

BAKTERİYOFAJ ENKAPSÜLASYONU VE POTANSİYEL UYGULAMALARI

Derya Saygılı*, Cem Karagözlü

Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Süt Teknolojisi Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Geliş tarihi / Received: 10.05.2016

Düzeltilerek Geliş tarihi / Received in revised form: 13.06.2016

Kabul tarihi / Accepted: 20.06.2016

Özet

Enkapsülasyon, aktif olan maddenin çevresinde uygun kaplama materyali ile koruyucu bir zar oluşturulması temeline dayanmaktadır. Gıda endüstrisinde mikroenkapsülasyon istenen bileşenin dış etkenlere karşı korunması, bazı özelliklerinin sürdürülebilmesi, kolay taşınması, tat ve koku maskeleyme, oluşabilecek reaksiyonların önüne geçme gibi amaçlarla kullanılmasına rağmen koruyucu ve tedavi amaçlı fajların enkapsülasyonunun da oldukça etkili bir yöntem olarak uygulanabildiği bilinmektedir. Bakteriyofajlar 20. yüzyılın başlarından beri bakteriyel enfeksiyonlara karşı koruma ve tedavi amacıyla kullanılmış ancak artan antibiyotik tüketimi, fajların tedavi amaçlı kullanımının önüne geçmiştir. En önemli özelliği yüksek spesifitesi olan bakteriyofajlar, çiftlik hayvanlarında patojen kolonizasyonunun azaltılması (faj tedavisi), çiğ süt, et ve taze gıdalarda dekontaminasyon (biyokontrol), ekipman yüzeylerinde sanitasyon (biyosanitasyon), hazır gıdalarda raf ömrü uzatmak (biyoprezervasyon) amacıyla uygulanabilen etkin bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bakteriyofaj enkapsülasyon uygulamalarında, fonksiyonel kaplama uygulamalarındaki gelişmelere paralel olarak daha uygun maliyetli ve daha uzun süre muhafaza edilebilen mikrokapsül teknolojilerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Enkapsülasyon, bakteriyofaj, faj tedavisi, biyokontrol, biyosanitasyon, biyoprezervasyon

BACTERIOPHAGE ENCAPSULATION AND POTENTIAL APPLICATIONS

Abstract

Encapsulation is based on forming a protective membrane around the active substance with a suitable coating material. Although microencapsulation is applied for purposes including protection of some components against external factors, preservation of some features, easy handling, flavor and odor masking, prevention of some reactions, it is known that the phage encapsulation can be highly effective for protection and treatment purposes. Since the early 20th century, bacteriophages are used for the prevention and treatment of bacterial infections, however the increase in the consumption of antibiotics has prevented the use of phages for treatment. One of the most important properties of bacteriophages is the high specificity. They are effectively used for the reduction of pathogen colonization in farm animals (phage therapy), decontamination of raw milk, meat and fresh food (biocontrol), sanitation of equipment surfaces (biosanitation), extending the shelf life of prepared foods (biopreservation). There is a need for the development of microcapsule technology which is relatively cost effective and allows longer storage periods in parallel with the developments in functional coating applications.

Keywords: Encapsulation, bacteriophage, phage therapy, biocontrol, biosanitation, biopreservation

* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author;

