






Bakteriyofajların Antibakteriyel Ajan Olarak Kullanımı

Firuze Ergin , Gizem Yıldız , Emine Mine Çomak Göçer , Ahmet Küçükçetin  

Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

Geliş Tarihi (Received): 03.04.2017, Kabul Tarihi (Accepted): 14.06.2017

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): kucukcetin@akdeniz.edu.tr (A. Küçükçetin)

☎ 0 242 310 65 69 📠 0 242 310 63 06

ÖZ

Doğada en fazla bulunan biyolojik topluluklardan birini temsil eden bakteriyofajlar, kendilerine özgü hedef bakteriyi öldürebilen bakteri virüsleri olarak tanımlanmaktadır. Bakteriyofajlar, 20. yüzyılın başlarında bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmıştır. Ancak, penisilin keşfi ve antibiyotik endüstrisinin gelişmesi, bakteriyofajların antibakteriyel ajan olarak kullanımının göz ardı edilmesine neden olmuştur. Patojen bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazanması, bakteriyofaj uygulamasını yeniden gündeme getirmiştir. Son yıllarda patojen bakterilere karşı bakteriyofajların kullanıldığı ve "faj terapisi" olarak adlandırılan tedavi yönteminin geliştirilmesine yönelik çalışmalar hızla artmaktadır. Bakteriyofajlar, gıdalarda patojen bakterilerin kontrolünde ve bazı ülkelerde hayvan ve insanlarda patojen bakteri enfeksiyonları ile mücadelede antibakteriyel ajan olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte bakteriyofajlar, gıdanın fizikokimyasal özellikleri, koruyucu bileşenleri, depolama koşulları ve ağız yoluyla alınmalarından sonra gastrointestinal sistemden geçişleri sırasında yüksek asitlik, sindirim enzimleri ve safra gibi olumsuz etkilere maruz kalmalarından dolayı aktivitelerini kaybetmektedir. Yapılan çalışmalar bakteriyofajları, bileşenleri, fizikokimyasal özellikleri ve depolama koşulları ile gıdanın ve gastrointestinal sistemin olumsuz etkilerine karşı korumak için mikrokapsülasyon yönteminin kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Bu derlemede, bakteriyofajların gıdalarda antibakteriyel ajan olarak kullanımı ve mikrokapsüle bakteriyofajların *in vitro* gastrointestinal sistem koşullarında salınımları ile ilgili bilgi verilmesi amaçlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyofaj, Antibakteriyel ajan, Mikrokapsülasyon

Use of Bacteriophages as Antimicrobial Agents

ABSTRACT

Bacteriophages represent one of the most abundant biological populations in nature and are defined as bacterial viruses that can kill specific target bacteria. Bacteriophages had been used to treat bacterial infections at the beginning of the 20th century. However, discovery of penicillin and development of antibiotic industry caused the uses of bacteriophage as an antibacterial agent to be ignored. Gaining resistance to antibiotics of pathogenic bacteria brought up bacteriophages application again. In recent years, studies have been increasing on the uses of bacteriophages against pathogenic bacteria and the development of a treatment method called "phage therapy". Bacteriophages have been used as an antibacterial agent to control pathogenic bacteria in foods and to combat pathogenic bacteria infections in animals and humans in some countries. Moreover, bacteriophages have lost their activities because of exposure to adverse effects such as physicochemical properties, preventive components and storage conditions of food and high acidity, digestive enzymes and bile during their passage along the gastrointestinal system after taken orally. Studies have revealed that microencapsulation can be used to protect bacteriophages against adverse effects of components, physicochemical properties and storage conditions of food, and gastrointestinal system. In this study, the use of bacteriophages as antibacterial agents in foods and the releases of microencapsulated bacteriophages in the conditions of *in vitro* gastrointestinal system are reviewed.

Keywords: Bacteriophage, Antibacterial agent, Microencapsulation

GİRİŞ

Bakteriyofajların varlığı ilk kez 1896 yılında Ernest Hankin tarafından fark edilmiştir. Frederick Twort tarafından 1913 yılında "bakterileri enfekte ederek öldüren bir etmen" olarak tanımlansa da; Felix d'Herelle, 1917'de "dizanteri basilinin görünmez bir mikrobunu" keşfederek bakteriyofaj olarak adlandırmış ve bakteriyofajların antimikrobiyal etkisini dünyaya duyuran ilk kişi olmuştur. Bakteriyofajların antimikrobiyal ajan olarak kullanımı, 1928'de Alexander Fleming'in bakterilerin çoğalmasını engelleyen penisilini bulmasıyla Batı dünyası için önemini yitirmiş ve patojen bakterilere karşı antibiyotik çağı başlamıştır [1, 2]. Patojen bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazanması ve bu durum karşısında yeni geliştirilen antibiyotiklerin de yetersiz kalması, bilim insanlarını patojen bakterilere karşı yeni yöntemler geliştirmeye yönlendirmektedir [3, 4]. Son yıllarda patojen bakterilere karşı bakteriyofajların kullanıldığı ve "faj terapisi" olarak adlandırılan tedavi yöntemi hızla gelişmektedir [5]. Bakteriyofajlar antibakteriyel ajan olarak, gıdalarda patojen bakterilerin kontrolünde, gıdaların duysal özelliklerini değiştiren yüksek ve düşük sıcaklık uygulamaları, kurutma, fermantasyon işlemi ve kimyasal koruma gibi klasik yöntemlerin yerine kullanılabilir [6]. Ayrıca bakteriyofajlar bazı ülkelerde hayvan ve insanlarda patojen bakteri enfeksiyonları ile mücadelede de kullanılmaktadır. Bakteriyofajların antimikrobiyal özelliğinden faydalanabilmesi için, üretiminde kullanılan gıdanın fizikokimyasal özellikleri (sıcaklık, pH, a_w vb.), koruyucu bileşenleri ve depolama koşulları gibi olumsuzluklara karşı direnç göstermesi bir zorunluluktur. Ayrıca bakteriyofajların gıda ile birlikte vücuda alındıktan sonra gastrointestinal sistemden geçiş süresince de yüksek asitlik ile enzim ve safra gibi olumsuz koşullarda aktivitelerini koruması ve vücuttaki hedef bölgeye ulaşması gerekmektedir [7]. Bakteriyofajların gıdalarda antibakteriyel ajan olarak kullanımlarının yanında bakteriyofajları hem gıdanın olumsuz özelliklerinden hem de tüketimleri sonucunda gastrointestinal sistemin olumsuz koşullarından korumak için mikrokapsülasyon uygulamalarına yönelik çalışmalar artmaktadır [8]. Bu derleme, bakteriyofajların gıdalarda antibakteriyel ajan olarak kullanımı, bakteriyofajların mikrokapsülasyonu ve bakteriyofajların *in vitro* gastrointestinal sistem koşullarında mikrokapsüllerden salınımları ile ilgili bilgilerinin verilmesi amaçlanmaktadır.

BAKTERİYOFAJLAR VE ANTİBAKTERİYEL AJAN OLARAK GIDALARDA KULLANIMLARI

Bakteriyofajlar, prokaryot organizmaları enfekte eden virüsler olarak tanımlanmaktadır. Bakteriyofajlar hayat döngülerini litik ve lizogenik olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirmektedir. Lizogenik döngüde bakteriyofaj, bakteri hücresi içine girdikten sonra genetik materyalini bakteri DNA'sı ile entegre hale getirmektedir. Bakterinin içinde bulunduğu çevresel koşullar kötüleşmediği sürece bakteriyofaj etkisiz bir şekilde varlığını sürdürmektedir. Ancak bakterinin çevresel koşulları bozulduğunda, örneğin besin kaynakları tükendiğinde, bakteri içindeki bakteriyofaj

aktif hale gelmekte ve çoğalarak bakteriyi parçalamaktadır. Litik döngüde ise, bakteriyofaj bakteriyi içinde çoğalmakta, bakteriyi parçalayarak başka bakterileri de enfekte edecek yeni bakteriyofajların oluşumuna neden olmaktadır. Bakteriyofajların antimikrobiyal etkilerini gösterebilmeleri için litik döngüye sahip olmaları gerekmektedir [9].

Kimyasal antibiyotiklerle karşılaştırıldığında patojenlere karşı bakteriyofaj uygulamasının birçok avantajı bulunmaktadır. Bakteriyofajlar yalnızca kendilerine özgü bakteri türlerine karşı aktivite göstermekte ve antibiyotiklerin aksine doğal mikrobiyotayı oluşturan diğer organizmalara zarar vermemektedir. Antibiyotiklerin etkisi kullanıldıktan sonra azalmaktayken, bakteriyofajlar ortamdaki konakçı bakteriler ölene kadar çoğalmakta ve bakteriler öldüğünde inaktif hale gelerek kendi üremelerini (oto doza) kontrol etmektedir. Bakteriyofajlar çoğunlukla nükleik asit ve proteinlerden oluştuğu için toksik değildir. Bakterilerin oluşturduğu antibiyotiğe direnç mekanizması bakteriyofajların söz konusu bakteriyeye etki etmesini engelleyememektedir. Patojen bakterilere karşı etkili bakteriyofajın bulunması kolaydır. Bakteriyofajlar genellikle yüksek sayıda buldukları kanalizasyonlardan ve diğer atık maddelerinden izole edilebilmektedir. Ayrıca bakteriyofajların üretimi antibiyotiklere göre daha ucuzdur [10, 11].

