve kurutma sonrası cam petri içeriği 100 ml fizyolojik tuzlu su (FTS) ile çözündürülmüş ve bakteriyofaj titre sayımı aşamasına geçilmiştir.

Çizelge 3.4. Proses koşulları

Proses Numarası	Vakum (MPa)	Sıcaklık (°C)	Süre (sa)
Proses I	0,02	35	4
Proses II	0,06	35	5
Proses III	0,02	25	8

### 3.1.3. İstatistiksel Analizler

Bu kapsamda gerçekleştirilen istatistiksel analizler: (i) farklı kriyoprotektan ve ekspiyan çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilen liyofilizasyon ve püskürtmeli kurutma işlemlerinin bakteriyofaj titresine etkisinin incelenmesi, (ii) farklı konsantrasyonlarda farklı kriyoprotektan ve ekspiyanlara sahip liyofilizasyon ve püskürtmeli kurutma ile kurutulmuş bakteriyofaj tozlarının  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de depolama süresince bakteriyofaj titresinin belirlenmesi, (iii) vakum köpük kurutma prosesinde bakteriyofaj canlılığına kimyasalların etkisinin incelenmesi, (iv) vakum köpük kurutma prosesinde bakteriyofaj canlılığına proses parametrelerinin (vakum ve sıcaklık) etkisinin incelenmesidir. Sonuçlar ortalama değerler olarak sunulmuş ve hata çubukları, elde edilen sonuçların standart sapma değerlerini temsil etmektedir. Numune gruplarının ortalamaları,  $p < 0,05$ 'te Fisher's en küçük önemli fark (Fisher's least significant difference (LSD)) tek yönlü ANOVA (Minitab 19.1.1, Minitab LLC, Birleşik Krallık) kullanılarak karşılaştırılmıştır.



## 3.2. Bakteriyofaj Preparatlarının Gıdalarda Kullanımı

### 3.2.1. Tavuk Etinde *Salmonella*'ya Karşı Liyofilizasyon ve Püskürtmeli Kurutma ile Hazırlanan Bakteriyofaj Tozlarının Kullanımı

Çiğ tavuk göğüs eti, deney günü Ankara'da bir marketten satın alınmıştır. Olası *Salmonella* varlığını ortadan kaldırmak için 5 dakika süreyle 50 ppm serbest klor çözeltisi ve ardından üç kez 5 dakika süreyle steril damıtılmış su yıkanmıştır [272]. Çiğ tavuk göğüs eti aseptik olarak yaklaşık 5x5 cm<sup>2</sup>'lik parçalar halinde kesilmiştir.

Çiğ tavuk eti örneklerinde *Salmonella* varlığı ISO 6579-1:2017 yöntemi kullanılarak taranmıştır [273]. Kısaca, 25 g tavuk eti numunesi, 225 ml tamponlu pepton içeren filtreli steril bir stomacher torbasına aseptik olarak yerleştirilmiş. 2 dakika boyunca torbanın dış yüzeyinden el masajı ile homojen hale getirildikten sonra 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir. Ön zenginleştirmeden sonra, tamponlu pepton içeren numuneden 0,1 ml ve 1 ml Rappaport Vassiliadis soya pepton sıvısına (RV; CM0866, Oxoid, Ottawa, Kanada) aktarılmıştır ve 37°C birincil zenginleştirme için 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonrası 20 µl örnek XLD agar (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) üzerine inoküle edilmiştir. 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra incelenen plakalarda *Salmonella* için tipik kolonilerin bulunmaması, numunelerin *Salmonella* içermediğini göstergesi olarak kullanılmıştır. Bakteri ve bakteriyofaj sayım deneyleri dört paralel petri ekimi şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Liyofilizasyon çalışması kapsamında, daha önce en başarılı kriyoprotektan olarak seçilen, liyofilize 0,3 M sakkaroz jelatin karışımı tozu (bakteriyofaj kokteyli içeren ve içermeyen) kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktiviteyi değerlendirmek için üç farklı liyofilize bakteriyofaj tozu kullanılmıştır. Bunlar; (i) taze hazırlanmış bakteriyofaj tozları, (ii) 4±1°C'de 10 ay depolanmış bakteriyofaj tozları ve (iii) 25°C'de 10 ay depolanmış bakteriyofaj tozlarıdır. Tüm denemelerde et örnekleri, suni aşılama sonrası tavuk eti üzerinde hücre adaptasyonu için 25°C'de 10 dakika bekletilmiştir.

Püskürtmeli kurutma çalışması kapsamında, daha önce en başarılı eksipiyan olarak seçilen, püskürtmeli kurutma ile elde edilen % 15 maltodekstrin ve % 5 kazein tozları (bakteriyofaj kokteyli içeren ve içermeyen) kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktiviteyi

değerlendirmek için üç farklı liyofilize bakteriyofaj tozu kullanılmıştır. Bunlar; (i) taze hazırlanmış % 15 maltodekstrin ve % 5 kazein içeren bakteriyofaj tozları, (ii)  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay depolanmış % 15 maltoz içeren bakteriyofaj tozları ve (iii)  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay depolanmış % 5 kazein içeren bakteriyofaj tozlarıdır. Tüm denemelerde et örnekleri, suni aşılama sonrası tavuk eti üzerinde hücre adaptasyonu için  $25^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika bekletilmiştir.

Her iki çalışma için ayrı ayrı üç farklı deney düzeneği tasarlanmıştır. Başlangıç seviyesi  $10^4$ ,  $10^5$  ve  $10^6$  KOB/ml olan *S. Enteritidis* ve *S. Typhimurium* karışımı, MOI 100 ve 1000 sağlayacak şekilde et yüzeyine suni aşılanmıştır. Toz bakteriyofaj kokteyli çığ tavuk etinin her yerine eşit olarak serpilmiştir. İki farklı kontrol numunesi hazırlanmıştır. Bunlar; (i) liyofilize toz ile muamele edilmemiş *Salmonella* aşılanmış et numuneleri (Kontrol A) ve (ii) bakteriyofaj kokteyli içermeyen liyofilize ve püskürtmeli kurutma ile kurutulmuş duvar malzemesi tozu ile işleme tabi tutulmuş *Salmonella* aşılanmış et numuneleri (Kontrol B). İşlem uygulanmış ve kontrol olarak kullanılan et örnekleri polistiren plakalar üzerine yerleştirilmiş (Şekil 3.1) ve  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de (bağıl nem  $\sim 90\%$ ) depolanmıştır. 0-6 gün süresince *Salmonella* bakteri sayısı ve bakteriyofaj titresi belirlenmiştir. Her deney iki paralel halinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Polistiren plaka üzerine yerleştirilmiş tavuk eti örnekleri

### **3.2.1.1. İstatistiksel Analizler**

Bu deney kapsamında gerçekleştirilen istatistiksel analizler, püskürtmeli kurutma ve liyofilizasyon sonucu elde edilen bakteriyofaj tozlarının  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de depolanan tavuk etinde *Salmonella* üzerine etkisinin incelenmesi ve bakteriyofaj titresinin belirlenmesidir. Sonuçlar ortalama değerler olarak sunulmuş ve hata çubukları, elde edilen sonuçların standart sapma değerlerini temsil etmektedir. Numune gruplarının ortalamaları,  $p < 0,05$ 'te Fisher's LSD tek yönlü ANOVA (Minitab 19.1.1, Minitab LLC, Birleşik Krallık) kullanılarak karşılaştırılmıştır.

### **3.2.2. Çileklerde *Salmonella*'nın Biyokontrolü için Bakteriyofaj Tabanlı Yenilebilir Kaplamaların İncelenmesi**

#### **3.2.2.1. Kimyasal Malzemeler**

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır. Bu çalışmada deiyonize (DI) su kullanılmıştır. Mikrobiyal analizde CASO Broth (Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Almanya) ve XLD (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) kullanılmıştır. Daldırma kaplama uygulamaları için yerel bir üreticiden (Tekirdağ, Türkiye) peynir altı suyu konsantresi (WPC) ve gliserol (Merck Millipore Corporation), orta moleküler ağırlıklı kitosan (CH), karboksimetil selüloz (CMC) ve sodyum aljinat (SA) kullanılmıştır (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD). Titre edilebilir asitliği (TA) belirlemek için sodyum hidroksit (NaOH) ve fenolftalein kullanılmıştır (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD).

#### **3.2.2.2. Meyve Temini**

Çilekler deney günü Ankara'da bulunan yerel marketten temin edilmiştir. Görünür bir fiziksel hasar veya çürüme olmayan, benzer boyut ve ağırlıktaki meyveler dikkatlice seçilmiştir. Yenilebilir kaplama uygulamasından önce, çilekler rastgele dört gruba ayrılmıştır. Bunlar (i) işlenmemiş numuneler, (ii) kaplanmamış ve bakteri kokteyli aşılansmış numuneler, (iii) bakteriyofaj yüklü biyopolimerler (peynir altı suyu proteini konsantresi, karboksimetil selüloz, kitosan, sodyum-aljinat) ile kaplanmış numuneler ve (iv) bakteriyofaj içermeyen biyopolimerlerle kaplanmış numunelerdir.

### 3.2.2.3. Kaplama Fomülasyonlarının Hazırlanması

Bakteri suşları ve bakteriyofaj kokteylinin hazırlanması başlık 3.1.1.2’de verilmiştir. Peynir altı suyu proteini konsantresi, karboksimetil selüloz, kitosan ve sodyum-aljinat solüsyonları sırasıyla Soazo ve ark. [274], Maftoonazad ve ark. [275], Han ve ark. [276] ve Şentürk Parreidt ve ark. [277] tarafından yapılan çalışmalardan bazı değişikliklerle hazırlanmıştır. Bakteriyofaj içermeyen yenilebilir kaplama, dört farklı biyopolimer için ayrı ayrı hazırlanmış ve kontrol olarak kullanılmıştır.

Peynir altı suyu proteini konsantre solüsyonu, % 10 (a/a) olacak şekilde hazırlanmış ve yaklaşık 30 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra çözelti 90°C’lik su banyosuna yerleştirilmiştir. Takiben karışıma 3:1 (a/a) peynir altı suyu proteini konsantresi içerisine gliserol ilave edilmiştir. Daha sonra çözelti bir homojenizatör (Heidolph Silent Crusher M, Almanya) ile 90°C’de ve 9500 rpm’de 4 dakika homojenize edilmiştir. Çözelti daha sonra 5-10 dakika buz banyosunda tutulmuştur. Karboksimetik selüloz, 1 g karboksimetil selüloz tozunun 100 mL 80°C su içinde manyetik karıştırma altında 2 saat çözündürülmesiyle (% 1,0 a/h) hazırlanmıştır. Kitosan çözeltisi, % 1 (h/h) asetik asit içeren damıtılmış suda % 2 kitosan (a/h) kullanılarak hazırlanmıştır. Daha sonra karışıma % 50 (h/h) gliserol ve % 0,2 (h/h) Tween 80 eklenmiştir. Sodyum aljinat (% 1,25 a/a), tam çözünme elde edilene kadar 70°C’de manyetik karıştırma kullanılarak 500 rpm’de sürekli karıştırılarak deiyonize su içinde çözülmüştür. Çözeltiye % 2 gliserol (a/a) ve % 0,2 (a/a) Tween 80 eklenmiştir.

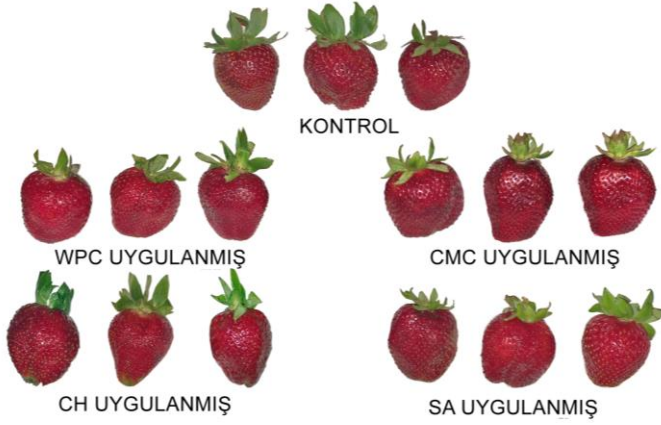
Tüm kaplama solüsyonları 5 dakika 5000 rpm’de homojenizatörde (Heidolph Silent Crusher M, Almanya) yardımı ile homojen edilmiştir. Bakteriyofaj kokteyli kaplama solüsyonlarına  $10^8$  KOB/ml konsantrasyonlarda ilave edilmiştir. Daha sonra film solüsyonunda bakteriyofajların eşit dağılımını sağlamak için yavaş bir karıştırma işlemi uygulanmıştır. Daha sonra ultrasonik banyo kullanılarak tüm çözeltilerin gazı giderilmiştir.



Şekil 3.2. Kaplama için hazırlanan çilek örnekleri

#### 3.2.2.4. Çileklerin Kaplanması

Çilekler musluk suyu ile yıkanarak üzerlerine yapışan partiküller uzaklaştırılmış ve daha sonra kağıt mendil ile yüzeylerine zarar vermeden nazikçe kurutulmuştur. Çilek örnekleri, bakteri aşılması için 5 dakika *Salmonella* karışımı içeren bir solüsyona daldırılmıştır. Aşılana çilek örnekleri yavaşça solüsyondan çıkarılmış ve oda sıcaklığında 15 dakika havayla kurutulmuştur. Daha sonra örnekler bakteriyofaj içeren ve bakteriyofaj içermeyen kaplama solüsyonlarında 5 dakika bekletilmiştir. Kaplama çözeltisine tamamen daldırılmış ve fazla çözeltiden arındırmak için yavaşça dışarı çekilmişlerdir. Kontrol ve kaplanmış çilek örneklerinin görünümü Şekil 3.2’de verilmiştir. Tüm çilekler, sıfırıncı gün olarak adlandırılan aynı günde kaplanmıştır. Depolama çalışması, ağzı açık olarak polistren kaplara tek sıra halinde yerleştirilen çilek örnekleri ile buzdolabı ortamında ( $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ , bağıl nem  $\sim\% 90$ ) 5 gün boyunca gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. Kaplama sonrası çilek örnekleri

### 3.2.2.5. Mikrobiyal Analizler

Bakteriyofaj kaplamaların *Salmonella* aşılansmış çilekler üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini değerlendirmek için 5 gün boyunca saklanan çilek numuneleri üzerinde günlük analizler yapılmıştır. Aşılansmış çileklerin mikrobiyolojik analizi, 5 günlük buzdolabında saklamanın ardından tüm numuneler için yapılmıştır. Örnekler 25 ml FTS (% 0,85 (a/h) NaCl) içeren Stomacher torbalarına yerleştirilmiş ve Stomacher 400 sirkülatör (Seward, Birleşik Krallık) kullanılarak 250 rpm'de 1 dakika işlem uygulanmıştır. Oluşan karışımından 1 ml steril bir Eppendorf'a aktarılmış ve 12500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatant, bakteriyofaj titresinin belirlenmesi için steril Eppendorf'a aktarılmıştır. Peletler, steril FTS kullanılarak seri ondalık seyreltmeler yapılmıştır. 100 µl'lik alikotlar XLD agar üzerine kaplanmış ve aerobik koşullar altında 37°C'de 24 sa inkübe edilmiştir. Ayrıca standart çift katmanlı agar tekniği kullanılarak süspansiyonlardan bakteriyofaj titresini belirlenmiştir. Tüm deneyler üç paralel halinde gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.2.6. Çilek Örneklerinin Fizikokimyasal Analizleri

Tüm çileklerin buzdolabında saklama sırasındaki renk değerleri, HunterLab (Reston, VA, ABD) kullanılarak  $L^*$ ,  $a^*$  ve  $b^*$  değerleri ölçülerek değerlendirilmiştir. Bu çalışmada açıklık (lightness ( $L^*$ )) ve renklilik parametreleri  $a^*$  (kırmızı-yeşil) ve  $b^*$  (sarı-mavi) ölçülmüştür. Numuneler üç paralel halinde analiz edilmiştir. Beyaz indeks (WI), sarı

indeks (YI), renk farklılıkları ( $\Delta E$ ), kroma (C) ve Hue (H) değerleri aşağıda verilen eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır [278, 279].

$$E = \sqrt{(\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})} \quad \text{Eşitlik 3.1}$$

$$C = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad \text{Eşitlik 3.2}$$

$$H = \tan^{-1}(b^*/a^*) \quad \text{Eşitlik 3.3}$$

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad \text{Eşitlik 3.4}$$

$$YI = 142,86 \times \frac{b^*}{L^*} \quad \text{Eşitlik 3.5}$$

pH ve titrasyon asitliğini (TA) (% sitrik asit) belirlemek için 25 ml deiyonize suya yaklaşık 5 g çilek örneği ilave edilerek çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra 50 ml'lik son hacme kadar deiyonize su ilave edilmiş ve çilekler bir karıştırıcı ile homojenleştirilmiştir. Elde edilen homojenat Whatman 42 filtre kağıdından süzülmüştür. Daha sonra dijital pH metre (Mettler Toledo, Greifensee, İsviçre) ile pH ölçümü yapılmıştır. Titrasyon asitliği analizinde indikatör olarak fenolftalein kullanılarak süzüntünün 0,1 N NaOH'ye karşı titre edilmesiyle belirlenmiştir [280].

### 3.2.2.8. İstatistiksel Analizleri

Bu çalışmada, tüm deneyler üç paralel halinde gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ortalama değerler olarak sunulmuş ve hata çubukları elde edilen sonuçların standart sapmalarını göstermektedir. Örnek gruplarının ortalamaları, her grupta n=3 gözlem (üç bağımsız deney) ile her örnekleme zamanında  $p < 0,05$ 'te Fisher's LSD tek yönlü ANOVA (Minitab 19.1.1, Minitab LLC, Birleşik Krallık) kullanılarak karşılaştırılmıştır.

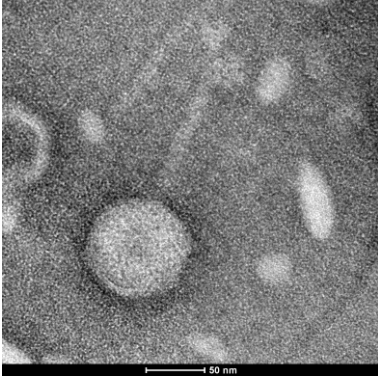
## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Mevcut tez çalışması, iki temel başlıkta özetlemiştir; bu kapsamda i) dondurarak kurutma (liyofilizasyon), püskürtmeli kurutma ve vakum köpük kurutma yöntemleri ile bakteriyofajların kurutulması, kurutma proses etkisinin izlenmesi ve depolama stabilitesinin incelenmesi, ii) kuru toz formda ve film formda hazırlanan bakteriyofaj preparatlarının, hayvansal ve bitkisel gıdalar üzerindeki etkinliğinin incelenmesidir. Bu kapsamda,  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 12 ay boyunca depolanan farklı kriyoprotektanlar ile dondurarak kurutma işlemi, farklı eksipiyenler ile püskürtmeli kurutma işlemi ve vakum köpük kuruma işlemi gerçekleştirilmiş, bakteriyofaj tozlarının proses kayıpları, kısa ve uzun vadeli depolama stabilitesini karşılaştırmalı olarak değerlendirmiştir. Tez çalışmasının ikinci bölümünde, kuru toz formda ve film formda hazırlanan bakteriyofaj preparatlarının hayvansal ve bitkisel gıdalar üzerindeki etkinliğinin incelenmiştir. Bu kapsamda, katı ve sıvı formlar arasında bir fiziksel form ile gıdalarda patojen kontrolü için yenilebilir kaplamaların bakteriyofajlar ile yüklenmesi ile depolama sürecinde gıdanın fizikokimyasal ve mikrobiyal özelliklerindeki değişimler araştırılmıştır.

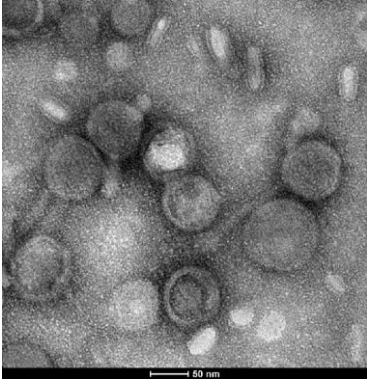
### 4.1. Bakteriyofajların Genel Özellikleri

Bu çalışma kapsamında kullanılan *S. Enteritidis* F5-4, *S. Typhimurium* L2-1 ve *S. Typhimurium* ICB1-1 bakteriyofajları, Ankara çevresindeki göllerden izole edilmiş ve önceki çalışmalarda kısmen karakterize edilmiştir. İlgili bakteriyofajlar için kullanılan konakçılar ise *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovarları Enteritidis (ATCC BAA-1045) ve Typhimurium (ATCC BAA-190). *S. Enteritidis* F5-4 (Şekil 4.1), *S. Typhimurium* L2-1 (Şekil 4.2) ve *S. Typhimurium* ICB1-1 (Şekil 4.3) bakteriyofajlarına ait TEM görüntüleri incelendiğinde, bakteriyofajın bir ikosahedral baş ve uzun, esnek bir kuyruğa sahip olduğunu görülmektedir.





Şekil 4.1. *S. Enteritidis* F5-4 bakteriyofajına ait TEM görüntüsü



Şekil 4.2. *S. Typhimurium* L2-1 bakteriyofajına ait TEM görüntüsü



Şekil 4.3. *S. Typhimurium* ICB1-1 bakteriyofajına ait TEM görüntüsü

*S. Enteritidis* F5-4, *S. Typhimurium* L2-1 ve *S. Typhimurium* ICB1-1 bakteriyofajları sırasıyla İlhan ve ark., Evran ve ark., Acar-Soykur ve ark. tarafından izole edilmiştir [266, 267]. Bakteriyofajların konak aralığı, literatürde en yaygın kullanılan yöntemlerden biri olan nokta testi kullanılarak belirlenmiş ve Çizelge 4.1’de gösterilmiştir [265-267, 281].

Çizelge 4.1. Bakteriyofajların konakçı aralığı

Bakteri suşları	Litik aktivite		
	S.	S.	S.
	Enteritidis F5-4	Typhimurium L2-1	Typhimurium ICB1-1
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC BAA-1045	++	++	+++
<i>Salmonella</i> Enteritidis FRC	++	++	++
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium IC	+	++	+++
<i>Salmonella</i> sp (enteritidis) 25089078 (PX) MLD	++	++	++
<i>Salmonella</i> sp (enterica st Anatum) 11 LAL	++	++	++
<i>Salmonella</i> sp (choleraesuis) 08 LAL	+	+++	++
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC BAA- 190	+	+	+++
<i>Escherichia coli</i> K12	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> DSM 682 DSM	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> DH5alpha BRL	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-
<i>Enterococcus italicus</i>	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	-	-	-

++: tam lizi; +: zayıf liziz; -: liziz yok

İlhan ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışma kapsamında, kullanılan *S. Enteritidis* F5-4 bakteriyofajının *Salmonella* spp.'e yüksek oranda özgül olduğu ve *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Streptococcus pyogenes* gibi test edilen diğer 11 suşa karşı herhangi bir litik aktivite göstermediği belirlenmiştir. *S. Enteritidis* F5-4'ın, farklı *S. Enteritidis* suşları üzerinde test edildiğinde tamamen berrak bölgeler gözlemlendiği, *S. Typhimurium* gibi diğer *Salmonella* suşları ile arka planı puslu ve dolayısıyla biraz daha zayıf lizizli bölgeler elde edildiği rapor edilmiştir [267]. Evran ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışma kapsamında, kullanılan beş farklı *Salmonella* serovarından hiçbirinin *S. Typhimurium* L2-1'a dirençli olmadığı rapor edilmiştir. *S. Typhimurium* L2-1'nin üç konakçıda (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* IC ve *S. Typhimurium*) açık plak oluşumu gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca Evran ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada, kullanılan *S. Typhimurium* L2-1 bakteriyofajının *Salmonella* dışında bakterileri (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* vb.) lize etmediği belirtilmiştir [266]. Acar-Soykut ve ark. tarafından yapılan çalışma kapsamında, kullanılan beş farklı *Salmonella* serovarından hiçbirinin *S. Typhimurium* ICB1-1 fajına karşı dirençli olmadığı ve kullanılan *Salmonella* spp. dışındaki bakterileri (*M. luteus*, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* vb.) lize edemediği rapor edilmiştir [281].

*S. Enteritidis* F5-4 bakteriyofajına ait kafa çapı yaklaşık  $76,7 \pm 2,7$  nm ve kuyruk boyutu  $141,5 \pm 2,7$  nm olarak belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre yazarlar, *S. Enteritidis* F5-4'ın *Siphoviridae* familyasına ait bir üye olduğunu düşündüklerini belirtilmiştir [267]. *S. Typhimurium* L2-1 bakteriyofaj kafa çapı yaklaşık  $77,2 \pm 4,4$  nm ve kuyruk boyutu  $155,83 \pm 13,0$  nm olarak rapor edilmiştir [266]. *S. Typhimurium* ICB1-1 bakteriyofaj kafa çapı yaklaşık  $87,16$  nm ve kuyruk boyutu  $124,45$  nm olarak rapor edilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, bakteriyofaj *S. Typhimurium* ICB1-1'nin *Siphoviridae* familyasına ait olduğu sonucuna varıldığı bildirilmiştir [281].

İlhan ve ark., tarafından gerçekleştirilen çalışma kapsamında *S. Enteritidis* F5-4'ün adsorpsiyon oranı oldukça yüksek bulunmuş ve inkübasyonun ilk 5 dakikasında fajların % 95'inden fazlasının konak hücrelere adsorbe olduğu rapor edilmiştir. *S. Enteritidis* F5-4'ın latent periyodu ve patlama boyutu, tek adımlı büyüme eğrisi kullanılarak belirlenmiş ve *S. Enteritidis* F5-4'ün latent süresinin 25 dakika olduğu rapor edilmiştir. Ortalama

patlama boyutu, enfekte olmuş hücre başına 112 POB olarak hesaplandığı ve bakteriyofajın ortalama latent döneme ve nispeten büyük bir patlama boyutuna sahip olduğu rapor edilmiştir [267]. Evran ve ark. tarafından yapılan çalışma kapsamında, bakteriyofaj *S. Typhimurium* L2-1'nin *Siphoviridae* familyasına ait olduğu sonucuna varıldığı bildirilmiştir. Bakteriyofajın latent periyodu ve patlama boyutu, tek adımlı büyüme eğrisi kullanılarak belirlenmiş ve *S. Typhimurium* L2-1'nin latent süresinin 15 dakika olduğu, ortalama patlama boyutunun enfekte olmuş hücre başına 113 POB ve adsorpsiyon hızının  $2,92 \times 10^{-8}$  ml/dk olarak hesaplandığı rapor edilmiştir [266].

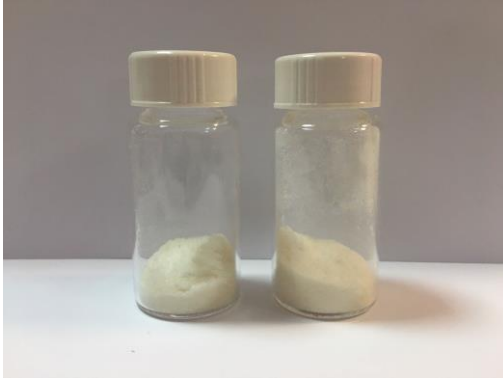
Bu çalışma kapsamında kullanılan *S. Enteritidis* F5-4, *S. Typhimurium* L2-1 ve *S. Typhimurium* ICB1-1 bakteriyofajlarına ilişkin genotoksisite kontrolü gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi sonucunda elde edilen ham baz dizilimleri oluşan pik ve karşılık gelen bazın doğruluğu kontrol edilmiş, yanlış okunan bazlar ya da okunamayan bölgeler dizilimden çıkarıldıktan sonra NCBI (National Center for Biotechnology Information) sayfasındaki Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ve Open Reading Frame Finder (ORF) araçları kullanılarak gen bankasında bulunan DNA ve protein dizilimleri ile elde edilen dizilimler hem nükleik ait hem de amino asit dizilimi olarak birbiriyle karşılaştırılmış ve toksin üretiminden sorumlu *stx1*, *stx2*, *hly*, *cdt*; lizogeni ve faj direnci ile ilişkilendirilen *sieA*, *int* ve *cl* gen bölgeleri için tarama yapıldığı ve *Salmonella* bakteriyofajlarında toksik gen bölgesine ve/veya lizogeni-faj direnci ile ilgili gen bölgelerine ya da uyuşan küçük bir bölge bile tespit edilmediği rapor edilmiştir.

## **4.2. Farklı Kurutma Yöntemleri ile Bakteriyofajların Kurutulması, Proses Kayıpları ve Depolama Stabilitesinin İncelenmesi**

### **4.2.1. Dondurarak Kurutma ile Bakteriyofajların Kurutulması ve Depolama Sırasında Etkinliğinin İncelenmesi**

Bu çalışmada, farklı kriyoprotektanlar (sakkaroz, mannitol, PEG 8000 ve sakkaroz jelatin karışımı) kullanılarak hazırlanan liyofilize bakteriyofaj tozlarının iki farklı sıcaklıkta ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$  ve  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) depolama etkinlikleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de liyofilizasyon ile üretilen toz örneklerin cam şişelerdeki görüntüleri verilmiştir. Liyofilize bakteriyofaj preparasyonları için seçilen kriyoprotektanlar, nispeten kolay elde edilebilmeleri, ucuz olmaları, gıdada kullanılabilir olmaları sebebiyle tercih edilmiştir. Literatürde diğer araştırmacılar tarafından

gerçekleştirilen bakteriyofaj liyofilizasyon çalışmaları farmasötik amaç üzerinde yoğunlaşmakla birlikte, agar üzerinde farklı kriyoprotektanların çeşitli konsantrasyonlarda bakteriyofaj titrelerinin belirlenmesi şeklinde rapor edilmiştir. Ancak liyofilize bakteriyofaj örneklerinin gıdalardaki antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar taze olarak hazırlanmış tozların kullanıldığı çalışmalar ile sınırlı olmakla birlikte depolanmış toz örneklerin gıdalar üzerindeki etkinliğinin incelendiği çalışma literatür çalışmalarında karşılaşılmamıştır. Bu sebeple bu çalışma kapsamında bilgimiz dahilinde ilk kez depolanmış liyofilize bakteriyofaj içeren tozların gerçek gıda maktriksindeki etkinliği ortaya konulmuştur.



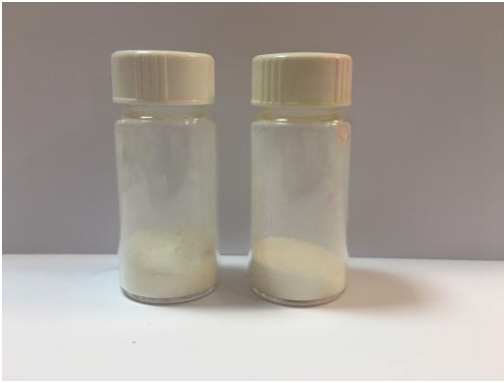
Şekil 4.4. Liyofilizasyon sonrası sakkaroz (0,3 M) örnekleri



Şekil 4.5. Liyofilizasyon sonrası sakkaroz (0,3 M) + %1 jelatin örnekleri



Şekil 4.6. Liyofilizasyon sonrası PEG (%1) örnekleri



Şekil 4.7. Liyofilizasyon sonrası mannitol (0,3 M) örnekleri

Liyofilizasyon işlemi sırasında, kullanılan tüm kriyoprotektanlar için bakteriyofaj titresinde 0,59-2,35 log POB arasında bir azalma gözlenmiştir (Çizelge 4.2). Liyofilizasyon proses koşullarında seçilen kriyoprotektan içerisinden en az bakteriyofaj titre kaybı 0,3 M sakkaroz jelatin karışımında gözlenmiştir. Benzer şekilde bu titre kaybındaki azalma en düşüğe olacak şekilde sakkaroz jelatin karışımları, sakkaroz çözeltileri, mannitol çözeltileri ve PEG 800 çözeltileri şeklinde elde edilmiştir. Literatürde liyofilizasyon işlemi sırasında bakteriyofaj aktivitesinde <1 log azalma gözlemlendiği rapor edilmiştir [282]. Bu durum farklı kriyoprotektanlar için farklı seviyelerde olması muhtemeldir. Bununla birlikte, önceki iki çalışma zıt sonuçlar göstermiş; Puapermpoonsiri ve ark. tarafından yapılan bir araştırma [207], daha yüksek sakkaroz konsantrasyonlarının bakteriyofaj titresinde azalmaya yol açtığını belirtilmiş iken ve Merabishvili ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada [205], bakteriyofaj aktivitesinin daha yüksek sakkaroz konsantrasyonlarında bile korunduğunu göstermiştir. Bu belirgin değişiklikler, liyofilizasyon sırasında kullanılan stabilizatörlerin farklı konsantrasyonlarından kaynaklanabilmekte ve ayrıca değişen morfolojilere sahip farklı

bakteriyofaj ailelerinin değişen stabiliteye sahip olduğuna ve kuyruklu fajların uzun süreli depolama sırasında daha kararlı oldukları olmalarına atfedilmektedir. Bu sebeple liyofilizasyon işleme tabi tutulacak bakteriyofajların genel olarak belirli kriyoprotektanlar ile çalışabileceği kanısı mutlaka her bir bakteriyofaj için bireysel olarak ürün ve konsantrasyon bazlı seçilerek test edilemelidir.

