

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Pseudomonas putida* Bakteriyofajının PÜSKÜRTEREK KURUTULMASININ
OPTİMİZASYONU VE ELDE EDİLEN BAKTERİYOFAJ TOZUNUN SÜTTE
ANTİMİKROBİYAL AMAÇLI KULLANIMI**

Merve AL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2024

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Pseudomonas putida Bakteriyofajının Püskürterek Kurutulmasının Optimizasyonu
ve Elde Edilen Bakteriyofaj Tozunun Sütte Antimikrobiyal Amaçlı Kullanımı

Merve AL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2024

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Pseudomonas putida* Bakteriyofajının Püskürterek Kurutulmasının Optimizasyonu
ve Elde Edilen Bakteriyofaj Tozunun Sütte Antimikrobiyal Amaçlı Kullanımı**

Merve AL
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından FDK-2023-6342 nolu proje ile desteklenmiştir.**

TEMMUZ 2024

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Pseudomonas putida* Bakteriyofajının Püskürterek Kurutulmasının Optimizasyonu
ve Elde Edilen Bakteriyofaj Tozunun Sütte Antimikrobiyal Amaçlı Kullanımı**

MERVE AL
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez / / 2024 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN (Danışman)	[imza]
Prof. Dr. Oğuz GÜRSOY	[imza]
Doç. Dr. Muammer DEMİR	[imza]
Doç. Dr. Tuğba AKTAR KÜÇÜKASLAN	[imza]
Doç. Dr. Firuze ERGİN ZEREN	[imza]

ÖZET

***Pseudomonas putida* Bakteriyofajının Püskürterek Kurutulmasının Optimizasyonu ve Elde Edilen Bakteriyofaj Tozunun Sütte Antimikrobiyal Amaçlı Kullanımı**

Merve AL

Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Temmuz 2024; 73 sayfa

Bu çalışmada, püskürtmeli kurutucu kullanılarak *Pseudomonas phage gh-1* (ATCC 12633-B1) bakteriyofajının farklı taşıyıcı materyallerle kurutulması optimize edilmiş ve elde edilen bakteriyofaj tozunun model gıda olarak seçilen sütte psikrotrof bir bakteri olan *Pseudomonas putida* ATCC 12633'ün gelişmesini önlemede etkinliği araştırılmıştır. Bakteriyofaj tozunun elde edilmesinde 3 bağımsız değişken (taşıyıcı materyaldeki maltodekstrin oranı, taşıyıcı materyaldeki peyniraltı suyu protein izolatu oranı ve kurutma çıkış sıcaklığı) kullanılarak bakteriyofaj titresinde en az kayıp olacak ve en yüksek çözünürlük değerleri elde edilecek şekilde püskürtmeli kurutucu ile gerçekleştirilen kurutma işlemi optimize edilmiştir. Optimum değerler, maltodekstrin ve peyniraltı suyu protein izolatu için sırasıyla %8.49 ve %5.66; çıkış sıcaklığı için 47.1°C olarak belirlenmiştir. Optimum değerlerde üretilen bakteriyofaj tozları ve bakteriyofajların sıvı formları 6 ay süre ile 4°C'de depolanmıştır. Bakteriyofaj tozu örneklerinde çözünme, faj titresi, partikül boyutu, kurumadde, su aktivitesi, yığın yoğunluğu, renk, camsı geçiş sıcaklığı ve görüntüleme analizleri yapılmıştır. Ayrıca depolamanın 1., 3. ve 6. aylarında sütte bakteriyofaj uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Depolamanın 1. gününde sıvı bakteriyofaj stok çözeltisinin sahip olduğu bakteriyofaj titresi 13 log POB/ml olarak saptanırken, optimum noktada üretilen bakteriyofaj toz örneğinin sahip olduğu faj titresi depolamanın 1. gününde 11 log POB/g olarak tespit edilmiştir. Depolamanın 3. ayında sıvı formda depolanan bakteriyofaj örneklerinin canlılık ve aktivitesini kaybettiği tespit edilirken, toz örneklerinin depolamanın 6. ayına kadar bakteriyofaj canlılığını ve aktivitesini koruduğu saptanmıştır. *Pseudomonas putida* bakterisi ile *Pseudomonas putida gh-1* bakteriyofajını farklı konsantrasyonlarda (10^6 ve 10^8 POB/ml) ve formlarda (sıvı ve toz) içeren süt örneklerinde 72 saatlik depolama süresince proteolitik aktivite, viskozite ve pH değerlerinin değişmediği, bakteri sayılarının azaldığı ve faj titrelerinin ise arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak *Pseudomonas putida gh-1* bakteriyofajının püskürtülerek kurutulmasıyla elde edilen bakteriyofaj tozlarının aktivitesini 6 aylık depolama süresince koruduğu ve *Pseudomonas putida* kaynaklı sütün fizikokimyasal özelliklerinde meydana gelebilecek olumsuzlukları engellemek amacıyla kullanılabileceği değerlendirilmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Bakteriyofaj tozu, Faj canlılığı, Püskürtmeli kurutucu, Taşıyıcı materyal

JÜRİ:

Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Prof. Dr. Oğuz GÜRSOY

Doç. Dr. Muammer DEMİR

Doç. Dr. Tuğba AKTAR KÜÇÜKASLAN

Doç. Dr. Firuze ERGİN ZEREN



ABSTRACT

Optimization of Spray Drying of *Pseudomonas putida* Bacteriophage and Use of the Obtained Bacteriophage Powder for Antimicrobial Purposes in Milk