Gıdalarda patojen bakterilerin kontrolünde antibakteriyel kimyasal ajanlar yerine bakteriyofaj kullanımı günümüzde mevcuttur. Özellikle, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (USFDA-United States Food and Drug Administration)'nin 2006 yılında bakteriyofajların et ve tavuk ürünlerinde patojen bakteri olan *Listeria monocytogenes*'in kontrolü için kullanımını onaylayıp gıda katkı maddesi olarak GRAS (Generally Recognized as Safe-Genel Olarak Güvenli Olarak Tanınan) listesine eklemesinden sonra gıdalarda patojen bakterilerin kontrolü için bakteriyofajların kullanımına dair akademik ve ticari amaçlı çalışmalar artmıştır. Ticari amaçla satılmak üzere, Intralytix şirketi tarafından gıdalarda *L.monocytogenes*, *Escherichia coli* O157 ve *Salmonella enterica* sayısının azaltılmasında kullanılması için sırasıyla ListShield, EcoShield ve SalmFresh bakteriyofaj ürünleri; Micros şirketi tarafından *L. monocytogenes*'e karşı etkili Listex P100 ürünü ve New Horizons Diagnostic tarafından diş ve ağız sağlığında kullanılmak üzere Streptococcus türlerine karşı etkili bakteriyofaj karışımını içeren sakız ve diş macunu üretilmiştir [7]. Avustralya ve Yeni Zelanda Gıda Standartları (FSANZ- Food Standards Australia New Zealand) ve İsviçre 2012 yılında ListexTM'in peynir ve diğer gıdalarda kullanımına onay vermiştir [12].

Farklı meyveler ile meyve sularında *L. monocytogenes*'in kontrolünde Listex P100'ün etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada; elma, armut ve kavun meyveleri temizlenip eşit ölçüde parçalara kesildikten ve aynı meyvelerin suları elde edilip 115°C'de 10 dakika ısıtıldıktan sonra 15 µL 1x10⁵ kob/mL düzeyinde *Listeria monocytogenes* CECT 4031, *Listeria monocytogenes* CECT 4032 ve *Listeria monocytogenes* CECT 940'i eşit hacimde içeren çözelti

ile enfekte edilmiştir. Meyve parçaları ve suları bakteri karışımı ile enfekte edildikten hemen sonra 15 µL 1x10⁸ pob (plak oluşturan birim)/mL bakteriyofaj içeren çözelti ile muamele edilmiş ve 10°C'de 8 gün süresince depolanmıştır. Çalışmanın kontrol gruplarını bakteri karışımı ile enfekte edilen, ancak bakteriyofaj uygulaması yapılmayan elma, armut, kavun parçaları ile elma, armut ve kavun suları oluşturmuştur. Bakteri ve bakteriyofaj uygulamasının hemen ardından ve depolamanın 2., 5., 8. günlerinde meyve parçaları ve meyve sularında mikrobiyolojik analiz ile pH, titrasyon asitliği ve çözünebilir kurumadde analizleri yapılmıştır. En yüksek pH değeri 5.92 ile kavun meyvesinin kullanıldığı örneklerde tespit edilirken, en düşük pH değeri 3.70 ile elma meyvesinin kullanıldığı örneklerde saptanmıştır. Depolama sonunda meyve parçalarından oluşan kontrol grubunda *L. monocytogenes* sayısının kavun, armut ve elma parçaları için sırasıyla 2.77'den 8.00 log kob/plug (faj plağı)'a, 2.94'den 6.00 log kob/plug'a ve 2.48'den 5.00 log kob/plug'a arttığı belirlenmiştir. Elma parçalarında *L. monocytogenes* sayısının tüm depolama süresince 2.20 ile 4.20 log kob/plug arasında değiştiği, patojen sayısının bakteriyofaj uygulamasından etkilenmediği ve *L. monocytogenes* sayısındaki azalmanın istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir. *L. monocytogenes* sayısında en fazla azalma yaklaşık 8.0 log ile kavun suyu örneklerinde belirlenirken, elma suyu örneklerinde patojen sayısındaki azalmanın istatistiksel olarak önemsiz olduğu saptanmıştır. Armut suyu örneklerinde depolama süresince bakteriyofaj sayısında değişim gözlenmediği, *L. monocytogenes* sayısında ise yaklaşık 3.0 log azalma olduğu tespit edilmiştir. Çalışma ile bakteriyofaj uygulamasının yüksek pH'ya sahip örneklerde patojen bakterilere karşı etkisinin yüksek olduğu; ancak düşük pH'daki ürünlerde patojen bakterilere karşı etkinliğinin zayıf olduğu ortaya konulmuştur [13]. Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise tavuk işletmelerinden izole edilen 42 adet *Listeria* suşuna karşı Listex P100 bakteriyofajının antibakteriyel etkisi incelenmiş ve Listex P100'ün özellikle *Listeria monocytogenes* suşları üzerine etkili olduğu belirlenmiştir [14].

Yapılan bir çalışmada, 3 cm x 3 cm x 1 cm boyutlarında kesilen kırmızı et parçaları 10⁴ kob/cm² olacak şekilde *Escherichia coli* O157 ile kontamine edilmiş ve kontaminasyondan 5 dakika sonra et parçalarına MOI [Multiplicity of infection-Enfeksiyon çokluğu (Bakteriyofaj sayısı/bakteri sayısının oranı)]=10 ve 1000 konsantrasyonlarında *E. coli* O157:T5-like (T5), *E. coli* O157:T1-like (T1), *E. coli* O157:T4-like (T4) ve *E. coli* O157:O1-like (O1) bakteriyofajları tek tek ve karışımlar halinde uygulanmıştır. *E. coli* O157 içerip bakteriyofaj içermeyen kontrol grubu örneklerinin ve *E. coli* O157 ile farklı bakteriyofajları içeren örneklerin mikrobiyolojik analizleri 37°C'de 3 saat, 22°C'de 6 saat ve 4°C'de 144 saat süresince yapılmıştır. Kontrol örneklerinde *E. coli* O157 sayısı tüm sıcaklıklar için belirtilen süreler sonunda sabit (10⁴ kob/cm²) kalmıştır. MOI=1000 konsantrasyonda T5 bakteriyofajı uygulanan et parçalarındaki *E. coli* O157 sayısındaki azalmanın kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında tüm inkübasyon sıcaklıkları için belirtilen sürelerin sonunda yaklaşık 3.0

log olduğu saptanmıştır. MOI=10 konsantrasyonunda T5 bakteriyofajı uygulanan et parçalarındaki *E. coli* O157 sayısındaki azalmanın kontrol örnekleri ile karşılaştırıldığında 4°C'de 144 saat sonunda yaklaşık 0.5 log, 22°C'de 6 saat ve 37°C'de 3 saat sonuna ise yaklaşık 1.0 log olduğu belirlenmiştir. O1 bakteriyofajı dışındaki bakteriyofajların ve bakteriyofaj karışımlarının *E. coli* O157 üzerine etkinliğinin MOI değerinin 10'dan 1000'e çıkartılmasıyla arttığı (P<0.001) tespit edilmiştir. Genel olarak *E. coli* O157 inaktivasyonunun, inkübasyon sıcaklığının yüksekliğine, MOI konsantrasyonunun artışına ve bakteriyofaja maruz kalma süresine bağlı olarak arttığı belirtilmiştir [15].

