

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**BAKTERİYOFAJ MİKROKAPSÜLASYONUNUN OPTİMİZASYONU VE
MİKROKAPSÜLE BAKTERİYOFAJIN YOĞURT ÜRETİMİNDE KULLANIM
OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Firuze ERGİN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

NİSAN 2019

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**BAKTERİYOFAJ MİKROKAPSÜLASYONUNUN OPTİMİZASYONU VE
MİKROKAPSÜLE BAKTERİYOFAJIN YOĞURT ÜRETİMİNDE KULLANIM
OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Firuze ERGİN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

NİSAN 2019

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAKTERİYOFAJ MİKROKAPSÜLASYONUNUN OPTİMİZASYONU VE
MİKROKAPSÜLE BAKTERİYOFAJIN YOĞURT ÜRETİMİNDE KULLANIM
OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Firuze ERGİN
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FDK-2018-3557 nolu proje ile desteklenmiştir.**

NİSAN 2019

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAKTERİYOFAJ MİKROKAPSÜLASYONUNUN OPTİMİZASYONU VE
MİKROKAPSÜLE BAKTERİYOFAJIN YOĞURT ÜRETİMİNDE KULLANIM
OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Firuze ERGİN
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez 30/04/2019 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN
Prof. Dr. Ayhan TOPUZ
Prof. Dr. Oğuz GÜRSOY
Prof. Dr. Yusuf YILMAZ
Dr. Öğr. Üyesi Muammer DEMİR

ÖZET

BAKTERİYOFAJ MİKROKAPSÜLASYONUNUN OPTİMİZASYONU VE MİKROKAPSÜLE BAKTERİYOFAJIN YOĞURT ÜRETİMİNDE KULLANIM OLANAKLARININ ARAŞTIRILMASI

Firuze ERGİN

Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Nisan 2019; 87 sayfa

Doğada en fazla bulunan biyolojik topluluklardan birini temsil eden bakteriyofajlar, kendilerine özgü hedef bakteriyi öldürebilen bakteri virüsleri olarak tanımlanmaktadır. Son yıllarda, patojen bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazanması, bakteriyofaj uygulamasını yeniden gündeme getirmiştir. İnsan sindirim sisteminin doğal mikrobiyotasında bulunan bakteriyofajlar ağız yoluyla alındıklarında, gastrointestinal sistemden geçişleri sırasında yüksek asitlik ve sindirim enzimleri gibi olumsuz etkilere maruz kalmalarından dolayı aktivitelerini kaybetmektedir. Bakteriyofajları, gıdanın bileşenleri, fizikokimyasal özellikleri ve depolama koşulları ile gastrointestinal sistemin olumsuz etkilerine karşı korumak için mikrokapsülasyon yöntemi kullanılabilmektedir.

Bu çalışma ile bakteriyofaj mikrokapsülasyonda kullanılan kaplama çözeltisindeki sodyum aljinat ve sodyum kazeinat oranları ile titreşim frekansı değişkenlerinin optimizasyonunun sağlanarak en yüksek yükleme verimliliğine, düşük pH değerleri dayanımına ve en küçük kapsül boyutuna sahip mikrokapsül oluşturulması hedeflenmiştir. Ayrıca çalışmada, Salmonella türlerinin % 98.2'sini lize edebilen Felix O1 bakteriyofajının yapay mide ortamında aktivitesinin belirlenmesi, yapay bağırsak ortamında Felix O1'in mikrokapsüllerden salınımının matematiksel modellenmesi, Felix O1 mikrokapsüllerinin model gıda olarak seçilen yoğurdun üretiminde kullanılması amaçlanmıştır.

En yüksek verimlilik değerine sahip mikrokapsülleri üretmek için titreşim frekans değerinin 1.61 kHz, kaplama çözeltisindeki sodyum aljinat ve kazeinat oranlarının sırasıyla % 1.86 ve % 3.26 olduğu; pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1'in azalma oranının en düşük olduğu optimum nokta için frekans değerinin 4.50 kHz, kaplama çözeltisindeki sodyum aljinat ve kazeinat oranlarının sırasıyla % 2.00 ve 2.69 olduğu; en yüksek mikrokapsül verimliliği, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranı ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğu olmak üzere her üç cevap için optimum koşullara sahip mikrokapsülleri üretmek için frekans değerinin 4.50 kHz, kaplama çözeltisi içerisindeki sodyum aljinat ve kazeinat oranlarının sırasıyla % 1.53 ve 2.72 olduğu nokta optimum olarak belirlenmiştir.

Yapay mide ortamında Felix O1 titresindeki en yüksek azalma miktarının, en yüksek mikrokapsül verimliliğine, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma

oranına ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğuna sahip mikrokapsüllerde olduğu ve söz konusu mikrokapsülü, sırasıyla en yüksek mikrokapsül verimliliğine ve pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsüllerin takip ettiği belirlenmiştir.

Mikrokapsüle ve serbest formdaki Felix O1'in üretimlerinde kullanıldıkları yoğurt örneklerindeki *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus*'un canlılıklarını ve yoğurt örneklerinin fizikokimyasal özelliklerini olumsuz etkilemediği ortaya konmuştur. Tek başına ya da yoğurt içerisinde yapay bağırsak ortamında bekletilen mikrokapsüllerden Felix O1 salınımının Korsmeyer-Peppas modeline iyi uyum sağladığı ve Felix O1'in salınım mekanizmasının difüzyon ile gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlar neticesinde, Felix O1'in yoğurdun fonksiyonel özelliğinin artırılmasında kullanılabileceği, böylece Felix O1'in yoğurt ile vücuda taşınabileceği ve vücut içerisinde etkin bir şekilde faaliyet gösterebileceği ortaya konmuştur.

ANAHTAR KELİMELELER: Bakteriyofaj, Felix O1, Mikrokapsülasyon, Optimizasyon, Yoğurt

JÜRİ: Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Prof. Dr. Ayhan TOPUZ

Prof. Dr. Oğuz GÜRSOY

Prof. Dr. Yusuf YILMAZ

Dr. Öğr. Üyesi Muammer DEMİR

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF MICROCAPSULATION OF BACTERIOPHAGES AND INVESTIGATION OF POTENTIAL USE OF MICROENCAPSULED BACTERIOPHAGES IN YOGURT PRODUCTION

Firuze ERGİN

PhD Thesis in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

April 2019; 87 papers

Bacteriophages represent one of the most abundant biological populations in nature and are defined as bacterial viruses that can kill specific target bacteria. In recent years, gaining resistance to antibiotics of pathogenic bacteria has brought up bacteriophages application again. Moreover, bacteriophages that present in natural microbiota of the human digestive system when taken orally, have lost their activities because of exposure to adverse effects such as high acidity and digestive enzymes during their passage along the gastrointestinal system. The microcapsulation method 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 formation of microcapsules with the highest loading efficiency, the highest resistance to low pH and the smallest particle size by optimization the vibration frequency values with sodium alginate and sodium caseinate ratios in the coating solution used in bacteriophage microcapsulation were aimed. Besides, determination activity of bacteriophage Felix O1 which is lysing 98.2% of Salmonella species, in the simulated gastric environment, mathematical modelling of release of Felix O1 from microcapsules in the simulated intestinal environment, use of microencapsulated Felix O1 in the production of yogurt as model food were aimed.

In order to produce microcapsules with the highest efficiency value, the vibration frequency value of 1.61 kHz, sodium alginate and caseinate in the coating solution were 1.86% and 3.26% respectively; for the optimum point where the reduction rate of Felix O1 in microcapsules exposed to pH 2.0 is the lowest, the frequency value is 4.50 kHz, the sodium alginate and caseinate ratios in the coating solution are 2.00% and 2.69, respectively; for the maximum microcapsule efficiency, the lowest Felix O1 reduction rate when microcapsules exposed to pH 2.0 and the smallest microcapsule perimeter the frequency value of 4.50 kHz, sodium alginate and caseinate in the coating solution were 1.53 and 2.72 respectively determined.

In the simulated gastric environment, the highest titres reduction of Felix O1 was determined in the microencapsules which had the maximum microcapsule efficiency, the lowest Felix O1 reduction rate when microcapsules exposed to pH 2.0 and the smallest microcapsule perimeter followed by, respectively, microencapsules which had the maximum microcapsule efficiency and microencapsules which has lowest Felix O1 reduction rate when microcapsules exposed to pH 2.0.

It was found that the microcapsulated and free form of Felix O1 did not adversely affect viability of *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* and *S. thermophilus* in yogurt samples and physicochemical properties of yogurt samples. It was determined that Felix O1 release from microcapsules as alone or in yoğurt, which were kept in the artificial intestinal environment, was fit well to the Korsmeyer-Peppas model, and the diffusion was the mechanism for releasing of Felix O1.

As a result of our results, Felix O1 can be used to increase the functional properties of yoğurt. Felix O1 can be transported to the body with yogurt and can be active in the body.

KEYWORDS: Bacteriophage, Felix O1, Microcapsulation, Optimisation, Yogurt

COMMITTEE: Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Prof. Dr. Ayhan TOPUZ

Prof. Dr. Oğuz GÜRSOY

Prof. Dr. Yusuf YILMAZ

Asst. Prof. Dr. Muammer DEMİR

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde bana her türlü yardım ve destekte bulunan ve bu konuda çalışma olanağı sağlayan danışmanım Sayın Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN'e, çalışmalarım sırasında yardımlarda bulunan Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nün tüm öğretim elemanlarına ve lisansüstü öğrencilerine teşekkürlerimi sunarım.

Projeye verdikleri destek nedeniyle Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Son olarak maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan, şu an bulunduğum noktada olmamda en büyük payın sahipleri aileme teşekkürü bir borç bilirim.



AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “Bakteriyofaj Mikrokapsülasyonunun Optimizasyonu ve Mikrokapsüle Bakteriyofajın Yoğurt Üretiminde Kullanım Olanaklarının Araştırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

30/04/2019

Firuze ERGİN



İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGE VE KISALTMALAR	x
ŞEKİL DİZİNİ	xii
ÇİZELGE DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Bakteriyofaj	3
2.1.1. Bakteriyofajların hayat döngüleri	3
2.1.2. Bakteriyofajların sınıflandırılması	4
2.1.2.1. Kuyruklu fajlar	5
2.1.2.2. Kuyuksuz fajlar	6
2.1.3. Felix O1 bakteriyofajı ve Salmonella	6
2.1.4. Bakteriyofajların kimyasal antibiyotiklere göre avantajları	8
2.1.5. Bakteriyofajların antibakteriyel ajan olarak gıdalarda kullanımı	8
2.2. Mikrokapsülasyon	13
2.2.1. Bakteriyofajların mikrokapsülasyonu ve yapay sindirim sistemini sıvılarındaki davranışları	18
2.2.2. Bakteriyofajların mikrokapsüllerden salınımının matematik modellenmesi	23
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. Materyal	27
3.2. Metot	27
3.2.1. Mikrobiyolojik analizler	27
3.2.1.1. <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> DSM18522'nin gelişim eğrisinin oluşturulması	27
3.2.1.2. Bakteriyofaj titresinin belirlenmesi	27
3.2.1.3. Bakteriyofajın aktifleştirilmesi ve çoğaltılması	28
3.2.2. Bakteriyofajların farklı pH değerlerine karşı direncinin tespiti	29
3.2.3. Bakteriyofajın sodyum aljinat-sodyum kazeinat karışımı ile mikrokapsülasyonu	29
3.2.4. Mikrokapsülasyon uygulamasının optimizasyonu	30

3.2.4.1. Sodyum aljinat ve sodyum kazeinat çözeltilerinin viskozite değerlerinin belirlenmesi.....	31
3.2.4.2. Mikrokapsüllerin yükleme verimliliklerinin belirlenmesi	31
3.2.4.3. Mikrokapsüllerin pH 2.0'deki davranışlarının belirlenmesi	32
3.2.4.4. Mikrokapsüllerin boyutlarının ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi	32
3.2.5. Mikrokapsülle bakteriyofajların yapay mide ve bağırsak sıvılarındaki stabilitesi	32
3.2.6. Bakteriyofaj salınımının matematiksel modellenmesi	32
3.2.7. Yoğurt üretimi ve analizleri.....	33
3.2.8. İstatistik analizleri.....	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	35
4.1. <i>Salmonella enterica</i> subps. <i>enterica</i> DSM18522'nin gelişim eğrisi.....	35
4.2. Bakteriyofajın farklı pH değerlerine karşı direnci	35
4.3. Mikrokapsülasyon uygulamasının optimizasyonu	36
4.3.1.1. Mikrokapsüllerin yükleme verimlilikleri	37
4.3.1.2. Mikrokapsüle Felix O1'in pH 2.0'deki davranışları	40
4.3.1.3. Mikrokapsüllerin boyutları.....	44
4.3.1.4. Kaplama çözeltisi viskozite değerlerinin incelenen mikrokapsül özellikleri ile ilişkisi.....	47
4.3.2. Optimizasyon sonuçlarının deneysel doğrulanması	49
4.4. Optimum noktalarda üretilen mikrokapsüle Felix O1'in yapay mide ve bağırsak ortamlarındaki aktivitesi	53
4.4.1. Mikrokapsüle Felix O1'in yapay mide ortamındaki aktivitesi.....	53
4.4.2. Mikrokapsüle Felix O1'in yapay bağırsak ortamındaki aktivitesi	56
4.5. Optimum noktalarda üretilen mikrokapsüllerin yoğurt üretiminde kullanılması	58
4.5.1. Yoğurt örneklerine ait fizikokimyasal analizler	58
4.5.2. Yoğurt örneklerine ait mikrobiyolojik analizler.....	60
4.5.3. Yoğurt içerisinde mikrokapsüle ve serbet formdaki Felix O1'in yapay mide ortamındaki aktivitesi	62
4.5.4. Yoğurt içerisinde mikrokapsüle ve serbest formdaki Felix O1'in yapay bağırsak ortamındaki aktivitesi.....	64
4.6. Felix O1'in mikrokapsüllerden salınımının matematik modellenmesi	67
4.6.1. Depolama süresince Felix O1'in yapay bağırsak ortamında mikrokapsüllerden salınımı	67

4.6.2.Depolama süresince yoğurt örneklerinde Felix O1'in yapay bağırsak ortamında mikrokapsüllerden salınımı	70
5. SONUÇLAR	75
6. KAYNAKLAR.....	78
ÖZGEÇMİŞ	



SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler

mm : Milimetre

μm : Mikrometre

g : Gram

mg : Miligram

mL : Mililitre

L : Litre

s : Saniye

dk : Dakika

C : Santigrat

$\leq$: Küçük veya eşit

$<$: Küçük

$>$: Büyük

% : Yüzde

Kısaltmalar

GRAS : Genel olarak güvenilir kabul edilen

pob : Plak oluşturan birim

kob : Koloni oluşturan birim

ABD : Amerika Birleşik Devletleri

CYY : Cevap yüzey yöntemi

BB :Box-Behnken

ANOVA: Varyans analizi

Pre-R² : Tahminlenmiş regresyon katsayısı

PRESS : Tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı

R^2	: Regresyon katsayısı
SD	: Serbestlik derecesi
HKT	: Hata kareler toplamı
MV	: Mikrokapsülasyon verimliliği
MAO	: pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranı
MÇU	: Mikrokapsül çevre uzunluğunu
F	: Frekans
A	: Sodyum aljinat
K	: Sodyum kazeinat

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1. Bakteriyofajların hayat döngüsü	4
Şekil 2.2. A; Salmonella hücre zarı yapısı, B; Salmonella lipopolisakkarit yapısı (GlcNac= N-asetilglukozamin; Glc=glukoz, Gal=galaktoz; Hep=heptoz; P=fosfat; Etn= etanolamin; KDO=2-keto-3-deoksioktonat) C; Salmonella hücresinin dış yapısı	7
Şekil 2.3. Kapsüllerin sınıflandırılması	13
Şekil 2.4. Aljinatın yapısı ve mikrokapsül oluşumu. G; α -L-guluronik asit, M; β -D-mannuronik asit (M), Ca; kalsiyumu ifade etmektedir	14
Şekil 2.5. a, Damla oluşumu; b, titreşim frekansı ve akış hızının kapsül çapına etkisi	16
Şekil 3.1. Felix O1 uygulama bölgelerindeki lize plakları	28
Şekil 3.2. Nisco Var B model mikrokapsülator (Nisco Eng. Inc. Zürih, İsviçre).....	29
Şekil 3.3. Mikrokapsül üretimi ve optimizasyonu	31
Şekil 4.1. a; <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> DSM18522'nin mikrobiyolojik sayım sonuçları ile oluşturulan gelişim eğrisi, b; optik yoğunluk (OD ₆₀₀) değerlerinin ölçülmesi ile oluşturulan gelişim eğrisi	35
Şekil 4.2 a: Sabit frekans değerinde (3.0 kHz) sodyum aljinat ve sodyum kazeinat oranının mikrokapsül verimliliği üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu, b: Sabit sodyum kazeinat oranında (% 1.75) sodyum aljinat oranı ile frekans değerinin mikrokapsül verimliliği üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu, c: Sabit sodyum aljinat oranında (% 1.50) sodyum kazeinat oranı ile frekans değerinin mikrokapsül verimliliği üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu.....	39
Şekil 4.3. Farklı pH değerlerinde sodyum kazeinat-kalsiyum aljinat mikrokapsüllerinin yapısı.....	42
Şekil 4.4. a: Sabit frekans değerinde (3.0 kHz) sodyum aljinat ve sodyum kazeinat oranının pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1'in azalma oranı üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu, b: Sabit sodyum kazeinat oranında (% 1.75) sodyum aljinat oranı ile frekans pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1'in azalma oranı üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu, c: Sabit sodyum aljinat oranında (% 1.50) sodyum kazeinat oranı ile frekans değerinin pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1'in azalma oranı üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu	43
Şekil 4.5. a: Sabit frekans değerinde (3.0 kHz) sodyum aljinat ve sodyum kazeinat oranının mikrokapsül boyutu üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu, b: Sabit sodyum kazeinat oranında (% 1.75) sodyum aljinat oranı ile frekans değerinin mikrokapsül boyutu üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu, c: Sabit sodyum aljinat oranında (% 1.50) sodyum kazeinat oranı ile frekans değerinin mikrokapsül boyutu üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu	46
Şekil 4.6. Sodyum aljinat ve sodyum kazeinat oranının kaplama çözeltilerinin viskozite değerleri üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu	48

Şekil 4.7. BB deneme deseninde yer alan bazı mikrokapsüllerin fotoğrafları (40 kat büyütülmüş)	49
Şekil 4.8. Farklı optimum noktalarda üretilen mikrokapsüllerden 30 günlük depolama periyodunda üç farklı zamanda, yapay bağırsak ortamında bekletme süresince belirlenen Felix O1'e ait salınım oranlarındaki değişim	68
Şekil 4.9. Üretiminde farklı optimum noktalarda üretilen mikrokapsüllerin kullanıldığı yoğurt örneklerinden 30 günlük depolama periyodunda üç farklı zamanda, yapay bağırsak ortamında bekletme süresince belirlenen Felix O1'e ait salınım oranlarındaki değişim	72



ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bakteriyofajların sınıflandırılması	5
Çizelge 3.1. Bakteriyofaj mikrokapsülasyonunda kullanılan Box-Behnken deneme deseni.....	30
Çizelge 3.2. Bakteriyofaj salınımının matematiksel modellenmesinde kullanılan formüller.....	33
Çizelge 4.1 Farklı pH değerlerindeki çözeltiler içinde Felix O1 bakteriyofajının titreleri (log pob/mL).....	35
Çizelge 4.2. Felix O1 bakteriyofajının mikrokapsülasyonunda kullanılan Box-Behnken deneme deseni.....	36
Çizelge 4.3. BB deneme desenine göre hazırlanan mikrokapsüllerin verimlilik değerleri.....	37
Çizelge 4.4. Mikrokapsül verimlilik değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu ve mikrokapsülasyon verimliliği için model uygunluğunun test edilebilmesi için kullanılan istatistiki veriler	38
Çizelge 4.5. BB deneme desenine göre hazırlanan ve pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1 titresi ve azalma oranı	40
Çizelge 4.6. pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1'in azalma oranları üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu ve mikrokapsülasyon verimliliği için model uygunluğunun test edilebilmesi için kullanılan istatistiki veriler.....	41
Çizelge 4.7. BB deneme desenine göre hazırlanan mikrokapsüllerin çevre uzunluğu değerleri.....	44
Çizelge 4.8. Mikrokapsüllerin çevre uzunluğu değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu ve mikrokapsüllerin çevre uzunluğu için model uygunluğunun test edilebilmesi için kullanılan istatistiki veriler	45
Çizelge 4.9. BB deneme desenine göre hazırlanan çözeltilerin viskozite değerleri	47
Çizelge 4.10. BB deneme desenine göre hazırlanan kaplama çözeltilerinin viskozite değerleri üzerine sodyum aljinat ve sodyum kazeinat oranlarının etkisi	48
Çizelge 4.11. En yüksek mikrokapsülasyon verimliliği için belirlenen optimum noktalar.....	50
Çizelge 4.12. pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1'in azalma oranının en düşük olduğu optimum noktalar	51
Çizelge 4.13. En küçük çevre uzunluğuna sahip mikrokapsül üretimi için belirlenen optimum noktalar	52
Çizelge 4.14. Mikrokapsülasyon verimliliği en yüksek, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranı en düşük ve mikrokapsül çevre uzunluğu en küçük mikrokapsül üretimi için belirlenen optimum noktalar	52
Çizelge 4.15. Optimum noktalarda doğrulama deney sonuçları.....	53

Çizelge 4.16. Optimum noktalarda üretilen mikrokapsüle Felix O1'in yapay mide ortamında belirlenen titre sonuçları (log pob/g).....	54
Çizelge 4.17. Optimum noktalarda üretilen mikrokapsüle Felix O1'in yapay mide ortamında belirlenen titre sonuçlarına ait varyans analiz sonuçları	54
Çizelge 4.18. Optimum noktalarda üretilen mikrokapsüle Felix O1'in yapay mide ortamında belirlenen titre değerlerine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları	55
Çizelge 4.19. Optimum noktalarda üretilen mikrokapsüle Felix O1'in yapay bağırsak ortamında belirlenen titre sonuçları (log pob/g)	56
Çizelge 4.20. Optimum noktalarda üretilen mikrokapsüle Felix O1'in yapay bağırsak ortamında belirlenen titre sonuçlarına ait varyans analiz sonuçları	57
Çizelge 4.21. Optimum noktalarda üretilen mikrokapsüle Felix O1'in yapay bağırsak ortamında belirlenen titre değerlerine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları	57
Çizelge 4.22. Yoğurt örneklerine ait fizikokimyasal analiz sonuçları.....	59
Çizelge 4.23. Yoğurt örneklerine ait pH değerleri.....	60
Çizelge 4.24. Yoğurt örneklerine ait titrasyon asitliği değerleri.....	60
Çizelge 4.25. Yoğurt örneklerindeki <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ve <i>Streptococcus thermophilus</i> sayıları	61
Çizelge 4.28. Yoğurt içerisinde mikrokapsüle ve serbet formdaki Felix O1'in yapay mide ortamındaki titresini (log pob/g)	62
Çizelge 4.29. Yoğurt içerisinde mikrokapsüle ve serbet formda bulunan Felix O1'in yapay mide ortamındaki titre değerlerine ait varyans analiz sonuçları.....	63
Çizelge 4.30. Yoğurt içerisinde mikrokapsüle ve serbet formdaki Felix O1'in yapay mide ortamındaki titre değerlerine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	63
Çizelge 4.31. Yoğurt içerisinde mikrokapsüle ve serbet formdaki Felix O1'in yapay bağırsak ortamındaki aktivitesi (log pob/g).....	65
Çizelge 4.32. Yoğurt içerisinde mikrokapsüle Felix O1'in yapay bağırsak ortamındaki titre değerlerine ait varyans analiz sonuçları	66
Çizelge 4.33. Yoğurt içerisinde mikrokapsüle Felix O1'in yapay bağırsak ortamındaki titre değerlerine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları.....	66
Çizelge 4.34. Depolama süresince Felix O1'in yapay bağırsak ortamında mikrokapsüllerden salınım oranları (%)	67
Çizelge 4.35. Mikrokapsüllerdeki Felix O1 salınım oranlarının birinci dereceden kinetik model, Higuchi, Hixon-Crowell, Korsmeyer-Peppas ve Baker-Lonsdale modellerine ait R ² değerleri.....	69
Çizelge 4.36. Mikrokapsüllerdeki Felix O1 salınım oranlarının Korsmeyer-Peppas modeli difüzyon katsayısı ve salınım üsteli değerleri	70
Çizelge 4.37. Yoğurt örneklerinde Felix O1'in yapay bağırsak ortamında mikrokapsüllerden salınım oranları (%)	71

Çizelge 4.38. Yoğurt içerisindeki mikrokapsüllerden Felix O1 salınım oranlarının birinci dereceden kinetik model, Higuchi, Hixon-Crowell, Korsmeyer-Peppas ve Baker-Lonsdale modellerine ait R^2 değerleri 73

Çizelge 4.39. Yoğurt içerisindeki mikrokapsüllerden Felix O1 salınım oranlarının Korsmeyer-Peppas modeli difüzyon katsayısı ve salınım üsteli değerleri.....74



1. GİRİŞ

Günümüzde patojen bakterilerin antibiyotiklere direnç kazanması, tüm dünyada özellikle enfeksiyon hastalıklarının tedavisini zorlaştıran ve tedavi maliyetlerini arttıran önemli bir sorundur. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO-World Health Organization) Nisan 2015'de yayımladığı “Antimikrobiyal Direnç Formu”nda bilim insanlarının patojen bakterilerin antibiyotiklere direnç kazanmasına karşı yeni ilaçlar, teşhis ve tedavi yöntemleri geliştirmeleri gerekliliği bildirilse de son yıllarda çok az sayıda antibiyotik geliştirilmiştir. Patojen bakterilere karşı yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi uzun süre ve yüksek maliyet gerektirmektedir. Antibiyotiklerle karşılaştırıldığında doğal mikrobiyotayı koruma, toksik olmama, ucuz ve kolay üretilme gibi avantajları olan ve yalnızca kendilerine özgü bakteri türlerini enfekte eden bakteriyofajlar yeniden önem kazanmıştır. Böylece 20. yüzyılın başlarında göz ardı edilen “faj terapisi” ile ilgili çalışmalar hızla artmaya başlamıştır. Son yıllarda, insan sindirim sisteminde istenen mikrobiyotanın oluşturulmasında gıda takviyesi ve probiyotik bakterilerin kullanımı gibi yöntemlerin yanında faj terapisi de kullanılmaktadır. Bakteriyofajlar, insan sindirim sisteminde kendilerine özgü bakteri türüne direkt etki ederek sindirim sistemi mikrobiyotasını düzenlediklerinden dolayı insan sağlığı için büyük öneme sahiptir. Ancak, bakteriyofajların mikrobiyotayı düzenleyebilmesi ve antimikrobiyal fayda sağlayabilmesi için üretiminde kullanılan gıdanın fizikokimyasal özellikleri (sıcaklık, pH, a_w vb.), koruyucu bileşenleri ve depolama koşulları ile uygulanan bakteriyofaj konsantrasyonunun yetersizliği gibi olumsuzluklara karşı direnç göstermesi bir zorunluluktur. Ayrıca gıda ile birlikte vücuda alındıktan sonra bakteriyofajların, gastrointestinal sistemden geçiş süresince sindirim enzimleri ile yüksek asitlik ve safra salgısı gibi olumsuz ortam koşullarında da aktivitelerini koruması ve vücuttaki hedef bölgeye ulaşması gerekmektedir. Bakteriyofajların olumsuz koşullara karşı korunmasında kullanılan en yaygın yöntem, bakteriyofajların kontrollü salınım ile hedef bölgede aktivite gösterebilmesini sağlayan mikrokapsülasyon uygulamasıdır. Mikrokapsüle bakteriyofajın hedef bölgede mikrokapsüllerden salınımının kontrolünde mikrokapsüllerin stabilitesi, boyutu ve yükleme verimliliği önemlidir. Söz konusu özelliklerin en uygun şekilde sağlanabilmesi için mikrokapsül üretiminde kullanılan kaplama materyallerinin oranları ve mikrokapsül uygulamasındaki işlem değişkenleri optimize edilmelidir. Ayrıca, mikrokapsüle bakteriyofajın verimliliğinin artırılması ve aktivitesinin korunması için bakteriyofajın mikrokapsüllerden salınım hızının, zamanının ve yerinin kontrol edilmesi gerekmektedir. Matematiksel modelleme ile aktif bir maddenin salınım profili elde edilebilmektedir.

Bu çalışmada bakteriyofaj olarak GRAS listesinde yer alan (GRN No. 468) Felix O1 (DSM 18524), konakçı bakteri olarak da *Salmonella enterica* subsp. *enterica* seçilmiştir. İnsan bağırsak mikrobiyotasının doğal üyelerinden olan *Salmonella*, aynı zamanda gıda kaynaklı en yaygın patojenler arasında kabul edilmektedir. *Salmonella* cinsi; salmonelloz adı verilen, tüm dünyada insan sağlığını tehdit eden ve ekonomik yönden ciddi kayıplara yol açan gıda kaynaklı en önemli bakteriyel enfeksiyonlardan birine neden olmaktadır. *Salmonella* cinsinde 6 adet alt tür (subsp. *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*) içeren *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere iki tür bulunmaktadır. İnsanlardan elde edilen izolatların önemli kısmı *S. enterica* türüne ait olup, bu türün alt türlerinden biri olan *S. enterica* subsp. *enterica* hayvan ve insanlarda enfeksiyon oluşturmaktadır. Çalışmada bakteriyofaj

mikrokapsülasyonunda düşük pH değerlerindeki ortamlarda stabilitesi yüksek ve salınımın düşük olduğu mikrokapsül üretimine imkân sağlayan sodyum aljinat-sodyum kazeinat karışımı kaplama materyali karışımı kullanılmıştır. Sodyum aljinat ve sodyum kazeinatın birlikte kullanılması ile üretilen mikrokapsüllerde, ortamın pH değeri düştükçe sodyum kazeinatın amino grupları ile aljinatın karboksil grupları arasındaki elektrostatik etkileşim sonucu mikrokapsül stabilitesi artmakta ve mikrokapsüllenen materyalin salınımı azalmaktadır.

Bu çalışmada mikrokapsüle bakteriyofajın vücuda alınmasında kullanılmak üzere model gıda olarak yoğurt seçilmiştir. Binlerce yıldan beri Türkler tarafından üretilen yoğurdun, insan beslenmesindeki önemi ve sağlıkla ilgili yararlılığından dolayı dünyadaki tüketimi giderek artmaktadır. Dünyada bölgesel olarak üretilip tüketilen birçok fermente süt ürünü olmasına rağmen, bunlardan sadece yoğurt gerçek anlamda uluslararası yayılım göstermede başarılı olabilmektedir. Sağlıkla ilgili olumlu özellikleri ve bu konudaki olumlu imajı, farklı formlarda üretilebilmesi, yaygın tüketimi ve fonksiyonel özelliğinin artırılması isteği gibi çeşitli nedenlerle yoğurt üretiminde pek çok biyoaktif bileşen kullanılabilmektedir. Ancak üretiminde kullanıldığı yoğurdun depolanması sırasında ve/veya gastrointestinal sistem kaynaklı su, ısı, ışık, oksijen, sıcaklık, düşük pH, enzim aktivitesi vb. çeşitli çevresel koşulların biyoaktif bileşenler üzerinde olumsuz etkileri olabilmektedir. Bununla birlikte, mikrokapsülasyon yöntemi yoğurt üretiminde kullanılacak biyoaktif bileşenleri olumsuz çevresel koşullara karşı korumada kullanılabilmektedir.

Tüm bu bilgiler ışığında konu değerlendirildiğinde, bakteriyofajın çeşitli kaplama materyalleriyle mikrokapsülasyonu, mikrokapsülasyon uygulamasındaki işlem değişkenlerinin Cevap Yüzey Yöntemi'yle optimize edilmesi ve elde edilecek mikrokapsüllerin yapay mide ve bağırsak sıvılarındaki salınımlarının incelenerek matematiksel modellenmesi bu çalışmanın en önemli amaçları arasında yer almıştır. Bununla birlikte, TÜBİTAK Vizyon 2023 Çalışmaları çerçevesinde gıda alanında Ar-Ge ve yenilik faaliyetlerimizin ivme kazanmasıyla elde edilmesi hedeflenen sosyal, ekonomik ve çevresel faydalardan biri olan “Yapılacak Ar-Ge ve yenilik çalışmalarıyla ürünlerin kalitesinin yükseltilmesi; toplumun dengeli ve sağlıklı beslenmesinin ve yaşam kalitesinin geliştirilmesinin sağlanması” maddesi de göz önüne alınarak mikrokapsüle bakteriyofajlar, yoğurt üretiminde kullanılarak yeni fonksiyonel ürün geliştirilmesi hedeflenmiştir. Üretilen yoğurt örnekleri depolamanın belirli günlerinde yapay mide ve bağırsak sıvılarına maruz bırakılarak içermiş olduğu Felix O1'in mikrokapsüllerden salınımı incelenmiş, böylece gıdanın hem bileşiminin hem de depolanmasının bakteriyofajların salınımı üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada, yoğurtta depolama süresince bakteriyofaj ve yoğurt bakterilerinin sayımı yapılarak bakteriyofaj ile yoğurt bakterileri arasındaki ilişki de ortaya konulmuştur.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Bakteriyofaj

Bakteriyofajların varlığı ilk kez 1896 yılında Ernest Hankin tarafından fark edilmiştir. Frederick Twort tarafından 1915 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. Doğada en fazla bulunan biyolojik topluluklardan birini temsil eden bakteriyofajlar, kendilerine özgü hedef bakteriyi öldürebilen bakteri virüsleri olarak tanımlanmaktadır. 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 (Nobrega vd. 2015, Anonim 1). Patojen bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazanması ve bu durum karşısında yeni geliştirilen antibiyotiklerin de yetersiz kalması, bilim insanlarını patojen bakterilere karşı yeni yöntemler geliştirmeye yönlendirmiştir (Tsonos vd. 2014; Snyder vd. 2016). Son birkaç yılda patojen bakterilere karşı bakteriyofajların kullanıldığı ve “faj terapisi” olarak adlandırılan tedavi yönteminin geliştirilmesine yönelik çalışmalar hızla artmıştır (Beke vd. 2016; Esteban vd. 2016).

2.1.1. Bakteriyofajların hayat döngüleri

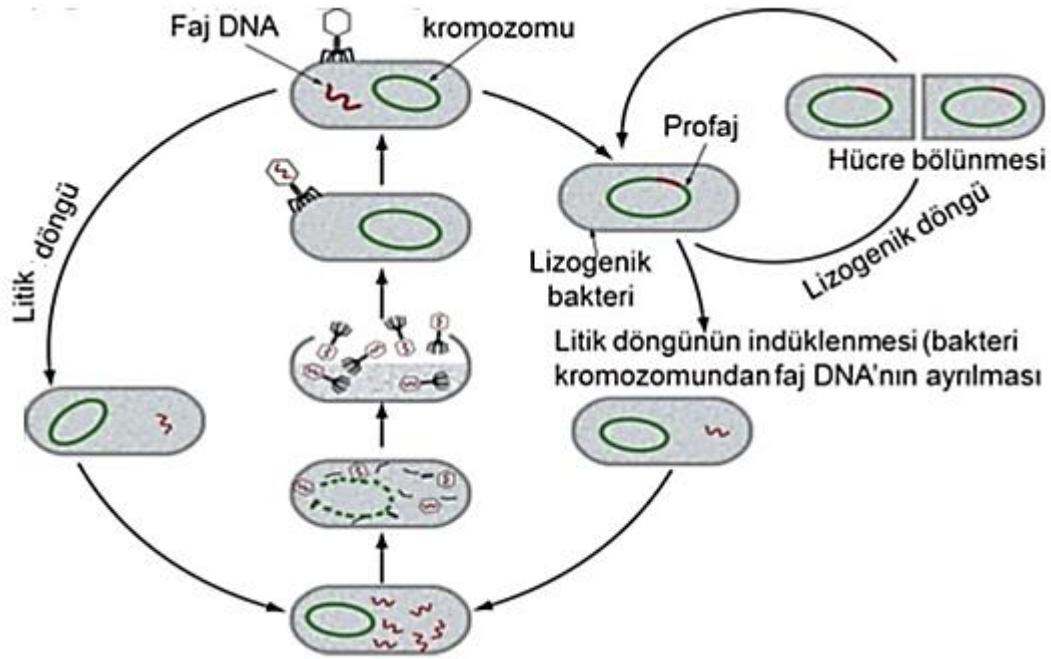
Baş, boyun, kuyruk, taban ve taban uzantıları gibi kısımlardan meydana gelen fajların yumak şeklindeki baş kısmında kapsit adı verilen protein kılıf ile çevrili nükleik asitler bulunmaktadır. Nükleik asitler, çift veya tek iplikli DNA ya da RNA’dan oluşabilmektedir. Bakteriyofajların hayat döngülerini devam ettirebilmeleri için genetik materyallerini spesifik oldukları konakçı bakteriye aktarmaları gerekmektedir (Orlova 2012). Bakteriyofajların litik veya lizogenik hayat döngüleri olabilmekte, bazılarında ise her ikisi de görülmektedir (Şekil 2.1). Litik hayat döngüsü, adsorpsiyon, penetrasyon, biyosentez ve lizis evrelerinden oluşmaktadır (Guttman vd. 2005).