✉ derya.saygili@ege.edu.tr,

☎ (+90) 543 822 2709,

☎ (+90) 232 311 4471

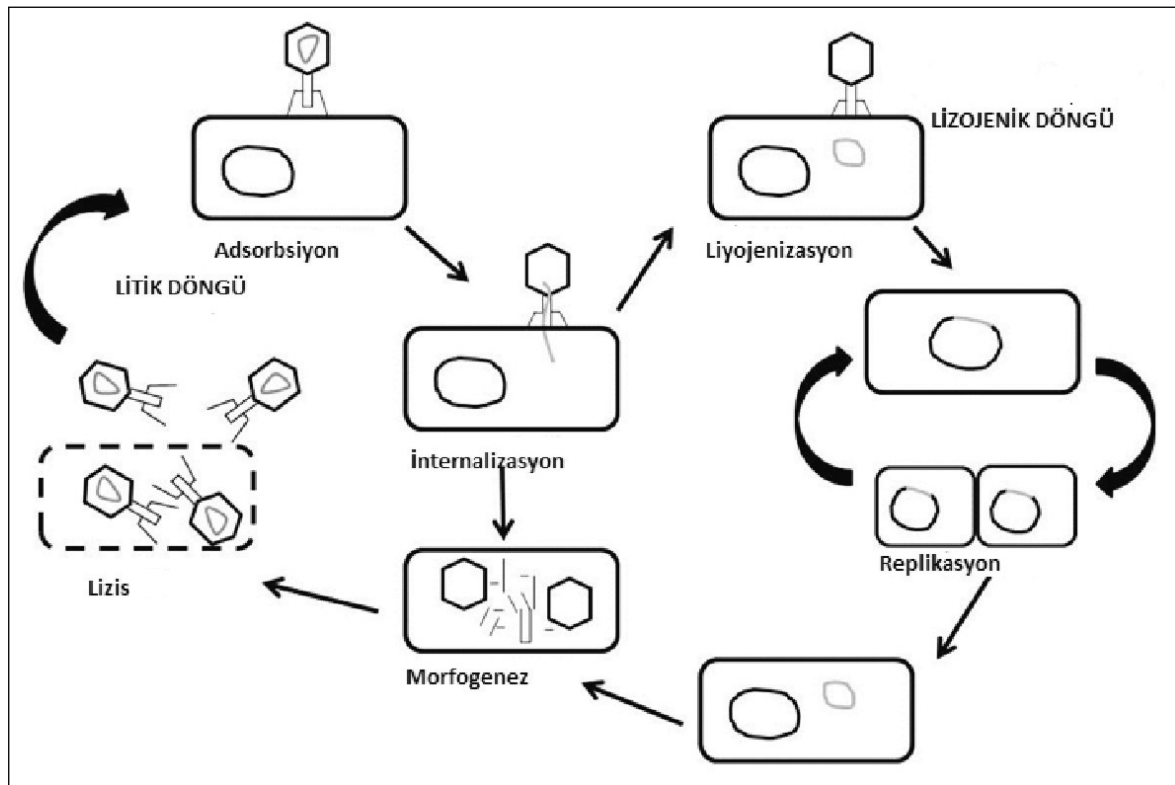
BAKTERİYOFAJLAR

Bakteri virüsleri olarak tanınan bakteriyofajlar, dünya üzerinde en çok var olan canlılar olup bakterilerin zorunlu parazitleri olarak yalnızca canlı bakteri hücreleri içerisinde çoğalmaktadırlar (1, 2). Bakteriyofajlar ilk olarak, 1896 yılında İngiliz bilim adamı Ernest Hanbury Hankin tarafından fark edilmiş, *Vibrio cholerae* bakterisinin Ganj Nehri suyunda öldüğünü ve su kaynatıldığında bu özelliğini kaybettiğini fark eden Hankin, bu olaya canlı bir varlığın sebep olduğunu ileri sürmüştür. Bu hipotezden yaklaşık 20 yıl sonra, ilk olarak bakteriyofaj tanımı Paris'te Pasteur Enstitüsünde çalışan bir mikrobiyolog olan Felix D'Herelle tarafından yapılmıştır (2). Bakteriler dışındaki canlılara (insan, hayvan, bitki) karşı zararsız olan bakteriyofajlar, pek çok farklı özelliğe göre sınıflandırılabilirler da genel anlamda en çok kullanılan sınıflandırma yöntemi kuyruk morfolojilerine göre yapılmaktadır. Bakteriyofajlar *Myoviridae* (kasılabilen kuyruk), *Siphoviridae* (uzun kısılmayan kuyruk) ve *Podoviridae* (çok kısa kuyruk) olarak 3 gruba ayrılmaktadır (3).

İki farklı yaşam döngüsüne sahip olan bakteriyofajlar Şekil 1.'de görüldüğü gibi litik ya da lizojenik

fazda çoğalmaktadırlar. Litik döngüde çoğalan virüs hücresi konak hücrenin ölmesine sebep olurken, lizojenik döngüde ise faj enfekte olmaktan ancak besin maddelerinin yetersiz kalması durumunda endojen fajlar etkinleşerek konak hücre parçalanmaktadır. Fajların ilk keşfi ile tedavi amaçlı kullanımına yönelik uygulamalarda, fajın litik ve lizojenik formda oluşu büyük önem taşımıştır. Litik fajlar tedavilere olumlu sonuçlar verirken, lizojenik fajlarda tedavi edici etki görülmemiş ve bu durum fajlar hakkında fikir ayrılıklarının yaşanmasına yol açmıştır (2, 4, 5).

20. yüzyılın başlarında fajların keşfedilmesiyle birlikte bakteri enfeksiyonlarına karşı koruyucu ve tedavi edici amaçlı kullanımları da gündeme gelmiştir. Faj tedavisi, fajların ilk keşfedildiği yıllarda tifo, kolera, idrar yolu enfeksiyonları gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmış ancak kalite kontrollerinin sağlıklı yapılamaması, yeterince saflaştırılmaması gibi çeşitli sebeplerle yapılan tedavilerin bir kısmında olumlu sonuç alınmadığı görülmüştür. 1928 yılında ise, Alexander Fleming'in penisilini keşfetmesiyle antibiyotik çağı başlamış ve fajlara olan ilgi bir anda önemini yitirmiştir (2, 6).



Şekil 1. Bakteriyofajların litik ve lizojenik yaşam döngüsü

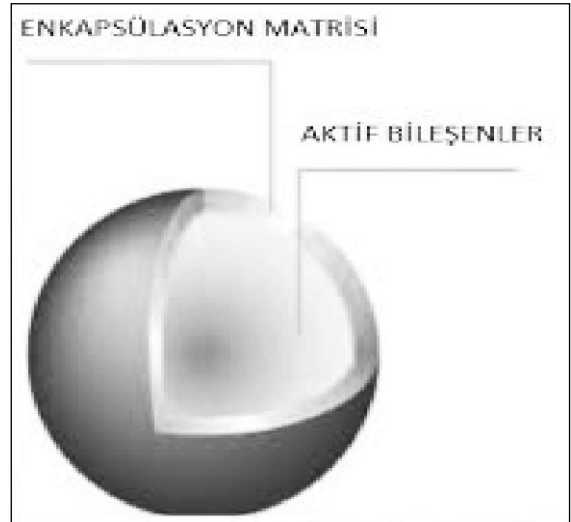
Günümüze bakıldığında, uygunsuz antibiyotik kullanımının toplumda dirençli bakterilerin hızla yaygınlaşmasına sebep olduğu görülmektedir (7). Hak ettiği önemi keşfedildiği dönemde göremeyen fajlara yönelik çalışmalar ise, günümüz teknolojisindeki gelişmelerle birlikte tekrar güncel hale gelmeye başlamıştır. Gıda sanayinde çiftlik hayvanlarında patojen kolonizasyonunu önlemek (faj tedavisi), çiğ et süt ve benzeri ürünlerde dekontaminasyonu önlemek (biyokontrol), gıda ile temas eden yüzey ve ekipmanların sanitasyonu (biyosanitasyon) ve hazır gıdalarda raf ömrünü uzatabilmek (biyoprezervasyon) gibi amaçlarla fajlardan yararlanmak mümkün olabilmektedir (8, 9). Antibiyotiklerin aksine yüksek spesifiteye sahip fajlar, düşük dozlarda dahi etkili olabilmektedir. Diğer antimikrobiyel yöntemlerle karşılaştırıldığında doğada yaygın olarak bulunmaları sayesinde nispeten daha ucuz bir yöntem olması ve gıda içeren kaynaklardan kolay izole edilebilir olmaları da fajları ön plana çıkaran özellikleri oluşturmaktadır (8, 10).