Endersen ve ark. [16] yaptıkları çalışmada, kümes, ahır ortamları ile gübre ve topraktan izole ettikleri *Mycobacterium* LE1, *Mycobacterium* LE2, *Mycobacterium* LE3, *Mycobacterium* LE4, *Mycobacterium* LE5 ve *Mycobacterium* LE6 bakteriyofajlarının sütte *Mycobacterium smegmatis* mc²155 bakterisine karşı antimikrobiyal ajan olarak kullanım potansiyelini araştırmışlardır. Yağsız süt tozu ile hazırlanan %10 kurumadeli rekonstitüye süt içerisine 1x10³ kob/mL olacak şekilde *M. smegmatis* mc²155 inoküle edilmiştir. Bakteri ile enfekte edilen rekonstitüye süte 1x10⁹ pob/mL düzeyinde ve tek tek veya karışım halinde farklı kaynaklardan izole edilen altı bakteriyofaj eklenip 37°C'de 96 saat inkübe edilmiştir. Çalışmanın kontrol grubunu bakteri içeren, ancak bakteriyofaj eklenmeyen örnekler oluşturmuştur. Inkübasyon sonunda kontrol örneklerinde *M. smegmatis* mc²155 sayısının yaklaşık 6.0 log arttığı belirlenirken, bakteriyofaj karışımı eklenen örneklerde 96. saatin sonunda *M. smegmatis* mc²155 tespit edilememiştir. *Mycobacterium* LE1 eklenen örneklerde inkübasyonun 48. saatinde *M. smegmatis* mc²155 sayısının kontrol örneği ile karşılaştırıldığında 3.0 log azaldığı; ancak inkübasyon sonunda, inkübasyonun 48. saatine göre *M. smegmatis* mc²155 sayısının 2 log arttığı saptanmıştır. Aynı çalışmada izole edilen bakteriyofajların farklı sıcaklık ve pH değerlerine karşı hassasiyeti de incelenmiştir. Farklı pH değerlerine (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ve 10) ayarlanmış Brain Heart Infusion (BHI) sıvı besiyeri, izole edilen bakteriyofajlar 1x10⁸ pob/mL olacak şekilde eklendikten sonra 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Sıcaklık uygulaması için 37, 45, 55, 60, 72 ve 90°C'lerde inkübe edilen ve 1x10⁹ kob/mL bakteriyofaj içeren BHI sıvı besiyerinden 60 dakika süresince örnek alınarak bakteriyofaj titresi belirlenmiştir. İzole edilen altı bakteriyofajın optimum gelişme gösterdiği pH değerinin 7 olduğu belirlenirken, 30 dakika sonunda bakteriyofaj titresinin pH 4 ve 10'da 3.0 log, pH 6 ve 8'de ise 1.0 log düştüğü, bakteriyofaj titresinin 60 dakika sonunda pH 4 ve 10'da 5.0 log, pH 6'da 3.0 log ve pH 8'de 2.0 log azaldığı belirlenmiştir. Bakteriyofajların 4 ile 60°C arasındaki sıcaklıklarda aktivitesini kaybetmediği; ancak 60°C'de 30 dakika inkübasyon uygulaması ile bakteriyofaj titresinin 2.0 log azaldığı, aynı sıcaklıkta 60 dakika inkübasyon uygulaması sonunda ise azalmanın 5.0 log'a çıktığı tespit edilmiştir. Bakteriyofaj titresi 72°C'de 15 dakika inkübasyon sonunda 5.0 log azalsa da, bakteriyofajların aktivitelerini koruduğu saptanmıştır. Çalışma ile önemli süt patojenlerinden olan *Mycobacterium avium* subsp.

paratuberculosis'in kontrolünde antimikrobiyal ajan olarak *Mycobacterium* bakteriyofajlarının kullanılabileceği belirtilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada, kırmızı et, kanatlı eti ve tüketime hazır et ürünlerinin ambalajları içerisinde kullanılan emici pedlere antimikrobiyal aktivite kazandırılması amaçlanmıştır. Tavuklardan izole edilen BFSE16, BFSE18, PaDTA1, PaDTA9, PaDTA10 ve PaDTA11 bakteriyofajlarından oluşan bakteriyofaj karışımı, 10^6 kob/mL düzeyinde *Salmonella enterica* subsp. *typhimurium* ATCC 14028 emdirilmiş ped üzerine 10^6 , 10^8 ve 10^9 pob/mL (MOI=1, 2, 3) konsantrasyonlarında ilave edilmiş ve söz konusu ped 10 ile 15°C'de 48 saat süresince depolanmıştır. Depolama sonunda 10^6 , 10^8 ve 10^9 pob/mL konsantrasyonlarında bakteriyofaj çözeltisi ilave edilen pedlerdeki *S. enterica* subsp. *typhimurium* ATCC 14028 sayısındaki azalma 15°C'de sırasıyla 0.87, 3.66 ve 4.36 log olarak tespit edilirken, söz konusu azalmanın 10°C'de ortalama 0.55 log olduğu saptanmıştır. Çalışmada, depolama sıcaklığı ile kullanılan bakteriyofaj konsantrasyonunun bakteriyofaj aktivitesi üzerine etkili olduğu belirtilmiştir [17].

Cheddar peyniri üretiminde *Staphylococcus aureus*'un kontrolünde kullanılmak üzere 2 farklı bakteriyofaj karışımının etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, mikrofiltrasyon uygulanan 200 mL süt 32°C'ye ısıtılmış ve 32°C'deki süte 0.4 g/L CaCl₂ ilave edilmiştir. CaCl₂ ilavesinden sonra süte 10^6 ve 10^7 kob/mL düzeyinde olacak şekilde *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CUC-22 ve *S. aureus* SMQ-1320 bakterileri inoküle edilmiştir. *S. aureus* Team1/*S. aureus* P68/*S. aureus* LH1-MUT (Karışım 1) ve *S. aureus* phi812/*S. aureus* 44AHJD/*S. aureus* phi2 (Karışım 2) bakteriyofajlarının eşit hacimde karıştırılmasıyla hazırlanmış olan iki farklı bakteriyofaj karışımı, bakteri inoküle edilen sütlere MOI=15, MOI=45 ve MOI=150 konsantrasyonlarında olacak şekilde eklenmiştir. Fermantasyon aşaması için süt, 32°C'de pH'sı 6.5'e ulaşıncaya kadar bekletildikten sonra pıhtılaşma aşaması için %0.01 oranında rennet ilave edilip 32°C'de 50 dakika inkübe edilmiştir. Oluşan pıhtı küp şeklinde kesildikten sonra peyniraltı suyu ile birlikte 38°C'de 30 dakika tutulmuştur. Peyniraltı suyundan ayrılan pıhtının pH'sı 5.2'ye ulaştıktan sonra elde edilen teleme olgunlaştırma için vakum paketlenerek 4°C'de iki hafta süresince depolanmıştır. Çalışmanın kontrol grubunu sadece *S. aureus* SMQ-1320 ilave edilen örnekler oluşturmuştur. Peynir yapımı süresince, başlangıç (süte bakteri ve bakteriyofaj karışımı ilavesinden hemen sonra), fermantasyon, pıhtılaşma, pıhtı ısıtma ve olgunlaştırma aşamalarından sonra örnek alınarak *S. aureus* SMQ-1320 sayısı ile bakteriyofaj titresi belirlenmiştir. Fermantasyon ve pıhtılaşma aşamalarından sonra yapılan analizlerde kontrol örnekleri ile MOI=15 konsantrasyonunda Karışım 1 içeren örneklerdeki *S. aureus* SMQ-1320 sayıları arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olmadığı (P>0.05) saptanmıştır. Pıhtılaşma aşamasından sonra *S. aureus* SMQ-1320 sayısının Karışım 1 bakteriyofajlarını MOI=45 ve MOI=150 konsantrasyonlarında içeren örneklerde sırasıyla 1.0 ve 2.0 log azaldığı tespit edilmiştir. Karışım 1

bakteriyofajlarını MOI=45 konsantrasyonunda içeren örneklerde *S. aureus* SMQ-1320 sayısının pıhtı ısıtma ve olgunlaştırma aşamalarının sonunda sırasıyla 2.0 ve 3.0 log azaldığı; MOI=150 konsantrasyonlarında Karışım 1 bakteriyofajlarını içeren örneklerde *S. aureus* SMQ-1320 sayısının pıhtı ısıtma ve olgunlaştırma aşamalarının sonunda sırasıyla 3.0 ve 4.0 log azaldığı belirlenmiştir. Fermantasyon aşamasından sonra Karışım 2 bakteriyofajlarını MOI=45 ve MOI=150 konsantrasyonlarında içeren örneklerde *S. aureus* SMQ-1320 sayısının sırasıyla 1.0 ve 2.0 log azaldığı tespit edilmiştir. Depolama süresinin sonunda kullanılan bakteriyofaj karışımları ve konsantrasyonlarından bağımsız olarak *S. aureus* SMQ-1320 sayısının tespit edilebilir seviyenin (2.0 log kob/mL) altına indiği saptanmıştır. Pıhtı ısıtma ve peyniraltı suyu ayırma işlemlerinin bakteriyofaj etkinliğini arttırdığı belirtilmiştir [18].

Bakteriyofajlar gıdalarda patojen bakterilerin kontrolünde kullanılsa da, gıdanın fizikokimyasal özellikleri (sıcaklık, pH, a_w vb.), koruyucu bileşenleri ve depolama koşulları ile uygulanan bakteriyofaj konsantrasyonunun yetersizliği gibi bakteriyofajların etkinliğini olumsuz yönde etkileyen durumlar kullanımlarını kısıtlamaktadır [7].