Merve AL

Ph.D. Thesis in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

July 2024; 73 pages

In this study, the drying of *Pseudomonas* phage gh-1 (ATCC 12633-B1) bacteriophage with different carrier materials using a spray dryer was optimized, and the effectiveness of the obtained bacteriophage powder in preventing the growth of *Pseudomonas putida* ATCC 12633, a psychrotrophic bacterium, in milk selected as a model food was investigated. In obtaining bacteriophage powder, three independent variables (maltodextrin ratio in the carrier material, whey protein isolate ratio in the carrier material, and drying outlet temperature) were used, and the drying process carried out with a spray dryer was optimized to ensure the least loss in bacteriophage titer and the highest solubility values. Optimum bacteriophage powder production was achieved by using a solution containing 8.49% maltodextrin and 5.66% whey protein isolate as carrier material and setting the drying exit temperature to 47.1°C. Both bacteriophage powders and liquid forms of bacteriophages were stored at 4°C for 6 months. Dissolution, phage titer, particle size, dry matter, water activity, bulk density, color, glass transition temperature, and imaging analyses were performed on bacteriophage powder samples. Additionally, bacteriophage applications were carried out on milk in the 1st, 3rd, and 6th months of storage. On the first day of storage, the phage titer of the liquid bacteriophage stock solution was found to be 13 log POB/ml. On the other hand, the phage titer of the bacteriophage powder sample produced at the optimal point was found to be 11 log POB/g. While it was determined that bacteriophage samples stored in liquid form lost their viability and activity in the 3rd month of storage, it was determined that powder samples maintained bacteriophage viability and activity until the 6th month of storage. In milk samples containing *Pseudomonas putida* bacteria and *Pseudomonas putida* gh-1 bacteriophage in different concentrations (10^6 and 10^8 POB/ml) and forms (liquid and powder), proteolytic activity, viscosity, and pH values did not change during 72 hours of storage; bacterial numbers decreased and phage titers increased. As a result, it was evaluated that the bacteriophage powders obtained by spray-drying the *Pseudomonas putida* gh-1 bacteriophage maintained their activity during 6 months of storage and could be used to prevent the negative effects that may occur in the physicochemical properties of milk caused by *Pseudomonas putida*.

KEYWORDS: Bacteriophage powder, Phage viability, Spray dryer, Carrier material

COMMITTEE: Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Prof. Dr. Oğuz GÜRSOY

Assoc. Prof. Dr. Muammer DEMİR

Assoc. Prof. Dr. Tuğba AKTAR KÜÇÜKASLAN

Assoc. Prof. Dr. Firuze ERGİN ZEREN



ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimime başladığım ilk günden bugüne kadar sadece bu çalışmanın gerçekleşmesinde değil, her konuda bir baba gibi her türlü yardım ve destekte bulunan, her daim elimizden tutup kaldıran, daima üstün bilgisiyle yoluma ışık tutan ve bu konuda çalışma olanağı sağlayan değerli Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN'e çok teşekkür ederek minnettar olduğumu belirtmek isterim. Hem Tez İzleme Komitesi jürisinde olan hem de lisansüstü eğitimim boyunca bana göstermiş olduğu özveri ve destekleri için değerli hocam Sayın Doç. Dr. Muammer DEMİR'e canı yürekten teşekkür ederim. Tez İzleme Komitesi jürisinde olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Oğuz GÜRSOY'a katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim boyunca bana karşı göstermiş oldukları büyük özveri ve desteklerinden dolayı ve kendilerini hep örnek aldığım kıymetli hocalarım Doç. Dr. Sayın Emine Mine ÇOMAK GÖÇER'e ve Doç. Dr. Sayın Firuze ERGİN ZEREN'e yürekten teşekkür ederim. Doktora eğitimim süresince aynı laboratuvarı ve daha birçok şeyi paylaştığım kıymetli ekip arkadaşlarım Araş. Gör. Işıl KAAAN'a, Araş. Gör. Hatice Kübra KIZILAY'a, Gıda Yüksek Mühendisi Esin ÖZEL'e ve Öğr. Gör. Dr. Özge GÖKÇE'ye teşekkürlerimi sunarım. Lisansüstü eğitimim süresince bana göstermiş olduğu özveri ve çalışmalarında göstermiş olduğu yardımlarından dolayı kıymetli hocam Öğr. Gör. Dr. Emrah EROĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora eğitimine ilk başladığım günlerden itibaren laboratuvar imkanlarını benimle paylaşan bilgi ve donanımlarından yararlandığım değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Mehmet İNAN'a, Sayın Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK'e ve Araş. Gör. Dr. Fatma ERSÖZ'e çok teşekkür ederim. Laboratuvarlarında göstermiş oldukları ilgi ve yardımlardan dolayı doktora öğrencileri Ayça URAS'a ve Fatma Nur MAVİ'ye çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimim sırasında yardımlarda bulunan Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nün tüm öğretim elemanlarına ve lisansüstü öğrencilerine teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında yardımlarda bulunan Akdeniz Üniversitesi Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi'nin tüm akademik, idari personellerine ve çalışanlarına canı yürekten teşekkür ederim.

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

Doktora eğitimim süresince 2211-A Yurtiçi Doktora Başarı Burs Programı ve YÖK 100/2000 Programı kapsamında beni maddi olarak destekleyen Tübitak ve Yükseköğretim Kurulu'na teşekkür ederim.