Bakteriyofajların antimikrobiyel ajan olarak kullanılabilmesinin tekrar gündeme gelmesi ile dünya genelinde pek çok firma tarafından faj bazlı antimikrobiyel ajanlar üretilmeye başlanmıştır. Patojen bakteriler gıdaya hayvanın kesimi, sağımı, depolama, ambalajlama veya uygulanan teknolojik işlemler esnasında da kontamine olabilmektedir. Özellikle çiftlik hayvanlarında görülen ve insan sağlığını riske atan *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella*, *Listeria* ve *Campylobacter* gibi en önemli patojenlere karşı geliştirilen ve gıda katkı maddesi adıyla ticari olarak üretilen fajların tüketime hazır gıdalar, hayvan besleme ve tedavide kullanımı, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi ve Tarım Bakanlığı tarafından da onaylanmıştır (11, 12). Söz konusu amaçlarla ihtiyaç duyulan faj uygulamalarında, fajların oral yolla alımı (gıda veya su içerisine ilave edilerek) veya aerosol sprey uygulaması söz konusudur (13). Her iki uygulama şekli için de bakteriyofajların canlılıkları tartışılır bir konu haline geldiğinden zaman içerisinde faj uygulamaları için yeni teknikler geliştirilmiştir. Bu tekniklerden en çok tercih edileni ise enkapsülasyon uygulamalarıdır.

ENKAPSÜLASYON UYGULAMALARI

Bir maddenin veya karışımın genellikle protein ya da karbonhidrat bazlı başka bir madde veya

sistem ile hapsedilmesi olarak tanımlanan tekniğe 'Enkapsülasyon' adı verilmektedir. Enkapsülasyon teknolojisi günümüzde farmakoloji, kimya, kozmetik, tıp, biyoteknoloji ve gıda gibi bir çok farklı alanda kullanılan ve uygulandığı ürünün fonksiyonel özelliklerini geliştirmede geniş imkanlar sunan bir teknolojidir (14-17). Enkapsülasyon uygulamaları elde edilen kapsüllerin mikro çaplarına bağlı olarak isimlendirilmekte ve gıda sanayinde daha çok 1 µm'den büyük çapa sahip mikrokapsüller tercih edildiğinden yöntem 'mikroenkapsülasyon' olarak adlandırılmaktadır (18). Şekil 2.'de görüldüğü gibi mikrokapsüller küre şeklinde olup etrafında homojen bir duvar yer almaktadır. Mikrokapsül içerisindeki kaplanan materyal öz (çekirdek) olarak ifade edilirken dış kaplama materyali membran (kabuk) olarak tanımlanmaktadır (19).



Şekil 2. Mikroenkapsül yapısı

Mikroenkapsülasyon teknolojisinin gıda sanayinde kullanımı oldukça eskiye dayanmakla birlikte son dönemlerde daha güncel hale gelmiştir. Mikroenkapsülasyon uygulamalarında kaplama materyalinin kompozisyonu elde edilecek olan son ürünün fonksiyonel özelliklerini doğrudan etkilediğinden ideal bir kaplama materyali dizaynı oldukça önemlidir (20, 21). Tercih edilen kaplama materyali çekirdeği hem işlem hem de depolama aşamalarında stabil bir şekilde koruyabilmeli, çekirdek materyal ile reaksiyona girmemelidir. Kapsülleme işleminde kolay işlenebilmeli, emülsiyon stabilitesi yüksek olmalı, istenen çözgüde çözünebilir özelliklere sahip ve maliyeti düşük olmalıdır (22).

BAKTERİYOFAJ ENKAPSÜLASYONU POTANSİYEL UYGULAMALARI

Her alanda farklı uygulama imkânları sunan mikroenkapsülasyon yöntemi gıda sanayisinde ilk olarak probiyotik mikroorganizmaların gıdalarla daha etkin tüketimini sağlamak amacıyla tanışmıştır.

Olumsuz çevre koşullarından çok hızlı etkilenen probiyotik canlıların insan gastrointestinal sisteminde yararlılığını arttırmak amacıyla mikroenkapsülasyon çalışmaları yapılmıştır. Yapılan araştırmalarda uygulanan mikroenkapsülasyon işlemi sonucunda probiyotiklerin daha uzun süre canlılığını koruduğu ve biyoyararlılığının artırıldığı ifade edilmiştir (23-26).

Gıda sanayinde en çok tercih edilen mikroenkapsülasyon yöntemi sprey kurutma yöntemidir. Ürünlerin içerisindeki suyun uzaklaştırılması, depolama ve taşıma maliyetlerinin azaltılması ve ürünlerin spesifik özelliklerinin korunması amacıyla gıda sanayinde yaygın olarak kullanılan bu yöntem, süttozu üretimi ile birlikte geliştirilmiştir. Sprey kurutma yöntemi en yaygın ve en ucuz teknik olmasına rağmen bu yöntemde kapsülleme amacıyla tercih edilecek olan materyal seçimi oldukça önemlidir (27-29). Uygulamada atomizer içerisinde hem çekirdek adı verilen kaplanacak materyal hem de kaplama materyali bir arada bulunmaktadır. Bu yöntemde en büyük dezavantaj yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyulması iken son üründe istenen miktarda hücre canlılığını korumanın da zor olduğu bildirilmiştir (30). Yüksek sıcaklıklarda çalışmanın enkapsülasyon uygulamalarında belli sorunlara sebep olduğunun rapor edilmesi üzerine (31, 32), bazı araştırmacılar tarafından daha düşük sıcaklıklarda enkapsülasyon yöntemlerinin geliştirilmesi üzerine çalışmalara odaklanılmıştır (33). Bakteriyo-fajların enkapsüle edilmesine yönelik birçok araştırmacı tarafından farklı çalışma koşullarında uygulamalar yapılmıştır. Genellikle *Staphylococcus aureus*'un sebep olduğu bilinen bakteriyel akciğer enfeksiyonunun tedavisi amacıyla sprey kurutma yöntemi ile laktoz, trehaloz ve dekstran varlığında mikroenkapsüle edilmiş faj üretimi için optimum endüstriyel üretim şartlarının arandığı bir çalışma yapılmıştır. Araştırmada, *Myovirus romulus* ve *Podovirus LUZ 19* sayılarında mikroenkapsülasyon işlemi esnasında meydana gelen azalma sırası ile 2.58 ve 0.02 logaritmik birim olarak bildirilmiştir. Çalışma sonucunda *Myovirus romulus* sayısında