Bakteriyofajın bakteriyi enfekte etmesi adsorpsiyon basamağı ile başlamaktadır. Adsorpsiyon basamağı konakçı hücre duvarı ile kuyruklu fajlarda taban fibrillerinin ya da kuyuksuz fajlarda kapsomerlerin yüksek uyumu ile gerçekleşmektedir. Bakteriyofajın bakteriye özgünlüğünde adsorpsiyon basamağı önemli rol oynamaktadır. Bakteriye özgü kapsül yapısı, lipoprotein tabakası, pili, flagella gibi yüzeyde bulunan protein tabiatındaki yapılar adsorpsiyon için gerekmektedir. Bununla birlikte, ortamın pH değeri, Mg^{+2} , Ca^{+2} gibi iyonların varlığı ile elektrostatik etkileşimler adsorpsiyon basamağını etkileyebilmektedir (Çelik 2017).

Penetrasyon basamağında faj nükleik asidini enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla konakçı bakteri hücresinin içine aktarmaktadır (Çelik 2017). Zarar görmeden konakçı bakterinin hücre zarını geçen faj nükleik asidi, periplazmik boşluk içinde bulunan nükleazlardan ve restriksiyon enzimlerinden korunmak için DNA/RNA’sını yapışkan uçlar vasıtasıyla hızla daireselleştirmekte veya lineer uçlarını korumaya almaktadır. Ardından faj DNA/RNA’sı, konakçı bakterinin RNA polimerazına tanıtılmakta ve *erken genlerin* transkripsiyonu gerçekleşmektedir. Erken genler ile faj genomu korunmakta ve konakçı bakteri, fajın çoğalabilmesine olanak sağlayacak şekilde yeniden

yapılandırılmaktadır. İlerleyen aşamada, konakçı bakteride yeni faj DNA/RNA'sının sentezlenmesinde kullanılacak ürünleri kodlayan *ara genlerin* ve faj partikülünün şekillenmesi ile DNA/RNA'sının paketlenmesini sağlayan enzimleri kodlayan bir dizi *geç genlerin* transkripsiyonu gerçekleşmektedir (Guttman vd. 2005). Morfogenez olarak adlandırılan basamakta bakteriyofajların biyosentezi gerçekleşmektedir. Konakçı bakteri sitoplazmasında sentezlenen yeni faj parçaları bir araya gelmektedir. Son aşama olan liziste ise olgunlaşan yeni fajlar konakçı bakteri hücrelerini parçalamakta ya da hücre zarında bulunan porlardan dışarı çıkmaktadır (Mutlu 2015).

Lizogenik döngüde bakteriyofaj, bakteri hücresi içine girdikten sonra genetik materyalini bakteri DNA'sı ile entegre hale getirmekte ve profaj olarak hücre genomunda bulunmaktadır. Profajlar, konakçı bakterinin bölünmesi sırasında bakteri DNA'sı ile birlikte replike olmakta ve yeni bakteri hücrelerine aktarılmaktadır. Bakterinin içinde bulunduğu çevresel koşullar kötüleşmediği sürece bakteriyofaj etkisiz halde varlığını sürdürmektedir. Ancak bakterinin çevresel koşulları bozulduğunda, örneğin besin kaynakları tükendiğinde, bakteri içindeki bakteriyofaj aktif hale gelmekte ve çoğalarak bakteriyi parçalamaktadır (Kittler vd. 2016).

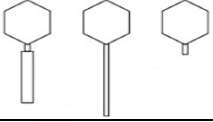


Şekil 2.1. Bakteriyofajların hayat döngüsü (Taş (2018)'den uyarlanmıştır)

2.1.2. Bakteriyofajların sınıflandırılması

Bakteriyofajlar, yapısal, fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri bakımından farklılıklar göstermektedir. Ackermann (2001)'in yaptığı sınıflandırmaya göre bakteriyofajlar dört yapısal grup (kuyruklu, polihedral, filamentöz ve pleomorfik) altında 1 takım, 13 aile ve 31 cins olarak tanımlanmıştır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Bakteriyofajların sınıflandırılması (Ackermann 2005)

Faj grubu	Ayırt edici yapısı	Adsorpsiyon bölgesi	Konakçı faj ilişkisi	Örnek	Şematik gösterimleri
Kuyruklu fajlar	Kontraktıl kuyruk	Hücre duvarı, kapsül, pili, flagella	Litik Lizogenik	T4, λ , T7	
<i>Microviridae</i>	Büyük kapsomer	Hücre duvarı	Litik	ϕ X174	
<i>Corticoviridae</i>	Çift kapsid, lipitler	Hücre duvarı	Litik	PM2	
<i>Tectiviridae</i>	Çift kapsid, pseudo-kuyruk, lipitler	Pili	Litik	PRD1	
<i>Leviviridae</i>	Çift kapsid, pseudo-kuyruk, lipitler	Pili	Litik	MS2	
<i>Cystoviridae</i>	Kılıf, lipitler	Hücre duvarı, pili	Litik	ϕ 6	
<i>Inoviridae</i>	Kısa çubuk, uzun filamentler	Pili	Lizogenik	fd	
<i>Lipothrixviridae</i>	Kılıf, lipitler	Pili	Lizogenik	TTV1	
<i>Rudiviridae</i>	Sert çubuk, kılıf ve lipit yok	Hücre duvarı	Lizogenik	SIRV	
<i>Plasmaviridae</i>	Kılıf, lipitler, kapsid yok	Plazma üyesi	Lizogenik	L2	
<i>Fuselloviridae</i>	Limona benzer yapıda, kılıf, lipitler	Pili	Lizogenik	SSV1	

2.1.2.1. Kuyruklu fajlar

Fajların çoğu kuyruklu yapıya sahiptir. Kuyruklu fajlar, doğrusal çift sarmal DNA (dsDNA) ve DNA'yı çevreleyen ikosahedral kübik şeklinde kapsid (baş) ile helikal tasarımlı düz görünüşlü uzun veya kısa kuyruktan oluşmaktadır. Kapsid proteinleri kapsomerler (5 veya 6 adet protein alt ünitesinden (polipeptitlerden) oluşan yapı) halinde düzenlenmektedir. Elektron mikroskopuyla kapsidler genellikle pürüzsüz ve kolay görünürken, kapsomerlerin gözlenmesi zordur. Helikal yapıya sahip faj kuyruklarının sonunda genellikle terminal adsorpsiyonu sağlayan plaklar, iğneler ve iplikçikler gibi çıkıntılar bulunabilmektedir. Kuyruklu fajlar, morfolojik, fizikokimyasal ve fizyolojik özellikleri açısından "Caudovirales" adı verilen monofiletik (tek bir ortak atadan evrimleşmiş) evrim grubunu oluşturmaktadır. Bununla birlikte, boyutları, DNA içerikleri, protein bileşimleri, fizyoloji ve konakçı çeşitliliklerinden dolayı kuyruklu fajlar 3 farklı aileye ayrılmaktadır. Kuyruklu fajların yaklaşık % 61'i kontraktıl olmayan uzun kuyruklu

Siphoviridae, yaklaşık % 25'i kontraktıl kuyruklu Myoviridae ve yaklaşık % 14'ü kısa kuyruklu Podviridae ailesine aittir (Ackermann 2005).

2.1.2.2. Kuyruksuz fajlar

Kuyruksuz fajlar, tüm tanımlanmış fajların sadece % 4'ünü oluşturmakta ve temel özelliklerindeki farklılıklardan dolayı 10 aileye ayrılmaktadırlar (Ackermann 2005).

- Polihedral DNA fajları

Microviridae (ssDNA) ailesi; yapıları kılıfsız ikosahedral kapsid ve 12 adet kapsomer ile dairesel çift sarmal DNA (ssDNA)'dan oluşmaktadır.

Corticoviridae (dsDNA) ailesi; deniz suyundan izole edilen PM2 fajı ailenin tek üyesi olmakla birlikte yapısında lipid varlığı tespit edilen ilk bakteriyofajdır.

Tectiviridae (dsDNA) ailesi; kalın ve esnek lipoprotein kesesi içeren kapside sahiptir (Ackermann 2005)..

- Polihedral RNA fajları

Leviviridae (ssRNA) ailesi; kılıfsız kapside sahiptir ve RNA'ları mRNA olarak işlev görmektedir. Serolojik ve genotip özelliklerine göre iki cinse (Levivirus ve Allevivirus) ayrılmaktadır.

Cystoviridae (dsRNA) ailesi; Fitopatojenik bakteri olan *Pseudomonas syringae* için spesifiktir ve lipid içeren kılıfla çevrili ikosahedral kapside sahiptir. Kapsidleri, bakteri hücre duvarı ve sitoplazmik membran arasındaki boşluğa girerek hücreyi enfekte etmektedir (Ackermann 2005)..

- Filamentöz fajlar

Inoviridae (ssDNA) ailesi; morfolojik yapı ve etki ettikleri konakçılara göre iki cinse (Inovirus ve Plectrovirus) ayrılmaktadır. Inovirus cinsi bakteriyofajlar, Enterobacteria, Clostridia ve Propionibacteria cinsi bakterileri enfekte etmekle birlikte kloroform ve sonikasyona karşı hassasiyet; çok yüksek sıcaklıklara karşı da direnç gösterebilmektedir. Kısa ve düz çubuk yapıdaki Plectrovirus cinsi fajlar sadece mikoplazmaları enfekte etmektedir.

Lipothrixviridae (dsDNA) ailesi; lipoprotein kılıf ile çevrili çubuk şeklinde bir yapıya sahiptir.

Rudiviridae (dsDNA) ailesi; bir ucunda bakteriye sabitlenmeyi sağlayan çıkıntılar bulunan çubuk şeklinde yapıya sahip iki üyeden oluşmaktadır (Ackermann 2005).

- Pleomorfik fajlar

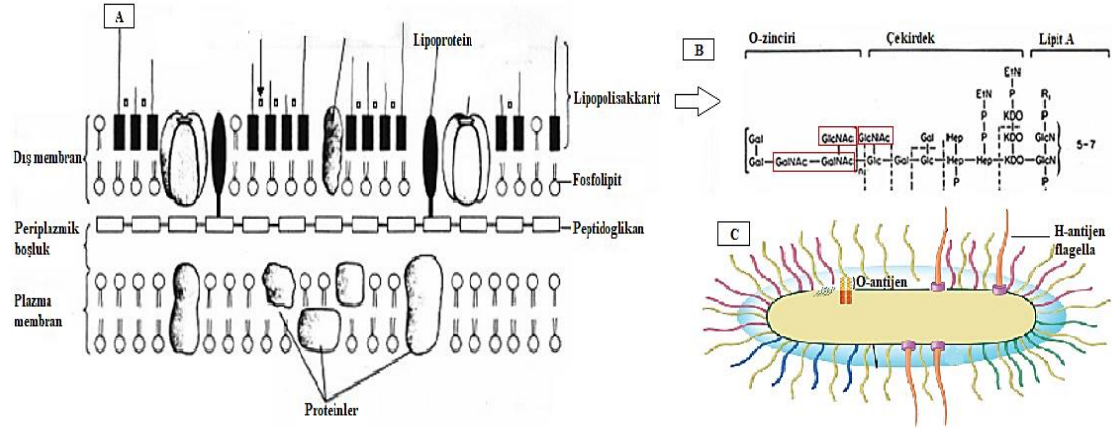
Plasmaviridae (dsDNA) ailesi; kapsidi olmayan, ancak genetik materyalleri kılıfla çevrelenmiş bir üyesi (Acholeplasma virus MVL2) bulunmaktadır.

Fuselloviridae (dsDNA) ailesi; bir ucunda kısa sivri uca sahiptir. UV ışık ve mitomisin C ile uyandırılmaktadır (Ackermann 2005).

2.1.3. Felix O1 bakteriyofajı ve Salmonella

Felix O1 (Bakteriyofaj O1, 01, 0-1) 73 nm çaplı ikosahedral baş, 17x113 nm uzunluğunda kontraktıl kuyruk ve 6 adet düz kuyruk çıkıntısına sahip, Myoviridae ailesinin A1 grubu üyesidir. Genetik materyali bir adet çift sarmallı düz DNA'dan

oluşmaktadır. İlk kez 1943 yılında Felix ve Callow'un *Salmonella typhi*'yi tanımlanması sırasında kullanılmıştır. Felix O1, *Salmonella* türlerinin % 98.2'sini lize edebilmektedir (Whichard vd. 2010). Felix O1, *Salmonella* türü bakterilerin hücre zarındaki lipopolisakkarit yapısının içine gömülü olarak bulunan, O yan zincirindeki N-asetilglukozamin dalına bağlanmaktadır (Şekil 2.2 A, Şekil 2.2 B) (Lindberg ve Holme 1969).



Şekil 2.2. A; *Salmonella* hücre zarı yapısı, B; *Salmonella* lipopolisakkarit yapısı (GlcNAc= N-asetilglukozamin; Glc=glukoz, Gal=galaktoz; Hep=heptoz; P=fosfat; Etn= etanolamin; KDO=2-keto-3-deoksioktonat) (Lindberg ve Holme (1969)'dan uyarlanmıştır) C; *Salmonella* hücresinin dış yapısı (Anonymous 1'den uyarlanmıştır.)

Salmonella ilk kez 1855'te Theobald Smith tarafından domuzların bağırsaklarından izole edilmekle birlikte ismini Amerikan patolojist Dr. Daniel Elmer Salmon'dan almaktadır. *Salmonella* cinsi bakteriler fakültatif anaerobik, Gram negatif, çubuk şeklinde, genellikle 2-5 µm uzunluğunda ve 0.5-1.5 µm genişliğindedir. *Salmonella* suşları, Kauffmann-White şemasına göre lipopolisakkarit (LPS) antijenleri (O) ve flagella protein antijenlerinin (H) çeşitliliğine dayanarak yaklaşık 2500 serovara ayrılmaktadır (Şekil 2.2 C) (Üre 2018). Enterobacteriaceae ailesine ait olan *Salmonella* cinsi, *Salmonella enterica* ve *Salmonella bongori* olmak üzere iki farklı türe ayrılmaktadır. *Salmonella enterica* genomik ve biyokimyasal özelliklerine göre altı alt türe (I, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*; II, *Salmonella enterica* subsp. *salamae*; IIIa, *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*; IIIb, *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*; IV, *Salmonella enterica* subsp. *houtenae*; ve VI, *Salmonella enterica* subsp. *indica*) ayrılmaktadır. Söz konusu alt türler arasında *Salmonella enterica* subsp. *enterica* çoğunlukla memelilerde bulunmakta ve sıcak kanlı hayvanlar ile insanlardaki *Salmonella* enfeksiyonlarının % 99'undan sorumlu tutulmaktadır. Ağız yolu ile alındığında *S. enterica* subsp. *enterica* türleri insanlarda enterik ateş (tifo), enterokolit/ishal (salmonelloz) ve bakteriyemi (sepsis) hastalıklarına neden olmaktadır (Coburn vd. 2007). Salmonelloz bireylerde kusma, ishal, kramp ve ateşe neden olmakla birlikte küçük çocuklarda, yaşlılarda ve bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde ölümle sonuçlanabilmektedir (Fatica ve Schneider 2011). Yapılan klinik çalışmalar, *Salmonella*'nın insanlarda hastalık oluşturmaları için gereken sayının 10 ile 10¹⁰ kob/g hücre gibi geniş bir aralıkta değiştiğini ve insanlarda enfeksiyonun *Salmonella* ile bulaşık gıda ve su tüketimi sonucu meydana geldiğini göstermektedir (Bell vd. 2016). Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (European Centre for Disease Prevention and

Control-ECDC) ve Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority-EFSA) tarafından 12 Aralık 2018 tarihinde yayımlanan “Zoonozların zoonotik ajanların ve gıda kaynaklı salgınların eğilimleri ve kaynakları” isimli rapora göre 2017 yılında *Salmonella* türlerinin neden olduğu *Salmonellozis*, 91662 vaka ile en sık karşılaşılan ikinci zoonoz kaynaklı hastalık olmuştur. Söz konusu rapora göre Avrupa Birliği ülkelerinde 1241 *salmonellozis* salgını belirlenirken, 156 kişi yaşamını yitirmiştir (Anonymous 2).

2.1.4. Bakteriyofajların kimyasal antibiyotiklere göre avantajları

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 dozaj) kontrol etmektedir. Bakteriyofajlar çoğunlukla nükleik asit ve proteinlerden oluştuğu için toksik değildir. Bakterilerin oluşturduğu antibiyotiğe direnç mekanizması bakteriyofajların söz konusu bakteriye etki etmesini engelleyememektedir. Patojen bakterilere karşı etkili bakteriyofajın bulunması kolaydır. Bakteriyofajlar genellikle yüksek sayıda bulundukları kanalizasyonlardan ve diğer atık maddelerden izole edilebilmektedir. Ayrıca bakteriyofajların üretimi antibiyotiklere göre daha ucuzdur (Harper vd. 2015, Pulit vd. 2015).

2.1.5. Bakteriyofajların antibakteriyel ajan olarak gıdalarda kullanımı

Gıdalarda patojen bakterilerin kontrolünde antibakteriyel kimyasal ajanlar yerine bakteriyofaj kullanımı günümüzde mevcuttur. Özellikle, Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (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 (Cooper 2016). Avustralya ve Yeni Zelanda Gıda Standartları (FSANZ- Food Standards Australia New Zealand) ve İsviçre 2012 yılında Listex™’in peynir ve diğer gıdalarda kullanımına onay vermiştir (Chatain 2014).

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 dk ısıtılma işleminden 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 kontamine edilmiştir. Meyve parçaları ve suları bakteri karışımı ile kontamine 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 kontamine 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 ve 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'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 (Oliveira vd. 2014). 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 *L. monocytogenes* suşları üzerine etkili olduğu belirlenmiştir (Sağlam 2014).

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 sayının 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 inkübasyon sonunda 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 sonunda 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 tespit edilmiştir. Genel olarak *E. coli* O157 inaktivasyonunun, inkübasyon sıcaklığının yüksekliğine, MOI konsantrasyonunun

artışına ve bakteriyofaja maruz kalma süresine bağlı olarak arttığı belirtilmiştir (Liu vd. 2015).

Yapılan başka bir çalışmada, *Salmonella* FO1-E2 bakteriyofajının tüketime hazır gıdalarda *Salmonella typhimurium*'un kontrolünde kullanımı incelenmiştir. Karides, midye ve kalamardan oluşan pişmiş deniz ürünleri karışımı, sosisli sandviç, pişirilmiş ve doğranmış hindi göğüs eti, çikolatalı süt ve pastörize yumurta sarısı, 1×10^3 kob/g veya kob/mL olacak şekilde *S. typhimurium* DB7155, *S. typhimurium* DB7155stmR ve *S. typhimurium* DB7155camR ile kontamine edildikten sonra bakterilerin ortama adapte olması için 8 ve 15°C'lerde yaklaşık 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübe edilen örnekler 3×10^8 pob/g veya 3×10^8 pob/mL bakteriyofaj uygulaması yapıldıktan sonra 8 ve 15°C'lerde 6 gün süresince depolanmıştır. Çalışmanın negatif kontrol grubunu bakteri ve bakteriyofaj içermeyen örnekler oluştururken, pozitif kontrol grubunu yalnız bakteri içeren örnekler oluşturmuştur. Deniz ürünleri karışımı ve çikolatalı sütün pozitif kontrol örneklerinde *S. typhimurium* sayısının 8°C'de 6 gün depolamanın sonunda 0.5-1.4 log arasında düşüş gösterdiği; bakteriyofaj uygulanan deniz ürünleri ve çikolatalı süt örneklerinde ise 1. günün sonunda *S. typhimurium* sayısının 3.0 log azalma göstererek tamamen inhibe olduğu tespit edilmiştir. *S. typhimurium* DB7155stmR ile kontamine edilen ve 15°C'de depolanan deniz ürünleri karışımı, çikolatalı süt ve pastörize yumurta sarısının pozitif kontrol örneklerinde *S. typhimurium* sayısının depolama sonunda yaklaşık 5.0 log arttığı belirlenirken, sosisli sandviç ve doğranmış hindi göğüs etinin pozitif kontrol örneklerinde *S. typhimurium* sayısının depolama sonunda yaklaşık 2.0 log arttığı saptanmıştır. *Salmonella* FO1-E2 bakteriyofaj uygulaması yapılan ve 15°C'de depolanan sosisli sandviç ve deniz ürünleri karışımı örneklerinde depolamanın sonunda *S. typhimurium* sayısında sırasıyla 3.0 ve 1.9 log'luk azalma olduğu tespit edilmiştir. Depolamanın 2. gününde pastörize yumurta sarısı örneklerinde *S. typhimurium* sayısının pozitif kontrol örneğine göre 2.6 log az olduğu belirlenirken, depolamanın sonunda pozitif kontrol örneği ile *Salmonella* FO1-E2 bakteriyofaj uygulaması yapılan örneklerdeki *S. typhimurium* sayısının eşit olduğu (yaklaşık 10^8 kob/g) saptanmıştır. Söz konusu durumun yumurta sarısının viskoz yapısının bakteriyofaj difüzyonunu engelleyerek bakteriyofajın konakçı bakteriyi inhibe etmesi için gerekli interaksiyon, adsorpsiyon ve enfeksiyonu gerçekleştirememesinden kaynaklandığı değerlendirilmiştir (Guenther vd. 2012).

Endersen vd. (2013) 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 kurumaddeli rekonstitüe süt içerisine 1×10^3 kob/mL olacak şekilde *M. smegmatis* mc²155 inoküle edilmiştir. Bakteri ile kontamine edilen rekonstitüe süte 1×10^9 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. İnkübasyon 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 1×10^8 pob/mL olacak şekilde eklendikten sonra 37°C 'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Sıcaklık uygulaması için 37 , 45 , 55 , 60 , 72 ve 90°C 'lerdeki 1×10^9 kob/mL bakteriyofaj içeren BHI sıvı besiyerinden 60 dakika süresince örnek alınarak bakteriyofaj titresini 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 bekletme uygulaması ile bakteriyofaj titresinin 2.0 log azaldığı, aynı sıcaklıkta 60 dakika bekletme uygulaması sonunda ise azalmanın 5.0 log'a çıktığı tespit edilmiştir. Bakteriyofaj titresini 72°C 'de 15 dakika bekletme 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 'lerde 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 (Gouvea vd. 2016).

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 CaCl_2 ilave edilmiştir. CaCl_2 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 ulaşınca 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 oluşturmıştır. Peynir yapımı süresince, başlangıç (süte bakteri ve bakteriyofaj karışımı ilavesinden hemen sonra), fermentasyon, pıhtılaşma, pıhtı ısıtma ve olgunlaştırma aşamalarından sonra örnek alınarak *S. aureus* SMQ-1320 sayısı ile bakteriyofaj titresi belirlenmiştir. Fermentasyon 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 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. Fermentasyon 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 (El Haddad vd. 2016).

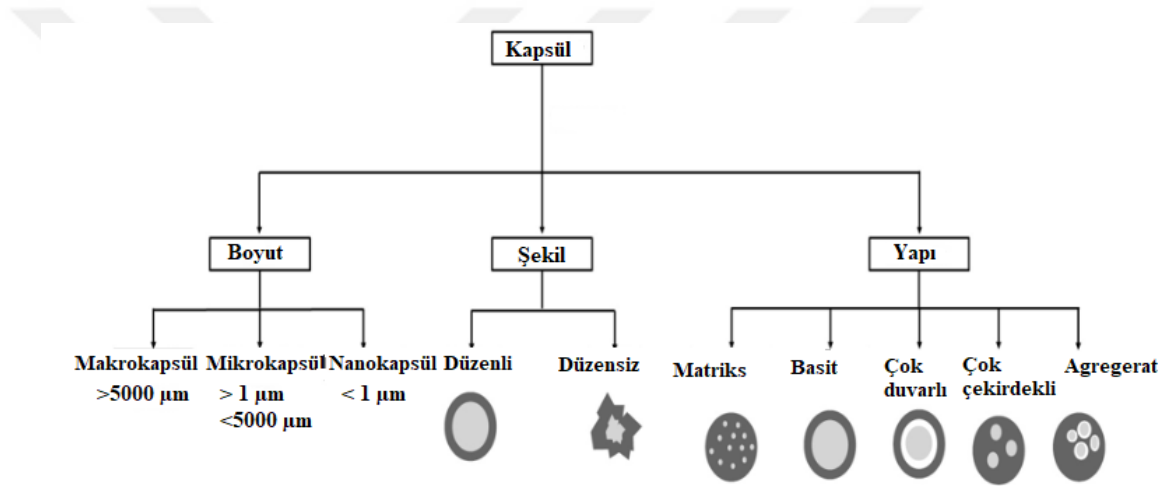
Yapılan bir çalışmada, sütte *Staphylococcus aureus*'un kontrolü için Phage K ATCC 19685-B1 kullanımı incelenmiştir. Çalışmada; çiğ süte, 90°C'de 10 dakika ısıtma işlemi uygulanmış süte ve BHI sıvı besiyerine *Staphylococcus aureus* DPC 5645 inoküle edilerek 37°C'de 4 saat (*S. aureus* DPC5645 sayısı 10^7 kob/mL ulaşana kadar) tutulduktan hemen sonra Phage K ATCC 19685-B1 MOI=100 olacak şekilde ilave edilmiştir. BHI sıvı besiyeri ve ısıtma işlemi uygulanmış süte 37°C'de 2 saat içinde *S. aureus* DPC5645'in tamamen inhibe olduğu; çiğ süte ise 8 saat süresince *S. aureus* DPC5645'in bakteriyofajdan hiç etkilenmediği tespit edilmiştir. Sütte ısıtma işlemi karşı hassas bileşenlerin bakteriyofajın bakteriye adsorpsiyonunu engellediği değerlendirilmiştir. Çalışmada ayrıca 45°C'ye ısıtılmış ve 45°C'ye ısıtıldıktan sonra homojenizasyon işlemi uygulanmış sütlere, çiğ süte 0.18 mL/L rennet eklenmesiyle elde edilen peyniraltı suyuna ve 90°C'de 10 dakika ısıtma işlemi uygulanmış peyniraltı suyuna 10^6 kob/mL düzeyinde *S. aureus* DPC 5645 inoküle edilip 37°C'de 3 saat tutulduktan sonra MOI=100 olacak şekilde Phage K ATCC 19685-B1 ilave edilmiştir. Homojenizasyon işlemi uygulanmış süte 37°C'de 8. saatin sonunda *S. aureus* DPC5645 sayısının yaklaşık 10 kat azaldığı saptanırken, 45°C'ye ısıtılmış süt örneklerinde 8 saat süresince bakteriyofajın *S. aureus* DPC5645'e etki etmediği belirlenmiştir. Isıtma işlemi uygulanmış peyniraltı suyunda 37°C'de 2 saat içinde *S. aureus* DPC5645 tespit edilemezken, ısıtma işlemi uygulanmamış peyniraltı suyunda *S. aureus* DPC5645'in 37°C'de 4 saat sonunda tamamen inhibe olduğu saptanmıştır. Çiğ süte ve ısıtma işlemi uygulanmamış peyniraltı suyunda sıcaklığa karşı hassas proteinlerin bakteri hücresinin yüzeyine tutunarak bakteriyofajın bakteriye bağlanmasını engellediği ya da geciktirdiği değerlendirilmiştir (O'Flaherty vd. 2005).

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 bakteriyofajın

etkinliğini olumsuz yönde etkileyen durumlar kullanımlarını kısıtlamaktadır (Chatain 2014).

2.2. Mikrokapsülasyon

Kapsülasyon; 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. Kapsülasyon işlemiyle kaplanan bileşen “aktif”, “çekirdek” ve “iç faz” olarak adlandırılmaktayken, kaplama materyali “duvar”, “kabuk”, “taşıyıcı” veya “membran” olarak isimlendirilmektedir (Davidov-Pardo ve McClements 2014). Üretilen kapsüller boyut, yapı ve morfolojilerine bağlı olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.3). Çap uzunlukları 5000 μm 'den büyük kapsüller, makrokapsül; 1-5000 μm arasında çap uzunluğuna sahip kapsüller mikrokapsül ve 1 μm ve daha küçük çap uzunluğuna sahip kapsüller nanokapsül olarak adlandırılmaktadır (Riberio vd. 2019).

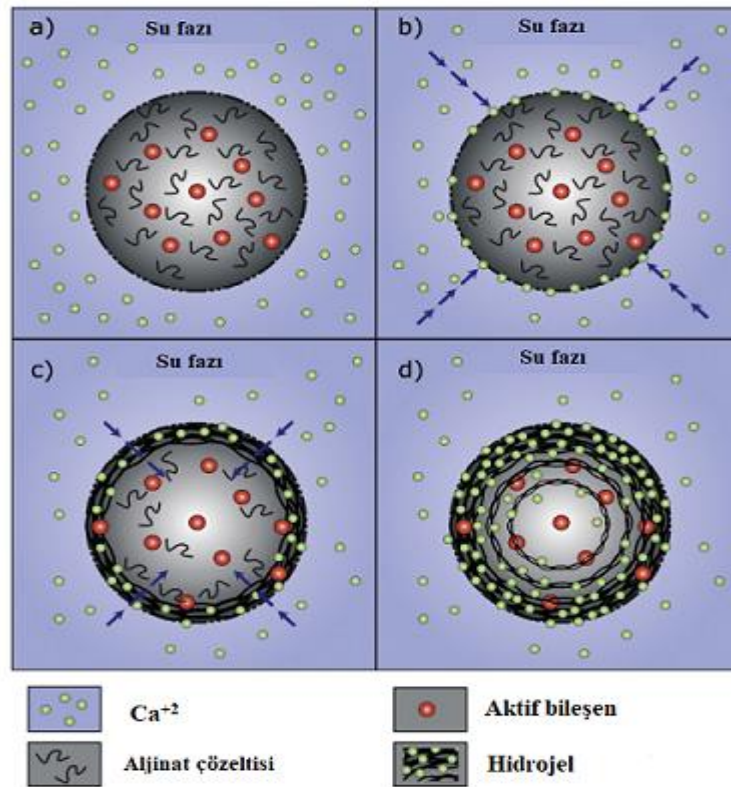
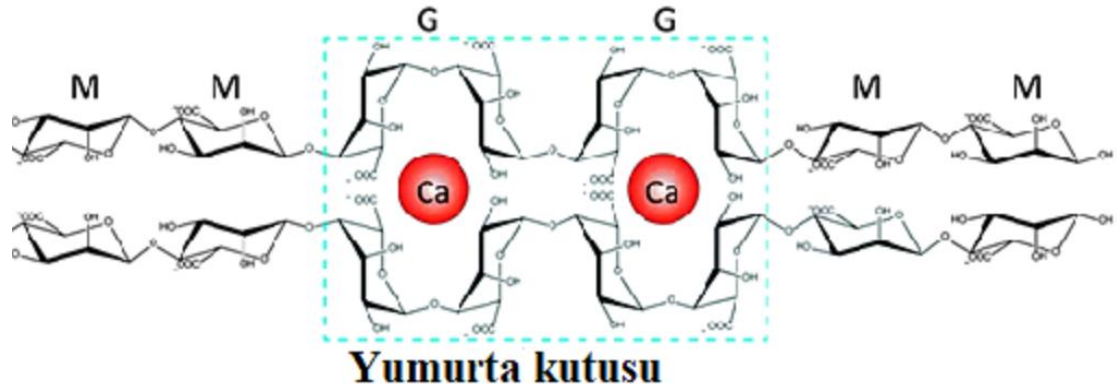


Şekil 2.3. Kapsüllerin sınıflandırılması (Riberio vd. (2019)’dan uyarlanmıştır.)

Mikrokapsülasyon teknolojisi ile elde edilen kapsüllerin genel olarak stabilitelerinin yüksek, geçirgenliklerinin uygun, boyutlarının istenen düzeyde ve ortamla uyumlu olması istenmektedir (Cook vd. 2012; Çomak Göçer 2013). 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 korumalı ve ucuz olmalıdır. Bütün bu özellikleri taşıyan tek kaplama materyali olmadığı için, bir kaplama materyali diğer kaplama materyalleri ile birlikte kullanılabilir (Silva vd. 2013).

Kaplama materyali olarak en sık kullanılan polimerlerden biri aljinattır. Aljinatlar genel olarak kahverengi deniz yosunundan elde edilmekle birlikte, α -L-gulonik asit (G) ve β -D-mannuronik asidin (M) biraraya gelmesiyle oluşmaktadır (Goh vd. 2012). İki değerli katyonlar aljinatın yapısında bulunan guluronik asit bloklarına bağlanmakta ve “yumurta kutusu” adı verilen yapı meydana gelmektedir. Suda kolay çözünme özelliğine sahip olması nedeniyle CaCl_2 aljinatın jelatinizasyonunda en sık kullanılan tuzdur. Su

içerisinde serbest hale gelen Ca^{+2} iyonları hidrojel parçacıkları oluşturmak için aljinatın guluronat birimlerine çapraz bağlanmaktadır (Leong vd. 2016) (Şekil2.4).



Şekil 2.4. Aljinatın yapısı ve mikrokapsül oluşumu. G; α -L-guluronik asit, M; β -D-mannuronik asit (M), Ca; kalsiyumu ifade etmektedir (Leong vd. (2016)'dan uyarlanmıştır.)

Yapılan çalışmalar, aljinatın tek başına kullanılmasıyla üretilen mikrokapsüllerin dayanıklılığının zayıf olduğunu ve aljinatın çeşitli polimerler ile desteklenerek kullanılması gerektiğini ortaya koymuştur (Motwani vd. 2008; Ma vd. 2012). Süt proteinleri; düşük viskoziteli çözelti oluşturma, kolay çözünebilme ve film oluşturabilme gibi fonksiyonel özelliklerinden dolayı aljinatla birlikte gıda bileşenlerinin, ilaçların, probiyotiklerin ve bakteriyofajların mikrokapsülasyonunda kullanılabilmektedir (Heidebach vd. 2009; Gaonkar vd. 2014; Vonasek vd. 2014).

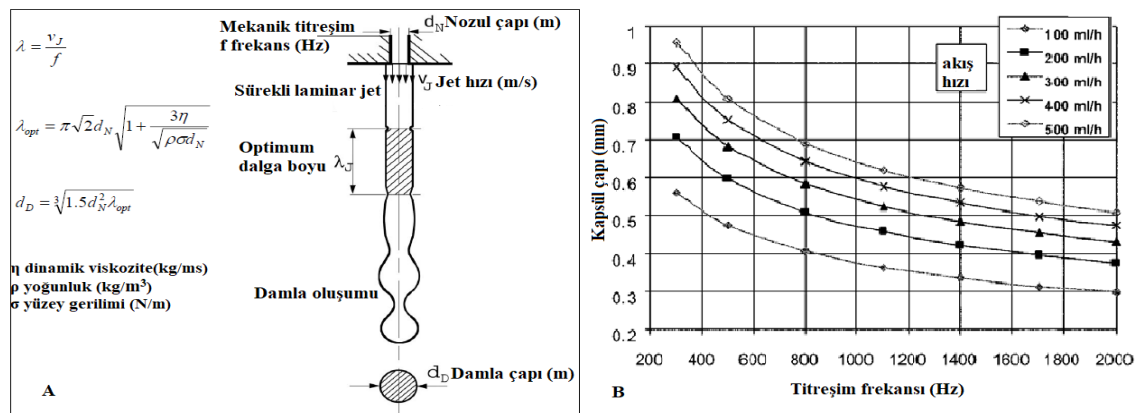
Süt proteinlerinden kazein temel olarak α_s -, β - ve κ - kazein olmak üzere farklı özelliklere sahip üç fraksiyondan oluşmaktadır. Söz konusu fraksiyonlar hidrofilik ve hidrofobik özellikler gösterebilmektedir. Kazein ile kazein tuzları olan sodyum kazeinat ve kalsiyum kazeinat gıda endüstrisinde küçük iyon ve molekülleri bağlayabilme, emülsiyon ve jelatin oluşturma, yüksek su bağlama kapasitesine sahip olma, yüzey aktif madde ve köpürtücü ajan olarak rol alma gibi özelliklerinin yanı sıra fonksiyonel özelliğe sahip bileşenlerin kapsülasyon işleminde de kullanılmaktadır (Ranadheera vd. 2016).