BAKTERİYOFAJLARIN MİKROKAPSÜLASYONU VE *IN VITRO* GASTROİNTESTİNAL SİSTEM KOŞULLARINDA SALINIMLARI

Gıdalarda olduğu gibi hayvanların ve insanların da patojen bakterilere karşı korunması için bakteriyofajların kullanılmasında (faj terapisi) bazı engeller bulunmaktadır. Vücuda ister gıda ile ağız yoluyla isterse de damar yoluyla alınacak olsun bakteriyofajın faydalı etki gösterebilmesi için öncelikle vücuda alınma anına kadar geçen sürede aktivitesini koruması gerekmektedir. Bununla birlikte, vücuda alındıktan sonra aktif olarak hedef bölgeye ulaşması ve vücudun savunma sistemi olan mononükleer fagositik sistem tarafından vücuttan uzaklaştırılmaması zorunludur [19]. Bakteriyofajlar, ağız yoluyla vücuda alındıktan sonra gastrointestinal sistemden geçişleri süresince yüksek asitlik ile enzim ve safra gibi sindirim salgılarına maruz kalmakta ve aktivitelerini kaybetmektedir [20].

Yapılan bir çalışmada, *Esherichia coli*'nin neden olduğu ishale karşı bakteriyofaj kullanımının etkinliği araştırılmıştır. *E. coli* T4-like, *E. coli* RB49-like ve *E. coli* JS98-like bakteriyofajlarından oluşan faj karışımını 10^9 pob/mL düzeyinde ve *E. coli* K12 bakterisini ise 10^{10} kob/mL düzeyinde içeren su, 5 denek faresine oral yolla verilmiştir. Denek farelerinin dışkısından, kanından ve öldürüldükten sonra iç organlarından (mide, kör bağırsak, kalın bağırsak, ciğer ile dalak ekstrakte edilerek, ince bağırsağın kısımları olan duodenum, jejunum ile ileum şırınga yardımıyla yıkanarak) örnekler alınmış ve bakteriyofaj titresi belirlenmiştir. Farelerden alınan kan, ciğer ve dalak örneklerinde bakteriyofaj tespit edilememiştir. Farelerin midelerinden alınan örneklerde bakteriyofaj titresinin ortalama 10^4 pob/g olduğu; ince bağırsağın bölümleri incelendiğinde ise bir farenin duodeumunda $\sim 10^2$ pob/mL, iki farenin

jejunumunda $\sim 10^2$ ve $\sim 10^4$ pob/mL düzeylerinde bakteriyofaj bulunduğu belirlenmiştir. Farelerin kör bağırsağı ve kalın bağırsağından alınan örneklerde bakteriyofaj titresinin ortalama 10^6 pob/g olduğu saptanmıştır. Farelerin mide pH'sinin yaklaşık 3 düzeylerinde olduğu ve söz konusu durumun bakteriyofaj titresinin azalmasında önemli bir etken olduğu belirtilmiştir [21].

Hayvan deneylerinde, bakteriyofajları gastrointestinal sistemin olumsuz etkilerine karşı korumak için bakteriyofajların CaCO_3 gibi anti-asit maddelerin çözeltileri ile birlikte kullanımı ve yüksek konsantrasyonda bakteriyofaj kullanımı gibi yöntemler uygulanmıştır [22, 23]. Son yıllarda yapılan *in vitro* çalışmalar, mikrokapsülasyon yönteminin de bakteriyofajları olumsuz çevre koşullarına karşı korumada kullanılabileceğini göstermiştir [24, 25].

Mikrokapsülasyon; katı, sıvı ve gaz halindeki aktif bir maddenin yararlı özellikleri korunarak bir kaplama materyali içerisine paketlenip kapsül hale dönüştürülmesi ve uygun koşullarda salınımının sağlanması olarak tanımlanmaktadır. Mikrokapsülasyon teknolojisi ile elde edilen kapsüllerin genel olarak stabiliteilerinin yüksek, geçirgenliklerinin uygun, boyutlarının istenen düzeyde ve ortama uyumlu olması istenmektedir [26]. Söz konusu şartların sağlanabilmesi için farklı kaplama materyalleri ve mikrokapsülasyon teknikleri kullanılmaktadır. Mikrokapsülasyonda kullanılacak kaplama materyalleri toksik olmamalı, GRAS listesinde olmalı, uygun çözünürlüğü ile aktif materyalin arzu edilen ortama istenilen düzeyde salınmasına izin vermeli, kapsüllenen faydalı bileşenleri olumsuz çevre şartlarına karşı en üst düzeyde korumalı ve ucuz olmalıdır. Bütün bu özellikleri taşıyan tek kaplama materyali olmadığı için, bir kaplama materyali diğer kaplama materyalleri ile birlikte kullanılabilmektedir [27].

Yapılan bir çalışmada, %2.2'lik sodyum aljinat çözeltisine 10^8 pob/mL düzeyinde Felix O1 bakteriyofajı ilave edildikten sonra hazırlanan karışım 300 μm çaplı nozula sahip enkapsülatörle 550 Hz frekansında 50 mM CaCl_2 çözeltisine ekstrüzyon yöntemiyle damlatılıp bakteriyofaj içeren mikrokapsüller elde edilmiştir. Mikrokapsüller sertleşmeleri için 30 dakika süresince 50 mM CaCl_2 çözeltisinde bekletildikten sonra filtre edilerek %0.4 kitosan içeren çözeltiye aktarılmış ve 20 dakika tutulmuştur. Elde edilen kitosan kaplı aljinat mikrokapsülleri %10 trehaloz çözeltisi ile karıştırılarak 22°C 'de 30 saat süresince çekerocakta laminar akıştaki hava ile kurutularak depolanmıştır. Felix O1 bakteriyofajının pH'ya karşı hassasiyetini belirleyebilmek için pH değeri 2.8, 3.2, 3.7, 4.4, 6.2 ve 7.4'e ayarlanmış %0.2'lik NaCl çözeltisi içine 10^8 pob/mL düzeyinde olacak şekilde bakteriyofaj eklenmiş ve 37°C 'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Felix O1 bakteriyofajının pH'ya karşı hassas olduğu ve bakteriyofaj titresinin pH 2.8 ile pH 3.2'de 8.0 log azaldığı saptanmıştır. Mide sıvısını simüle etmek için hazırlanan 3.2 mg/mL pepsin ve %0.2 NaCl içeren, pH değeri 2.0 ve 2.4'e ayarlanmış olan 10 mL çözelti, 160 mg kurutulmuş mikrokapsül eklendikten sonra 37°C 'de 120 dakika süresince inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun 60. dakikasında pH değeri 2.4 olan mide sıvısında bakteriyofaj titresinin 2.58 log azaldığı belirlenirken, pH değeri 2.0 olan mide sıvısında 30 dakika sonunda bakteriyofaj tespit edilememiştir. Safra tuzunu %1.0 ve %2.0 oranlarında içeren 10 mL'lik çözeltiler, içerisine 160 mg kurutulmuş mikrokapsül veya 100 μL mikrokapsüllenmemiş serbest bakteriyofaj 10^9 pob/mL düzeyinde olacak şekilde ilave edildikten sonra 37°C 'de 3 saat süresince inkübe edilmiştir. Serbest bakteriyofaj titresinin, %1.0'lik safra tuzu çözeltisinde inkübasyonun 1. ve 3. saatleri sonunda sırasıyla 0.09 ve 1.29 log azaldığı; %2.0'lik safra tuzu çözeltisinde ise inkübasyonun 1. ve 3. saatleri sonunda sırasıyla 0.58 ve 1.69 log azaldığı belirlenirken, mikrokapsüle bakteriyofajların ise safra tuzundan etkilenmediği saptanmıştır. Simüle bağırsak sıvısından (10 mg/mL pankreatin, pH 6.8) 50 mL alınarak içine 200 mg mikrokapsül eklenip 37°C 'de 6 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon süresince bakteriyofajın mikrokapsülden salınımı incelenmiştir. Simüle bağırsak sıvısı içinde mikrokapsüllerin şiştiği ve yapılarının bozularak çözüldükleri gözlenmekle birlikte, inkübasyonun ilk 30 dakikasında bakteriyofaj titresinin 1.5×10^5 pob/mL olduğu ve 5. saatin sonunda kapsüllerin tamamen çözülerek bakteriyofaj sayısının 1.6×10^7 pob/mL düzeyine ulaştığı tespit edilmiştir [24].