hassas yapısından dolayı daha yüksek kayıp meydana geldiği rapor edilmiştir (34). Yapılan araştırmanın devamı niteliğinde olan çalışmada ise, uzun süreli depolamanın fajlar üzerine etkisi incelenmiştir. *P. aeruginosa* LUZ19 ve *S. aureus Romulus* fajının depolamada gösterdiği değişimin incelendiği çalışmada, farklı sıcaklık ve bağıl nem şartlarında depolanan trehaloz ve peynir altı suyu tozlarından elde edilen mikroenkapsüle fajların stabilitesi kontrol edilmiştir. Trehaloz tozundan elde edilen mikroenkapsül uygulamasında optimum depolama şartlarının 4°C'de % 0 bağıl nem şartlarında elde edilirken, 25°C ve üzeri sıcaklıklarda depolama koşullarının stabiliteyi olumsuz etkilediği bildirilmiştir. Peynir altı suyu tozu ile uygulanan mikroenkapsülasyon işleminde ise, 4°C'de karanlık ortamda depolanan fajların aktivasyonunda 1 aylık depolama süresince azalma olmadığı bildirilmiştir. Sonuç olarak, söz konusu araştırmada ve benzer çalışmalarda tedavi amacıyla uygulanacak olan fajların depolama koşullarının dikkate alınması gereken önemli parametreler olduğu bildirilmiştir (35-37). Ağız yoluyla uygulanan faj tedavilerinde asidik çevre koşullarında ve bazı enzimlerin varlığında fajların aktivitelerinde azalma gözlenmiştir. Araştırmacılar tarafından fajların asidik koşullardan ve enzimlerden korunmasını sağlamak amacıyla çeşitli kaplama materyalleri geliştirilmektedir. Aljinat ve pektin bazlı polimerlerin faj uygulamalarında etkin bir koruyucu kılıf olarak fajları olumsuz çevre koşullarından koruduğu bildirilirken, mikroenkapsül uygulamalarında peynir altı suyu proteini kullanımının fajların canlılığını koruduğu ve kontrollü salınımına imkân tanıdığı bildirilmiştir (38, 39).

Sprey kurutma yönteminin yanı sıra mikroenkapsülasyon amacıyla farklı teknikler geliştirilmiş ve bu konuda yeni teknikler geliştirilmeye devam edilmektedir. Mikroenkapsülasyon teknikleri farklı sınıflandırmalara ayrılmasına rağmen en yaygın kullanılan sınıflandırma şekli çoğu araştırmacı tarafından da kabul edilmiş olan 3 ayrı grupta toplanan kimyasal, fizikokimyasal ve fizikomekanik yöntemler sınıflandırmasıdır (40). Geliştirilen teknikler üzerine yapılan çalışmalarda her tekniğin farklı avantaj ve dezavantajlara sahip olduğu bildirilmiştir. Çizelge 1.'de sprey kurutma, ekstrüzyon ve emülsiyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları değerlendirilmiştir (41).

Çizelge 1. Enkapsülasyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları

Özellik	Sprey kurutma	Ekstrüzyon	Emülsiyon
Büyütülmesi	Kolay	Daha zor	Kolay
Kapsülasyon işlemi	Basit	Basit	Daha zor
Kaplama materyalinin çeşidi	Çok	Az	Çok
Şekil ve genişlik	Üniform/ Küçük	Üniform/ Büyük	Üniform değil/ Küçük
Mikroorganizma canlılığı koruma	Taşıyıcı ve sıcaklığa bağlı	Yüksek	Yüksek

Günümüz gelişmiş teknolojiyle birlikte yeniden fajların tedavi, biyokontrol, biyosanitasyon ve biyoprezervasyon amaçlarıyla etkin bir şekilde kullanımının mümkün olduğu bildirilmektedir. Güncel çalışmalar, fajların hayvan orjinli patojenlere karşı kullanılması üzerine odaklanmıştır. Uygulamada ağız yoluyla alımı (gıda veya su içerisine ilave edilerek) veya aerosol sprey olarak kullanımı söz konusu olan fajların birçok çalışmada olumlu sonuçlar verdiği görülmektedir (42-44). Broiler cinsi tavukları ölümcül solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olan *E.coli* den korumak amacıyla farklı yöntemlerde faj uygulamalarının etkinliğinin denendiği bir çalışmada, aerosol sprey ve kas içerisine enjeksiyon uygulamalarının ağız yoluyla alımlara oranla daha etkin sonuç verdiği bildirilmiştir (10). Koyunlarda *E.coli* O157:H7 seviyesini takip etmek amacıyla ağız yoluyla CEV1 ve CEV2 fajları üzerine çalışılmıştır. Çalışmada hem ayrı ayrı hem de karışım olarak fajların etkileri araştırılmıştır. CEV1 ve CEV2 fajlarından oluşan karışımın % 99.9 oranında patojen *E.coli* O157:H7'yi yok ettiği ve karışım halindeki faj uygulamasının ayrı halde uygulanan fajlara oranla daha etkili olduğu bildirilmiştir (45). Bir başka çalışmada, tavuklarda *Salmonella* bakterisinin kümes içerisinde bulaşmasını önlemek amacıyla yemlerle birlikte faj uygulamasının etkisi incelenmiştir. Çalışmada faj uygulamasının *Salmonella*'nın kümes içerisinde yayılmasını önlediği rapor edilmiştir (46).