Sodyum kazeinatın *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19 (F19) ve *Bifidobacterium lactis* Bb12 (Bb12) probiyotik bakterilerinin kapsülasyonunda kullanıldığı bir çalışmada, % 15 oranında sodyum kazeinat içeren ve pH değeri 7.0'ye ayarlanmış çözeltilere F19 ve Bb12 bakterileri eklenmiştir. Elde edilen sodyum kazeinat-bakteri karışımlarına transglutaminaz enzimi ilave edildikten sonra emülsiyon tekniği kullanılarak mikrokapsüller üretilmiştir. Mikrokapsüllerin ortalama boyutlarının 165 ± 23 μ m olduğu ve kapsüllenen bakterilerin türünden etkilenmediği belirlenmiştir. Mide ortamının simülasyonu için F19 ve Bb12 bakterilerini içeren mikrokapsüller pH değerleri 2.5 ve 3.6'ya ayarlanmış çözeltiler içinde 37°C'de 90 dakika süresince tutulmuştur. pH değeri 2.5 ve 3.6 olan çözeltiler içerisinde 90 dakika tutulduktan sonra kapsülasyon işlemi uygulanmayan serbest haldeki F19 bakterisinin sayısının sırasıyla yaklaşık 5.0 ve 2.4 log kob/g azaldığı; kapsüle F19 bakterisinin sayısının ise sırasıyla yaklaşık 2.0 ve 1.8 log kob/g azaldığı saptanmıştır. Bb12 probiyotik bakterisinin F19'a göre düşük pH değerlerine daha dirençli olduğu ve sodyum kazeinatın probiyotik bakterileri düşük pH değerlerine karşı koruduğu tespit edilmiştir (Heidebach vd. 2009)

Protein ve aljinatın kapsül oluşturabilmesi, van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler, hidrojen ve iyonik bağlar gibi farklı kovalent olmayan moleküller arası etkileşimlerle olsa da temel etkileşim moleküller arasındaki elektrostatik çekimden meydana gelmektedir (Goh vd. 2014). Messaoud vd. (2015)'in sodyum aljinat (NaAlg) ve sodyum kazeinat (NaCas)'ı birlikte kullanarak ürettikleri mikrokapsüllerin farklı pH değerlerindeki davranışını araştırdıkları başka çalışmada, % 1.5 konsantrasyondaki NaAlg ve % 2.0 konsantrasyonundaki NaCas çözeltileri 1:0, 1:0.5, 1:1 ve 1:1.5 oranlarında karıştırılmış ve içerisine koşinil kırmızı boya eklenerek, 0.99 mm nozul çapına sahip şırınga ile % 1.0 CaCl_2 ve % 90 gliserol içeren sertleştirme çözeltisi içerisine damlatılmıştır. Elde edilen mikrokapsüller membran stabilitelerinin sağlanması için pH değeri 2.0, 3.0, 4.8 ve 7.0'ye ayarlanmış % 0.5 CaCl_2 çözeltisine aktarılmıştır. Mikrokapsüllerin boyutu ile membran kalınlığı ve pH değeri 2.0, 3.0, 4.8 ve 7.0'ye ayarlanmış su içerisinde koşinil kırmızı boyanın mikrokapsüllerden salınımı 6 saat süresince incelenmiştir. CaCl_2 çözeltisinin pH değeri düştükçe oluşan mikrokapsüllerin boyutlarının küçüldüğü saptanırken, 1:0, 1:0.5, 1:1 ve 1:1.5 oranlarında NaAlg:NaCas karışımı ile üretilen mikrokapsüllerin çaplarının pH 2.0'de sırasıyla 3.40, 3.25, 3.18 ve 3.24 mm iken, pH 7.0'de sırasıyla 4.30, 4.44, 4.45 ve 4.51 mm olduğu belirlenmiştir. Mikrokapsüllerin membran kalınlığının CaCl_2 çözeltisinin pH değerine bağlı olarak değiştiği ve pH değerinin 4.8'den 2.0'ye düşmesiyle birlikte farklı oranlardaki karışımla üretilen tüm mikrokapsüllerin membran kalınlığının azaldığı tespit edilmiştir. Koşinil kırmızı boyanın 1:0.5, 1:1 ve 1:1.5 NaAlg:NaCas karışımı ile üretilen mikrokapsüllerden salınım düzeylerinin pH değeri 2.0'ye ayarlanmış suda 6 saat sonunda sırasıyla ortalama % 17.6, 10.9 ve 5.2 olduğu saptanmış ve pH değeri 7.0'ye ayarlanmış su içinde tüm

mikrokapsüllerin 120 dakika sonunda tamamen çözündüğü belirlenmiştir. Mikrokapsüllerin yapımında kullanılan karışımda sodyum kazeinat oranının artmasıyla düşük pH değerlerinde koşinil kırmızı boyanın mikrokapsüllerden salınımının yavaşladığı değerlendirilmiştir.

İstenilen özelliklerde mikrokapsül üretmek için kaplama materyallerinin doğru seçilmesinin yanı sıra mikrokapsülasyon tekniğinin de seçimi önemlidir (Estevinho ve Rocha 2018). Ekstrüzyon, emülsiyon, püskürterek kurutma, püskürterek soğutma, dondurarak kurutma ve elektropüskürtme gibi teknikler mikrokapsülasyon işleminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Matos-Jr vd. 2019). Ekstrüzyon; düşük maliyeti, basitliği ve hücre canlılığını yüksek oranda korumasından dolayı en çok kullanılan mikrokapsülasyon tekniğidir. En basit şekliyle ekstrüzyon tekniği, aktif bileşen içeren çözeltinin bir şırınga yardımıyla sertleştirme çözeltisi içerisine damlatılması sonucu mikrokapsüllerin elde edilmesi olarak tanımlanmaktadır (Heidebach vd. 2012). Söz konusu yöntemde damlatma işleminin kontrol altında gerçekleştirilmesi “prilling” olarak adlandırılmaktadır. Kontrol, kapsülasyon işleminin yapıldığı cihaza frekans kaynağı, hava akışı, dönen disk ve elektrik alan gibi uygulamalar eklenmesi sonucunda jet atımı veya nozulun titreşimi ile sağlanmaktadır (Kailasapathy 2002; Martin vd. 2015). Nozul titreşiminin frekans kaynağı ile sağlandığı sistemlerin çalışma prensibi, ekstrüzyona tabi tutulan çözeltinin laminar jetin üst üste binen bir titreşimle eşit büyüklükteki damlalara ayrılmasına dayanmaktadır (Şekil 2.5 a) (Whelehan ve Marison 2011). Lord Rayleigh 19. yüzyılın sonlarında laminar sıvı jetinin damlalara parçalanmasına etki eden faktörleri incelemiş ve akıştaki maksimum kararsızlık (damlaların oluşumu için akış kararsızlığı gerekmektedir) için gerekli olan frekans değerinin genel olarak jet hızıyla ve nozul çapıyla ilgili olduğunu göstermiştir (Rayleigh 1897). Şekil 2.5 b’de farklı akış hızları için titreşim frekansının bir fonksiyonu olarak kapsül çapları Rayleigh’in formülleri esas alınarak hesaplanmış ve düşük akış hızları ile yüksek frekanslarda daha küçük kapsüller elde edilebildiği gösterilmiştir (Heinzen vd. 2004). Weber 1931 yılında damla oluşumunu için optimum dalga boyuna akışkanların viskozite özelliklerinin etkilerini incelemiş ve Rayleigh’in Newtonyan akışkanlar için geliştirdiği formüle viskozite değerini de eklemiştir. Söz konusu formülle damla oluşumu için gerekli optimum frekansın nozul çapı, akışkanın fizikokimyasal özellikleri ile akış hızına bağlı olduğunu ortaya konulmuştur (Serp vd. 2000).



Şekil 2.5. a, Damla oluşumu; b, titreşim frekansı ve akış hızının kapsül çapına etkisi (Heinzen vd. (2004)’den uyarlanmıştır.)

Stabil bir laminar sıvı jetinin oluşturulması için nozula beslenen çözeltinin akış hızı çözelti viskozitesi ve yüzey gerilimini yenecek kadar yüksek olmalıdır. Bununla birlikte, çok yüksek akış hızlarında sıvı jetinin parçalanması engellenebilmekte veya spreyci oluşumuna neden olabilmektedir. Ayrıca yüksek akış hızlarında damlalar sertleştirme çözelti içerisine düşerken daha fazla darbe alarak deformasyona uğramakta ve birleşik kapsüller oluşmaktadır. Elde edilecek kapsüllerin boyutu ve şekli titreşim frekansı ile değişebilmektedir. Yüksek frekans değerlerinde damlalar bir araya gelerek büyük kapsüllerin oluşmasına neden olmaktadır, düşük frekans değerlerinde ana kapsüle bağlı ve uydu adı verilen bir veya daha fazla küçük kapsül oluşumu gözlenebilmektedir (Whelehan ve Marison 2011).

Gaudio vd. (2005)'te nozul titreşimli kapsülator ile yaptıkları çalışmada sodyum aljinat konsantrasyonunun, viskozitesinin ve akış hızının kapsül özelliklerine olan etkisini incelemişlerdir. Nozul çapının 400 µm, titreşim frekansının 250 Hz ve akış hızının 10 mL/dakika olduğu koşullarda % 0.5-2.75 oranında hazırlanan sodyum aljinat çözeltileri 10, 15 ve 20 mL/dakika akış hızlarında sisteme beslenmiştir. Sodyum aljinat oranı % 0.85'den daha düşük olan çözeltilerle üretilen kapsüllerin ortalama çaplarının 1.0 mm'den küçük olduğu, % 0.85-2.5 oranında sodyum aljinat içeren çözeltilerle elde edilen kapsüllerin çaplarının ise yaklaşık 3.0 mm olduğu belirlenmiştir. Sodyum aljinat oranı % 2.5'dan daha yüksek olan çözeltiler ile belirlenen koşullarda laminar jetin sağlanamadığı ve kapsül üretiminin zorlaştığı saptanmıştır. Aynı çalışma koşulları altında 30 mPa'dan daha düşük viskozite değerlerine sahip sodyum aljinat çözeltileri ile 750 µm'den daha küçük çaplara sahip mikrokapsüller üretilmiştir. Ancak viskozite değerleri 40 ile 350 mPa arasında olan çözeltilerle 3.0-3.5 mm çapa sahip mikrokapsüller elde edilmiş ve yüksek viskoziteli çözeltilerde titreşim frekansı ile laminar jetin sağlanamadığı, akışın damlama şeklinde olduğu belirtilmiştir. Nozul çapının 400 µm, titreşim frekansının 250 Hz ve akış hızının 15 mL/dakika'ya çıkarıldığı koşullarda akışın laminar jetten damlama şekline geçmesi için gereken viskozite değerinin 68 mPa olduğu saptanırken, akış hızının 20 mL/dakika olduğu koşullarda tüm kapsüllerin laminar jetin parçalanmasıyla üretildiği tespit edilmiştir. Akış hızının artması ile aljinat çözeltisinin nozula adhezyonunun engellendiği ve laminar jet akışta değişikliğin olmadığı değerlendirilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada, titreşimli nozul tekniğine göre çalışan kapsülatorde farklı akış hızları (130-240 mL/saat), nozul çapları (50- 200 µm) ve frekans (2.9-4.0 kHz) değerleri ile farklı viskozite değerlerindeki (85 ve 200 mPa/s) sodyum aljinat çözeltileri kullanılarak fibroblast hücrelerini içeren mikrokapsüller üretilmiştir. Düşük viskoziteye sahip aljinat ve 120 µm çapa sahip nozul ile 130 mL/saat akış hızında 2.9, 3.0, 3.5 ve 4.0 kHz'de üretilen mikrokapsüllerin düzensiz şekilde oldukları belirlenmiş ve çapları hesaplanamamıştır. Düşük viskoziteye sahip aljinat ile 120 µm çapa sahip nozul kullanılarak sadece akış hızının 240 mL/saat'e çıkarılması ile 2.9 kHz frekansta 250 µm çapa sahip mikrokapsüller üretilirken, frekans değerlerinin 3.0, 3.5 ve 4.0 kHz olduğu koşullarda ortalama 300 µm çapa sahip düzenli mikrokapsüller elde edilmiştir. Belirtilen çalışma koşullarında yüksek viskoziteli aljinat kullanılarak üretilen mikrokapsüllerin düzensiz şekle sahip olmasından ve çaplarının düşük viskoziteli aljinat kullanılarak üretilen mikrokapsüllere göre büyük olmasından dolayı çalışmada optimum koşullar düşük viskozite değerine sahip aljinat kullanılarak belirlenmiştir. Çalışma sonunda 200-300 µm çapa sahip mikrokapsüller üretebilmek için optimum koşulların 240 mL/saat akış

hızı, 2.9 kHz frekans değeri ve 120 µm çapa sahip nozul olduğu tespit edilmiştir (Koch vd. 2010).

2.2.1. Bakteriyofajların mikrokapsülasyonu ve yapay sindirim sistemini sıvılarındaki davranışları

İnsan sindirim sistemi üzerine yapılan çalışmalar, insan sağlığı ile sindirim sisteminde bulunan mikrobiyota arasında sıkı bir ilişki olduğunu göstermektedir (Abeles ve Pride 2014). Sindirim sistemi mikrobiyotasını oluşturan bakteri içeriği bireye özgü olmakla birlikte beslenmeye, antibiyotik kullanımına, yaşa ve geçirilen hastalıklara göre değişmektedir. Son yıllarda mikroorganizma topluluklarının birlikte incelenmesi amacıyla yapılan metagenomik çalışmalar, insan sindirim sisteminde yaklaşık 10^{15} bakteriyofaj bulunduğunu, ayrıca bakteriyofajların insan sindirim sistemi mikrobiyotasını kontrol ettiğini ve şekillendirdiğini ortaya koymuştur (Dalmasso vd. 2014). Bu bağlamda, sindirim sistemi mikrobiyotasını düzenleyebilmesi ve antimikrobiyal etki gösterebilmesi için bakteriyofajların gıda ile birlikte alınmasının uygun olduğu değerlendirilmektedir (Samtlebe vd. 2016). 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 bakteriyofajın aktif olarak hedef bölgeye ulaşması ve vücudun savunma sistemi olan mononükleer fagositik sistem tarafından vücuttan uzaklaştırılmaması gerekmektedir (Singla vd. 2016). Bakteriyofajlar, ağız yoluyla vücuda alındıktan sonra gastrointestinal sistemden geçişleri süresince yüksek asitlik ile enzim ve safra salgısı gibi sindirim salgılarına maruz kalmakta ve aktivitelerini kaybetmektedir (Stanford vd. 2010).

Yapılan bir çalışmada, *Escherichia 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 dışkılarından, 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 duodenumunda $\sim 10^2$ pob/mL, iki farenin jejunumunda $\sim 10^2$ ve $\sim 10^4$ pob/mL düzeylerinde bakteriyofaj bulunduğu belirlenmiştir. Farelerin kör ve kalın bağırsaklarından alınan örneklerde bakteriyofaj titresinin ortalama 10^6 pob/g olduğu saptanmıştır. Farelerin mide pH'sının yaklaşık 3 düzeylerinde olduğu ve söz konusu durumun bakteriyofaj titresinin azalmasında önemli bir etken olduğu belirtilmiştir (Denou vd. 2009).

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 hayvan deneylerinde uygulanmıştır (Tanji vd. 2005, Jamalludeen vd. 2009). Son yıllarda yapılan *in vitro*

çalışmalar, mikrokapsülasyon yönteminin de bakteriyofajları olumsuz çevre koşullarına karşı korumada kullanılabileceğini göstermiştir (Ma vd. 2008, Tang vd. 2013).

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 çekercokta 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 çözündükleri 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 (Ma vd. 2008).

Dini vd. (2012) 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 metoksilli (HM) pektin ve % 0.2 guar gam içeren 0.5 M CaCl_2 sertleştirme çözeltilerine damlatılarak mikrokapsül elde edilmiş

ve mikrokapsüller 4°C’de 12 saat süresince sertleştirme çözeltilerinde 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 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 formda 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 formdaki 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 formda 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 CaCl₂ çözeltisine ekstrüzyon yöntemiyle damlatılıp bakteriyofaj içeren mikrokapsüller elde edilmiştir. Oluşan mikrokapsüller 30 dakika süresince 50 mM CaCl₂ 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 çekeroakta 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 mikrokapsüllerinin 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 formda 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 formdaki 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 salınımı 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 (Ma vd. 2012).

Tang vd. (2013) 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 μ m 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. İnkübasyon 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 vd. (2016) 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. Inkübasyon sonrası karışım, CaCl₂ eklendikten sonra ayçiçeği 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 formdaki 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 formda 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 formdaki 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 düzeylerinde 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 µm 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 çekeroçakta 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±16, 648±13, 880±80 ve 323±14 µm olduğu tespit edilmiştir. Mikrokapsülasyonda kullanılan kaplama materyali karışımlarının toplam konsantrasyonu arttıkça üretilen mikrokapsüllerin 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 10⁹ 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 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 çapının 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'nın mikrokapsüllerden salınımı incelenmiştir. B ve E karışımları kullanılarak üretilen mikrokapsüllerin simüle bağırsak çözeltisi içinde sırasıyla 75 ve 120 dakikada tamamen çözündükleri belirlenmiştir. A_K, B_K ve C_K mikrokapsüllerinin ise simüle bağırsak çözeltisi içinde sırasıyla 25, 100 ve 120 dakikada tamamen çözündükleri tespit edilmiştir (Tang vd. 2015).

2.2.2. Bakteriyofajların mikrokapsüllerden salınımının matematik modellenmesi

Mikrokapsüllenen aktif maddenin salınımının kontrolünde matematiksel modelleme önemli bir konudur. Mikrokapsüllenen aktif bir maddenin sürekli salınımı, kapsülün şekil ve boyut gibi geometrik özellikleri ile aktif maddenin yükleme oranı gibi değişkenlere göre farklılık göstermektedir (Lu vd. 1996). Aktif bir maddenin mikrokapsülden salınım profili, mikrokapsülün özelliklerine etki eden değişkenlerle ilgili en az sayıda deneysel veri ile sistematik bir yaklaşımın kullanıldığı matematiksel modelleme ile tahmin edilebilmektedir (Arifin vd. 2006). Organizma için gerekli olan aktif maddeyi belirlenen süre içerisinde kontrollü oranda salınımını sağlayarak hedef hücreye, dokuya veya organa ulaştıran sistemler "kontrollü salınım sistemleri" olarak adlandırılmaktadır (Harzadın 2015). Özellikle ilaç endüstrisinde herhangi bir aktif maddenin salınımının matematiksel modellenmesiyle söz konusu aktif maddenin vücutta salınım hızı, zamanı ve yeri kontrol edilerek verimliliğinin artırılması ve aktivitesinin korunması amaçlanmaktadır. İlaç salınımı, kullanılan ilacın ve kaplama materyalinin kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlı olarak difüzyon kontrollü ilaç salınımı, şişme

kontrollü ilaç salınımı ve erozyon kontrollü ilaç salınımı olarak üç temel mekanizmaya göre gerçekleşmektedir. Difüzyon kontrollü sistemlerde; ilaç, kaplama materyali ile çevrelenen bir çekirdek görünümündedir. İlaç salınımı kaplama materyalinden Fick difüzyon kurallarına göre gerçekleşmektedir. Şişme kontrollü sistemde ilaç salınımı kaplama materyalinin ortamdaki sıvı ile şişip, bütünlüğünün bozulmasından kaynaklanmaktadır. Erozyon kontrollü ilaç salınımı; madde taşınımı, ilacın çözülmesi, kaplama materyalinin bozunması, ortam koşullarının değişmesi (pH, sıcaklık vb), kaplama materyalinden difüzyon veya kaplama materyalinde gözenek oluşumu ile gerçekleşebilmektedir. Kontrollü ilaç salınım sistemlerinde ilaç salınımı, söz konusu mekanizmalardan sadece birine veya birkaçına göre olabilmektedir (Uzun 2011, Öncel 2013). İlaç salınımının modellenmesi için yaygın olarak kullanılan eşitlikler, sıfırıncı dereceden kinetik model, birinci dereceden kinetik model, Higuchi, Baker-Lonsdale, Hixon-Crowell ve Peppas modelleridir. Sıfırıncı dereceden kinetik model " $F=kt$ " eşitliği ile ifade edilmektedir. Sıfırıncı dereceden model için, F ; t zaman içinde mikrokapsülden salınan ilaç miktarını, k ; salınım sabitini belirtmektedir. Sıfırıncı dereceden modele göre ilaç salınım yüzdesi değerleri (X) ve zaman değerleri (Y) kullanılarak bir dağılım grafiği çizildiğinde doğru elde edilmektedir. Söz konusu modele uyan sistemlerde salınan ilaç miktarı birim zamanda değişmemektedir. İlaç endüstrisinde sıfırıncı dereceden kinetik model, şekli bozulmayan (zamanla yüzey alanı değişmeyen ve denge koşulları sağlanamayan) ve ilacı yavaş salan sistemler için kullanılmaktadır. Birinci dereceden kinetik model " $F=100x(1-e^{-kt})$ " eşitliği kullanılarak ifade edilmektedir (Costa ve Lobo 2001, Dash vd. 2010). Higuchi modeli, " $F=kt^{1/2}$ " eşitliği ile ifade edilmekle birlikte genelde suda çözünebilir veya düşük çözünürlüğe sahip ilaçların düzlemsel sistemlerden salınımı için türetilmiş olsa da farklı geometrik yapıya sahip sistemlerde de uygulanabilmektedir. Baker ve Lonsdale 1974 yılında Higuchi modelini küresel şekile sahip matriksten ilaç salınımını göz önüne alarak tekrar düzenlemiş ve " $3/2[1-(1-F)^{2/3}]-F=kt$ " eşitliğini elde etmişlerdir. Baker-Lonsdale modeli olarak adlandırılan bu model, mikrokapsül ve mikrokürelerden ilaç salınımının doğrusallaştırılması için kullanılmaktadır (Lu vd. 1996, Teresa 2012). Hixon-Crowell modeli, " $1-(1-F)^{1/3}=kt$ " eşitliği ile ifade edilmekte ve ilaç endüstrisinde çözünme hızı limitli ve salınım süresince şeklinde büyük bir değişim meydana gelmeyen sistemler için kullanılmaktadır. Söz konusu model tabletler gibi çözünmenin yüzeye paralel gerçekleştiği ve geometrik şekli bozulmadan tüm yüzeyin orantılı bir şekilde küçülüp homojen bir şekilde erozyona uğradığı sistemlerde iyi sonuç vermektedir (Uzun 2011). İlaç salınım mekanizmasının tam olarak bilinmediği veya birden fazla salınım mekanizmasının geçerli olduğu durumlarda kullanılan Peppas modeli " $F=kt^n$ " eşitliği ile ifade edilmektedir. Eşitlikteki k ve n değerleri sırasıyla, difüzyon katsayısını ve ilaç salınım mekanizmasını belirten salınım üstelini göstermektedir. Küresel sistemler için $n=0.43$ değeri, salınımın Fick difüzyonuna (Durum I) uyduğunu ve ilaç salınımının difüzyon kontrollü olduğunu; n değerinin 0.85 olması, Durum II difüzyonunu tanımlamakta ve ilaç salınımının şişme kontrollü gerçekleştiğini belirtmektedir. n değerinin $0.43 < n < 0.85$ arasında bir değer alması Durum I ve Durum II difüzyonlarının bir karışımını ifade etmekte ve Durum I difüzyonuna uymayan (anormal geçiş) olarak adlandırılmaktadır. $n > 0.85$ ise Özel Durum II olarak tanımlanmaktadır (Peppas ve Sahlin 1989, Öncel 2013). Ağız yoluyla vücuda alındığı zaman midede irritasyonlara neden olan İndomethasin (IND) ilacının zararlı etkilerini azaltmak ve kan seviyesinde görülen dalgalanmaları engellemek için kontrollü salınım sisteminin geliştirilmesinin amaçlandığı bir çalışmada, sodyum aljinat (NaAlg) ve N-vinil piroolidon (N-VP) polimerleri kullanılarak hazırlanan kaplama materyali 1/1,

$\frac{1}{2}$ ve $\frac{1}{4}$ oranlarında IND ile karıştırıldıktan sonra 80 mL/saat akış hızında, 5 cm yükseklikten değişik miktarlarda glutraldehit (% 0.25-0.75) ve HCl (% 0.5-3.0) içeren çapraz bağlayıcı çözelti içine damlatılarak mikrokapsül üretilmiştir. Hazırlanan mikrokapsüllerde ilaç/polimer oranı, çapraz bağlayıcının karakteristikleri gibi özelliklerin IND salınımı üzerine etkileri araştırılmıştır. Mikrokapsüllerden ilaç salınımı için 50 mg mikrokapsül, mide sıvısını temsil eden pH 1.2 HCl çözeltisi içine konulmuş ve 37°C'de 2 saat süresince tutulmuştur. Mikrokapsüller daha sonra pH 7.4 değerindeki fosfat tamponu içinde 37°C'de 4 saat bekletilerek her 30 dakikada bir ortamdan örnek alınmış, 265 nm dalga boyunda UV spektrofotometresinde mikrokapsüllerden salınan IND miktarı belirlenmiş ve % salınım değerleri hesaplanmıştır. Çalışmada; IND'nin mikrokapsüllerden salınımının sıfırcı dereceden, birinci dereceden ve Peppas eşitliklerine uygunluğu da incelenmiştir. Hazırlanan mikrokapsüllerden ilaç salınımının ilaç/polimer oranının ve çapraz bağlama çözeltisi içindeki HCl miktarının artmasıyla azaldığı belirlenmiştir. Mikrokapsüllerden ilaç salınımının ortamın pH'sından etkilendiği ve pH değeri arttıkça ilaç salınımının arttığı saptanırken, elde edilen mikrokapsüllerin bağırsakta salınım yapabilen sistemler olduğu tespit edilmiştir. İlaç/polimer oranı $\frac{1}{4}$ olan ve 0.50 glutraldehit+ 0.50 HCl çapraz bağlayıcı çözeltisi içinde hazırlanan NaAlg-N-VP mikrokapsüllerinden IND salınımının 6 saat sonunda en yüksek olduğu (% 77) belirlenmiştir. IND'nin mikrokapsüllerden salınım davranışlarının Fick difüzyonuna uymadığı, genellikle Durum II'ye uyduğu ve n değerlerinin 0.61 ile 0.96 arasında değiştiği saptanmıştır (İnal 2007).

Yapılan bir çalışmada, tümör hücrelerinin gelişiminin engellenmesinde kullanılan 5-flurourasil (5-FU) ilacının insan vücudunda maruz kalabileceği olumsuz etkilerden korunması amaçlanmıştır. 5-FU ilacı 0.5, 1.0 ve 5.0 mg/mL olacak şekilde 2:1 oranında kitosan (0.75 mg/mL) ve tripolifosfat (0.5 mg/mL) içeren karışıma eklenmiş ve iyonik jelasyon tekniği ile nanokapsüller üretilmiştir. Üretilen nanokapsüllerin partikül boyutları, yükleme verimlilikleri, pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 ve 7.4'te selüloz membran tüpten 37°C'de 408 saat süresince salınım davranışları ve salınımın sıfırcı dereceden, birinci dereceden, Higuchi, Hixon-Crowell, Peppas ve Kopcha modellerine uygunluğu araştırılmıştır. 5-FU ilacını 0.5, 1.0 ve 5.0 mg/mL konsantrasyonlarında içeren nanokapsüllerin partikül boyutlarının sırasıyla 243.1 ± 17.9 , 86.9 ± 1.4 ve 69.1 ± 1.0 nm olduğu saptanırken, yükleme verimliliklerinin sırasıyla % 69.7 ± 0.3 , 31.2 ± 0.9 ve 29.98 ± 0.80 olduğu belirlenmiştir. İlaç salınımının ilk 6 saatte yüksek (% 12.7-21.2) olduğu ve söz konusu durumun nanokapsüllerin yüzeyine adsorbe olan 5-FU'nun daha kolay difüze olmasından kaynaklandığı değerlendirilmiştir. pH 3.0, 5.0 ve 7.4'te 408 saat sonunda 5-FU'nun nanokapsüllerden salınım oranlarının sırasıyla % 29.1, 60.8 ve 34.1 olduğu tespit edilmiştir. Ortamının pH değerinden bağımsız olarak 5-FU salınımının en fazla Higuchi modeline uygunluk ($R^2=0.92-0.96$) gösterdiği belirlenmiştir. Peppas eşitliğindeki n değerinin 0.28 ile 0.34 arasında değiştiği ve tüm pH değerleri için 5-FU salınımının Fick difüzyonuna uyduğu tespit edilmiştir (Aydın ve Pulat 2012).

Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamız, bakteriyofajın mikrokapsülasyonunda kullanılan sodyum aljinat ve sodyum kazeinat karışım oranları ile mikrokapsülasyon uygulamasındaki işlem değişkenlerinden olan titreşim frekansının optimize edilmesini, optimum koşullarda üretilen mikrokapsüle bakteriyofajların çalışmanın model gıdası olan yoğurdun üretiminde kullanılmasını, yapay mide sıvısında mikrokapsüllerin

koruyucu etkisinin belirlenmesini ve yapay bağırsak sıvısında bakteriyofajların mikrokapsüllerden salınımının matematiksel modellemesini kapsamaktadır.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan bakteriyofaj Felix O1 (DSM 18524) ve DSMZ (Almanya Mikroorganizmalar ve Hücre Kültürü Koleksiyonu)'de belirtildiği üzere konakçı bakterisi *Salmonella enterica* subps. *enterica* (DSM 18522) DSMZ'den temin edilmiştir. Yoğurt starter kültürü (CH-1 Yo-Flex) Chr. Hansen's Laboratorium Danimarka Ltd.'nin Türkiye temsilcisi Peyma Sanayi ve Ticaret A.Ş. İstanbul'dan satın alınmıştır. Yoğurt örneklerinin üretimi Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Sodyum aljinat, sodyum kazeinat, pepsin ve pankreatin Sigma Aldrich Co. (St. Louis, ABD) firmasından, inek sütü ise yerel marketten satın alınmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Mikrobiyolojik analizler

3.2.1.1. *Salmonella enterica* subps. *enterica* DSM18522'nin gelişim eğrisinin oluşturulması

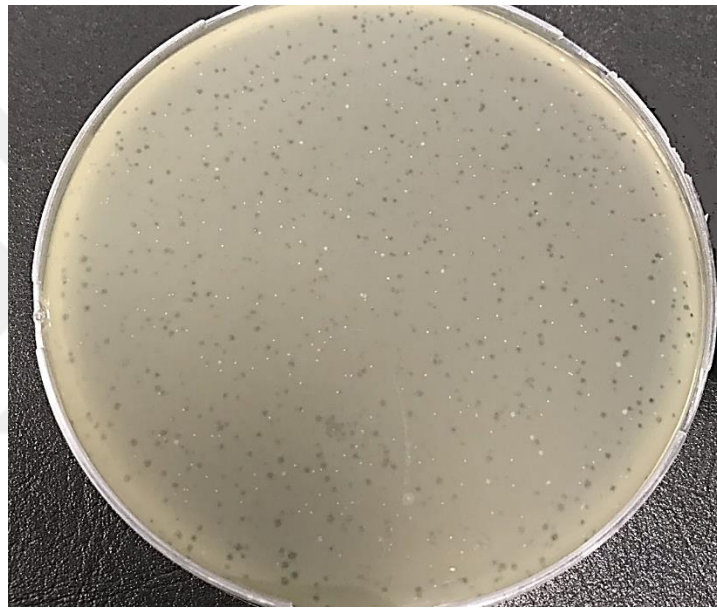
Çalışmamızda kullandığımız orjinal ampülündeki *S. enterica* subps. *enterica* DSM 18522, kullanım talimatına uygun olarak TS (Tryptik soy) sıvı besiyeri içerisine inoküle edilip 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde karışım, santrifüj (5200 g, 5°C, 5 dk.) edilmiştir. Santrifüj sonrası santrifüj tüplerinde üstte kalan sıvı kısım döküldükten sonra çöken kısımların üzerine 5 mL Nutrient sıvı besiyeri-gliserin karışımı (0.8 g Nutrient sıvı besiyeri + 30 mL gliserin + 70 mL saf su) ilave edilerek mikrosantrifüj tüpüne (2.0 mL) 1.0 mL olacak şekilde koyularak sonraki analizlerde kullanılmak üzere -80°C'de depolanmıştır. Konakçı bakterinin gelişim eğrisinin oluşturulması için stok *S. enterica* subps. *enterica*, TS sıvı besiyeri içerisine inoküle edilip 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince birer saat aralıklarla örnek alınarak *S. enterica* subps. *enterica* sayımı yapılmıştır. Ayrıca *S. enterica* subps. *enterica* içeren TS sıvı besiyerinin optik yoğunluğunu belirlemek üzere 600 nm'de absorbans değeri ölçülmüştür. Elde edilen veriler ile *S. enterica* subps. *enterica*'nın gelişim eğrisi oluşturulmuştur (Ergin 2013).

3.2.1.2. Bakteriyofaj titresinin belirlenmesi

Faj titresinin plak oluşturma birimi (pob/mL) esas alınarak saptanmasında, çift tabaka TS agar yöntemi kullanılmıştır. Her birinde, 0.9 mL steril ringer çözeltisi bulunan mikrosantrifüj tüplerine (2.0 mL), aseptik koşullarda, faj süspansiyonlarından 0.1 mL aktarıldıktan sonra bu örneklerden 10⁻⁶ düzeyine kadar seyrelti dizisi hazırlanmıştır. *S. enterica* subps. *enterica* 9.0 mL TS sıvı besiyerlerine 1.0 mL olacak şekilde inoküle edilip, 37°C'de erken çoğalma evresine ulaşınca kadar inkübe edilmiştir. TS sıvı besiyerinde geliştirilen bakteriden 0.3 mL alınarak, uygun dilüsyondan alınan 0.1 mL bakteriyofaj ve 0.1 mL MgSO₄ ile karıştırılmıştır. Bakteriyofajın bakteriye adsorbsiyonu için 10 dk beklenip, 45°C'deki su banyosunda tutulan ve içerisinde 3.0 mL TS yumuşak agar bulunan test tüplerine (16 x 100 mm) aktarılmıştır. Tüpler kısa bir süre vorteksle karıştırıldıktan sonra, petri kutusunda daha önceden hazırlanan alt tabaka (katı agar)

üzerine dökülüp homojen bir şekilde yayılmıştır. Yumuşak agarın katılaşması için 5-10 dk beklenmiştir. Petri kutuları düz bir zeminde yaklaşık 30 dk bekletildikten sonra, 37°C’de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Son aşamada petri kutularında, faj uygulama bölgelerindeki lize plakları (berrak plaklar) incelenerek faj titreleri belirlenmiştir (Şekil 3.1).

Çift tabaka TS agar besiyeri hazırlanışı: Faj titresinin belirlenmesinde, alt tabaka agar (katı agar) besiyeri için, TS agar hazırlanıp 121°C’de 15 dk ısıtılarak sterilize edilmiş ve soğuduktan sonra petri kutularına dökülerek 25°C’de 18 saat tutulmuştur. Üst tabaka besiyeri (yumuşak agar), TS sıvı besiyerine Agar Agar ilave edildikten sonra 121°C’de 15 dk ısıtılarak sterilize edilmiş, 3.5 mL olacak şekilde analizde kullanılmak üzere test tüplerine (16 x 100 mm) aktarılmıştır (Sambrook vd. 2001).



Şekil 3.1. Felix O1 uygulama bölgelerindeki lize plakları

3.2.1.3. Bakteriyofajın aktifleştirilmesi ve çoğaltılması

Çalışmada kullanılan orijinal ampülündeki Felix O1 bakteriyofajı, kullanım talimatına uygun olarak 5 mM MgSO₄ içeren TS agar ve TS yumuşak agar kullanılarak aktif hale getirilmiştir. Felix O1 bakteriyofajının çoğaltılması için, içerisinde 3 mL TS yumuşak agar bulunan tüplerin içerisine 0.1 mL bakteriyofaj çözeltisi ve 0.3 mL 37°C’de erken çoğalma evresine ulaşmaya kadar inkübe edilmiş olan *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ilave edilmiş ve tüp içeriği, petri kutusundaki TS katı agar üzerine dökülüp homojen şekilde yayılmıştır. Yumuşak agar katılaştıktan sonra 37°C’de 18 saat süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra katı agar, üzerine 5 mL SM tampon çözeltisi (% 0.1 jelatin, 100 mM NaCl, 8.0 mM MgSO₄, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) ilave edildikten sonra 17°C’de 18 saat süresince inkübe edilmiştir. Petri kutusundaki sıvı, steril santrifüj tüpüne aktarılıp, santrifüj (13000 g, 4°C’de 5 dakika) edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı kısım, 0.22 µm gözenek çapına sahip filtreden geçirilip, diğer analizlerde kullanılmak üzere 4°C’de depolanmıştır (Anonymous 3).

3.2.2. Bakteriyofajların farklı pH değerlerine karşı direncinin tespiti

Felix O1 bakteriyofajının farklı pH değerlerindeki aktivitesini belirlemek için % 0.2 konsantrasyonda hazırlanan NaCl çözeltisinin pH değeri 1 M HCl asit ile 2.0, 2.5, 3.0, 5.0 ve 7.0'ye ayarlanmıştır. Önceden 37°C'ye ısıtılan farklı pH değerlerindeki NaCl çözeltisine, 10⁶ pob/mL olacak şekilde Felix O1 bakteriyofajı ilave edildikten sonra 60 dk süresince 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 5, 15, 30 ve 60. dakikalarında farklı pH değerlerindeki çözeltilerden örnek alınarak bakteriyofaj titresi belirlenmiştir (Dini vd. 2012).