12 aylık depolama boyunca farklı kriyoprotektanların bakteriyofaj stabilitesi Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’da sunulmuştur. Bu stabilite ilk üç ay boyunca iki haftalık periyotlar ile daha sonraki süreçte ise aylık periyotlar ile titre sayımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre,  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ’de depolanan sıvı bakteriyofaj numuneleri sırasıyla 2,50 ve 4,62 log birim titre kaybı göstermiştir. Sıvı bakteriyofaj kokteyli, depolama sıcaklığından bağımsız olarak tüm liyofilize bakteriyofaj tozlarından önemli ölçüde daha yüksek titre kaybı ( $p<0,05$ ) sergilemiştir. 0,3 M sakkaroz jelatin karışımı kullanılarak hazırlanan liyofilize bakteriyofaj tozları,  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ’de sırasıyla 1,09 ve 2,79 log birim azalma ile 12 aylık depolama için en yüksek stabiliteyi gösterirken, geri kalan kriyoprotektanların daha az kararlı olduğu ve titrelerinde daha yüksek bir düşüş yaşandığı gözlenmiştir.

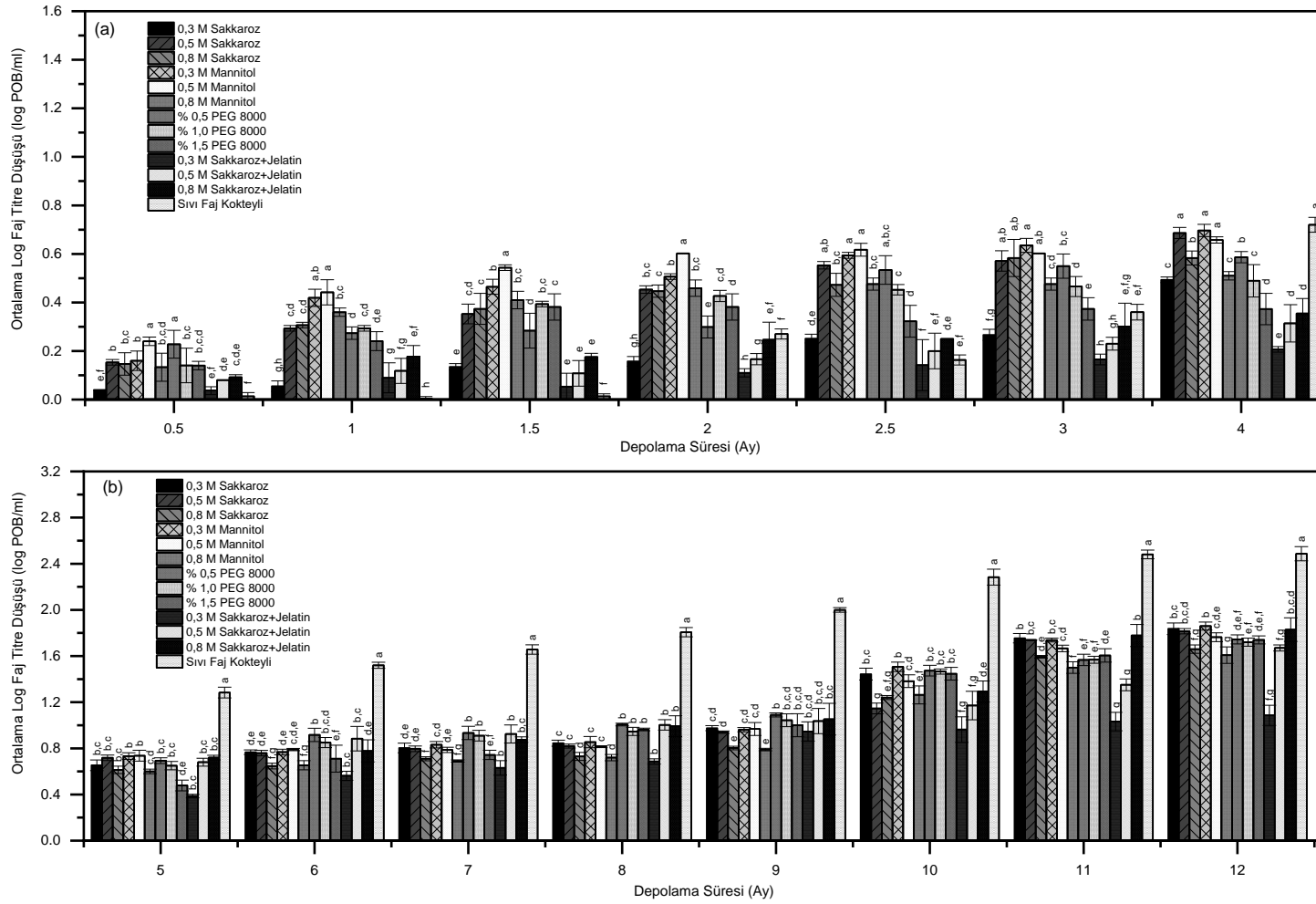
$4\pm 1^{\circ}\text{C}$ ’de mannitol konsantrasyonundaki artışla bakteriyofaj titrelerindeki düşüşün arttığı gözlenmiştir. Diğer kriyoprotektanlar arasında konsantrasyon ve titre kaybı arasında anlamlı bir korelasyon gözlenmemiş ve  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ’de önemli bir değişkenlik meydana gelmemiştir. Seçilen kriyoprotektanlardan,  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ’de bakteriyofaj yüklü 0,3 M sakkaroz jelatin karışımı, 12 ayda diğer kriyoprotektaanlara ve sıvı bakteriyofaj kokteyline göre önemli ölçüde daha az bakteriyofaj titre kaybı ( $p<0,05$ ) sergilemiştir.  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ ’de saklanan liyofilize bakteriyofaj tozları,  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ’de saklananlardan daha düşük titre kayıpları göstermiştir. Depolama koşullarından bağımsız olarak tüm formülasyonlarda zamanla bakteriyofaj sayılarında azalma gözlenmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı kriyoprotektanlar varlığında dondurarak kurutulmuş bakteriyofaj kokteylinin proses kayıpları

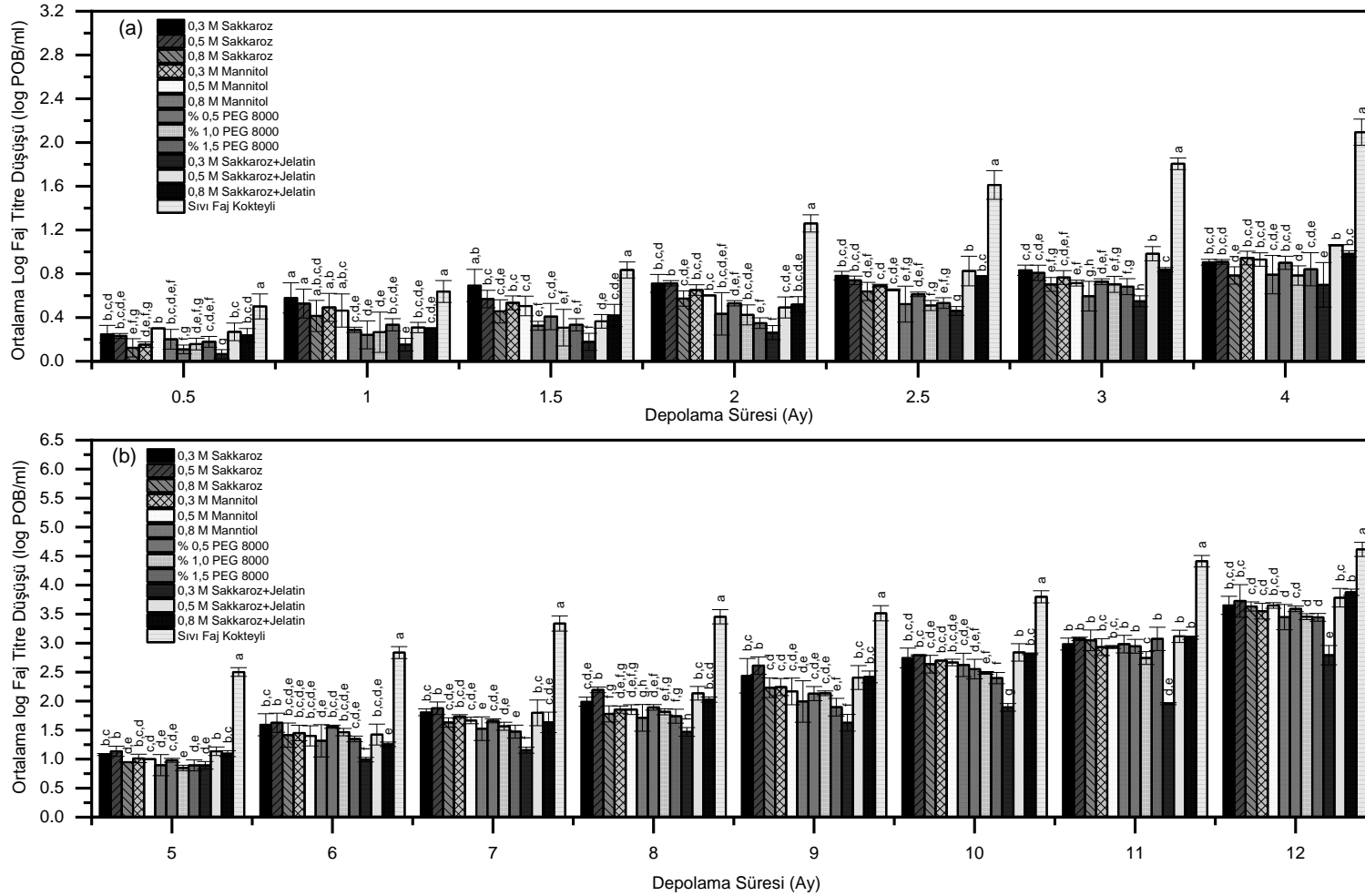
<b>Kriyoprotektanlar</b>	<b><math>t_1-t_0</math> (log POB)</b>
0,3 M Sakkaroz	0,80±0,06 <sup>d</sup>
0,5 M Sakkaroz	0,85±0,04 <sup>d</sup>
0,8 M Sakkaroz	0,98±0,05 <sup>c</sup>
0,3 M Mannitol	1,15±0,05 <sup>b</sup>
0,5 M Mannitol	1,02±0,03 <sup>c</sup>
0,8 M Mannitol	1,11±0,08 <sup>b</sup>
% 0,5 PEG 8000	2,31±0,03 <sup>a</sup>
% 1,0 PEG 8000	2,35±0,05 <sup>a</sup>
% 1,5 PEG 8000	2,31±0,08 <sup>a</sup>
0,3 M Sakkaroz + Jelatin	0,59±0,07 <sup>f</sup>
0,5 M Sakkaroz + Jelatin	0,62±0,05 <sup>f</sup>
0,8 M Sakkaroz + Jelatin	0,73±0,05 <sup>e</sup>

Başlağıç sıvı çözeltilde bulunan bakteriyofaj kokteyli 12,51 log POB. Sonuçlar, ortalama log faj titresinin kaybı olarak gösterilmiştir. Farklı üst simgelerle gösterilen sonuçlar, ilgili sütunlarda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklılık bulunduğunu göstermektedir ( $p<0,05$ ).





Şekil 4.8.  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 12 aylık depolama sırasında farklı kriyoprotektanların bakteriyofaj stabilitesi. (a) 0-4 ay (b) 5-12 ay. Her çubuktaki farklı harfler,  $p < 0,05$ 'te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farkı göstermektedir.



Şekil 4.9. 25±1°C’de 12 aylık depolama sırasında farklı kriyoprotektanların faj stabilitesi. (a) 0-4 ay (b) 5-12 ay. Her çubuktaki farklı harfler,  $p < 0,05$ ’te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farkı göstermektedir.

Liyofilizasyon çalışması kapsamında, seçilen kriyoprotektantlar için numune grubundaki en etkili örneklerin su aktivitesi ( $a_w$ ) (Çizelge 4.3) ve partikül boyutu analizi (Çizelge 4.4) yapılmıştır. Liyofilize bakteriyofaj tozlarının başlangıç  $a_w$  değeri 0,04-0,10 aralığında bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, 0,3 M sakkaroz jelatin karışımının en düşük  $a_w$  değerine sahip olduğunu ortaya konulmuştur. Düşük  $a_w$  değeri, bu liyofilize bakteriyofaj tozunun mikrobiyal büyüme açısından mikrobiyal güvenliğini ifade etmektedir [272]. Ortalama partikül çapları 328 nm ile 642,8 nm arasında elde edilmiştir. Önceki çalışmalarda farklı bakteriyofaj ve kriyoprotektantların kullanılması nedeniyle daha yüksek ortalama çap değerleri elde edilmiştir [207].

Çizelge 4.3. Liyofilize bakteriyofaj tozları için su aktivitesi

Örnekler	Su aktivitesi ( $a_w$ )	Sıcaklık (°C)
0,3 M Sakkaroz	0,0542±0,0027	25,03
% 1,0 PEG 8000	0,0971±0,0078	25,09
0,3 M Mannitol	0,1071±0,0064	25,11
0,3 M Sakkaroz + Jelatin	0,0442±0,0018	25,04

Çizelge 4.4. Liyofilize bakteriyofaj tozları için partikül boyutları

Örnekler	Ortalama partikül büyüklüğü (d.nm)	Ortalama polidispersite indeksi
0,3 M Sakkaroz	642,8±238,7	0,86±0,25
% 1,0 PEG 8000	570,6±384,1	0,67±0,15
0,3 M Mannitol	491,9±52,6	0,76±0,21
0,3 M Sakkaroz + Jelatin	328,7±133,9	0,91±0,16

Literatürdeki çalışmalarda, Skaradzińska ve ark., *E. coli*, *Salmonella* sp. ve *E. faecalis*'in liyofilizasyonu için yağsız süt tozu, sakkaroz ve ticari hayvan yemi katkı maddesi kullanmıştır. Yağsız süt tozu ve sakkaroz, liyofilizasyon sürecinde kriyoprotektan olarak umut verici bir potansiyel sergilediğini savunmuşlardır [283]. Merabishvili ve ark., *S aureus* faj ISP'nin liyofilizasyonu için farklı konsantrasyonlarda altı farklı stabilizatör kullanılmıştır [205]. Bu çalışmada 0,1 M mannitol kullanılarak liyofilizasyon sonrası dönemde bakteriyofaj aktivitesi gözlenmezken, 0,5 M mannitol kullanılarak liyofilizasyon sonrası bakteriyofaj titresinde 4 log azalma gözlemlendiği bildirilmiştir. Buna ek olarak sakkaroz ve trehalozun en iyi stabilize edici kriyoprotektanlar olduğunu gösterilmiştir. Ayrıca, ISP titresinde sırasıyla % 1 ve % 5 PEG 6000 preparatları için 1,8 ve 5,0 log düşüşler tespit edildiği bildirilmiştir. Zhang ve ark., liyofilize bakteriyofaj tozlarının stabilitesini araştırmış ve M13KE fajı için kriyoprotektan olarak trehaloz, mannitol, sakkaroz ve PEG 6000 kullanmışlardır. Trealoz ve sakkaroz içeren formülasyonların, mannitol ve PEG 6000 ile karşılaştırıldığında daha az titter kaybına sahip olduğunu bulmuşlardır [284]. Manohar ve ark., kriyoprotektan olarak glukoz, sakkaroz, jelatin, mannitol, polietilen glikol ve sorbitol kullanarak *Escherichia* faj ECP311, *Klebsiella* faj KPP235 ve *Enterobacter* faj ELP140 bakteriyofajlarını liyofilize etmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre liyofilizasyon işleminde sakkaroz, jelatin ve bunların kombinasyonlarının kullanımının faj canlılığının sürdürülmesi açısından daha faydalı olduğu sonucuna varılmıştır [282]. Gonzalez-Menendez ve ark., 24 ay boyunca farklı ekşiyanlar (0,8 M trehaloz, 0,8 M sakkaroz, % 15 gliserol veya %11 yağsız süt tozu) kullanarak liyofilize *Staphylococcus* fajlarının stabilitesini 4°C'de değerlendirmiştir. Sonuçlar, 0,8 M sakkaroz kullanımı ile depolama sırasında faj titrelerinde bir miktar düşüş gözlenmesine rağmen, bunun yine de etkili bir stabilizatör olduğunu ortaya koymuştur [285].

Liyofilizasyonda, farklı şekerler ve şeker alkollerini kriyoprotektan olarak kullanılmış ve farklı bakteriyofajlar yüksek düzeyde değişken hatta çelişkili aktivite derecelerine ait sonuçlar elde edilmiştir [201, 205, 207, 286]. Sakkaroz gibi disakkaritlerin, proteinleri doğal yapılarını korumaları için monosakkaritlerden daha fazla yapısal esnekliğe sahip olduğu bulunmuştur. Sakkaroz konsantrasyonunu liyofilize bakteriyofaj stabilitesi ile ilişkilendiren çalışmalarda görülen varyasyon, kriyoprotektanın bakteriyofaj koruma yeteneğinin bakteriyofaj tipine, fizikokimyasal özelliklere ve proses koşullarına bağlı

olabileceğini düşündürmektedir. Liyofilizasyonda kullanılan disakkaritler nedeniyle partiküllerin korunmasında bir artış beklenmesine rağmen [287], sakkaroz uygulamasının başarılı sonuçlar elde etmek için duruma bağlı optimizasyonlar gerektirdiği ileri sürülmüştür [283]. Bir diğer kriyoprotektan olan mannitol, hem sıvı hem de katı formdaki farmasötik formülasyonlarda yaygın olarak kullanılan bir kriyoprotektan olmasına rağmen, daha önceki çalışmalar, bakteriyofaj canlılığını korumadaki performansının oldukça sınırlı olduğunu bildirmiştir [205, 282]. Birden fazla yardımcı maddenin bir arada kullanıldığı sistemde ise başarılı sonuçlar elde edilebileceği gösterilmiştir [284].

Merabishvili ve ark. [205], *S. aureus* faj ISP'nin stabilitesini araştırdıkları çalışmada her ekspiyan 0,1 M veya 0,5 M konsantrasyonda: sakkaroz, trehaloz, mannitol, glisin ve polivinilpirolidon (PVP) ve PEG 6000 (% 1 ve % 5) için çalışma gerçekleştirmiş ve PVP, mannitol ve PEG 6000 ile hazırlanan örneklerin başarısız olduğunu rapor etmiştir. Bun karşın Yüksek konsantrasyonlarda (0,5 M) trehaloz ve sakkarozun faj ISP'si için en etkili dengeleyiciler olduğu bulmuştur. Polietilen glikol (PEG), protein stabilizasyonu için tercih edilen bir ürün olmasına rağmen, faj aktivitesini sürdürmede eşit derecede başarılı değildir [282, 288]. Hem % 1 hem de % 5 PEG 6000 ile hazırlanan formülasyonda liyofilizasyon sonrası 4°C'de 37 aylık depolama süresince ISP faj titresinde önemli bir azalma olduğu bir çalışmada bildirilmiştir [205]. Sakkaroz veya mannitol gibi şekerlerin kullanımıyla da başarılı sonuçlar bildirilmiştir [205, 207].

Manohar ve ark., tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada bakteriyofaj liyofilizasyonu için kullanımı uygun olmadığı rapor edilmiştir. PEG, liyofilizasyon sonrası bakteriyofaj aktivitesinde 4 log'dan daha fazla azalmaya neden olan bir polihidrik alkoldür, ancak PEG'nin diğer proteinler için etkili bir kriyoprotektan olduğu kabul edilmiştir. Genellikle PEG'in polar olmayan protein kalıntıları ile hidroPOBik etkileşimlere sahip olduğu ve bakteriyofaj partiküllerini çökeltebildikleri bulunmuştur, bu nedenle tek başına PEG, bakteriyofaj liyofilizasyonu için çok iyi bir ekspiyan olarak kabul edilemeyeceği rapor edilmiştir [288]. Jelatin, aşı ürünlerinde tipik protein stabilizatörü olduğundan, kuru faj formülasyonlarında kullanım için önemli bir ekspiyandır. Jelatinin liyofilizasyon çalışmalarında tam olarak açıklanmasa da başarılı bir yardımcı madde olduğu ileri sürülmüştür [207]. Puapermpoonsiri ve ark. [207] sakkaroz, PEG ve jelatinin, 30 günlük

bir süre boyunca *S. aureus* ve *P. aeruginosa* bakteriyofajının canlılığı üzerindeki etkisini değerlendiren çalışmada jelatinin, liyofilizasyonun ardından bakteriyofaj canlılığının korunmasında hiçbir rol oynamadığı bulunduğu raporlanmıştır. Manohar ve ark., tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise jelatinin incelenen üç faj türü için de iyi bir ekspiyan olduğu bulunmuştur (<2 log indirgemeyi kabulü ile). Araştırmacılar tarafından jelatinin liyofilizasyon sırasında kriyoprotektan olarak rolünün açık olmadığı belirtilmekte birlikte bakteriyofaj morfolojisini sürdürmeyi destekleyen polimerler oluşturabileceğine inanıldığı belirtilmiştir. Sırasıyla 0,5 M ve % 1'lik sakkaroz (disakkarit) ve jelatin (polimer) kombinasyonu ilk kez test edilmiş ve faydalı olduğu ortaya konulmuştur (<1 log azalma) [282]. Malenovská [208] yapısal olarak farklı hayvan virüslerinin liyofilizasyonu sırasında jelatin ile kombinasyon halinde sakkaroz ile iyi sonuçlar bildirmiştir. Ticari olarak temin edilebilen dondurularak kurutulmuş bir faj kokteylinin sakkaroz ve jelatin içermesi bu sebeple önem taşımaktadır [179].

Liyofilizasyonun çeşitli biyomateryalleri stabilize etmek için etkili bir teknoloji olmasına rağmen, kullanımı açısından uygulaması yüksek özgünlük göstermekte ve her bir bakteriyofajın ve kriyoprotektanın sonuçları kullanılan miktara, işlemeye, depolamaya ve diğer streslere bağlı olarak değişebilmektedir. Literatürdeki bilgiler ışığında, kullanılan bakteriyofajların özellikleri, seçilen kriyoprotektan maddenin konsantrasyonu ve liyofilizasyon prosesinin, liyofilize tozların aktivitesi üzerinde önemli etkileri olduğu ve sonuçların ürüne ve çalışmalara göre yüksek bireysellik gösterdiği sonucuna varılabilmektedir. Genel olarak, düşük sıcaklığın (4°C) bakteriyofaj depolaması için en uygun koşulu sağladığını göstermiştir. Oda sıcaklığında (25°C) depolama, bakteriyofaj yapısını bozabilecek termal kararsızlığa neden olabilmesi sebebiyle sınırlı ve değişken bir başarıya sahiptir.

Bu çalışma kapsamında bakteriyofaj koleksiyonumuzda bulunan *S. Enteritidis* F5-4, *S. Typhimurium* L2-1 ve *S. Typhimurium* ICB1-1 bakteriyofajları kullanılarak hazırlanan bakteriyofaj kokteylinin farklı kriyoprotektanlar ile gerçekleştirilen liyofilizasyon işleminden nasıl etkilendiği ve depolama süresince bakteriyofaj titresindeki kayıplar ortaya konulmuştur. Elde edilen liyofilize tozların aktiviteleri izlenmiş ve en başarılı kriyoprotektan, 4±1°C ve 25±1°C'de 12 aylık depolamada saklanan 0,3 M sakkaroz

jelatin karışımı olarak seçilmiştir. Bu çalışmada sakkaroz jelatin karışımı *Salmonella* bakteriyofajlarında yardımcı madde olarak ilk kez kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bakteriyofajların kurutulması üzerine yayınlanmış çalışmaların büyük çoğunluğunda ortak nokta gerçekleştirilcek proses koşullarının seçilen bakteriyofaja büyük bir spesiflik taşınması nedeniyle optimize edilmesi gerektiğidir. Bu sebeple farklı kurutma çalışmalarında kullanılan bakteriyofajların, seçilen kimyasalların ve konsantrasyonların, uygulanan proses koşullarının farklılığı çalışmaların birbirlerine ile kıyaslanabilirliğini önemli ölçüde azaltmaktadır. Bu durumun önüne geçmek için, çalışılacak bakteriyofaj için mutlaka proses koşulları ve kullanılacak kimyasalların optimize edilmesi gerekmektedir. Aynı şekilde depolama sürecindeki davranışlarında görülen değişkenlik sebebiyle her bakteriyofaj için ayrı ayrı çalışılması önerilmektedir. Liyofilize bakteriyofaj örneklerinde antimikrobiyal etkide gözlenen bu başarı, ticari preparasyon geliştirme, taşıma, kısa ve uzun süreli depolama açısından birçok avantajı beraberinde getirmektedir. Liyofilizasyon ile elde edilen etkinliğin artırılması için gıda tüketici kabul kriterlerini etkilemeyecek, kolay temin edilebilir ve ucuz yardımcı maddelerin optimum formülasyonuna yönelik çalışmalar teşvik edilmelidir.

#### **4.2.2. Püskürtmeli Kurutma ile Bakteriyofajların Kurutulması ve Depolama Sırasında Etkinliğinin İncelenmesi**

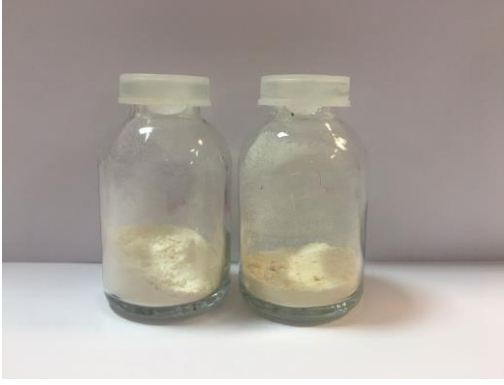
Bu çalışmada kapsamında dört farklı eksojen (mannitol, kazein, yağsız süt tozu ve maltodekstrin) kullanılarak hazırlanan püskürtmeli kurutma yöntemi ile kurutulmuş bakteriyofaj tozlarının depolama etkinlikleri  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Şekil 4.10 - Şekil 4.13 arasında püskürtülerek kurutulmuş bakteriyofaj tozlarının cam kaplardaki görselleri verilmiştir.



Şekil 4.10. Püskürtmeli kurutma sonrası kazein (% 10) örnekleri



Şekil 4.11. Püskürtmeli kurutma sonrası yağsız süt tozu (% 10) örnekleri



Şekil 4.12. Püskürtmeli kurutma sonrası mannitol (0,5 M) örnekleri





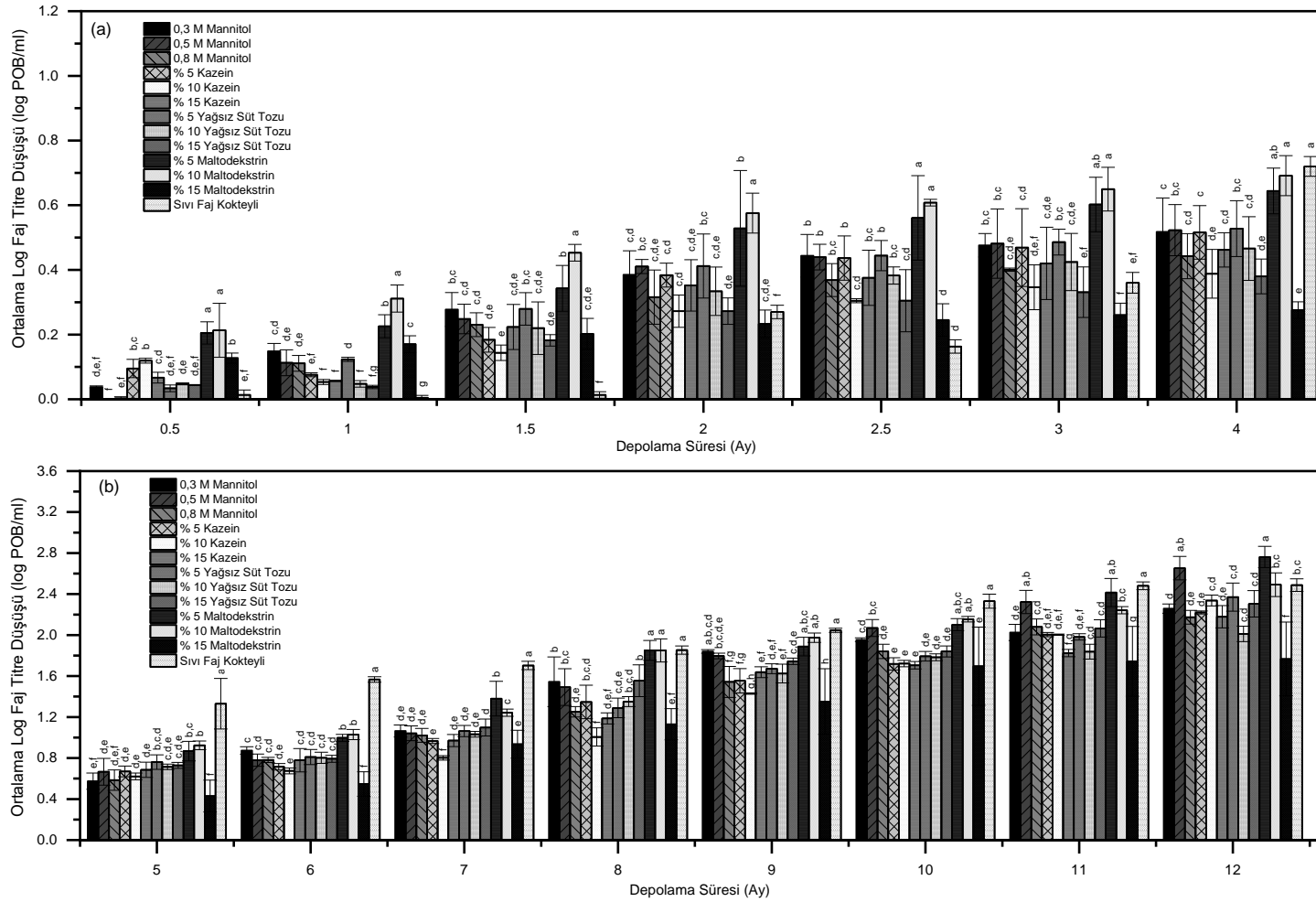
Şekil 4.13. Püskürtmeli kurutma sonrası maltodekstrin (% 15) örnekleri

Çalışma kapsamında seçilen ekspiyanlar, gıda ile uyumlu, nispeten kolay elde nedeniyle tercih edilmiştir. Seçilen yöntemin maliyetleri göz önünde bulundurularak nispeten ucuz ekspiyanlar tercih edilmeye çalışılmıştır. Daha önce diğer araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen çalışmalar, agar üzerinde farklı ekspiyanların çeşitli konsantrasyonlarında kullanımının fajların canlılığına olan etkisini bildirmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalar çoğunlukla farmasötik amaçlar için seçilen fajlar ve buna uyumlu ekspiyanlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Bildiğimiz kadarıyla bugüne kadar, gıdaların biyokontrolü için püskürtmeli kurutma ile kurutulmuş bakteriyofaj tozu kullanımına ilişkin bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu bilgiler doğrultusunda ilk kez taze ve depolanmış püskürtülerek kurutulmuş bakteriyofaj içeren tozların gerçek gıda matriksindeki etkinliği ortaya konulmuştur.