Dini ve ark. [28] yaptıkları çalışmada, Bakteriyofaj CA933P'yi farklı materyaller ile kaplayarak ürettikleri mikrokapsüllerin düşük pH'ya dayanımını, bakteriyofaj yükleme verimliliğini ve pepsin enzimine karşı direncini belirlemişlerdir. Mikrokapsülasyon işlemi için %3.0'lük düşük metoksili (LM) pektin ile %2.0'lik sodyum aljinat kaplama çözeltileri ve söz konusu kaplama çözeltilerine Tween 20 ile oleik asit eklenerek elde edilen emülsiyonları 1×10^8 pob/mL düzeyinde olacak şekilde bakteriyofaj CA933P ilave edildikten sonra 0.5 M CaCl_2 sertleştirme çözeltisi içerisine damlatılarak mikrokapsül oluşturulmuş ve mikrokapsüller 4°C 'de 12 saat süresince sertleştirme çözeltisinde bekletildikten sonra filtre edilerek 4°C 'de depolanmıştır. Ayrıca, 1×10^8 pob/mL düzeyinde olacak şekilde bakteriyofaj CA933P eklenen %3.0'lük LM pektin ve %2.0'lik sodyum aljinat çözeltileri, %0.2 yüksek metoksili (HM) pektin ile %0.2 guar gam içeren iki farklı 0.5 M CaCl_2 sertleştirme çözeltisine damlatılarak mikrokapsül elde edilmiş ve mikrokapsüller 4°C 'de 12 saat süresince sertleştirme çözeltisinde bekletildikten sonra filtre edilerek 4°C 'de depolanmıştır. Elde edilen mikrokapsüllerin yükleme verimliliği ile bakteriyofajı düşük pH'ya (pH=1.6) karşı koruma düzeyi belirlenerek en yüksek yükleme verimliliği ve koruma düzeyine sahip kaplama materyali seçilmiş ve seçilen kaplama materyali ile üretilen mikrokapsüllerin simüle gastrointestinal sistem koşullarındaki davranışı araştırılmıştır. Genel olarak aljinat ile üretilen mikrokapsüllerin pektin içerenlere göre; aljinat ve pektin emülsiyonları ile üretilen mikrokapsüllerin de sadece aljinat ve pektin ile üretilenlere göre daha yüksek ($P < 0.05$) yükleme verimliliğine sahip olduğu saptanmıştır. Sertleştirme çözeltisine HM pektin ve guar gam eklenmesinin mikrokapsüllerin yükleme verimliliğini olumsuz etkilediği, düşük pH'ya dayanımını ise etkilemediği belirlenmiştir. Bakteriyofajı düşük pH'ya karşı korumada, en yüksek

koruma düzeyine sahip mikrokapsüllerin yapımında pektin emülsiyonu kullanılanlar olduğu; en düşük koruma özelliğine sahip olanların ise aljinat emülsiyonu ile üretilen mikrokapsüller olduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın ilerleyen bölümlerindeki analizler pektin emülsiyonu ile üretilen mikrokapsüllerle gerçekleştirilmiştir. Pepsin enziminin mikrokapsülasyon işlemi uygulanmayan serbest bakteriyofajlar ile mikrokapsüle bakteriyofaj üzerine etkisini incelenmek için pepsin enzimi içermeyen, 0.5, 1.5, 3.2 ve 4.2 mg/mL pepsin enzimi içeren pH değeri 2.5 olarak hazırlanan simüle mide sıvıları, 1.52×10^{10} pob/mL düzeyinde olacak şekilde serbest bakteriyofaj ile 1.56×10^7 pob/mikrokapsül bakteriyofaj içeren 10 adet mikrokapsül ilave edilip 37°C 'de 180 dakika süresince tutulmuştur. Pepsin enzimi içermeyen simüle mide sıvısında serbest bakteriyofaj titresinin 10 dakika sonunda 3.7 log azaldığı belirlenirken, 0.5 mg/mL pepsin enzimi içeren mide sıvısında ise bakteriyofaj tespit edilememiştir. Mikrokapsüle bakteriyofajların pepsin enzimi konsantrasyonu ve düşük pH'dan etkilenmediği, bununla birlikte bakteriyofaj titresinin de 180 dakika süresince değişmediği saptanmıştır. Çalışmada ayrıca tripsin (2.5 mg/mL) ve kimotripsin (3.0 mg/mL) içeren pH değeri 7.2 olan simüle bağırsak sıvısı, 1.52×10^{10} pob/mL düzeyinde olacak şekilde serbest bakteriyofaj eklendikten sonra 37°C 'de 24 saat bekletilmiş ve süre sonunda bakteriyofaj titresinde değişim olmadığı belirlenmiştir. Bakteriyofajın mikrokapsülden salınımını incelenmek için pH değeri 7.2 olan fosfat tamponu, içine 20 adet 1.56×10^7 pob/mikrokapsül bakteriyofaj içeren mikrokapsüllerden ilave edilip 19, 30 ve 37°C 'lerde 240 dakika tutulmuştur. Sıcaklık yükseldikçe bakteriyofaj salınımının arttığı ve 37°C 'de 240 dakika sonunda fosfat tamponu içindeki bakteriyofaj titresinin yaklaşık 10^6 pob/mL olduğu tespit edilmiştir.

Mide sıvısının düşük pH'sından korumak amacıyla Phage K'ya mikrokapsülasyon işleminin uygulandığı bir çalışmada, %2.0 sodyum aljinat ve %2.0 sodyum aljinat ile %1.0 kalsiyum karbonat içeren çözeltilere 10^8 pob/mL düzeyinde olacak şekilde Phage K ilave edilmiştir. Hazırlanan bakteriyofajlı karışım 500 µm çaplı nozula sahip enkapsülatör ile 50 mM CaCl_2 çözeltisine ekstrüzyon yöntemiyle damlatılıp bakteriyofaj içeren mikrokapsüller elde edilmiştir. Oluşan mikrokapsüller 30 dakika süresince 50 mM CaCl_2 çözeltisinde bekletildikten sonra filtre edilerek farklı konsantrasyonlardaki (%5, 10, 15 ve 20) trehaloz, sukroz, maltodekstrin ve yağsız süt tozu çözeltileri ile karıştırıldıktan sonra 22°C 'de 30 saat süresince çekerocakta laminar akıştaki hava ile kurutulmuştur. Phage K bakteriyofajının düşük pH'ya karşı hassasiyetini belirleyebilmek için pH değeri 3.8 ve 4.4'e ayarlanmış %0.2'lik NaCl çözeltisi, içine 10^8 pob/mL olacak şekilde bakteriyofaj eklenip 37°C 'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Phage K bakteriyofajının düşük pH'ya karşı hassas olduğu, pH 3.8 ve 4.4'de desimal azalma sürelerinin sırasıyla 0.42 ve 4.9 dakika olduğu saptanmıştır. Mide sıvısını simüle etmek için 3.2 mg/mL pepsin ile %0.2 NaCl içeren ve pH değeri 2.5 olan 10 mL çözelti, içine 190 mg kurutulmuş mikrokapsül konulup 37°C 'de 120 dakika süresince inkübe edilmiştir. Simüle mide sıvısı içinde 60 dakika sonunda, sadece

aljinat kullanılarak mikrokapsüllenen Phage K'nın titresinin 2.4 log azaldığı belirlenirken, 90 dakika sonunda ortamda bakteriyofaj varlığı tespit edilememiştir. Sodyum aljinat ve kalsiyum karbonat kullanılarak elde edilen Phage K mikrokapsüllerin düşük pH'ya direncinin yüksek olduğu ve simüle mide sıvısı içinde 120 dakika sonunda Phage K'nın titresinin sadece 0.17 log azaldığı saptanmıştır. Mikrokapsülasyon işlemi uygulanmayan serbest bakteriyofaj (10^7 pob/mL) ve mikrokapsüle bakteriyofaj %1.0 ve %2.0 safra tuzu içeren çözeltiler içinde 37°C 'de 3 saat süresince inkübe edilmiştir. Serbest bakteriyofaj titresinin %1.0'lik safra tuzu çözeltisinden etkilenmediği, %2.0'lik safra tuzu çözeltisinde ise 3. saatin sonunda 0.23 log azaldığı belirlenmiştir. Farklı materyallerle kaplanan mikrokapsüle bakteriyofajın titresinin her iki konsantrasyondaki safra tuzu çözeltisinden etkilenmediği saptanmıştır. Simüle bağırsak sıvısından (10 mg/mL pankreatin, pH 6.8) 50 mL alınarak içine 500 mg mikrokapsül eklenmiş ve 37°C 'de 12 saat süresince bakteriyofajın mikrokapsülden salınımını incelenmiştir. Simüle bağırsak sıvısı içinde 6 ve 10 saat inkübasyondan sonra sadece aljinat ile kaplanan Phage K'nın mikrokapsüllerden salınım oranlarının sırasıyla %79 ve %90 olduğu belirlenirken, aljinat ve kalsiyum karbonat ile kaplanan Phage K'nın mikrokapsüllerden salınım oranının bağırsak sıvısı içinde 12 saat sonunda %68 olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada, mikrokapsüllerin kurutulması sırasında kullanılan farklı çözeltiler ile konsantrasyonlarının Phage K'nın aktivitesi üzerine etkileri de belirlenmiştir. Herhangi bir çözelti kullanılmadan kurutulan kontrol grubu mikrokapsüllerde kurutma sırasında bakteriyofaj titresinin 8.6'dan 3.0 log pob/g'a düştüğü saptanmıştır. Phage K için en iyi korumayı %20 oranında yağsız süt tozu içeren çözelti ile karıştırıldıktan sonra kurutulan mikrokapsüllerin sağladığı, bu mikrokapsüllerin kurutma sonunda bakteriyofaj titresinin başlangıca göre değişmediği tespit edilmiştir [29].