Dualarıyla her zaman yanımda olmaya çalışan hayatta kalan en büyük çınarım dedem Nazir YÜZER'e, her derdimi dinleyen anne yarım biricik teyzem Sema YÜZER'e ve sevgili dayım Ahmet Turan YÜZER'e eğitim hayatım boyunca göstermiş oldukları destek ve özverilerden dolayı gönülden teşekkür ederim.

Dođduđu günden bugüne neşe kaynağım olan canımdan çok sevdiğim ve benden küçük olmasına rağmen her zaman yol göstericim olan doktor adayı, biriciğim, kız kardeşim Arzu AL’a hayatım boyunca hep yanımda olduğu için çok teşekkür ederim. Birlikte büyüdüğüm, aynı okullarda okuyup el ele birçok şeyi göğüslediğimiz canım kardeşim Öğr. Gör. Dr. Büşra Al’a hayatıma kattığı anlam için çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini her daim yanımda hissettiğim, bu günlere gelmemdeki en büyük paya sahip olan bize hem anne hem baba olan canımdan kıymetli annem Semra AL’a canı yürekten teşekkür ederim.

Son olarak, bana hayattaki en değerli duygunun insan olmanın olduğunu öğreten, çocuklarının yaşamı ve eğitimi için tüm gücüyle çabalayan, çok erken kaybettiğim canımdan çok sevdiğim canım babam Hamit AL’a minnettar olduğumu söylemek isterim. Doktora Tezimi yüreğinin gücünü hala içimde hissettiğim rahmetli babama büyük bir saygı, sevgi ve derin bir özlem ile ithaf ediyorum...



AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum '***Pseudomonas putida* Bakteriyofajının Püskürterek Kurutulmasının Optimizasyonu ve Elde Edilen Bakteriyofaj Tozunun Sütte Antimikrobiyal Amaçlı Kullanımı**' adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

Tarih 10/07/2024

MERVE AL

İmzası

[Handwritten signature]

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. <i>Pseudomonas</i> Cinsi Bakterilerin Süt Kalitesi Üzerindeki Etkisi	3
2.2. <i>Pseudomonas putida</i>	7
2.3. Psikrotrof Bakterilerin Gelişiminin Önlenmesi	8
2.3.1. Bakteriyofajların genel özellikleri	10
2.4. Püskürterek kurutma	13
3. MATERYAL VE METOT	18
3.1. Materyal	18
3.2. Metot	18
3.2.1. <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633 suşunun aktifleştirilmesi ve gelişim eğrisinin oluşturulması	19
3.2.2. <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633'nin proteolitik aktivitesinin besiyerinde tespiti.....	19
3.2.3. <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633'nin UHT sütler içerisinde proteolitik aktivitesinin tespiti ve UHT sütlerin viskozite ve pH değerleri üzerine etkisinin tespiti.....	20
3.2.3.1. Proteolitik aktivite analizi	20
3.2.3.2. Viskozite analizi	20
3.2.3.3. pH analizi	20
3.2.4. <i>Pseudomonas phage gh-1</i> bakteriyofajının aktifleştirilmesi, çoğaltılması ve titresinin belirlenmesi	21
3.2.5. Sıvı formda olan bakteriyofajların özelliklerinin belirlenmesi	22
3.2.5.1. Bakteriyofajların farklı sıcaklık değerlerine karşı direncinin tespiti.....	23
3.2.5.2. Bakteriyofajların farklı pH değerlerine karşı direncinin tespiti	23
3.2.6. Bakteriyofaj kurutulması ve optimizasyonu	23

3.2.7. Bakteriyofaj tozlarının analizleri	25
3.2.7.1. Toz örneklerindeki bakteriyofaj titresinin belirlenmesi	25
3.2.7.2. Bakteriyofaj tozlarının çözünürlük analizi	25
3.2.7.3. Bakteriyofaj tozlarının kurumadde miktarının ve su aktivitesinin tespiti	25
3.2.7.4. Bakteriyofaj tozlarının yığın yoğunluğunun tespiti	25
3.2.7.5. Bakteriyofaj tozlarının renk analizi	26
3.2.7.6. Bakteriyofaj tozlarının camsı geçiş sıcaklıklarının tespiti	26
3.2.7.7. Bakteriyofaj tozlarının SEM ile görüntülenmesi	26
3.2.7.8. Bakteriyofaj tozlarının partikül boyut analizi	26
3.2.8. Sütte yapılan uygulama ve analizler	26
3.2.8.1. Sütlerin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi	26
3.2.8.2. Sütlerin mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesi	27
3.2.8.3. Sütlerde bakteriyofaj uygulaması	28
3.2.9. İstatistiksel analizler	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	32
4.1. <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633 Suşunun Aktifleştirilmesi ve Gelişim Eğrisi	32
4.2. <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633'nin Proteolitik Aktivitesinin Tespiti	32
4.3. <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633 Aşıl原因 UHT Sütlerde Bakteri Gelişimi, Proteolitik Aktivite ve Viskozite Sonuçları	33
4.4. Sıvı formda olan bakteriyofajların bazı özellikleri	35
4.4.1. Sıvı formda bulunan bakteriyofajların farklı sıcaklık değerlerine karşı gösterdikleri aktivite değerleri	35
4.4.2. Sıvı formda bulunan bakteriyofajların farklı pH değerlerine karşı gösterdikleri aktivite değerleri	36
4.5. <i>Pseudomonas phage gh-1</i> Bakteriyofajının Püskürtülerek Kurutulması ve Optimizasyonu	37
4.5.1. Bakteriyofaj tozlarının faj titresini (POB/ml) değerleri	38
4.5.2. Bakteriyofaj tozlarının çözünabilirlik değerleri	41
4.5.3. Bakteriyofaj tozlarının su aktivitesi ve kurumadde değerleri	43
4.5.4. Bakteriyofaj tozlarına ait yığın yoğunluk değerleri	45
4.5.5. Bakteriyofaj tozlarına ait renk analiz sonuçları	46