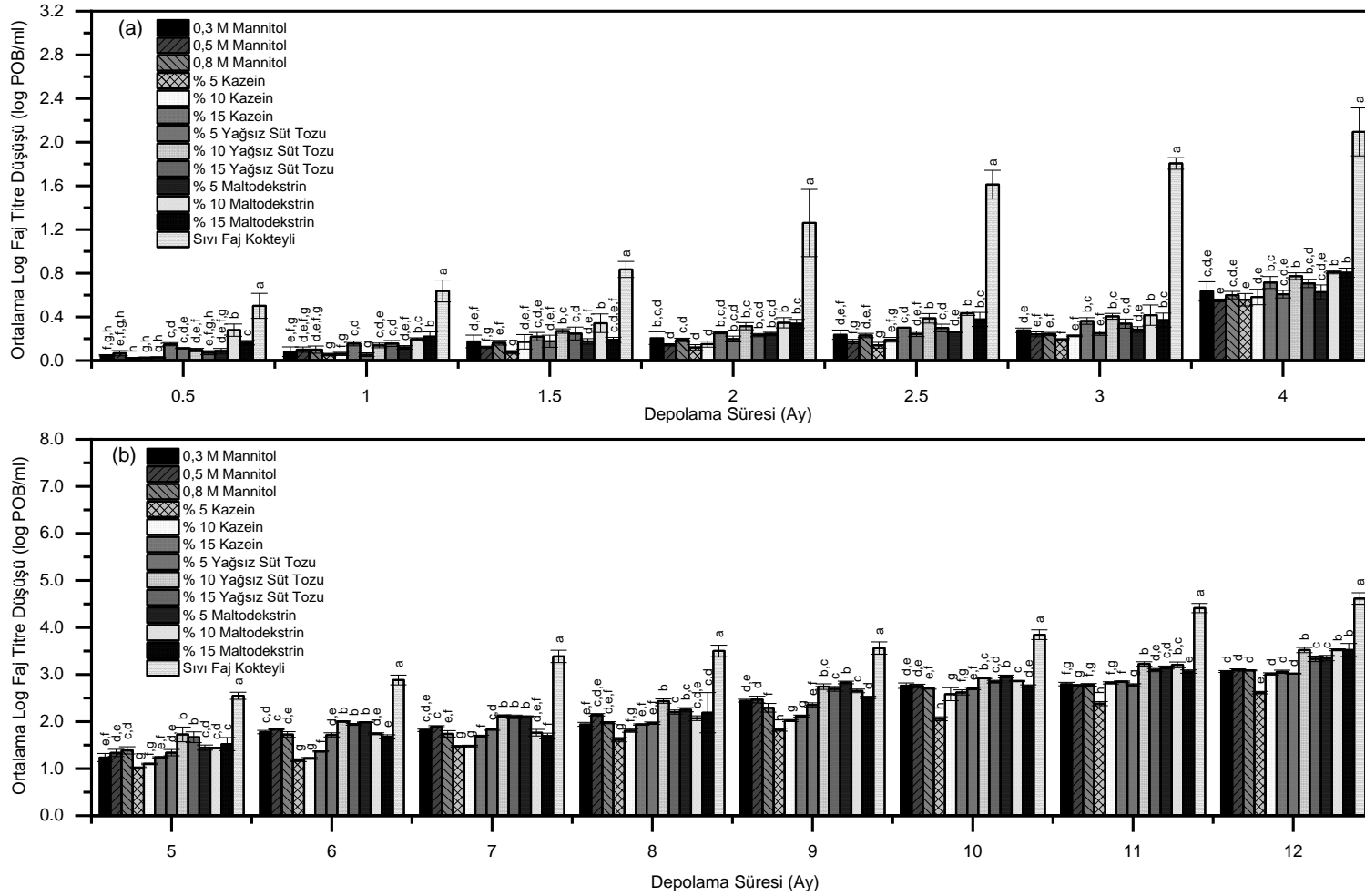
Çizlege 4.5'te verildiği gibi püskürtmeli kurutma işlemi sırasında bakteriyofajlarda karşılaşılan titre kaybı, kullanılan tüm ekspiyanlar için 1,19-1,95'lik bir log azalma şeklinde gözlenmiştir. Püskürtmeli kurutma işleminde seçilen ekspiyanlar içerisinde en az bakteriyofaj titre kaybı 0,3 M mannitol ve % 15 Maltodekstrin örneklerinde gözlenmiştir. Püskürtmeli kurutma prosesi sırasında bakteriyofaj titresindeki azalma en düşükten en yükseğe olacak şekilde maltodekstrin karışımları, yağsız süt tozu, mannitol ve kazein şeklinde elde edilmiştir. Bu sıralamada 0,3 M mannitol bir istisnayı temsil etmektedir. Literatürde püskürtmeli kurutma işlemi sırasında faj aktivitesinde farklı ekspiyanlar için farklı seviyelerde azalma gözleendiği rapor edilmiştir. Edilen veriler ışığında püskürtülerek kurutma çok küçük parçacıklar elde edilmesine izin vererek özellikle farmasötik uygulamalar da daha fazla öğütmeye gerek kalmadan pulmoner uygulama için

kullanıma izin vermesine rağmen, dondurarak kurutmada elde edilen yüksek titre değerlerini korumada daha az başarılıdır [155]. Bakteriyofajın püskürtülerek kurutulması için en iyi koşullar, biyolojik materyallerin püskürtülerek kurutulmasında (70–100°C) tipik olarak kullanılandan çok daha düşük olan düşük çıkış hava sıcaklıkları (40–60°C) olma eğilimindedir [155]. Bu sebeple bu tez çalışması kapsamında muhtemel kayıpların minimize edilmesi için çıkış sıcaklığı 45°C olacak şekilde seçilmiştir. Püskürtmeli kurutmadaki canlılık kaybının bir kısmı atomizasyon sürecinden kaynaklanabildiği tek etkenin sıcaklık olmadığı bilinmektedir [155].

Şekil 4.14 ve Şekil 4.15 sırasıyla 4±1°C ve 25±1°C’de 12 aylık depolama sırasında farklı ekspiyanların bakteriyofaj stabilitesini göstermektedir. Depolama stabilitesi, çalışma kapsamında ilk üç ay boyunca iki haftalık periyotlar ile daha sonraki dönemde ise aylık periyotlar ile titre sayımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, 4±1°C ve 25±1°C sıcaklıkta depolanan sıvı faj örnekleri sırasıyla 2,50 ve 4,62 log birim titre kaybı göstermiştir. Her iki depolama sıcaklığında, sıvı bakteriyofaj kokteyli tüm püskürtmeli kurutma ile kurutulmuş faj tozlarından önemli ölçüde daha yüksek titre kaybı ( $p<0,05$ ) sergilemiştir. % 15 maltodekstrin ve % 5 kazein kullanılarak hazırlanan püskürtülerek kurutulmuş bakteriyofaj tozları, 4±1°C ve 25±1°C’de sırasıyla 1,77 ve 2,61 log birim azalma ile 12 aylık depolama için en yüksek stabiliteyi gösterirken, diğer ekspiyanların daha az kararlı olduğu tespit edilmiştir. Diğer ekspiyanlar için konsantrasyon ve titre kaybı arasında anlamlı bir korelasyon gözlenmemiş ve 4±1°C ve 25±1°C’de önemli bir değişkenlik meydana gelmemiştir. Seçilen ekspiyanlardan % 15 maltodekstrin ile kurutulup 4±1°C’de depolanmış ve % 5 kazein ile kurutulup 25±1°C’de depolanmış toz örnekler, 12 ayda diğer diğer ekspiyanlara ve sıvı faj kokteyline göre önemli ölçüde daha az faj titer kaybı ( $p<0,05$ ) göstermiştir. 4±1°C’de depolanan püskürtülerek kurutulmuş bakteriyofaj tozları, 25±1°C’de depolanan bakteriyofaj tozlarına kıyasla daha düşük titre kayıpları göstermiştir. Depolama koşullarından bağımsız olarak tüm formülasyonlarda zamanla bakteriyofaj sayılarında azalma gözlenmiştir.



Şekil 4.14. 4±1°C’de 12 aylık depolama sırasında farklı ekspiyanların baktariyofaj stabilitesi. (a) 0-4 ay (b) 5-12 ay. Her çubuktaki farklı harfler,  $p < 0,05$ ’te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkı göstermektedir.



Şekil 4.15. 25±1°C’de 12 aylık depolama sırasında farklı eksipiyenlerin bakteriyofaj stabilitesi. (a) 0-4 ay (b) 5-12 ay. Her çubuktaki farklı harfler,  $p < 0,05$ ’te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkı göstermektedir.

Çizelge 4.5. Farklı ekspiyanlar malzemelerin varlığında püskürtülerek kurutulmuş bakteriyofaj kokteylinin proses kayıpları

<b>Eksipiyanlar</b>	<b>t<sub>1</sub>-t<sub>0</sub> (log POB)</b>
0,3 M Mannitol	1,19±0,28 <sup>d</sup>
0,5 M Mannitol	1,74±0,51 <sup>a,b,c</sup>
0,8 M Mannitol	1,56±0,51 <sup>a,b,c,d</sup>
% 5 Kazein	1,95±0,36 <sup>a</sup>
% 10 Kazein	1,70±0,38 <sup>a,b,c,d</sup>
% 15 Kazein	1,63±0,53 <sup>a,b,c,d</sup>
% 5 Yağsız Süt Tozu	1,76±0,42 <sup>a,b</sup>
% 10 Yağsız Süt Tozu	1,40±0,31 <sup>b,c,d</sup>
% 15 Yağsız Süt Tozu	1,41±0,54 <sup>b,c,d</sup>
% 5 Maltodekstrin	1,53±0,27 <sup>a,b,c,d</sup>
% 10 Maltodekstrin	1,37±0,51 <sup>b,c,d</sup>
% 15 Maltodekstrin	1,23±0,58 <sup>c,d</sup>

Başlangıç sıvı çözeltide bulunan bakteriyofaj kokteyli 13,51 log POB. Sonuçlar, ortalama log faj titresinin kaybı olarak gösterilmiştir. Farklı üst simgelerle gösterilen sonuçlarda, ilgili sütunlarında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklılık bulunmaktadır ( $p<0,05$ ).

Her ekspiyan grubu için kendi numune grubundaki en etkili numunenin su aktivitesi ( $a_w$ ) (Çizelge 4.6) ve partikül boyutu analizi (Çizelge 4.7) yapılmıştır. Püskürtmeli kurutma ile kurutulmuş bakteriyofaj tozlarının başlangıç  $a_w$  değerlerinin 0,06-0,08 aralığında olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçlar, % 15 maltodekstrinin en düşük  $a_w$  değerine sahip olduğunu ortaya koymuş; bu da, bu kuru bakteriyofaj kokteyli formunun mikrobiyal büyüme (bakteri, maya ve küf gibi) açısından mikrobiyal güvenliğini göstermektedir [272, 289]. Ortalama partikül çapları 790,5 ile 1235,5 nm arasındadır. Daha önceki çalışmalarda farklı bakteriyofaj ve ekspiyan kullanılması nedeniyle farklı ortalama çap değerleri elde edilmiştir.

Çizelge 4.6. Püskürtmeli kurutma ile elde edilen bakteriyofaj tozları için su aktivitesi

Örnekler	Su aktivitesi ( $a_w$ )	Sıcaklık (°C)
0,3 M Mannitol	0,0828±0,0035	22,79
% 5 Kazein	0,0722±0,0030	25,09
% 15 Yağsız süt tozu	0,0888±0,0042	25,04
% 15 Maltodekstrin	0,0626±0,0030	25,05

Çizelge 4.7. Püskürtmeli kurutma ile elde edilen bakteriyofaj tozları partikül boyutları

Örnekler	Ortalama partikül büyüklüğü (d.nm)	Ortalama polidispersite indeksi
0,3 M Mannitol	891,8±162,3	0,75±0,08
% 5 Kazein	1235,5±433,3	0,94±0,08
% 15 Yağsız süt tozu	1135,6±397,2	0,75±0,16
% 15 Maltodekstrin	790,5±18,2	0,66±0,03

Bakteriyofaj tozlarının üretiminde en çok tercih edilen yardımcı maddeler poli- ve disakkaritler (örn, maltodekstrin, dekstran, trehaloz, laktoz, sakkaroz), proteinler (örn, kazein, peynir altı suyu proteini izolatu ve laktoferrin) ve bunların karışımları olarak sıralanabilir [155, 186]. Örneğin, peynir altı suyu proteini izolatu, gastrik asit koşullarının olumsuz etkilerine karşı bakteriyofajların başarılı bir şekilde korunmasını sağlamıştır [290, 291]. Ayrıca, trehaloz, sakkaroz ve laktoz kullanımı, bakteriyofaj süspansiyonlarını püskürterek kurutmak için umut verici sonuçlar sağlamıştır [185]. Ayrıca dekstran, laktoz, glukoz, sakkaroz, mannitol ve lösin gibi yardımcı maddelerin bakteriyofaj tozlarının dağılılabirliğine olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir [183, 186, 200]. Leung ve ark., bakteriyofajların püskürtmeli kurutulması için mannitol kullanmanın daha iyi partikül ve farklı seviyede bakteriyofaj canlılığı ile sonuçlandığını savunmuştur [183, 184].

Çalışmalarda görülen bu değişkenlik, ekspiyanların bakteriyofajları koruma yeteneğinin değişkenliğine atfedilebilmekte ve bakteriyofaj türü ve fizikokimyasal özelliklere (örn, üçüncül ve dördüncül yapı, şekil) ve işleme koşullarına bağlı olabilmektedir. Kazein gibi proteinlerin eklendiği trehaloz formülasyonlarının fajların termal stresten korunmasında olumlu etkileri olduğu görülmüştür [186]. Sadece tampon kullanan bakteriyofajların kuru tozu, 1-10 log POB titre azalması göstermiş [201, 292] ve sakkaroz [201, 205], laktoz [201, 204] ve trehaloz gibi şekerlerin eklenmesi, kurutma işlemi ve depolama sırasında fajların daha iyi korunmasını sağladığı rapor edilmiştir. González-Menéndez ve ark, 4°C’de 12 ay boyunca hem yağsız sütte hem de trehalozda canlı kapsüllenmiş bakteriyofajlar (phiIPLA-RODI ve phiIPLA88) içeren kuru tozlar elde etmek için püskürtmeli kurutma kullanmıştır. Çalışma sonuçları, bakteriyofajların 20°C’de depolanmasının daha az etkili olduğunu, phiIPLA-RODI’nin her iki stabilizatörde de yalnızca 6 ay stabil olduğunu ortaya çıkarmıştır [285].

Daha önce, farklı bakteriyofajlar ve farklı ekspiyanlarla depolama sırasında sadece bakteriyofaj aktivitesi çalışmaları yapılmış ve gıda numunelerinde püskürtmeli kurutma ile toz haline getirilmiş bakteriyofajların aktivitesi gösterilmemiştir. Bakteriyofajların kuru formları, daha uzun süreli aktivite, maliyet etkinliği, ağırlıkta hafiflik ve taşıma ve depolama için kompaktlık gibi önemli avantajlara sahiptir. Püskürtmeli kurutma, çeşitli biyolojik partikülleri stabilize etmek için en etkili yöntemlerden biri olarak kabul edilse de, ticari faj kullanımı bağlamındaki uygulaması, her bir bakteriyofajın ve ekspiyanın sonuçlarının kullanılan miktara, işlemeye ve depolama ve diğer streslere bağlı olarak değişmesi nedeniyle sınırlıdır. Literatürdeki bilgiler ışığında, kullanılan bakteriyofajların özellikleri, seçilen yardımcı maddenin konsantrasyonu ve püskürtmeli kurutma işleminin kurutulmuş tozların aktiviteleri üzerinde önemli etkileri olduğu ve sonuçların duruma göre değişmektedir. Genel olarak, düşük sıcaklığın (4°C) bakteriyofaj depolaması için en uygun koşulu sağladığını göstermiştir. Oda sıcaklığında (25°C) depolama, bakteriyofaj yapısını bozabilecek termal kararsızlığa neden olabilmesi sebebiyle sınırlı ve değişken bir başarıya sahiptir.

Tez çalışmasının bu bölümü kapsamında, püskürtmeli kurutma yöntemi kullanılarak *S. Enteritidis* F5-4, *S. Typhimurium* L2-1 ve *S. Typhimurium* ICB1-1 bakteriyofajları ile

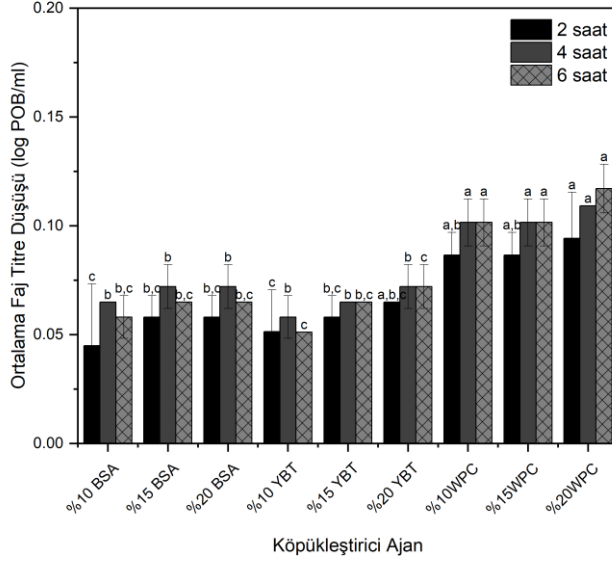
hazırlana kokteylinin farklı ekşiyanlar varlığında kurutma prosesinden nasıl etkilendiği ve depolama süresince bakteriyofaj titresindeki değişimler ortaya konulmuştur. Elde kurutulmuş tozların aktiviteleri izlendiğinde ve en başarılı ekşiyan,  $4\pm 1^\circ\text{C}$  12 aylık depolama sonunda % 15 maltodekstrin ve  $25\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 12 aylık depolama sonunda % 5 kazein olarak seçilmiştir. Daha önce bakteriyofajların kurutulması ile ilgili bilimsel çalışmalar incelendiğinde, proses sonrası kayıp ve depolama sonrası canlılığını bir bakteriyofajdan diğerine değiştiğini ve kurutma koşullarının her bakteriyofaj için optimize edilmesi gereken, formülasyon parametrelerine büyük ölçüde bağlı olduğunu açıkça göstermektedir. Literatürdeki bu eksiklik, proses koşulları, seçilen formülasyonların ve kullanılan bakteriyofajların birbirinden farklı olmasına sebebiyle kıyaslanabilmeyi büyük ölçüde azaltmaktadır. Seçilecek ekşiyanın ve yapılacak formülasyonun kullanılacak bakteriyofaj için mutlaka bireysel olarak denemesi önerilmektedir.

#### **4.2.3. Vakum Köpük Kurutma ile Bakteriyofajların Kurutulması ve Etkinliğinin İncelenmesi**

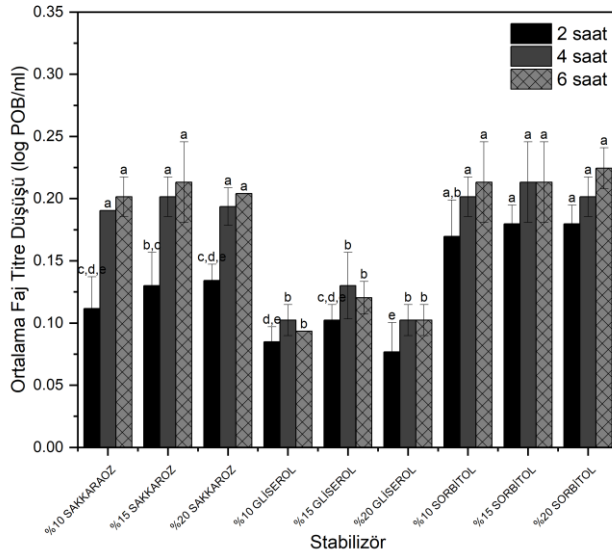
##### **4.2.3.1. Kimyasalların Etkisinin Değerlendirilmesi**

Vakumla köpük kurutma için seçilen üç farklı köpükleştirici ajan ile stabilizör malzemenin bakteriyofaj üzerine etkisinin incelenmesi için tekli solüsyon-bakteriyofaj ve ikili solüsyon-bakteriyofaj etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 2 saat arayla bakteriyofaj titresindeki düşme izlenmiştir. Şekil 4.16'da gösterildiği üzere seçilen köpükleştirici ajanlar arasında bakteriyofaj titre düşmesi en az olan kimyasal sığır serum albumini olarak kaydedilmiştir. Şekil 4.17'de gösterildiği üzere seçilen stabilizör ajanlar arasında bakteriyofaj titre düşmesi en az olan kimyasal gliserol olarak kaydedilmiştir. Sığır serum albuminde (BSA) görülen titre düşmesinin gliserole (GLY) kıyasla daha az olduğu gözlenmiştir.



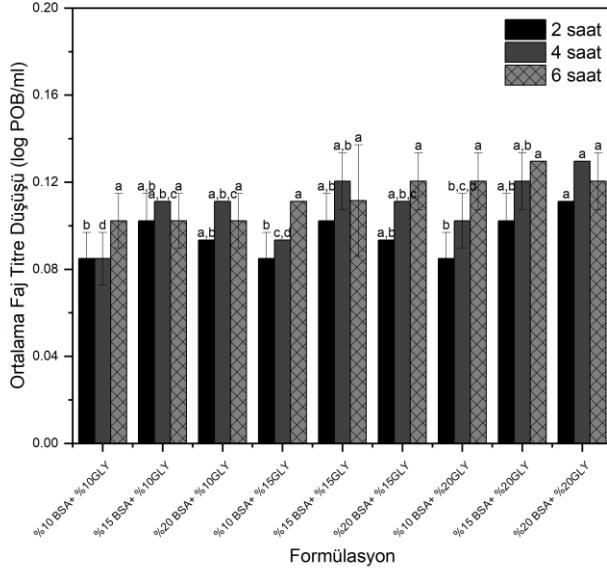


Şekil 4.16. Üç farklı köpükleştirici ajanın bakteriyofaj titresi üzerine etkisi



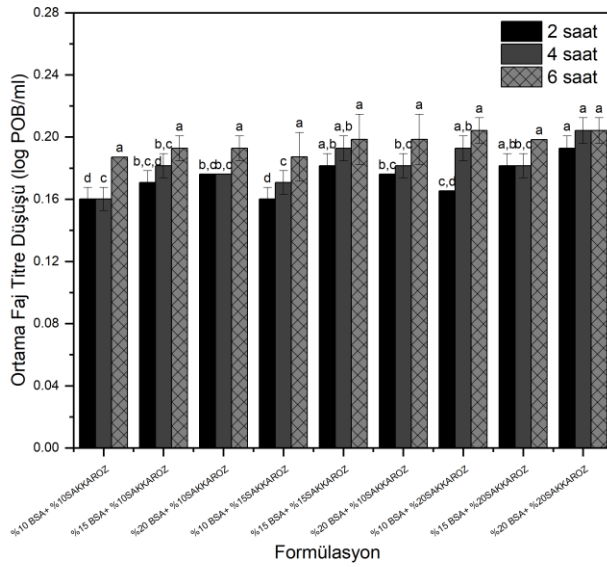
Şekil 4.17. Üç farklı stabilizör ajanın bakteriyofaj titresi üzerine etkisi

İkili solüsyon-bakteriyofaj etkisinin incelenmesi için, bakteriyofaj titresi düşüşü üzerinde en az etki gösteren sığır serum albumini ve gliserol çözeltilerinin ikili karışımları hazırlanmış ve ikili etki 2, 4 ve 6 saat süreyle izlenmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. İkili solüsyonun (sığır serum albumini (BSA) ve gliserol (GLY)) bakteriyofaj titresi üzerine etkisi

İkili solüsyon-bakteriyofaj etkisinin incelenmesi için, sığır serum albumini ve sakkaroz çözeltilerinin ikili karışımları hazırlanmış ve ikili etki 2, 4 ve 6 saat süreyle izlenmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. İkili solüsyonun (sığır serum albumini (BSA) ve sakkaroz) bakteriyofaj titresi üzerine etkisi

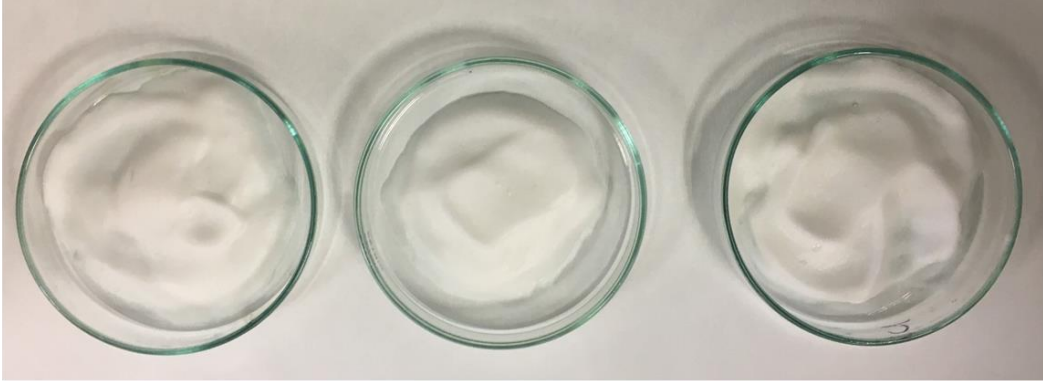
Farklı kimyasalların bakteriyofaj canlılığı üzerinde minör etkileri, bakteriyofaj depolama tamponunun seyreltilmesinenedeniyle iyonik güçteki değişikliğe bağlı olarak gerçekleşebileceği düşünülmektedir. Bu duruma ilişkin literatürde benzer örnekler görüşmektedir. Leung ve ark., tarafından gerçekleştirilen çalışma kapsamında PEV2 bakteriyofajının püskürtmeli kurutma ile kurutulması kapsamında kullanılan formülasyonların kurutma öncesi formülasyon hazırlık aşamasında bakteriyofaj titresindeki etkisi incelenmiş ve formülasyon aşamasında stok faj solüsyonunun 100 kat seyreltilmesi ile hazırlanan formülasyonlarda ~0,5 log titre kaybı yaşadığı görülmüştür [183].

#### 4.2.3.2. Köpük Oluşumu ve Vakumla Köpük Kurutma Etkisinin Değerlendirilmesi

Vakumla köpük kurutma için seçilen sığır serum albumin ve gliserol ile oluşturulan üç farklı solüsyonun (solüsyon A, solüsyon B, solüsyon C) köpük oluşumu ve kurutma sonrası bakteriyofaj titresini belirlenmiştir. Solüsyon A, B ve C için yaş köpük (Şekil 4.20) ve kurutma önceki petriye aktarılan yaş köpük (Şekil 4.21) görselleri verilmiştir. Kurutma esnasında hacim artışına ilişkin görsel Şekil 4.22’de verilmiştir.



Şekil 4.20. Proses I koşullarında solüsyon A, B ve C için vakum kurutma öncesi köpük görselleri



Solüsyon A: %10 (ağırlık/hacim) sığır serum albumini + %10 (hacim/hacim) gliserol + %10 (hacim/hacim) bakteriyofaj

Solüsyon B: %15 (ağırlık/hacim) sığır serum albumini + %10 (hacim/hacim) gliserol + %10 (hacim/hacim) bakteriyofaj

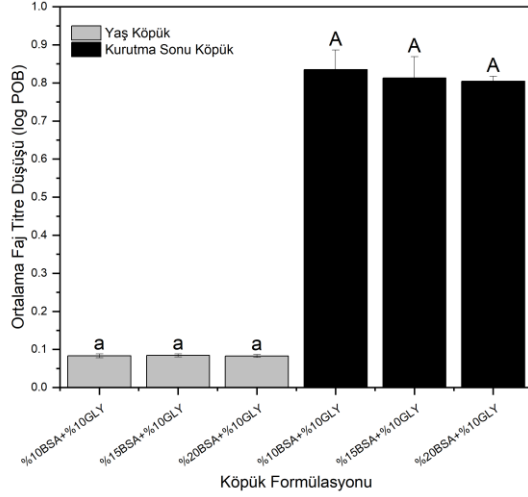
Solüsyon C: %20 (ağırlık/hacim) sığır serum albumini + %10 (hacim/hacim) gliserol + %10 (hacim/hacim) bakteriyofaj

Şekil 4.21. Proses I koşullarında solüsyon A, B ve C için vakum etüve yerleştirilen köpük görselleri



Şekil 4.22. Proses I koşullarında solüsyon A, B ve C için vakum altında kurutma sırasında örneklere ait hacim değişikliği görselleri

Köpük oluşumu sonrası yaş köpük titresinde 0,08 log POB titre düşüşü gözlenmiştir (Şekil 4.23). Proses I ( $35\pm 1^\circ\text{C}$ , 0,02 MPa, 4 saat) koşullarında yapılan kurutma sonrası bakteriyofaj titresinde solüsyon A için 0,84 log POB, solüsyon B için 0,81 log POB ve solüsyon C için 0,80 log POB titre düşüşü gözlenmiştir (Şekil 4.23).



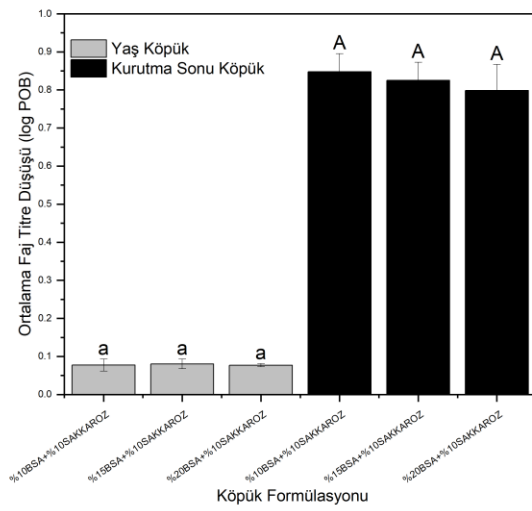
Şekil 4.23. Proses I koşullarında solüsyon A (% 10 BSA + % 10 GLY), solüsyon B (% 15 BSA + % 10 GLY), solüsyon C (% 20 BSA + % 10 GLY) için yaş köpük ve kurutma sonrası köpükte bakteriyofaj titre düşüşü

Proses I koşullarında kurutulan örneklerin kurutma sonrası görselleri Şekil 4.24'te gösterilmiştir. Kurutma sonu elde edilen çıktılarda bakteriyofaj canlılığı açısından başarılı sonuçlar elde edilmesine rağmen kurutulmuş örneklerin cam petriyelerden başka bir depolama kabına alınması açısından yapışkanlık ve toplaklanma konularında sorunlar bulunmaktadır.



Şekil 4.24. Proses I koşullarında solüsyon A, B ve C için vakum kurutma sonrası görselleri (soldan sağa: solüsyon A, solüsyon B, solüsyon C)

Vakumla köpük kurutma için seçilen sığır serum albumin ve sakkaroz ile oluşturulan üç farklı solüsyonun (solüsyon D, solüsyon E, solüsyon F) köpük oluşumu ve kurutma sonrası bakteriyofaj titresi belirlenmiştir. Köpük oluşumu sonrası yaş köpük titresinde 0,08 log POB titre düşüşü gözlenmiştir (Şekil 4.25). Proses I (35±1°C, 0,02 MPa, 4 saat) koşullarında yapılan kurutma sonrası bakteriyofaj titresinde solüsyon D için 0,85 log POB, solüsyon E için 0,83 log POB ve solüsyon F için 0,80 log POB titre düşüşü gözlenmiştir. Proses I koşullarında kurutulan örneklerin kurutma öncesi (Şekil 4.26 ve Şekil 4.27), kurutma esnası (Şekil 4.28 ve Şekil 4.29) ve kurutma sonrası görselleri Şekil 4.30 ve Şekil 4.31’de gösterilmiştir.



Şekil 4.25. Proses I koşullarında solüsyon D, solüsyon E, solüsyon F için yaş köpük ve kurutma sonrası köpükte bakteriyofaj titre düşüşü



Şekil 4.26. Proses I koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum kurutma öncesi köpük görselleri

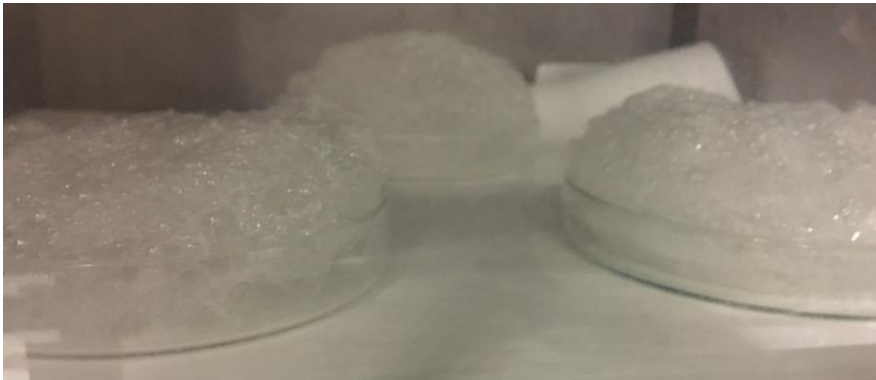


Solüsyon D: %10 (ağırlık/hacim) sığır serum albumini + %10 (hacim/hacim) sakkaroz + %10 (hacim/hacim) bakteriyofaj  
Solüsyon E: %15 (ağırlık/hacim) sığır serum albumini + %10 (hacim/hacim) sakkaroz + %10 (hacim/hacim) bakteriyofaj  
Solüsyon F: %20 (ağırlık/hacim) sığır serum albumini + %10 (hacim/hacim) sakkaroz + %10 (hacim/hacim) bakteriyofaj

Şekil 4.27. Proses I koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum etüve yerleştirilen köpük görselleri



Şekil 4.28. Proses I koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum altında kurutma sırasında örneklere ait hacim değişikliği görselleri

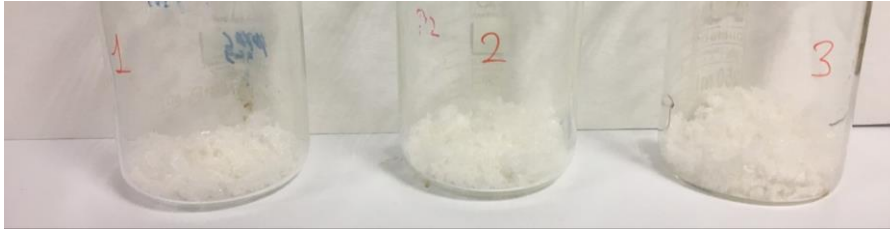


Şekil 4.29. Proses I koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum altında kurutma sırasında köpüklerin sönmülmesi

Proses I koşullarında kurutulmuş örneklerin kurutma sonrası görselleri Şekil 4.30 ve Şekil 4.31’de gösterilmiştir. Kurutma sonu elde edilen çıktılarda bakteriyofaj canlılığı açısından başarılı sonuçlar elde edilmiş ve kurutulmuş örneklerin cam petrilerden başka bir depolama kabına alınması açısından yapışkanlık ve toplaklanma konularında gliserol kullanımında yaşanan sorunlar ile karşılaşılmasıdır.