3.2.3. Bakteriyofajın sodyum aljinat-sodyum kazeinat karışımı ile mikrokapsülasyonu

Bakteriyofajın sodyum aljinat-sodyum kazeinat karışımı ile mikrokapsülasyonu Messaoud vd (2015)'in uyguladıkları yöntem modifiye edilerek ekstrüzyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Mikrokapsülasyon uygulamalarında Nisco Var B Model (Nisco Eng. Inc. Zürih, İsviçre) elektrostatik titreşim ile ekstrüzyon/emülsiyon tipi kaplama işlemi yapabilen ve komple sterilize edilebilen mikroenkapsülatör sistemi kullanılmıştır (Şekil 3.2). Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan sodyum aljinat çözeltisi 121°C'de 15 dk ısıtım işlemi uygulandıktan sonra 25°C'ye soğutulmuştur. Sodyum kazeinatın distile su ile farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandıktan sonra 80°C'de 30 dk ısıtım işlemi uygulanmış ve 25°C'ye soğutulmuştur. Elde edilen karışım içerisine stok bakteriyofaj çözeltisinden faj titresi 10⁷-10⁸ pob/mL olacak şekilde ilave edildikten sonra başlangıç faj titresi belirlenmiştir. Hazırlanan karışım farklı titreşim frekanslarında 100 mM'lik CaCl₂ içerisine 25°C'de beslenmiştir. Oluşan kapsüller 30 dakika bekletilerek jelleşme tamamlanmıştır. Daha sonra kapsüller Whatman#4 filtre kağıdından süzölmüş ve analizlerde kullanılmak üzere steril kaplarda 4°C'de muhafaza edilmiştir. Mikrokapsül içindeki faj titresi, 0.1 g ıslak mikrokapsülün 0.9 mL açma çözeltisi [50 mM sodyum sitrat, 200 mM sodyum hidrojen karbonat ve 50 mM tris-HCl (pH 7.5)] içinde 60 dakikada çözöndürölmösesinden sonra belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Nisco Var B model mikrokapsülatör (Nisco Eng. Inc. Zürih, İsviçre)

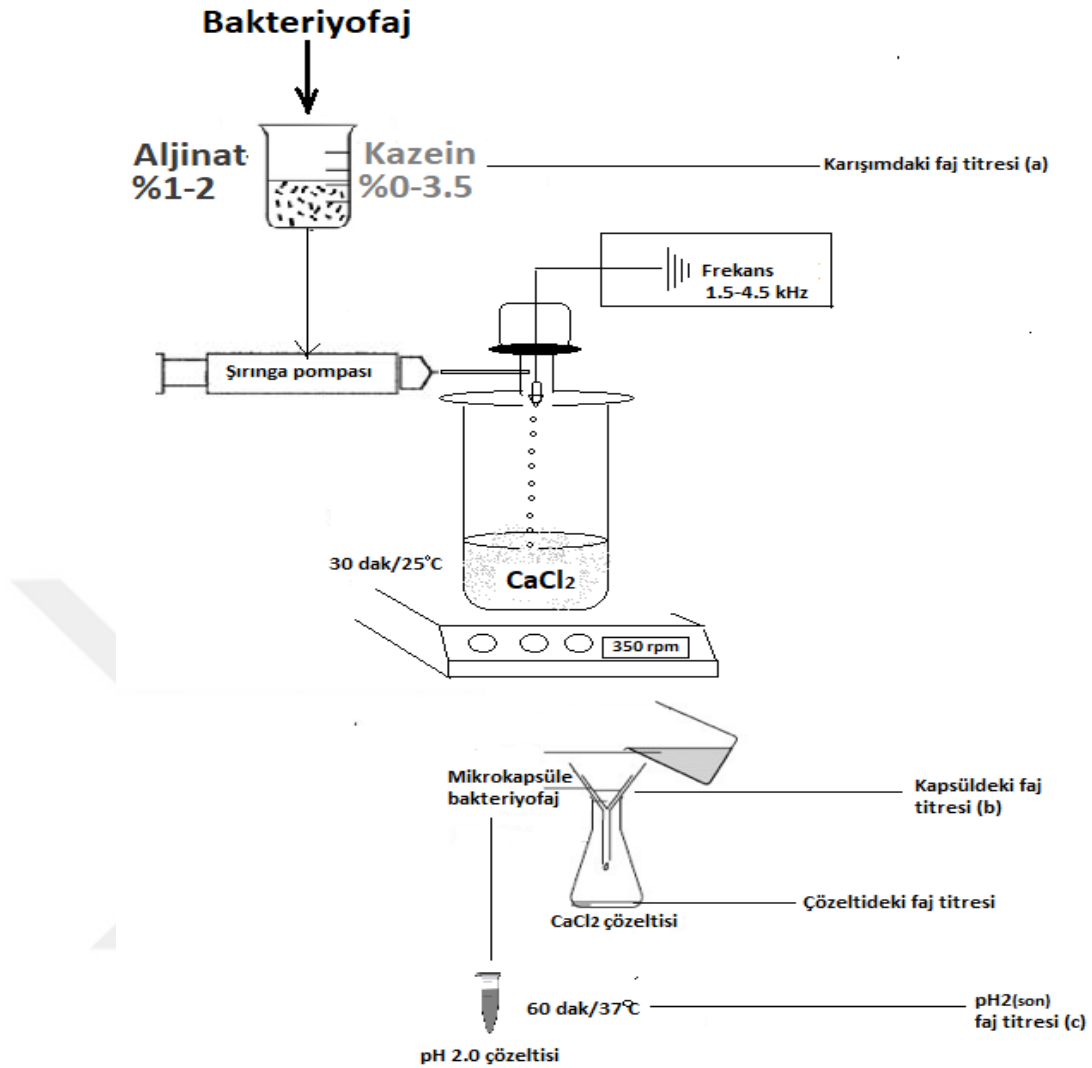
3.2.4. Mikrokapsülasyon uygulamasının optimizasyonu

Bakteriyofajların sodyum aljinat-sodyum kazeinat karışımları ile mikrokapsüllenmesinin optimizasyonunda Box-Behnken Cevap Yüzey Metodu kullanılmıştır. Bu yöntem ile mikrokapsülasyon uygulaması için kaplama materyallerinin karışım oranlarının ve mikrokapsülasyon cihazının titreşim frekansının değişmesinin, mikrokapsüllerin düşük pH'ya karşı dayanıklılığına, yükleme verimliliğine ve boyutuna olan etkileri tespit edilmiştir (Şekil 3.3). Mikrokapsülasyon uygulaması için 5'i belirlenen değerlerin orta noktası olmak üzere 17 desen denenmiş ve denenilen desenlerin cevaplarından düşük pH'ya karşı en dayanıklı, yükleme verimliliği en yüksek ve partikül boyutu en küçük olan 3 farklı mikrokapsülasyon uygulaması seçilmiştir (Çizelge 3.1). Optimizasyon cevabına göre seçilen işlem değişkenleri ile üretilen bakteriyofaj mikrokapsülleri yoğurt üretimi çalışmalarında kullanılmış ve ayrıca steril falkon tüpü (30 x 115 mm) içinde 30 gün süresince 4°C'de depolanmıştır. Mikrokapsüle bakteriyofajların yapay mide ve bağırsak sıvılarındaki davranışları depolamanın 1, 15 ve 30. günlerinde incelenmiştir.

Çizelge 3.1. Bakteriyofaj mikrokapsülasyonunda kullanılan Box-Behnken deneme deseni

No	Frekans (kHz)	Sodyum aljinat (%)	Sodyum kazeinat (%)
1	-1*	0**	-1
2	0	0	0
3	0	-1	-1
4	1***	0	1
5	-1	0	1
6	1	1	0
7	-1	1	0
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	1	1
12	0	1	-1
13	0	0	0
14	-1	-1	0
15	0	-1	1
16	1	-1	0
17	1	0	-1

(*: -1, uygulamada kullanılacak minimum değeri, ** 0, uygulamada kullanılacak orta değeri, *** 1, uygulamada kullanılacak maksimum değeri göstermektedir.)



Şekil 3.3. Mikrokapsül üretimi ve optimizasyonu

3.2.4.1. Sodyum aljinat ve sodyum kazeinat çözeltilerinin viskozite değerlerinin belirlenmesi

Box-Behnken Cevap Yüzey Metodu ile elde edilen 17 denemede kullanılan çözeltilerin viskozite değerleri Coghetto vd. (2016)'nın kullandığı yöntem modifiye edilerek Brookfield DV II+ viskozimetresi (Model DV II+Pro, Brookfield Engineering Laboratories Inc, Middleboro, MA, ABD) ile belirlenmiştir. Çözeltilerin viskozite ölçümü 25°C'de, 100 rpm hızda ve RV4 nolu spindil kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.2. Mikrokapsüllerin yükleme verimliliklerinin belirlenmesi

Mikrokapsüllerin yükleme verimlilikleri Tang vd. (2013)'ın kullandıkları formülle hesaplanmıştır. Mikrokapsüllenen bakteriyofaj titresi, kaplama materyali karışımına başlangıçta ilave edilen bakteriyofaj titresine bölünüp, 100 ile çarpılmıştır.

3.2.4.3. Mikrokapsüllerin pH 2.0'deki davranışlarının belirlenmesi

Mikrokapsüllerin pH 2.0'deki davranışları Dini vd. (2012)'in uyguladıkları yöntem modifiye edilerek incelenmiştir. Farklı kaplama materyalleri ile elde edilen bakteriyofaj mikrokapsülleri, 100 mg olacak miktarda tartılmış ve içerisinde 900 µL % 0.2 konsantrasyonda ve 1.0 M HCl asit ile pH değeri 2.0 ayarlanan NaCl çözeltisi bulunan mikrosantrifüj tüpüne (2.0 mL) eklenmiştir. Mikrokapsüller, önceden 37°C'ye ısıtılan pH 2.0 değerindeki NaCl çözeltisi içinde 60 dk süresince bekletilerek bakteriyofaj titresi belirlenmiştir.

3.2.4.4. Mikrokapsüllerin boyutlarının ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi

Mikrokapsüllerin boyut ve morfolojisi Samtlebe vd. (2016)'nın uyguladıkları yöntemle göre belirlenmiştir. Mikrokapsüllerin morfolojisi ve boyutunun belirlenmesinde floresan mikroskop (MCX300, MICROS Produktions und HandelsgesmbH. Veit/Glan, Avusturya) kullanılmıştır. Mikrokapsüllerin mikroskop altındaki görüntüleri dijital fotoğraf makinesi (EOS 450D, Canon Inc., Tokyo, Japonya) ile elde edilmiştir. Mikrokapsüllerin çevre uzunlukları, Image J1 (National Institutes of Health, Maryland, ABD) programı ile hesaplanmıştır.

3.2.5. Mikrokapsülle bakteriyofajların yapay mide ve bağırsak sıvılarındaki stabilitesi

Yapay mide ve bağırsak sıvıları Samtlebe vd. (2016)'nın uyguladıkları yöntemle göre hazırlanmıştır. Buna göre yapay mide ortamı için % 0.2 oranında NaCl ve 80 mM HCl içeren çözelti içerisine 3.2 mg/mL olacak şekilde pepsin enzimi ilave edilmiş ve çözeltinin pH değeri 0.5 M NaOH ile 2.0'ye ayarlanmıştır. Mikrokapsül ve yoğurt örneklerinden 1 g tartılarak daha önceden 37°C'ye ısıtılmış 9 mL yapay mide sıvısına ilave edilmiş ve 0., 60. ve 120. dakikalarda örneklerdeki mikrokapsüller açma çözeltisi ile açılarak bakteriyofaj titresi belirlenmiştir. Yapay bağırsak ortamı için 10 mg/mL pankreatin enzimi içeren ve önceden 37°C'ye ısıtılmış 9 mL 0.1 mM sodyum fosfat tampon (6.8 pH) içerisine 1 g mikrokapsül ve yoğurt örneklerinden tartılmış, 0. 30. 60. 90. ve 120. dakikalarda bakteriyofaj titresi tespit edilmiştir.

3.2.6. Bakteriyofaj salınımının matematiksel modellenmesi

Optimizasyon cevabına göre seçilen işlem değişkenleri kullanılarak üretilen mikrokapsüle bakteriyofajlar ve mikrokapsüle bakteriyofajları içeren yoğurtlar, depolamanın 1., 15. ve 30. günlerinde yapay bağırsak sıvısı içerisinde bakteriyofaj titresi belirlenmiş ve bakteriyofaj salınımının matematiksel modellere uygunluğu incelenmiştir. Verilerin birinci dereceden kinetik model, Higuchi, Hixon-Crowell, Peppas ve Baker-Lonsdale modellerine uyumluluğu araştırılarak bakteriyofaj salınımının hangi modele daha fazla uygunluk gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 3.2). Bakteriyofaj salınımının modellenmesi için Sigmaplot 12 (SYSTAT Software GmbH Erkrath, Almanya) programı kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Bakteriyofaj salınımının matematiksel modellenmesinde kullanılan formüller

Matematiksel modeller	Formüller
Birinci dereceden kinetik model	$F=100x(1-e^{-kt})$
Higuchi modeli	$F=kt^{1/2}$
Baker ve Lonsdale modeli	$3/2[1-(1-F)^{2/3}]-F=kt$
Hixon-Crowell modeli	$1-(1-F)^{1/3}=kt$
Korsmeyer-Peppas modeli	$F=kt^n$

t; zaman, F; t zaman içinde mikrokapsülden salınan ilaç miktarını, k; salınım sabitini, n; salınım üstelini belirtmektedir.

3.2.7. Yoğurt üretimi ve analizleri

Kurumadde miktarı (% 15.0) standardize edilen yağsız (% 0.01 yağ) süt, 90°C’de 10 dakika ısıtılma tabi tutulduktan sonra 42°C’ye soğutulmuştur. Soğutulan süt, yoğurt starter kültüründen % 2.0 (w/v) oranında aşılansarak 42°C’de pH değeri yaklaşık 4.6’ya ulaşınca kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda yoğurdun sıcaklığı 20°C’ye düşürülüp pıhtısı parçalanmıştır. Mikrokapsüle ve serbest formdaki bakteriyofaj, 10^6 - 10^7 pob/g olacak şekilde yoğurt örneklerine eklenmiştir. Ayrıca bakteriyofaj eklemesi yapılmaksızın da yoğurt üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen yoğurtlar 4°C’ye soğutulmuş ve 30 gün süresince depolanmıştır. Yoğurt örnekleri depolamanın 1, 15 ve 30. günlerinde yapay mide ve bağırsak sıvılarına tabi tutulmadan önce bakteriyofaj titresi ile yoğurt bakterilerinin canlılıkları incelenmiştir. Yoğurt üretimlerinde kullanılan sütlerin toplam kurumadde içeriği (%) gravimetrik yöntem (TSE 1994) ile, yağ içeriği (%) Gerber metodu (TSE 1995) ile, kül içeriği (%) ise gravimetrik yöntem (Kurt vd. 1993) ile tespit edilmiştir. Süt örneklerinin pH değerleri Thermo Scientific Orion 2 Star marka pH metre (Thermo Fisher Scientific GmbH., Bremen, Almanya) kullanılarak, protein içeriği (%) Kjeldahl metodu ile, titrasyon asitliği ise % laktik asit cinsinden belirlenmiştir (Kurt vd. 1993). Yoğurt örneklerinin toplam kurumadde içerikleri (%) Uluslararası Sütçülük Federasyonu (IDF)’nin bildirdiği referans metoda göre gravimetrik yöntem (IDF 1987) ile, protein içeriği (%) Kjeldahl metodu (IDF 1986) ile, yağ içeriği (%) Gerber metodu (Oysun 1991) ile viskozite değerleri Brookfield DV II+ viskozimetre (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Middleboro, ABD) ile Shihata ve Shah (2002)’nin belirttiği yöntemle göre, sertlik özellikleri TA-XT2 tekstür analiz cihazı (Stable Micro Systems Ltd., Surrey, Birleşik Krallık) kullanılarak (Haq ve vd. 2001) depolamanın 1. gününde belirlenmiştir. Tüm yoğurt örneklerinin pH değerleri Thermo Scientific Orion 2 Star marka pH metre kullanılarak, titrasyon asitliği (%) IDF’nin bildirdiği referans metot (IDF 1991) ile depolamanın 1., 15. ve 30. günlerinde tespit edilmiştir.

- Yoğurt bakterilerinin sayımı

Streptococcus thermophilus sayımında % 1.0 laktoz ilave edilmiş M17 agar besiyeri olarak kullanılmıştır. Uygun dilüsyonların her birinden M17 agar besiyerine dökme plak yöntemi ile ekim yapılmış ve petri kutuları 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (IDF 2003). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sayımı için pH değeri 6.5’e ayarlanmış MRS agar besiyeri kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan dökme

plak yöntemi ile ekim yapılan petri kutuları anaerobik ortamda 37°C’de 72 saat süreyle inkübe edilmiştir (IDF 2003).

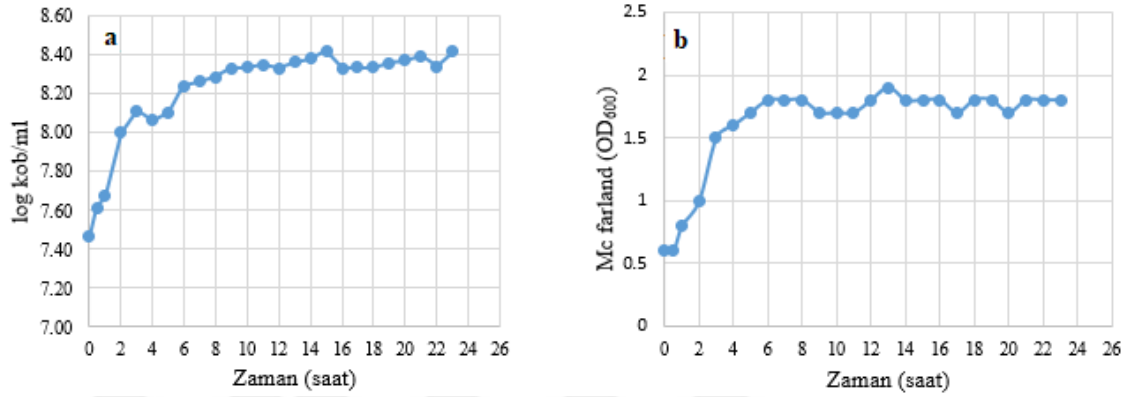
3.2.8. İstatistik analizleri

Bakteriyofajların mikrokapsülasyon için gerekli parametrelerinin optimizasyonu DesignExpert 8.0.7.1 Analiz Programı (Trial version, State-Ease Inc. Minneapolis, ABD) ile cevap yüzey yönteminin Box-Behnken tasarımı kullanılarak belirlenmiştir. Box-Behnken ile elde edilen denemelerde kullanılan kaplama çözeltilerinin mikrokapsüllerin çevre uzunlukları üzerine etkilerini incelemek amacıyla SPSS (Statistical Package for the Social Science) paket programı (Version 23.0, IBM Inc., New York, ABD) kullanılarak pearson korelasyon ilişki analizi yapılmıştır. Araştırma 2 tekerrürlü yapılmış olup, analizler paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Araştırma sonunda yoğurt örneklerine ait sonuçlar varyans analizine tabi tutulmuş ve farklı bulunan sonuçlar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile karşılaştırılmıştır (Düzgüneş vd. 1987).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *Salmonella enterica* subps. *enterica* DSM18522'nin gelişim eğrisi

Salmonella enterica subps. *enterica* DSM18522'nin 37°C'de 24 saat süresince mikrobiyolojik sayım ve optik yoğunluk (OD₆₀₀) değerlerinin tespiti ile oluşturulan gelişim eğrileri sırasıyla Şekil 4.1 a ve Şekil 4.1 b'de verilmiştir.



Şekil 4.1. a; *S. enterica* subps. *enterica* DSM18522'nin mikrobiyolojik sayım sonuçları ile oluşturulan gelişim eğrisi, b; optik yoğunluk (OD₆₀₀) değerlerinin ölçülmesi ile oluşturulan gelişim eğrisi

Bakteriyofaj titresinin belirlenmesinde kullanılmak üzere *S. enterica* subps. *enterica* DSM18522'in erken çoğalma evresinde alınması gerekmektedir. Erken çoğalma evresi olarak *S. enterica* subps. *enterica* DSM18522 sayısının 8.00 log kob/mL ve OD₆₀₀ değerinin 1.0 olduğu 2. saatin uygun olduğu değerlendirilmiştir.

4.2. Bakteriyofajın farklı pH değerlerine karşı direnci

Felix O1 bakteriyofajının farklı pH değerlerindeki çözeltiler içerisindeki titreleri Çizelge 4.1'de görülmektedir. pH değeri 2.0'ye ayarlanan çözelti içerisinde Felix O1 titresinin 5. dakikadan sonra 2.00 log pob/g'ın altına düştüğü ve Felix O1'in pH 2.0'ye direnç gösteremediği saptanmıştır. pH 2.5 ve üzerindeki değerlerin ise 60 dk süresince Felix O1 bakteriyofajı için ölümcül etki oluşturmadığı saptanmıştır.

Çizelge 4.1. Farklı pH değerlerindeki çözeltiler içinde Felix O1 bakteriyofajının titreleri (log pob/mL)

Süre (dk)	pH 2.0	pH 2.5	pH 3.0	pH 5.0
5	3.52±0.03	7.24±0.01	7.24±0.03	7.37±0.04
15	T.E	7.27±0.04	7.21±0.03	7.41±0.04
30	T.E	7.29±0.01	7.23±0.01	7.41±0.03
60	T.E	7.26±0.02	7.33±0.04	7.39±0.01

T.E: Tespit edilemedi. Felix O1 titresi 2.00 log pob/g ve üzeri değerlerde tespit edilebilmektedir.

Felix O1'in farklı pH değerlerine direncinin incelendiği başka bir çalışmada, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde 10 dk sonunda Felix O1 titresinin belirlenemediği, pH 2.5 olan çözelti içerisinde ise 6 saat sonunda Felix O1 aktivitesinin olmadığı

belirlenmiştir (Vinner ve Malik 2018). Çalışmamızda pH değeri 2.0 olan çözelti için belirlenen Felix O1 titresinin söz konusu çalışma ile uyumlu olduğu saptanmıştır.

4.3. Mikrokapsülasyon uygulamasının optimizasyonu

Felix O1 bakteriyofajının mikrokapsülasyonunun optimizasyonunda kullanılan sodyum aljinat ve sodyum kazeinat oranları yapılan ön denemeler ile literatür bilgileri doğrultusunda sırasıyla % 1.0-2.0 ve % 0-3.5 aralığında belirlenirken, frekans değeri aralığı 1.5-4.5 kHz olarak saptanmıştır (Çizelge 4.2). Mikrokapsül üretimi optimizasyonu uygulamasında, mikrokapsül verimliliği, pH 2.0'de Felix O1 sayısındaki azalma oranı ve mikrokapsül boyutu cevap olarak kullanılmıştır.

Çizelge 4.2. Felix O1 bakteriyofajının mikrokapsülasyonunda kullanılan Box-Behnken deneme deseni

No	Frekans (kHz)	Sodyum aljinat (%)	Sodyum kazeinat (%)
1	1.50	1.50	0.00
2	3.00	1.50	1.75
3	3.00	1.00	0.00
4	4.50	1.50	3.50
5	1.50	1.50	3.50
6	4.50	2.00	1.75
7	1.50	2.00	1.75
8	3.00	1.50	1.75
9	3.00	1.50	1.75
10	3.00	1.50	1.75
11	3.00	2.00	3.50
12	3.00	2.00	0.00
13	3.00	1.50	1.75
14	1.50	1.00	1.75
15	3.00	1.00	3.50
16	4.50	1.00	1.75
17	4.50	1.50	0.00

Analizlerde elde edilen mikrokapsül verimliliği, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip ve mikrokapsül boyutu sonuçları kullanılarak cevapların her biri için belirlenen en uyumlu modelin regresyon eşitlikleri (a) cevap yüzey metodu ile oluşturulmuştur.

$$MV/MAO/MÇU = \beta_0 + \beta_1 F + \beta_2 A + \beta_3 K + \beta_4 FA + \beta_5 FK + \beta_6 AK + \beta_7 F^2 + \beta_8 A^2 + \beta_9 K^2 + h \dots (a)$$

Bu eşitlikte;

MV: Mikrokapsül verimliliğini (%), MAO: pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranını (%), MÇU: Mikrokapsül çevre uzunluğunu (mm), A: Sodyum aljinat oranını (%) , K: Sodyum kazeinat oranını (%), F: Frekans (kHz), β_0 : Keşif değeri, $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5, \beta_6, \beta_7, \beta_8, \beta_9$: Bağımsız değişkenlerin katsayı değerlerini ve h: Hatayı ifade etmektedir.

Modellerin istatistiki önem düzeyi % 95 güven aralığında F-değeri ($p < 0.05$) ile ölçülmüş ve modelin değerlendirmesinde model uyumsuzluğu, saf hata, varyasyon katsayısı (CV), tahmini hataların karelerinin toplamı (PRESS), regresyon katsayısı (R^2), düzeltilmiş regresyon katsayısı ($R^2_{döl}$), tahmini belirleme katsayısı ($Pred-R^2$) ve yeterli kesinlik parametreleri kullanılmıştır.

4.3.1.1. Mikrokapsüllerin yükleme verimlilikleri

Farklı koşullar altında Box-Behnken (BB) deneme planı izlenerek üretilen mikrokapsüllerin verimlilik değerleri Çizelge 4.3'te verilmiştir. Mikrokapsülasyon verimliliğinin % 77.47 ile 98.06 arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. BB deneme desenine göre hazırlanan mikrokapsüllerin verimlilik değerleri

No	Frekans (kHz)	Sodyum aljinat (%)	Sodyum kazeinat (%)	Kaplama çözeltisindeki Felix O1 titresi (log pob/g)	Mikrokapsüldeki Felix O1 titresi (log pob/g)	Verimlilik (%)
1	1.50	1.50	0.00	7.27±0.05	6.90±0.03	94.89±1.12
2	3.00	1.50	1.75	7.34±0.28	6.59±0.50	89.82±3.41
3	3.00	1.00	0.00	8.07±0.00	6.90±0.09	85.51±1.10
4	4.50	1.50	3.50	7.37±0.10	7.22±0.04	98.06±1.81
5	1.50	1.50	3.50	7.37±0.10	7.08±0.02	96.12±1.50
6	4.50	2.00	1.75	7.03±0.06	6.36±0.03	90.45±0.36
7	1.50	2.00	1.75	7.03±0.06	6.57±0.03	93.46±0.42
8	3.00	1.50	1.75	7.19±0.25	6.59±0.42	91.60±2.63
9	3.00	1.50	1.75	7.42±0.11	6.54±0.24	88.10±1.95
10	3.00	1.50	1.75	7.51±0.18	6.59±0.25	87.70±1.18
11	3.00	2.00	3.50	8.07±0.01	7.73±0.01	95.74±0.02
12	3.00	2.00	0.00	7.97±0.06	6.87±0.01	86.20±0.53
13	3.00	1.50	1.75	7.28±0.00	6.56±0.13	90.11±1.82
14	1.50	1.00	1.75	7.92±0.01	6.73±0.04	84.93±0.42
15	3.00	1.00	3.50	8.25±0.01	6.39±0.01	77.47±0.01
16	4.50	1.00	1.75	7.27±0.04	6.82±0.01	93.79±0.67
17	4.50	1.50	0.00	7.53±0.25	6.87±0.21	91.20±0.17

Çizelge 4.4'te verilen ANOVA analizi sonuçlarına göre, mikrokapsül verimliliğinin model ile uyumlu olduğu ($p < 0.05$), model uyumsuzluğunun hiçbir parametre üzerinde istatistiki açıdan önemli olmadığı ($p > 0.05$) gözlenmiştir. Ayrıca, mikrokapsül verimliliği üzerine sodyum aljinat oranı ile sodyum aljinat ve sodyum kazeinat oranı etkisinin istatistiksel açıdan önemli ($p < 0.05$) olduğu belirlenmiştir. Model denkleminin yeterli kesinliğinin göstergesi olan sinyal gürültü oranı mikrokapsülasyon verimliliği için 9.21 olarak belirlenmiş ve değerin 4'ün üzerinde olması model denkleminin yeterli olduğunu göstermiştir. Önerilen model denkleminin R^2 ve $R^2_{döl}$ değerleri sırasıyla 0.89 ve 0.75 olarak tespit edilmiştir. Söz konusu değerlerin 1'e yakın olması sonuç denklemlerin deneysel verileri temsil etmede başarılı olduğu anlamını taşımaktadır.

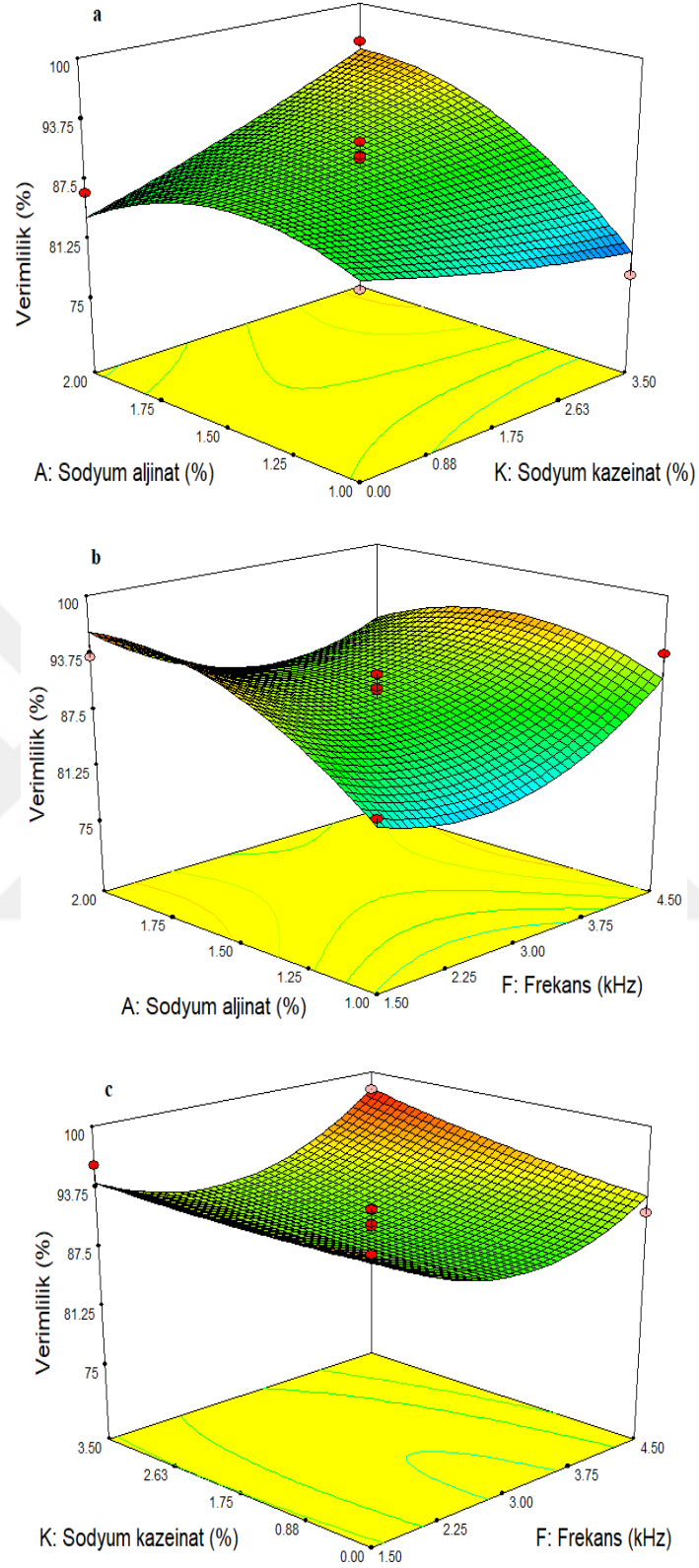
Çizelge 4.4. Mikro kapsül verimlilik değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu ve mikrokapsülasyon verimliliği için model uygunluğunun test edilebilmesi için kullanılan istatistiki veriler

Varyasyon kaynakları	SD	HKT	p değeri
Model (Kuadratik)	9	367.77	0.01*
F	1	2.10	0.59
A	1	72.91	0.01*
K	1	11.50	0.23
FA	1	35.19	0.05
FK	1	7.91	0.31
AK	1	77.21	0.01*
F ²	1	105.52	0.01*
A ²	1	61.72	0.02*
K ²	1	1.41	0.66
Kalıntı	7	46.28	
Model Uyumsuzluğu	3	36.44	0.08
Saf Hata	4	9.85	
Toplam	16	414.06	
Model Kuadratik	R ² 0.89	R ² _{dzl} 0.75	Pred-R ² 0.45
		CV % 2.85	PRESS 598.36
			Yeterli kesinlik 9.21

*p < 0.05 seviyesinde istatistiki açıdan önemli

F: Frekans, A: Sodyum aljinat, K: Sodyum kazeinat, SD: Serbestlik derecesi, HKT: Hata Kareler Toplamı, R²_{dzl}: Düzeltilmiş R²

Mikrokapsül verimliliği için istatistiksel açıdan önemli varyasyon kaynakları kullanılarak $MV = +89.48 + 3.02A + 4.39AK + 5.01F^2 - 3.83A^2$ ikinci dereceden polinomiyal model eşitliği elde edilmiştir. İşlem değişkenlerinin mikrokapsülasyon verimliliği değerleri üzerindeki etkilerinin gözlemlenebilmesi için elde edilen modeller kullanılarak yanıt yüzey grafikleri ve eş yükselti eğrileri oluşturulmuştur. Bu grafiklerin oluşturulabilmesi için işlem değişkenlerinden herhangi biri deneysel tasarımın merkez noktasında sabit tutulmuş, diğer iki değişkenin sonsuz sayıdaki kombinasyonları çıkarılmıştır. Şekil 4.2’de mikrokapsülasyon etkinliği üzerinde etkili ve etkisiz olan faktörlere ait yanıt yüzey grafikleri ve eş yükselti eğrileri yer almaktadır. Mikrokapsül üretimi sırasında çözeltideki sodyum aljinat ve sodyum kazeinat oranının artması ile birlikte mikrokapsül verimliliğinin arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2.a). Frekans değerinin 1.5 ve 4.5 kHz olduğu noktalardaki mikrokapsülasyon verimliliğinin 3.0 kHz olduğu noktaya göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2.b-c).



Şekil 4.2 a: Sabit frekans değerinde (3.0 kHz) sodyum aljinat ve sodyum kazeinat oranının mikrokapsül verimliliği üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu, b: Sabit sodyum kazeinat oranında (% 1.75) sodyum aljinat oranı ile frekans değerinin mikrokapsül verimliliği üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu, c: Sabit sodyum aljinat oranında (% 1.50) sodyum kazeinat oranı ile frekans değerinin mikrokapsül verimliliği üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu

Team 1 *Staphylococcus aureus* bakteriyofajının % 1.0'lik sodyum aljinat çözeltisiyle makro ve mikro kapsülasyonunun yapıldığı bir çalışmada kapsüllerin yükleme verimlilikleri sırasıyla % 99 ve 45 olarak tespit edilmiş ve verimlilik değerleri arasındaki farkın mikrokapsüllerin yüzey alanının makrokapsüllerden büyük olmasından kaynaklandığı değerlendirilmiştir (El Haddad vd. 2018). Ekstrüzyon yöntemiyle T4 bakteriyofajının % 2.0'lik sodyum aljinat çözeltisiyle kapsüllendiği başka bir çalışmada ortalama 2.9 mm çaplı makrokapsüller elde edilmiş ve kapsülasyon verimliliği % 98.37 olarak saptanmıştır (Sliwka vd. 2019). Titreşim frekansının 2.0 kHz, nozul çapının 80 µm ve elektrot voltajının 950 V olduğu koşullarda % 1.6'lık sodyum aljinat çözeltisi ile hazırlanan nisin mikrokapsüllerinin ortalama çaplarının 118 µm olduğu; verimliliklerinin ise % 71 ile 76 arasında değiştiği belirlenmiştir. Çalışmamız sonucunda bulduğumuz değerler genel olarak diğer çalışmalarla uyumlu olmakla birlikte, farklılıkların kullanılan kaplama çözeltisinin özelliklerinden ve kapsülasyon üretim tekniğinden kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir.

4.3.1.2. Mikrokapsüle Felix O1'in pH 2.0'deki davranışları

BB deneme desenine göre üretilmiş olan 17 farklı mikrokapsülün içerdiği Felix O1'in titreleri mikrokapsüller pH 2.0'a maruz bırakılmadan önce ve 60 dk maruz bırakıldıktan sonra belirlenerek, % azalma oranları hesaplanmıştır. Çizelge 4.5 incelendiğinde, sodyum kazeinat içermeyen kaplama çözeltileri ile hazırlanan mikrokapsüllerin pH 2.0 çözeltisi içerisinde Felix O1'i koruyamadığı saptanmıştır.

Çizelge 4.5. BB deneme desenine göre hazırlanan ve pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1 titresi ve azalma oranı

No	Frekans (kHz)	Sodyum aljinat (%)	Sodyum kazeinat (%)	Mikrokapsüldeki Felix O1 titresi (log pob/g)	pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1 titresi (log pob/g)	Felix O1 titresindeki azalma oranı (%)
1	1.50	1.50	0.00	6.90±0.03	T.E	*>71.15
2	3.00	1.50	1.75	6.59±0.50	4.84±0.65	25.59±5.45
3	3.00	1.00	0.00	6.90±0.09	T.E	>71.15
4	4.50	1.50	3.50	7.22±0.04	5.98±0.11	17.29±1.96
5	1.50	1.50	3.50	7.08±0.02	6.10±0.07	13.88±1.20
6	4.50	2.00	1.75	6.36±0.03	5.74±0.03	9.71±0.90
7	1.50	2.00	1.75	6.57±0.03	5.15±0.04	21.62±0.27
8	3.00	1.50	1.75	6.59±0.42	4.88±0.30	25.87±9.10
9	3.00	1.50	1.75	6.54±0.24	5.03±0.25	23.64±1.10
10	3.00	1.50	1.75	6.59±0.25	5.47±0.57	16.92±5.59
11	3.00	2.00	3.50	7.73±0.01	6.51±0.03	15.76±0.57
12	3.00	2.00	0.00	6.87±0.01	T.E	>71.03
13	3.00	1.50	1.75	6.56±0.13	5.41±0.03	17.59±2.18
14	1.50	1.00	1.75	6.73±0.04	5.39±0.07	19.92±0.56
15	3.00	1.00	3.50	6.39±0.01	5.39±0.07	15.68±1.05
16	4.50	1.00	1.75	6.82±0.01	5.59±0.05	18.02±0.54
17	4.50	1.50	0.00	6.87±0.21	T.E	>71.03

T.E: Tespit edilemedi. Felix O1 titresi 2.00 log pob/g ve üzeri değerlerde tespit edilebilmektedir.

* pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1'in azalma oranı değerleri Felix O1'in tespit edilebilme değerine göre hesaplanmıştır.

pH 2.0'a maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1'in azalma oranı değerleri üzerine en etkili işlem değişkeninin sodyum kazeinat oranı ($p < 0.05$) olduğu saptanmıştır. Ayrıca ANOVA analizi sonuçlarına göre, pH 2.0'a maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1'in azalma oranı değerlerinin sodyum kazein oranının karesinden de istatistiki açıdan önemli ($p < 0.05$) şekilde etkilendiği belirlenmiştir. Model ile istatistiki açıdan uyumlu olduğu belirlenen Felix O1'in azalma oranı değerleri BB deneme deseninin diğer değişkenleri olan frekans ve sodyum aljinat oranından etkilenmemiştir (Çizelge 4.6). Önerilen model denkleminin R^2 ve $R^2_{döl}$ değerleri sırasıyla 0.99 ve 0.99 olarak tespit edilmesi model denkleminin deneysel verileri temsil etmede başarılı olduğunu göstermektedir. Pred- R^2 , bağımsız değişken değerleri için model denkleminin bağımlı değişken değerlerini çeşitlendirebilme yeteneğini ifade etmekte ve $R^2_{döl}$ değeri ile birbirlerine yakın olması (farkın 0.2'den az) beklenmektedir (Yoğurtçu 2018). Elde ettiğimiz sonuçlarla önerilen model denklemlerinin başarı düzeyinin oldukça iyi olduğu ortaya konmuştur.