4.5.6. Bakteriyofaj tozlarının camsı geçiş sııcaklık değerleri	51
4.5.7. Bakteriyofaj tozlarının partikül boyut analizi sonuçları.....	54
4.5.8. Bakteriyofaj tozlarına ait görüntüler	55
4.5.9.Optimizasyon çalışmasına ait sonuçların deneysel olarak doğrulanması.....	58
4.5.10.Optimum değerlerde üretilen bakteriyofaj tozlarına ait analiz sonuçları.....	58
4.6. Sütte yapılan uygulama ve analizlere ait sonuçlar	60
4.6.1. Çiğ ve ısııl işlem görmüş sùtlere ait fizikokimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları.....	60
4.6.2. Bakteriyofaj uygulaması yapılan ısııl işlem görmüş sùtlere ait analiz sonuçları	60
5. SONUÇLAR	65
6. KAYNAKLAR	67
ÖZGEçMİş	

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

ml	: Mililitre
L	: Litre
kob	: Koloni oluşturan birim sayısı
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
°C	: Santigrat derece
cP	: Centi-poise
dk	: Dakika
s	: Saniye
pH	: Hidrojen iyonları derişiminin eksi logaritması
N	: Normalite

Kisaltmalar

F	: F değeri
IDF	: International Dairy Federation
PCA	: Plate Count Agar
SD	: Serbestlik derecesi
TMAB	: Toplam mezofilik aerobik bakteri
YGC	: Yeast Extract Glucose Chloramphenicol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633 suşunun gram boyama sonucu mikroskopta 100x büyütme objektif altındaki görüntüsü	8
Şekil 3.1. Spot testi ile <i>Pseudomonas phage gh-1</i> bakteriyofajının Nutrient agar ve Nutrient yumuşak agar besiyerleri kullanarak konakçı bakteri olan <i>P. putida</i> ATCC 12633 suşu üzerinde gelişiminin belirlenmesi	21
Şekil 3.2. Çift tabaka bakteriyofaj ekim yöntemi ile <i>Pseudomonas phage gh-1</i> bakteriyofajının faj titresinin belirlenmesi sırasında oluşan berrak plaklar	22
Şekil 3.3. Kurutma işlemlerinde kullanılan püskürtmeli kurutucu	23
Şekil 3.4. Süt örneklerinde bakteriyofaj uygulaması	28
Şekil 4.1. A: Çalkalamalı inkübatörde geliştirilen <i>P. putida</i> ATCC 12633'nin mikrobiyolojik sayım sonuçları ile oluşturulan gelişim eğrisi, B: Çalkalamalı inkübatörde geliştirilen <i>P. putida</i> ATCC 12633'nin bulunduğu sıvı besiyerinin OD ₆₀₀ değerlerinin ölçülmesi ile oluşturulan gelişim eğrisi	32
Şekil 4.2. <i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633'nin %1 yağsız süt tozu içeren PCA besiyerinde gelişimi	33
Şekil 4.3. <i>Pseudomonas putida</i> (10 ⁻¹ . dilüsyon-10 ⁸ kob/ml <i>Pseudomonas putida</i> içeren süt örneği) aşılınmış sütlerin 30°C'de 24. saatlik depolama sonunda görünümü	33
Şekil 4.4.a: Sabit sıcaklık değerinde taşıyıcı materyaldeki peyniraltı suyu protein izolatu ve maltodekstrin oranlarının bakteriyofaj tozlarının canlılığı üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu, b: Taşıyıcı materyaldeki sabit peyniraltı suyu protein izolat oranında, taşıyıcı materyaldeki maltodekstrin oranı ile kurutma çıkış sıcaklık değerinin bakteriyofaj tozlarının canlılığı üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu.....	40
Şekil 4.5.a: Sabit sıcaklık değerinde taşıyıcı materyallerdeki peyniraltı suyu protein izolatu ve maltodekstrin oranlarının bakteriyofaj tozlarının çözünürlüğü üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu, b: Taşıyıcı materyallerdeki sabit peyniraltı suyu protein izolat oranında, taşıyıcı materyallerdeki maltodekstrin oranı ile kurutma sıcaklık değerinin bakteriyofaj tozlarının çözünürlüğü üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu.....	42
Şekil 4.6.a: Sabit sıcaklık değerinde taşıyıcı materyaldeki peyniraltı suyu protein izolatu ve maltodekstrin oranlarının bakteriyofaj tozlarının h* değeri üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu, b: Taşıyıcı materyaldeki sabit peyniraltı suyu protein izolat oranında, taşıyıcı materyaldeki maltodekstrin oranı ile kurutma çıkış sıcaklık değerinin bakteriyofaj tozlarının h* değeri üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu.....	51
Şekil 4.7.a: Sabit sıcaklık değerinde taşıyıcı materyaldeki peyniraltı suyu protein izolatu ve maltodekstrin oranlarının bakteriyofaj tozlarının camsı geçiş sıcaklık değeri üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu, b: Taşıyıcı materyaldeki sabit peyniraltı suyu protein izolat oranında, taşıyıcı materyaldeki maltodekstrin oranı ile kurutma çıkış sıcaklık değerinin bakteriyofaj tozlarının camsı ge.iş sıcaklık değeri üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu.	54
Şekil 4.8. Bakteriyofaj tozlarına ait SEM görüntüleri	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Box-Behnken Cevap Yüzey Yöntemi'ne göre oluşturulan deneme deseni.....	24
Çizelge 3.2. Bakteri ve bakteriyofaj içermeyen kontrol grubu dahil <i>P. putida</i> ATCC 12633 aşılana ve <i>Pseudomonas</i> phage gh-1 bakteriyofajı uygulanan süt örneklerinin isimlendirilmesi	29
Çizelge 4.1. Süt örneklerinde pH değerlerinin 30°C'de 24 saat depolama sırasında değişimi	34
Çizelge 4.2. <i>Pseudomonas putida</i> bakterisinin farklı konsantrasyonlarda aşılandığı süt örneklerinde 30°C'de 24 saat depolama sırasında proteolitik aktivite değerlerinin (340 nm'de absorbans değeri) ve <i>Pseudomonas putida</i> sayılarının (log kob/g) değişimi	34
Çizelge 4.3. Süt örneklerinde viskozite değerlerinin (cP) 30°C'de 24 saat depolama sırasında değişimi.....	35
Çizelge 4.4. <i>Pseudomonas putida</i> ve <i>Pseudomonas</i> phage gh-1 bakteriyofajın farklı sıcaklık değerlerindeki sayıları	36
Çizelge 4.5. <i>Pseudomonas putida</i> ve <i>Pseudomonas</i> phage gh-1 bakteriyofajın farklı pH değerlerindeki sayıları.....	37
Çizelge 4.6. Box-Behnken Cevap Yüzey Yöntemi'ne göre oluşturulan deneme desenine göre üretilen bakteriyofaj tozlarında gerçekleştirilen faj titresi ve çözünürlük analizlerine ait sonuçlar.....	38
Çizelge 4.7. Bakteriyofaj tozlarının canlılık değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA sonuçları ve model uyumluluğu ile ilgili istatistiksel veriler	39
Çizelge 4.8. Bakteriyofaj tozlarının çözünebilirlik değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA sonuçları ve model uyumluluğu ile ilgili istatistiksel veriler	41
Çizelge 4.9. Box-Behnken Cevap Yüzey Yöntemi'ne göre oluşturulan deneme desenine bağlı olarak üretilen bakteriyofaj tozlarında gerçekleştirilen su aktivitesi ve kurumadde analizlerine ait sonuçlar.....	43
Çizelge 4.10. Bakteriyofaj tozlarının su aktivitesi değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA sonuçları ve model uyumluluğunun test edilebilmesi için kullanılan istatistiksel veriler.....	44
Çizelge 4.11. Bakteriyofaj tozlarının kurumadde değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA sonuçları ve model uyumluluğu ile ilgili istatistiksel veriler	45
Çizelge 4.12. Box-Behnken Cevap Yüzey Yöntemi'ne göre oluşturulan deneme desenine bağlı olarak üretilen toz örneklerin yığın yoğunluk analiz sonuçları.....	46
Çizelge 4.13. Box-Behnken Cevap Yüzey Yöntemi'ne göre oluşturulan deneme desenine bağlı olarak üretilen toz örneklerin renk analiz sonuçları.....	47