Şekil 4.30. Proses I koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum kurutma sonrası görselleri (soldan sağa: solüsyon D, solüsyon E, solüsyon F)

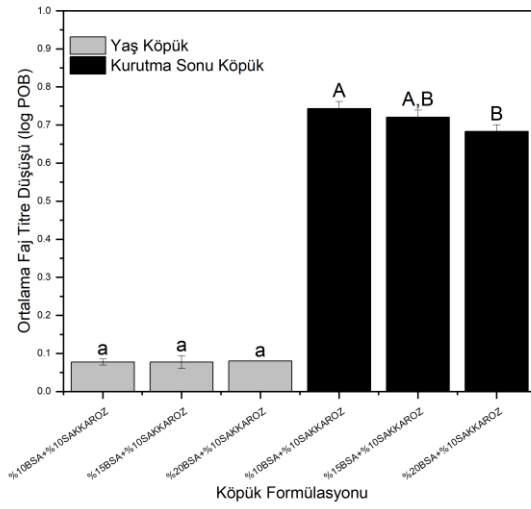


Şekil 4.31. Proses I koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum kurutma sonrası görselleri (soldan sağa: solüsyon D, solüsyon E, solüsyon F)

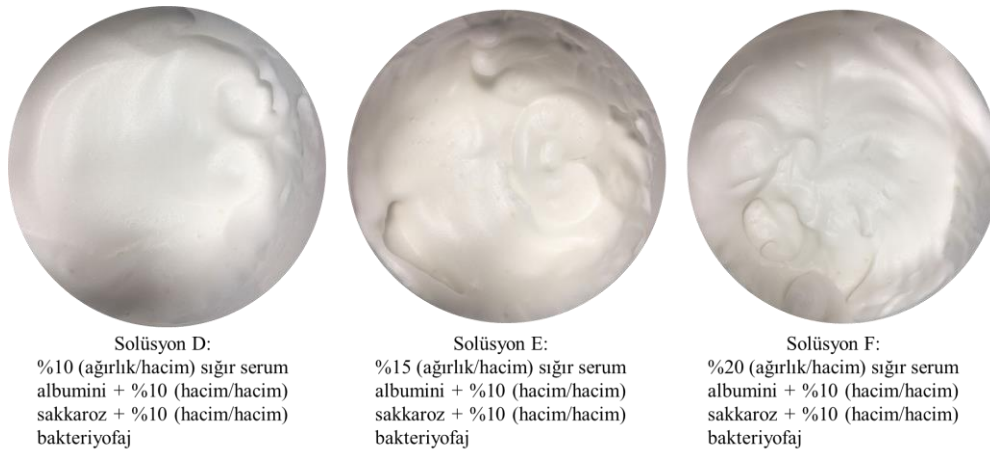
Vakumla köpük kurutma için seçilen sığır serum albumin ve sakkaroz ile oluşturulan üç farklı solüsyonun (solüsyon D, solüsyon E, solüsyon F) köpük oluşumu ve kurutma sonrası bakteriyofaj titresi Proses II ( $35\pm 1^\circ\text{C}$ , 0,06 MPa, 5 saat) koşullarında belirlenmiştir. Köpük oluşumu sonrası yaş köpük titresinde 0,08 log POB titre düşüşü gözlenmiştir. Kurutma sonrası bakteriyofaj titresinde solüsyon D için 0,74 log POB, solüsyon E için 0,72 log POB ve solüsyon F için 0,68 log POB titre düşüşü gözlenmiştir (Şekil 4.32). Proses II koşullarında kurutulmuş örneklerin kurutma öncesi (Şekil 4.33 ve



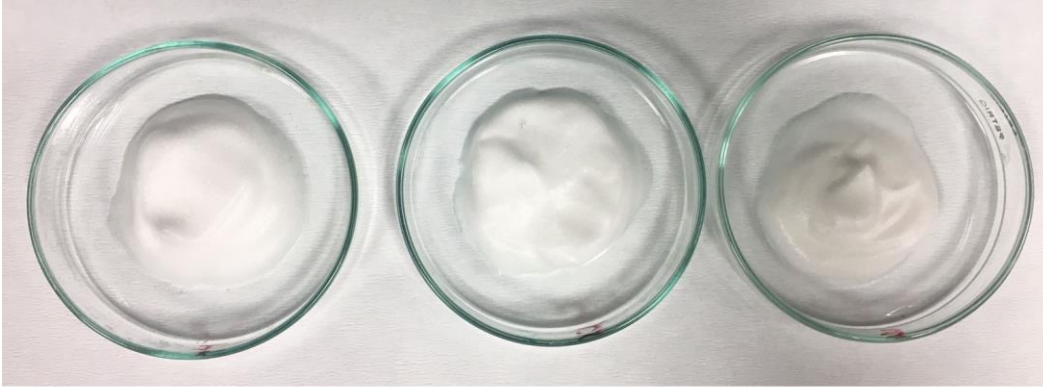
Şekil 4.34), kurutma esnası (Şekil 4.35) ve kurutma sonrası görselleri Şekil 4.36'da gösterilmiştir.



Şekil 4.32. Proses II koşullarında solüsyon D, solüsyon E, solüsyon F için yaş köpük ve kurutma sonrası köpükte bakteriyofaj titre düşüşü



Şekil 4.33. Proses II koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum kurutma öncesi köpük görselleri

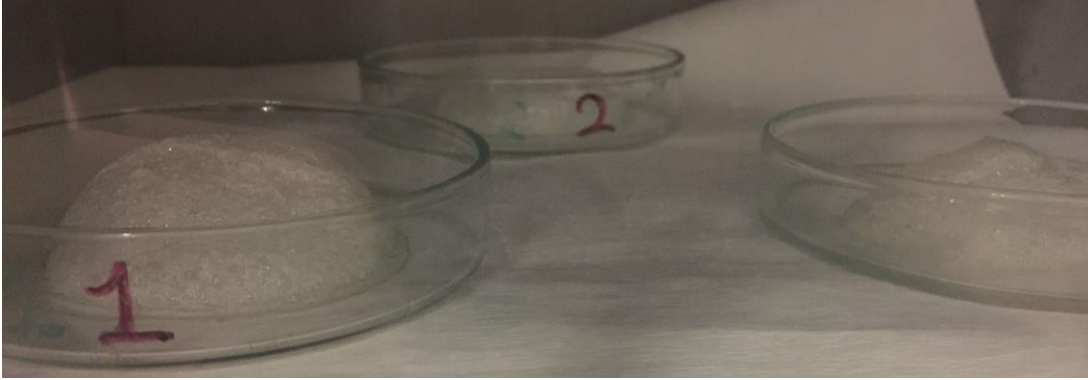


Solüsyon D:  
%10 (ağırlık/hacim) sığır serum  
albumini + %10 (hacim/hacim)  
sakkaroz + %10 (hacim/hacim)  
bakteriyofaj

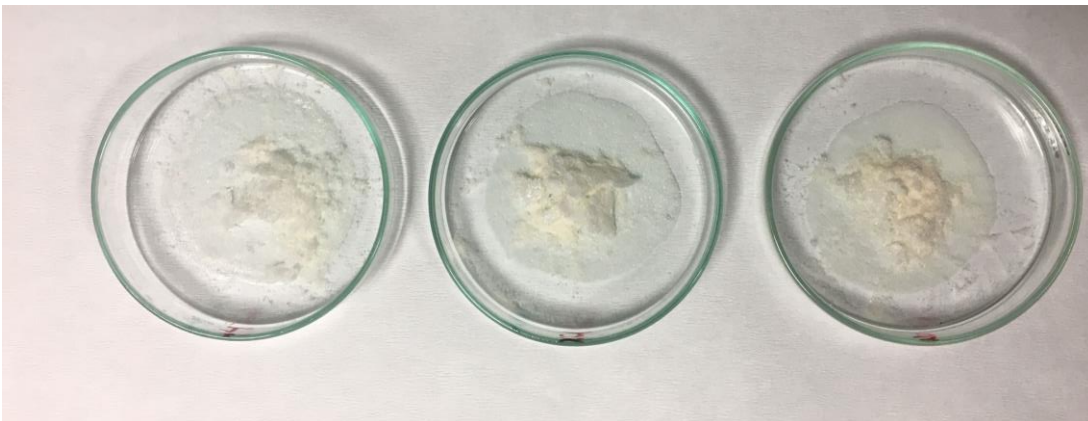
Solüsyon E:  
%15 (ağırlık/hacim) sığır serum  
albumini + %10 (hacim/hacim)  
sakkaroz + %10 (hacim/hacim)  
bakteriyofaj

Solüsyon F:  
%20 (ağırlık/hacim) sığır serum  
albumini + %10 (hacim/hacim)  
sakkaroz + %10 (hacim/hacim)  
bakteriyofaj

Şekil 4.34. Proses II koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum etüve yerleştirilen köpük görselleri

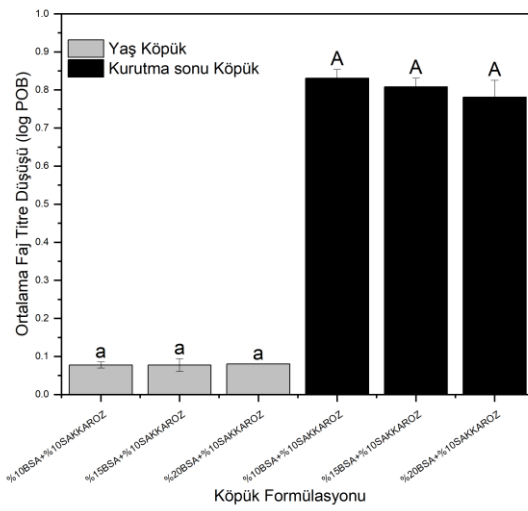


Şekil 4.35. Proses II koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum altında kurutma sırasında örneklere ait hacim değişikliği görselleri



Şekil 4.36. Proses II koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum altında kurutma vakum kurutma sonrası görselleri (soldan sağa: solüsyon D, solüsyon E, solüsyon F)

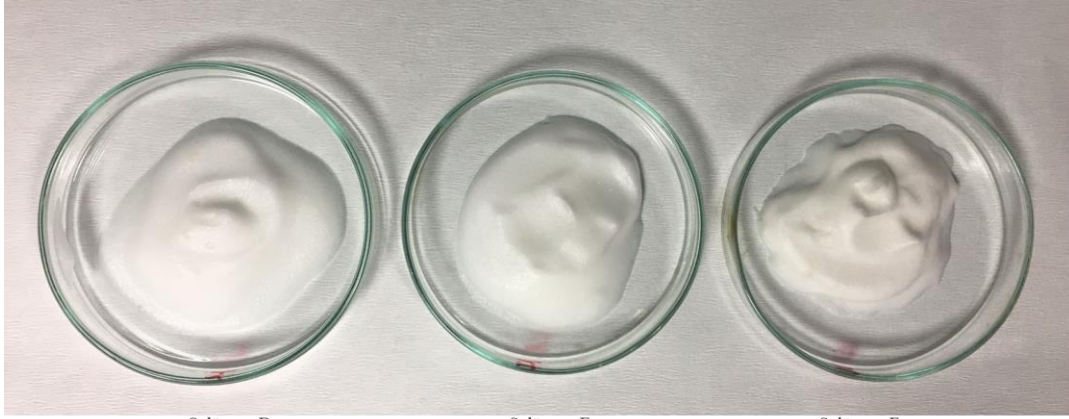
Vakumla köpük kurutma için seçilen sığır serum albumin ve sakkaroz ile oluşturulan üç farklı solüsyonun (solüsyon D, solüsyon E, solüsyon F) köpük oluşumu ve kurutma sonrası bakteriyofaj titresi Proses III ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 0,02 MPa, 8 saat) koşullarında belirlenmiştir. Köpük oluşumu sonrası yaş köpük titresinde 0,08 log POB titre düşüşü gözlenmiştir. Kurutma sonrası bakteriyofaj titresinde solüsyon D için 0,83 log POB, solüsyon E için 0,81 log POB ve solüsyon F için 0,78 log POB titre düşüşü gözlenmiştir (Şekil 4.37). Proses III koşullarında kurutulmuş örneklerin kurutma öncesi (Şekil 4.38 ve Şekil 4.39), kurutma esnası (Şekil 4.40 ve Şekil 4.41) ve kurutma sonrası görselleri Şekil 4.42’de gösterilmiştir.



Şekil 4.37. Proses III koşullarında solüsyon D, solüsyon E, solüsyon F için yaş köpük ve kurutma sonrası köpükte bakteriyofaj titre düşüşü



Şekil 4.38. Proses III koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum kurutma öncesi köpük görselleri



Solüsyon D:  
%10 (ağırlık/hacim) sığır serum albumini + %10 (hacim/hacim) sakkaroz + %10 (hacim/hacim) bakteriyofaj

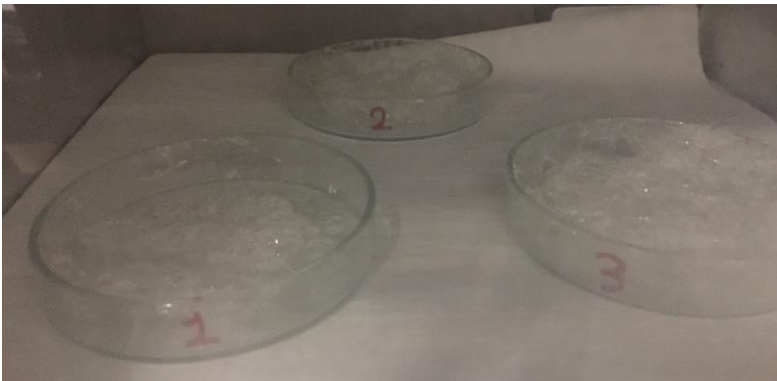
Solüsyon E:  
%15 (ağırlık/hacim) sığır serum albumini + %10 (hacim/hacim) sakkaroz + %10 (hacim/hacim) bakteriyofaj

Solüsyon F:  
%20 (ağırlık/hacim) sığır serum albumini + %10 (hacim/hacim) sakkaroz + %10 (hacim/hacim) bakteriyofaj

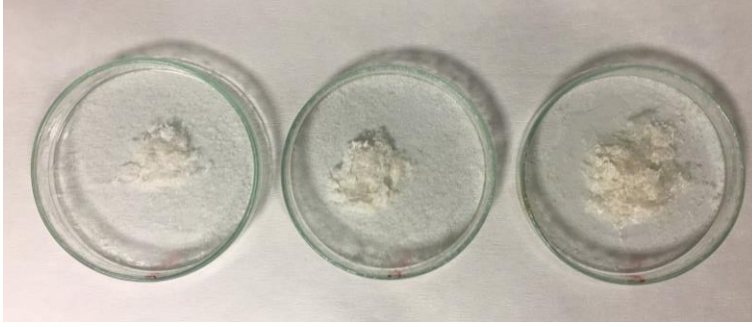
Şekil 4.39. Proses III koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum etüve yerleştirilen köpük görselleri



Şekil 4.40. Proses III koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum altında kurutma sırasında örneklere ait hacim değişikliği görselleri



Şekil 4.41. Proses III koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum altında kurutma sırasında köpüklerin sönmülmesi



Şekil 4.42. Proses III koşullarında solüsyon D, E ve F için vakum altında kurutma vakum kurutma sonrası görselleri (soldan sağa: solüsyon D, solüsyon E, solüsyon F)

Bu tez kapsamında yapılan çalışmadan sığır serum albumini+gliserol ve sığır serum albumini+sakkaroz kullanılarak iki farklı formülasyonda *S. Enteritidis* F5-4 bakteriyofajının vakum köpük kurutma ile kurutulması çalışılmıştır. Köpük kurutma yaklaşımının hem bakteriyel hem de viral aşılarda kullanılmasıyla 1990'lara kadar yeniden ortaya çıkmamıştır. Hem Roser hem de Gribbon ve Victor Bronstein, virüsler ve bakteriler gibi gücünü koruyan köpükle kurutulmuş biyolojik ürünler üretmek için bir vakum sürecinin patentini almıştır [238-240]. Truong ve ark. 2000'lerde, canlı zayıflatılmış grip virüsü ve parainfluenza virüsü gibi viral aşılarda potensinin korunması için, liyofilizasyon gibi diğer geleneksel yöntemlere göre depolama stabilitesinde önemli bir gelişme gösteren bir vakumlu köpük kurutma işleminin geliştirilmesi izlemiştir [241]. Sığır vebası ve peste des petits ruminant virüsleri [262], Newcastle hastalığı virüsü [263], parainfluenza virüsü [242], *Francisella tularensis* bakterisi [248], *Salmonella* Typhi bakterisi [249], kuduz virüsü [264] için canlı zayıflatılmış aşılarda, domuz üreme ve solunum sendromu virüsü [265] ve grip virüsü [247], liyofilizasyon ve/veya püskürtmeli kurutmaya göre üstün stabilizasyon göstererek başarıyla köpükle kurutulmuştur. Bu kapsamda literatürde biyolojik malzemelerin köpük vakum kurutma ile kurutulmasında sınırlı sayıda çalışma bulunmakla birlikte başarılı sonuçları rapor edilmiştir. Bu tez kapsamında olduğu gibi bir bakteriyofajın köpük ile vakum altında kurutulmasına ilişkin aşı çalışmaları dışında bir çalışmaya rastlanmamış olması bu konuda çalışmanın özgünlüğü ortaya koymaktadır.

Tez çalışmaları kapsamında, sığır serum albumini ve gliserol kullanılarak yapılan formülasyon çalışmasında bakteriyofaj titresinde kabul edilebilir bir düşüş gözlenmesine

rağmen oluşturulan köpük formunda yüksek vizkozitesi, köpüğün göreceli olarak daha hızlı sönümlenmesi ve kuruma sonu yapışkan formun elde edilen kurutulmuş yapının başka bir depolama ortamına transferinde sorun yaratacağı sebebiyle camsı özelliği daha yüksek bir formülasyona geçilmiştir. Bu sebeple, sığır serum albumini ve sakkaroz kullanılarak geliştirilen formülasyonda gliserole kıyasla yüksek vizkoziteli bir köpük formu elde edilmiş ve kurutma sonrasında başka bir depolama ortamına transferinde sorun oluşturmayan kuru bakteriyofaj içeren toz örnekler elde edilmiştir. Sığır serum albumini ve sakkaroz formülasyonu için üç farklı proses sonrası bakteriyofaj titresindeki düşüş izlenmiş ve optimum prosese karar verilmiştir.

Proses I ve III arasında kurutma sonrası bakteriyofaj titresindeki düşüş incelendiğinde iki süreç arasında belirgin bir fark bulunmamakla birlikte, Proses III düşük sıcaklık sebebiyle daha uzun bir kurutma süresine ihtiyaç duymaktadır. Proses III süresince  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleştirilen köpük sönümlenmesinde yeterli kuruma olmadan köpük sönümlendiği için kuruma yapılan kabın taban kısmına örneklerin yapışması ve yüzeyde kuruması gerçekleşmiştir. Bu sebeple kurutma sonu numunelerin kurutma petrilerinden alınırken daha az kurutulmuş numune geri alınabilmiştir. Proses II yapılan işlemler içerisinde bakteriyofaj titresindeki azalmanın en az olduğu işlem grubu olarak görülmektedir. Bu durumun sisteminde daha düşük vakum altında işlem görmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Proses II süresince düşük vakum altında köpük yeterli seviyede yükselip hava dolmamış olmasından ötürü kurutma yapılan kabın taban kısmına örneklerin yapışması ve yüzeyde kuruması gerçekleşmiştir. Bu sebeple kurutma sonu numunelerin kurutma petrilerinden alınırken daha az kurutulmuş numune geri alınabilmiştir.

Bir çalışma kapsamında *Salmonella* Typhi canlı bakteri aşısının (Ty21a) gücünü ve immünojenitesini korumak için köpükle kurutmanın etkinliği, Ohtake ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir [229]. Büyüme ortamına sodyum klorür ilave edilerek bakterileri ozmotik strese maruz bırakarak ve büyümenin durağan fazında iken bakterinin köpükle kurutma ve sonrasındaki streslere karşı direncini arttırdığını bulmuşlardır. Bakterilerin köpükle kurutmaya ilişkili proses kaybını en aza indirmedeki önemli faktörlerden birini, minimuma indirmek için raf sıcaklığını kontrol ederken, basıncı kademeli bir şekilde

atmosferik basınçtan 100 mTorr'un altına düşürerek köpürme ve kurutma hızının dikkatli bir şekilde kontrol edilmesi olduğu rapor edilmiştir. İlk araştırmalar, proses kaybının çoğunun, nemin uzaklaştırılmasının çoğunun gerçekleştiği döngünün erken bölümlerinde meydana geldiğini bulunmuştur. Böylece, kısa dengeleme bekletmeleriyle sistem basıncında kademeli düşüşler yaparak döngü optimizasyonu yoluyla, proses kaybı 0,8'den 0,3 log KOB'ya düşürüldüğü rapor edilmiştir.

Köpük formülasyonu geliştirme sürecinde uygun bir tamponlama sistemi pH'ı kontrol etmenin yanı sıra bir stabilizatör veya çözücü görevi görebilir ve köpürme işleminin kendisine katılabilmesi açısından belirli tamponlar ile gerçekleştirilmektedir. Köpük kurutma ortam koşullarına yakın olduğundan, buz kristalleri oluşturma, ekspiyanları dondurma-konsantre etme ve büyük pH kaymaları yaratma eğilimi en aza indirilmekle birlikte uygun tampon seçimi ile başarılı bir kurutma işlemi gerçekleştirilebilmektedir. Köpükle kurutulmuş sığır serum albüminiyle [247] ilgili bir çalışmada, sodyum fosfatın potasyum fosfattan daha stabilize edici olduğu bulunması bu çalışma kapsamında kullanılan fosfat tamponu kullanımı tercih edilmiştir.

Köpük kurutma için yaygın olarak kullanılan amorf ekspiyanlardan sakkaroz hem kurutma sırasında hem de elde edilen camsı matris içinde kaplandığında nihai üründe biyolojik stabilize eden disakaritlerdir. Sakkaroz diğer polioller ayrıca, proteinin yüklü bölgelerine hidrojen bağı yoluyla hidrasyonun kaybolan suyunu değiştirerek biyolojik olanı kurumaya bağlı denatürasyona karşı koruyabilmesi sebebiyle tercih edilmiştir. Sorbitol, gliserol veya dimetil sülfoksit (DMSO) gibi daha düşük moleküler ağırlıklı katkı maddeleri, cam oluşturuçulara göre doğru miktarda dahil edildiğinde, bu amaçlar için biyolojik katı dozaj formunun depolama stabilitesini geliştirmek için başarıyla kullanılmıştır [249, 272, 273]. Bu tez çalışması kapsamında gliserol özellikle biyolojik ajanlar için stabilizasyon açısından formülasyonlarda bulunması tercih edilmesine rağmen camsılık sağlayacak sakkaroz gibi bir yapının ortamda yokluğu durumunda yapışkanlık ve topaklaşmanını, kurutma sonrası tozların başka bir depolama ortamına transferindeki zorlukların önüne geçilememiştir.

Başarılı farmasötik uygulamaları arasında Lovalenti ve ark., canlı zayıflatılmış grip aşısının (LAIV) sabit bir katı dozaj formunu üretmek için farklı kurutma yöntemlerinin etkinliğini karşılaştırmıştır [227]. Karşılaştırmadan önce, yardımcı madde taraması yoluyla bir H1N1 grip virüsü suşunun ayrı ayrı optimize edilmiş köpükle kurutulmuş, püskürtülerek kurutulmuş ve dondurularak kurutulmuş formülasyonlarını üretmek için biraz çaba sarf etmişlerdir. Arginin ve jelatin ilavesinin köpükle kurutulmuş formülasyonda stabilize edici bir etkisi olmasına rağmen, iyonik olmayan yüzey aktif cismi Pluronic F68'den bir miktar stabilizasyon yararı sergileyen püskürtülerek kurutulmuş formülasyon üzerinde ihmal edilebilir bir etkisi olduğu raporlanmıştır. Ticari bir dondurularak kurutulmuş formülasyon (NASOVACTM) da karşılaştırmaya dahil edilmiştir. NASOVAC formülasyonu, 4°C'de köpükle kurutulmuş formülasyona benzer şekilde performans gösterse de, köpükle kurutulmuş formülasyon, 25°C ve 37°C'de tüm formülasyonlardan çok daha düşük güç kaybı oranı sergilemiştir. Aslında, püskürtmeyle ve dondurularak kurutulmuş formülasyonlar 37°C'de bir hafta sonra 1 log'dan fazla kayıp gözlenirken, köpükle kurutulmuş formülasyonun aynı miktarı kaybetmesi 20 haftadan uzun sürdüğü rapor edilmiştir. Köpükle kurutulmuş formülasyonun, formülasyonlar arasında en düşük camsı geçiş sıcaklığına (Tg) ve en yüksek nem içeriğine sahip olmasına rağmen, aşırı yüksek sıcaklıklarda stabilize etmede başarılı olması şaşırtıcı olduğu vurgulanmıştır. Stabilitayı belirlemede daha önemli olabilecek moleküler hareketlilik gibi başka fiziksel özelliklerin varlığı ve köpükle kurutulmuş formülasyon için bu istenen özelliklerin kazandırılmasında daha etkili olabileceği rapor edilmiştir.

Elde edilen bulgular ışında Proses II (35±1°C , 0,06 MPa, 5 saat) solüsyon F için 0,68 log POB titre düşüşü çalışma kapsamında en başarılı sonuç olarak gözlenmiştir. Proses II için kurutulmuş numune geri kazanımının artırılması için kurutma kabı ve kabinlerinin hacimlerinin artırılarak işlem yapılması önerilmektedir. Bu sayede göreceli olarak düşük bir titre kaybında, moderate bir sıcaklıkta, proses sürecinde müdahale etme imkanı veren bir sistemle bakteriyofajların kurutulması gerçekleştirilebilmektedir. Köpükle kurutma, özellikle canlı viral veya bakteriyel aşılarda gibi kararsız biyofarmasötikler için, gelişmiş depolama stabilitesine sahip biyolojik maddeler için katı dozaj formları üretebilen çekici bir kurutma teknolojisini temsil etmektedir. Spesifik formülasyon eksipiyenler nihai stabilite profili için kritik olmakla birlikte, köpük kurutma ile kullanılan temel



formülasyon parametrelerinin birçoğunun tipik farmasötik formülasyonlarda yaygın olarak kullanılanlar olabileceği büyük bir avantajdır.

#### **4.2.4. Kurutma Yöntemlerine İlişkin Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi**

Bu tez çalışmasının ilk bölümü kapsamında, dondurarak kurutma (liyofilizasyon), püskürtmeli kurutma ve vakum köpük kurutma yöntemleri ile bakteriyofajların kurutulması, kurutma proses etkisinin izlenmesi ve depolama stabilitesinin incelenmiştir. Bu çalışma kapsamında, proses koşullarının bakteriyofajların titresini üzerine etkisi incelendiğinde (Çizelge 4.8), her üç yöntem için belirli işlem kayıpları olduğu ve bu kayıplardan en yüksek olanın püskürtmeli kurutma olduğu gözlemlenmiştir. Bu inceleme kapsamında liyofilizasyon ve püskürtmeli kurutma için 12 aylık depolama sonunda en az titre düşüşü gösteren formülasyon ile vakum köpük kurutma için kurutma işleminde en az titre düşüşü gösteren proses koşulları seçilmiştir. Çizelge 4.8 incelendiğinde, liyofilizasyon ile üretilen bakteriyofaj tozları diğer yöntemlere göre proses sonunda daha az titre düşüşü sergilemiştir. Vakum köpük kurutma ise püskürtmeli kurutmaya kıyasla belirgin derece daha az proses kaybı sergilerken, liyofilizasyon yöntemi ile yaklaşık olarak benzer sonuçlar üretmektedir.

Literatürde depolama sırasında bakteriyofaj aktivite çalışmaları yapılmakta olup, dondurularak kurutulmuş ve püskürtmeli kurutma ile kurutulmuş bakteriyofaj tozlarının aktiviteleri farklı bakteriyofajlar ve farklı yardımcı maddeler ile sınırlı sayıda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Dondurarak kurutma ve püskürtmeli kurutma işlemleri ısı işlem uygulamalarının soğuk ve sıcak olmak üzere iki sınır ucunu temsil etmektedir. Kendi içlerinde optimizasyonlar sonucunda proses kayıplarının minimize edilmesi durumunda bile sırasıyla yaklaşık 1-2 log bakteriyofaj kaybı yaşandığı rapor edilmiştir [205, 282]. Bu proses kayıplarının minimize edilmesi amacıyla özellikle daha ılımlı koşullarda kurutma işlemine imkan veren vakumla köpük kurutma prosesinin bir alternatif oluşturabileceği üzerine bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Vakumla köpük kurutma, ortam sıcaklığına yakın bir sıcaklıkta çalışabilme özelliğini içermektedir. Bu, kurutma için düşük veya yüksek sıcaklık gerektiren işlemlere kıyasla enerji tüketimini azaltmakta, daha ekonomik bir işleme ve malzeme üzerindeki stresin azalmasına olanak tanımaktadır. Tez çalışmasının bu bölümünde farklı formülasyonlarda vakumla köpük

kurutma işlemi gerçekleştirilerek formülasyon ve proses koşullarının bakteriyofajların kurutulmasına etkisi araştırılmıştır.

Kuru toz bakteriyofaj formülasyonları liyofilizasyon, püskürtmeli kurutma ve vakum köpük kurutma ile başarılı bir şekilde işlenmiş olsa da, toz performansının büyük ölçüde faj tipine, formülasyon kimyasallarına ve bunların konsantrasyonlarına ve üretim sürecine bağlı olduğu görülmektedir. Liyofilizasyon çalışması kapsamında karşılaşılan bu proses kaybı yüksek ozmotik basınç değişiklikleri (olası ozmotik hasar) ve göreceli olarak düşük sıcaklıklarda ( $<-20^{\circ}\text{C}$ ) hızlı dondurma işleminin kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu etkileri minimize etmek için proses koşulları, formülasyonda kullanılan kriyoprotektanlar ve tekrar rehidresyon işleminin optimize edilmesi gereklidir. Püskürtmeli kurutma çalışması kapsamında ise kurutma hava sıcaklığının oluşturduğu termal stres ve nozulda karşılaşılan yüksek kayma gerilimi bakteriyofajlarda canlılık kaybını oluşturduğuna ilişkin raporlar bulunmaktadır. Bu durumun azaltılması için püskürtmeli kurutma işlemine tabi tutulacak bakteriyofajın ısı tolerasına uygun proses koşulları ve kayma geriliminden koruma sağlayacak ekşiyanlar ile formülasyon hazırlanarak proses koşullarının optimize edilmesi gereklidir. Vakum köpük kurutma yönteminde ise sıvının köpürmesi ile oluşan yüzey ve kayma gerilimleri arayüzeydeki protein kılıfın zarar görmesine neden olabilmektedir. Buna ek olarak diğer tüm kurutma yöntemlerinde karşılaşılan dehidrasyon stresi ve osmotik stresin, protein agregasyonuna yol açabildiği rapor edilmektedir. Bu durumun uygun cam oluşturmaların, yüzey aktif maddelerin ve diğer stabilizatörlerin kullanılması bu sorunları en aza indirebilir.

Çizelge 4.8. Kurutma proseslerinin incelenmesi

Yöntem	Formülasyon	Başlangıç bakteriyofaj (log POB)	Kurutma çıkışı bakteriyofaj (log POB)	Proses kaybı (log POB)
Liyofilizasyon	0,3 M sakkaroz + %1 jelatin	12,51	11,92	0,59
Püskürtmeli kurutma	%5 Kazein %15 Maltodekstrin	13,51	11,56 12,28	1,95 1,23
Vakum köpük kurutma	% 15 sığır serum albumini + % 10 sakkaroz	9,93	9,25	0,68

Liyofilizasyon, püskürtmeli kurutma ve vakum köpük kurutma yöntemleri farklı proses ekipman gereksinimi sebebiyle özellikle enerji maliyetinde farklılaşma yaratan proseslerdir. Liyofilizasyon işlemi dondurma ve kurutma süreçlerini birlikte barındırması sebebiyle uzun proses süresine ihtiyaç duyan ve bu sebeple enerji maliyeti görece yüksek bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Buna kıyasla püskürtmeli kurutma anlık gerçekleşen bir süreç olup kurutlacak ürün miktarına bağlı olarak maliyet teşkil etmektedir. Vakum köpük kurutma ise donma işlemine gerek olmaması sebebiyle görece liyofilizasyondan daha ekonomik bir yöntem olarak görünmekle birlikte kesikli bir sistem olması büyük ölçekli üretimler için sürekli sistemlerin tasarlanması gerekliliğini gündeme getirmektedir.

Bakteriyofajların kurutulmasındaki önemli motivasyonlardan biri depolama süre ve sıcaklıklarında sağladığı avantajların yanı sıra taşıma maliyetindeki etkileridir. Depolama süresince en az titre düşüşü gösteren formülasyonlar için seçilen yöntemin, sıvı kütleyi kurutma prosesi sonrası daha kolay ve ekonomik depolama ve taşıma imkanı sunan miktarlara dönüştürme etkinliği incelenmiştir. Bu kapsamda, liyofilizasyon çalışması için 0,3 M sakkaroz ve %1 jelatin çözeltisi ile hazırlanan solüsyonda toplam formülasyon ağırlığı kurutma işlemi sonunda 10 kat azaltılmıştır. Püskürtmeli kurutma çalışması için % 5 kazein için 21 kat ve % 15 maltodekstrin çözeltisi ile hazırlanan formülasyon için 7,7 kat azaltılmıştır. Vakum köpük kurutma işleminde ise % 15 sığır serum albumini + % 10 sakkaroz için 4 kat ağırlık azaltılmıştır.

Bakteriyofajlar protein ve nükleik asitlerden oluştuğu için sıvı halde uzun süreli depolama sırasında aktivitelerini kaybetme riski taşımaktadırlar [207]. Bakteriyofajlar, protein yapılarından dolayı, proteinleri denatüre ettiği bilinen faktörlere karşı hassastır; bunlar arasında yüksek sıcaklıklar, iyonik güç, organik çözücüler, pH ve arayüzey etkileri yer almaktadır. Bakteriyofajların protein kapsidleri olduğundan, bakteriyofaj formülasyonları diğer protein bazlı formülasyonlara makul bir benzerlik taşımaktadır. Proteinlerin sıvı formları genellikle toz formlarından daha kararsızdır [228]. Buna ek olarak bakteriyofajların güvenli bir şekilde doğrudan bir gıda partisine eklenebileceği uygun şekilde seçilmiş sistemler bulmak çok önemlidir. Bakteriyofajların, büyük miktarda yiyeceğin sıvı ortama daldırılması, püskürtülerek veya sıvı olarak eklenebileceği önerilmektedir. Bununla birlikte, böyle bir dağıtım sisteminin daha fazla dezavantajı vardır. Çoğu bakteriyofaj, proses sistemindeki temizlik sırasında yıkama sıvısı ile temas ederek etkisiz hale gelebilmektedir. Ayrıca, bakteriyofajlar doğrudan bir gıda partisine eklendiğinde, iki büyük sorunla karşılaşılabilir: bakteriyofajların seyrelmesi ve bakteri direncinin potansiyel gelişimi. Bu gibi problemlerin önüne geçmenin etkili yollarında biri de bakteriyofajların bir yardımcı malzeme enkapsülendirilerek kuru forma taşınmasıdır. Bu sayede gıda vb. ortamlarda bulunabilecek negatif etkili fiziksel veya kimyasal stres faktörlerinden uzak kalarak canlılıklarını koruyup faaliyetlerinin sürdürebilmektedirler.