Çizelge 4.6. pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1'in azalma oranları üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu ve mikrokapsülasyon verimliliği için model uygunluğunun test edilebilmesi için kullanılan istatistiki veriler

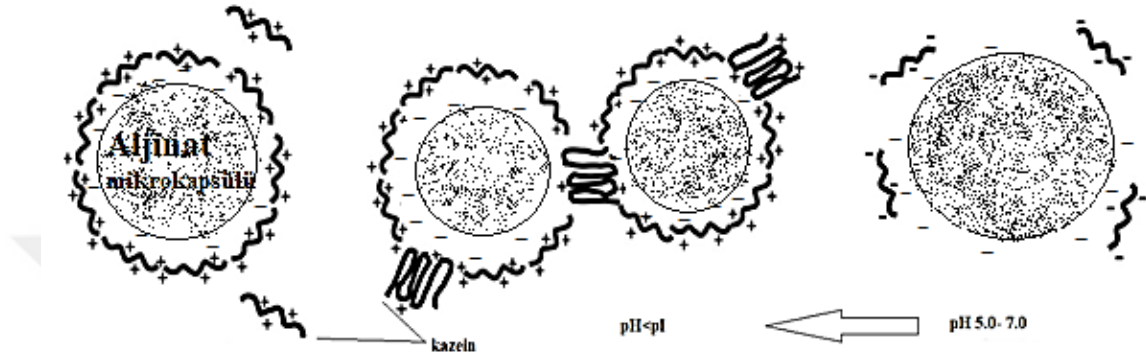
Varyasyon kaynakları	SD	HKT	p değeri
Model (Kuatratik)	9	20423.12	0.00*
F	1	13.52	0.40
A	1	5.33	0.59
K	1	14229.00	0.00*
FA	1	25.05	0.26
FK	1	2.91	0.69
AK	1	0.0016	0.99
F ²	1	22.96	0.28
A ²	1	21.65	0.30
K ²	1	6146.56	0.00*
Kalıntı	7	118.48	
Model Uyumsuzluğu	3	42.67	0.58
Saf Hata	4	75.81	
Toplam	16	20541.61	
Model	R^2	$R^2_{döl}$	Pred- R^2
Kuatratik	0.99	0.99	0.96
		CV %	PRESS
		11.08	796.00
			Yeterli kesinlik
			28.49

* $p < 0.05$ seviyesinde istatistiki açıdan önemli

F: Frekans, A: Sodyum aljinat, K: Sodyum kazeinat, SD: Serbestlik derecesi, HKT: Hata Kareler Toplamı

Sodyum kazeinat ile % 2.0 sodyum aljinat çözeltisinin 0.1 M CaCl₂ çözeltisi içerisine aerosol tekniğiyle püskürtülmesiyle üretilen kalsiyum aljinat mikrokapsüllerinin (20-80 µm) arasındaki elektrostatik ilişkiyi ortaya koyan bir çalışmada, sodyum kazeinat çözeltisinin, kalsiyum aljinat mikrokapsüllerinin ve sodyum kazeinat çözeltisi içerisindeki kalsiyum aljinat mikrokapsüllerinin farklı pH değerlerindeki (3, 4, 5, 6 ve 7) zeta potansiyel ve isoelektrik (pI) değerleri belirlenmiştir. Sodyum kazeinat çözeltisinin zeta potansiyel değerinin pH 3.0 ve 7.0'de sırasıyla 31.92 ile -38.73 mV; pI değerinin 4.1 olduğu belirlenmiştir. Sodyum kazeinat çözeltisi içerisindeki kalsiyum aljinat

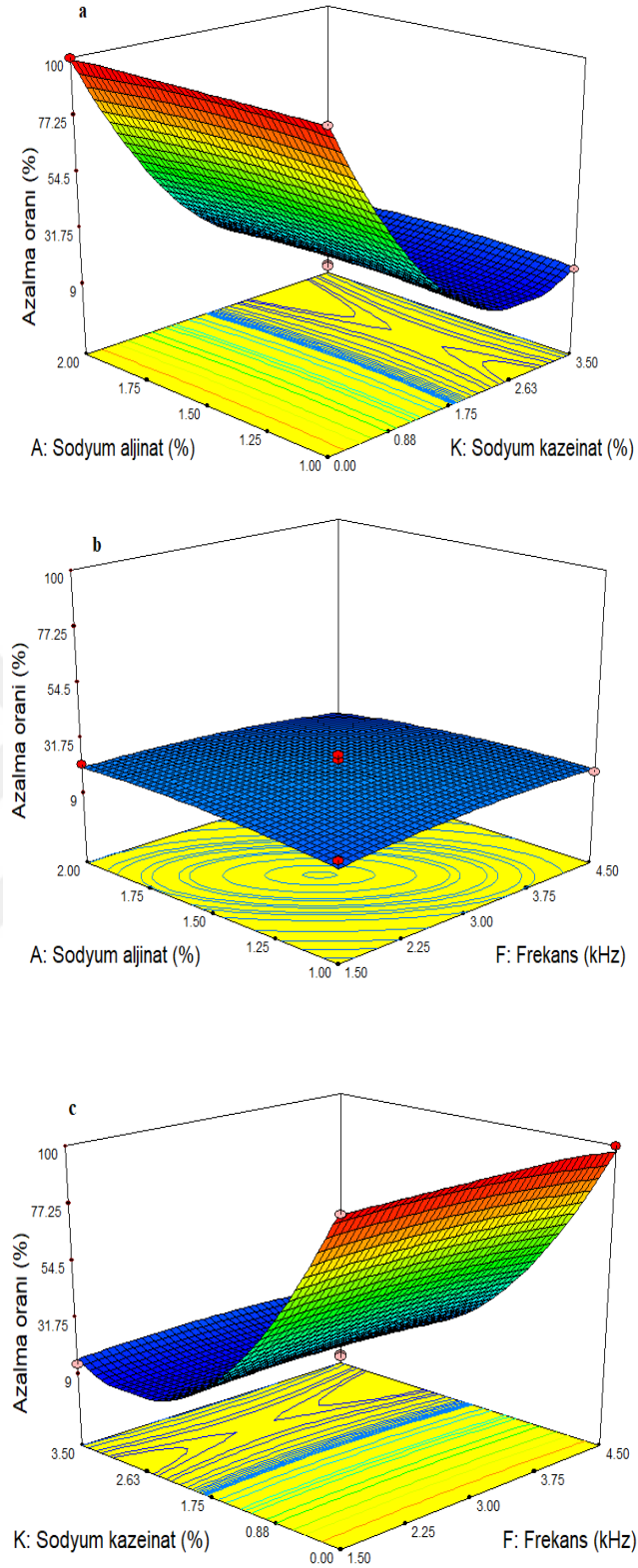
mikrokapsüllerinin pH 3.0'deki zeta potansiyel değerinin 23.80 mV olduğu ve pI'nın altındaki pH değerlerinde zeta potansiyelinin düşmesinin protein yapısında bulunan amin ($-\text{NH}_3^+$) gruplarıyla polisakkaritlerin karboksil ($-\text{CO}_2^-$) gruplarının birleşmesine bağlı olduğu ve pI'nın altındaki pH değerlerinde stabilitenin bu yolla sağlandığı değerlendirilmiştir (Şekil 4.3). Konfokal lazer taramalı mikroskop ile yapılan görüntüleme analizinde kalsiyum aljinat mikrokapsüllerinin yüzeyindeki por büyüklüklerinin sodyum kazeinat ile kaplandığı için küçüldüğü ve mikrokapsüllerin koruma gücünün arttığı belirlenmiştir (Ching vd. 2015).



Şekil 4.3. Farklı pH değerlerinde sodyum kazeinat-kalsiyum aljinat mikrokapsüllerinin yapısı (Ching vd. (2015)'ten uyarlanmıştır.)

pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1'in azalma oranı değerleri için regresyon analizi sonucunda elde edilen ikinci dereceden polinomiyal model, istatistiki açıdan önemsiz değişkenlerin çıkarılmasıyla indirgenmiş değerler üzerinden $\text{MAO}=21.92-42.17K+38.21K^2$ olarak verilmiştir. Felix O1'in azalma oranı değerleri üzerine etkili ve etkisiz olan faktörlere ait yanıt yüzey grafikleri ve eş yükselti eğrileri incelendiğinde, kaplama çözeltisi içindeki sodyum kazeinat oranının azalmasıyla birlikte pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1'in azalma oranının arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.4).

Ma vd. (2008) % 2.2 oranında sodyum aljinat kullanarak ürettikleri mikrokapsülleri kitosan ve treheloz ile kaplayarak pH değeri 2.0 ve 2.4'e ayarlanmış mide ortamı içinde 37°C'de 120 dakika süresince inkübe etmiştir. 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 dk sonunda bakteriyofaj tespit edilememiştir. Kaplama çözeltisi olarak pektin ve sodyum aljinat kullanılan diğer bir çalışmada, bakteriyofajı düşük pH'ya karşı korumada, en yüksek koruma düzeyine sahip mikrokapsüllerin yapımında pektin emülsiyonu kullanılanlar olduğu; en düşük koruma özelliğine sahip olanların ise sadece aljinat emülsiyonu ile üretilen mikrokapsüller olduğu tespit edilmiştir (Dini vd. 2012). Çalışmamız sonuçlarının belirtilen çalışmalarla uyum içinde olduğu görülmektedir.



Şekil 4.4. a: Sabit frekans değerinde (3.0 kHz) sodyum aljinat ve sodyum kazeinat oranının pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1'in azalma oranı üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu, b: Sabit sodyum kazeinat oranında (% 1.75) sodyum aljinat oranı ile frekans pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1'in azalma oranı üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu, c: Sabit sodyum aljinat oranında (% 1.50) sodyum kazeinat oranı ile frekans değerinin pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1'in azalma oranı üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu

4.3.1.3. Mikrokapsüllerin boyutları

BB deneme desenine göre elde edilen mikrokapsüllerin çevre uzunlukları Image J programı ile ölçülmüş ve sonuçlar Çizelge 4.7’de gösterilmiştir. En büyük çevre uzunluğu (2.57 ± 0.19 mm) % 2.0 oranında sodyum aljinat ile % 3.5 oranında sodyum kazeinat içeren kaplama çözeltisiyle hazırlanan mikrokapsüllerde (No 11) belirlenmiştir.

Çizelge 4.7. BB deneme desenine göre hazırlanan mikrokapsüllerin çevre uzunluğu değerleri

No	Frekans (kHz)	Sodyum aljinat (%)	Sodyum kazeinat (%)	Mikrokapsüllerin çevre uzunluğu (mm)
1	1.50	1.50	0.00	0.23 ± 0.06
2	3.00	1.50	1.75	0.24 ± 0.09
3	3.00	1.00	0.00	0.25 ± 0.09
4	4.50	1.50	3.50	0.26 ± 0.07
5	1.50	1.50	3.50	0.27 ± 0.08
6	4.50	2.00	1.75	0.22 ± 0.08
7	1.50	2.00	1.75	0.21 ± 0.08
8	3.00	1.50	1.75	0.25 ± 0.09
9	3.00	1.50	1.75	0.25 ± 0.08
10	3.00	1.50	1.75	0.24 ± 0.09
11	3.00	2.00	3.50	2.57 ± 0.19
12	3.00	2.00	0.00	0.15 ± 0.04
13	3.00	1.50	1.75	0.32 ± 0.12
14	1.50	1.00	1.75	0.23 ± 0.09
15	3.00	1.00	3.50	0.30 ± 0.17
16	4.50	1.00	1.75	0.24 ± 0.08
17	4.50	1.50	0.00	0.20 ± 0.06

Çalışmamızda optimizasyon uygulamasındaki bağımlı değişkenlerden biri olan en küçük boyuta sahip olan mikrokapsülün üretilmesi için ANOVA analizi gerçekleştirilmiş, ancak mikrokapsüllerin çevre uzunluğu sonuçları ile model arasında uyumsuzluk ($p > 0.05$) belirlenirken, model uyumsuzluğunun da mikrokapsüllerin çevre uzunlukları üzerine etkisinin istatistiki açıdan önemli ($p < 0.05$) olduğu saptanmıştır. Söz konusu nedenden dolayı en büyük çevre uzunluğuna sahip mikrokapsül deneme deseninden çıkartılarak tekrar ANOVA analizi gerçekleştirilmiştir. BB deneme deseninden 11 No’lu denemenin çıkartılması ile elde edilen ANOVA analiz sonuçları Çizelge 4.8’de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde verilen mikrokapsüllerin çevre uzunlukları üzerine kaplama çözeltisindeki sodyum kazeinat oranının istatistiki açıdan önemli ($p < 0.05$) etkisi olduğu tespit edilmiştir.

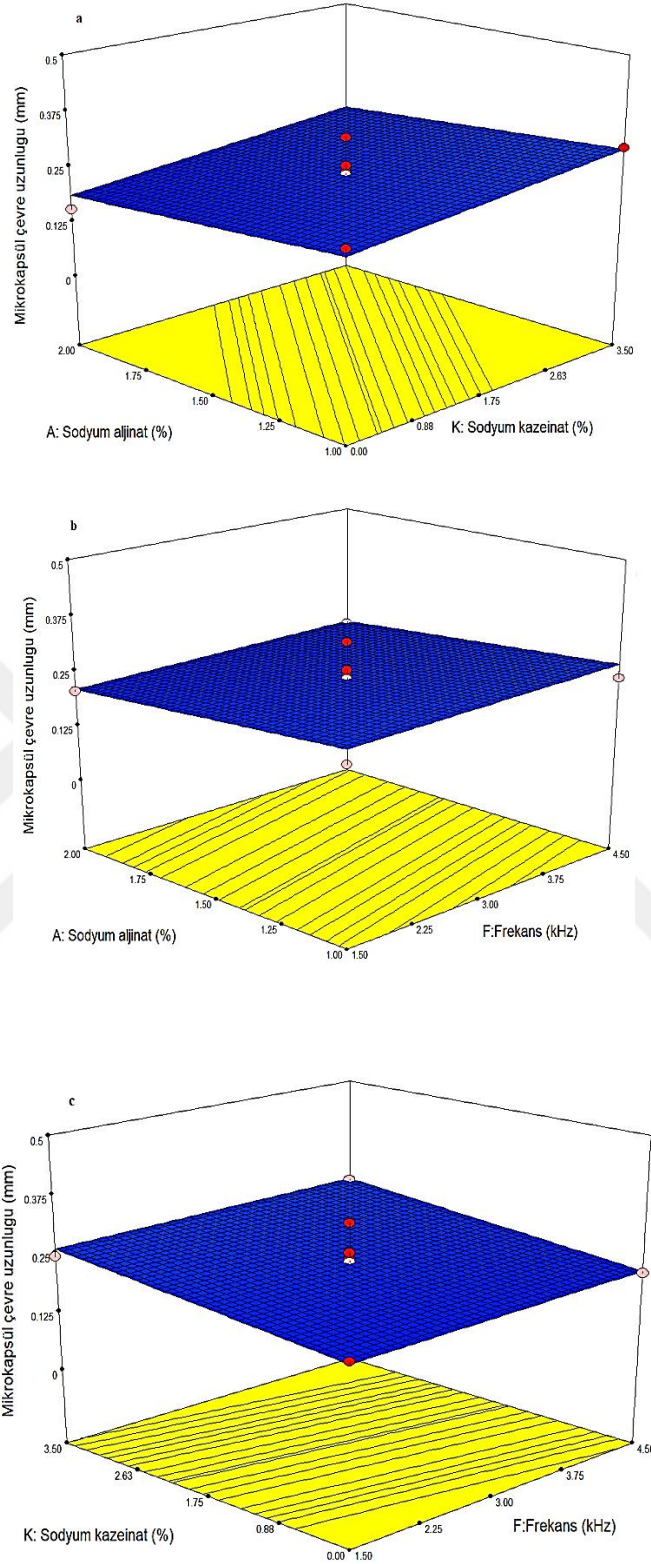
Çizelge 4.8. Mikrokapsüllerin çevre uzunluğu değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu ve mikrokapsüllerin çevre uzunluğu için model uygunluğunun test edilebilmesi için kullanılan istatistiki veriler

Varyasyon kaynakları	SD	HKT	p değeri
Model (Lineer)	3	0.011	0.03*
F	1	0.003	0.60
A	1	0.004	0.06
K	1	0.006	0.02*
Kalıntı	12	0.010	
Model Uyumsuzluğu	8	0.004	0.72
Saf Hata	4	0.022	
Toplam	15	20541.61	
Model	R^2	$R^2_{döl}$	Pred- R^2
Lineer	0.53	0.41	0.28
			CV %
			12.24
			PRESS
			0.015
			Yeterli kesinlik
			7.166

* $p < 0.05$ seviyesinde istatistiki açıdan önemli

F: Frekans, A: Sodyum aljinat, K: Sodyum kazeinat, SD: Serbestlik derecesi, HKT: Hata Kareler Toplamı, $R^2_{döl}$: Düzeltilmiş R^2

Mikrokapsüllerin çevre uzunlukları için lineer regresyon analizi sonucunda elde edilen eşitlik istatistiki açıdan önemsiz değişkenlerin çıkarılmasıyla indirgenmiş değerler üzerinden $M\hat{C}U = 0.24 + 0.029K$ olarak verilmiştir. Çizelge 4.8’de verilen ANOVA analizi sonuçlarına göre, mikrokapsüllerin çevre uzunluklarının model ile uyumlu olduğu ($p < 0.05$), model uyumsuzluğunun hiçbir parametre üzerinde istatistiki açıdan önemli olmadığı ($p > 0.05$) gözlenmiştir. Bununla birlikte, modellerin deneysel verileri ne ölçüde karşıladığını belirten regresyon katsayısı (R^2) ve düzeltilmiş regresyon katsayısı ($R^2_{döl}$) değerlerinin sırasıyla 0.53 ve 0.41 olduğu belirlenmiştir. Mikrokapsüllerin çevre uzunlukları değerleri üzerine etkili ve etkisiz olan faktörlere ait yanıt yüzey grafikleri ve eş yükselti eğrileri Şekil 4.5’te sunulmuştur. Kaplama çözeltisindeki sodyum kazeinat miktarı ile mikrokapsülasyon işlemi sırasında uygulanan frekans değerinin artışı ile birlikte mikrokapsüllerin çevre uzunluk değerlerinin arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. a: Sabit frekans değerinde (3.0 kHz) sodyum aljinat ve sodyum kazeinat oranının mikrokapsül boyutu üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu, b: Sabit sodyum kazeinat oranında (% 1.75) sodyum aljinat oranı ile frekans değerinin mikrokapsül boyutu üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu, c: Sabit sodyum aljinat oranında (% 1.50) sodyum kazeinat oranı ile frekans değerinin mikrokapsül boyutu üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu

Sodyum aljinat ve peyniraltı suyu protein tozunu farklı oranlarda içeren kaplama çözeltilerinin farklı çaplara sahip nozullardan geçirilerek, ekstrüzyon yöntemi ile Phage K içeren mikrokapsüller üretilen bir çalışmada, 500 µm çaplı nozul kullanılarak, % 0.8 sodyum aljinat ve % 3.0'lık peyniraltı suyu protein tozunun karışımı ile üretilen mikrokapsüllerin ortalama çapları 310 µm; % 0.8 sodyum aljinat ve % 5.0'lık peyniraltı suyu protein tozunun karışımı ile üretilen mikrokapsüllerin ortalama çapları ise 800 µm olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 300 µm çaplı nozul kullanılarak, % 1.5 sodyum aljinat ve % 3.0'lük peyniraltı suyu protein tozunun karışımı ile üretilen mikrokapsüllerin ortalama çapları 323 µm; % 1.5 sodyum aljinat ve % 4.0'lık peyniraltı suyu protein tozunun karışımı ile üretilen mikrokapsüllerin ortalama çapları ise 880 µm olarak tespit edilmiştir. Çalışmada, protein miktarındaki artışın mikrokapsül boyutlarının artmasına neden olduğu belirtilmiştir (Tang vd. 2015).

Ketoprofen ve ketoprofen lisinatın farklı konsantrasyonlardaki sodyum aljinat çözeltileri ile 250 ve 450 Hz titreşim frekansında kapsüllendiği bir çalışmada, genel olarak yüksek frekansta üretilen mikrokapsüllerin ortalama çaplarının daha büyük olduğu tespit edilmiş ve yüksek frekansta titreşimin ana kapsüllerde uydu adı verilen istenmeyen parçacıklara neden olduğu bildirilmiştir (Gaudio vd. 2009). Çalışmamızda, kaplama çözeltilisindeki sodyum kazeinat miktarı ile mikrokapsülasyon işlemi sırasında uygulanan frekans değerinin artışı ile mikrokapsüllerin çevre uzunluk değerlerinin arttığı tespit edilmiştir.

4.3.1.4. Kaplama çözeltisi viskozite değerlerinin incelenen mikrokapsül özellikleri ile ilişkisi

Deneme desenine göre farklı oranlarda sodyum aljinat ve sodyum kazeinat ile hazırlanan çözeltilerin viskozite değerleri Çizelge 4.9'da sunulmuştur. En yüksek viskozite değeri 1983.41±156.78 cP ile % 2.0 sodyum aljinat ve % 3.5 sodyum kazeinat içeren çözeltide belirlenirken, en düşük viskozite değeri 24.09±0.29 cP ile % 1.0 oranında sodyum aljinat içeren çözeltide tespit edilmiştir.

Çizelge 4.9. BB deneme desenine göre hazırlanan çözeltilerin viskozite değerleri

No	Sodyum aljinat (%)	Sodyum kazeinat (%)	Viskozite (cP)
1	1.50	0.00	198.55±12.67
2	1.50	1.75	399.84±23.55
3	1.00	0.00	24.09±0.29
4	1.50	3.50	471.00±1.55
5	1.50	3.50	466.45±41.49
6	2.00	1.75	705.34±116.00
7	2.00	1.75	1050.91±133.03
8	1.50	1.75	255.70±3.85
9	1.50	1.75	211.66±10.17
10	1.50	1.75	177.66±10.59
11	2.00	3.50	1983.41±156.78
12	2.00	0.00	348.11±21.31
13	1.50	1.75	147.16±3.49
14	1.00	1.75	48.23±1.04
15	1.00	3.50	57.18±1.15
16	1.00	1.75	49.02±0.57
17	1.50	0.00	160.36±5.94

Sodyum aljinat ve sodyum kazeinat oranlarının kaplama çözeltilerinin viskozite değerleri üzerine etkisi incelenmiştir (Çizelge 4.10). Kaplama çözeltilerine ait en yüksek ve en düşük viskozite değerlerinin oranının 10'dan daha büyük (82.33) olmasından dolayı ANOVA analizi, değerlerin e tabanındaki doğal logaritmik ($y' = \ln(y+k)$) karşılıklarına göre gerçekleştirilmiştir. Kaplama çözeltilerinin viskozite değerleri üzerine hem sodyum aljinat hem de sodyum kazeinat oranının $p < 0.05$ düzeyinde etkili olduğu saptanmıştır.

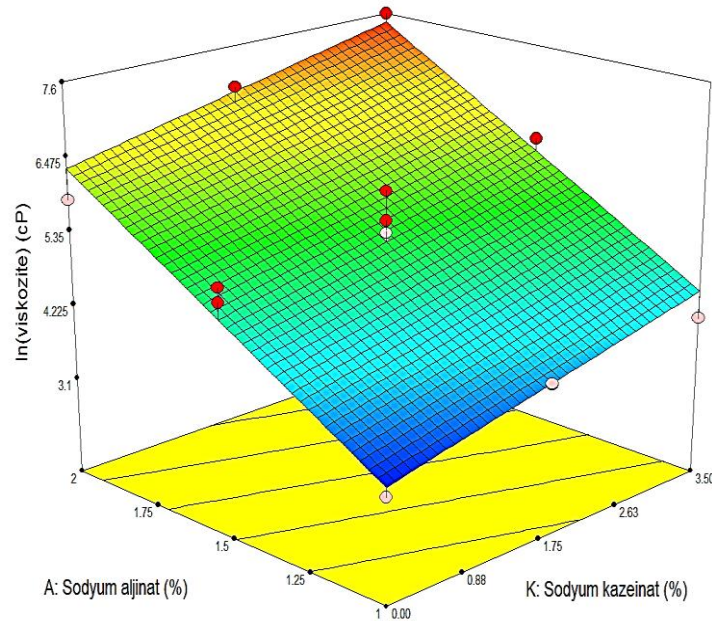
Çizelge 4.10. BB deneme desenine göre hazırlanan kaplama çözeltilerinin viskozite değerleri üzerine sodyum aljinat ve sodyum kazeinat oranlarının etkisi

Varyasyon kaynakları	SD	HKT	p değeri
Model (Lineer)	2	20.47	0.00*
A	1	17.89	0.00*
K	1	2.57	0.00*
Kalıntı	14	1.49	
Model Uyumsuzluğu	6	0.80	0.28
Saf Hata	8	0.69	
Toplam	16	21.96	
Model	R^2	$R^2_{d\tilde{z}}$	Pred- R^2
Lineer	0.93	0.92	0.90
		CV %	PRESS
		6.05	2.28
		Yeterli kesinlik	30.10

* $p < 0.05$ seviyesinde istatistiki açıdan önemli

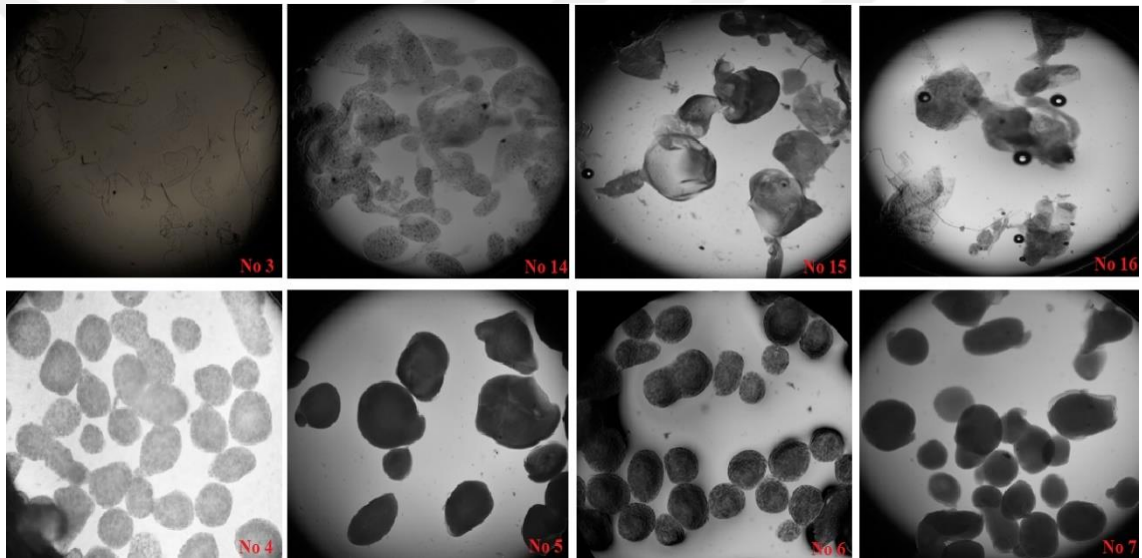
F: Frekans, A: Sodyum aljinat, K: Sodyum kazeinat, SD: Serbestlik derecesi, HKT: Hata Kareler Toplamı, $R^2_{d\tilde{z}}$: Düzeltilmiş R^2

Kaplama çözeltilerinin viskozite değerleri için lineer regresyon analizi sonucunda elde edilen eşitlik logaritmik tabanda $\ln(V) = 5.39 + 1.50A + 0.57K$ olarak verilmiştir. Şekil 4.6'da kaplama çözeltilerinin viskozite değerlerinin içerdikleri sodyum aljinat ve sodyum kazeinat oranının yükselmesiyle arttığı saptanmıştır.



Şekil 4.6. Sodyum aljinat ve sodyum kazeinat oranının kaplama çözeltilerinin viskozite değerleri üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu

BB deneme desenine göre üretilen mikrokapsüllerin fotoğrafları Şekil 4.7’de sunulmuştur. Kaplama çözeltisi içerisinde % 1.0 oranında sodyum aljinat içeren mikrokapsüllerin (No 3, 14, 15 ve 16) morfolojik yapıları incelendiğinde küresel formda olmadıkları, kuyruklu bir yapıya sahip oldukları görülmektedir. Söz konusu durumdan dolayı üretilen mikrokapsüllerin çaplarının hesaplanmasının doğru olmayacağı değerlendirilerek, deneme desenindeki tüm mikrokapsüllerin çevre uzunlukları hesaplanmıştır. Kaplama çözeltisi içerisinde % 1.0 oranında sodyum aljinat içeren mikrokapsüllerin kaplama çözeltilerinin viskozite değerlerinin 24.09 ile 57.18 cP arasında değiştiği belirlenmiş ve düzgün formda mikrokapsül oluşabilmesi için viskozite değerlerinin düşük olması gerektiği düşünülmüştür. Toplam sodyum aljinat ve sodyum kazeinat oranının % 3.75 ve üzeri olduğu kaplama çözeltilerinin (No 4, 5, 6, 7 ve 11) viskozite değerlerinin 466.45 ile 1983.41 cP arasında değiştiği tespit edilmiştir. Söz konusu deneme desenlerine ait mikrokapsüllerin yapılarının küresele yakın olduğu, kaplama çözeltisi içerisindeki sodyum aljinat oranının artışıyla ilgili olarak kuyruklanmanın azaldığı belirlenmiştir (No 4 ve 6).



Şekil 4.7. BB deneme deseninde yer alan bazı mikrokapsüllerin fotoğrafları (40 kat büyütülmüş)

Kaplama çözeltilerinin viskozite değerlerinin, mikrokapsülasyon verimliliği, pH 2.0’ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1’in azalma oranı ve mikrokapsüllerin çevre uzunlukları üzerine etkisi Pearson korelasyon analizi ile incelenmiştir. Pearson korelasyon analizi sonuçlarına göre, kaplama çözeltilerinin viskozite değerleri ile mikrokapsülasyon verimliliği arasında pozitif yönlü % 46 oranında; pH 2.0’ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1’in azalma oranı değerleri arasında negatif yönlü % 27 ve mikrokapsüllerin çevre uzunlukları arasında pozitif yönlü % 84 oranında korelasyon sağlanmıştır.

4.3.2. Optimizasyon sonuçlarının deneysel doğrulanması

Felix O1’in mikrokapsülasyonu için işlem koşulları olarak seçilen frekans, kaplama çözeltisi içerisindeki sodyum aljinat ve sodyum kazeinat oranları, mikrokapsülasyon

verimliliğin en yüksek, pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1'in azalma oranının en düşük ve mikrokapsüllerin çevre uzunluklarının en küçük olmasını sağlamak amacıyla istenebilirlik fonksiyonu yaklaşımı ve eş yükselti eğrilerinin kullanılmasıyla optimize edilmiştir. Ayrıca optimum noktanın belirlenmesinde her bir cevap için elde edilen ikinci dereceden polinomial modeller kullanılmıştır.

Verimlilik değerleri en yüksek mikrokapsüllerin üretilmesi için istenebilirlik fonksiyonu yaklaşımı uygulandığında optimum nokta için birbirine yakın 30 çözüm önerilmiştir (Çizelge 4.11). Sunulan çözümlerden istenebilirlik değeri en yüksek olan birinci çözümde elde edilen faktör seviyesi seçilmiştir. Söz konusu noktada frekans değerinin 1.61 kHz, kaplama çözeltisindeki sodyum aljinat ve kazeinat oranlarının sırasıyla % 1.86 ve % 3.26 olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.11. En yüksek mikrokapsülasyon verimliliği için belirlenen optimum noktalar

No	Frekans (kHz)	Sodyum aljinat (%)	Sodyum kazeinat (%)	Mikrokapsül verimliliği (%)	İstenebilirlik
1	1.61	1.86	3.26	98.52	1.00
2	4.47	1.61	3.32	98.25	1.00
3	4.44	1.89	3.33	98.23	1.00
4	4.44	1.61	3.41	98.32	1.00
5	1.50	1.94	2.57	98.09	1.00
6	1.76	1.94	3.47	98.43	1.00
7	4.48	1.91	3.49	98.09	1.00
8	4.49	1.53	3.50	98.34	1.00
9	4.49	1.63	3.39	98.40	1.00
10	1.53	1.83	3.46	98.20	1.00
11	1.53	1.94	2.73	98.28	1.00
12	4.39	1.78	3.31	98.09	1.00
13	4.49	1.66	3.41	98.30	1.00
14	4.47	1.57	3.42	98.26	1.00
15	1.51	1.89	2.79	98.32	1.00
16	4.40	1.85	3.33	98.16	1.00
17	4.50	1.79	3.12	98.11	1.00
18	4.49	1.98	3.46	98.47	1.00
19	4.49	1.55	3.49	98.50	1.00
20	4.46	1.58	3.39	98.22	1.00
21	4.50	2.00	3.04	96.72	0.94
22	1.50	1.81	1.27	95.57	0.88
23	1.50	1.81	0.97	95.21	0.86
24	1.50	1.61	0.06	94.92	0.85
25	1.50	1.61	0.08	94.91	0.85
26	1.50	1.64	0.31	94.91	0.85
27	4.50	1.21	0.00	94.20	0.81
28	4.50	1.33	0.87	94.12	0.81
29	4.50	1.31	0.56	94.06	0.81
30	4.50	1.38	0.00	93.82	0.79

pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1'in azalma oranının en düşük olduğu optimum nokta istenebilirlik fonksiyonu yaklaşımı uygulanarak saptanmıştır (Çizelge 4.12). Önerilen 14 çözüm içerisinde istenebilirlik değeri en yüksek olan birinci çözüm seçilmiştir. Söz konusu noktada frekans değerinin 4.50 kHz, kaplama çözeltisindeki sodyum aljinat ve kazeinat oranlarının sırasıyla % 2.00 ve % 2.69 olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.12. pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1'in azalma oranının en düşük olduğu optimum noktalar

No	Frekans (kHz)	Sodyum aljinat (%)	Sodyum kazeinat (%)	Felix O1 titresindeki azalma oranı (%)	İstenebilirlik
1	4.50	2.00	2.69	1.54	0.99
2	4.50	2.00	2.65	1.57	0.98
3	4.49	2.00	2.73	1.62	0.98
4	4.50	1.99	2.70	1.63	0.98
5	4.50	2.00	2.87	1.92	0.98
6	4.50	2.00	3.96	2.39	0.98
7	4.27	2.00	2.74	2.75	0.97
8	1.50	1.00	2.74	4.81	0.95
9	1.50	1.00	2.76	4.81	0.95
10	1.50	1.00	2.68	4.84	0.95
11	1.50	1.01	2.73	4.90	0.95
12	4.50	1.00	2.70	8.15	0.92
13	1.50	2.00	2.73	8.20	0.92
14	1.98	2.00	2.73	8.39	0.92

Optimizasyon çalışmalarımızın diğer bir cevabı olan mikrokapsüllerin çevre uzunluklarının en küçük olmasını sağlamak amacıyla istenebilirlik fonksiyonu yaklaşımı uygulanarak optimum nokta için birbirine yakın 24 çözüm üretilmiştir (Çizelge 4.13). Elde edilen çözümler incelendiğinde, kaplama çözeltisinin sodyum kazeinat içermediği durumlarda en küçük çevre uzunluğuna sahip mikrokapsüllerin üretilebileceği belirlenmiştir. Ancak içerisinde sodyum kazeinat olmayan kaplama çözeltileri ile üretilen mikrokapsüllerin pH değeri 2.0'ye ayarlanan çözeltide Felix O1'i koruyamadığı optimizasyon çalışmaları sırasında tespit edilmiş olup, söz konusu cevaba uygun optimum noktada mikrokapsül üretmenin çalışma açısından uygun olmadığı değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.13. En küçük çevre uzunluğuna sahip mikrokapsül üretimi için belirlenen optimum noktalar

No	Frekans (kHz)	Sodyum aljinat (%)	Sodyum kazeinat (%)	Mikrokapsüllerin çevre uzunluğu (mm)	İstenebilirlik
1	1.50	2.00	0.00	0.18	0.84
2	1.51	2.00	0.00	0.18	0.84
3	1.50	2.00	0.01	0.18	0.84
4	1.58	2.00	0.00	0.18	0.84
5	1.50	1.99	0.00	0.18	0.84
6	1.50	2.00	0.03	0.18	0.83
7	1.50	1.99	0.00	0.18	0.83
8	1.50	1.98	0.00	0.18	0.83
9	1.50	2.00	0.07	0.18	0.83
10	1.52	1.97	0.00	0.18	0.83
11	1.50	1.95	0.00	0.18	0.82
12	2.27	2.00	0.00	0.18	0.82
13	2.35	2.00	0.00	0.18	0.82
14	2.43	2.00	0.00	0.18	0.82
15	2.69	2.00	0.00	0.19	0.81
16	1.50	1.90	0.00	0.19	0.81
17	2.77	2.00	0.00	0.19	0.81
18	2.90	2.00	0.00	0.19	0.81
19	3.31	2.00	0.00	0.19	0.80
20	3.39	2.00	0.00	0.19	0.79
21	1.50	1.83	0.00	0.19	0.79
22	3.95	2.00	0.00	0.19	0.78
23	4.32	2.00	0.00	0.19	0.77
24	4.41	2.00	0.00	0.19	0.77

Her üç cevabın da optimum olduğu tek bir noktada mikrokapsüle Felix O1 üretebilmek için istenebilirlik fonksiyonu yaklaşımı uygulandığında program tarafından 8 çözüm sunulmuştur (Çizelge 4.14). Söz konusu çözümler içerisinde frekans değerinin 4.5 kHz, kaplama çözeltisi içerisindeki sodyum aljinat ve kazeinat oranlarının sırasıyla % 1.53 ve 2.72 olduğu nokta optimum olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.14. Mikrokapsülasyon verimliliği en yüksek, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranı en düşük ve mikrokapsül çevre uzunluğu en küçük mikrokapsül üretimi için belirlenen optimum noktalar

No	Frekans (kHz)	Sodyum aljinat (%)	Sodyum kazeinat (%)	Mikrokapsül verimliliği (%)	Felix O1 titresindeki azalma oranı (%)	Mikrokapsüllerin çevre uzunluğu (mm)	İstenebilirlik
1	4.50	1.53	2.72	97.43	8.39	0.16	0.96
2	4.50	1.52	2.73	97.43	8.39	0.16	0.96
3	4.50	1.54	2.66	97.43	8.45	0.15	0.96
4	4.50	1.53	2.74	97.48	8.41	0.25	0.96
5	4.50	1.65	2.71	98.10	8.67	2.05	0.95
6	1.50	1.62	2.38	94.76	10.27	0.16	0.91
7	1.50	1.63	2.36	94.81	10.51	0.16	0.91
8	1.50	1.65	2.28	94.93	11.38	0.16	0.91

Felix O1 içeren mikrokapsüllerde cevaplar için gerçekleştirilen doğrulama denemelerinin sonuçlarının modelden tahminlenen değerlere oldukça yakın ve hata değerlerinin % 10'nun altında olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15. Optimum noktalarda doğrulama deney sonuçları

Cevaplar	Frekans (kHz)	Sodyum aljinat (%)	Sodyum kazeinat (%)		Mikrokapsül verimliliği (%)	Felix O1 titresindeki azalma oranı (%)	Mikrokapsül çevre uzunluğu (mm)
OptV	1.61	1.86	3.26	Tahminlenen değer	98.52	---	---
				Deneysel değer	92.86±0.60	8.35±0.48	0.35±0.10
				Hata (%)	6.08		
OptAO	4.50	2.00	2.69	Tahminlenen değer	---	1.54	---
				Deneysel değer	90.78±1.79	1.57±0.79	0.30±0.08
				Hata (%)		1.94	
Opt3	4.50	1.53	2.72	Tahminlenen değer	97.43	8.39	0.16
				Deneysel değer	89.20±0.26	7.98±1.55	0.16±0.04
				Hata (%)	9.23	5.23	0.41

OptV :En yüksek mikrokapsül verimliliğine sahip mikrokapsüller

OptAO: pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsüller

Opt3: En yüksek mikrokapsül verimliliğine, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğuna sahip mikrokapsüller

Hata (%) = $(|d_{deneysel} - d_{tahminlenen}| / d_{deneysel}) \times 100$

4.4. Optimum noktalarda üretilen mikrokapsüle Felix O1'in yapay mide ve bağırsak ortamlarındaki aktivitesi

En yüksek mikrokapsül verimliliğine, pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerde en düşük Felix O1 azalma oranına ve bunlarla birlikte en küçük mikrokapsül çevre uzunluğuna sahip olan Felix O1 mikrokapsülleri 30 gün süresince 4°C'de Falkon tüplerinde depolanmış ve söz konusu mikrokapsüllerin depolanmanın 1., 15. ve 30. günlerinde yapay mide ve bağırsak ortamlarındaki davranışları incelenmiştir.