Çizelge 4.14. Bakteriyofaj tozlarının renk analizine ait L* değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA sonuçları ve model uyumluluğunun test edilebilmesi için kullanılan istatistiksel veriler.....	47
Çizelge 4.15. Bakteriyofaj tozlarının renk analizine ait a* değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA sonuçları ve model uyumluluğunun test edilebilmesi için kullanılan istatistiksel veriler.....	48
Çizelge 4.16. Bakteriyofaj tozlarının renk analizine ait b* değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA sonuçları ve model uyumluluğunun test edilebilmesi için kullanılan istatistiksel veriler.....	49
Çizelge 4.17. Bakteriyofaj tozlarının renk analizine ait c* değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA sonuçları ve model uyumluluğunun test edilebilmesi için kullanılan istatistiksel veriler.....	49
Çizelge 4.18. Bakteriyofaj tozlarının renk analizine ait h* değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA sonuçları ve model uyumluluğunun test edilebilmesi için kullanılan istatistiksel veriler.....	50
Çizelge 4.19. Box-Behnken Cevap Yüzey Yöntemi'ne göre oluşturulan deneme desenine bağlı olarak üretilen toz örneklerin camsı geçiş sıcaklık değerleri	52
Çizelge 4.20. Bakteriyofaj tozlarının camsı geçiş sıcaklığı üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA sonuçları ve model uyumluluğunun test edilebilmesi için kullanılan istatistiksel veriler.....	53
Çizelge 4.21. Box-Behnken Cevap Yüzey Yöntemi'ne göre oluşturulan deneme desenine bağlı olarak üretilen bakteriyofaj tozlarında gerçekleştirilen partikül boyut analizlerine ait sonuçlar.....	55
Çizelge 4.22. Optimum noktada doğrulama deney sonuçları	58
Çizelge 4.23. Optimum değerlerde elde edilen <i>Pseudomonas putida gh-1</i> bakteriyofaj tozlarının faj titresi, çözünübilirlik, su aktivitesi, kurumadde, yığın yoğunluk, camsı geçiş sıcaklığı analizlerine ait sonuçlar	59
Çizelge 4.24. Optimum değerlerde elde edilen <i>Pseudomonas putida gh-1</i> bakteriyofaj tozlarında ait renk analiz sonuçları	59
Çizelge 4.25. Sıvı ve toz formlarda bakteriyofaj uygulaması yapılan/yapılmayan ve sonrasında 10°C'de depolanan sütlere ait pH, viskozite, proteolitik aktivite değerleri ve bakteri sayısı ile bakteriyofaj titresi	61
Çizelge 4.26. Sıvı ve toz formlarda bakteriyofaj uygulaması yapılan/yapılmayan ve sonrasında 4°C'de depolanan sütlere ait pH, viskozite, proteolitik aktivite değerleri ve bakteri sayısı ile bakteriyofaj titresi	63