Sıvı formlarda karşılaşılan instabilite sorununu ortadan kaldırmak, moleküler hareketlilik, hidroliz ve kontaminasyon riskini azaltmak için kullanılan işlemlerden biri de liyofilizasyondur. Dondurarak kurutma veya liyofilizasyon, proteinler, aşılarda, peptidlerde veya lipozomlar, nanopartiküller ve nanoemülsiyonlar gibi koloidal taşıyıcılar için farmasötik formülasyonlarda uzun vadeli ürün stabilitesini iyileştirmek ve ürün taşıma ve işlemeyi basitleştirmek için yaygın bir uygulamadır. Proteinlerin liyofilizasyonu sırasında, protein yapılarının, fiziksel/kimyasal stabilitelerinin ve sulandırıldıktan sonra çözünme yeteneklerinin yanı sıra liyofilizasyon proses parametrelerinin ve kriyoprotektanların seçiminin dikkate alınması çok önemlidir. Bir diğer yöntem olan püskürtülerek kurutma ile sıvı formlara göre daha iyi termal kararlılık, hafif ve kompakt olması, soğuk zincir nakliyesinin olmaması, nakliye ve depolama maliyetlerinde azalma gibi sunduğu avantajlar nedeniyle özellikle mikroorganizmaları kapsülleyerek kuru toz

üretmek için kullanılan en önemli yöntemlerden biridir. Bakteriyofajlar, sulu çözeltileri ajitasyon, sıcaklık değişimleri, pH yükselmeleri ve denatürantlar gibi streslere maruz kaldığında aktivite kaybıyla karşı karşıya kalmaktadır. Bakteriyofajların uzun süreli depolanması sırasında stabiliteyi korumak için toz formlarının hazırlanması, üzerinde araştırma yapılan ve geliştirilmesi gereken en önemli konulardan biridir. Literatürde çok farklı biyo-preservant ve bakteriyofajın farklı proses koşullarında, farklı sürelerde depolama ve stabilite çalışmaları yapılması sebebiyle ortak düşünce, çalışılan fajların aynı veya benzer familyadan olmasına rağmen kullanılan biyo-koruyucular, konsantrasyonlar ve proses koşulları sebebiyle çalışma özelinde incelenmesi gerektiği belirtilmiştir.

Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde başarılı kurutma tekniğinin seçimi için izlenecek yöntem karakterizasyonu tamamlanmış bakteriyofajlar için seçilen formülasyonlar bileşenlerinin, proses koşullarının, depolama koşullarının bakteriyofaj canlılığına etkilerinin incelenmesi sonucu ortaya konulmasıdır. Kurutma yöntemlerinin kendi avantaj ve dezavantajları değerlendirildiğinde amaca yönelik bir tercih gerçekleştirme imkanı sunulmaktadır. Gıda güvenliği ve kalitesi için kullanıma uygun bakteriyofaj tabanlı ürünlerin ticari olarak faydalı bir stabilite profili sergilemesi için önemli bir talep mevcuttur. Ayrıca, bu ürünlerin uzun vadeli stoklama için saklama ihtiyacı önemli bir zorluk teşkil edebilmektedir. Geliştirilmiş ürün kararlılığı, yalnızca soğuk zincir gereksinimlerine olan ihtiyacı ortadan kaldırmakla kalmamakta, aynı zamanda nakliye, taşıma ve uzun süreli depolama maliyetlerini de azaltabilmektedir. Örneğin, oda sıcaklığında kararlı bir ürün üretmek, soğutma olmadan ulaşılamayan alanlara toplu işleme programlarını kolaylaştıracaktır.

### **4.3. Bakteriyofaj Preparatlarının Gıdalarda Kullanımının İncelenmesi**

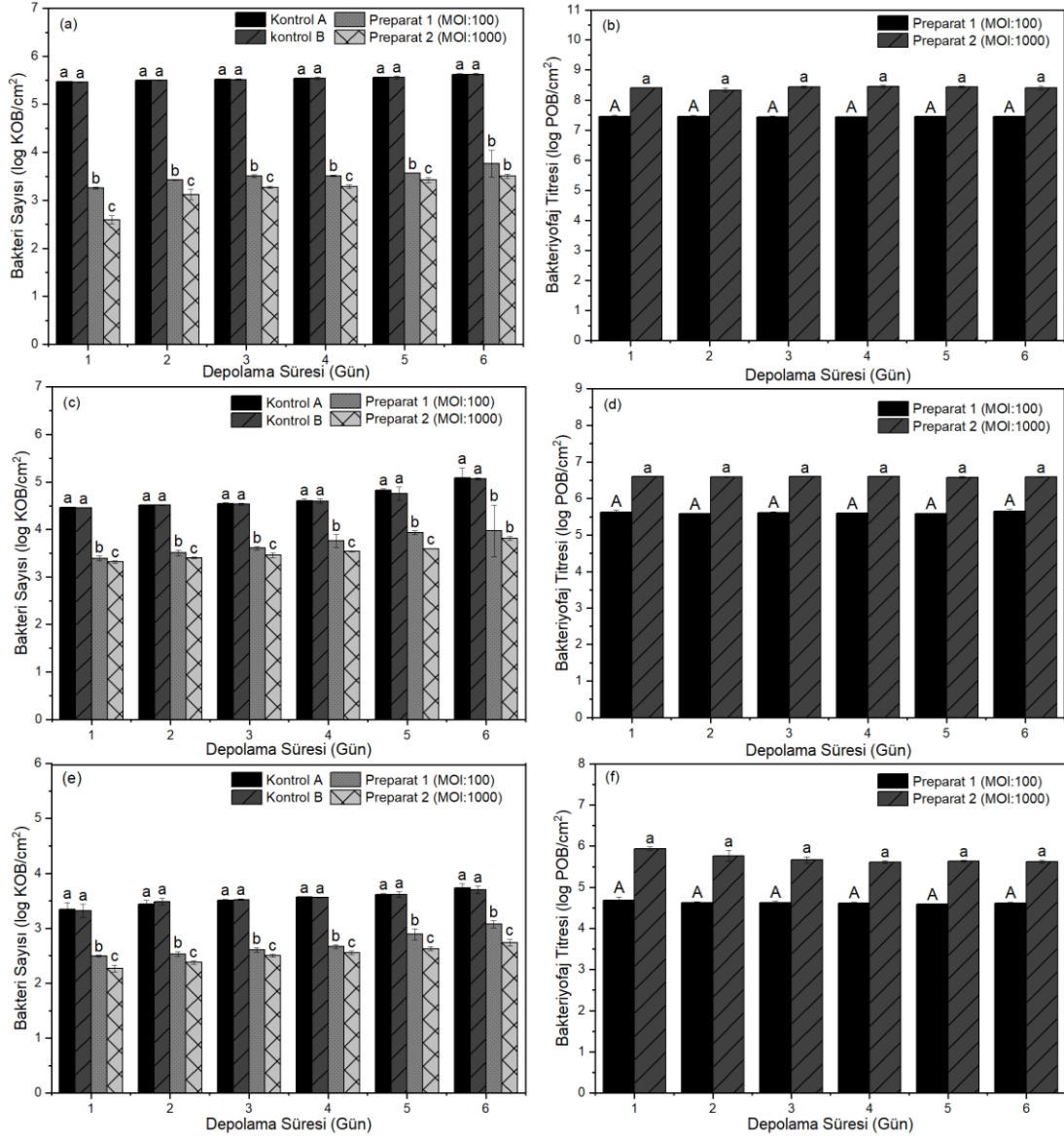
#### **4.3.1. Tavuk Etinde Liyofilize Bakteriyofaj Tozunun Antimikrobiyal Etkinliğinin İncelenmesi**

Tavuk eti, *Salmonella* kontaminasyonu açısından en yüksek riskli gıda gruplarından birini temsil etmektedir. Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'ne (CDC) göre, pazardaki her 25 paket tavuktan 1'inin *Salmonella* ile kontamine olduğu rapor edilmiştir [293]. Bu bağlamda, bu çalışmada kullanılacak çiğ tavuk göğüs etinde

*Salmonella* varlığı diğer tüm analizlerden önce test edilmiş ve satın alınan numunelerin hiçbirinde *Salmonella* tespit edilmemiştir. Bu çalışma kapsamında, 0,3 M sakkaroz jelatin karışımı kullanılarak liyofilizasyon yöntemi ile kurutulan bakteriyofaj preparasyonu kullanılmış ve çiğ tavuk etinde *Salmonella* sayısı üzerinde etkisi incelenmiştir.

Bakteriyofaj tozlarının stabilitesi ve antimikrobiyal etkisinin incelenmesi amacıyla, çiğ tavuk göğüs eti örnekleri  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 6 gün boyunca depolanmış ve bakteriyofaj titresi ile *Salmonella* sayısı izlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, sırasıyla MOI 100 ve 1000 için 6 gün sonunda, yeni hazırlanan liyofilize bakteriyofaj tozları uygulanmış çiğ tavuk etinde *Salmonella* sayısında 1,86 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 2,18 log KOB/cm<sup>2</sup> azalma olduğunu gözlenmiştir (Şekil 4.43a). Şekil 4.43a'da görüldüğü gibi bakteriyofaj tozu uygulanan et örneklerindeki bakteri sayısında, işlem uygulanmayan (kontrol A) ve bakteriyofaj içermeyen kriyoprotektan uygulaması yapılan (kontrol B) örneklerle kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ( $p<0.05$ ) gözlenmiştir. 1 - 6 gün boyunca her gün analiz edilmiştir. Ayrıca depolama süresi boyunca, bakteriyofaj tozları ile muamele edilmiş et örneklerinde bakteriyofaj titresinde istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı ( $p>0,05$ ) gözlenmiştir (Şekil 4.43b).

Liyofilizasyon yöntemi ile kurutulmuş,  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay süreyle depolanmış toz bakteriyofaj örneklerinin antimikrobiyal aktivitesi ve stabilitesi araştırılmıştır. Bu kapsamda,  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  10 ay depolanmış liyofilize bakteriyofaj tozlarının ile muamele edilen çiğ tavuk etinde  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 6 gün depolama sonunda *Salmonella* sayısında MOI 100 ve 1000'de sırasıyla 1,08 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 1,26 log KOB/cm<sup>2</sup> azalma gözlenmiştir (Şekil 4.43c). Benzer şekilde,  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay boyunca depolanan liyofilize bakteriyofaj tozlarının uygulanması yapılan çiğ tavuk etinde *Salmonella* sayısı MOI 100 ve 1000 için sırasıyla 0,66 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 1,00 log KOB/cm<sup>2</sup> azalma gözlenmiştir (Şekil 4.43e). Şekil 4.43c ve Şekil 4.43e'de, bakteriyofaj tozu ile muamele edilmiş et numunelerindeki bakteri sayısında, işlem uygulanmayan numuneye (kontrol A) ve bakteriyofaj içermeyen kriyoprotektan ile işlem gören numuneye (kontrol B) kıyasla depolama süresi boyunca her günde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ( $p<0,05$ ) gözlenmiştir. Ayrıca 6 gün boyunca işlem görmüş et örneklerinde bakteriyofaj titresinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ( $p>0,05$ ) gözlenmiştir (Şekil 4.13d ve Şekil 4.43f).



Şekil 4.43. Çiğ et örneklerine  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 6 gün süreyle uygulanan 0,3 M sakkaroz jelatin ile hazırlanmış bakteriyofaj tozlarının stabilitesi ve antimikrobiyal etkisi. (a) yeni hazırlanmış tozların etkisi, (b) yeni hazırlanmış tozlarının stabilitesi, (c)  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay süreyle depolanan tozların etkisi, (d)  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay boyunca depolanan tozların stabilitesi, (e)  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay süreyle depolanan tozların etkisi, (f)  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay süreyle depolanan tozların stabilitesi. (a), (c) ve (e) için: Her çubuktaki farklı harfler,  $p<0,05$ 'te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkı göstermektedir. (b), (d) ve (f) için: Her çubuktaki farklı harfler,  $p<0,05$ 'te analiz süresi boyunca uygulama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkı göstermektedir.

Daha önceki çalışmalarda, Spricigo ve ark., çiğ tavuk etinde *Salmonella*'nın biyolojik kontrolü için sıvı bakteriyofaj kokteyli kullanılmıştır. Sonuçları, 4°C'de 7 gün içinde *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ve *S. enterica* serovar Enteritidis için sırasıyla 0,9 ve 2,2 log KOB/g azalmanın gözlemlendiğini göstermiştir [294]. Petsong ve ark., yeni hazırlanan dondurularak kurutulmuş bakteriyofaj tozunun çiğ tavuk eti üzerindeki antimikrobiyal aktivitesini araştırmıştır. Yazarlar, dondurarak kurutmanın yardımcı maddesi olarak peynir altı suyu proteini izolatu ve trehaloz karışımını kullanmışlardır. 4°C'de 4 gün içinde çiğ tavuk etinde *S. Enteritidis*'te 0,57 log KOB/cm<sup>2</sup> ve *S. Typhimurium*'da 1,78 log KOB/cm<sup>2</sup>'lik bir azalmanın gözlemlendiğini rapor etmişlerdir [272]. Elde edilen bulgular ışığında, sıvı bakteriyofaj lizatına benzer şekilde liyofilize faj preparasyonunun da çiğ tavuk etinde *Salmonella* kontrolünde başarılı sonuçlar verdiği söylenebilmektedir.

Bu çalışma, yeni hazırlanan ve farklı sıcaklıklarda (4±1°C ve 25±1°C) 10 ay boyunca depolanan çiğ tavuk eti üzerinde uygulanan bakteriyofaj preparatlarının antimikrobiyal aktivitelerini ve stabilitesini karşılaştıran ilk çalışmadır. Toz preparasyonun daha önceki çalışmalarda kullanılan sıvı bakteriyofaj kokteyllerine benzer antimikrobiyal aktivite gösterdiği, aynı zamanda çiğ tavuk eti örneklerinde 4±1°C'de 6 gün boyunca bakteriyofaj titrelerinde önemli bir değişiklik gözlenmediği görülmüştür. Özet olarak, buradaki bulgular, taze tavuk etinin güvenliğini artırmak için bir biyokontrol maddesi olarak liyofilize bakteriyofaj kokteylinin potansiyel kullanımını önermektedir. Ayrıca liyofilizasyon işlemi ile ürünün taşınmasını kolaylaştırması, taşıma ve depolama sırasında stabilitesini sağlaması ve depolama için gerekli alanı azaltması nedeniyle ticari üretiminin başarılı bir formülasyon olacağı öngörülmektedir.

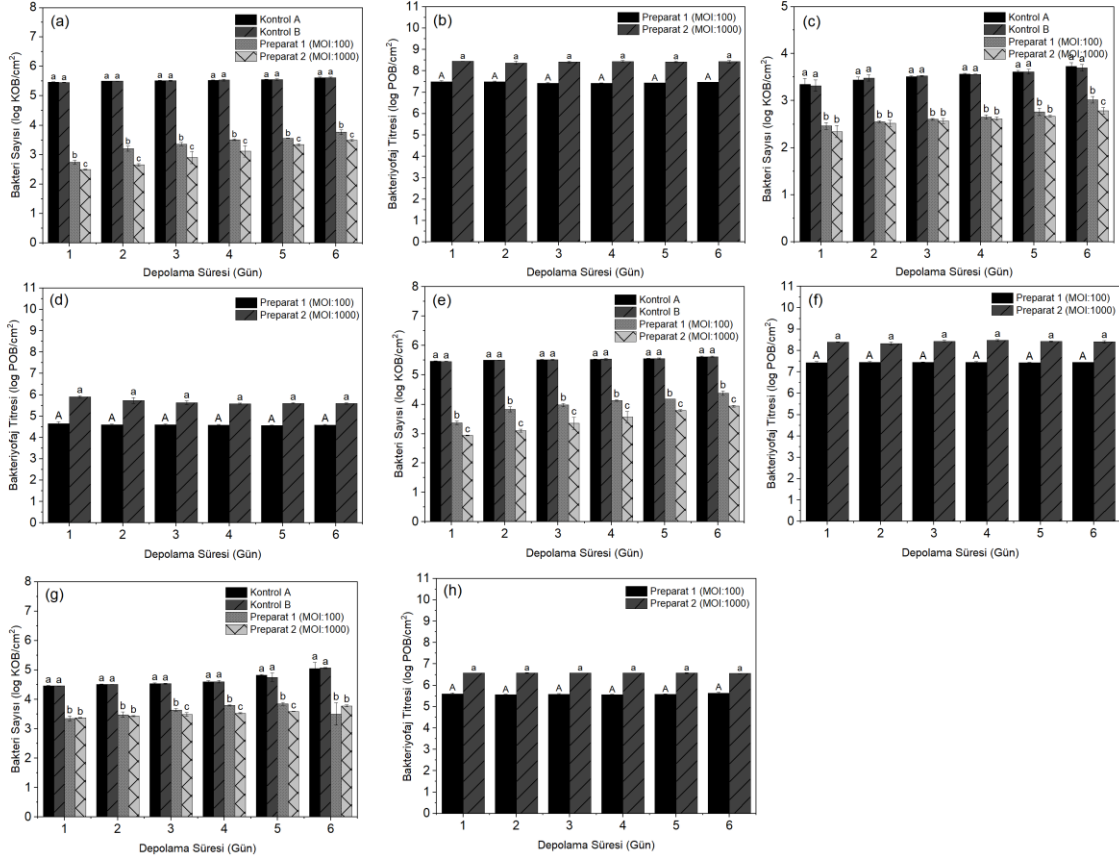
#### **4.3.2. Tavuk Etinde Püskürtülerek Kurutulmuş Bakteriyofaj Tozunun Antimikrobiyal Etkinliğinin İncelenmesi**

Çiğ tavuk göğüs etinin *Salmonella* varlığı açısından yüksek risk grubunu temsil etmesi sebebiyle, tüm numunelerinde *Salmonella* varlığı tüm deneylerden önce test edilmiş ve numunelerin hiçbirinde *Salmonella* tespit edilmemiştir. Bu deney kapsamında, % 15 maltodekstrin ve % 5 kazein kullanılarak püskürtmeli kurutma yöntemi ile üretilen bakteriyofaj preparasyonun çiğ tavuk etinde *Salmonella* biyokontrolü üzerine etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda, çiğ tavuk et örnekleri bakteriyofaj tozları ile muamele



edildikten sonra  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de altı gün süreyle depolanarak bakteriyofaj tozlarının stabilitesi ve antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Elde edilen veriler, püskürtmeli kurutma yöntemi ile yeni hazırlanmış, % 15 maltodekstrin içeren faj tozları ile uygulama yapılmış et örneklerinde MOI 100 ve 1000 için *Salmonella* sayısı sırasıyla 1,85 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 2,13 log KOB/cm<sup>2</sup> azalma olduğunu tespit edilmiştir (Şekil 4.44a). Benzer şekilde, % 5 kazein içeren ile yeni hazırlanmış tozların uygulandığı et örneklerinde sırasıyla MOI 100 ve 1000'de 1,78 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 2,09 log KOB/cm<sup>2</sup> *Salmonella* sayısında azalması gözlemlenmiştir (Şekil 4.44c). Şekil 4.44a ve Şekil 4.44c'de gösterildiği gibi, bakteriyofaj tozu uygulanmış et örneklerinde, işlem uygulanmayan (kontrol A) ve yalnızca ekspiyan uygulanan (kontrol B) örneklere kıyasla bakteri sayısında önemli bir azalma ( $p<0,05$ ) gözlenmiştir. Buna ek olarak, 6 günlük soğuk depolama boyunca bakteriyofaj titresini izlenmiş ve bakteriyofaj tozları ile işlem görmüş et örneklerinde istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı ( $p>0,05$ ) tespit edilmiştir (Şekil 4.44b ve Şekil 4.44d).

Püskürtmeli kurutma yöntemi kurutulmuş ve 10 ay süre ile  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de depolanmış toz bakteriyofaj örneklerinin çiğ tavuk etindeki performansı araştırılmıştır. Bu kapsamda,  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay süreyle depolanmış % 15 maltodekstrin ile hazırlanan toz bakteriyofaj örneklerinin antimikrobiyal aktivitesi ve stabilitesi araştırılmıştır. Sonuçlara göre,  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay depolanan püskürtülerek kurutulmuş bakteriyofaj tozları uygulanması yapılmış ve çiğ tavuk etinde *Salmonella* sayısında MOI 100 ve 1000'de sırasıyla 1,09 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 1,30 log KOB/cm<sup>2</sup> azalma gözlenmiştir (Şekil 4.44e). Benzer şekilde,  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay depolanan % 5 kazein ile hazırlanan püskürtülerek kurutulmuş bakteriyofaj tozlarının uygulanması yapılan çiğ tavuk etinde MOI 100 ve 1000 için sırasıyla 0,72 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 0,95 log KOB/cm<sup>2</sup> *Salmonella* azalması gözlemlenmiştir (Şekil 4.44g). Şekil 4.44e'de, bakteriyofaj tozu uygulanmış et örneklerinde, işlem uygulanmayan (kontrol A) ve yalnızca ekspiyan uygulanan (kontrol B) örneğe kıyasla bakteri sayısında istatistiksel anlamda önemli bir azalma ( $p<0,05$ ) elde edilmiştir. Ayrıca 6 gün süreyle işlem görmüş et örneklerinde bakteriyofaj titresinde önemli bir fark olmadığı ( $p>0,05$ ) gözlenmiştir (Şekil 4.44f ve Şekil 4.44h).



Şekil 4.44. Çiğ et örneklerine  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 6 gün uygulanan bakteriyofaj tozlarının stabilitesi ve antimikrobiyal etkisi. (a) % 15 maltodekstrin ile yeni hazırlanmış tozların etkisi, (b) % 15 maltodekstrin ile yeni hazırlanmış tozların stabilitesi, (c) % 5 kazein ile yeni hazırlanmış tozların etkisi, (d) % 5 kazein ile yeni hazırlanmış tozların stabilitesi, (e) % 15 maltodekstrin ile hazırlanan ve  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay depolanan tozların etkisi, (f) % 15 maltodekstrin ile hazırlanan ve  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay depolanan tozların stabilitesi, (g) % 5 kazein ile hazırlanan ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay depolanan tozların etkisi, (h) %5 kazein ile hazırlanan ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay depolanan tozların stabilitesi, (a), (c), (e) ve (g) için: Her bir çubuktaki farklı harfler,  $p < 0,05$ 'te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında anlamlı bir farkı göstermektedir, (b), (d), (f) ve (h) için: Her çubuktaki farklı harfler,  $p < 0,05$ 'te analiz süresi boyunca uygulama grupları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Literatürde, Spicigo ve ark, çiğ tavuk etinde *Salmonella*'nın biyolojik kontrolü için sıvı bakteriyofaj kokteyli kullanmıştır. Elde edilen sonuçlarda,  $4^{\circ}\text{C}$ 'de 7 gün içinde *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ve *S. enterica* serovar Enteritidis için sırasıyla

0,9 ve 2,2 log KOB/g azalmanın gözlemlendiğini rapor etmiştir [294]. Literatür çalışmalarından elde edilen bilgiler ışında bu çalışmaya kadar, gıdaların biyokontrolü için püskürtülerek kurutulmuş bakteriyofaj tozunun kullanıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Püskürterek kurutulmuş bakteriyofaj tozu çalışmaları genellikle depolama aktivitesine ve uzun süreli depolama veya taşıma verimliliğine odaklanmıştır.

Son yıllarda ilaç endüstrisinde kullanılan yüksek oranda solunabilir bakteriyofaj tozu üzerine yapılan çalışmalar ile bu alandaki araştırmalar hız kazanmıştır. Ancak bu çalışmaların gıda numunelerindeki toz preparasyonların etkinliğinin izlenmesi, gıda güvenliği ve biyokontrol amaçlı geliştirilen ticari preparasyonların form aktivitesi, maliyet ve depolama verimliliğinden faydalanmak için kritik bir rol oynamaktadır. Bu nedenle bu çalışma, taze olarak üretilen ve farklı koşullarda belirli bir süre depolanan püskürtülerek kurutulmuş toz faj örneklerinin gıda üzerindeki etkinliğini ortaya koyması nedeniyle ilk ve yenilikçi bir özellik taşımaktadır. Bu çalışma, yeni hazırlanan ve farklı sıcaklıklarda ( $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) 10 ay boyunca depolanan püskürtmeli kurutma ile kurutulmuş bakteriyofaj tozlarının çığ tavuk etinde üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini ve stabilitesini karşılaştıran ilk çalışmadır. Püskürterek kurutulmuş bakteriyofaj örneklerinde antimikrobiyal etkide gözlenen bu başarı, ticari preparasyonun geliştirilmesi, taşınması, kısa ve uzun süreli saklanması açısından birçok avantajı beraberinde getirmektedir. Püskürtmeli kurutma ile elde edilen etkinliğin artırılması için gıda tüketici kabul kriterlerini etkilemeyecek, kolay temin edilebilir ve ucuz yardımcı maddelerin optimum formülasyonuna yönelik çalışmalar teşvik edilmelidir.

Bu çalışmada, *Salmonella* bakteriyofajlarında kullanılacak ve gıda ile uyumlu dört farklı ekispiyanın üç farklı konsantrasyonu kullanılarak püskürtmeli kurutma uygulanmıştır. En başarılı yardımcı madde  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 12 ay depolanamada % 15 maltodekstrin ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 12 ay depolamada % 5 kazein olarak belirlenmiştir.  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 6 gün süreyle depolanan çığ tavuk eti numuneleri üzerinde yeni hazırlanan ve 10 aylık boyunca depolanmış bakteriyofaj tozlarının antimikrobiyal aktivitesi ve stabilitesi değerlendirilmiştir. Toz preparasyonun daha önceki çalışmalarda kullanılan sıvı bakteriyofaj kokteyllerine benzer antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve aynı zamanda çığ tavuk eti örneklerinde  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 6 gün boyunca bakteriyofaj titrelerinde önemli bir

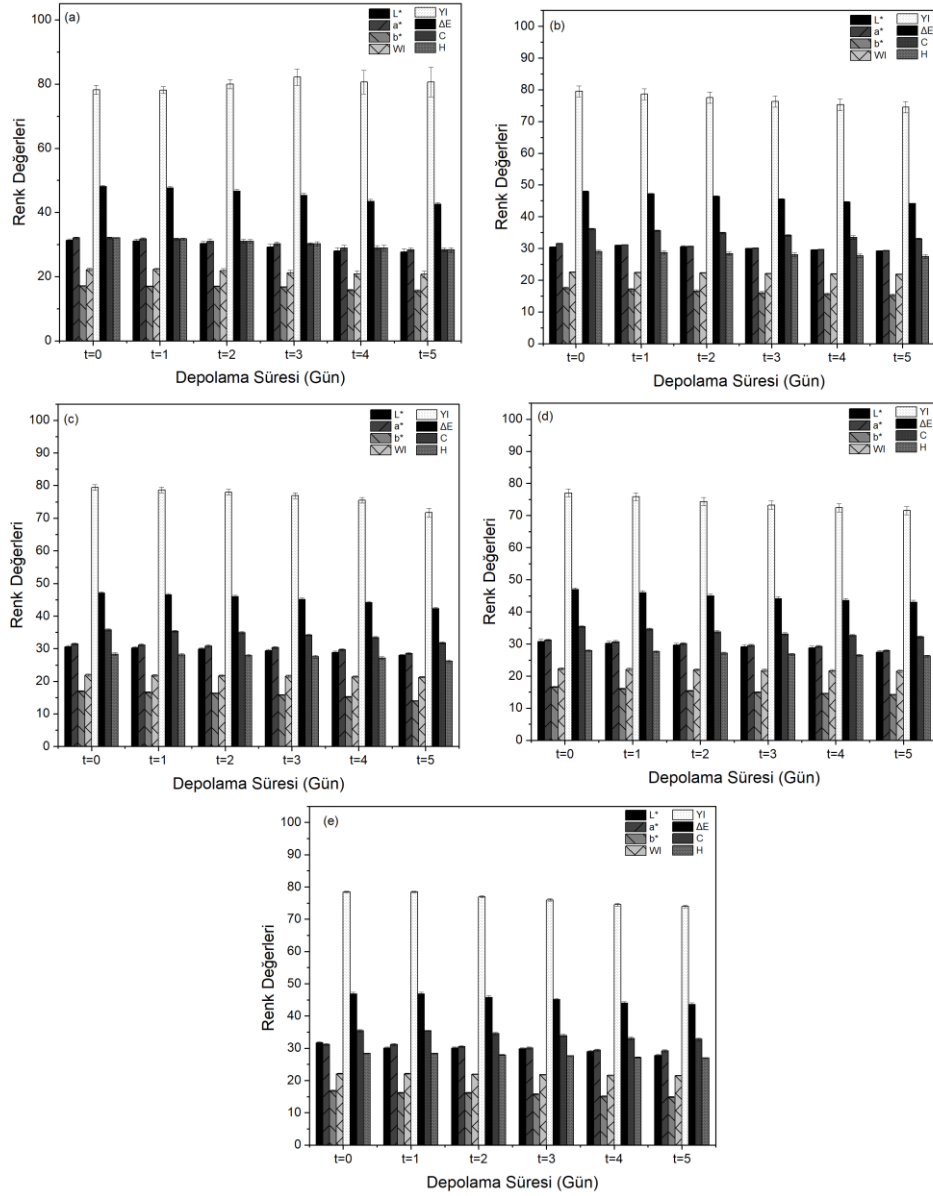
değişiklik gözlenmediği görülmüştür. Buradaki sonuçlar, püskürtülerek kurutulmuş faj kokteylinin, taze tavuk etinin güvenliğini artırmak için bir biyokontrol ajanı olarak etkili bir yöntem olabileceğini göstermektedir. Püskürterek kurutma işlemi ile ekonomik ve fiziksel zorluklar önleneceği gibi, ürünün nakliye ve depolama sürecindeki kararlılığı ve etkinliği de korunacaktır.

### **4.3.3. Çileklerde *Salmonella*'nın Biyokontrolü için Bakteriyofaj Temelli Yenilebilir Kaplama Kullanımının İncelenmesi**

#### **4.3.3.1. Çilek Kalitesinin Değerlendirilmesi**

Kaplama malzemelerinin çilek kalitesi üzerindeki etkilerini incelemek için depolama süresince renk, pH ve titre edilebilir asitlik parametreleri test edilmiştir. Çilek rengi, tüketicinin taze çileği kabul etmesi için en önemli özelliklerden biridir ve çilek örneklerimizin dış rengindeki değişiklikler  $L^*$ ,  $a^*$  (yeşil/kırmızı),  $b^*$  (mavi/sarı), beyaz indeks (WI), sarı indeks (YI),  $\Delta E$ , kroma (C) ve H değerleri kullanılarak izlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.45'te sunulmuştur.

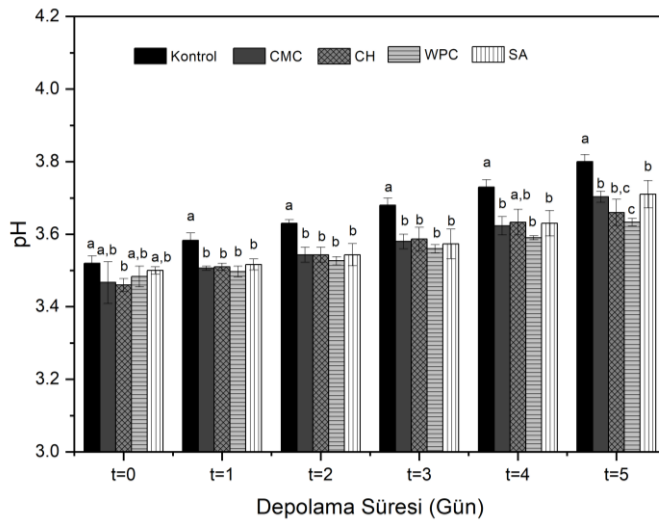
$L^*$  ve H değerlerindeki düşüş, çilek örneklerinin yüzey renginin koyulaştığının bir göstergesidir [278].  $a^*$  ve  $b^*$  değeri, çilek numunelerinin yeşilden kırmızıya ve maviden sarıya değerlerini temsil etmektedir. Başlangıç aşamasında ( $t=0$ ), hem kontrol numuneleri hem de kaplanmış numuneler benzer  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , WI, YI,  $\Delta E$ , C ve H değerlerine sahiptir. Kontrol numunelerinde,  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , C, WI ve  $\Delta E$  değerleri kademeli olarak azalırken, YI değeri kaplamalı numunelere göre çok daha yüksek oranda depolama süresince yavaş bir şekilde artmıştır. Peynir altı suyu tozu konsantratu kaplı numuneler, kontrol numuneleri ve diğer kaplama malzemeleri ile kaplanmış numunelere göre  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , C, WI ve  $\Delta E$  değerlerinde biraz daha yüksek bir düşüş ve YI değerinde biraz daha yüksek bir artış göstermiştir. Bu durum literatürdeki diğer çalışmalara benzer şekilde, depolama sonunda kaplanmış ve kaplanmamış tüm çileklerde düşük hue ve kroma değerleri elde edilmesine rağmen kaplanmış ve kaplanmamış örneklerde kroma ve hue açıları değişmemiştir. Renkteki azalma, daha az canlı renklere doğru bir kayma olduğunu göstermektedir. Biyopolimerler ve kontrol numunesi arasında beşinci günde C değeri açısından önemli bir fark yoktur ( $p>0,05$ ), bu durum literatürdeki diğer çalışmalarda elde edilen sonuçlara benzerdir [278, 295].