Bakteriyofajların biyokontrol ajanları olarak kullanımı ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda, *E.coli* O157:H7 sayısını düşürücü etkisiyle fajlar oldukça etkili sonuçlar ortaya koymuştur (47, 48, 49). Domates, ıspanak gibi taze tüketilen ürünlerde deneysel olarak kontamine edilmiş *E.coli* O157:H7'nin biyokontrolü amacıyla gerçekleştirilen bakteriyofaj uygulamalarında, domateslerde 120 saat sonunda % 94 azalma görülürken, ıspanaklarda 24 saat sonunda % 100 oranında düşüş olduğu bildirilmiştir (47). ECP-100 faj karışımının marul ve taze kesilmiş kavunlarda uygulandığı bir çalışmada, sprey olarak uygulanan faj karışımının 4°C'de 2 gün depolama sonrasında *E.coli* O157:H7

sayısında önemli derecede azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir (48). Benzer şekilde dekontamine edilen taze ıspanak ve marullarda uygulanan faj karışımı yardımıyla 10 dakika gibi bir süre içerisinde *E. coli* O157:H7 bakteri canlılığı tespit edilemediği rapor edilmiştir (49). Önemli patojenlerden olan *Salmonella typhimurium* PT160 ve *Campylobacter jejuni* inoküle edilerek 5°C ve 24°C'de depolanan çiğ etlerde ise, bakteriyofaj uygulamasında inkübasyon süresi boyunca azalma olduğu ve söz konusu azalmanın inkübasyon koşullarına bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir (50). Bakteriyofajların biyokontrol ajanı olarak kullanımda etkinliğinin incelendiği bir başka çalışmada ise, çimlenen hardal ve brokoli tohumlarında farklı faj uygulamalarının ve karışım uygulamanın etkinliği araştırılmıştır. Çalışmada faj A ve B karışımının uygulandığı tohumlarda *Salmonella* sayısında önemli derecede düşüş olduğu ifade edilmiştir (51). Elma ve kavunlarda faj karışımına kombine olarak uygulanan nisin ilavesinin *Listeria monocytogenes* sayısında meydana gelen azalmayı destekleyici etki gösterdiği bildirilmiştir. Bakteriyofaj uygulaması ile elma ve kavunlarda *Listeria* sayısında meydana azalma sırası ile 0.4 ve 4.6 log iken, bakteriyofaj ve nisin birlikte uygulandığında bu değerlerin sırası ile 2.3 ve 5.7 log olduğu rapor edilmiştir (52). Son dönemlerde yapılan çalışmalardan birinde ise, *Salmonella*'nın domuz derisi, tavukgöğsü ve yumurtalardaki gelişimi üzerine 3 farklı faj karışımının etkisi incelenmiştir. Çalışmada, en etkin azalma domuz derisinde sprey uygulama ile elde edilirken, kontamine tavukgöğüslerinde faj solüsyonuna 5 dakika daldırma metodu ile istatistiksel olarak önemli azalma görüldüğü bildirilmiştir. Çalışmada yumurtalarda uygulanan sprey faj uygulaması da etkin bir sonuç verirken, söz konusu azalmanın domuz derisinde görülen azalmadan daha düşük olduğu rapor edilmiştir (53).

Biyokontrol ajanı olarak kullanımının yanı sıra tüketime hazır gıdalarda raf ömrünü uzatmaya yardımcı olan bakteriyofaj uygulamaları, çeşitli gıdalar üzerinde yapılan çalışmalarda biyopre-

zervasyon ajanı olarak da olumlu sonuçlar vermiştir. Farklı gıda örneklerinde (et, ıspanak) *E.coli* O157:H7 üzerine 3 farklı faj karışımının etkisi incelenmiştir. Araştırmada, 10^7 kob/ml düzeyinde kontamine edilen gıda örnekleri 4°C ve 24°C'de depolanmıştır. Et örneklerinde 4°C ve 24°C'de 24 saat depolama sonrası sırası ile 0.48 ve 1.97 logaritmik birim azalma olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada ıspanak örneklerinde başlangıç kontaminasyonu 10^7 kob/ml olan *E.coli* O157:H7 sayısının 24°C'de 24, 48 ve 72 saat depolama sonrasında sırasıyla 3.28, 2.88 ve 2.77 logaritmik birim azalma tespit edildiği bildirilmiştir (54). *Campylobacter* faj uygulamalarının araştırıldığı bir çalışmada, çiğ ve pişmiş sığır eti üzerine uygulanan fajların etkinliğinin etin çeşidine ve depolama koşullarına bağlı olarak değiştiği, hem çiğ hem de pişmiş sığır etlerinde önemli ölçüde azalma kaydedilmiştir (50). *Salmonella* üzerine yapılan araştırmalarda, *Salmonella* typhimurium'un tüketime hazır gıdalardaki kontrolünü sağlamak amacıyla FO1 ve E2 fajları araştırılmıştır. Çalışmada, kırmızı et ve çikolatalı sütün 8°C'de depolanan faj uygulamasında 3 logaritmik birim azalma saptanırken, 15°C'de depolamada 5 logaritmik birim azalma görüldüğü rapor edilmiştir (55). Bir başka araştırmada, çiğ ve pastörize süttten Cheddar peyniri üretiminde bakteriyofajların *Salmonella* enteritidis'in canlılığına etkisini tespit etmek amacıyla üretim ve depolama aşamalarında analizler gerçekleştirilmiştir. Bakteriyofaj ilave edilmeyen sütlerden üretilen peynirlerde *Salmonella* sayısında artış gözlenirken, hem çiğ hem de pastörize süte faj ilavesinin *Salmonella* sayısını belirgin ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. 8°C'de depolanan ve pastörize süttten elde edilen peynirlerde 89 gün sonunda *Salmonella* varlığının tespit edilemediği bildirilmiştir (56). Tavuk derisinde *Salmonella* miktarını azaltıcı etkisini tespit etmek amacıyla çeşitli kimyasallarla bakteriyofaj uygulamalarının karşılaştırıldığı bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada, kümes hayvanlarında en önemli patojen olan ve gıda kaynaklı hastalıklara sebebiyet veren *Salmonella* ile kontamine tavuklarda yapılan analizlerde, bakteriyofaj uygulamasının kimyasal uygulamalar yerini alabilecek önemli bir alternatif olduğu vurgulanmıştır (57). Benzer bir çalışma ise, olgunlaştırılmış yumuşak beyaz peynirler ve kırmızı damarlı peynirlerde fajların kullanımı ile *Listeria monocytogenes*'in kontrolünü sağlamak amacıyla yapılmıştır. Araştırmada fajların