4.4.1. Mikrokapsüle Felix O1'in yapay mide ortamındaki aktivitesi

Optimum noktalarda üretilen Felix O1 mikrokapsülleri 120 dakika süresince pepsin enzimi içeren ve pH değeri 2.0'ye ayarlanan çözelti içinde bekletilmiştir. Çizelge 4.16'da sunulduğu üzere depolama süresince optimum verimliliğe sahip mikrokapsüllerdeki Felix O1 titresinin 7.38-7.25 log pob/g; optimum azalma oranına sahip mikrokapsüllerde 7.36-7.27 log pob/g ve optimum verimlilik, azalma oranı ile çevre uzunluğuna sahip mikrokapsüllerde 7.32-7.19 log pob/g arasında değiştiği belirlenmiştir. Depolamanın 30. gününde mide sıvısı içinde 120 dakika bekletilen, optimum verimliliğe, optimum azalma oranına ve her üç cevap için optimum koşullara sahip mikrokapsüllerde başlangıç

değerine göre Felix O1 titresindeki azalma sırasıyla 2.16, 2.11 ve 2.88 log pob/g olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.16. Optimum noktalarda üretilen mikrokapsüle Felix O1'in yapay mide ortamında belirlenen titre sonuçları (log pob/g)

Süre (dakika)	1.gün	15. gün	30.gün
OptV _{başlangıç}	7.38±0.02	7.31±0.02	7.25±0.02
5	6.99±0.01	6.69±0.01	6.21±0.01
60	5.90±0.23	5.91±0.23	5.88±0.23
120	5.76±0.01	5.38±0.01	5.09±0.01
OptAO _{başlangıç}	7.36±0.01	7.29±0.00	7.27±0.09
5	6.89±0.10	6.78±0.01	6.34±0.05
60	6.01±0.04	5.95±0.24	5.84±0.12
120	5.76±0.01	5.63±0.11	5.16±0.05
Opt3 _{başlangıç}	7.32±0.03	7.26±0.05	7.19±0.01
5	6.92±0.16	6.19±0.05	5.62±0.07
60	5.79±0.08	5.05±0.05	4.75±0.06
120	5.62±0.17	4.96±0.12	4.31±0.00

OptV :En yüksek mikrokapsül verimliliğine sahip mikrokapsüller

OptAO: pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsüller

Opt3: En yüksek mikrokapsül verimliliğine, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğuna sahip mikrokapsüller

Depolama süresince yapay mide ortamına maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1 titreleri istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.17'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde ana varyasyon kaynakları mikrokapsül çeşidinin, yapay mide ortamında bekletme süresinin ve depolama zamanının mikrokapsüllerdeki Felix O1 titreleri üzerine istatistiksel olarak $p<0.001$ önem düzeyinde etkili olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.17. Optimum noktalarda üretilen mikrokapsüle Felix O1'in yapay mide ortamında belirlenen titre sonuçlarına ait varyans analiz sonuçları

Varyans kaynakları	SD	KO	F
Mikrokapsül çeşidi (MÇ)	2	1.77	29.85***
Yapay mide ortamı (YMO)	2	6.99	117.97***
Depolama zamanı (DZ)	2	2.33	39.28***
MÇxYMO	4	0.05	0.90
MÇxDZ	4	0.31	5.20**
YMOxDZ	4	0.11	1.92
MÇxYMOxDZ	8	0.01	0.23
Hata	27	0.06	

** $p<0.01$, *** $p<0.001$ düzeyinde önemli

Depolama süresince yapay mide ortamına maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1 titrelerine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.18'de verilmiştir. Çizelgeye göre mikrokapsül çeşitleri incelendiğinde en yüksek Felix O1 titresinin pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip

mikrokapsüllerde, en düşük Felix O1 titresinin ise her üç cevap için optimum değerlerde üretilen mikrokapsüllerde olduğu tespit edilmiştir. Mikrokapsüle Felix O1 titresinin yapay mide sıvısında bekletme süresi uzadıkça azaldığı ve söz konusu azalmanın istatistiksel açıdan önemli olduğu ($p<0.05$) saptanmıştır.

Çizelge 4.18. Optimum noktalarda üretilen mikrokapsüle Felix O1'in yapay mide ortamında belirlenen titre değerlerine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Varyans kaynakları	Felix O1 titresini (log pob/g)
Mikrokapsül çeşidi	
OptV	5.98±0.62 a*
OptAO	6.04±0.53 a
Opt3	5.47±0.76 b
Yapay mide ortamı (dakika)	
5.	6.52±0.44 a
60.	5.67±0.45 b
120.	5.30±0.51 c
Depolama (gün)	
1	6.18±0.55 a
15	5.84±0.67 b
30	5.47±0.65 c

OptV :En yüksek mikrokapsül verimliliğine sahip mikrokapsüller

OptAO: pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsüller

Opt3: En yüksek mikrokapsül verimliliğine, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğuna sahip mikrokapsüller

*Aynı sütunda farklı harfle işaretlenen ortalama değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ($p<0.05$).

İzole edilen *Bacillus subtilis* φ19-5, *Bacillus subtilis* F11-1, *Bacillus subtilis* 6-1, *Bacillus subtilis* 6-2, *Salmonella enteritidis* F5-3, *Salmonella enteritidis* F5-4, *Salmonella enteritidis* (FRC) AK-1, *Salmonella enteritidis* (FRC) AK2, *Salmonella enteritidis* AK-3-1, *Salmonella enteritidis* Lake2-2, *Salmonella typhimurium* Lake2-2 ve *Salmonella typhimurium* IC B1-1 bakteriyofajlarının % 1.33'lük sodyum aljinat çözeltisi ile püskürterek kurutma yöntemiyle mikrokapsüllendiği bir çalışmada, üretilen mikrokapsüller pH değeri 2.4 olan mide ortamında 2 saat süresince bekletilmiştir. Kapsülasyon işlemi uygulanmayan serbest formdaki bakteriyofajların mide ortamında ilk 15 dakikada aktivitelerini kaybettikleri belirlenmiştir. Mide ortamında 2 saat bekletme sonunda *B. subtilis* ve *S. enteritidis* bakteriyofaj titrelerindeki azalmanın sırasıyla 1.00-2.00 ve 0.40-1.30 log ünite arasında değiştiği saptanırken, *S. typhimurium* bakteriyofajlarının titresinin yaklaşık 0.7 log azaldığı tespit edilmiştir (Soykut vd. 2019). Kim vd. (2015) yaptıkları çalışmada, *Escherichia coli* O157:H7 bakteriyofajını ekstrüzyon yöntemini kullanarak % 2.0'lik sodyum aljinat çözeltisi ile kapsülledikten sonra kitosan çözeltisi ile kaplamışlardır. Üretilen mikrokapsülleri pH değeri 2.0 ve 2.5'e ayarlanan mide ortamlarında iki saat süresince bekletmişlerdir. Serbest formdaki bakteriyofajlar pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde ilk 5 dakikada, pH değeri 2.5 olan çözeltide ise 60. dakikadan sonra tespit edilememiştir. Mikrokapsüle bakteriyofajların pH değeri 2.0 ve 2.5 olan mide ortamlarında 120 dakika sonundaki titrelerinin sırasıyla yaklaşık 1.60 ve 0.90 log azaldığı saptanmıştır. Çalışmamızda depolamanın 1.gününde farklı optimum noktalarda üretilen mikrokapsüle Felix O1 titrelerinin mide ortamı içinde ortalama 1.65 log azaldığı belirlenmiş olup azalma miktarının kullanılan kaplama

çözeltisine, bakteriyofaj türüne ve mikrokapsüllerin üretim yöntemine bağlı olarak değiştiği değerlendirilmiştir.

4.4.2. Mikrokapsüle Felix O1'in yapay bağırsak ortamındaki aktivitesi

Farklı optimum noktalarda üretilen Felix O1 mikrokapsüllerinin yapay bağırsak ortamındaki davranışları 5., 30., 60., 90. ve 120. dakikalarda ortamdan alınan örneklerdeki Felix O1 titresinin belirlenmesi ile ortaya koyulmuştur. Depolamanın 1., 15. ve 30. günlerinde yapay bağırsak sıvısında 120 dakika sonunda belirlenen ortalama Felix O1 titrelerinin, optimum verimliliğe sahip mikrokapsüllerde sırasıyla 7.07, 7.13 ve 7.15 log pob/g; pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsüllerde sırasıyla 6.78, 7.10 ve 7.11 log pob/g ve her üç cevap için optimum değerlerde üretilen mikrokapsüllerde sırasıyla 7.05, 7.07 ve 7.12 log pob/g olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19. Optimum noktalarda üretilen mikrokapsüle Felix O1'in yapay bağırsak ortamında belirlenen titre sonuçları (log pob/g)

Süre (dakika)	1.gün	15. gün	30.gün
OptV _{başlangıç}	7.38±0.02	7.31±0.02	7.25±0.02
5	4.71±0.05	4.68±0.06	5.01±0.08
30	5.43±0.24	5.94±0.06	5.81±0.02
60	5.72±0.17	6.26±0.08	6.30±0.13
90	5.90±0.02	6.37±0.07	6.38±0.09
120	7.07±0.02	7.13±0.00	7.15±0.01
OptAO _{başlangıç}	7.36±0.01	7.29±0.00	7.27±0.09
5	3.77±0.01	3.78±0.05	4.21±0.10
30	4.54±0.31	4.69±0.03	5.03±0.03
60	5.02±0.02	5.48±0.13	5.32±0.15
90	5.22±0.18	5.68±0.01	5.70±0.03
120	6.78±0.33	7.10±0.01	7.11±0.01
Opt3 _{başlangıç}	7.36±0.01	7.29±0.00	7.27±0.09
5	5.36±0.06	5.41±0.02	5.43±0.02
30	5.61±0.14	5.57±0.27	5.50±0.17
60	5.85±0.06	6.46±0.05	6.52±0.06
90	6.22±0.08	6.68±0.12	6.74±0.20
120	7.05±0.00	7.07±0.09	7.12±0.03

OptV :En yüksek mikrokapsül verimliliğine sahip mikrokapsüller

OptAO: pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsüller

Opt3: En yüksek mikrokapsül verimliliğine, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğuna sahip mikrokapsüller

Farklı optimum noktalarda üretilen mikrokapsüle Felix O1'in yapay bağırsak ortamında belirli zaman aralıklarıyla belirlenen titreleri istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.20'de sunulmuştur. Varyans analiz sonuçları incelendiğinde ana varyasyon kaynakları mikrokapsül çeşidi, yapay bağırsak ortamında bekletme süresi ve depolama zamanı ile mikrokapsül çeşidi x yapay bağırsak ortamında bekletme süresi interaksyonunun mikrokapsüle Felix O1 titresine istatistiksel olarak $p < 0.001$ önem düzeyinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.20. Optimum noktalarda üretilen mikrokapsüle Felix O1'in yapay bağırsak ortamında belirlenen titre sonuçlarına ait varyans analiz sonuçları

Varyans kaynakları	SD	KO	F
Mikrokapsül çeşidi (MÇ)	2	6.43	230.19***
Yapay bağırsak ortamı (YBO)	4	13.92	498.31***
Depolama zamanı (DZ)	2	0.96	34.41***
MÇxYBO	8	0.47	16.76***
MÇxDZ	4	0.02	0.70
YBOxDZ	8	0.09	3.10**
MÇxYBOxDZ	16	0.03	1.10
Hata	45	0.03	

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ düzeyinde önemli

Varyans kaynaklarından mikrokapsül çeşidi incelendiğinde yapay bağırsak ortamında en fazla Felix O1 salınım miktarının her üç cevap için optimum değerlerde üretilen mikrokapsüllerde olduğu belirlenirken, en az salınım miktarı pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsüllerde tespit edilmiştir (Çizelge 4.21). Depolama ve yapay bağırsak ortamında bekletme süresince mikrokapsüllerden ortama salınan Felix O1'in arttığı saptanmıştır.

Çizelge 4.21. Optimum noktalarda üretilen mikrokapsüle Felix O1'in yapay bağırsak ortamında belirlenen titre değerlerine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Varyans kaynakları	Felix O1 titresi (log pob/g)
Mikrokapsül çeşidi	
OptV	5.99±0.78 b*
OptAO	5.29±1.04 c
Opt3	6.17±0.66 a
Yapay bağırsak ortamı (dakika)	
5.	4.71±0.63 e
30.	5.35±0.49 d
60.	5.88±0.52 c
90.	6.10±0.49 b
120.	7.06±0.15 a
Depolama (gün)	
1	5.62±0.91 b
15	5.89±0.96 a
30	5.95±0.87 a

OptV: En yüksek mikrokapsül verimliliğine sahip mikrokapsüller

OptAO: pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsüller

Opt3: En yüksek mikrokapsül verimliliğine, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğuna sahip mikrokapsüller

*Aynı sütunda farklı harfle işaretlenen ortalama değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ($p < 0.05$)

Sodyum aljinat ve süt karışımı ile hazırlanan farklı konsantrasyondaki çözeltilerle (A₁S₁; 1 birim aljinat+1 birim süt, A₁S₂; 1 birim aljinat+2 birim süt, A₁S₃; 1 birim aljinat+3 birim süt, A₁S₄; 1 birim aljinat+4 birim süt, A_{1.5}S₄; 1.5 birim aljinat+4 birim süt, A₂S₄; 2 birim aljinat+4 birim süt) mikrokapsülasyonu gerçekleştirilen *Lactobacillus*

bulgaricus'un pH değeri 6.8 olan yapay bağırsak ortamındaki salınımı incelenmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki karışımlarla üretilen mikrokapsüllerden *L. bulgaricus*'un büyük kısmının ilk 60 dakika içinde salındığı belirlenmiş olup, kaplama çözeltisinin içerdiği aljinat miktarının artmasına bağlı olarak *L. bulgaricus*'un salınım oranının istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldığı saptanmıştır. Yüksek polimer konsantrasyonun bakteriyi asidik ortama karşı koruduğu ancak salınımını yavaşlattığı bildirilmiştir (Shi vd. 2013). Çalışmamızda en düşük Felix O1 salınım oranının kaplama çözeltisi içinde % 2.00 oranında sodyum aljinat bulunan pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsüllerde olduğu belirlenirken, en yüksek salınım oranının ise kaplama çözeltisi içinde % 1.5 oranında sodyum aljinat bulunan her üç cevap için optimum koşullarda üretilen mikrokapsüllerde olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonuçlarımız bu yönüyle söz konusu çalışma ile uyum içindedir.

4.5. Optimum noktalarda üretilen mikrokapsüllerin yoğurt üretiminde kullanılması

4.5.1. Yoğurt örneklerine ait fizikokimyasal analizler

Yoğurt örneklerinin üretiminde kullanılan yağsız (% 0.1) sütün kurumadde, protein, laktoz, kül ve titrasyon asitliği değerlerinin sırasıyla ortalama % 12.86, 4.60, 2.80, 0.76, 0.12 olduğu tespit edilirken pH değerinin ortalama 6.65 olduğu belirlenmiştir.

Üç farklı optimum noktada üretilen Felix O1 mikrokapsüllerini ve kapsülasyon işlemi uygulanmayan serbest formda Felix O1'i içeren yoğurt örnekleri ile herhangi bir formda Felix O1 içermeyen kontrol yoğurt örneklerine ait kurumadde, protein, kül, sertlik ve viskozite değerleri Çizelge 4.22'de verilmiştir. Üretilen mikrokapsüllerin kurumadde değerlerinin yoğurdun kurumadde değerinden daha düşük olması, içerisinde Felix O1 mikrokapsülleri içeren yoğurt örneklerinin kurumadde değerlerinin içermeyen örneklere göre yüzdesel olarak daha düşük çıkmasına neden olduğu değerlendirilmiştir. Yoğurt örneklerinin protein değerleri incelendiğinde, yapısında sodyum aljinat ve kazeinat bulunduran mikrokapsülleri içeren örneklerinin protein değerlerinin içermeyen örneklere göre istatistiki olarak yüksek olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Serbest formda Felix O1 içeren yoğurt örneği ve kontrol grubu yoğurt örneğinin sertlik değerleri ile mikrokapsül içeren örneklerin sertlik değerleri arasındaki farklılığın istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$). Serbest formda Felix O1 içeren yoğurt örneği ve kontrol grubu yoğurt örneğinin sertlik ve viskozite değerlerinin mikrokapsül içeren örneklere göre yüksek olmasının kurumadde değerlerinin yüksek olmasından kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.22. Yoğurt örneklerine ait fizikokimyasal analiz sonuçları

Yoğurt örnekleri	Kurumadde (%)	Protein (%)	Kül (%)	Sertlik (g)	Viskozite (cP)
YoptV	14.27±0.05 b*	5.52±0.00 a	1.16±0.00 b	18.48±1.26 a	1016.00±16.00 b
YoptAO	14.31±0.26 b	5.50±0.01 ab	1.25±0.01 a	18.33±0.20 a	1048.00± 8.00 ab
Yopt3	14.28±0.26 b	5.48±0.01 ab	1.13±0.01 b	18.58±0.41 a	1006.00±14.00 b
Ysflx	15.07±0.15 a	5.41±0.05 c	1.27±0.05 a	19.06±0.22 a	1079.00±21.00 ab
Kontrol	15.09±0.02 a	5.40±0.03 c	1.17±0.03 b	20.15±0.03 a	1129.50±45.00 a

YoptV: En yüksek mikrokapsül verimliliğine sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

YoptAO: pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

Yopt3: En yüksek mikrokapsül verimliliğine, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğuna sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

Ysflx: Serbest formda Felix O1'i içeren yoğurt örnekleri

Kontrol: Herhangi bir formda Felix O1 içermeyen yoğurt örnekleri

*Aynı sütunda farklı küçük harfle işaretlenen ortalama değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ($p<0.05$)

Sodyum aljinat ve dirençli nişasta kullanılarak üretilen mikrokapsüle *Lactobacillus plantarum*'un yoğurdun fizikokimyasal özellikleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, yoğurt üretimi yapıldıktan sonra mikrokapsüle *L. plantarum* ilave edilmiştir. Çalışmanın kontrol grubunu içinde *L. plantarum* olmayan yoğurt örnekleri oluşturmuştur. Depolamanın 1. gününde mikrokapsül içeren yoğurt örneklerinin kurumadde, protein, kül, titrasyon asitliği ve pH değerlerinin sırasıyla % 10.83, % 2.38, % 1.0, % 0.64 ve 4.61 olduğu belirlenirken, kontrol örneğinde söz konusu değerlerin sırasıyla % 11.5, % 2.89, % 0.96, % 0.69 ve 4.43 olduğu tespit edilmiştir (Shafiei, 2018). Pektin ve peyniraltı suyu proteini karışımı kullanılarak emülsiyon yöntemiyle mikrokapsüllenen *Lactobacillus acidophilus* LA-5'in yoğurt üretiminde kullanımının araştırıldığı başka bir çalışmada ise, serbest ve mikrokapsüle formdaki *L. acidophilus* LA-5 yoğurt strater kültürleri ile birlikte süte eklenerek iki farklı yoğurt üretilmiştir. Serbest formda *L. acidophilus* LA-5 içeren yoğurt örneğinin pH, titrasyon asitliği, protein, kurumadde ve kül değerleri sırasıyla 4.34, % 0.80, % 3.38, % 12.71 ve % 0.89 olarak tespit edilirken, mikrokapsüle *L. acidophilus* LA-5 içeren yoğurt örneğinin söz konusu değerleri sırasıyla 4.50, % 0.75, % 4.04, % 12.10 ve % 0.85 olarak saptanmıştır. Serbest formda *L. acidophilus* LA-5 içeren yoğurt örneklerinin kurumadde ve kül değerlerinin mikrokapsüle *L. acidophilus* LA-5 içeren yoğurt örneklerinden yüksek olduğu; ancak protein değerinin düşük olduğu belirlenmiştir. Proteinin yüksek olmasının kapsül çözeltisinde yer alan peyniraltı suyu proteininden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Ribeiro vd. 2014). Çalışma sonuçlarımız ile diğer çalışma sonuçları arasındaki farkın yoğurtların üretimlerinde kullanılan sütlerin standardize edilen değerlerindeki farklılıklarından kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.23'de depolama süresince yoğurt örneklerinin pH değerlerinde meydana gelen değişim sunulmuştur. Tüm yoğurt örneklerinin depolama süresince pH değerlerinin düştüğü tespit edilmiştir. En yüksek pH değeri depolamanın 1. gününde 4.66 ile en yüksek mikrokapsül verimliliğine sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örneklerinde belirlenirken, en düşük pH değeri depolamanın 30. gününde 4.43 ile kontrol örneklerinde saptanmıştır. Yoğurt örneklerinin pH değerlerinin depolama süresince düştüğü ve örneklerin 1. ile 30. günlerindeki pH değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).

Çizelge 4.23. Yoğurt örneklerine ait pH değerleri

Yoğurt örnekleri	pH		
	1.gün	15.gün	30.gün
YoptV	4.66±0.01 a* A**	4.54±0.02 a B	4.48±0.02 a B
YoptAO	4.65±0.00 a A	4.53±0.01 a B	4.48±0.01 a C
Yopt3	4.60±0.00 b A	4.50±0.01 ab B	4.47±0.00 a C
Yflx	4.55±0.00 c A	4.49±0.00 ab AB	4.45±0.02 a B
Kontrol	4.56±0.00 c A	4.46±0.02 b B	4.43±0.03 a B

YoptV: En yüksek mikrokapsül verimliliğine sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

YoptAO: pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

Yopt3: En yüksek mikrokapsül verimliliğine, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğuna sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

Ysflx: Serbest formda Felix O1'i içeren yoğurt örnekleri

Kontrol: Herhangi bir formda Felix O1 içermeyen yoğurt örnekleri

*Aynı sütunda farklı küçük harfle işaretlenen ortalama değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ($p<0.05$)

**Aynı satırda farklı büyük harfle işaretlenen ortalama değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ($p<0.05$)

Yoğurt örneklerine ait titrasyon asitliği değerleri incelendiğinde, mikrokapsül içermeyen yoğurt örneklerinin titrasyon asitliği değerlerinin depolamanın 1., 15. ve 30. günlerinde mikrokapsül içeren yoğurt örneklerine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.24). Mikrokapsül üretiminde kullanılan sodyum kazeinatın tamponlama etkisinden dolayı mikrokapsül içeren yoğurt örneklerinin pH değerlerinin yüksek, titrasyon asitliği değerlerinin ise mikrokapsül içermeyen yoğurt örneklerine göre daha düşük olduğu değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.24. Yoğurt örneklerine ait titrasyon asitliği değerleri

Yoğurt örnekleri	Titrasyon asitliği (%)		
	1.gün	15.gün	30.gün
YoptV	1.15±0.01 b* B**	1.16±0.01 c B	1.23±0.00 b A
YoptAO	1.15±0.00 b B	1.18±0.01 c AB	1.20±0.01 b A
Yopt3	1.18±0.01 b A	1.20±0.00 c A	1.23±0.02 b A
Yflx	1.27±0.01 a A	1.30±0.01 b A	1.33±0.02 a A
Kontrol	1.28±0.02 a B	1.37±0.01 a A	1.38±0.01 a A

YoptV: En yüksek mikrokapsül verimliliğine sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

YoptAO: pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

Yopt3: En yüksek mikrokapsül verimliliğine, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğuna sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

Ysflx: Serbest formda Felix O1'i içeren yoğurt örnekleri

Kontrol: Herhangi bir formda Felix O1 içermeyen yoğurt örnekleri

*Aynı sütunda farklı küçük harfle işaretlenen ortalama değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ($p<0.05$)

**Aynı satırda farklı büyük harfle işaretlenen ortalama değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ($p<0.05$)

4.5.2. Yoğurt örneklerine ait mikrobiyolojik analizler

Üretilen beş farklı yoğurt örneğinde *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* sayıları incelenmiştir. Çizelge 4.25'te sunulduğu üzere, depolama süresince yoğurt örneklerindeki *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sayısının 8.07 ile 7.57 log kob/g; *S. thermophilus* sayısının ise 9.28 ile 8.97 log kob/g arasında değiştiği saptanmıştır. Yoğurt örneklerindeki *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus*

sayısındaki farklılıkların depolama süresince 1.00 log kob/g'ın altında olduğu belirlenmiştir. Ayrıca mikrokapsüle ve serbest formdaki Felix O1'in yoğurt örneklerindeki *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* sayılarını olumsuz etkilemediği ortaya konulmuştur.

Çizelge 4.25. Yoğurt örneklerindeki *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* sayıları

Yoğurt örnekleri	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (log kob/g)			<i>Streptococcus thermophilus</i> (log kob/g)		
	1.gün	15.gün	30.gün	1.gün	15.gün	30.gün
YoptV	8.07±0.00	7.70±0.04	7.76±0.04	9.28±0.01	9.18±0.04	9.10±0.04
YoptAO	8.07±0.01	7.99±0.01	7.80±0.00	9.18±0.04	9.12±0.04	9.08±0.03
Yopt3	7.98±0.01	7.95±0.01	7.73±0.00	9.15±0.07	9.11±0.07	9.06±0.02
Yflx	7.91±0.03	7.87±0.09	7.65±0.03	9.14±0.02	9.06±0.02	9.00±0.01
Kontrol	8.04±0.04	7.80±0.06	7.57±0.02	9.18±0.07	9.15±0.02	8.97±0.12

YoptV: En yüksek mikrokapsül verimliliğine sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

YoptAO: pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

Yopt3: En yüksek mikrokapsül verimliliğine, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğuna sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

Ysflx: Serbest formda Felix O1'i içeren yoğurt örnekleri

Kontrol: Herhangi bir formda Felix O1 içermeyen yoğurt örnekleri

Peyniraltı suyu proteini ve inulin kullanılarak püskürterek kurutma yöntemi ile mikrokapsüllenen *Bifidobacterium* BB-12'in yoğurt üretiminde kullanımının araştırıldığı bir çalışmada, yoğurt örneklerindeki *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* sayılarının sırasıyla 9.63-10.41 ve 8.90-10.47 log kob/g arasında değiştiği belirlenmiştir. Üretiminde peyniraltı suyu proteini kullanılan mikrokapsüle *Bifidobacterium* BB-12 ilave edilen yoğurt örneklerindeki *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus* sayısının serbest formda *Bifidobacterium* BB-12 içeren kontrol grubu yoğurt örneklerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Peyniraltı suyu proteinin yoğurt bakterileri için besleyici değeri olduğu değerlendirilmiştir (Pinto vd. 2017). Demir katkılı yoğurt üretimi için ferrik amonyum sülfatın poligliserol monostearat ile mikrokapsülendiği bir çalışmada, üretilen yoğurtlara serbest ve mikrokapsüle formda ferrik amonyum sülfat ilave edilmiştir. Çalışmanın kontrol grubunu ferrik amonyum sülfat içermeyen yoğurt örnekleri oluşturmuş ve 20 gün süresince örneklerdeki *S. thermophilus* ile *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*'un canlılıkları izlenmiştir. Depolama süresince tüm örneklerde *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sayısının sırasıyla 8.00 ve 7.00 log kob/g düzeyinde olduğu belirlenmiştir. *S. thermophilus* ve *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sayılarının örneklerle göre istatistiksel olarak değişmediği tespit edilmiştir. Mikrokapsüle ve serbest formdaki ferrik amonyum sülfatın yoğurt bakterilerinin canlılıklarını olumsuz etkilemediği değerlendirilmiştir (Kim vd. 2003). Çalışma sonuçlarımızla diğer çalışma sonuçları arasındaki farklılığın, üretilen yoğurdun bileşen içeriğinin ve sonlandırma pH'sının farklı olması ile kullanılan *S. thermophilus* ile *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bakterilerinin suşlarının farklı olmasından kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir.

4.5.3. Yoğurt içerisinde mikrokapsüle ve serbet formdaki Felix O1'in yapay mide ortamındaki aktivitesi

Yoğurt örneklerinde bulunan mikrokapsüle ve serbest formdaki Felix O1'in depolamanın 1., 15. ve 30. günlerindeki ve depolama süresince yapay mide ortamındaki titre sonuçları Çizelge 4.28'de verilmiştir. Depolama sonunda optimum verimliliğe, optimum azalma oranına, her üç cevap için optimum koşullara sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri ile serbest formda Felix O1 içeren yoğurt örneğinde başlangıç değerine göre Felix O1 titresindeki azalma sırasıyla 0.17, 0.09, 0.35 ve 0.61 log pob/g olarak belirlenmiştir. Ayrıca depolamanın 30. gününde yapay mide ortamında 120 dakika bekletilen serbest formda Felix O1 içeren yoğurt örneklerinde Felix O1 tespit edilememiştir.

Çizelge 4.26. Yoğurt içerisinde mikrokapsüle ve serbet formdaki Felix O1'in yapay mide ortamındaki titresi (log pob/g)

Süre (dakika)	1.gün	15. gün	30.gün
YoptV _{başlangıç}	6.51±0.03	6.42±0.01	6.34±0.01
5	6.36±0.06	6.28±0.13	6.26±0.06
60	5.90±0.05	5.84±0.03	5.79±0.20
120	5.65±0.05	5.08±0.00	5.05±0.05
YoptAO _{başlangıç}	6.42±0.08	6.40±0.08	6.33±0.03
5	6.34±0.03	6.34±0.01	6.29±0.01
60	5.86±0.01	5.80±0.04	5.70±0.11
120	5.64±0.07	5.10±0.03	5.08±0.03
Yopt3 _{başlangıç}	6.50±0.02	6.36±0.03	6.15±0.01
5	6.43±0.03	6.21±0.06	6.07±0.01
60	5.83±0.07	5.76±0.01	5.65±0.14
120	5.60±0.09	5.01±0.00	4.92±0.01
Ysflx _{başlangıç}	6.17±0.04	5.68±0.03	5.56±0.02
5	4.85±0.05	4.94±0.06	4.81±0.03
60	4.09±0.05	3.78±0.10	3.59±0.01
120	2.38±0.09	2.37±0.09	T.E

YoptV_{başlangıç}: En yüksek mikrokapsül verimliliğine sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örneklerindeki başlangıç Felix O1 titresi

YoptAO_{başlangıç}: pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örneklerindeki başlangıç Felix O1 titresi

Yopt3_{başlangıç}: En yüksek mikrokapsül verimliliğine, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğuna sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örneklerindeki başlangıç Felix O1 titresi

Ysflx_{başlangıç}: Serbest formda Felix O1'i içeren yoğurt örneklerindeki başlangıç Felix O1 titresi

T.E: Tespit edilemedi. Felix O1 titresi 2.00 log pob/g ve üzeri değerlerde tespit edilebilmektedir.

Depolama süresince yapay mide ortamından belirli zaman aralıklarında alınan örneklerde belirlenen Felix O1 titresinin istatistiksel analizi sonucunda, incelenen ana varyasyon kaynaklarından yoğurt çeşidi, yapay mide ortamında bekletme süresi ve depolama zamanı ile ana varyasyon kaynaklarının birbirleriyle olan interaksiyonlarının Felix O1 titresi üzerine $p<0.001$ düzeyinde etkili olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.29).

Çizelge 4.27. Yoğurt içerisinde mikrokapsüle ve serbet formda bulunan Felix O1'in yapay mide ortamındaki titre değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Varyans kaynakları	SD	KO	F
Yoğurt çeşidi (YÇ)	3	26.05	991.97***
Yapay mide ortamı (YMO)	2	15.64	595.67***
Depolama zamanı (DZ)	2	1.17	44.68***
YÇxYMO	6	1.95	74.07***
YÇxDZ	6	0.27	10.28***
YMOxDZ	4	0.59	22.36***
YÇxYMOxDZ	12	0.24	9.28***
Hata	36	0.03	

*** $p < 0.001$ düzeyinde önemli

Yoğurt içerisinde mikrokapsüle ve serbest formdaki Felix O1'in yapay mide ortamındaki titre değerlerine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.30'da verilmiştir. Çizelge incelendiğinde serbest formdaki Felix O1'i içeren yoğurt örneklerindeki Felix O1 titresinin mikrokapsüle Felix O1 içeren yoğurt örneklerinden daha düşük olduğu saptanmıştır. Mikrokapsüle Felix O1 içeren yoğurt örneklerindeki Felix O1 titresini arasındaki farkın istatistiki olarak önemli olmadığı ($p > 0.05$) bulunmuştur. Söz konusu sonuçlar, mikrokapsülasyon işleminin Felix O1'in yoğurt örneklerindeki aktivitesini olumlu etkilediğini göstermektedir. Yapay mide ortamında bekletme süresinin artması ve depolama zamanının uzaması ile birlikte yoğurt örneklerindeki Felix O1 titresinin azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

Çizelge 4.28. Yoğurt içerisinde mikrokapsüle ve serbet formdaki Felix O1'in yapay mide ortamındaki titre değerlerine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Varyans kaynakları	Felix O1 titresini (log pob/g)
Yoğurt çeşidi	
YoptV	5.80±0.47 a*
YoptAO	5.79±0.46 a
Yopt3	5.72±0.48 a
Ysflx	3.37±1.51 b
Yapay mide ortamı (dakika)	
5.	5.93±0.62 a
60.	5.26±0.95 b
120.	4.32±1.70 c
Depolama (gün)	
1	5.37±1.18 a
15	5.21±1.11 b
30	4.93±1.66 c

YoptV: En yüksek mikrokapsül verimliliğine sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

YoptAO: pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

Yopt3: En yüksek mikrokapsül verimliliğine, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğuna sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

Ysflx: Serbest formda Felix O1'i içeren yoğurt örnekleri

*Aynı sütunda farklı harfle işaretlenen ortalama değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ($p < 0.05$)

Samtlebe vd. (2018) yaptıkları çalışmada, 11.00 log kob/mL serbest formda Phage P008 içeren 300 g suyu, % 10 oranında yağsız süt tozu süspansiyonu (% 35 oranında süt tozu ve 11.00 log kob/mL serbest formda Phage P008 içermekte) içeren 300 g suyu ve % 10 oranında 10.50 log kob/mL mikrokapsüle Phage P008 (% 35 oranında süt tozu içeren süspansiyondan enzimatik-emülsiyon yöntemi ile elde edilmiş) içeren 300 g suyu dinamik gastrointestinal sisteme tabi tutmuşlardır. Mide kısmında 45 dakika sonunda pH değerinin 2.5'e ulaştığı ve serbest formda su ile sisteme verilen Phage P008'in aktivitesini kaybettiği belirlenirken, 75 dakika sonunda pH değerinin 1.9'un altına inmesiyle birlikte % 10 yağsız süt tozu süspansiyonuyla birlikte sisteme verilen serbest formdaki Phage P008'in de aktivitesini kaybettiği saptanmıştır. Bununla birlikte, 240 dakika sonunda mide ortamından alınan mikrokapsüller açılarak belirlenen Phage P008 titresinin 8.00 log pob/mL olduğu tespit edilmiştir. Yağsız süt tozu süspansiyonu içerisinde dinamik gastrointestinal sisteme verilen Phage P008'in aktivitesini su içinde verilenlere göre daha uzun süre koruduğu saptanmıştır. Çalışma sonuçlarımıza göre, depolama sonunda mide ortamına yoğurt içinde verilen mikrokapsüllerdeki Felix O1 titresindeki logaritmik azalmanın yoğurt içinde verilmeyenlere göre daha düşük olduğu, yoğurt içinde serbest formda mide ortamına maruz kalan Felix O1'in ise 120 dakika sonunda titresinin tespit edilemediği belirlenmiştir. Yoğurdun yapısında bulunan fosfat ve sitrat tuzları ile birlikte proteinlerin tamponlayıcı etkisinden dolayı yapay mide ortamının pH değerinin yükseldiği ve mikrokapsülenen aktif bileşiğin koruduğu bildirilmiştir (Champagne vd. 2015).