Şekil 4.45. Yenilebilir kaplama işlemlerinin buzdolabında saklama sırasında  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , H, WI, YI,  $\Delta E$ , C ve H değerlerine etkisi. (a) kontrol numuneleri, (b) peynir altı suyu proteini konsantresi ile muamele edilmiş numuneler, (c) karboksümetil selüloz ile muamele edilmiş numuneler, (d) kitosan ile muamele edilmiş numuneler, (e) sodyum aljinatla muamele edilmiş numuneler.

Farklı yenilebilir kaplamaların çileklerin pH'ı üzerindeki etkisi Şekil 4.46'da gösterilmektedir. Bu sonuçlar, çilek meyvesinin pH değerinin depolama süresince arttığını ve kaplanmamış örneklerde kaplanmış örneklere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir. Tüm meyvelerde, başlangıç pH yaklaşık 3,5 iken ve beşinci günde kontrol,

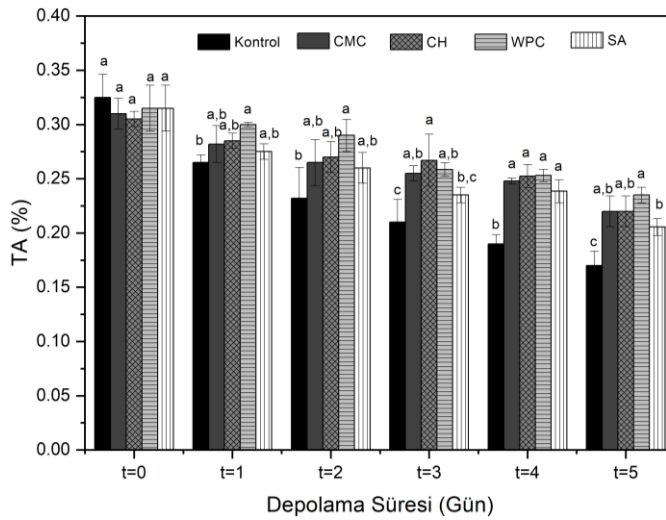
karboksümetil selüloz (CMC), kitosan (CH), peynir altı suyu protein konsentratı (WPC) ve sodyum aljinat (SA) kaplı numuneler için sırasıyla  $3,80 \pm 0,01$ ,  $3,70 \pm 0,02$ ,  $3,66 \pm 0,04$ ,  $3,62 \pm 0,02$  ve  $3,71 \pm 0,1$ 'e yükselmiştir. Sıfırındaki pH seviyeleri açısından, işlenmiş numuneler arasında anlamlı bir fark yoktur ( $p > 0,05$ ). Beş günlük depolamadan sonra elde edilen sonuçlar, pH değerinin tüm işlemler için depolama süresi boyunca önemli ölçüde arttığını göstermiştir ( $p < 0,05$ ). Tüm biyopolimerler arasında, WPC kaplama, beş günlük depolamadan sonra pH'ta en az artışı göstermiştir. Beşinci günde WPC ile muamele edilmiş numunelerin ve diğer biyopolimerlerin ve kontrol numunesinin pH seviyeleri arasında önemli farklılıklar ( $p < 0,05$ ) vardır. Bu sonuçlar, kontrol numunelerinde WPC kaplı numunelere göre daha yüksek bir pH artışı bildiren önceki çalışmalarla uyumludur. Literatürdeki diğer çalışmalarda farklı kaplama malzemeleri için de benzer sonuçlar elde edilmiştir [295-297].



Şekil 4.46. Depolama sırasında farklı yenilebilir kaplamaların çilek meyvesinin pH'ına etkisi. Her çubuktaki farklı harfler,  $p < 0,05$ 'te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Farklı kaplama malzemelerinin çileklerin titrasyon asitliği (TA) içeriği üzerindeki etkisi Şekil 4.47'de gösterilmektedir. Çilek numunelerinin TA değeri sitrik asit (%) olarak ifade edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, depolama süresince kontrol ve kaplanmış çilek örneklerinin TA değerlerinde bir düşüş olduğunu ortaya koymuştur. TA değerlerindeki bu değişiklikler, kontrol numuneleri için  $0,33 \pm 0,02$  ile  $0,17 \pm 0,01$ , CMC ve CH

numuneleri için %  $0,31 \pm 0,01$  ile %  $0,22 \pm 0,01$ , WPC için %  $0,32 \pm 0,02$  ile %  $0,24 \pm 0,01$  ve SA numuneleri için %  $0,32 \pm 0,02$  ile %  $0,21 \pm 0,01$  arasında değişmektedir. Sonuçlara göre, kaplanmış meyveler kontrol örneklerinden daha yüksek TA'ya (%) sahiptir. TA, esas olarak sitrik ve malik asitten oluşan çilek meyvesinin organik asit içeriğini temsil etmektedir [295]. Depolama sırasında pH ve TA değerini düzenleyen faktör, çeşitli metabolik yollarda tüketilen organik asitlerdir. Çalışmamızda depolama süresince tüm kaplanmış örneklerde TA değeri düşmüştür. Bu azalma kontrolde kaplamalı meyvelere göre daha yüksek düzeyde gözlenmiştir. TA düşüş grafikleri incelendiğinde en az düşüşün WPC ile kaplanmış çilek örneklerinde gözlemlendiği görülmüştür. Depolama sırasında meyve örneklerinin solunum mekanizması nedeniyle daha yüksek asitlik kaybının meydana gelebileceğini bildiren önceki çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilmiştir. Yenilebilir kaplama, kaplama malzemelerinin özelliklerine bağlı olarak bu kaybı bir dereceye kadar sınırlayabilmektedir [295-297].



Şekil 4.47. Depolama sırasında farklı yenilebilir kaplamaların çilek meyvesinin TA üzerindeki etkisi. Her çubuktaki farklı harfler,  $p < 0,05$ 'te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Bu çalışma kapsamında 5 günlük bir depolama süresi seçilmiş ve çilek örnekleri  $4 \pm 1^\circ\text{C}$  sıcaklıkta saklanmıştır. Raf ömrü çalışmalarında, depolama ortamı ve depolama süresi büyük farklılıklar göstermektedir. Bu çalışma, farklı kaplama malzemelerinin kullanıldığı benzer çalışmalarda kullanılan saklama koşulları dikkate alınarak tasarlanmış ve 5-10 gün

gibi saklama süreleri belirlenmiştir [298-300]. Vargas ve ark., taze çileğin düşük sıcaklıklarda (0-4°C) raf ömrünün genellikle 5 gün civarında olduğunu belirtmişlerdir [301]. Kitosan bazlı yenilebilir kaplamaların, depolama sırasında meyvenin mekanik özelliklerinin ve renginin daha iyi korunmasına neden olduğunu gösterdiler. Benzer şekilde Luo ve ark., 5 gün boyunca soğuk depolama sırasında çileklerde antioksidan bozunma kinetiği 4 °C’de soğutulmuş çileğin raf süresi üzerine fukoidan bazlı yenilebilir kaplamayı incelediler ve *Laminaria japonica* (FL) ve karboksimetil FL’den elde edilen fukoidanın koruyucu etki, endojen antioksidan kapasitede bastırılmış azalma ve uzun süreli olduğunu buldukları rapor edilmiştir [298]. Bu çalışmada sadece tek bir sıcaklık ve süre incelenmiş olsa da çilek tedarik zincirinde kullanılan farklı depolama sıcaklıkları ve sürelerinin daha detaylı incelenmesinin farklı kaplama biyopolimerlerinin etkinliği açısından önemli sonuçlar doğuracağı öngörülmektedir.

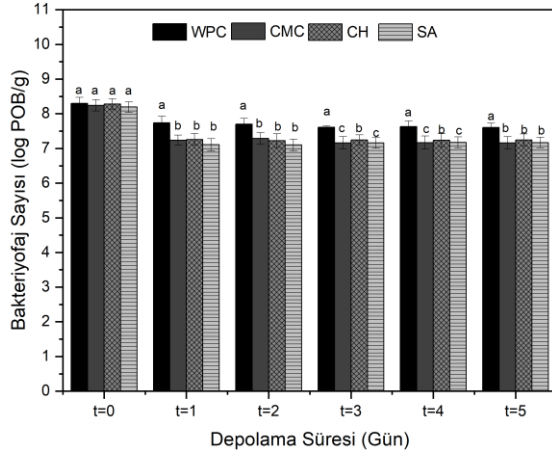
#### **4.3.3.2. Mikrobiyal Analizlerin Değerlendirilmesi**

Çilek numuneleri her numune grubundan rastgele seçilmiş ve çalışmada kullanılan çilek numunelerinde *Salmonella* varlığını test etmek için analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre satın alınan numunelerin hiçbiri *Salmonella* içermemektedir. Bu çalışmada, farklı enkapsülasyon biyopolimerleri ile kaplanmış bakteriyofaj kokteylinin bakteriyofaj stabilitesi ve antimikrobiyal etkisi incelenmiştir.

Şekil 4.48’de buzdolabında saklama sırasında aktif bakteriyofaj sayısındaki değişimi göstermektedir. Her bir malzeme grubunda sıfır gününe ait değerlerle yapılan karşılaştırma, depolama sırasında tüm kaplama malzemeleri için bakteriyofaj aktivitesinin önemli ölçüde ( $p<0,05$ ) azaldığını göstermiştir. Beş günlük buzdolabında saklama süresi boyunca, WPC, CMC, CH ve SA kaplamalarında sırasıyla 0,7 log POB/g, 1,1 log POB/g, 1,0 log POB/g ve 1,0 log POB/g birim azalma gözlenmiştir. Seçilen biyopolimerler arasında, bakteriyofaj yüklü WPC kaplaması, 1-5 gün boyunca günde diğer kaplamalara göre önemli ölçüde daha yüksek faj sayıları ( $p<0,05$ ) sergilemiştir. Bu, WPC kaplamaya yüklenen bakteriyofaj sayısının diğerlerine yüklenenden daha yüksek olduğunu göstermektedir. Kitosandaki faj aktivitesinin kaybı, kitosanın daha önce bildirilen ve daha fazla araştırılması gereken antiviral etkisinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir [302]. Çilek, sitrik asidin ana bileşen olduğu, pH değeri 3,5



civarında olan asidik bir meyvedir. Yapısı gereği serbest bakteriyofajlar fizyolojik aralıklarında değilse canlılıklarını kaybedebilirler. Bununla birlikte, yenilebilir kaplama, bu çevresel stres faktörleri için bakteriyofajların gelişmiş stabilitesini sağlayabilir.

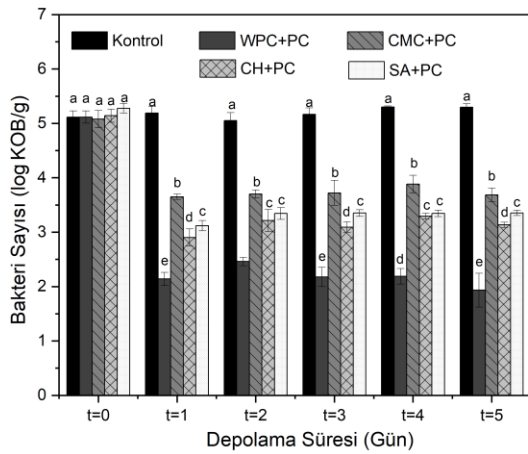


Şekil 4.48. Yenilebilir kaplanmış çilek örneklerinin bakteriyofaj stabilitesi. Her çubuktaki farklı harfler,  $p < 0,05$ 'te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

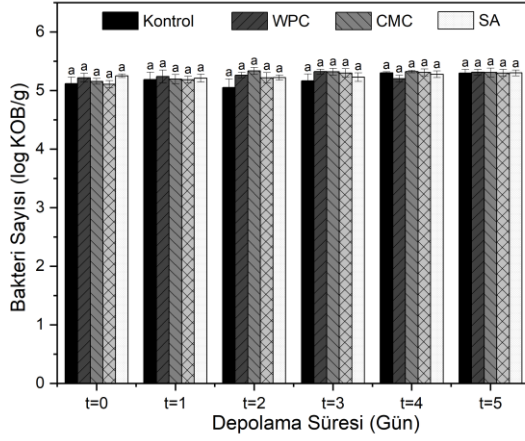
Gıda örneklerinde bakteriyofajların stabilitesi ile ilgili çok az çalışma vardır. Bunlardan biri faj konsantrasyonlarında 1 veya 2 log-birim artış [45, 303] bildirirken, diğerleri meyveler için 1 veya 2 log-birim azalma ve hatta inaktivasyon bildirmiştir [69, 77]. Bunlar genellikle pH veya ikincil bitki bileşenlerine (organik asitler, tanenler, vb.) atfedilmektedir [304]. Öte yandan taze numune yüzeylerinde bakteriyofaj stabilitesi için zıt sonuçlar elde eden çalışmalar da mevcuttur [304, 305]. Ayrıca, başarılı sonuçlar alınan araştırmalar, yenilebilir kaplama uygulamalarının, nispeten düşük pH gösteren gıda numunelerinde bakteriyofaj aktivitesindeki azalmayı sınırlamaya yardımcı olduğunu bildirmiştir [140]. Kaplama malzemelerinin bakteriyofaj inaktivasyonunu sınırladığı ve asidik bileşenlerin hareketliliğini sınırlaması nedeniyle olumsuz etkilere neden olduğu tahmin edilmektedir. Bu çalışmada kapsamında da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Daha önceki araştırmalarda farklı matrisler ve bakteriyofajlar kullanılarak kaplama çalışmaları yapılmış ve fajların stabilitesi araştırılmıştır. Bu çalışmaların çok azı gıda sistemleri üzerinde test edilmiştir [140, 149, 152, 154]. Vonasek ve ark., dilimlenmiş salatalıklarda, dilimlenmiş elmalarda ve bütün çeri domateslerde *E. coli*'yi azaltmak için peynir altı suyu proteini izolatu yenilebilir film kullanmıştır. Tomat ve ark., et numunelerinde *E. coli* için

WPC yenilebilir film kullanmış ve Amarillas ve ark., domateslerde *E. coli* için kitosan yenilebilir film kullanmıştır.

Bu çalışmada, bakteriyofaj kokteyli olan ve olmayan WPC, CMC, CH ve SA'nın yenilebilir bir film ile kaplanmış çilek numunelerine *Salmonella* kokteyli inokülasyonu, sıfır günü olarak da adlandırılan kaplama işleminden hemen sonra yapılan plak sayımları ile değerlendirilmiştir. Kaplanmamış çileklerin ve bakteriyofaj içermeyen kaplanmış numunelerin toplam yaşayabilir koloni sayısı, depolama sırasında  $\sim 10^5$  KOB/g'da nispeten sabit bir konsantrasyon seviyesinde tutulmuştur. Beş günün sonunda, bakteriyofaj yüklü dört farklı biyopolimer kullanılarak hazırlanan kaplamalarda, kontrol örneğine göre bakteri yükünde farklı oranlarda daha fazla azalma gözlenmiş ve bakteriyofaj yüklü kaplamanın önemli bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Çilek numunelerinde *Salmonella* üzerindeki bakteriyofajların antimikrobiyal aktivitesi Şekil 4.49'de gösterilmektedir. Bakteriyofaj içermeyen kaplanmış çilek numuneleri ile kontrol numuneleri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ) (Şekil 4.50).



Şekil 4.49. Bakteriyofaj yüklü kaplama yapılmış çilek örneklerinin antimikrobiyal aktivitesi. Kontrol: kaplanmamış ve *Salmonella* aşılansmış örnekler, PC: bakteriyofaj kokteyli, WPC+PC, CMC+PC, CH+PC, SA+PC: bakteriyofaj yüklü yenilebilir kaplamalı numuneler. Her çubuktaki farklı harfler,  $p<0,05$ 'te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.50. Bakteriyofaj içermeyen yenilebilir kaplı çilek örneklerinde *Salmonella* sayısı değişimi. Kontrol: kaplanmamış ve *Salmonella* aşılınmış örnekler. WPC, CMC, CH, SA: bakteriyofaj içermeyen yenilebilir kaplamalı örnekler. Her çubuktaki farklı harfler,  $p>0,05$ 'te aynı analiz günü içinde uygulama grupları arasında anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir.

İstatistiksel analize göre, kontrol ve bakteriyofaj içermeyen kaplamalı çilek örnekleri arasında beş günlük buzdolabında saklama süresince *Salmonella* sayıları açısından önemli bir fark yoktur ( $p>0,05$ ) (Şekil 4.49). Bu bölümde kaplanmamış inoküle edilmiş grup kontrol olarak kullanılmıştır. Aynı şekilde bakteriyofaj içermeyen duvar malzemesi ile kaplanmış çilek örnekleri ile kontrol örnekleri arasında beş günlük depolama süresince *Salmonella* sayıları açısından önemli bir fark gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ) (Şekil 4.50). Ancak sıfır gününe ait değerlerle karşılaştırıldığında ( $p<0,05$ ), bakteriyofaj yüklü kaplama malzemeleri ile kaplanmış çilek örneklerinde *Salmonella* sayısının depolama boyunca tüm biyopolimerler için önemli bir düşüş gösterdiği görülmüştür. Ayrıca, depolama sırasında bakteriyofaj yüklü kaplama malzemeleri ile kaplanmış çilek numunelerinde *Salmonella* sayısında kontrol numunelerine göre önemli ölçüde daha yüksek bir azalma gözlenmiştir ( $p<0,05$ ). En yüksek antimikrobiyal etki, 3,1 log KOB/g azalma ile WPC'nin kullanıldığı kaplanmış örneklerde gözlenirken bunu 2,0 log KOB/g ile kitosan, 1,9 log KOB/g ile sodyum aljinat izledi ve 1,4 log KOB/g ile karboksimetil selüloz takip etmektedir (Şekil 4.49). Önceki çalışmaların bulgularına benzer şekilde, elde edilen sonuçlar WPC, CMC, CH ve SA kaplamaların gıda yüzeylerinde patojen büyümesini kontrol edebileceğini ortaya koymuştur [140, 149, 306]. Seçilen

biyopolimerler arasında, bakteriyofaj yüklü WPC kaplanmış örnekler, 1-5 gün boyunca günlük olarak diğer kaplamalar ve kontrol numunelerine göre *Salmonella* sayısında daha önemli bir azalma ( $p<0,05$ ) meydana getirmiştir.

Kaplama biyopolimerine yüklenen bakteriyofaj kokteylinin antimikrobiyal aktivite gösterebilmesi için ortamda bulunabilecek hedef mikroplarla fiziksel temas halinde olması kritiktir. Çilek numuneleri bakteriyofaj yüklü kaplama biyopolimerleri ile kaplandıktan sonra, bakteriyofajın çilek numuneleri üzerine yayılan bakteriyel konakçıları saldırdığı ve enfekte ettiği tahmin edilmektedir. Bu çalışmada bakteriyofaj yüklü kaplama malzemeleri ile kaplanan çilek örneklerinde *Salmonella* sayısının değişen oranlarda azaldığı görülmüş ve en etkili azalmanın WPC biyopolimer kullanımı ile elde edildiği görülmüştür. Öte yandan, bakteriyofaj içermeyen biyopolimer örneklerinde *Salmonella* sayısında önemli bir düşüş gözlenmemiştir. Özellikle birinci günün sonunda kaplama biyopolimerlerine yüklenen bakteriyofaj kokteyli ile muamele edilen çilek örneklerinde bakteri sayısında önemli bir azalma gözlenmiş ve en etkili biyopolimer WPC olmuştur. Depolamayı takip eden günlerde antimikrobiyal aktivitede artış gözlenmezken, bakteri sayısında ilk güne göre hafif bir düşüş gözlenmiştir. Bu durum, fajların biyopolimer içerisinde ve çilek örneklerinin yüzeyinde difüzyonu nedeniyle kaplama biyopolimerine yüklenen fajlarla bakterilerin etkileşiminin azalmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, optimum çalışma sıcaklığı olan 37 °C'nin altında olması nedeniyle, soğuk depolamanın fajın aktivitesini sınırlayan faktörlerden biri olabileceği düşünülmektedir. Hızlı ve etkili difüzyon ve bakteriyofaj-bakteri etkileşimi için kaplama malzemesi, kaplama yöntemi ve faj-kaplama etkileşimi konularında araştırmaların ilerletilerek başarının artırılacağı sonucuna varılmıştır. Bu çalışmanın farklı parametreler (farklı ortamlar, makro ve mikro ölçekler, bağıl nem, sıcaklık ve paketlenme ortamı) kullanılarak yürütülmesi, duyuşal ve tekstür profil analizlerinin yapılması ve bu dinamik süreçlerin gösterilmesi bakteriyofajların etkinliğinin büyük ölçekte ortaya çıkarılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışma kapsamında, çilek örnekleri kullanılarak dört farklı enkapsülasyon biyopolimeri ile kaplanmış faj kokteylinin bakteriyofaj stabilitesi ve antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Depolama süresince kullanılan biyopolimerlerin renk, pH, titre edilebilir

asitlik, bakteriyofaj stabilitesi ve antimikrobiyal etki sonuçları karşılaştırmalı olarak incelendiğinde, en başarılı sonuçların WPC kullanılan örneklerde alındığı görülmüştür. Meyvelerin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik kalitesinin arttırılmasında etkili bir yöntem olan yenilebilir kaplamanın bakteriyofajlar kullanılarak muhafaza süresince uygulanması ile başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Şimdiye kadar elde edilen bilgiler ışığında, bakteriyofaj kullanılan WPC, CMC, CH ve SA yenilebilir film kaplamaların gıda sisteminde *Salmonella* biyokontrolü için performansı ile ilgili literatürde başka bir çalışma yapılmamıştır. Elde edilen sonuçlara göre bakteriyofaj yüklü yenilebilir kaplamaların taze çilek örneklerinde *Salmonella* sayısında kademeli bir düşüşe neden olduğu görülmektedir. Seçilen biyopolimerler, taze çilek numunelerinde fajların antimikrobiyal aktivitesini engellememiştir. Seçilen biyopolimerler arasında bakteriyofaj etkinliğinin en başarılı şekilde korunduğu ve *Salmonella* sayısının en çok azaldığı kaplama grubu WPC olarak bulunmuştur. Farklı biyopolimerlere sahip yenilebilir kaplamaların, buzdolabında muhafaza edilen çilek numuneleri üzerindeki bakteri popülasyonunu azaltmada etkili olduğu bulunmuştur.

## 5. YORUM

Bakteriyofaj uygulamalarının en önemli zorluklarından biri, uzun vadeli stabilite ve etkiyi koruyan, gıda örneklerine uygulanabilir bir forma dönüştürmektir. Başlangıçta, bakteriyofaj formülasyonları, depolama sonrasında raf ömürlerini, güvenliklerini ve güçlerini sınırlayan sıvı süspansiyonlar olarak hazırlanmakta ve sıvı dozaj formları genellikle 2–8°C’de soğuk sıcaklıkta saklama ve soğuk zincirle taşıma gerektirmektedir. Tipik olarak proteinler, sulu çözeltilerdeki sıcaklık, pH, iyonik güç, ajitasyon, arayüzlere maruz kalma, mikrobiyal kontaminasyon riski ve suyla ilgili kimyasal bozunma dahil olmak üzere fiziksel streslere karşı hassasiyetleri nedeniyle kuru halde çözelti halinde olduğundan daha karardır. Kuru toz halindeki formülasyon tipik olarak daha uzun bir raf ömrüne sahiptir, nakliye ve depolama koşullarında daha fazla esneklik sağlamaktadır. Literatürde, dondurarak ve püskürtülerek kurutulmuş bakteriyofajların, yeniden süspansiyon edildikten sonra farklı depolama koşullarında canlılıklarını koruduğu ve aynı süre boyunca depolanan sıvı formülasyonlardan daha kararlı olduğunu gösterilmiştir. Bu formülasyonlarda, kurutma yardımcı maddeleri, seçilen proses koşulları, yöntemleri, uygulama yapılacak bakteriyofajın özellikleri toz halindeki ürünün stabilitesini büyük ölçüde etkilemektedir. Dehidrasyon işlemi sırasında, suyun proteinin yerel ortamından kademeli olarak uzaklaştırılması, proteinin açılmasını ve ardından agregasyonu (tersinir veya geri döndürülemez) ve kimyasal bozunmayı indükleyebilmektedir. Liyofilizasyon işleminde, düşük sıcaklık, yerel aşırı doygunluk, pH ve iyonik güçteki değişiklikler ve buzlu su, buzlu hava ve su-havadan kaynaklanan arayüzey gerilimleri dahil olmak üzere gerilimlere maruz kalabilmektedir. Buna karşılık, püskürterek kurutma işlemi, yüksek sıcaklıklarda kararsızlığa neden olmakta ve liyofilizasyonda bulunmayan püskürterek kurutma memesinin titreşimiyle mekanik bir stres oluşturmaktadır. Farklı eksojen ve kriyoprotektanların kullanımı ile bu streslerin azaltılarak bakteriyofajların canlılıklarının proses süresi ve sonrasındaki depolama sürecinde stabilizasyon ve koruma sağladığı görülmüştür.

Mevcut tez çalışmasının ilk bölümünde, dondurarak kurutma (liyofilizasyon), püskürtmeli kurutma ve vakum küpük kurutma yöntemleri ile bakteriyofajların kurutulması, kurutma proses etkisinin izlenmesi ve depolama stabilitesinin incelenmiştir.

Bu amaçla farklı kriyoprotektanlar (sakkaroz, mannitol, PEG 8000 ve sakkaroz jelatin karışımı) kullanılarak hazırlanan liyofilize bakteriyofaj tozlarının iki farklı sıcaklıkta ( $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) depolama etkinlikleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Liyofilizasyon işlemi sırasında, kullanılan tüm kriyoprotektanlar için bakteriyofaj titresinde 0,59-2,35 log POB arasında bir azalma gözlenmiştir. Liyofilize bakteriyofaj tozlarının başlangıç  $a_w$  değerleri 0,04-0,10 aralığında bulunmuştur. Ortalama partikül çapları 328 nm ile 642,8 nm arasında elde edilmiştir. 12 aylık depolama boyunca farklı kriyoprotektanların bakteriyofaj stabilitesi incelemesi sonunda  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de depolanan sıvı bakteriyofaj numuneleri sırasıyla 2,50 ve 4,62 log birim titre kaybı göstermiştir. Sıvı bakteriyofaj kokteyli, depolama sıcaklığından bağımsız olarak tüm liyofilize bakteriyofaj tozlarından önemli ölçüde daha yüksek titre kaybı ( $p<0,05$ ) sergilemiştir. 0,3 M sakkaroz jelatin karışımı kullanılarak hazırlanan liyofilize bakteriyofaj tozları,  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de sırasıyla 1,09 ve 2,79 log birim azalma ile 12 aylık depolama için en yüksek stabiliteyi gösterirken, geri kalan kriyoprotektanların daha az kararlı olduğu ve titrelerinde daha yüksek bir düşüş yaşandığı gözlenmiştir.

Püskürtmeli kurutma çalışması kapsamında, farklı ekşiyanlar (mannitol, kazein, yağsız süt tozu ve maltodekstrin) kullanılarak hazırlanan püskürtülerek kurutulmuş bakteriyofaj tozlarının depolama etkinlikleri  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Püskürterek kurutma işlemi sırasında, kullanılan tüm ekşiyanlar için bakteriyofaj titresinde 1,19-1,95 log azalma gözlenmiştir. 12 aylık depolama sırasında farklı ekşiyanların bakteriyofaj stabilitesi incelendiğinde  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta depolanan sıvı faj örnekleri sırasıyla 2,50 ve 4,62 log birim titre kaybı göstermiştir. Sıvı bakteriyofaj kokteyli, depolama sıcaklığından bağımsız olarak, tüm püskürtülerek kurutulmuş faj tozlarından önemli ölçüde daha yüksek titre kaybı ( $p<0,05$ ) göstermiştir. % 15 maltodekstrin ve % 5 kazein kullanılarak hazırlanan püskürtülerek kurutulmuş bakteriyofaj tozları,  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  ve  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de sırasıyla 1,77 ve 2,61 log birim azalma ile 12 aylık depolama için en yüksek stabiliteyi gösterirken, diğer ekşiyanların daha az kararlı olduğu tespit edilmiştir. Püskürterek kurutulmuş bakteriyofaj tozlarının başlangıç  $a_w$  değerlerinin 0,06-0,08 aralığında olduğu görülmüştür. Ortalama partikül çapları 790,5 ile 1235,5 nm arasındadır.

İlgili tez çalışması kapsamında, liyofilizasyon ve püskürteli kurutma proses kayıplarının minimize edilmesi amacıyla vakumla köpük kurutma ile bakteriyofajların kurutulması ve etkinliğinin incelenmiştir. Vakumla köpük kurutma için seçilen üç farklı köpükleştirici ajan ile stabilizör malzemenin bakteriyofaj üzerine etkisinin incelenmesi için tekli solüsyon-bakteriyofaj ve ikili solüsyon-bakteriyofaj etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla seçilen köpükleştirici ajanlar arasında bakteriyofaj titre düşmesi en az olan kimyasal sığır serum albumini ve stabilizör ajanlar arasında bakteriyofaj titre düşmesi en az olan kimyasal gliserol bulunmuştur. Sığır serum albuminde görülen titre düşmesinin gliserole kıyasla daha az olduğu gözlenmiştir. İkili solüsyon-bakteriyofaj etkisinin incelenmesi sonucunda seçilen formülasyonda köpük oluşumu çalışılmıştır. Vakumla köpük kurutma için sığır serum albumini+gliserol ve sığır serum albumini+sakkaroz kullanılarak iki farklı formülasyonda *S. Enteritidis* F5-4 bakteriyofajının vakum köpük kurutma ile kurutulması çalışılmıştır. Proses I ve III arasında kurutma sonrası bakteriyofaj titresindeki düşüş incelendiğinde iki süreç arasında belirgin bir fark bulunmamakla birlikte, Proses III düşük sıcaklık sebebiyle daha uzun bir kurutma süresine ihtiyaç duymaktadır. Proses II yapılan işlemler içerisinde bakteriyofaj titresindeki azalmanın en az olduğu işlem grubu olarak görülmektedir. Proses II süresince düşük vakum altında köpük yeterli seviyede yükselip hava dolmamış olmasından ötürü kurutma yapılan kabın taban kısmına örneklerin yapışması ve yüzeyde kurumaması gerçekleşmiştir. Bu sebeple kurutma sonucunun kurutma petriyelerinden alınırken daha az kurutulmuş numune geri alınabilmiştir. Köpük oluşumu sonrası yaş köpük titresinde 0,08 log POB titre düşüşü gözlenmiştir. Proses II (35±1°C, 0,06 MPa, 5 saat) koşullarında titresinde solüsyon D için 0,74 log POB, solüsyon E için 0,72 log POB ve solüsyon F için 0,68 log POB titre düşüşü çalışma kapsamında en başarılı sonuç olarak gözlenmiştir.

Mevcut tez çalışmasının ikinci bölümünde, kuru toz formda ve film formda hazırlanan bakteriyofaj preparatlarının hayvansal ve bitkisel gıdalar üzerindeki etkinliğinin incelenmiştir. Liyofilizasyon çalışması kapsamında, çiğ tavuk eti örneklerinde 4±1°C'de 6 gün süreyle bakteriyofaj yüklü 0,3 M sakkaroz jelatin karışımına ait liyofilize tozların stabilitesi ve antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, sırasıyla MOI 100 ve 1000 için 6 gün sonunda, yeni hazırlanan liyofilize bakteriyofaj tozlarının uygulanmasıyla çiğ tavuk etinde *Salmonella*'da 1,86 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 2,18 log KOB/cm<sup>2</sup> azalma olduğunu ortaya gözlenmiştir. Çiğ tavuk etinde 4±1°C ve 25±1°C'de 10 ay



süreyile depolanmış liyofilize toz bakteriyofaj örneklerinin antimikrobiyal aktivitesi ve stabilitesi araştırılmıştır. Sonuçlara göre MOI 100 ve 1000 için  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de depolanan liyofilize bakteriyofaj tozlarının uygulanması sonucunda çiğ tavuk etinde *Salmonella* sırasıyla 1,08 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 1,26 log KOB/cm<sup>2</sup> azalma gözlenmiştir. Benzer şekilde, MOI 100 ve 1000'de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de depolanan liyofilize bakteriyofaj tozlarının uygulanması sonucunda çiğ tavuk etinde *Salmonella* sırasıyla 0,66 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 1,00 log KOB/cm<sup>2</sup> azalma gözlenmiştir. Buna ek olarak 6 gün boyunca işlem görmüş et örneklerinde bakteriyofaj titresinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ( $p>0,05$ ) gözlenmiştir.

Püskürtmeli kurutma çalışması kapsamında, çiğ tavuk eti örneklerinde örneklerine  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 6 gün süreyle bakteriyofaj tozlarının stabilitesi ve antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Elde edilen veriler, MOI 100 ve 1000 için % 15 maltodekstrin ile yeni hazırlanmış püskürtülerek kurutulmuş bakteriyofaj tozunun uygulanması sonucunda çiğ tavuk etinde *Salmonella*'da sırasıyla 1,85 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 2,13 log KOB/cm<sup>2</sup> azalma olduğunu tespit edilmiştir. Benzer şekilde, % 5 kazein ile yeni hazırlanmış püskürtmeli kurutmalı faj tozunun sırasıyla MOI 100 ve 1000 uygulanmasıyla çiğ tavuk etinde 1,78 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 2,09 log KOB/cm<sup>2</sup> *Salmonella* azalması gözlemlenmiştir. Çiğ tavuk etinde  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 10 ay süreyle depolanmış % 15 maltodekstrin ile hazırlanan püskürtülerek kurutulmuş toz bakteriyofaj örneklerinin antimikrobiyal aktivitesi ve stabilitesi araştırılmıştır. Sonuçlara göre MOI 100 ve 1000 için  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de depolanan püskürtülerek kurutulmuş bakteriyofaj tozları uygulanması yapılmış çiğ tavuk etinde *Salmonella*'da sırasıyla 1,09 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 1,30 log KOB/cm<sup>2</sup> azalma gözlenmiştir. Benzer şekilde MOI 100 ve 1000'de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan % 5 kazein ile hazırlanan püskürtülerek kurutulmuş bakteriyofaj tozlarının uygulanması sonucunda çiğ tavuk etinde sırasıyla 0,72 log KOB/cm<sup>2</sup> ve 0,95 log KOB/cm<sup>2</sup> *Salmonella* azalması gözlemlenmiştir. Buna ek olarak, 6 gün boyunca işlem görmüş et örneklerinde bakteriyofaj titresinde önemli bir fark olmadığı ( $p>0,05$ ) gözlenmiştir.