biyokontrol ajanı olarak kullanımının önemi vurgulanırken 22 günlük depolama sonunda *Listeria monocytogenes* sayısında 3 logaritmik birim azalma gözlemlendiği bildirilmiştir (58). Tüketime hazır tavuklarda kısalabilir kuyruk morfolojisine sahip fajların biyoprezervasyon amacıyla kullanıldığı çalışmada, 5°C'de ve 30°C'de depolamalarda belirgin farklılıklar meydana geldiği gözlenmiştir. 30°C'de depolanan tavuklarda 2.5 logaritmik birim azalma görülürken, 5°C'de depolanan tavuklarda 21 gün sonunda *Listeria monocytogenes*'in gelişiminin engellendiği bildirilmiştir (59). Pastörize süt, taze ve sert tip peynirlerde *S.aureus*'un gelişimini önlemek amacıyla uygulanan faj çalışmasında ise, diğer patojenlere karşı elde edilen sonuçlara paralel sonuçlar alınmıştır. Pastörize sütte yapılan faj uygulamasında iki farklı başlangıç kontaminasyon seviyesinde faj ve yüksek hidrostatik basınç uygulamasının birlikte kullanımının kontaminasyon düzeyini azaltmada oldukça etkin olduğu bildirilmiştir. Çalışmada 400 MPa basınç ile kombine kullanılan fajların, başlangıçta 10^4 ve 10^6 kob/ml olan *S. aureus* sayısını 10 kob/ml seviyelerine düşürdüğü ifade edilmiştir. Taze ve sert tip peynirlerde 10^6 kob/ml seviyesinde kontamine edilen pastörize sütlere yaklaşık 10^6 kob/ml litik faj karışımı ilave edilerek iki farklı tip peynir üretimi gerçekleştirilmiştir. Taze peynirlere uygulanan faj karışımı 3 saat içerisinde 3.83 logaritmik birim azalma sağlarken, 6 saat sonunda *S.aureus* sayısını tespit edilemeyecek kadar düşürmüştür (60, 61).

Gıdaların kontrolü olduğu kadar gıdalarla temas halinde bulunan ekipman ve yüzeylerin de temizliği büyük önem taşımaktadır. Gıda ile temas halinde bulunan alet ekipman ve yüzeylerin faj uygulamaları ile dezenfeksiyonu işlemine biyosanitasyon adı verilmektedir. Biyosanitasyon amacıyla yapılan çalışmalarda da, diğer faj uygulamalarına paralel sonuçlar alındığı görülmektedir. Yapılan bir çalışmada 10^6 , 10^5 ve 10^4 kob seviyelerinde *E.coli* O157:H7 ile kontamine edilen paslanmaz çelik, seramik ve yüksek yoğunluklu polietilen (HDPE) yüzeylerde faj uygulaması ile önemli sonuçlar alındığı ifade edilmiştir. Çalışmada, farklı yüzeylere inoküle edilen patojenler 4, 12, 23 ve 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. 37°C ve 12°C'de paslanmaz çelik yüzeylerde 10 dakika gibi kısa bir süre içerisinde patojen varlığı tespit edilemezken, 23°C'de 1 saatin sonunda aynı sonuca ulaşılmıştır. Seramik

yüzeylerde ise, 37°C'de 10 dakika, 23°C'de 1 saatten sonra benzer sonuç elde edilmiştir (62). Söz konusu çalışma kontamine sert yüzeylerde faj uygulamasının etkinliğini destekler nitelikte sonuçlar vererek bakteriyofajların biyosanitasyon ajanı olarak kullanımının önemini vurgulayan diğer çalışmaları da destekler niteliktedir (63).