Tang ve ark. [25] yaptıkları çalışmada, farklı oranlarda sodyum aljinat (NA) ve peyniraltı suyu protein tozu (WP) içeren karışımı kullanarak Felix O1 bakteriyofajını mikrokapsüllemiş ve mikrokapsüllerin simüle gastrointestinal sistem koşullarına dayanımını incelemişlerdir. A (%0.8 NA+%3.0 WP), B (%1.5 NA+%3.0 WP) ve C (%0.8 NA+%5.0 WP) kaplama materyali karışımlarına $\sim 10^{11}$ pob/mL düzeyinde olacak şekilde Felix O1 bakteriyofajı eklenmiş ve bakteriyofaj içeren kaplama materyali karışımları 500 µm çaplı nozula sahip enkapsülatör ile 0.1 M CaCl_2 çözeltisine ekstrüzyon yöntemiyle damlatılıp bakteriyofaj içeren mikrokapsüller elde edilmiştir. Mikrokapsüller sertleşmeleri için 30 dakika süresince 0.1 M CaCl_2 çözeltisinde bekletildikten sonra filtre edilerek 4°C 'de depolanmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki kaplama materyalleri kullanılarak elde edilen mikrokapsüllerin yükleme verimliliklerinin %99 olduğu ve bakteriyofaj titresinin 10.58 ile 10.81 log pob/g arasında değiştiği belirlenmiştir. Mide sıvısını simüle etmek için 3.2 mg/mL pepsin ve %0.2 NaCl içeren, pH değeri 2.0 ve 2.5'e ayarlanmış olan çözeltiler kullanılmış olup, bu çözeltiler içine mikrokapsüle bakteriyofaj konularak 41.4°C 'de 120 dakika süresince inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda

pH değeri 2.0'ye ayarlanmış mide sıvısı içinde A, B ve C karışımları kullanılarak üretilen mikrokapsüllerde bakteriyofaj titresinin sırasıyla yaklaşık 2.0, 1.0 ve 0.5 log düzeylerinde azaldığı saptanırken, pH değeri 2.5 olan mide sıvısı içinde bakteriyofaj titresinde azalma olmadığı tespit edilmiştir. Felix O1 bakteriyofajının farklı konsantrasyondaki kaplama materyali karışımları ile üretilen mikrokapsüllerden salınımı, 10 mg/mL pankreatin içeren ve pH değeri 6.8 olan simüle bağırsak sıvısı içinde 41.4°C'de 6 saat süresince izlenmiştir. Aynı aljinat konsantrasyonuna sahip A ve C karışımları kullanılarak üretilen bakteriyofajların salınım oranları incelendiğinde, karışımlardaki WP konsantrasyonu arttıkça bakteriyofaj salınımının yavaşladığı belirlenmiştir.

Samtlebe ve ark. [30] farklı mikrokapsül üretim yöntemleri ve kaplama materyalleri kullanarak *Lactococcus phage P008* içeren mikrokapsüller üretmiş ve mikrokapsüllerin simüle mide ve bağırsak sıvıları içindeki davranışlarını incelemişlerdir. Emülsiyon yöntemiyle mikrokapsül üretmek için, yağsız süt tozu ile hazırlanan çözelti, içerisine $\sim 10^9$ pob/mL düzeyinde olacak şekilde *Lactococcus phage P008* ve 60 μ L rennet enzimi eklenip 5°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası karışım, CaCl₂ eklendikten sonra çizek yağı içine 0.55 mm nozula sahip şırınga ile damlatılmıştır. Ekstrüzyon yöntemiyle mikrokapsül üretmek için, %1.6'lık sodyum aljinat çözeltisine ve %1.6'lık sodyum aljinat çözeltisi ile %10'luk peyniraltı suyu tozu çözeltisinin birebir oranında karıştırılmasıyla hazırlanan karışım çözeltisine $\sim 10^9$ pob/mL düzeyinde bakteriyofaj ilave edilmiştir. Bakteriyofaj ilavesinden sonra her iki çözelti 0.55 mm nozula sahip şırınga ile 100 mM CaCl₂ çözeltisine damlatılıp 30 dakika bekletilmiş ve bakteriyofaj içeren mikrokapsüller elde edilmiştir. Mikrokapsüle bakteriyofaj ile mikrokapsülasyon işlemi uygulanmayan serbest bakteriyofajların simüle mide sıvısına direncini belirleyebilmek için 3.2 mg/mL pepsin, %0.2 NaCl ve 80 mM HCl içeren, pH değeri 2.0'ye ayarlanmış olan çözelti, içine mikrokapsüle bakteriyofaj ile serbest bakteriyofaj ilave edilip 37°C'de 120 dakika süresince inkübe edilmiştir. *Lactococcus phage P008*'in mikrokapsüllerden salınımı simüle bağırsak sıvısı (10 mg/mL pankreatin, pH 6.8) içinde belirlenmiştir. Serbest bakteriyofajın mide sıvısı içinde 1 dakika içinde inhibe olduğu, 30 dakika sonunda sadece sodyum aljinat kullanılarak ekstrüzyon yöntemi ile mikrokapsüllenen bakteriyofajların titresinin ise 10 pob/g'ın altına düştüğü saptanmıştır. Simüle mide sıvısında inkübasyon sonunda, emülsiyon yöntemiyle üretilen mikrokapsüle bakteriyofajın titresinin 2.2 log azaldığı tespit edilirken, sodyum aljinat-peyniraltı suyu tozu karışımı ile ekstrüzyon yöntemi kullanılarak kaplanan mikrokapsüle bakteriyofajın titresinin başlangıca göre değişmediği belirlenmiştir. Simüle bağırsak sıvısı içinde 1 dakika sonunda, emülsiyon yöntemiyle ve sodyum aljinat-peyniraltı suyu tozu karışımı kullanılarak ekstrüzyon yöntemiyle üretilen mikrokapsüle bakteriyofajların titresinin sırasıyla 10^5 ve 10^6 pob/mL olduğu; 120 dakika sonunda ise aynı mikrokapsüle bakteriyofajların titresinin sırasıyla 10^7 ve 10^8 pob/mL olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada, ekstrüzyon yöntemi

kullanılarak sodyum aljinat-peyniraltı suyu tozu karışımıyla üretilen bakteriyofaj mikrokapsülleri 120 dakika simüle mide sıvısında tutulduktan sonra simüle bağırsak sıvısı içine aktararak bakteriyofajın mikrokapsüllerden salınımı incelenmiştir. Bağırsak sıvısında 30. dakika ve 1. saatin sonunda mikrokapsüllerden salınan bakteriyofaj titresinin sırasıyla 10^3 ve 10^5 pob/mL düzeyinde olduğu saptanmıştır.