Liyofilize ve püskürtülerek kurutulmuş bakteriyofaj preparasyonlarının hazırlanmasında nispeten kolay elde edilebilmeleri, ucuz olmaları, gıdada kullanılabilir olmaları ve gıda endüstrisinde kullanılan katkı maddeleri grubunda bulunmaları sebebiyle tercih edilmiş ve bu şekilde üretim için seçilecek kimyasalların yüksek hacimde kullanımında maliyet

ve kolay temin edilebilirlik açısından avantaj sağlanmıştır. Literatürde diğer araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen bakteriyofaj kurutma çalışmaları farmasötik amaç üzerinde yoğunlaşmakla birlikte, agar üzerinde farklı kriyoprotektan ve ekşiyanların çeşitli konsantrasyonlarda bakteriyofaj titrelerinin belirlenmesi şeklinde rapor edilmiştir. Fakat gıda maktripleri üzerindeki etkinlikleri için sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar özellikle taze olarak hazırlanmış tozların kullanıldığı çalışmalar ile sınırlı olmakla birlikte depolanmış toz örneklerin gıdalar üzerindeki etkinliğinin incelendiği çalışma literatür çalışmalarında karşılaşılmamıştır. Bu sebeple bu tez çalışma kapsamında bilgimiz dahilinde ilk kez depolanmış liyofilize bakteriyofaj içeren tozların gerçek gıda maktrisindeki etkinliği ortaya konulmuştur.

Film formda hazırlanan bakteriyofaj preparatlarının etkinliğinin incelenmesi kapsamında, çileklerde *Salmonella*'nın biyokontrolü için bakteriyofaj temelli yenilebilir kaplama kullanımının incelenmiştir. Çilek örneklerinin depolama süresinceki fizikokimyasal değişiklikleri renk, pH ve titre edilebilir asitlik parametreleri üzerinden incelenmiştir. Başlangıç aşamasında ( $t=0$ ), hem kontrol numuneleri hem de kaplanmış numuneler benzer  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , WI, YI,  $\Delta E$ , C ve H değerlerine sahiptir. Kontrol numunelerinde,  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , C, WI ve  $\Delta E$  değerleri kademeli olarak azalırken, YI değeri kaplamalı numunelere göre çok daha yüksek oranda depolama süresince yavaş bir şekilde artmıştır. Peynir altı suyu tozu konsantratu (WPC) kaplı numuneler, kontrol numuneleri ve diğer kaplama malzemeleri ile kaplanmış numunelere göre  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , C, WI ve  $\Delta E$  değerlerinde biraz daha yüksek bir düşüş ve YI değerinde biraz daha yüksek bir artış göstermiştir. Bu sonuçlar, çilek meyvesinin pH değerinin depolama süresince arttığını ve kaplanmamış örneklerde kaplanmış örneklere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir. Beş günlük depolamadan sonra elde edilen sonuçlar, pH değerinin tüm işlemler için depolama süresi boyunca önemli ölçüde arttığını göstermiştir ( $p<0,05$ ). Tüm biyopolimerler arasında, WPC kaplama, beş günlük depolamadan sonra pH'ta en az artışı göstermiştir. Beşinci günde WPC ile muamele edilmiş numunelerin ve diğer biyopolimerlerin ve kontrol numunesinin pH seviyeleri arasında önemli farklılıklar ( $p<0,05$ ) vardır. Depolama süresince kontrol ve kaplanmış çilek örneklerinin TA değerlerinde bir düşüş olduğunu ortaya koymuştur. TA düşüş grafikleri incelendiğinde en az düşüşün WPC ile kaplanmış çilek örneklerinde gözlemlendiği görülmüştür. Çilek numunelerinde farklı enkapsülasyon biyopolimerleri ile kaplanmış bakteriyofaj kokteylinin bakteriyofaj stabilitesi ve

antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. Beş günlük buzdolabında saklama süresi boyunca, WPC kaplamasında sırasıyla 0,7 log POB/g azalma gözlenmiştir. Seçilen biyopolimerler arasında, bakteriyofaj yüklü WPC kaplaması, 1-5 gün boyunca günde diğer kaplamalara göre önemli ölçüde daha yüksek faj sayıları ( $p<0,05$ ) sergilemiştir. *Salmonella* kokteyli inoküle edilmiş örneklerde ise en yüksek antimikrobiyal etki, 3,1 log KOB/g azalma ile WPC'nin kullanıldığı kaplanmış örneklerde gözlenmiştir. Bu çalışmanın öne çıkan yönleri şunlardır: (i) ilk kez çilek örnekleri üzerinde bakteriyofaj yüklü yenilebilir bir kaplama çalışması yapılmış, (ii) aynı bakteriyofaj kokteyli ile birden fazla farklı kaplamanın etkinliği ilk kez gösterilmiş ve (iii) farklı biyopolimerlerin bakteriyofaj stabilitesi üzerindeki etkisi karşılaştırmalı bir şekilde gösterilmiştir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] L.R. Beuchat, Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 in bovine feces applied to lettuce and the effectiveness of chlorinated water as a disinfectant, *J. Food Prot.*, 62 (1999) 845-849.
- [2] S. Zhang, J. Farber, The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables, *Food Microbiol.*, 13 (1996) 311-321.
- [3] J. Hudson, C. Nicol, J. Wright, R. Whyte, S. Hasell, Seasonal variation of *Campylobacter* types from human cases, veterinary cases, raw chicken, milk and water, *J. Appl. Microbiol.*, 87 (1999) 115-124.
- [4] W.C. Summers, Felix d'Herelle and the origins of molecular biology, Yale University Press 1999.
- [5] E. Scallan, R.M. Hoekstra, F.J. Angulo, R.V. Tauxe, M.-A. Widdowson, S.L. Roy, J.L. Jones, P.M. Griffin, Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens, *Emerging infectious diseases*, 17 (2011) 7.
- [6] J.C. Buzby, H. Farah-Wells, J. Hyman, The estimated amount, value, and calories of postharvest food losses at the retail and consumer levels in the United States, *USDA-ERS Economic Information Bulletin*, (2014).
- [7] S.M. Sillankorva, H. Oliveira, J. Azeredo, Bacteriophages and their role in food safety, *Int. J. Microbiol.*, 2012 (2012).
- [8] A. Sulakvelidze, Z. Alavidze, Bacteriophage therapy. , *Antimicrobe Agents Chemother*, 45 (2001) 649-659.
- [9] W.C. Summers, From culture as organism to organism as cell: historical origins of bacterial genetics, *J. Hist. Biol.*, (1991) 171-190.
- [10] A. Twort, *In focus, out of step: a biography*, Sutton Pub Limited 1993.
- [11] M. d'Herelle, Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques, *Acta Kravsi*, (1961).
- [12] W. Summers, Theorien der Verursachung, ihre Rechtfertigung und de experimentelle Wissenschaft: Daniel E. Salmon und die Schweinepest, *Strategien der Kausalitaet. Konzeptionen der Krankheitsversuchung im*, 19 (1998) 77-92.
- [13] R. Bruynoghe, J. Maisin, Essais de thérapeutique au moyen du bacteriophage, *CR Soc Biol*, 85 (1921) 1120-1121.
- [14] A.N. Creager, Tobacco Mosaic Virus and the History of Molecular Biology, *Annual Review of Virology*, 9 (2022) 39-55.
- [15] W.J. Elford, C.H. Andrewes, The sizes of different bacteriophages, *British journal of experimental pathology*, 13 (1932) 446.

- [16] V. Sertic, N. Boulgakov, Classification et identification des typhi-phages, CR Soc. Biol. Paris, 119 (1935) 1270-1272.
- [17] M. Schlesinger, The Feulgen reaction of the bacteriophage substance, Nature, 138 (1936) 508-509.
- [18] C. Levaditi, Les Ultravirus considérés à travers le microscope électronique, par MM. C. Levaditi et Bonét-Maury, Masson 1942.
- [19] S.E. Luria, T.F. Anderson, The identification and characterization of bacteriophages with the electron microscope, Proceedings of the National Academy of Sciences, 28 (1942) 127-130.121.
- [20] E. Peankuch, G. Kausche, Isolierung und, übermikroskopische Abbildungeines Bakteriophagen, Naturwissenschaften, 28 (1940) 46-46.
- [21] H. Ruska, Die Sichtbarmachung der bakteriophagen lyse im übermikroskop, Naturwissenschaften, 28 (1940) 45-46.
- [22] J. Cairns, G.S. Stent, J.D. Watson, Phage and the origins of molecular biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1992.
- [23] E. Kellenberger, Electron microscopy of developing bacteriophage, Phage and the Origins of Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory of Quantitative Biology 1966, pp. 116-126.
- [24] W.B. Wood, R.S. Edgar, Building a bacterial virus, Scientific American, 217 (1967) 60-75.
- [25] G. Stent, J.D. Watson, J. Cairns, Phage and the origins of molecular biology, Cold Springs Harbor Laboratory of Quantitative Biology, New York, (1966).
- [26] R. Danovaro, C. Corinaldesi, A. Dell'Anno, J.A. Fuhrman, J.J. Middelburg, R.T. Noble, C.A. Suttle, Marine viruses and global climate change, FEMS Microbiol. Rev., 35 (2011) 993-1034.
- [27] D.H. Duckworth, P.A. Gulig, Bacteriophages, Biodrugs, 16 (2002) 57-62.
- [28] B.R. Levin, R.E. Lenski, Bacteria and phage: A model system for the study of the ecology and co-evolution of hosts and parasites, LINN. SOC. SYMP. SER. 1985., 1985.
- [29] S. Ripp, R.V. Miller, Dynamics of the pseudolysogenic response in slowly growing cells of *Pseudomonas aeruginosa*, Microbiology, 144 (1998) 2225-2232.
- [30] R. D'Ari, The SOS system, Biochimie, 67 (1985) 343-347.
- [31] T.F. Cooper, J.A. Heinemann, Transfer of conjugative plasmids and bacteriophage  $\lambda$  occurs in the presence of antibiotics that prevent de novo gene expression, Plasmid, 43 (2000) 171-175.
- [32] S. Williamson, M. McLaughlin, J. Paul, Interaction of the  $\Phi$ HSIC virus with its host: lysogeny or pseudolysogeny?, Applied and environmental microbiology, 67 (2001) 1682-1688.

- [33] J.D. Watson, The Properties of X-RAY-inactivated Bacteriophage I: Inactivation by Direct Effect, *J. Bacteriol.*, 60 (1950) 697-718.
- [34] E. Emond, B.J. Holler, I. Boucher, P.A. Vandenberg, E.R. Vedamuthu, J.K. Kondo, S. Moineau, Phenotypic and genetic characterization of the bacteriophage abortive infection mechanism *AbiK* from *Lactococcus lactis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (1997) 1274-1283.
- [35] L.R. Garcia, I.J. Molineux, Incomplete entry of bacteriophage T7 DNA into F plasmid-containing *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 177 (1995) 4077-4083.
- [36] R.E. Lenski, Coevolution of bacteria and phage: are there endless cycles of bacterial defenses and phage counterdefenses?, *J. Theor. Biol.*, 108 (1984) 319-325.
- [37] S.T. Abedon, Selection for lysis inhibition in bacteriophage, *J. Theor. Biol.*, 146 (1990) 501-511.
- [38] S.T. Abedon, *The bacteriophages*, Oxford University Press 2005.
- [39] J. Alisky, K. Iczkowski, A. Rapoport, N. Troitsky, Bacteriophages show promise as antimicrobial agents, *J. Infect.*, 36 (1998) 5-15.
- [40] C.R. Merrill, B. Biswas, R. Carlton, N.C. Jensen, G.J. Creed, S. Zullo, S. Adhya, Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93 (1996) 3188-3192.
- [41] K.E. Ashelford, M.J. Day, J.C. Fry, Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil, *Applied and environmental microbiology*, 69 (2003) 285-289.
- [42] E. Goldberg, Recognition attachment, and injection, *Molecular biology of bacteriophage T4*, (1994) 347-356.
- [43] U. Henning, Receptor Recognition by T-Even Coliphages, *Molecular Biology of Bacteriophage T 4*, (1994).
- [44] M. Schwartz, Interaction of phages with their receptor proteins, *Virus receptors*, (1980) 59-94.
- [45] D. Ellis, P. Whitman, R. Marshall, Effects of homologous bacteriophage on growth of *Pseudomonas fragi* WY in milk, *Appl. Microbiol.*, 25 (1973) 24-25.
- [46] B.A. Wiggins, M. Alexander, Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems, *Applied and environmental microbiology*, 49 (1985) 19-23.
- [47] A. Berchieri Jr, M. Lovell, P. Barrow, The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*, *Res. Microbiol.*, 142 (1991) 541-549.
- [48] G.G. Greer, Effects of phage concentration, bacterial density, and temperature on phage control of beef spoilage, *J. Food Sci.*, 53 (1988) 1226-1227.

- [49] R.J. Payne, V.A. Jansen, Phage therapy: the peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals, *Clinical pharmacology & therapeutics*, 68 (2000) 225-230.
- [50] M.H. Wilkinson, Predation in the presence of decoys: an inhibitory factor on pathogen control by bacteriophages or bdellovibrios in dense and diverse ecosystems, *J. Theor. Biol.*, 208 (2001) 27-36.
- [51] B.R. Levin, F.M. Stewart, L. Chao, Resource-limited growth, competition, and predation: a model and experimental studies with bacteria and bacteriophage, *The American Naturalist*, 111 (1977) 3-24.
- [52] B.J. Bohannan, R.E. Lenski, Effect of prey heterogeneity on the response of a model food chain to resource enrichment, *The American Naturalist*, 153 (1999) 73-82.
- [53] K. Tait, L. Skillman, I.W. Sutherland, The efficacy of bacteriophage as a method of biofilm eradication, *Biofouling*, 18 (2002) 305-311.
- [54] H.W. Smith, M.B. Huggins, K.M. Shaw, Factors influencing the survival and multiplication of bacteriophages in calves and in their environment, *Microbiology*, 133 (1987) 1127-1135.
- [55] S.E. Luria, M. Delbrück, Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance, *Genetics*, 28 (1943) 491.
- [56] B.R. Levin, J. Bull, Phage therapy revisited: the population biology of a bacterial infection and its treatment with bacteriophage and antibiotics, *The American Naturalist*, 147 (1996) 881-898.
- [57] A. Buckling, P.B. Rainey, Antagonistic coevolution between a bacterium and a bacteriophage, *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 269 (2002) 931-936.
- [58] D.G. Nyachuba, Foodborne illness: is it on the rise?, *Nutr. Rev.*, 68 (2010) 257-269.
- [59] P. Whitman, R. Marshall, Isolation of psychrophilic bacteriophage-host systems from refrigerated food products, *Appl. Microbiol.*, 22 (1971) 220-223.
- [60] Z. Lu, F. Breidt Jr, H. Fleming, E. Altermann, T. Klaenhammer, Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage,  $\Phi$ JL-1, from a cucumber fermentation, *Int. J. Food Microbiol.*, 84 (2003) 225-235.
- [61] S. Chibani-Chennoufi, A. Bruttin, M.-L. Dillmann, H. Brüssow, Phage-host interaction: an ecological perspective, *J. Bacteriol.*, 186 (2004) 3677-3686.
- [62] F. Hernandez, R. Monge, C. Jimenez, L. Taylor, Rotavirus and hepatitis A virus in market lettuce (*Latuca sativa*) in Costa Rica, *Int. J. Food Microbiol.*, 37 (1997) 221-223.
- [63] J. Kennedy Jr, C. Wei, J. Oblinger, Distribution of coliphages in various foods, *J. Food Prot.*, 49 (1986) 944-951.

- [64] R.J. Atterbury, P.L. Connerton, C.E. Dodd, C.E. Rees, I.F. Connerton, Isolation and characterization of *Campylobacter* bacteriophages from retail poultry, *Applied and environmental microbiology*, 69 (2003) 4511-4518.
- [65] F.-C. Hsu, Y.-S.C. Shieh, M. Sobsey, Enteric bacteriophages as potential fecal indicators in ground beef and poultry meat, *J. Food Prot.*, 65 (2002) 93-99.
- [66] V.B. Suarez, A. Quiberoni, A.G. Binetti, J.A. Reinheimer, Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinian dairy industries, *J. Food Prot.*, 65 (2002) 1597-1604.
- [67] A.G. Binetti, J.A. Reinheimer, Thermal and chemical inactivation of indigenous *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from Argentinian dairy plants, *J. Food Prot.*, 63 (2000) 509-515.
- [68] S. Moineau, M. Borkaev, B.J. Holler, S.A. Walker, J.K. Kondo, E.R. Vedamuthu, P.A. Vendenbergh, Isolation and characterization of lactococcal bacteriophages from cultured buttermilk plants in the United States, *J. Dairy Sci.*, 79 (1996) 2104-2111.
- [69] G.G. Greer, Psychrotrophic *Brocothrix thermosphacta* bacteriophages isolated from beef., *Applied and Environmental Microbiology*, 46 (1983) 245-251.
- [70] J.E. Kennedy, G. Bitton, Bacteriophages in foods, in: S.M. Goyal, C.P. Gerba, G. Bitton (Eds.) *Phage ecology*, John Wiley and Sons, New York, 1987, pp. 289-316.
- [71] H. Chung, L.-A. Jaykus, G. Lovelace, M. Sobsey, Bacteriophages and bacteria as indicators of enteric viruses in oysters and their harvest waters, *Water Science and Technology*, 38 (1998) 37-44.
- [72] W. Doré, K. Henshilwood, D. Lees, The development of management strategies for control of virological quality in oysters, *Water Science and Technology*, 38 (1998) 29-35.
- [73] W. Grabow, C. Holtzhausen, J. De Villiers, Research on bacteriophages as indicators of water quality, *Water Research Commission, Pretoria, South Africa. Project Report*, 321 (1993).
- [74] A. Havelaar, M. Van Olphen, Y. Drost, F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water, *Applied and environmental microbiology*, 59 (1993) 2956-2962.
- [75] A. Havelaar, Bacteriophages as model viruses in water quality control, *Water Research (Oxford)*, 25 (1991) 529-541.
- [76] D. Goode, V. Allen, P. Barrow, Reduction of experimental *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages, *Applied and environmental microbiology*, 69 (2003) 5032-5036.
- [77] B. Leverentz, W.S. Conway, Z. Alavidze, W.J. Janisiewicz, Y. Fuchs, M.J. Camp, E. Chighladze, A. Sulakvelidze, Examination of bacteriophage as a biocontrol



- method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study, *J. Food Prot.*, 64 (2001) 1116-1121.
- [78] C. Gill, Visible contamination on animals and carcasses and the microbiological condition of meat, *J. Food Prot.*, 67 (2004) 413-419.
- [79] J. Oosterom, S. Notermans, H. Karman, G. Engels, Origin and Prevalence of *Campylobacter jejuni* in Poultry Processing, *J. Food Prot.*, 46 (1983) 339-344.
- [80] L.M. Kasman, A. Kasman, C. Westwater, J. Dolan, M.G. Schmidt, J.S. Norris, Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy, *J. Virol.*, 76 (2002) 5557-5564.
- [81] C. Bell, A. Kyriakides, *Salmonella* in: Foodborne Pathogens. Hazards, risk analysis and control, Woodhead Publishing Limited, 2002.
- [82] C.R. Raetz, C. Whitfield, Lipopolysaccharide endotoxins, *Annual review of biochemistry*, 71 (2002) 635.
- [83] F. Brenner, R. Villar, F. Angulo, R. Tauxe, B. Swaminathan, *Salmonella* nomenclature, *J. Clin. Microbiol.*, 38 (2000) 2465-2467.
- [84] R. Andreatti Filho, J. Higgins, S. Higgins, G. Gaona, A. Wolfenden, G. Tellez, B. Hargis, Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in vitro and in vivo, *Poult. Sci.*, 86 (2007) 1904-1909.
- [85] S. Santos, E. Fernandes, C.M. Carvalho, S. Sillankorva, V. Krylov, E. Pleteneva, O. Shaburova, A. Nicolau, E. Ferreira, J. Azeredo, Selection and characterization of a multivalent *Salmonella* phage and its production in a nonpathogenic *Escherichia coli* strain, *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (2010) 7338-7342.
- [86] S. Sillankorva, E. Pleteneva, O. Shaburova, S. Santos, C. Carvalho, J. Azeredo, V. Krylov, *Salmonella* Enteritidis bacteriophage candidates for phage therapy of poultry, *J. Appl. Microbiol.*, 108 (2010) 1175-1186.
- [87] S.B. Santos, A.M. Kropinski, P.-J. Ceysens, H.-W. Ackermann, A. Villegas, R. Lavigne, V.N. Krylov, C.M. Carvalho, E.C. Ferreira, J. Azeredo, Genomic and proteomic characterization of the broad-host-range *Salmonella* phage PVP-SE1: creation of a new phage genus, *J. Virol.*, 85 (2011) 11265-11273.
- [88] R.J. Payne, V.A. Jansen, Understanding bacteriophage therapy as a density-dependent kinetic process, *J. Theor. Biol.*, 208 (2001) 37-48.
- [89] R. Atterbury, Bacteriophage biocontrol in animals and meat products, *Microb. Biotechnol.*, 2 (2009) 601-612.
- [90] R. Modi, Y. Hirvi, A. Hill, M. Griffiths, Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of cheddar cheese made from raw and pasteurized milk, *J. Food Prot.*, 64 (2001) 927-933.

- [91] S. Pao, S. Rolph, E. Westbrook, H. Shen, Use of bacteriophages to control *Salmonella* in experimentally contaminated sprout seeds, *J. Food Sci.*, 69 (2004) M127-M130.
- [92] J.P. Higgins, S. Higgins, K. Guenther, W. Huff, A. Donoghue, D. Donoghue, B. Hargis, Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products, *Poult. Sci.*, 84 (2005) 1141-1145.
- [93] T. Bigwood, J. Hudson, C. Billington, G. Carey-Smith, J. Heinemann, Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat, *Food Microbiol.*, 25 (2008) 400-406.
- [94] K. Prameela, C.M. Mohan, C. Ramakrishna, Biopolymers for food design: consumer-friendly natural ingredients, *Biopolymers for food design*, Elsevier 2018, pp. 1-32.
- [95] E.A. Baldwin, R. Hagenmaier, J. Bai, Edible coatings and films to improve food quality, CRC press 2011.
- [96] V. Lazic, J. Gvozdenovic, Biopolimers [ie Biopolymers] as packaging materials, *Mleko i mlečni proizvodi*, (2007).
- [97] G. Robertson, State-of-the-art biobased food packaging materials, *Environmentally compatible food packaging*, Elsevier 2008, pp. 3-28.
- [98] S.W. Ruban, Biobased packaging-application in meat industry, *Veterinary World*, 2 (2009) 79.
- [99] M.A. García, M.N. Martino, N.E. Zaritzky, Starch-based coatings: effect on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76 (1998) 411-420.
- [100] Y. Pranoto, S. Rakshit, V. Salokhe, Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin, *LWT-Food Science and Technology*, 38 (2005) 859-865.
- [101] E. Chollet, Y. Swesi, P. Degraeve, I. Sebti, Monitoring nisin desorption from a multi-layer polyethylene-based film coated with nisin loaded HPMC film and diffusion in agarose gel by an immunoassay (ELISA) method and a numerical modeling, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 10 (2009) 208-214.
- [102] C.I. García-Betanzos, H. Hernández-Sánchez, T.F. Bernal-Couoh, D. Quintanar-Guerrero, M. de la Luz Zambrano-Zaragoza, Physicochemical, total phenols and pectin methylesterase changes on quality maintenance on guava fruit (*Psidium guajava* L.) coated with candeuba wax solid lipid nanoparticles-xanthan gum, *Food Res. Int.*, 101 (2017) 218-227.
- [103] M. Halagarda, Effects of trehalose and dough additives incorporating enzymes on physical characteristics and sensory properties of frozen savory Danish dough, *LWT*, 86 (2017) 603-610.

- [104] M.E. Steffolani, P.D. Ribotta, G.T. Perez, M.C. Puppo, A.E. León, Use of enzymes to minimize dough freezing damage, *Food and Bioprocess Technology*, 5 (2012) 2242-2255.
- [105] A.M.M.T. Galvão, A.W. de Oliveira Araújo, S.V. Carneiro, R.A. Zambelli, M.d.S.R. Bastos, Coating development with modified starch and tomato powder for application in frozen dough, *Food packaging and shelf life*, 16 (2018) 194-203.
- [106] Y. Song, L. Liu, H. Shen, J. You, Y. Luo, Effect of sodium alginate-based edible coating containing different anti-oxidants on quality and shelf life of refrigerated bream (*Megalobrama amblycephala*), *Food Control*, 22 (2011) 608-615.
- [107] S.Z. Popović, V.L. Lazić, N.M. Hromiš, D.Z. Šuput, S.N. Bulut, Biopolymer packaging materials for food shelf-life prolongation, *Biopolymers for food design*, Elsevier 2018, pp. 223-277.
- [108] G. Oms-Oliu, M.A. Rojas-Graü, L.A. González, P. Varela, R. Soliva-Fortuny, M.I.H. Hernando, I.P. Munuera, S. Fiszman, O. Martín-Belloso, Recent approaches using chemical treatments to preserve quality of fresh-cut fruit: A review, *Postharvest biology and technology*, 57 (2010) 139-148.
- [109] R. Ahvenainen, *Novel food packaging techniques*, Elsevier 2003.
- [110] G. Kerch, Chitosan films and coatings prevent losses of fresh fruit nutritional quality: A review, *Trends in Food Science & Technology*, 46 (2015) 159-166.
- [111] M.A. Rojas-Graü, R. Soliva-Fortuny, O. Martín-Belloso, Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review, *Trends in food science & technology*, 20 (2009) 438-447.
- [112] N. Jabeen, I. Majid, G.A. Nayik, Bioplastics and food packaging: A review, *Cogent Food & Agriculture*, 1 (2015) 1117749.
- [113] H. Molavi, S. Behfar, M.A. Shariati, M. Kaviani, S. Atarod, A review on biodegradable starch based film, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021 (2021) 456-461.
- [114] M.A. Bertuzzi, E.C. Vidaurre, M. Armada, J. Gottifredi, Water vapor permeability of edible starch based films, *J. Food Eng.*, 80 (2007) 972-978.
- [115] D. Peressini, B. Bravin, R. Lapasin, C. Rizzotti, A. Sensidoni, Starch–methylcellulose based edible films: rheological properties of film-forming dispersions, *J. Food Eng.*, 59 (2003) 25-32.
- [116] M. Montero-Calderón, M.A. Rojas-Graü, O. Martín-Belloso, Effect of packaging conditions on quality and shelf-life of fresh-cut pineapple (*Ananas comosus*), *Postharvest biology and technology*, 50 (2008) 182-189.
- [117] S. Rastegar, H. Hassanzadeh Khankahdani, M. Rahimzadeh, Effectiveness of alginate coating on antioxidant enzymes and biochemical changes during storage of mango fruit, *J. Food Biochem.*, 43 (2019) e12990.

- [118] A.C. Guerreiro, C.M. Gago, M.L. Faleiro, M.G. Miguel, M.D. Antunes, The effect of edible coatings on the nutritional quality of 'Bravo de Esmolfe' fresh-cut apple through shelf-life, *Lwt*, 75 (2017) 210-219.
- [119] S. Wang, A. Lu, L. Zhang, Recent advances in regenerated cellulose materials, *Prog. Polym. Sci.*, 53 (2016) 169-206.
- [120] T. Bourtoom, Edible films and coatings: characteristics and properties, *International food research journal*, 15 (2008) 237-248.
- [121] J. Rydz, M. Musioł, B. Zawidlak-Węgrzyńska, W. Sikorska, Present and future of biodegradable polymers for food packaging applications, *Biopolymers for food design*, (2018) 431-467.
- [122] R. Villalobos, J. Chanona, P. Hernández, G. Gutiérrez, A. Chiralt, Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure, *Food hydrocolloids*, 19 (2005) 53-61.
- [123] P. Varela, S. Fiszman, Hydrocolloids in fried foods. A review, *Food hydrocolloids*, 25 (2011) 1801-1812.
- [124] P. Mallikarjunan, M. Chinnan, V. Balasubramaniam, R. Phillips, Edible coatings for deep-fat frying of starchy products, *LWT-Food Science and Technology*, 30 (1997) 709-714.
- [125] L.D. Goodridge, B. Bisha, Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods, *Bacteriophage*, 1 (2011) 130-137.
- [126] W.A. Sarhan, H.M. Azzazy, Phage approved in food, why not as a therapeutic?, *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 13 (2015) 91-101.
- [127] S. Galus, J. Kadzińska, Food applications of emulsion-based edible films and coatings, *Trends in Food Science & Technology*, 45 (2015) 273-283.
- [128] J.M. Krochta, Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities, *Protein-based films and coatings*, 1 (2002) 1-40.
- [129] N. Cé, C.P. Noreña, A. Brandelli, Antimicrobial activity of chitosan films containing nisin, peptide P34, and natamycin, *CyTA-Journal of Food*, 10 (2012) 21-26.
- [130] A. Nandane, R.K. Dave, T.R. Rao, Optimization of edible coating formulations for improving postharvest quality and shelf life of pear fruit using response surface methodology, *J. Food Sci. Technol.*, 54 (2017) 1-8.
- [131] N. Kavas, G. Kavas, D. Saygili, Use of ginger essential oil-fortified edible coatings in Kashar cheese and its effects on *Escherichia coli* O157: H7 and *Staphylococcus aureus*, *CyTA-Journal of Food*, 14 (2016) 317-323.
- [132] H. Aloui, K. Khwaldia, Natural antimicrobial edible coatings for microbial safety and food quality enhancement, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15 (2016) 1080-1103.

- [133] F. Fung, H.-S. Wang, S. Menon, Food safety in the 21st century, *Biomedical journal*, 41 (2018) 88-95.
- [134] Y. Premjit, G.K. Malik, J. Mitra, Antimicrobial Agents in Films and Coatings, *Biopolymer-Based Food Packaging: Innovations and Technology Applications*, (2022) 282-335.
- [135] C.A. Campos, L.N. Gerschenson, S.K. Flores, Development of edible films and coatings with antimicrobial activity, *Food and bioprocess technology*, 4 (2011) 849-875.
- [136] J. Oliveira, F. Castilho, A. Cunha, M. Pereira, Bacteriophage therapy as a bacterial control strategy in aquaculture, *Aquaculture International*, 20 (2012) 879-910.
- [137] S. Punia Bangar, V. Chaudhary, N. Thakur, P. Kajla, M. Kumar, M. Trif, Natural antimicrobials as additives for edible food packaging applications: A review, *Foods*, 10 (2021) 2282.
- [138] J. Ramos-Vivas, M. Elexpuru-Zabaleta, M.L. Samano, A.P. Barrera, T.Y. Forbes-Hernández, F. Giampieri, M. Battino, Phages and enzybiotics in food biopreservation, *Molecules*, 26 (2021) 5138.
- [139] S. Kalkan, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 inactivation by using methylcellulose films containing encapsulated bacteriophages, *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 42 (2018) 480-485.
- [140] E.L. Vonasek, A.H. Choi, J. Sanchez Jr, N. Nitin, Incorporating phage therapy into WPI dip coatings for applications on fresh whole and cut fruit and vegetable surfaces, *J. Food Sci.*, 83 (2018) 1871-1879.
- [141] M. Garvey, Bacteriophages and Food Production: Biocontrol and Bio-Preservation Options for Food Safety, *Antibiotics*, 11 (2022) 1324.
- [142] L. El Haddad, J.-P. Roy, G.E. Khalil, D. St-Gelais, C.P. Champagne, S. Labrie, S. Moineau, Efficacy of two *Staphylococcus aureus* phage cocktails in cheese production, *Int. J. Food Microbiol.*, 217 (2016) 7-13.
- [143] E. Jończyk-Matysiak, N. Łodej, D. Kula, B. Owczarek, F. Orwat, R. Międzybrodzki, J. Neuberg, N. Bagińska, B. Weber-Dąbrowska, A. Górski, Factors determining phage stability/activity: Challenges in practical phage application, *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 17 (2019) 583-606.
- [144] J.A. Aguirre-Joya, M.A. De Leon-Zapata, O.B. Alvarez-Perez, C. Torres-León, D.E. Nieto-Oropeza, J.M. Ventura-Sobrevilla, M.A. Aguilar, X. Ruelas-Chacón, R. Rojas, M.E. Ramos-Aguiñaga, Basic and applied concepts of edible packaging for foods, *Food packaging and preservation*, Elsevier 2018, pp. 1-61.
- [145] D. Alves, M.A. Cerqueira, L.M. Pastrana, S. Sillankorva, Entrapment of a phage cocktail and cinnamaldehyde on sodium alginate emulsion-based films to fight food contamination by *Escherichia coli* and *Salmonella* Enteritidis, *Food Res. Int.*, 128 (2020) 108791.