1. GİRİŞ

Süt ürünlerinde üretildikleri çiğ sütün psikrotrof bakteriler ile kontaminasyonundan kaynaklanan bozulmalar, süt endüstrisi açısından önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Süt işletmelerine getirilen sütler, ısıtma işlemi öncesinde 2-5 gün süresince soğukta depolanabilmektedir (Meng vd. 2017). Sağımdan sonra sütün soğutulması, sütte asitlik artışına sebep olan mezofilik mikroorganizmaların çoğalmasını engellemekte, ancak psikrotrof bakterilerin gelişimini desteklemektedir (Capodifoglio vd. 2016). Çiğ sütün düşük sıcaklıkta depolanması sırasında psikrotrof bakteriler tarafından üretilen proteolitik ve lipolitik enzimler hem çiğ sütlerde hem de bu sütlerden elde edilen ürünlerde bozulmaya neden olabilmektedir (Çaylak-Taş vd. 2013; Ergin ve Küçükçetin 2018). Ayrıca *Pseudomonas* cinsleri başta olmak üzere psikrotrof bakterilerin varlığı ve bu bakteriler tarafından üretilen enzimlerin çiğ sütte bulunması, üretilen süt ürünlerinin depolama sırasında bozulmasına ve dolayısıyla raf ömrünün kısalmasına neden olabilmektedir (Stoeckel vd. 2016). Bu nedenle çiğ sütü düşük sıcaklık değerlerinde (4-10°C’lerde) muhafaza ederken mikroorganizmaların gelişmesini, özellikle de psikrotrof bakterilerin faaliyet göstermesini engellemek, yüksek kalitede süt ürünlerinin üretilmesi açısından önemlidir (Tanaka vd. 2018). Psikrotrof bakteriler arasında baskın olarak kabul edilen ve önemli bir biyofilm üreticisi olan *Pseudomonas* cinsi bakteriler, süt ve süt ürünlerinin kalitesini olumsuz etkileyen bakteri grupları arasındadır. Bu durum, söz konusu bakteri grubunun ısıtma işlemi karşı stabil kalan proteolitik ve lipolitik enzimlerin üreticisi olmasından kaynaklanmaktadır (Ribeiro Júnior vd. 2018). Öte yandan gıda üretiminde mikrobiyolojik kalite ile ilgili uygulanan kimyasal ve/veya fiziksel işlemlere alternatif olarak bakteriyofajların da dahil olduğu doğal antimikrobiyallerin kullanılmasına yönelik talep artmaktadır (do Nascimento vd. 2022).

Bakteriyofajlar gıdalardaki patojen bakterileri kontrol altına almak için gıda endüstrisinde kullanılabilmektedir (Ly-Chatain 2014). Ticari amaçla satılmak üzere, Amerika Birleşik Devletleri’nde bulunan Intralytix şirketi tarafından kırmızı et ve tavuktan hazırlanan tüketime hazır gıdalarda *Listeria monocytogenes* sayısının azalması için altı adet bakteriyofaj içeren LMP-102TM (ListshieldTM) ürünü ve *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella enterica* sayısının et ürünleri ile meyve ve sebzelerde azaltılmasında kullanılması için sırasıyla EcoShield ve SalmFresh bakteriyofaj ürünleri geliştirilmiştir. Microos şirketi tarafından *L. monocytogenes*’e karşı etkili olan ve 1997 yılında Almanya’da bulunan bir süt mandırasının atık sularından izole edilmiş fajı içeren Listex P100 ürünü üretilmiştir. Bir başka ticari çalışma ise New Horizons Diagnostic şirketi tarafından diş ve ağız sağlığında kullanılmak üzere *Streptococcus* cinslerine karşı etkili bakteriyofaj karışımını içeren sakız ve diş macunu üretimidir. Ayrıca Avustralya Yeni Zelanda Gıda Standartları’nca (FSANZ-Food Standards Australia New Zealand) Avustralya ve Yeni Zelanda ve ayrıca İsviçre 2012 yılında ListexTM’in peynir ve diğer gıdalarda kullanımını onaylamıştır (Küçükduman vd. 2020; Ergin vd. 2017). Bakteriyofajlarla ilgili araştırmaların sayısı artmakla birlikte, bakteriyofaj ürünlerinin kullanımı yaygın hale gelememiştir. Bu durum, bakteriyofaj uygulamalarının etkinliğinin pH ve sıcaklık gibi çeşitli faktörlere bağlı olmasından kaynaklanmaktadır (Chatain-Ly2014). Bu bağlamda bakteriyofajların antibakteriyel amaçla kullanılabilmeleri için üretim, depolama ve uygulama sırasında karşılaştıkları olumsuz koşullara dayanıklı olması gerekmektedir. Çoğaltılmasından sonra saklama koşulları bakteriyofajların türüne göre farklılık göstermektedir. Bazı bakteriyofajlar oda sıcaklığında ya da 37°C gibi