SONUÇ

Bakteriyofajların tedavi, biyokontrol, biyosanitasyon ve biyoprezervasyon amaçlı kullanımına yönelik çalışmaların özellikle son yıllarda artış gösteriyor olmasının yanı sıra bu konu üzerine çalışan ticari firma sayısının da artması fajların antimikrobiyel yeteneklerinin oldukça yüksek olduğunun tespit edilmesinden kaynaklanmaktadır. Günümüzde kimyasal koruyuculardan uzak durmaya çalışan tüketici profili için bakteriyofaj kaynaklı koruyucuların kullanımı daha güvenilir ve alternatif bir yöntem olarak ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda pozitif sonuç alabilmek için ilk olarak fajların buldukları ortamdan doğru şekilde izole edilmeleri gerekmektedir. Bu nedenle bakteriyofajların alternatif antimikrobiyel ajanlar olarak kullanımının etkin bir şekilde yaygınlaşmasını sağlamak için daha güvenli ve teknolojik çalışma ortamlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Brussow H, Kutter E. 2005. Phage Ecology. In: *Bacteriophages: Biology and applications, Florida*, pp. 129-163.
2. Coşkun, MY. 2003. Bakteriyofaj Tedavisi. *Bilim ve Teknik*. 474 (5): 82-85.
3. Ackermann HW. 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch. Virol*, 152, 227-243.
4. Seçkin, AK., Baladura, E. 2010. Gıdaların Muhafazasında Bakteriyosin ve Bakteriyofaj Uygulamaları. *GIDA*, 35(6): 461-467.
5. Chibeu, A. 2013. Bacteriophages in food safety. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, Formatex.
6. Wittebole, X., De Roock, S., Opal, SM. 2014. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, 5, 226-235.
7. Dewaal, CS., Grooters, SV. 2013. Antibiotic resistance in foodborne pathogens. *Center for Sci Publ Intrest*, May.
8. Sillankorva, SM., Oliverira, H., Azeredo, J. 2012. Bacteriophages and their role in food safety. *Int J Microbiol*, 863-945.
9. Temelli, S., Çetin, E. 2011. Gıdalarda Patojen Kontrolünde Bakteriyofaj Kullanımı. *Uludağ Üniv. J. Fac. Vet. Med.* 30(2), 45-52.
10. Loc-Carrillo, C., Abedon, ST. 2011. Pros and Cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1, 111-114.
11. Endersen, L., O'Mahony, J., Hill, C., Ross, P., McAuliffe, O., Coffey, A. 2014. Phage therapy in the food industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 327-349.
12. Carvalho, CM., Santos, SB., Kropinski, AM., Ferreira, EC., Azeredo, J. 2012. Phages as therapeutic tools to control major foodborne pathogens: *Campylobacter* and *Salmonella*. In: *Bacteriophages*, pp.180-214.
13. Huff, WE., Huff, GR., Rath, NC. 2002. Prevention of *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens with bacteriophage (SPR02). *Poult Sci*, vol. 81(4), 437-441.
14. Poshadri, A., Aparna, K. 2010. Microenkapsulation Technology: A Review. *J.Res. ANGRAU* 38(1), 86-102.
15. Çakır, İ. 2007. Fonksiyonel Gıda Bileşenleri ve Probiyotiklerde Mikroenkapsülasyon Uygulamaları. 5. Gıda Mühendisliği Kongresi, 08-10 Kasım, Ankara.
16. Ünal, E. ve Erginkaya, Z. 2010. Probiyotik Mikroorganizmaların Mikroenkapsülasyonu. *GIDA*, 35(4), 297-304.
17. Gouin, S. 2004. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Sci and Technol*, 15, 330-347.
18. Choinska-Pulit, A., Mitula, P., Sliwka, P., Laba, W., Skaradzinska, A. 2015. Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications. *Trends in Food Sci & Technol* 45, 212-221.
19. Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J Food Engineering*, 104 (4), 467-483.
20. Sakai, S. and Kawakami, K. 2010. Development of subsieve-size capsules and application to cell therapy. *Advances in Experimental Med and Biol*, 670, 22-30.

21. Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. 2007. Application of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res. Int.* 40, 1107-1121.
22. Koç, M., Sakin, S. Ertekin, FK. 2010. Mikroenkapsülasyon ve Gıda Teknolojisinde Kullanımı. Pamukkale Üniversitesi. *Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(1), 77-86.
23. Özcan, T. ve Altun, B. 2013. Süt Ürünlerinde Probiyotik Bakterilerin Mikroenkapsülasyonu I: Enkapsülasyon Teknikleri. U. Ü. *Ziraat Fakültesi Dergisi* 27(2), 93-104.
24. Burgain, J., Corgneau, M., Scher, J. Gaiani, C. 2015. Encapsulation of Probiotics in Milk Protein Microcapsules. In: *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications* Chapter 20. France, pp. 391-406.
25. Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M, Scher, J. 2011. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *J Food Engineering*, 104 (4), 467-483.
26. Li, R., Zhang, Y., Polk, DB., Tomasula, PM., Yan, F., Liu, L. 2016. Preserving viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG *in vitro* and *in vivo* by a new encapsulation system. *J Control Release*, 230(28), 79-87.
27. Gökmen, S., Palamutoğlu, R., Sarıçoban, C. 2012. Gıda Endüstrisinde Enkapsülasyon Uygulamaları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7(1), 36-50.
28. Venkata Naga Jyothi, N., Muthu Prasanna, P., Narayan Sakarkar, SK., Prabha, S., Seetha Ramaiah, P., Srawan, GY. 2010. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J Microencapsul*, 27(3), 187-197.
29. Campos, DC., Acevedo, F., Morales, E., Aravena, J., Amiard, V., Jorquera, MA. 2014. Microencapsulation by spray drying of nitrogen-fixing bacteria associated with lupin nodules. *World J Microbiol and Biotechnol*, 30, 2371-2378.
30. Gbassi, GK. and Vandamme, T. 2012. Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. *Pharm*, 4, 149-163.
31. O'Riordan, K., Andrews, D., Buckle, K., Conway, P. 2001. Evaluation of microencapsulation of a bifidobacterium strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *J Appl Microbiol*, 91, 1059-1066.
32. Müller-Merbach, M., Rauschner, T., Hinrichs, J. 2005. Inactivation of bacteriophages by thermal and high-pressure treatment. *Int Dairy J*, 15, 777-784.
33. Matinkhoo, S., Lynch, KH., Dennis, JJ., Finlay, WH., Vehring, R. 2011. Spraydried respirable powders containing bacteriophages for the treatment of pulmonary infections. *J Pharm Sci*, 100, 5197-5205.
34. Vandenheuveel, D., Singh, A., Vandersteegen, K., Klumpp, J., Lavigne, R., Van den Mooter, G. 2013. Feasibility of spray drying bacteriophages into respirable powders to combat pulmonary bacterial infections. *European J Pharm and Biopharm*, 84, 578-582.
35. Vandenheuveel, D., Meeus, J., Lavigne, R., Van den Mooter, G. 2014. Instability of bacteriophages in spray-dried trehalose powders is caused by crystallization of the matrix. *Int J Pharm*, 472, 202-205.
36. Golec, P., Dabrowski, K., Hejnowicz, M., Gozdek, A., Los, JM., Wegrzyn, G. 2011. A reliable method for storage of tailed phages. *J Microbiol Meth*, 88(3), 486-489.
37. Vonasek, E., Le, P., Nitin, N. 2014. Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release. *Food Hydrocolloids*, 37, 7-13.
38. Dini, C., Islan, GA., de Urraza, PJ., Castro, GR. 2012. Novel biopolymer matrices for microencapsulation of phages: enhanced Protection against acidity and protease activity. *Macromolecular Biosci*, 12, 1200-1208.
39. Tang, Z., Huang, X., Baxi, S., Chambers, JR., Sabour, PM., Wang, Q. 2013. Whey protein improves survival and release characteristics of bacteriophage Felix O1 encapsulated in alginate microspheres. *Food Research Int*, 52, 460-466.
40. Mortazavian, A., Razavi, SH., Ehsani, MR., Sohrabvandi, S. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian J Biotechnol*, 5(1), 1-18.
41. Chen, M.J., Chen, K.N., 2007. Applications of probiotic encapsulation in Dairy Products. In: Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems, *Blacwell Publishing*, U.S.A., pp. 83-112.
42. Carvalho, CM., Santos, SB., Kropinski, AM., Ferreira, EC., Azeredo, J. 2012. Phages as therapeutic tools to control major foodborne pathogens: *Campylobacter* and *Salmonella*. In: *Bacteriophages*, Chapter 10, pp. 180-214.