Yapılan başka bir çalışmada, sodyum aljinat (NA) ve peyniraltı suyu protein tozu (WP)'nu farklı oranlarda içeren karışım, farklı nozul çapına sahip enkapsülatörden geçirilip ekstrüzyon yöntemi ile Phage K içeren mikrokapsüller üretilmiştir. İçerisine 10^9 pob/mL düzeyinde olacak şekilde Phage K bakteriyofajı eklenen A (%0.8 NA+%3.0 WP), B (%1.5 NA+%3.0 WP) ve C (%0.8 NA+%5.0 WP) karışımları 500 μ m çaplı nozula sahip enkapsülatör kullanılarak; D (%1.5 NA+%3.0 WP) ve E (%1.5 NA+%4.0 WP) karışımları ise 300 μ m çaplı nozula sahip enkapsülatör ile 100 mM CaCl₂ çözeltisi içerisine damlatılmış ve mikrokapsüller üretilmiştir. A, B ve C karışımları ile üretilen mikrokapsüller %40'lık maltodekstrin içerisinde 22°C'de 30 saat süresince çekerecekte laminar akıştaki hava ile kurutularak, kurutulmuş A (A_K), kurutulmuş B (B_K) ve kurutulmuş C (C_K) örnekleri elde edilmiştir. Elde edilen mikrokapsüllerin yükleme verimlilikleri, partikül boyutları ile simüle mide ve bağırsak sıvılarındaki davranışları incelenmiştir. Üretilen mikrokapsüllerin yükleme verimliliklerinin %99 olduğu ve A, B, C ile D karışımları kullanılarak elde edilen mikrokapsüllerin ortalama çaplarının sırasıyla 310 \pm 16, 648 \pm 13, 880 \pm 80 ve 323 \pm 14 μ m olduğu tespit edilmiştir. Mikrokapsülasyonda kullanılan kaplama materyali karışımlarının toplam konsantrasyonu arttıkça üretilen mikrokapsüllerinin çaplarının arttığı; nozul çapının küçülmesiyle ise mikrokapsül çaplarının azaldığı saptanmıştır. Pepsin (3.2 mg/mL) ve NaCl (2 mg/mL) içeren, pH değeri 1.5, 2.0 ve 2.5'e ayarlanmış simüle mide sıvıları 10^9 pob/mL düzeyinde olacak şekilde mikrokapsüle Phage K eklendikten sonra 37°C'de 120 dakika süresince inkübe edilmiştir. D karışımı ile mikrokapsüllenen bakteriyofajın, pH değeri 2.0'ye ayarlanmış simüle mide sıvısında 20 dakika sonunda tamamen inhibe olduğu belirlenirken, 120 dakika sonunda B karışımı ile üretilen mikrokapsüle bakteriyofajın titresinin 2 log azaldığı saptanmıştır. D kullanılarak üretilen mikrokapsüller pH 1.5'e ayarlanmış simüle mide sıvısına konulduktan 1 dakika sonra ortamda bakteriyofaj varlığı tespit edilememişken, E karışımıyla üretilen mikrokapsüllerdeki bakteriyofajların 10 dakika süresince aktivitelerini korudukları belirlenmiştir. pH değeri 2.5 olan simüle mide sıvısı içine eklenen C_K ve A_K örneklerinde 120 dakika sonunda bakteriyofaj titresinin sırasıyla 0.5 ve 5.0 log azaldığı saptanmıştır. Mikrokapsül çapınının büyümesi ve kaplama materyali karışımında kullanılan WP miktarının artmasıyla mikrokapsüllerin mide sıvısının yüksek asitliğine karşı direncinin arttığı belirlenmiştir. Çalışmada simüle bağırsak sıvısı (10 mg/mL pankreatin, pH 6.8) içine mikrokapsüller eklenmiş ve 37°C'de 12 saat süresince Phage K'nin mikrokapsüllerden salınımı incelenmiştir. B ve E karışımları kullanılarak üretilen mikrokapsüllerin simüle bağırsak çözeltisi içinde sırasıyla 75 ve 120 dakikada tamamen çözüldükleri

belirlenmiştir. A_K , B_K ve C_K mikrokapsüllerinin ise simüle bağırsak çözeltisi içinde sırasıyla 25, 100 ve 120 dakikada tamamen çözüldükleri tespit edilmiştir [31].

Broiler tavuklarda *Salmonella* enfeksiyonunu önlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, 500 mg %1.0 oranında $CaCO_3$ ve 900 mg %1.8 oranındaki sodyum aljinat içeren çözelti içerisine 10^{11} pob/mL düzeyinde olacak şekilde UAB Phi20, UAB Phi78 ve UAB Phi87 *Salmonella* bakteriyofajları ilave edilmiştir. Hazırlanan bakteriyofajlı karışımlar 1.5 mL/dak akış hızında %1.8 oranındaki $CaCl_2$ çözeltisi içine spray nozulla eklenmiş ve mikrokapsüller üretilmiştir. Oluşan mikrokapsüller 90 dakika süresince %1.8 oranındaki $CaCl_2$ çözeltisinde bekletildikten sonra santrifüj edilerek 10 mM $MgSO_4$ çözeltisi içinde $4^\circ C$ 'de 6 ay depolanmıştır. UAB Phi20, UAB Phi78 ve UAB Phi87 bakteriyofajlarına ait mikrokapsüllerin ortalama çaplarının sırasıyla 124 ± 9 , 141 ± 16 ve 149 ± 6 μm olduğu belirlenirken, mikrokapsüllerin yükleme verimliliklerinin %98 ile %99 arasında değiştiği saptanmıştır. Mikrokapsüle bakteriyofajlar ile mikrokapsülasyon işlemi uygulanmayan serbest bakteriyofajların simüle mide sıvısına direncini belirleyebilmek için 3.0 mg/mL pepsin, %85 oranında NaCl içeren, pH değeri 2.8'e ayarlanmış olan çözelti, içine mikrokapsüle bakteriyofaj ile serbest bakteriyofaj ilave edilip $42^\circ C$ 'de 60 dakika süresince inkübe edilmiştir. UAB Phi20, UAB Phi78 ve UAB Phi87 bakteriyofajlarının mikrokapsüllerden salınımı simüle bağırsak sıvısı (1 mg/mL pankreatin, 10 mM safra tuzu, %85 oranında NaCl, pH 8.0) içinde belirlenmiştir. Mikrokapsüle UAB Phi78 ve UAB Phi87 bakteriyofaj titrelerinin simüle mide sıvısı içinde 60 dakika sonunda sırasıyla 2.9 ve 3.5 log azaldığı tespit edilirken, serbest formlarının titrelerinin yaklaşık olarak 8.0 log azaldığı belirlenmiştir. Simüle mide sıvısı içinde 60 dakika sonunda mikrokapsüle UAB Phi20 bakteriyofaj titresinde ise azalma saptanamamıştır. UAB Phi20, UAB Phi78 ve UAB Phi87 bakteriyofajlarının simüle bağırsak sıvısı içinde 40 dakika sonunda mikrokapsüllerden salınımlarının sırasıyla 97.7 ± 18.6 , 88.4 ± 7.6 ve 100.0 ± 20.8 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, çalışmada *in vivo* denemeler için broiler tavuklar *Salmonella typhimurium* ATCC14028 Rif^R bakterisi ile 10^7 kob/hayvan olacak şekilde enfekte edilmiş ve bir gruba serbest formdaki UAB Phi20, UAB Phi78 ve UAB Phi87 bakteriyofajlarından hazırlanan karışım (1:1:1), diğer bir gruba ise mikrokapsüle UAB Phi20, UAB Phi78 ve UAB Phi87 bakteriyofajlarından hazırlanan karışım (1:1:1) 10^{10} pob/hayvan düzeyinde $MgSO_4$ çözeltisi içinde tavuklara ağız yoluyla verilmiştir. Kontrol grubu enfekte tavuklara ise sadece bakteriyofaj içermeyen $MgSO_4$ çözelti verilmiştir. Enfeksiyonun ardından 1., 3., 6., 8., 10. ve 15. günlerde tavuklarının kör bağırsaklarından örnek alınarak *S. typhimurium* ATCC14028 Rif^R sayısı belirlenmiştir. Kontrol grubu enfekte tavuklar ile serbest ve mikrokapsüle bakteriyofaj karışımı verilen enfekte tavukların kör bağırsaklarında 15 günün sonunda *S. typhimurium* ATCC14028 Rif^R sayısı sırasıyla 5.2 ± 1.3 , 6.3 ± 1.0 ve 3.5 ± 2.1 log kob/g olarak tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda *Salmonella* ile enfekte olan ticari broiler tavuklarda ağız yoluyla faj terapisinin başarıyla uygulandığı değerlendirilmiştir [32].

Konu ile ilgili yapılan çalışmalarda; bakteriyofajların mikrokapsülasyonunda kullanılan kaplama materyallerinin mikrokapsül boyutunu ve verimliliğini etkilediği, genel olarak mikrokapsülasyon uygulamasının bakteriyofajların canlılıklarını gastrointestinal sistemin olumsuz koşullarına karşı koruduğu ve ayrıca mikrokapsülasyon uygulaması ile bakteriyofaj salınımının kontrollünün sağlandığı belirtilmiştir.