nispeten yüksek sıcaklıklarda uzun süre stabilite gösterebilirken, bazıları 4, -20 veya -80°C'ler gibi düşük sıcaklıklarda daha uzun süre stabil olarak saklanabilmektedir (Fernández vd. 2019). Sıvı olarak veya dondurularak depolanan bakteriyofajlar genellikle gelişme besiyerlerinde veya gliserol içeren tampon çözeltilerde tutulmaktadır. Ancak, dondurularak depolama sırasında buz kristallerinin etkisiyle protein yapı zarar görebilmekte ve buna bağlı olarak bakteriyofaj, aktivitesini yitirebilmektedir. Bakteriyofajlar uzun süreli depolamada stabil kalmaları için kurutma işlemine tabi tutulabilmektedir. Bakteriyofajların kurutulmasında en yaygın kullanılan yöntemlerden biri püskürterek kurutmadır (Carrigy 2019). Gıdaların üretiminde doğrudan kullanılmasının ötesinde bakteriyofajların kullanımını yaygınlaştırmak ve stabilitelerini korumak için kapsül formülasyonlarının geliştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır (Vonasek vd. 2014). Yukarıda bahsi geçen bilgiler ışığında konu değerlendirildiğinde, bu doktora tez çalışmasında bir optimizasyon işlemi ile püskürtmeli kurutucu kullanılarak *Pseudomonas phage gh1* bakteriyofajının farklı taşıyıcı materyallerle kurutulması ve elde edilen bakteriyofaj tozunun model gıda olarak seçilen sütte psikrotrof bir bakteri olan *Pseudomonas putida*'nın gelişmesini önlemede etkinliğinin tespiti konularında araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Bakteriyofajın püskürterek kurutulmasında 3 bağımsız değişken (maltodekstrin oranı, peyniraltı suyu protein izolatu oranı ve püskürtmeli kurutucudan çıkış sıcaklığı) kullanılarak bakteriyofaj titresinde en az kayıp olacak ve bakteriyofaj tozlarında en yüksek çözünürlük değerleri elde edilecek şekilde kurutma işlemi optimize edilmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. *Pseudomonas* Cinsi Bakterilerin Süt Kalitesi Üzerindeki Etkisi

Süt; dişi memeli hayvanların doğumdan sonra meme bezlerinden salgılanmakta, canlının gereksinimlerini karşılayabilecek proteinleri, lipitleri, karbonhidratları, mineral maddeleri, vitaminleri ve yaşam için gerekli diğer birçok besin maddesini yeterli ve dengeli olarak içeren tek gıda olmasının yanı sıra insan beslenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Sütün vücudumuzda en iyi değerlendirme şekli içme sütü olarak tüketilmesidir (Arslan ve Kaymaz 2023 ; Üçüncü 2005).

Türk Gıda Kodeksi İçme Sütleri Tebliği'nde (Tebliğ No: 2019/12) içme sütü “Çiğ sütün; pastörizasyon, yüksek sıcaklıkta pastörizasyon, UHT veya sterilizasyon işlemlerinden biri uygulanarak elde edilen ve başka bir işleme gerek kalmadan tüketime sunulan süt” olarak ifade edilmektedir (Anonim 1). Ulusal Süt Konseyi tarafından 2021 yılında yayımlanan Dünya ve Türkiye’de Süt Sektör İstatistikleri Süt Raporu’nda; Uluslararası Sütçülük Federasyonu (IDF, International Dairy Federation) verileri değerlendirilerek 2020 yılında dünyada süt üretiminin yaklaşık 910 milyon tona ulaştığı bildirilmiştir. Söz konusu raporda 2020 yılında üretilen sütlerin 124 milyon tonunun içme sütü üretiminde kullanıldığı ve dünya toplam süt üretim miktarının önümüzdeki 5 yıl içinde 1 milyar tonun üzerine çıkmasının beklendiği bildirilmiştir (Anonim 2). Türkiye İstatistik Kurumu tarafından 18 Nisan 2024 tarihinde açıklanan veriler dikkate alındığında ülkemizde ticari süt işletmeleri tarafından toplanan inek sütü miktarının, 2024 yılının Mart ayında bir önceki yılın aynı ayına göre %7.7 artarak 982322 tona ulaştığı rapor edilmiştir. Ayrıca Mart 2023’te 138678 ton olan içme sütü miktarının Mart 2024’te 139794 tona çıktığı bildirilmiştir (Anonim 3). Ulusal Süt Konseyi tarafından 2021 yılında yayımlanan Dünya ve Türkiye’de Süt Sektör İstatistikleri Süt Raporu’nda ülkemizde toplam 1.5 milyon ton olan içme sütü miktarının 1.46 milyon tonunun (%91) ultra yüksek sıcaklıkta işleme (UHT) sütlerine işlendiği, geri kalan sütlerin ise pastörize süt olarak piyasaya sunulduğu belirtilmiştir (Anonim 4).

Kentleşmeyle birlikte tüketicilerin beslenme konusunda bilinçlenmesi, modern tesislerde üretilen kaliteli süt ve süt ürünlerine olan talebi arttırmıştır. Her yıl yüz binlerce ton çiğ süt işlenmekte olan süt sektöründe standart ve kaliteli ürün üretimi, çiğ süt kalitesine, üretim teknolojisine, hijyenik şartlara, uygun teknikle ambalajlamaya ve muhafaza koşullarına bağlı olarak değişmektedir (Gökçe 2024). Süt ve süt ürünlerine yönelik küresel talebin artması, süt üreticilerinin yüksek kaliteli ve uzun raf ömrüne sahip ürünler üretmesi gerekliliğini de beraberinde gerektirmektedir. Süt endüstrisi, yüksek kaliteyi koruma ve mikrobiyal bozulmadan kaynaklanan kayıpları önleme konusunda zorluklarla karşı karşıyadır (Yuan vd. 2018). Çiğ sütün işlenmeden önceki mikrobiyolojik kalitesi, nihai süt ürünlerinin kalitesi ile doğrudan ilişkilidir. Çiğ sütün sağımından itibaren soğutulması, nakliyesi ve üretimin yapılacağı tesiste işlenmesi sırasında oluşacak mikrobiyal yük, ürün kalitesini etkilemektedir (Zhang vd. 2020).