43. Ma, Y., Pacan, J.C., Wang, Q., Sabour, P.M., Huang, X., Xu, Y. 2012. Enhanced alginate microspheres as means of oral delivery of bacteriophage for reducing *Staphylococcus aureus* intestinal carriage. *Food Hydrocolloids*, 26, 434-440.
44. Murthy, K., Engelhardt, R. 2012. Stabilized bacteriophage formulations. *European Patent Appl*, 2, 462-940.
45. Raya, R.R., Oot, R.A., Moore-Maley, B., Wieland, S., Callaway, T.R. 2011. Naturally resident and exogenously applied T4-like and T5-like bacteriophages can reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep guts. *Bacteriophage*, 1(1), 15-24.
46. Lim, T.H., Lee, D.H., Lee, Y.N. 2011. Efficacy of bacteriophage therapy on horizontal transmission of *Salmonella Gallinarum* on commercial layer chickens. *Avian Diseases*, 55(3), 435-438.
47. Abuladze, T., Li, M., Menetrez, M.Y., Dean, T., Senecal, A. and Sulakvelidze, A. 2008. Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Appl and Environ Microbiol*, 74(20) 6230-6238.
48. Sharma, M., Patel, J.R., Conway, W.S., Ferguson, S., Sulakvelidze, A. 2009. "Effectiveness of bacteriophages in reducing *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut cantaloupes and lettuce," *J Food Protect*, 72(7) 1481-1485.
49. Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., Diez-Gonzalez, F. 2011. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on hard surfaces by treatment with a bacteriophage mixture. *Int J Food Microbiol*, 145(1), 37-42.
50. Bigwood, T., Hudson, J.A., Billington, C., Carey-Smith, G.V., Heinemann, J.A. 2008. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat. *Food Microbiol*, 25(2), 400-406.
51. Pao, S., Randolph, S.P., Westbrook, E. W., Shen, H. 2004. Use of bacteriophages to control *Salmonella* in experimentally contaminated sprout seeds. *J Food Sci*, 69(5), 127-130.
52. Leverentz, B., Conway, W.S., Alavidze, Z. 2001. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. *J Food Protect*, 64(8), 1116-1121.
53. Spricigo, D.A., Bardina, C., Cortes, P., Lagostera, M. 2013. Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *Int J Food Microbiol*, 16(5), 169-174.
54. Hong, Y., Pan, Y., Ebner, P.D. 2014. Meat Science and Muscle Biology Symposium: Development of bacteriophage treatments to reduce *Escherichia coli* O157:H7 contamination of beef products and produce. November 24.
55. Guenther S., Herzig O., Fieseler L., Klumpp J., Loessner M.J. 2012. Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. *Int J Food Microbiol*, 154, 66-72.
56. Modi, R., Hirvi, Y., Hill, A., Griffiths, M.W. 2001. Effect of phage on survival of *Salmonella* Enteritidis during manufacture and storage of Cheddar cheese made from raw and pasteurized milk. *J Food Protect*, 64(7), 927-933.
57. Hungaro, M.H., Santos Mendonca, R.C., Gouvea, D.M., Danata Vanetti, M.C., Oliveira Pinto, C.L. 2013. Use of bacteriophage to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with chemical agents. *Food Res Int.*, 52, 75-81.
58. Guenther S., Loessner M.J. 2011. Bacteriophage biocontrol of *Listeria monocytogenes* on soft ripened white mold and red-smear cheeses. *Bacteriophage*, 1, 94-100.
59. Bigot, B., Lee, W.J., McIntyre, L. 2011. Control of *Listeria monocytogenes* growth in a ready-to-eat poultry product using a bacteriophage. *Food Microbiol*, 28(8), 1448-1452.
60. Tabla, R., Martinez, B., Rebollo, J.E. 2012. Bacteriophage performance against *Staphylococcus aureus* in milk is improved by high hydrostatic pressure treatments. *Int J Food Microbiol*, 156(3), 209-213.
61. Bueno, E., Garcia, P., Martinez, B., Rodriguez, A. 2012. Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in fresh and hard-type cheeses. *Int J Food Microbiol*, 158(1), 23-27.
62. Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., Diez-Gonzalez, F. 2011. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on hard surfaces by treatment with a bacteriophage mixture. *Int J Food Microbiol*, 145(1), 37-42.
63. Mahony, J., Auliffe, O.M., Ross, R.P., Sinderen, D., 2011. Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens. *Curr. Opin. Biotech.*, 22, 157-163.