4.5.4. Yoğurt içerisinde mikrokapsüle ve serbest formdaki Felix O1'in yapay bağırsak ortamındaki aktivitesi

Üretiminde mikrokapsüle ve serbest formda Felix O1 kullanılan yoğurt örneklerinde depolama ve yapay bağırsak ortamında bekletme süresince belirlenen Felix O1 titrelerine ait logaritmik değerlerdeki değişim Çizelge 4.31'de görülmektedir. Çizelgede sunulduğu üzere mikrokapsüle ve serbest formda Felix O1 içeren yoğurt örneklerinde 30 günlük depolama süresince üç farklı zamanda belirlenen ortalama Felix O1 titrelerinin 6.51-5.56 log pob/g arasında değiştiği tespit edilmiştir. Serbest formda Felix O1 içeren yoğurt örneğinde depolamanın 1., 15. ve 30. günlerinde yapay bağırsak ortamında bekletme sonrasında belirlenen ortalama Felix O1 titrelerinin azalma miktarları sırasıyla 0.30, 0.43 ve 0.37 log pob/g olarak saptanmış ve pankreatin enzimi içeren bağırsak sıvısı içerisinde Felix O1'in aktivitesini devam ettirebildiği görülmüştür.

Çizelge 4.29. Yoğurt içerisinde mikrokapsüle ve serbest formdaki Felix O1'in yapay bağırsak ortamındaki aktivitesi (log pob/g)

Süre (dakika)	1.gün	15. gün	30.gün
YoptV _{başlangıç}	6.51±0.03	6.42±0.01	6.34±0.01
5	2.81±0.05	2.92±0.08	3.73±0.07
30	3.69±0.10	4.10±0.02	4.24±0.10
60	3.92±0.08	4.27±0.27	4.38±0.12
90	4.18±0.03	4.54±0.06	4.48±0.22
120	5.12±0.00	5.18±0.03	5.24±0.08
YoptAO _{başlangıç}	6.42±0.08	6.40±0.08	6.33±0.03
5	2.75±0.10	2.83±0.06	3.06±0.07
30	3.43±0.09	3.64±0.05	3.68±0.00
60	3.90±0.52	3.88±0.11	4.67±0.01
90	4.36±0.19	4.36±0.03	4.98±0.00
120	4.86±0.10	4.88±0.01	5.09±0.19
Yopt3 _{başlangıç}	6.50±0.02	6.36±0.03	6.15±0.01
5	3.11±0.04	3.50±0.16	4.18±0.07
30	4.12±0.01	4.31±0.17	4.77±0.07
60	4.20±0.17	4.42±0.01	4.87±0.17
90	4.47±0.33	4.77±0.10	5.01±0.03
120	5.16±0.09	5.30±0.06	5.29±0.19
YsflX _{başlangıç}	6.17±0.04	5.68±0.03	5.56±0.02
5	6.17±0.03	5.63±0.07	5.55±0.01
30	6.15±0.02	5.44±0.02	5.54±0.00
60	6.11±0.00	5.40±0.00	5.46±0.10
90	5.94±0.10	5.34±0.09	5.39±0.01
120	5.87±0.07	5.25±0.03	5.19±0.06

YoptV_{başlangıç}: En yüksek mikrokapsül verimliliğine sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örneklerindeki başlangıç Felix O1 titresi

YoptAO_{başlangıç}: pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örneklerindeki başlangıç Felix O1 titresi

Yopt3_{başlangıç}: En yüksek mikrokapsül verimliliğine, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğuna sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örneklerindeki başlangıç Felix O1 titresi

YsflX_{başlangıç}: Serbest formda Felix O1'i içeren yoğurt örneklerindeki başlangıç Felix O1 titresi

Yapay bağırsak ortamında bekletilen mikrokapsüle Felix O1 içeren yoğurt örneklerinde belirli zaman aralıklarıyla belirlenen Felix O1 titreleri istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.32'de sunulmuştur. Varyans analiz sonuçları incelendiğinde ana varyasyon kaynakları yoğurt çeşidi, yapay bağırsak ortamında bekletme süresi ve depolama zamanı ile yoğurt çeşidi x yapay bağırsak ortamında bekletme süresi interaksyonunun mikrokapsüle Felix O1 titresi üzerine istatistiksel olarak $p < 0.001$ önem düzeyinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.30. Yoğurt içerisinde mikrokapsüle Felix O1'in yapay bağırsak ortamındaki titre değerlerine ait varyans analiz sonuçları

Varyans kaynakları	SD	KO	F
Yoğurt çeşidi (YÇ)	2	1.73	44.52***
Yapay bağırsak ortamı (YBO)	4	9.06	233.74***
Depolama zamanı (DZ)	2	1.96	50.62***
YÇxYBO	8	0.15	3.91***
YÇxDZ	4	0.05	1.28
YBOxDZ	8	0.09	2.41*
YÇxYBOxDZ	16	0.05	1.34
Hata	45	0.04	

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ düzeyinde önemli

Depolama süresince yapay bağırsak ortamında bekletilen mikrokapsüle Felix O1 içeren yoğurt örneklerindeki Felix O1 titresine ait ortalamaların Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.33'de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde en yüksek Felix O1 titresini her üç cevap içinde optimum koşullarda üretilen mikrokapsüle Felix O1 içeren yoğurt örneklerinde; en düşük Felix O1 titresini ise optimum azalma oranına sahip mikrokapsüle Felix O1 içeren yoğurt örneklerinde belirlenmiştir. Yapay bağırsak ortamında bekletilen mikrokapsüle Felix O1 içeren yoğurt örneklerindeki Felix O1 titresini bekletme süresinin ve depolama zamanının uzamasıyla birlikte arttığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.31. Yoğurt içerisinde mikrokapsüle Felix O1'in yapay bağırsak ortamındaki titre değerlerine ait Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Varyans kaynakları	Felix O1 titresini (log pob/g)
Yoğurt çeşidi	
YoptV	4.19±0.70 b*
YoptAO	4.03±0.78 c
Yopt3	4.50±0.62 a
Yapay bağırsak ortamı (dakika)	
5.	3.21±0.47 e
30.	4.00±0.41 d
60.	4.28±0.39 c
90.	4.57±0.31 b
120.	5.12±0.18 a
Depolama (gün)	
1	4.01±0.75 c
15	4.19±0.72 b
30	4.51±0.63 a

YoptV: En yüksek mikrokapsül verimliliğine sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

YoptAO: pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

Yopt3: En yüksek mikrokapsül verimliliğine, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğuna sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

* Aynı sütunda farklı harfle işaretlenen ortalama değerler istatistiki olarak birbirinden farklıdır ($p < 0.05$).

4.6. Felix O1'in mikrokapsüllerden salınımının matematik modellenmesi

Optimizasyon cevabına göre seçilen değişkenler kullanılarak üretilen üç farklı mikrokapsülden Felix O1'in salınımı yapay bağırsak ortamında belirlenmiştir. Ayrıca yoğurt üretiminde kullanılan söz konusu mikrokapsüllerden Felix O1'in salınımı depolama süresince tespit edilerek, model gıda olan yoğurdun yapay bağırsak ortamında Felix O1 salınımı üzerine etkisi incelenmiştir. Yapay bağırsak ortamından 5, 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda örnek alınarak Felix O1 titresi belirlenmiş ve mikrokapsüllerdeki başlangıç Felix O1 titresine göre % salınım oranları hesaplanmıştır.

4.6.1. Depolama süresince Felix O1'in yapay bağırsak ortamında mikrokapsüllerden salınımı

Felix O1'in yapay bağırsak ortamında farklı optimum noktalarda üretilen mikrokapsüllerden salınım oranlarındaki değişim 120 dakika süresince izlenmiş ve Çizelge 4.34'te sunulmuştur. Çizelge incelendiğinde, mikrokapsüllerden Felix O1'in salınım oranlarının optimum verimlilik oranına sahip mikrokapsüller için % 63.82 ile 98.57; optimum azalma oranına sahip mikrokapsüller için % 51.20 ile 97.80 ve her üç cevap için optimum koşullarda üretilen mikrokapsüllerde % 73.19 ile 99.02 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Depolama süresinin sonunda en fazla Felix O1 salınımının her üç cevap için optimum koşullarda üretilen mikrokapsüllerde olduğu belirlenirken, en az Felix O1 salınımının optimum azalma oranına sahip mikrokapsüllerde olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.32. Depolama süresince Felix O1'in yapay bağırsak ortamında mikrokapsüllerden salınım oranları (%)

	Süre (dakika)	1.gün	15. gün	30.gün
OptV	0*	0	0	0
	5	63.82±0.62	64.06±0.80	69.11±1.06
	30	73.64±3.23	81.25±0.79	80.09±0.28
	60	77.54±2.35	85.65±1.14	86.86±1.76
	90	79.95±0.29	87.11±0.89	87.98±1.18
	120	95.80±0.32	97.61±0.00	98.57±0.08
OptAO	0	0	0	0
	5	51.20±0.15	51.90±0.72	57.86±1.43
	30	61.67±4.18	64.38±0.41	69.22±0.43
	60	68.23±0.28	75.16±1.72	73.11±2.07
	90	70.93±2.42	77.88±0.18	78.45±0.34
	120	92.15±4.43	97.36±0.12	97.80±0.11
Opt3	0	0	0	0
	5	73.19±0.77	74.53±0.21	75.59±0.22
	30	76.52±1.85	76.72±3.66	76.49±2.36
	60	79.81±0.83	89.03±0.62	90.79±0.87
	90	84.86±1.06	92.11±1.59	93.79±2.77
	120	96.27±0.03	97.48±1.25	99.02±0.42

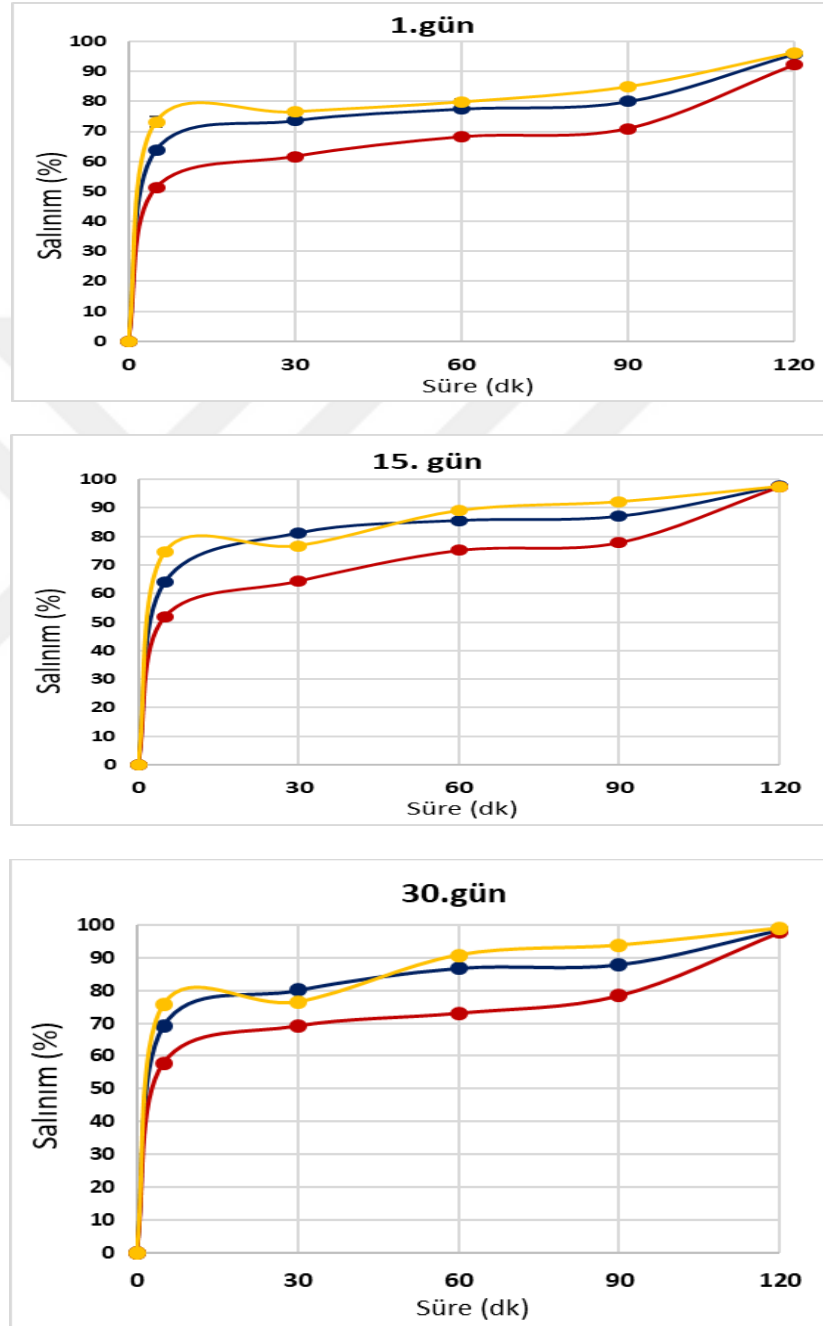
OptV: En yüksek mikrokapsül verimliliğine sahip mikrokapsüller

OptAO: pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsüller

Opt3: En yüksek mikrokapsül verimliliğine, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğuna sahip mikrokapsüller

* 0. dakika mikrokapsüllerin yapay bağırsak ortamına koyulduğu an olarak alınmış ve Felix O1 salınımının 0 olduğu varsayılmıştır.

Farklı optimum noktalarda üretilen mikrokapsüllerden 30 günlük depolama periyodunda üç farklı zamanda, yapay bağırsak ortamında bekletme süresince belirlenen Felix O1'e ait salınım oranlarındaki değişimin daha net gösterilebilmesi amacıyla hazırlanan grafik Şekil 4.8'de sunulmuştur. Şekil 4.8'de görüldüğü üzere yapay bağırsak ortamında ilk 5 dakikada mikrokapsüllerden hızlı bir Felix O1 salınımı meydana gelmekteyken ilerleyen dakikalarda Felix O1'in salınım hızı yavaşlayarak artmaktadır.



Şekil 4.8. Farklı optimum noktalarda üretilen mikrokapsüllerden 30 günlük depolama periyodunda üç farklı zamanda, yapay bağırsak ortamında bekletme süresince belirlenen Felix O1'e ait salınım oranlarındaki değişim

Yapay bağırsak ortamı içindeki mikrokapsüllerden Felix O1'in salınım oranlarının birinci dereceden kinetik model, Higuchi, Hixon-Crowell, Korsmeyer-Peppas ve Baker-Lonsdale modellerine uyumluluğu araştırılmış ve R^2 değerlerine bakılarak Felix O1 salınımının hangi modele daha fazla uygunluk gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.35). Çizelge incelendiğinde, tüm mikrokapsül çeşitleri ile depolama günlerinde Felix O1'in mikrokapsüllerden salınımının Korsmeyer-Peppas modeline uygun olduğu, R^2 değerlerinin 0.960 ile 0.995 arasında değiştiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.33. Mikrokapsüllerdeki Felix O1 salınım oranlarının birinci dereceden kinetik model, Higuchi, Hixon-Crowell, Korsmeyer-Peppas ve Baker-Lonsdale modellerine ait R^2 değerleri

Mikrokapsül çeşidi	Depolama zamanı (gün)	Birinci dereceden kinetik model	Higuchi	Baker-Lonsdale	Hixon-Crowell	Korsmeyer-Peppas
OptV	1	0.095	0.564	0.571	0.103	0.980
	15	0.114	0.579	0.587	0.124	0.995
	30	0.182	0.529	0.538	0.192	0.994
OptAO	1	0.212	0.722	0.727	0.206	0.960
	15	0.278	0.772	0.776	0.272	0.974
	30	0.118	0.676	0.681	0.111	0.967
Opt3	1	0.282	0.439	0.447	0.291	0.983
	15	0.240	0.482	0.491	0.251	0.990
	30	0.220	0.492	0.501	0.230	0.987

OptV: En yüksek mikrokapsül verimliliğine sahip mikrokapsüller

OptAO: pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsüller

Opt3: En yüksek mikrokapsül verimliliğine, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğuna sahip mikrokapsüller

Korsmeyer-Peppas modeli " $F=kt^n$ " eşitliği ile ifade edilmektedir. Eşitlikteki k ve n değerleri sırasıyla, difüzyon katsayısını ve aktif bileşenin salınım mekanizmasını belirten salınım üstelini göstermektedir. Küresel sistemler için $n \leq 0.43$ olduğu değerler, salınımın Fick difüzyon yasasına uyduğunu ve salınımın difüzyon kontrollü ile gerçekleştiğini ifade etmektedir. Felix O1'in mikrokapsüllerden salınımı Korsmeyer-Peppas modeline göre düzenlendiğinde k değerlerinin 2.55 ile 4.53 arasında; n değerlerinin ise 0.08 ile 0.19 arasında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.36). Tüm mikrokapsül çeşitleri için Felix O1 salınımının difüzyon ile gerçekleştiği saptanmıştır. En düşük difüzyon katsayısı değerleri optimum azalma oranına sahip mikrokapsüllerde belirlenirken, en yüksek difüzyon katsayısı değerlerinin her üç cevap için optimum koşullarda üretilen mikrokapsüllere ait olduğu tespit edilmiştir. Optimum verime sahip mikrokapsüller ile optimum azalma oranına sahip mikrokapsüllere ait difüzyon katsayısı değerleri depolamanın 30. gününde en yüksek değerlerine ulaşmıştır.

Çizelge 4.34. Mikrokapsüllerdeki Felix O1 salınım oranlarının Korsmeyer-Peppas modeli difüzyon katsayısı ve salınım üsteli değerleri

Mikrokapsül çeşidi	Depolama zamanı (gün)	Difüzyon katsayısı (m^2/s)	Salınım üsteli (n)
OptV	1	3.77	0.11
	15	3.86	0.12
	30	4.15	0.10
OptAO	1	2.62	0.17
	15	2.55	0.19
	30	3.08	0.15
Opt3	1	4.53	0.08
	15	4.48	0.09
	30	4.45	0.09

OptV: En yüksek mikrokapsül verimliliğine sahip mikrokapsüller

OptAO: pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsüller

Opt3: En yüksek mikrokapsül verimliliğine, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğuna sahip mikrokapsüller

4.6.2. Depolama süresince yoğurt örneklerinde Felix O1'in yapay bağırsak ortamında mikrokapsüllerden salınımı

Yoğurt örneklerindeki farklı mikrokapsüllerden Felix O1'in salınımı yapay bağırsak ortamında incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.37'de verilmiştir. Depolama süresince en az Felix O1 salınımın 1. günde % 41.50 ile optimum azalma oranına sahip mikrokapsüllerden olduğu; en fazla salınımın ise % 85.91 ile her üç cevap için optimum koşullarda üretilen mikrokapsüllerde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Farklı mikrokapsülleri içeren yoğurt örneklerinin yapay bağırsak ortamında bekletme süresi ve depolama zamanının uzamasına bağlı olarak mikrokapsüllerden salınan Felix O1 oranının arttığı belirlenmiştir (Çizelge 4.37).

Çizelge 4.35. Yoğurt örneklerinde Felix O1'in yapay bağırsak ortamında mikrokapsüllerden salınım oranları (%)

	Süre (dakika)	1.gün	15. gün	30.gün
YoptV	0*	0	0	0
	5	43.19±0.51	45.57±1.21	58.76±1.05
	30	56.71±1.55	63.86±0.27	66.93±1.52
	60	60.25±1.19	66.50±4.14	69.12±1.92
	90	64.13±0.45	70.77±0.97	70.60±3.40
	120	78.54±0.00	80.67±0.45	82.69±1.24
YoptOA	0	0	0	0
	5	41.50±1.54	44.26±0.98	48.33±1.15
	30	51.79±1.29	56.92±0.76	58.15±0.07
	60	58.90±7.89	60.65±1.73	73.88±0.14
	90	65.88±2.80	68.24±0.50	78.78±0.00
	120	73.38±1.51	76.33±0.17	80.52±3.02
Yopt3	0	0	0	0
	5	48.70±0.55	55.00±2.50	67.99±1.15
	30	64.57±0.23	67.69±2.69	77.54±1.19
	60	65.91±2.63	69.38±0.12	79.14±2.78
	90	70.05±5.24	75.00±1.51	81.37±0.42
	120	80.97±1.47	83.26±0.94	85.91±3.09

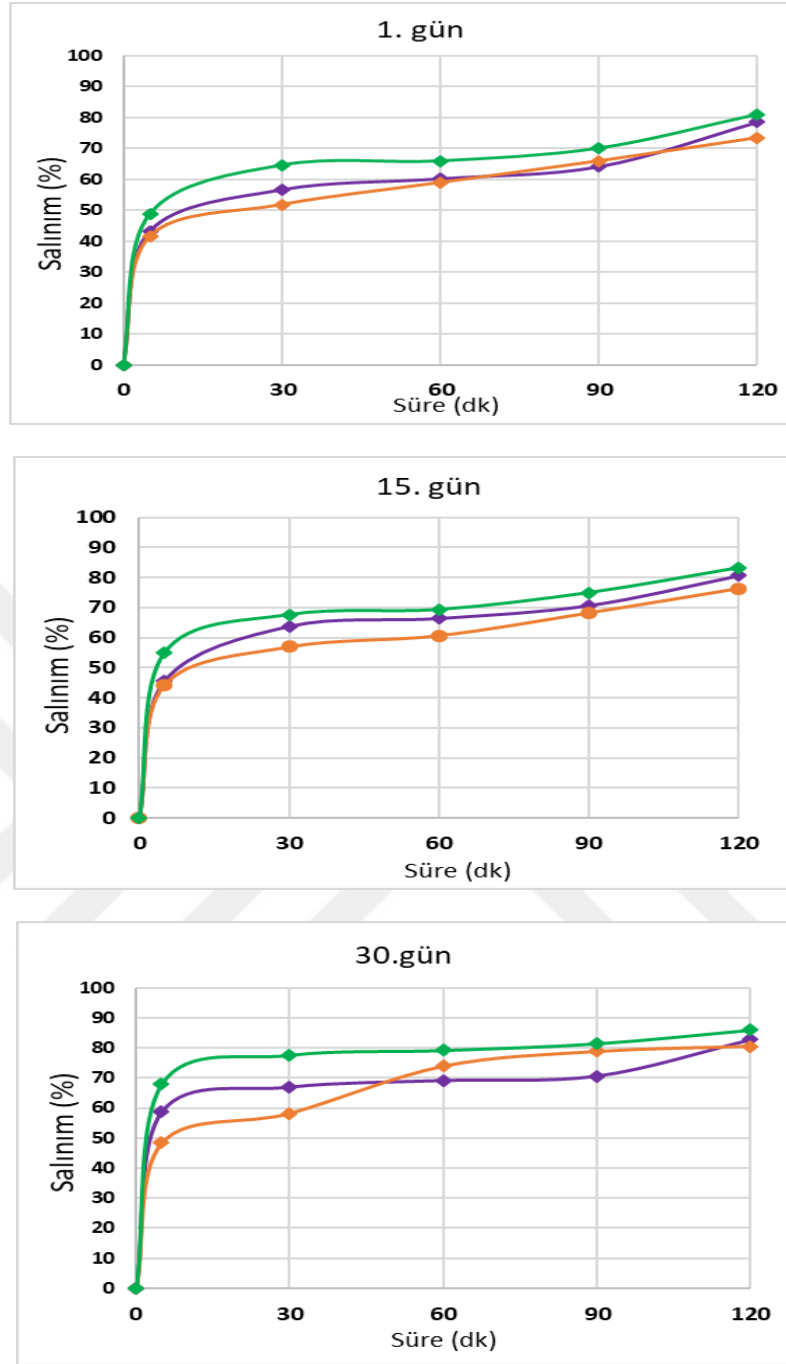
YoptV: En yüksek mikrokapsül verimliliğine sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

YoptAO: pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

Yopt3: En yüksek mikrokapsül verimliliğine, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğuna sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

* 0. dakika yoğurt örneklerinin yapay bağırsak ortamına koyulduğu an olarak alınmış ve Felix O1 salınımının 0 olduğu varsayılmıştır.

Üretiminde farklı optimum noktalarda üretilen mikrokapsüllerin kullanıldığı yoğurt örneklerinden depolama periyodunda üç farklı zamanda, yapay bağırsak ortamında bekletme süresince belirlenen Felix O1'e ait salınım oranlarındaki değişimin daha net gösterilebilmesi amacıyla hazırlanan grafik Şekil 4.9'da sunulmuştur. Şekil 4.9'da görüldüğü üzere, 1, 15 ve 30. günlerde yapay bağırsak ortamına en az salınım oranının üretiminde optimum azalma oranına sahip mikrokapsüllerin kullanıldığı yoğurt örneklerinde olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Üretiminde farklı optimum noktalarda üretilen mikrokapsüllerin kullanıldığı yoğurt örneklerinden 30 günlük depolama periyodunda üç farklı zamanda, yapay bağırsak ortamında bekletme süresince belirlenen Felix O1'e ait salınım oranlarındaki değişim

—◆— YoptV —■— YoptAO —▲— Yopt3

Mikrokapsüllerdeki Felix O1 salınımı üzerine model gıda olan yoğurdun etkisinin incelenebilmesi için mikrokapsüllerden Felix O1'in salınım oranlarının birinci dereceden kinetik model, Higuchi, Hixon-Crowell, Korsmeyer-Peppas ve Baker-Lonsdale modellerine uyumluluğu araştırılmış ve R^2 değerlerine bakılarak yoğurt içindeki mikrokapsüllerden Felix O1 salınımının hangi modele daha fazla uygunluk gösterdiği

belirlenmiştir (Çizelge 4.38). Depolama süresince yoğurt örneklerindeki mikrokapsüllerden salınan Felix O1 oranının Korsmeyer-Peppas modeline uygun olduğu, modele uygunluğun göstergesi olan R^2 değerlerinin 0.979 ile 0.999 arasında değiştiği saptanmıştır.

Çizelge 4.36. Yoğurt içerisindeki mikrokapsüllerden Felix O1 salınım oranlarının birinci dereceden kinetik model, Higuchi, Hixon-Crowell, Korsmeyer-Peppas ve Baker-Lonsdale modellerine ait R^2 değerleri

Mikrokapsül çeşidi	Depolama zamanı (gün)	Birinci dereceden kinetik model	Higuchi	Baker-Lonsdale	Hixon-Crowell	Korsmeyer-Peppas
YoptV	1	0.182	0.731	0.735	0.177	0.979
	15	0.101	0.707	0.712	0.095	0.993
	30	0.229	0.489	0.496	0.236	0.985
YoptAO	1	0.158	0.738	0.742	0.152	0.991
	15	0.143	0.721	0.725	0.138	0.991
	30	0.158	0.738	0.742	0.152	0.991
Yopt3	1	0.018	0.653	0.658	0.011	0.989
	15	0.094	0.586	0.592	0.101	0.993
	30	0.426	0.382	0.390	0.434	0.999

YoptV: En yüksek mikrokapsül verimliliğine sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

YoptAO: pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

Yopt3: En yüksek mikrokapsül verimliliğine, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğuna sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

Çizelge 4.39’da yoğurt içerisindeki mikrokapsüllerden Felix O1 salınım oranlarının Korsmeyer-Peppas modeli difüzyon katsayısı ve salınım üsteli değerleri verilmiştir. Çizelgeye göre, yoğurt örneklerindeki mikrokapsüllerden salınan Felix O1’in mikrokapsüllerden salınımı Korsmeyer-Peppas modeline göre düzenlendiğinde k değerlerinin 2.03 ile 3.75 arasında; n değerlerinin ise 0.07 ile 0.18 arasında değiştiği belirlenmiştir. Modele ait salınım üsteli değerleri incelendiğinde 0.43’den küçük oldukları ve salınımın difüzyon ile gerçekleştiği tespit edilmiştir. Optimum verimliliğe sahip mikrokapsüller ile her üç cevap için optimum koşullarda üretilen mikrokapsülleri içeren yoğurt örneklerinde yapay bağırsak ortamına salınan Felix O1’in difüzyon katsayısı değerlerinin depolama süresi ile birlikte arttığı saptanmıştır. Yoğurt içerisinde bulunmayan mikrokapsüllerle yoğurt içindeki mikrokapsüllerin difüzyon katsayısı değerleri karşılaştırıldığında, yoğurt içerisindeki mikrokapsüllerden Felix O1 salınımının daha yavaş gerçekleştiği görülmektedir.

Çizelge 4.37. Yoğurt içerisindeki mikrokapsüllerden Felix O1 salınım oranlarının Korsmeyer-Peppas modeli difüzyon katsayısı ve salınım üsteli değerleri

Mikrokapsül çeşidi	Depolama zamanı (gün)	Difüzyon katsayısı (m^2/s)	Salınım üsteli (n)
YoptV	1	2.03	0.18
	15	2.25	0.17
	30	3.13	0.09
YoptAO	1	2.19	0.18
	15	2.07	0.17
	30	2.19	0.18
Yopt3	1	2.44	0.15
	15	2.83	0.12
	30	3.75	0.07

YoptV: En yüksek mikrokapsül verimliliğine sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

YoptAO: pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

Yopt3: En yüksek mikrokapsül verimliliğine, pH değeri 2.0 olan çözelti içerisinde en düşük Felix O1 azalma oranına ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğuna sahip mikrokapsülleri içeren yoğurt örnekleri

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, Felix O1'in mikrokapsülasyonunda kullanılan sodyum aljinat ve sodyum kazeinatın karışım oranları ile mikrokapsülasyon uygulamasındaki işlem değişkenlerinden olan titreşim frekansı, en yüksek verimlilik değerine, pH 2.0'de Felix O1 sayısındaki en düşük azalma oranına ve en küçük çevre uzunluğuna sahip mikrokapsüllerin üretimi için optimize edilmiştir. Ayrıca üç farklı optimum noktada üretilen Felix O1 mikrokapsülleri yoğurt üretiminde kullanılmıştır. Serbest formdaki Felix O1 ve mikrokapsüle Felix O1'in yoğurdun bazı fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir. Gerek depolanan Felix O1 mikrokapsülleri gerekse de Felix O1 mikrokapsüllerini içeren yoğurt örnekleri yapay mide ve bağırsak ortamlarında 120 dakika bekletilmiş ve Felix O1'in aktivitesi araştırılmıştır. Bununla birlikte yapay bağırsak ortamında Felix O1'in mikrokapsüllerden salınımlarının matematik modellemesi yapılmıştır. Çalışmamız sonunda elde ettiğimiz sonuçlar aşağıda sunulmuştur:

Salmonella enterica subsp. *enterica* DSM18522'nin 37°C'de 24 saat süresince canlılığı ve optik yoğunluğu saptanmıştır. Çalışma süresince Felix O1 titresinin belirlenmesi için erken çoğalma evresi olarak *S. enterica* subsp. *enterica* DSM18522 sayısının 8.00 log kob/mL ve OD₆₀₀ değerinin 1.0 olduğu 120. dakikanın uygun olduğu değerlendirilmiştir.

Felix O1, pH değerleri 2.0, 2.5, 3.0 ve 5.0 olan çözeltiler içerisinde 60 dakika süresince tutulmuş ve pH 2.0 değerinin Felix O1 için ölümcül olduğu tespit edilmiştir.

Felix O1 bakteriyofajının mikrokapsülasyonunun optimizasyonunda kullanılan sodyum aljinat ve sodyum kazeinat oranları yapılan ön denemeler ile literatür bilgileri doğrultusunda sırasıyla % 1.0-2.0 ve % 0-3.5 aralığında belirlenirken, frekans değer aralığı 1.5-4.5 kHz olarak saptanmıştır.

Mikrokapsül üretimi sırasında çözeltideki sodyum aljinat ve sodyum kazeinat oranının artması ile birlikte mikrokapsül verimliliğinin arttığı ve sodyum kazeinat içermeyen kaplama çözeltileri ile hazırlanan mikrokapsüllerin pH 2.0 çözeltisi içerisinde Felix O1'i koruyamadığı tespit edilmiştir.

En büyük çevre uzunluğu (2.57 ± 0.19 mm) % 2.0 oranında sodyum aljinat ile % 3.5 oranında sodyum kazeinat içeren kaplama çözeltisiyle hazırlanan mikrokapsüllerde belirlenmiş olup, söz konusu değerlerde akış hızı ve titreşim frekansının laminar sıvı jetini oluşturamadığı ortaya konulmuştur.

Kaplama çözeltilerinin viskozite değerlerinin içerdikleri sodyum aljinat ve sodyum kazeinat oranının yükselmesiyle arttığı saptanmıştır. Pearson korelasyon analizi sonuçlarına göre, kaplama çözeltilerinin viskozite değerleri ile mikrokapsülasyon verimliliği arasında pozitif yönlü % 46 oranında; pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1'in azalma oranı değerleri arasında negatif yönlü % 27 ve mikrokapsüllerin çevre uzunlukları arasında pozitif yönü % 84 oranında korelasyon sağlanmıştır. Bununla birlikte kaplama çözeltilerinin viskozite değerlerinin mikrokapsüllerin morfolojik yapısını etkilediği değerlendirilmiştir.

En yüksek verimlilik değerine sahip mikrokapsülleri üretmek için frekans değerinin 1.61 kHz, kaplama çözeltisindeki sodyum aljinat ve kazeinat oranlarının sırasıyla % 1.86 ve % 3.26 olduğu; pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerdeki Felix O1'in azalma oranının en düşük olduğu optimum nokta için frekans değerinin 4.50 kHz, kaplama çözeltisindeki sodyum aljinat ve kazeinat oranlarının sırasıyla % 2.00 ve % 2.69 olduğu; en yüksek mikrokapsül verimliliği, pH 2.0'ye maruz bırakılan mikrokapsüllerde en düşük Felix O1 azalma oranı ve en küçük mikrokapsül çevre uzunluğu olmak üzere her üç cevap için optimum koşullara sahip mikrokapsülleri üretmek için frekans değerinin 4.50 kHz, kaplama çözeltisi içerisindeki sodyum aljinat ve kazeinat oranlarının sırasıyla % 1.53 ve % 2.72 olduğu nokta optimum olarak belirlenmiştir. Felix O1 içeren mikrokapsüllerde cevaplar için gerçekleştirilen doğrulama denemelerinin sonuçlarının modelden tahminlenen değerlere oldukça yakın olduğu tespit edilmiştir.

Depolama sonunda yapay mide sıvısı içinde optimum verimliliğe, optimum azalma oranına ve her üç cevap için optimum koşullara sahip mikrokapsüllerde başlangıç değerine göre Felix O1 titresindeki azalma sırasıyla 2.16, 2.11 ve 2.88 log pob/g olarak saptanmıştır. En iyi korumayı kaplama çözeltisinde en fazla sodyum aljinat içeren, optimum azalma oranına sahip mikrokapsüllerin sağladığı ortaya konmuştur. Yapay bağırsak ortamında en fazla Felix O1 salınım miktarının kaplama çözeltisinde en az sodyum aljinat içeren, her üç cevap için optimum değerlerde üretilen mikrokapsüllerde olduğu belirlenmiştir.

Tüm yoğurt örneklerinin depolama süresince pH değerlerinin düştüğü, titrasyon asitliği değerlerinin ise yükseldiği tespit edilmiştir. Mikrokapsül üretiminde kullanılan sodyum kazeinatın tamponlama etkisinden dolayı mikrokapsül içeren yoğurt örneklerinin pH değerlerinin yüksek, titrasyon asitliği değerlerinin ise mikrokapsül içermeyen yoğurt örneklerine göre daha düşük olduğu değerlendirilmiştir.

Mikrokapsül içermeyen yoğurt örneklerine göre daha yüksek pH değeri olan mikrokapsül içeren yoğurt örneklerindeki *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* sayılarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca mikrokapsüle ve serbest formdaki Felix O1'in yoğurt örneklerindeki *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ve *S. thermophilus* sayıları üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı ortaya konmuştur.

Yapay mide ortamında, depolama sonunda serbest formda Felix O1 içeren yoğurt örneklerinde Felix O1 aktivitesi tespit edilemezken, pankreatin enzimi içeren bağırsak ortamı içerisinde serbest formdaki Felix O1'in aktivitesini devam ettirebildiği saptanmıştır.

Tek başına ya da yoğurt içerisinde yapay bağırsak ortamında bekletilen mikrokapsüllerden Felix O1 salınımının Korsmeyer-Peppas modeline uyduğu ve salınımın difüzyon ile gerçekleştiği tespit edilmiştir. Yoğurdun yapay bağırsak ortamında Felix O1'in mikrokapsüllerden salınımını yavaşlattığı ve 120 dakikanın sonunda daha az oranda Felix O1 salındığı belirlenmiştir.