SONUÇ

Bakteriyofajların başta su olmak üzere gıdaların ve insan gastrointestinal sisteminin doğal florasında yüksek sayıda bulunması ve tüketiminin insanda zararlı etkileri olmaması, bakteriyofajların gıdalarda antibakteriyel ajan olarak kullanılması fikrini doğurmuştur. Bu fikir doğrultusunda yapılan çalışmalar, bakteriyofajların antibakteriyel ajan olarak gıdaların korunmasında kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Bakteriyofajların gıdalarda patojen bakterilerin kontrolü için kullanımının çeşitli otorite kuruluşları tarafından onaylanması ve ticari firmaların söz konusu amaca yönelik bakteriyofaj preparatları üretmesi konu ile ilgili çalışmaları arttırmıştır. Ülkemizde ise bakteriyofajların gıdalarda antibakteriyel ajan olarak kullanımına yönelik sınırlı sayıda çalışma yapılmış olmakla birlikte, konu ile ilgili herhangi bir yasal düzenleme bulunmamaktadır. Bakteriyofajların antibakteriyel ajan olarak kullanımı ile ilgili ülkemizde gerekli yasal düzenlemelerin yapılabilmesine ışık tutabilecek nitelikte çalışmaların yeterince yapılmıyor olması önemli bir eksikliktir. Bakteriyofajları hem gıdaların olumsuz özelliklerinden hem de tüketimleri sonucunda gastrointestinal sistemin olumsuz koşullarından korunmasına yönelik çalışmalara ağırlık verilmesi gerekmektedir. Bakteriyofaj mikrokapsülasyonu uygulamalarına yönelik çalışmalar, mikrokapsülasyon yönteminin bakteriyofajları gastrointestinal sistemin olumsuz etkilerine karşı korumada başarılı olduğunu göstermekle birlikte, yapılan literatür taramasında halen mikrokapsüle bakteriyofajların gıdalarda kullanımı üzerine çalışmaların mevcut olmadığı belirlenmiştir. Konu ile ilgili yapılacak çalışmalarda, özellikle gıda üretiminde kullanılabilecek boyutlarda bakteriyofaj mikrokapsüllerinin oluşturulmasına yönelik farklı kapsülleme teknolojilerine odaklanması ve mikrokapsüle bakteriyofaj stabilitesinin gastrointestinal sistemde *in vitro* ve *in vivo* olarak araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Anonim. 2016. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Bakteriyofaj>. Erişim Tarihi: 18.08.2016.
- [2] Nobrega, F., Costa, A., Kluskens, L., Azeredo, J., 2015. Revisiting phage therapy: new applications for old resources. *Trends in Microbiology* 23(4): 185-191.
- [3] Tsonos, J., Vandenheuvel, D., Briers, Y., De Greve, H., Hernalsteens, J.P., Lavigne, R., 2014. Hurdles in bacteriophage therapy: Deconstructing the parameters. *Veterinary Microbiology* 171: 460-469.

- [4] Snyder, A.B., Perry, J.J., Yousef, A.E., 2016. Developing and optimizing bacteriophage treatment to control enterohemorrhagic *Escherichia coli* on fresh produce. *International Journal of Food Microbiology* 236: 90-97.
- [5] Beke, G., Stano, M., Klucar, L., 2016. Modelling the interaction between bacteriophages and their bacterial hosts. *Mathematical Biosciences* 279: 27-32.
- [6] Moreira, H.H., Santos, M.R., Meireles, G.D., Vanetti, C., de Oliveira P.C., 2013. Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with chemical agents. *Food Research International* 52(1): 75-81.
- [7] Cooper, I.A., 2016. A review of current methods using bacteriophages in live animals, food and animal products intended for human consumption. *Journal of Microbiological Methods* 130: 38-47.
- [8] Esteban, P.P., Jenkins, A.T., Arnot, T.C., 2016. Elucidation of the mechanisms of action of Bacteriophage K/nano-emulsion formulations against *S. aureus* via measurement of particle size and zeta potential. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 139: 87-94.
- [9] Saygılı, D., Karagözlü, C., 2017. Bakteriyofaj enkapsülasyonu ve potansiyel uygulamaları. *Gıda* 42(1): 58-66.
- [10] Harper, D.R., Mcconville, M., Anderson, F.J., Enright, M.J., 2015. Molecular Medical Microbiology Second Edition Volume I Chapter 31. Ed. Tang Y., Sussman M., Liu D., Poxton I., Schwartzman J. Academic Press, Elsevier, pp.567-581.
- [11] Pulit, A.C., Mitula, P., Sliwka, P., Laba, W., Skaradzinska, A., 2015. Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications. *Trends in Food Science & Technology* 45: 212-221.
- [12] Chatain, M.H.L., 2014. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in Microbiology* 5(51): 1-6.
- [13] Oliveira, M., Viñas, I., Colàs, P., Anguera, M., Usall, J., Abadias, M., 2014. Effectiveness of a bacteriophage in reducing *Listeria monocytogenes* on fresh-cut fruits and fruit juices. *Food Microbiology* 38: 137-142.
- [14] Sağlam, S., 2014. Tavuk İşletmelerinden ve Tavuk Etlerinden İzole Edilen *Listeria* spp.'ler Üzerine Listex™ P100 Bakteriyofajının Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 73 ss. Adana.
- [15] Liu, H., Niu, Y.D., Meng, R., Wang, J., Li, J., Johnson, R.P., McAllister, T.A., Stanford, K., 2015. Control of *Escherichia coli* O157 on beef at 37, 22 and 4°C by T5-, T1-, T4- and O1-like bacteriophages. *Food Microbiology* 51: 69-73.
- [16] Endersen, L., Coffey, A., Neve, H., McAuliffe, O., Ross, R.P., O'Mahony, J.M., 2013. Isolation and characterisation of six novel mycobacteriophages and investigation of their antimicrobial potential in milk. *International Dairy Journal* 28: 8-14.
- [17] Gouvea, D.M., Mendonça, R.C.S., Lopez, M.E.S., Batalha, L.S., 2016. Absorbent food pads containing bacteriophages for potential antimicrobial use in refrigerated food products. *LWT - Food Science and Technology* 67: 159-166.
- [18] El Haddad, L., Roy, J.P., Khalil, G.E., St-Gelais, D., Champagne, C.P., Labrie, S., Moineau, S., 2016. Efficacy of two *Staphylococcus aureus* phage cocktails in cheese production. *International Journal of Food Microbiology* 217: 7-13.
- [19] Singla, S., Harjai, K., Raza, K., Wadhwa, S., Katare, O.P., Chhibber, S., 2016. Phospholipid vesicles encapsulated bacteriophage: A novel approach to enhance phage biodistributions. *Journal of Virological Methods* 236: 68-76.
- [20] Stanford, K., Mcallister, T.A., Niu, Y.D., Stephens, T.P., Mazzocco, A., Waddell, T.E., Johnson, R.P., 2010. Oral delivery systems for encapsulated bacteriophages targeted at *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. *Journal of Food Protection* 73(7): 1304-1312.
- [21] Denou, E., Bruttin, A., Barretto, C., Ngom-Bru, C., Brüssow, H., Zuber, S., 2009. T4 phages against *Escherichia coli* diarrhea: Potential and problems. *Virology* 388: 21-30.
- [22] Tanji, Y., Shimada, T., Fukudomi, H., Miyanaga, K., Nakai, Y., Unno, H., 2005. Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in gastrointestinal tract of mice. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100(3): 280-287.
- [23] Jamalludeen, N., Johnson, R.P., Shewen, P.E., Gyles, C.L., 2009. Evaluation of bacteriophages for prevention and treatment of diarrhea due to experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* O149 infection of pigs. *Veterinary Microbiology* 136: 135-141.
- [24] Ma, Y., Pacan, J.C., Wang, Q., Xu, Y., Huang, X., Korenevsky, A., Sabour, P.M., 2008. Microencapsulation of bacteriophage Felix O1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery. *Applied and Environmental Microbiology* 8: 799-805.
- [25] Tang, Z., Huang, X., Baxi, S., Chambers, J.R., Sabour, P.M., Wang, Q., 2013. Whey protein improves survival and release characteristics of bacteriophage Felix O1 encapsulated in alginate microspheres. *Food Research International* 52: 460-466.
- [26] Çomak Göçer, E.M., Aşçı Arslan, A., Küçükçetin, A., Ergin, F., 2013. Probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyonu. *Yetiştiren ve Çocuklarda Probiyotikler* 1(1): 33-37.
- [27] Silva, P.I., Stringheta, P.C., Teófilo, R.F., De Oliveira, I.R.N., 2013. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering* 117: 538-544.
- [28] Dini, C., Islan, G.A., de Urraza, P.J., Castro, G.R., 2012. Novel biopolymer matrices for microencapsulation of phages: Enhanced protection against acidity and protease activity. *Macromolecular Bioscience* 12: 1200-1208.
- [29] Ma, Y., Pacan, J.C., Wang, 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.
- [30] Samtlebe, M., Ergin, F., Wagner, N., Neve, H., Küçükçetin, A., Franz, C.M.A.P., Heller, K.J., Hinrichs, J., Atamer, Z., 2016. Carrier systems for bacteriophages to supplement food systems: Encapsulation and controlled release to modulate the human gut microbiota. *LWT - Food Science and Technology* 68: 334-340.
- [31] Tang, Z., Huang, X., Sabour, P.M., Chambers, J.R., Wang, Q., 2015. Preparation and characterization of dry powder bacteriophage K for intestinal delivery through oral administration. *LWT - Food Science and Technology* 60: 263-270.
- [32] Colom, J., Cano-Sarabia, M., Otero, J., Aríñez-Soriano, J., Cortés, P., Maspoch, D., Llagostera, M., 2017. Microencapsulation with alginate/CaCO₃: A strategy for improved phage therapy. *Scientific Reports* 7: 1-10.
-