- [146] C. López de Dicastillo, L. Settler-Ramírez, R. Gavara, P. Hernández-Muñoz, G. López Carballo, Development of biodegradable films loaded with phages with antilisterial properties, *Polymers*, 13 (2021) 327.
- [147] E. Vonasek, P. Le, N. Nitin, Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release, *Food hydrocolloids*, 37 (2014) 7-13.
- [148] D.M. Gouvêa, R.C.S. Mendonça, M.L. Soto, R.S. Cruz, Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging, *LWT-Food Science and Technology*, 63 (2015) 85-91.
- [149] L. Amarillas, L. Lightbourn-Rojas, A.K. Angulo-Gaxiola, J. Basilio Heredia, A. González-Robles, J. León-Félix, The antibacterial effect of chitosan-based edible coating incorporated with a lytic bacteriophage against *Escherichia coli* O157: H7 on the surface of tomatoes, *J. Food Saf.*, 38 (2018) e12571.
- [150] S. Weng, A. López, S. Sáez-Orviz, I. Marcet, P. García, M. Rendueles, M. Díaz, Effectiveness of bacteriophages incorporated in gelatine films against *Staphylococcus aureus*, *Food Control*, 121 (2021) 107666.
- [151] H. Cui, L. Yuan, L. Lin, Novel chitosan film embedded with liposome-encapsulated phage for biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7 in beef, *Carbohydrate polymers*, 177 (2017) 156-164.
- [152] D. Tomat, M. Soazo, R. Verdini, C. Casabonne, V. Aquili, C. Balagué, A. Quiberoni, Evaluation of an WPC edible film added with a cocktail of six lytic phages against foodborne pathogens such as enteropathogenic and Shigatoxigenic *Escherichia coli*, *Lwt*, 113 (2019) 108316.
- [153] D. Radford, B. Guild, P. Strange, R. Ahmed, L.-T. Lim, S. Balamurugan, Characterization of antimicrobial properties of Salmonella phage Felix O1 and *Listeria* phage A511 embedded in xanthan coatings on Poly (lactic acid) films, *Food Microbiol.*, 66 (2017) 117-128.
- [154] D. Alves, A. Marques, C. Milho, M.J. Costa, L.M. Pastrana, M.A. Cerqueira, S.M. Sillankorva, Bacteriophage  $\phi$ IBB-PF7A loaded on sodium alginate-based films to prevent microbial meat spoilage, *Int. J. Food Microbiol.*, 291 (2019) 121-127.
- [155] D.J. Malik, I.J. Sokolov, G.K. Vinner, F. Mancuso, S. Cinquerrui, G.T. Vladisavljevic, M.R. Clokie, N.J. Garton, A.G. Stapley, A. Kirpichnikova, Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 249 (2017) 100-133.
- [156] P.B. Poduval, J.M. Noronha, S.K. Bansal, S.C. Ghadi, Characterization of a new virulent phage  $\phi$ MC1 specific to *Microbulbifer* strain CMC-5, *Virus research*, 257 (2018) 7-13.
- [157] J.A. Hudson, C. Billington, A. Cornelius, T. Wilson, S. On, A. Premaratne, N. King, Use of a bacteriophage to inactivate *Escherichia coli* O157: H7 on beef, *Food Microbiol.*, 36 (2013) 14-21.

- [158] Y.T. Lu, Y. Ma, C.W. Wong, S. Wang, Characterization and application of bacteriophages for the biocontrol of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in Romaine lettuce, *Food Control*, 140 (2022) 109109.
- [159] E.L. Simmons, K. Drescher, C.D. Nadell, V. Bucci, Phage mobility is a core determinant of phage–bacteria coexistence in biofilms, *The ISME journal*, 12 (2018) 531-543.
- [160] C.D. Hickey, J.J. Sheehan, M.G. Wilkinson, M.A. Auty, Growth and location of bacterial colonies within dairy foods using microscopy techniques: a review, *Front. Microbiol.*, 6 (2015) 99.
- [161] M. Merabishvili, J.-P. Pirnay, G. Verbeken, N. Chanishvili, M. Tediashvili, N. Lashkhi, T. Glonti, V. Krylov, J. Mast, L. Van Parys, Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials, *PLoS One*, 4 (2009) e4944.
- [162] F. Rohwer, Global phage diversity, *Cell*, 113 (2003) 141.
- [163] A. Bruttin, H. Brüßow, Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49 (2005) 2874-2878.
- [164] Y. Ma, J.C. Pacan, Q. Wang, P.M. Sabour, X. Huang, Y. Xu, Enhanced alginate microspheres as means of oral delivery of bacteriophage for reducing *Staphylococcus aureus* intestinal carriage, *Food hydrocolloids*, 26 (2012) 434-440.
- [165] Y. Ma, J.C. Pacan, Q. Wang, Y. Xu, X. Huang, A. Korenevsky, P.M. Sabour, Microencapsulation of bacteriophage Felix O1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery, *Applied and environmental microbiology*, 74 (2008) 4799-4805.
- [166] R. Langer, J. Folkman, Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules, *Nature*, 263 (1976) 797-800.
- [167] J.M. Lakkis, *Encapsulation and controlled release technologies in food systems*, John Wiley & Sons 2016.
- [168] A.K. Anal, H. Singh, Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery, *Trends in food science & technology*, 18 (2007) 240-251.
- [169] C.P. Champagne, P. Fustier, Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 18 (2007) 184-190.
- [170] K. Kailasapathy, Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications, *Current issues in intestinal microbiology*, 3 (2002) 39-48.
- [171] S. Sakai, K. Kawakami, Development of subsieve-size capsules and application to cell therapy, *Therapeutic applications of cell microencapsulation*, (2010) 22-30.

- [172] N.V.N. Jyothi, P.M. Prasanna, S.N. Sakarkar, K.S. Prabha, P.S. Ramaiah, G. Srawan, Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency, *Journal of microencapsulation*, 27 (2010) 187-197.
- [173] M.C. Roco, C.A. Mirkin, M.C. Hersam, Nanotechnology research directions for societal needs in 2020: Retrospective and outlook., 2010.
- [174] S.K. Ghosh, Functional coatings and microencapsulation: a general perspective, *Functional Coatings: by polymer microencapsulation*, (2006) 1-28.
- [175] G.K. Gbassi, T. Vandamme, Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut, *Pharmaceutics*, 4 (2012) 149-163.
- [176] W. Krasaekoopt, B. Bhandari, H. Deeth, Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt, *Int. Dairy J.*, 13 (2003) 3-13.
- [177] A. Mortazavian, S.H. Razavi, M.R. Ehsani, S. Sohrabvandi, Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms, (2007).
- [178] U. Puapermpoonsiri, J. Spencer, C.F. van der Walle, A freeze-dried formulation of bacteriophage encapsulated in biodegradable microspheres, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72 (2009) 26-33.
- [179] K. Markoishvili, G. Tsitlanadze, R. Katsarava, J. Glenn, M. Morris Jr, 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, *Int. J. Dermatol.*, 41 (2002) 453-458.
- [180] D. Jikia, N. Chkhaidze, E. Imedashvili, I. Mgaloblishvili, G. Tsitlanadze, R. Katsarava, J. Glenn Morris Jr, A. Sulakvelidze, The use of a novel biodegradable preparation capable of the sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*-infected local radiation injuries caused by exposure to Sr90, *Clinical and Experimental Dermatology: Clinical dermatology*, 30 (2005) 23-26.
- [181] S. Hoe, J.W. Ivey, M.A. Boraey, A. Shamsaddini-Shahrbabak, E. Javaheri, S. Matinkhoo, W.H. Finlay, R. Vehring, Use of a fundamental approach to spray-drying formulation design to facilitate the development of multi-component dry powder aerosols for respiratory drug delivery, *Pharm. Res.*, 31 (2014) 449-465.
- [182] N.B. Carrigy, L. Liang, H. Wang, S. Kariuki, T.E. Nagel, I.F. Connerton, R. Vehring, Spray-dried anti-*Campylobacter* bacteriophage CP30A powder suitable for global distribution without cold chain infrastructure, *Int. J. Pharm.*, 569 (2019) 118601.
- [183] S.S. Leung, T. Parumasivam, F.G. Gao, N.B. Carrigy, R. Vehring, W.H. Finlay, S. Morales, W.J. Britton, E. Kutter, H.-K. Chan, Production of inhalation phage powders using spray freeze drying and spray drying techniques for treatment of respiratory infections, *Pharm. Res.*, 33 (2016) 1486-1496.



- [184] S.S. Leung, T. Parumasivam, F.G. Gao, E.A. Carter, N.B. Carrigy, R. Vehring, W.H. Finlay, S. Morales, W.J. Britton, E. Kutter, Effects of storage conditions on the stability of spray dried, inhalable bacteriophage powders, *Int. J. Pharm.*, 521 (2017) 141-149.
- [185] N. Grasmeijer, M. Stankovic, H. de Waard, H.W. Frijlink, W.L. Hinrichs, Unraveling protein stabilization mechanisms: vitrification and water replacement in a glass transition temperature controlled system, *Biochim. Biophys. Acta*, 1834 (2013) 763-769.
- [186] S. Matinkhoo, K.H. Lynch, J.J. Dennis, W.H. Finlay, R. Vehring, Spray-dried respirable powders containing bacteriophages for the treatment of pulmonary infections, *J. Pharm. Sci.*, 100 (2011) 5197-5205.
- [187] D. Vandenhevel, J. Meeus, R. Lavigne, G. Van den Mooter, Instability of bacteriophages in spray-dried trehalose powders is caused by crystallization of the matrix, *Int. J. Pharm.*, 472 (2014) 202-205.
- [188] E. Sjöholm, N. Sandler, Additive manufacturing of personalized orodispersible warfarin films, *Int. J. Pharm.*, 564 (2019) 117-123.
- [189] J. Davies, M. Kelly, The preservation of bacteriophage H1 of *Corynebacterium ulcerans* U 103 by freeze-drying, *Epidemiology & Infection*, 67 (1969) 573-583.
- [190] K. Roe, T. Labuza, Glass transition and crystallization of amorphous trehalose-sucrose mixtures, *Int. J. Food Prop.*, 8 (2005) 559-574.
- [191] B.C. Hancock, G. Zografi, The relationship between the glass transition temperature and the water content of amorphous pharmaceutical solids, *Pharm. Res.*, 11 (1994) 471-477.
- [192] J. Lin, C. Weng, C. Liao, K. Yeh, M. Pan, Protective effects of oral microencapsulated Mycoplasma hyopneumoniae vaccine prepared by co-spray drying method, *J. Vet. Med. Sci.*, 65 (2003) 69-74.
- [193] C.-W. Liao, H.-Y. Chiou, K.-S. Yeh, J.-R. Chen, C.-N. Weng, Oral immunization using formalin-inactivated Actinobacillus pleuropneumoniae antigens entrapped in microspheres with aqueous dispersion polymers prepared using a co-spray drying process, *Prev. Vet. Med.*, 61 (2003) 1-15.
- [194] J.H. Crowe, L.M. Crowe, J.F. Carpenter, C.A. Wistrom, Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars, *Biochemical Journal*, 242 (1987) 1.
- [195] B. Riveros, J. Ferrer, R. Borquez, Spray drying of a vaginal probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus*, *Drying Technology*, 27 (2009) 123-132.
- [196] D.C. Campos, F. Acevedo, E. Morales, J. Aravena, V. Amiard, M.A. Jorquera, N.G. Inostroza, M. Rubilar, Microencapsulation by spray drying of nitrogen-fixing bacteria associated with lupin nodules, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30 (2014) 2371-2378.

- [197] A. Sulakvelidze, G.R. Pasternack, *E. coli* O157: H7 bacteriophage and uses thereof, Google Patents, **2009**.
- [198] W. Wang, Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals, *Int. J. Pharm.*, 203 (**2000**) 1-60.
- [199] W. Abdelwahed, G. Degobert, S. Stainmesse, H. Fessi, Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations, *Adv. Drug Del. Rev.*, 58 (**2006**) 1688-1713.
- [200] M.J. Telko, A.J. Hickey, Dry powder inhaler formulation, *Respir. Care*, 50 (**2005**) 1209-1227.
- [201] C. Dini, P.J. De Urza, Effect of buffer systems and disaccharides concentration on *Podoviridae* coliphage stability during freeze drying and storage, *Cryobiology*, 66 (**2013**) 339-342.
- [202] H.-W. Ackermann, D. Tremblay, S. Moineau, Long-term bacteriophage preservation, *WFCC Newsl*, 38 (**2004**) 35-40.
- [203] H. Engel, L. Smith, L. Berwald, The preservation of mycobacteriophages by means of freeze drying, *American Review of Respiratory Disease*, 109 (**1974**) 561-566.
- [204] L. Golshahi, K. Lynch, J. Dennis, W. Finlay, In vitro lung delivery of bacteriophages KS4-M and  $\Phi$ KZ using dry powder inhalers for treatment of *Burkholderia cepacia* complex and *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis, *J. Appl. Microbiol.*, 110 (**2011**) 106-117.
- [205] M. Merabishvili, C. Vervaet, J.-P. Pirnay, D. De Vos, G. Verbeken, J. Mast, N. Chanishvili, M. Vaneechoutte, Stability of *Staphylococcus aureus* phage ISP after freeze-drying (lyophilization), *PLoS One*, 8 (**2013**) e68797.
- [206] C. Cox, W. Harris, J. Lee, Viability and electron microscope studies of phages T3 and T7 subjected to freeze-drying, freeze-thawing and aerosolization, *Microbiology*, 81 (**1974**) 207-215.
- [207] U. Puapermpoonsiri, S. Ford, C. Van der Walle, Stabilization of bacteriophage during freeze drying, *Int. J. Pharm.*, 389 (**2010**) 168-175.
- [208] H. Malenovská, The influence of stabilizers and rates of freezing on preserving of structurally different animal viruses during lyophilization and subsequent storage, *J. Appl. Microbiol.*, 117 (**2014**) 1810-1819.
- [209] W.A. Clark, Comparison of several methods for preserving bacteriophages, *Appl. Microbiol.*, 10 (**1962**) 466-471.
- [210] F.A. Weiss, Maintenance and preservation of cultures, *Manual of microbiological methods*, (**1957**) 99-119.
- [211] R. Greaves, J. Davies, Separate effects of freezing, thawing and drying living cells, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 125 (**1965**) 548-558.

- [212] P. Steele, J. Davies, R. Greaves, Some factors affecting the viability of freeze-thawed T4 bacteriophage, *Epidemiology & Infection*, 67 (1969) 107-114.
- [213] H. Carne, R. Greaves, Preservation of corynebacteriophages by freeze-drying, *Epidemiology & Infection*, 72 (1974) 467-470.
- [214] C. Cox, R. Heckly, Effects of oxygen upon freeze-dried and freeze-thawed bacteria: viability and free radical studies, *Canadian Journal of Microbiology*, 19 (1973) 189-194.
- [215] M. Lion, E. Bergmann, The Effect of Oxygen on Freeze-dried *Escherichia coli*, *Microbiology*, 24 (1961) 191-200.
- [216] C.H. Zierdt, Stabilities of lyophilized *Staphylococcus aureus* typing bacteriophages, *Applied and environmental microbiology*, 54 (1988) 2590.
- [217] C.H. Zierdt, Preservation of Staphylococcal Bacteriophage by means of Lyophilization, *Amer. Clin. Path.*, 31 (1959) 326-331.
- [218] M. Alfadhel, U. Puapermpoonsiri, S.J. Ford, F.J. McInnes, C.F. van der Walle, Lyophilized inserts for nasal administration harboring bacteriophage selective for *Staphylococcus aureus*: in vitro evaluation, *Int. J. Pharm.*, 416 (2011) 280-287.
- [219] H. Anany, W. Chen, R. Pelton, M. Griffiths, Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes, *Applied and environmental microbiology*, 77 (2011) 6379-6387.
- [220] V.L. Truong, A.M. Abdul-Fattah, The impact of formulation and drying processes on the characteristics and performance of biopharmaceutical powders, *Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing Biopharmaceuticals*, (2010) 565-585.
- [221] K.A. Pikal-Cleland, N. Rodríguez-Hornedo, G.L. Amidon, J.F. Carpenter, Protein denaturation during freezing and thawing in phosphate buffer systems: monomeric and tetrameric  $\beta$ -galactosidase, *Archives of biochemistry and biophysics*, 384 (2000) 398-406.
- [222] A.M. Abdul-Fattah, V. Truong-Le, L. Yee, E. Pan, Y. Ao, D.S. Kalonia, M.J. Pikal, Drying-induced variations in physico-chemical properties of amorphous pharmaceuticals and their impact on stability II: Stability of a vaccine, *Pharm. Res.*, 24 (2007) 715-727.
- [223] A.M. Abdul-Fattah, V. Truong-Le, L. Yee, L. Nguyen, D.S. Kalonia, M.T. Cicerone, M.J. Pikal, Drying-induced variations in physico-chemical properties of amorphous pharmaceuticals and their impact on stability (I): Stability of a monoclonal antibody, *J. Pharm. Sci.*, 96 (2007) 1983-2008.
- [224] R.H. Walters, B. Bhatnagar, S. Tchessalov, K.-I. Izutsu, K. Tsumoto, S. Ohtake, Next generation drying technologies for pharmaceutical applications, *J. Pharm. Sci.*, 103 (2014) 2673-2695.

- [225] S. Sawatdee, A. Atipairin, A. Sae Yoon, T. Srichana, N. Changsan, Enhanced dissolution of sildenafil citrate as dry foam tablets, *Pharmaceutical development and technology*, 24 (2019) 1-11.
- [226] A. Sprunk, S. Page, P. Kleinebudde, Influence of process parameters and equipment on dry foam formulation properties using indomethacin as model drug, *Int. J. Pharm.*, 455 (2013) 189-196.
- [227] P.M. Lovalenti, J. Anderl, L. Yee, V. Nguyen, B. Ghavami, S. Ohtake, A. Saxena, T. Voss, V. Truong-Le, Stabilization of live attenuated influenza vaccines by freeze drying, spray drying, and foam drying, *Pharm. Res.*, 33 (2016) 1144-1160.
- [228] S. Ohtake, R.A. Martin, A. Saxena, D. Lechuga-ballesteros, A.E. Santiago, E.M. Barry, V. Truong-Le, Formulation and stabilization of *Francisella tularensis* live vaccine strain, *J. Pharm. Sci.*, 100 (2011) 3076-3087.
- [229] S. Ohtake, R. Martin, A. Saxena, B. Pham, G. Chiueh, M. Osorio, D. Kopecko, D. Xu, D. Lechuga-Ballesteros, V. Truong-Le, Room temperature stabilization of oral, live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi-vectored vaccines, *Vaccine*, 29 (2011) 2761-2771.
- [230] P.M. Lovalenti, V. Truong-Le, Foam Drying, *Drying Technologies for Biotechnology and Pharmaceutical Applications*, (2020) 257-282.
- [231] W.A. Heyman, Porous expanded citrus fruit products, *Google Patents*, 1943.
- [232] N. Aceto, H. Sinnamon, E. Schoppet, R. Eskew, Continuous vacuum drying of whole milk foam, *J. Dairy Sci.*, 45 (1962) 501-507.
- [233] O. Lepeshinskaya, The origin of the cell, *Pod znamenem marksizma (USSR)*, 5 (1939) 130-145.
- [234] I.I. Katkov, V. Isachenko, E. Isachenko, M.S. Kim, A.G.I. Lulat, A.M. Mackay, F. Levine, Low-and high-temperature vitrification as a new approach to biostabilization of reproductive and progenitor cells, *International Journal of Refrigeration*, 29 (2006) 346-357.
- [235] L. Stamp, The preservation of bacteria by drying, *Microbiology*, 1 (1947) 251-265.
- [236] D. Annear, Preservation of bacteria, *Nature*, 174 (1954) 359-360.
- [237] D. Annear, Recoveries of bacteria after drying and heating in glutamate foams, *Epidemiology & Infection*, 68 (1970) 457-459.
- [238] B. Roser, E. Gribbon, Methods for stably incorporating substances within dry, foamed glass matrices and compositions obtained thereby, *Google Patents*, 2005.
- [239] V. Bronshtein, Preservation by foam formation, *Google Patents*, 1998.
- [240] V. Bronshtein, Preservation by foam formulation: An alternative to freeze-drying, *Pharmaceutical technology* (2003), 28 (2004) 86-92.

- [241] V. Truong-Le, Preservation of bioactive materials by freeze dried foam, Google Patents, **2006**.
- [242] E.E. Worrall, Method for the preservation of viruses and mycoplasma, Google Patents, **2003**.
- [243] S. Pisal, G. Wawde, S. Salvankar, S. Lade, S. Kadam, Vacuum foam drying for preservation of LaSota virus: effect of additives, *AAPS PharmSciTech*, 7 (**2006**) E30-E37.
- [244] T.G. Smith, M. Siirin, X. Wu, C.A. Hanlon, V. Bronshtein, Rabies vaccine preserved by vaporization is thermostable and immunogenic, *Vaccine*, 33 (**2015**) 2203-2206.
- [245] F. Lv, Y. Lu, Z.-l. Hao, Y.-h. Zhao, L. Feng, J. Chen, L.-l. Wang, R. Rui, J.-b. Hou, Preparation and heat resistance study of porcine reproductive and respiratory syndrome virus sugar glass vaccine, *Vaccine*, 34 (**2016**) 3746-3750.
- [246] S. Ohtake, E. Shalaev, Effect of water on the chemical stability of amorphous pharmaceuticals: I. Small molecules, *J. Pharm. Sci.*, 102 (**2013**) 1139-1154.
- [247] R. Jangle, S. Pisal, Vacuum foam drying: an alternative to lyophilization for biomolecule preservation, *Indian J. Pharm. Sci.*, 74 (**2012**) 91.
- [248] A. A Hajare, H. N More, S. S Pisal, Effect of sugar additives on stability of human serum albumin during vacuum foam drying and storage, *Curr. Drug Del.*, 8 (**2011**) 678-690.
- [249] B. Roser, A. De Castro, Amorphous glasses for stabilizing sensitive products, *PCT Patent WO*, 99 (**2001**) 047174.
- [250] Z. Hardy, V.A. Jideani, Foam-mat drying technology: A review, *Critical reviews in food science and nutrition*, 57 (**2017**) 2560-2572.
- [251] M. Djaeni, A. Prasetyaningrum, S. Sasongko, W. Widayat, C. Hii, Application of foam-mat drying with egg white for carrageenan: drying rate and product quality aspects, *J. Food Sci. Technol.*, 52 (**2015**) 1170-1175.
- [252] M.T. Cicerone, A. Tellington, L. Trost, A. Sokolov, Substantially improved stability, *BioProcess International*, 1 (**2003**) 36-47.
- [253] M. Cicerone, C. Soles, Z. Chowdhuri, M. Pikal, L. Chang, Fast dynamics as a diagnostic for excipients in preservation of dried proteins, *American Pharmaceutical Review*, 8 (**2005**) 22.
- [254] S. Ohtake, D. Lechuga-Ballesteros, V. Truong-Le, E.J. Patzer, Strategies for heat-stable vaccines, *Vaccine development and manufacturing*, (**2015**) 287-318.
- [255] U. Food, D. Administration, Food Ingredients & Packaging, Food Additives & Petitions. Food Additive Status List. Available from: <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/food-additive-status-list>. Accessed Oct, 30 (**2017**).

- [256] U. Code, Title 21: Food and Drugs, Legal Information Institute, (2016).
- [257] F. Food, Drug, and Cosmetic Act (21 US Code Chapter 9). , U.S. Government Publishing Office, 2011.
- [258] Food, D. Administration, Guidance documents & regulatory information by topic (food and dietary supplements), 2019.
- [259] U. FDA, Substances generally recognized as safe, proposed rule, Fed. Regist., 62 (1997) 18937-18964.
- [260] U. Food, D. Administration, Label Claims for Conventional Foods and Dietary Supplements., Retrieved July, 22 (2014) 2014.
- [261] T. Abuladze, M. Li, M.Y. Menetrez, T. Dean, A. Senecal, A. Sulakvelidze, Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157: H7, Applied and environmental microbiology, 74 (2008) 6230-6238.
- [262] E. Directive, Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives, Official Journal of the European Union, 354 (2008) 16-33.
- [263] E. Directive, Directive 2000/13/EC of THE European Parliament and of the Council, Official Journal of the European Union, 109 (2000) 29.
- [264] C. von Jagow, T. Teufer, Which path to go?, European Food and Feed Law Review, 3 (2007) 136-145.
- [265] E. Acar Soykut, E.K. Tayyarcı, Ş. Evran, İ.H. Boyacı, İ. Çakır, M. Khaaladi, S. Fattouch, Microencapsulation of phages to analyze their demeanor in physiological conditions, Folia Microbiol., 64 (2019) 751-763.
- [266] S. Evran, E.K. Tayyarcı, E. Acar-Soykut, I.H. Boyacı, Applications of Bacteriophage Cocktails to Reduce *Salmonella* Contamination in Poultry Farms, Food Environ. Virol., (2022) 1-9.
- [267] H. İlhan, E.K. Tayyarcı, M.G. Caglayan, İ.H. Boyacı, N. Sağlam, U. Tamer, Replacement of antibodies with bacteriophages in lateral flow assay of *Salmonella* Enteritidis, Biosens. Bioelectron., 189 (2021) 113383.
- [268] J. Sambrook, D.W. Russell, Molecular Cloning: Ch. 8. In Vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001.
- [269] Y. Xie, L. Wahab, J.J. Gill, Development and validation of a microtiter plate-based assay for determination of bacteriophage host range and virulence, Viruses, 10 (2018) 189.
- [270] P. Hyman, Phages for phage therapy: isolation, characterization, and host range breadth, Pharmaceuticals, 12 (2019) 35.

- [271] A.M. Kropinski, Measurement of the rate of attachment of bacteriophage to cells, *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*, (2009) 151-155.
- [272] K. Petsong, S. Benjakul, K. Vongkamjan, Evaluation of storage conditions and efficiency of a novel microencapsulated *Salmonella* phage cocktail for controlling *S. enteritidis* and *S. typhimurium* in-vitro and in fresh foods, *Food Microbiol.*, 83 (2019) 167-174.
- [273] ISO, ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp., (2022).
- [274] M. Soazo, A.C. Rubiolo, R.A. Verdini, Effect of drying temperature and beeswax content on physical properties of whey protein emulsion films, *Food Hydrocolloids*, 25 (2011) 1251-1255.
- [275] N. Maftoonazad, H.S. Ramaswamy, M. Marcotte, Shelf-life extension of peaches through sodium alginate and methyl cellulose edible coatings, *International journal of food science & technology*, 43 (2008) 951-957.
- [276] C. Han, Y. Zhao, S. Leonard, M. Traber, Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*), *Postharvest biology and Technology*, 33 (2004) 67-78.
- [277] T. Senturk Parreidt, M. Lindner, I. Rothkopf, M. Schmid, K. Müller, The development of a uniform alginate-based coating for cantaloupe and strawberries and the characterization of water barrier properties, *Foods*, 8 (2019) 203.
- [278] A.B. Muley, R.S. Singhal, Extension of postharvest shelf life of strawberries (*Fragaria ananassa*) using a coating of chitosan-whey protein isolate conjugate, *Food Chem.*, 329 (2020) 127213.
- [279] E. Velickova, E. Winkelhausen, S. Kuzmanova, V.D. Alves, M. Moldão-Martins, Impact of chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa* cv Camarosa) under commercial storage conditions, *LWT-Food Science and Technology*, 52 (2013) 80-92.
- [280] N.B. Gol, P.R. Patel, T.R. Rao, Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan, *Postharvest Biology and Technology*, 85 (2013) 185-195.
- [281] E. Acar Soykut, Gıda Kaynaklı Patojen Bakterilere Etkili Bakteriyofajların Sınıflandırılması ve Karakterizasyonu, Ankara, 2022.
- [282] P. Manohar, N. Ramesh, Improved lyophilization conditions for long-term storage of bacteriophages, *Scientific reports*, 9 (2019) 1-10.
- [283] A. Skaradzińska, G. Skaradziński, A. Choińska-Pulit, P. Śliwka, W. Łaba, P. Mituła, M. Żaczek, B. Weber-Dąbrowska, Potential application of lyophilization

- in commercial use of bacteriophage preparations in veterinary medicine, *Slovenian Veterinary Research*, 55 (2018) 73-80.
- [284] Y. Zhang, X. Peng, H. Zhang, A.B. Watts, D. Ghosh, Manufacturing and ambient stability of shelf freeze dried bacteriophage powder formulations, *Int. J. Pharm.*, 542 (2018) 1-7.
- [285] E. Gonzalez-Menendez, L. Fernandez, D. Gutierrez, A. Rodriguez, B. Martinez, P. Garcia, Comparative analysis of different preservation techniques for the storage of *Staphylococcus* phages aimed for the industrial development of phage-based antimicrobial products, *PLoS One*, 13 (2018) e0205728.
- [286] Y. Zhang, M. Soto, D. Ghosh, R.O. Williams, Manufacturing Stable Bacteriophage Powders by Including Buffer System in Formulations and Using Thin Film Freeze-drying Technology, *Pharm. Res.*, 38 (2021) 1793-1804.
- [287] F.K. Bedu-Addo, Understanding lyophilization formulation development, *Pharm. Technol.*, 20 (2004) 10-19.
- [288] J.C. Lee, L. Lee, Preferential solvent interactions between proteins and polyethylene glycols, *J. Biol. Chem.*, 256 (1981) 625-631.
- [289] S. Thorne, *Food Chemistry*, Elsevier, New York, 1988.
- [290] K. Petsong, S. Benjakul, K. Vongkamjan, Optimization of wall material for phage encapsulation via freeze-drying and antimicrobial efficacy of microencapsulated phage against *Salmonella*, *J. Food Sci. Technol.*, 58 (2021) 1937-1946.
- [291] M. Samtlebe, F. Ergin, N. Wagner, H. Neve, A. Küçükçetin, C.M. Franz, K.J. Heller, J. Hinrichs, Z. Atamer, Carrier systems for bacteriophages to supplement food systems: Encapsulation and controlled release to modulate the human gut microbiota, *LWT-Food Science and Technology*, 68 (2016) 334-340.
- [292] S. Zuber, C. Boissin-Delaporte, L. Michot, C. Iversen, B. Diep, H. Brüßow, P. Breeuwer, Decreasing *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) food contamination level with bacteriophages: prospects and problems, *Microb. Biotechnol.*, 1 (2008) 532-543.
- [293] CDC, Chicken and Food Poisoning, 2022.
- [294] D.A. Spricigo, C. Bardina, P. Cortés, M. Llagostera, Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry, *Int. J. Food Microbiol.*, 165 (2013) 169-174.
- [295] G. Alharaty, H.S. Ramaswamy, The effect of sodium alginate-calcium chloride coating on the quality parameters and shelf life of strawberry cut fruits, *Journal of Composites Science*, 4 (2020) 123.
- [296] P. Hernandez-Munoz, E. Almenar, V. Del Valle, D. Velez, R. Gavara, Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria ananassa*) quality during refrigerated storage, *Food Chem.*, 110 (2008) 428-435.



- [297] J. Yan, Z. Luo, Z. Ban, H. Lu, D. Li, D. Yang, M.S. Aghdam, L. Li, The effect of the layer-by-layer (LBL) edible coating on strawberry quality and metabolites during storage, *Postharvest Biology and Technology*, 147 (2019) 29-38.
- [298] P. Luo, F. Li, H. Liu, X. Yang, Z. Duan, Effect of fucoidan-based edible coating on antioxidant degradation kinetics in strawberry fruit during cold storage, *J. Food Process. Preserv.*, 44 (2020) e14381.
- [299] C. Ribeiro, A.A. Vicente, J.A. Teixeira, C. Miranda, Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence, *Postharvest Biology and Technology*, 44 (2007) 63-70.
- [300] H.E. Tahir, Z. Xiaobo, S. Jiyong, G.K. Mahunu, X. Zhai, A.A. Mariod, Quality and postharvest-shelf life of cold-stored strawberry fruit as affected by gum arabic (*Acacia senegal*) edible coating, *J. Food Biochem.*, 42 (2018) e12527.
- [301] M. Vargas, A. Albors, A. Chiralt, C. González-Martínez, Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan–oleic acid edible coatings, *Postharvest biology and technology*, 41 (2006) 164-171.
- [302] S. Chirkov, The antiviral activity of chitosan, *Appl. Biochem. Microbiol.*, 38 (2002) 1-8.
- [303] G.G. Greer, Homologous bacteriophage control of *Pseudomonas* growth and beef spoilage, *J. Food Prot.*, 49 (1986) 104-109.
- [304] S. Guenther, D. Huwyler, S. Richard, M.J. Loessner, Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods, *Applied and environmental microbiology*, 75 (2009) 93-100.
- [305] O. Boyacioglu, M. Sharma, A. Sulakvelidze, I. Goktepe, Biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7 on fresh-cut leafy greens, *Bacteriophage*, 3 (2013) e24620.
- [306] S.P. Silva, S.C. Ribeiro, J.A. Teixeira, C.C. Silva, Application of an alginate-based edible coating with bacteriocin-producing *Lactococcus* strains in fresh cheese preservation, *LWT*, 153 (2022) 112486.

## **EKLER**

### **EK 1 – Tezden Türetilmiş Yayınlar**

B. Sezer, E.K. Tayyarcan, I.H. Boyaci, The use of bacteriophage-based edible coatings for the biocontrol of *Salmonella* in strawberries, *Food Control*, 135 (2022) 108812.

Sezer, Banu, I.H. Boyaci, Evaluation of long-and short-term storage conditions and efficiency of a novel microencapsulated *Salmonella* phage cocktail for controlling *Salmonella* in chicken meat, *Food Science and Biotechnology*, (2023), 1-9.

## **EK 2 – Tez Çalışması Orjinallik Raporu**

Tez çerçevesinde Anket Çalışması yapılmış ise “Anket Metni” sırasıyla bu bölümde verilmelidir,