Gıdalarda antibakteriyel ajan olarak patojen bakterilerin kontrolü amacıyla bakteriyofajlar kullanılabilmektedir. Bununla birlikte elde ettiğimiz sonuçlar neticesinde, Felix O1'in yoğurdun fonksiyonel özelliğinin artırılmasında kullanılabileceği, böylece Felix O1'in yoğurt ile vücuda taşınabileceği ve vücut içerisinde etkin bir şekilde faaliyet

gösterebileceği ortaya konmuştur. Bundan sonraki süreçte, yapay bağırsak ortamına patojenlerden oluşan mikrobiyal flora eklenmesi ve Felix O1 ile birlikte farklı bakteriyofajları da içerecek şekilde hazırlanacak faj kokteyllerinin patojenlere karşı etkinliğinin bağırsak ortamında belirlenmesi üzerine çalışmaların yapılması gerektiği değerlendirilmiştir.



6. KAYNAKLAR

- Abeles, S.R. and Pride, D.T. 2014. Molecular bases and role of viruses in the human microbiome. *Journal of Molecular Biology*, 426: 3892-3906.
- Ackermann, H.W. 2001. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Archives Virology*, 146: 843-857.
- Ackermann, H.W. 2005. Chapter 4 Bacteriophage classification. In: Kutter, E. and Sulakvelidze, A. (Eds.). *Bacteriophages: Biology and applications*. CRC Press. Amerika Birleşik Devletleri. pp. 80-102.
- Anonim1: <https://tr.wikipedia.org/wiki/Bakteriyofaj>. [Son erişim Tarihi: 18.08.2016].
- Anonymous1: <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1020§ionid=56968775> [Son erişim tarihi: 10.04.2019].
- Anonymous 2: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. Scientific report. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/european-union-summary-report-trends-and-sources-zoonoses-zoonotic-agents-and-10> [Son erişim tarihi: 10.04.2019].
- Anonymous3: https://www.dsmz.de/fileadmin/Bereiche/Microbiology/Dateien/Kultivierungshinweise/PDF_Internet_Propagation_of_Phages13.pdf [Son erişim tarihi: 10.04.2019].
- Arifin, D.Y., Lee, L.Y. and Wang, C.H. 2006. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58: 1274-1325.
- Aydın, R.S.T. and Pulat, M. 2012. 5-Fluorouracil encapsulated chitosan nanoparticles for pH-stimulated drug delivery: evaluation of controlled release kinetics. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Nanomaterials*, 2012: 1-10.
- Beke, G., Stano, M. and Klucar, L. 2016. Modelling the interaction between bacteriophages and their bacterial hosts. *Mathematical Biosciences*, 279: 27-32.
- Bell, R.L., Jarvis, K.G., Ottesen, A.R., McFarland, M.A. and Brown, E.W. 2016. Recent and emerging innovations in Salmonella detection: a food and environmental perspective. *Microbial Biotechnology*, 9: 279-292.
- Champagne, C.P., Raymond, Y., Guertin, N., Martoni, C.J., Jones, M.L., Mainville, I. and Arcand, Y. 2015. Impact of a yogurt matrix and cell microencapsulation on the survival of *Lactobacillus reuteri* in three in vitro gastric digestion procedures. *Beneficial Microbes*, 6 (5): 753-763.
- Chatain, M.H.L. 2014. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in Microbiology*, 5 (51): 1-6.

- Ching, S.H., Bhandari, B., Webb, R. and Bansal, N. 2015. Visualizing the interaction between sodium caseinate and calcium alginate microgel particles. *Food Hydrocolloids*, 43: 165-171.
- Coburn, B., Grassl, G.A. and Finlay, B.B. 2007. Salmonella, the host and disease: A brief review. *Immunology and Cell Biology*, 85: 112-118.
- Coghetto, C.C., Brinques, G.B., Siqueira, N.M., Pletsch, J., Soares, R.M.D. and Ayub, M.A.Z. 2016. Electrospraying microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* enhances cell viability under refrigeration storage and simulated gastric and intestinal fluids. *Journal of Functional Foods*, 24: 316-326.
- Cook, M.T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D. and Khutoryanskiy, V.V. 2012. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162: 56-67.
- 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.
- Costa, P. and Lobo, J.M.S. 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13: 123-133.
- Çelik, B. 2017. Çoğul dirençli *Acinetobacter baumannii* suşuna özgü litik bakteriyofaj araştırılması. Yüksek lisans tezi. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Sivas. 64 s.
- Çomak Göçer, E.M., Aşçı Arslan, A., Küçükçetin, A. ve Ergin, F. 2013. Probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyonu. *Yetişkin ve Çocuklarda Probiyotikler*, 1 (1): 33-37.
- Dalmasso, M., Hill, C. and Ross, R.P. 2014. Exploiting gut bacteriophages for human health. *Trends in Microbiology*, 22 (7): 399-405.
- Dash, S., Murthy, P.N., Nath, L. and Chowdhury, P. 2010. Kinetic modelling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica and Drug Research*, 67 (3): 217-223.
- Davidov-Pardo, G. and McClements, D.J. 2014. Resveratrol encapsulation: Designing delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues. *Trends in Food Science & Technology*, 38 (2): 88-103.
- Denou, E., Bruttin, A., Barretto, C., Ngom-Bru, C., Brüßow, H. and Zuber, S. 2009. T4 phages against *Escherichia coli* diarrhea: Potential and problems. *Virology*, 388: 21-30.

- Dini, C., Islan, G. A., de Urraza, P. J. and Castro, G. R. 2012. Novel biopolymer matrices for microencapsulation of phages: Enhanced protection against acidity and protease activity. *Macromolecular Bioscience*, 12: 1200-1208.
- Düzgüneş, O., Kesici, T., Kavuncu, O. ve Gürbüz, F. 1987. Araştırma ve Deneme Metotları (İstatistik II). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No:1021, Ankara, 381 ss.
- El Haddad, L., Roy, J.P., Khalil, G.E., St-Gelais, D., Champagne, C.P., Labrie, S. and Moineau, S. 2016. Efficacy of two *Staphylococcus aureus* phage cocktails in cheese production. *International Journal of Food Microbiology*, 217: 7-13.
- El Haddad, L., Lemay, M.J., Khalil, G.E., St-Gelais, D., Moineau, S. and Champagne, C.P. 2018. Microencapsulation of a *Staphylococcus* phage for concentration and long-term storage. *Food Microbiology*, 76: 304-309.
- Endersen, L., Coffey, A., Neve, H., McAuliffe, O., Ross, R.P. and 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.
- Ergin, F. 2013. Farklı sıcaklık-süre kombinasyonlarında ısıl strese maruz bırakılan *Lactobacillus acidophilus*'un dondurma üretiminde kullanımının araştırılması. Yüksek lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya, 72 ss.
- Esteban, P.P., Jenkins, A.T. and 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.
- Estevinho, B.N. and Rocha, F. 2018. Chapter 7 Application of biopolymers in microencapsulation processes. Grumezescu, A.M. and Holban, A.M. (Eds.). *Biopolymers for Food Design*. Academic Press. Birleşik Krallık. pp. 191-222.
- Fatica, M.K. and Schneider, K.R. 2011. Salmonella and produce: survival in the plant environment and implications in food safety. *Virulence*, 2: 573-579.
- Gaonkar, A.G., Vasisht, N., Khare, A.R. and Sobel, R. 2014. Microencapsulation in the food industry a practical implementation guide. Academic Press, Birleşik Krallık. pp. 590.
- Gaudio, P.D., Colombo, P., Colombo, G., Russo, P. and Sonvico, F. 2005. Mechanisms of formation and disintegration of alginate beads obtained by prilling. *International Journal of Pharmaceutics*, 302: 1-9.
- Gaudio, P.D., Russo, P., Lauro, M.R., Colombo, P., and Aquino, R.P. 2009. Encapsulation of ketoprofen and ketoprofen lysinate by prilling for control of drug release. *AAPS Pharmaceutical Science Technology*, 10 (4): 1178-1185.

- Goh, C.H., Heng, P.W.S. and Chan, L.W. 2012. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, 88: 1-12.
- Goh, K.K.T., Sarkar, A. and Singh, S. 2014. Chapter 13 Milk protein-polysaccharide interactions. Taylor. S.L. (Ed.). Milk proteins. Elsevier Inc. Yeni Zelenda. pp. 393-396.
- Gouvea, D.M., Mendonça, R.C.S., Lopez, M.E.S. and 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.
- Guenther, S., Herzig, O., Fieseler, L., Klumpp, J. and Loessner, M.J. 2012. Biocontrol of *Salmonella typhimurium* in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. *International Journal of Food Microbiology*, 154: 66-72.
- Guttman, B., Raya, R. and Kutter, E. 2005. Chapter 3 Basic phage biology. In: Kutter, E. and Sulakvelidze, A. (Eds.). Bacteriophages: Biology and applications. CRC Press. Amerika Birleşik Devletleri. pp. 43-79.
- Haque, A., Richardson, R.K. and Morris, E.R. 2001. Effect of fermentation temperature on the rheology of set and stirred yogurt. *Food Hydrocolloids*, 15 (4-6): 593-602.
- Harper, D. R., Mcconville, M., Anderson, F. J. and 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.
- Harzadın, M. A. 2015. Selülozun diyabet, kolesterol ve tansiyon sınıfına ait bazı ilaçların kontrollü salımında kullanılması ve ilaç etkileşimlerinin deneysel ve teorik olarak incelenmesi. Doktora tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 603 ss.
- Heidebach, T., Forst, P. and Kulozik, U. 2009. Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells. *International Dairy Journal*, 19: 77-84.
- Heidebach, T: Forst, P. and Kulozik, U. 2012. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*. 23: 1670-1677.
- Heinzen, C., Berger, A. and Marison, I. 2004. Use of vibration technology for jet break - up for encapsulation of cells, microbes and liquids in monodisperse microcapsules. In: Nedovic, V. and Willaert, R. (Eds). Fundamentals of cell immobilisation Technology. Kluwer Academic Publishers. Hollanda. pp. 257-275.
- IDF. 1986. Milk Determination of Nitrogen (Kjeldahl Method) and Calculation of Crude Protein Content. International Dairy Federation Standard 20A, Belgium
- IDF. 1987. Milk, Cream and Evaporated Milk. Determination of Total Solids Content. Reference Method. International Dairy Federation Standard 21B, Belgium

- IDF. 1991. Yogurt-Determination of Titratable Acidity. International Dairy Federation Standard 150, Belgium
- IDF. 2003. Yogurt-Identification of Characteristic Microorganisms (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*). International Dairy Federation Standart 146, Belgium
- İnal, M. 2007. Sodyum aljinat ve vinil pirolidon aşılannmış sodyum aljinat kürelerden indomethasinin kontrollü salımı. Yüksek lisans tezi, Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale, 99 ss.
- Jamalludeen, N., Johnson, R.P., Shewen, P.E. and 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.
- Kailasapathy, K. 2002. Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. *Current Issues Intestinal Microbiology*, 3: 39-48.
- Kim, S.J., Ahn, J., Seok, J.S and Kwak, H.S. 2003. Microencapsulated iron for drink yogurt fortification. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16 (4): 581-587.
- Kim, S., Jo, A. and Alın, J. 2015. Application of chitosan–alginate microspheres for the sustained release of bacteriophage in simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 50: 913-918.
- Kittler, S., Wittmann, J., Mengden, R.A.L.P., Klein, G., Rohde, C. and Lehnher, H. 2017. The use of bacteriophages as one-health approach to reduce multidrug-resistant bacteria. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 5: 80-83.
- Koch, S., Schwinger, C., Kressler, J., Heinzen, C. and Rainov, N.G. 2003. Alginate encapsulation of genetically engineered mammalian cells: Comparison of production devices, methods and microcapsule characteristics. *Journal of Microencapsulation*, 20 (3): 303-316.
- Kurt, A., Çakmakcı, S. ve Çağlar, A. 1993. Süt ve Mamulleri Muayene ve Analiz Metotları Rehberi. Atatürk Üniversitesi Yayınları No:252, Erzurum, 238 ss.
- Leong, J.Y. et al. 2016. Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. *Particuology*, 24: 44-60.
- Lindberg, A.A and Holme, T. 1969. Influence of O side chains on the attachment of the Felix 0-1 bacteriophage to Salmonella bacteria. *Journal of Bacteriology*, 99 (2): 513-519.

- Liu, H., Niu, Y.D., Meng, R., Wang, J., Li, J., Johnson, R.P. McAllister, T.A. and 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.
- Lu, D.R., Abu-Izza, K. and Mao, F. 1996. Nonlinear data fitting for controlled release devices: an integrated computer program. *International Journal of Pharmaceutics*, 129: 243-251.
- Ma, Y., Pacan, J.C., Wang, Q., Xu, Y., Huang, X., Korenevsky, A. and Sabour, P.M. 2008. Microencapsulation of bacteriophage Felix O1 into chitosan-alginate microspheres for oral delivery. *Applied and Environmental Microbiology*, 8: 799-805.
- Ma, Y., Pacan, J.C., Wang, Q., Sabour, P.M., Huang, X. and Xu, Y. 2012. Enhanced alginate microspheres as means of oral delivery of bacteriophage for reducing *Staphylococcus aureus* intestinal carriage. *Food Hydrocolloids*, 26: 434-440.
- Martín, M.J., Villoslada, F.L., Ruiz, M.A. and Morales, M.E. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27: 15-25.
- Matos-Jr. F.E.d., Silva. M.P.D., Kasemodel M.G.C., Santos. T.T. Burns. P., Reinheimer. J., Viderola. G. and Trindade. Evaluation of the viability and the preservation of the functionality of microencapsulated *Lactobacillus paracasei* BGP1 and *Lactobacillus rhamnosus* 64 in lipid particles coated by polymer electrostatic interaction. *Journal of Functional Foods*, 54: 98-108.
- Maresca, D., De Prisco, A., La Storia, A., Cirillo, T., Esposito, F. and Mauriello, G. 2016. Microencapsulation of nisin in alginate beads by vibrating technology: Preliminary investigation. *LWT - Food Science and Technology*, 66: 436-443.
- Messaoud, G.B., González, L.S., Jacquot, A., Probst, L. and Desobry, S. 2015. Alginate/sodium caseinate aqueous-core capsules: A pH-responsive matrix. *Journal of Colloid and Interface Science*, 440: 1-8.
- Motwani, S.K., Chopra, S., Talegaonkar, S., Kohli, K., Ahmad, F.J. and Khar, R.K. 2008. Chitosan-sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: Formulation, optimization and *in vitro* characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68: 513-525.
- Mutlu, N. 2015. Çevresel örneklerden *Listeria monocytogenes*'e özgü faj izolasyonu ve genotipik karakterizasyonu. Doktora tezi, Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars. 71 s.
- Nobrega, F., Costa, A., Kluskens, L. and Azeredo, J. 2015. Revisiting phage therapy: new applications for old resources. *Trends in Microbiology*, 23 (4): 185-191.

- O'Flaherty, S., Coffey, A., Meaney, W.J., Fitzgerald, G.F. and Ross, R.P. 2005. Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 274-279.
- Oliveira, M., Viñas, I., Colàs, P., Anguera, M., Usall, J. and Abadias, M. 2014. Effectiveness of a bacteriophage in reducing *Listeria monocytogenes* on fresh-cut fruits and fruit juices. *Food Microbiology*, 38: 137-142.
- Orlova, E.V. 2012. Chapter 1 Bacteriophages and their structural organisation. In: Kurtböke, İ. (Ed.). Bacteriophages. InTech. Croatia. pp. 3-9.
- Oysun, G. 1991. Süt Ürünlerinde Analiz Yöntemleri. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Basımevi, İzmir, 230 ss.
- Öncel, P. 2013. İlaç salımı için moleküler baskılanmış kriyojel membranlar. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 73 ss.
- Peppas, N.A. and Sahlin J.J. 1989. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal of Pharmaceutics*, 57: 169-172.
- Pinto, S.S., Cavalcante, B.D.C., Verruck, S., Alves, L.F., Prudeancio, E.S. and Amboni, R.D.M.C. 2017. Effect of the incorporation of Bifidobacterium BB-12 microencapsulated with sweet whey and inulin on the properties of Greek-style yogurt. *Journal of Food Science Technology*, 54 (9):2804-2813.
- Pulit, A.C., Mitula, P., Sliwka, P., Laba, W. and Skaradzinska, A. 2015. Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, 45: 212-221.
- Ranadheera, C.S., Liyanaarachchi, W.S., Chandrapala, I., Dissanayake, M. and Vasiljevic, T. 2016. Utilizing unique properties of caseins and the casein micelle for delivery of sensitive food ingredients and bioactives. *Trends in Food Science & Technology*, 57: 178-187.
- Rayleigh, F.R.S. 1879. On the capillary phenomena of jets. *Proceedings of the London Mathematical Society*, 10: 71-97.
- Ribeiro, M.C.E., Chaves, K.S., Gebara, C., Infante, F.N.S., Grosso, C.R.F. and Gigante, M.L. 2014. Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. *Food Research International*, 66: 424-431.
- Ribeiro, A.M, Estevinho, B.N. and Rocha, F. 2019. Microencapsulation of polyphenols - the specific case of the microencapsulation of *Sambucus Nigra* L. extracts - A review. *Trends in Food Science & Technology*, Accepted Manuscript.

- Sağlam, S. 2014. Tavuk işletmelerinden ve tavuk etlerinden izole edilen *Listeria* spp.'ler üzerine Listex[™] P100 bakteriyofajının etkisi. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 73 ss.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 2001. Molecular Cloning-A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Chapter 2, Protocol:1, 1448 pp.
- Samtlebe, M., Ergin, F., Wagner, N., Neve, H., Küçükçetin, A., Franz, C.M.A.P., Heller, K.J., Hinrichs, J. and 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.
- Serp, D., Cantana, E., Heinzen, C., von Stockar, U. and Marison, I.W. 2000. Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization. *Biotechnology and Bioengineering*, 70 (1): 41-53.
- Shafiei, Y. 2018. Probiotic and synbiotic yogurt production using free or alginate/resistant starch microencapsulated *Lactobacillus plantarum*. *Role of Materials Science in Food Bioengineering*, 301-328.
- Shi., L.E, Li, Z.H., Li, D.T., Xu, M., Chen, H.Y., Zhang, Z.L. and Tang, Z.X. 2013. Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate-milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Engineering*, 117: 99-104.
- Shihata, A. and Shah, N.P. 2002. Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria. *International Dairy Journal*, 12 (9): 765-772.
- Silva, P.I., Stringheta, P.C., Teófilo, R.F. and 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.
- Singla, S., Harjai, K., Raza, K., Wadhwa, S., Katore, O.P. and Chhibber, S. 2016. Phospholipid vesicles encapsulated bacteriophage: A novel approach to enhance phage biodistributions. *Journal of Virological Methods*, 236: 68-76.
- Sliwka, P., Mitula, P., Mitula, A., Skaradzinski, G., Pulit, A.C., Niezgoda, N., Dabrowska, B.W., Zaczek, M. and Skaradzinski A. 2019. Encapsulation of bacteriophage T4 in mannitol-alginate dry macrospheres and survival in simulated gastrointestinal conditions. *LWT- Food Science and Technology*, 99: 238-243.
- Soykut, E.A., Tayyarcı, E.K., Evran, Ş., Boyacı, İ.H., Çakır, İ., Khaaladi, M. and Fattouch, S. 2019. Microencapsulation of phages to analyze their demeanor in physiological conditions. *Folia Microbiologica*, 1-13.

- Snyder, A.B., Perry, J.J. and 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.
- Stanford, K., Mcallister, T.A., Niu, Y.D., Stephens, T.P., Mazzocco, A., Waddell, T.E. and 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.
- Tang, Z., Huang, X., Baxi, S., Chambers, J.R., Sabour, P.M. and Wang, Q. 2013. Whey protein improves survival and release characteristics of bacteriophage Felix O1 encapsulated in alginate microspheres. *Food Research International*, 52: 460-466.
- Tang, Z., Huang, X., Sabour, P. M., Chambers, J.R. and 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.
- Tanji, Y., Shimada, T., Fukudomi, H., Miyanaga, K., Nakai, Y. and 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.
- Taş, B. 2018. *Salmonella* Typhimurium ve *Escherichia coli* O157:H7'nin sütte gelişimi üzerine bakteriyofajların etkisi. Yüksek lisans tezi. Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Niğde. 54 s.
- Terrassa, N.C.P. 2012. Modelling drug delivery mechanisms for microencapsulated substances applied on textile substracts. PhD. thesis, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, 176 pp.
- TS 1018. 1994. Çiğ İnek Sütü Standardı. Türk Standartları Enstitüsü, Ankara ,14 ss.
- Tsonos, J., Vandenheuvel, D., Briers, Y., De Greve, H., Hernalsteens, J.P. and Lavigne, R. 2014. Hurdles in bacteriophage therapy: Deconstructing the parameters. *Veterinary Microbiology*, 171: 460-469.
- Uzun, İ.N. 2011. Süperkritik mikronizasyon yöntemleriyle kontrollü ilaç salımına yönelik ilaç-polimer kompozit mikrotaneciklerinin hazırlanması. Doktora tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 239 ss.
- Üre, M.A. 2018. Kars yöresinde kazlarda *Salmonella* enteritidis antikorlarının Elisa ile araştırılması. Yüksek lisans tezi. Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kars. 53 ss.
- Vinner, G.K. and Malik, D.J. 2018. High precision microfluid microencapsulation of bacteriophages for enteric delivery. *Research in Microbiology*, 169: 522-530.

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

Yoğurtçu, H. 2018. Yanıt yüzey metodu kullanarak mikrodalga ile elma kurutmanın optimizasyonu. *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 1-17.

Whelehan, M. and Marison, I.W. 2011. Microencapsulation using vibrating technology. *Journal of Microencapsulation*, 28 (8): 669-688.

Whichard, J.M. et al. 2010. Complete genomic sequence of bacteriophage Felix O1. *Viruses*, 2: 710-730.



ÖZGEÇMİŞ

FİRUZE ERGİN

fergin@akdeniz.edu.tr



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2014-2019	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya
Yüksek Lisans 2011-2014	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya
Lisans 2006-2010	Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Denizli

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi 2015-Devam Ediyor	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya
--	---

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Gürsoy O, Küçükçetin, A., Gökçe Ö., ERGİN F., Kocatürk, K. 2018. Physicochemistry, microbiology, fatty acids composition and volatile profile of traditional Söğle tulum (goat's skin bag) cheese. Anais Da Academia Brasileira de Ciências, 90(4), 3661-3674

2. Tontul İ., ERGİN F., Eroglu E., Küçükçetin A., Topuz A. 2018. Physical and microbiological properties of yoghurt powder produced by refractance window drying. International Journal of Dairy Technology, 85, 169-176

3. Samtlebe, M., ERGİN, 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, 334-342

4. ERGİN F., Atamer Z., Arslan A.A., Çomak Göçer E.M., Demir M., Samtlebe M., et al. 2016. Application of cold- and heat-adapted *Lactobacillus acidophilus* in the manufacture of ice cream, International Dairy Journal, 59, 72-79

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

5. ERGİN F., Küçükçetin, A. 2018. UHT İçme sütlerinde jelleşme sorunu: Enzimlerin etkisi. Akademik Gıda, 16(3), 313-322

6. ERGİN F., Yıldız G., Çomak Göçer E.M., Küçükçetin A. 2017. Bakteriyofajların antibakteriyel ajan olarak kullanımı. Akademik Gıda, 15, 172-181

7. ERGİN F., Oz, G., Özmen, Ü., Erdal, Ş., Çavana, E., Küçükçetin, A. 2017. Sütün homojenizasyonunun kefirin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkisi. Akademik Gıda, 15 (4) 368-376

8. Çomak Göçer E.M., ERGİN F., Arslan A.A., Küçükçetin A. 2106. Farklı inkübasyon sıcaklığı ile inkübasyon sonlandırma pH'sının probiyotik yoğurdun fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkisi. Akademik Gıda, 14, 341-350

9. Çomak Göçer E.M., ERGİN F., Küçükçetin A. 2016. Sindirim sistemi modellerinde probiyotik mikroorganizmaların canlılığı. Akademik Gıda, 14, 158-165

10. ERGİN F., Çomak Göçer E.M., Arslan A.A., Küçükçetin A. 2015. Probiyotikler ile ilgili yasal düzenlemeler. Akademik Gıda, 13, 229-236

11. ERGİN F., Çomak Göçer E.M., Aşci Arslan A., Küçükçetin A. 2013. Probiyotik bakterilerin yüksek sıcaklık stresine karşı adaptasyon mekanizmaları. Akademik Gıda, 11, (3-4), 63-69

12. Çomak Göçer E.M., Aşci Arslan A., ERGİN F., Küçükçetin A. 2013. Probiyotik bakterilerin mikroenkapsülasyonu. Yetişkin ve Çocuklarda Probiyotikler, 1, 33-37

13. ERGİN F., Çomak Göçer E.M., Aşci Arslan A., Küçükçetin A. 2012. Probiyotik bakterilerin düşük sıcaklık stresine adaptasyonu. Akademik Gıda, 10, 65-69

Uluslararası ve ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler :

14. ErKaymaz T., ERGİN F., Yıldız G., Küçükçetin, A. 2018. Determination of milk proteins in dairy products by analytical methods. 13th International Conference of Food Physicists. Antalya, TÜRKİYE, 23-25 Ekim, 60-63
15. Kocabaş H., ERGİN F., Çomak Göçer E.M., Küçükçetin, A. 2018. The low-lactose yoghurt. 13th International Conference of Food Physicists. Antalya, TÜRKİYE, 23-25 Ekim, 107
16. ERGİN F., Kocabaş H., Çomak Göçer E.M., Küçükçetin, A. 2018. The usage of centrifuge technique in concentrated yoghurt production. 13th International Conference of Food Physicists. Antalya, TÜRKİYE, 23-25 Ekim, 108
17. ERGİN F., Çomak Göçer E.M., Demir M., Küçükçetin, A. 2018. The effects of different microencapsulation methods on viability of *Lactobacillus acidophilus* in gastrointestinal media. 13th International Conference of Food Physicists. Antalya, TÜRKİYE, 23-25 Ekim, 109
18. Çomak Göçer E.M., ERGİN F., Küçükçetin, A. 2018. Breast Milk Microbiota. 3.rd World Summit & Expo on Food Technology and Probiotics. Prag, ÇEK CUMHURİYETİ, 25-26 Ekim, 46
19. ERGİN F., Çomak Göçer E.M., Küçükçetin, A. 2018. Probiotic edible film from milk proteins. 3.rd World Summit & Expo on Food Technology and Probiotics. Prag, ÇEK CUMHURİYETİ, 25-26 Ekim, 47
20. Küçükçetin, A., ERGİN F. 2018. Süt, yoğurt ve probiyotik yoğurtlarda şeker efsanelerine bilimsel bakış. 5. Ulusal Bağırsak Mikrobiyotası ve Probiyotik Kongresi. Antalya, TÜRKİYE, 11-14 Ekim, 35
21. ERGİN F., Çomak Göçer E.M., Yıldız G., Küçükçetin, A. 2018. Adaptation mechanisms of probiotic bacteria to osmotic stress. 3.rd International Congress on Food Technology. Nevşehir, TÜRKİYE, 10-12 Ekim, 152
22. Yıldız G., ERGİN F., ErKaymaz T., Küçükçetin, A. 2018. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in dairy products. 3.rd International Congress on Food Technology. Nevşehir, TÜRKİYE, 10-12 Ekim, 165
23. ERGİN F., Yıldız G., ErKaymaz T., Çomak Göçer E.M., Küçükçetin, A. 2018. Influence of cold and heat adaptation treatments on fatty acid composition of *Lactobacillus acidophilus* cell membrane. 3.rd International Congress on Food Technology. Nevşehir, TÜRKİYE, 10-12 Ekim, 164
24. ERGİN F., Kızılay H.K., Demir M., Küçükçetin, A. 2018. Biofouling problem in dairy processing industry. 3.rd International Congress on Food Technology. Nevşehir, TÜRKİYE, 10-12 Ekim, 153

25. ERGİN F., Temur Y., Yaramışlı, S., Küçükçetin, A. 2018. Preservation methods for microorganisms in kefir grains. Euro Global Conference on Food Science, Agronomy and Technology. Roma, İTALYA, 20-22 Eylül, 96-97
26. ERGİN F., ErKaymaz T., Yıldız G., Küçükçetin, A. 2018. Organik ve Konvansiyonel Uygulamalarla Üretilen Sütlerin Eser Element İçeriği Açısından Karşılaştırılması. International Trace Anaysis Congress. Sivas, TÜRKİYE, 20-23 Haziran, 205
27. ERGİN F., Gökçe Ö., Küçükçetin A., Gürsoy O. 2018. Potential Usage of Bacteriophages as Antibacterial Agents in Cheese Production. 1st International Health Science and Life Congress. Burdur, TÜRKİYE, 2-5 Mayıs, 430
28. ERGİN F., Küçükçetin A., Çomak Göçer E.M. 2018. Microflora of kefir grains from different origins. The 4th International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus. Girne, KUZHEY KIBRIS TÜRK CUMHURİYETİ, 19-21 Nisan, 289
29. Küçükçetin A., ErKaymaz T., ERGİN F., Yıldız G. 2018. Determination of Milk Adulteration in Dairy Products Using Chromatographic Techniques. The 4th International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus. Girne, KUZHEY KIBRIS TÜRK CUMHURİYETİ, 19-21 Nisan, 250
30. Küçükçetin A., ERGİN F., Çomak Göçer E.M. 2018. Physicochemical and microbiological properties of Kuru Kaymak (A traditional Turkish Dry Clotted Cream). The 4th International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus. Girne, KUZHEY KIBRIS TÜRK CUMHURİYETİ, 19-21 Nisan, 293
31. ERGİN F., ErKaymaz T., Atamer Z., Hinrichs J., Küçükçetin A. 2018. The methods used in determination of adulteration of milk species during cheese production. Proceedings of the 10th Cheese Symposium. Rennes, FRANSA, 4-6 Nisan, 188
32. ERGİN F., Yıldız G., Çomak Göçer E.M., Demir M., Küçükçetin A. 2017. Stres Koşullarına Adaptasyonu Sağlanan Probiyotik Bakterilerin Süt Ürünlerinde Kullanım Olanakları. 1. Ulusal sütçülük kongresi, ANKARA, TÜRKİYE, 25-26 Mayıs, 35
33. Küçükçetin A., ERGİN F., Yıldız G., Çomak Göçer E.M. 2017. Gıdalarda T Bakteriyofajının Kullanımı ile İlgili Yasal Düzenlemeler. 1. Tarım ve Gıda Etiği Kongresi, ANKARA, TÜRKİYE, 10-11 Mart, 443-450
34. Çomak Göçer E.M., ERGİN F., Yıldız G., Küçükçetin A. 2017. Biofilms of Probiotics. 6th International Congress on Food Technology, Atina, YUNANİSTAN, 18-19 Mart, 45
35. Yalçın S., ERGİN F., Çomak Göçer E.M., Demir M., Küçükçetin A. 2017. The Potential Applications of Lactobionic Acid and Its Production methods. 6th International Congress on Food Technology, Atina, YUNANİSTAN, 18-19 Mart, 6-6
36. Yıldız G., ERGİN F., Çomak Göçer E.M., Küçükçetin A., "Effect of Heat Treatment on Organophosphorous Pesticides in milk", 6th International Congress on Food

Technology, Atina, YUNANİSTAN, 18-19 Mart 2017, pp.65-65

37. ERGİN F., Çomak Göçer E.M., Yıldız G., Demir M., Küçükçetin A., "The acid adaptation of *bifidobacterium bifidum* dsm 20456 and *bifidobacterium animalis subsp. lactis* bb12", 6th international congress on food technology, Atina, YUNANİSTAN, 18-19 Mart 2017, pp.116-116
38. ERGİN F., Çomak Göçer E.M., Yıldız G., Küçükçetin A., "β-galaktosidaz Enziminin Mikrokapsülasyonu", 1. Ulusal sütçülük kongresi, ANKARA, TÜRKİYE, 25-26 Mayıs 2017, ss.118-118
39. ERGİN F., Çomak Göçer E.M., Yıldız G., Demir M., Küçükçetin A., "The Effects of Different Drying Methods and Physiological states of The Cells on Viability of Dried Probioticmicroorganisms", 6th International Congress On Food Technology, Atina, YUNANİSTAN, 18-19 Mart 2017, pp.117-117
40. Küçükçetin A., Al M., ERGİN F., Çomak Göçer E.M., "Glikomannanların Özellikleri ve Gıda Endüstrisinde Kullanımı", Türkiye 12. Gıda Kongresi, EDİRNE, TÜRKİYE, 5-7 Ekim 2016, ss.257-257
41. ERGİN F., Çomak Göçer E.M., Demir M., Küçükçetin A., "Gıdaların Ambalajlanmasında Bakteriyofajların Antimikrobiyal Ajan Olarak Kullanım", 1. Uluslararası Turizm ve Mikrobiyal Gıda Güvenliği Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 21-23 Nisan 2016, pp.1-1
42. ERGİN F., Çomak Göçer E.M., Demir M., Küçükçetin A., "Patojen Bakterilerin Tespitinde Akıllı Telefonların Kullanımı", I. Uluslararası Turizm ve Mikrobiyal Gıda Güvenliği Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 21-23 Nisan 2016, pp.2-2
43. Çomak Göçer E.M., ERGİN F., Demir M., Küçükçetin A., "Deve Sütü ve Önemi", I. Uluslararası Turizm ve Mikrobiyal Gıda Güvenliği Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 21 Nisan - 23 Haziran 2016, pp.2-2
44. Karahançer H., ERGİN F., Çomak Göçer E.M., Küçükçetin A., "Probiyotik Mikroorganizmaların Peynir Üretiminde Kullanımı", Türkiye 12. Gıda Kongresi, EDİRNE, TÜRKİYE, 5-7 Ekim 2016, ss.272-272
45. ERGİN F., Atamer Z., Arslan A.A., Çomak Göçer E.M., Demir M., Samtlebe M., et al., "Verbesserte Viabilität temperaturadaptierter Lactobacillus acidophilus kulturen in speiseeiserzeugnissen", 16. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie, Stuttgart, ALMANYA, 30 Mart - 1 Nisan 2016, pp.61-61
46. ERGİN F., Çomak Göçer E.M., Atamer Z., Samtlebe M., Hinrichs J., Küçükçetin A., "Bacteriophages as Biocontrol Agent for Preserving Food Products of Animal Origin", International Congress on Food of Animal Origin, Girne, KUZEY KIBRIS TÜRK CUM., 10-13 Kasım 2016, pp.64-64
47. Çomak Göçer E.M., ERGİN F., Küçükçetin A., "Küresel Gıda Güvenliği

Kuruluşları", I. Uluslararası Turizm ve Mikrobiyal Gıda Güvenliği Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 21-23 Nisan 2016, pp.36-36

48. Demir M., Küçükçetin A., ERGİN F., Çomak Göçer E.M., "Effect of Heat Treatment and Dry Matter of Skim Milk on The Physical Properties of A Yogurt Drink", 12th International conference of food physicists, Debrecen, MACARİSTAN, 6-9 Temmuz 2016, pp.17-17
49. ERGİN F., Yalçın S., Çomak Göçer E.M., Demir M., Küçükçetin A., "Physicochemical and Sensory Properties of Yogurt as Influenced By Addition of Whey Protein Concentrate And Whey Powder", 12th International conference of food physicists, Debrecen, MACARİSTAN, 6-8 Temmuz 2016, pp.39-39
50. ERGİN F., Aşçı Arslan A., Çomak Göçer E.M., Küçükçetin A., "Effect of Different Starter Cultures on Physicochemical and Sensorial Properties of Fermented Dairy Drink", 7th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods, İSTANBUL, TÜRKİYE, 14-17 Ekim 2014, pp.257-257
51. Aşçı Arslan A., Çomak Göçer E.M., ERGİN F., Küçükçetin A., "Milk Derived Cationic Antimicrobial Peptides", 7th International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods, İSTANBUL, TÜRKİYE, 14-17 Ekim 2014, pp.268-268
52. Atamer Z., ERGİN F., Samtlebe M., Çomak Göçer E.M., Aşçı Arslan A., Hinrichs J., et al., "Probiotics and studies on enhancing their viability in fermented milk products.", Kiel Food Science Symposium, Kiel, ALMANYA, 20-21 Mayıs 2014, pp.34-34
53. Atamer Z., ERGİN F., Samtlebe M., Çomak Göçer E.M., Aşçı Arslan A., Hinrichs J., et al., "Improving the viability of probiotic cells in fermented milk products", Dairy Conference, Stuttgart, ALMANYA, 16-17 Eylül 2013, pp.88-88
54. Küçükçetin A., ERGİN F., Aşçı Arslan A., Çomak Göçer E.M., "Probiyotik bakterilerin asit stresine karşı adaptasyonu.", Uluslararası Katılımlı 1. Ulusal Probiyotik Prebiyotik ve Fonksiyonel Gıdalar Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 11-13 Nisan 2013, ss.24-24
55. Aşçı Arslan A., Çomak Göçer E.M., ERGİN F., Küçükçetin A., "Antibiyotiğe karşı direnç ve probiyotikler", Uluslararası Katılımlı 1. Ulusal Probiyotik Prebiyotik ve Fonksiyonel Gıdalar Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 11-13 Nisan 2013, ss.25-25
56. ERGİN F., Aşçı Arslan A., Çomak Göçer E.M., Küçükçetin A., "İçme Sütü Üretiminde Kullanılan Süt Tozunun Belirlenmesi", Süt Endüstrisinde Yenilikçi Yaklaşımlar Sempozyumu, DENİZLİ, TÜRKİYE, 15-16 Kasım 2012, ss.39-40
57. Küçükçetin A., Aşçı Arslan A., Çomak Göçer E.M., ERGİN F., "Yoğurtta Granüllü Yapı Oluşumunu Etkileyen Faktörler", 3. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, KONYA, TÜRKİYE, 10-12 Mayıs 2012, ss.138-138