Süt; içerdiği besin öğeleri, yüksek su miktarı ve yaklaşık nötr pH değerine sahip olması ile mikroorganizmaların gelişimi için uygun bir ortam oluşturması ve içermiş olduğu bileşenler nedeniyle bozulma yapan mikroorganizmalara ve bu mikroorganizmaların enzimlerine karşı hassas bir gıdadır. Çiğ sütte *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*,

Staphylococcus, *Streptococcus*, *Pseudomonas* ve *Microbacterium* cinsleri de dahil olmak üzere birçok bakteri türü bulunmaktadır (Tanaka vd. 2018). Çiğ sütte farklı bakteri türlerinin varlığı ve bu bakterilerin ürettiği enzimler nedeni ile süt ürünlerinde ciddi kalite kayıpları meydana gelebilmektedir (Teh vd. 2011). Çiğ sütün taşınmasında ve işlenmesi sırasında mikroorganizmalar için uygun ortam oluşturmamasından dolayı süt endüstrisinde sıklıkla bakterilerin neden olduğu bozulmalar ile karşılaşmaktadır. Hem mikroorganizmaların neden olduğu bozulmaların önüne geçilebilmesi hem de süt ve süt ürünlerinin kalitesinin korunması amacıyla; çiğ sütün soğutulması, pastörizasyon ve UHT gibi işlemler uygulanmaktadır (Ergin ve Küçükçetin 2018; Yang vd. 2020; Yuan vd. 2018).

İşlenmiş süt ve süt ürünlerinde kontaminasyon sonucu mezofilik ve termofilik spor oluşturan bakteriler gelişebilmekte ve bu durum süt endüstrisi için zorluklar oluşturmaktadır. Bununla birlikte psikrotrof bakteriler süt endüstrisi için daha ciddi sorunlar meydana getirebilmektedir. Çiğ sütte düşük sıcaklıklarda gelişebilen psikrotrof bakterilerin hücre dışına salgıladığı ve yüksek pH aralıklarında dahi aktivitelerini koruyabilen termostabil peptidazların yüksek sıcaklığa dayanıklı olmasından dolayı ısıl işlem ile inaktif olmaması süt endüstrisi açısından önem arz etmektedir (Yanglar 2020).

Psikro toleranslı olarak da adlandırılan psikrotrof bakteri terimi, düşük sıcaklıklarda gelişme gösterebilen, ancak 15-20°C'nin üzerinde optimum gelişme sıcaklığına sahip olan mikroorganizmaları ifade etmektedir. Birçok gıdanın soğukta taşınması ve depolanması göz önüne alındığında, psikrotrof mikroorganizmaların gıda güvenliği açısından önemi daha net anlaşılmaktadır (Oliveira vd. 2015). Süt endüstrisi için oldukça önemli olan psikrotrof bakteriler, 7°C'nin altında gelişebilen, toprak ve havadan bulaşabilen ve esas olarak toprakta ve suda olmakla birlikte hemen her yerde bulunabilen mikroorganizmalardır (Yang vd. 2020).

Soğuk zincir sistemi süt endüstrisinde yaygın olarak kullanılmasına rağmen çiğ sütte psikrotrof bakterilerin gelişimini engellemede yetersiz kalmaktadır (Vithanage vd. 2017). Üretim ve depolama koşullarına ve mevsimsel değişimlere bağlı olarak çiğ süte bulaşması engellenemeyen psikrotrof bakterilerin süt teknolojisi açısından olumsuz etkilerini ortadan kaldıracak için bulaşmanın önlenmesi veya en alt düzeyde tutacak hijyen ve temizlik kurallarına uyulması gerekmektedir (Samaržija vd. 2012).

Çiğ sütün toplanması, depolanması ve işlenmesi sırasında özellikle yeterli düzeyde hijyen koşullarının sağlanmadığı durumlarda sütü çoğunlukla *Pseudomonas* cinsine ait olan bakterilerin kontamine ettiği ve psikrotrof bakterilerin sütte hızla geliştiği bildirilmiştir (Oliveira vd. 2015; Pereira vd. 2019).

Çiğ sütte baskın olarak bulunup psikrotrof bakteriler olarak tanımlanan *Pseudomonas* cinsleri süt endüstrisi açısından en önemli bakteri gruplarından biridir (Le Nguyen vd. 2020). *Pseudomonas* cinsleri, süt sağımında ve çiğ süt depolamada hijyen ve temizlik kurallarına uyulmaması nedeniyle süt endüstrisi için önemli bir sorun haline gelmiştir. Sağım sırasında kullanılan su, meme başı yüzeyleri, meme uçları ve süt depolama tankları *Pseudomonas* cinslerinin yaygın bulunduğu yerlerdir (Okuno vd. 2021).

Çiftliklerde ve süt işleme tesislerinde bulunan soğutma sistemleri çiğ sütün ve bu bağlı olarak süt ürünlerinin kalitesini önemli ölçüde arttırırken, optimum gelişme sıcaklıklarından bağımsız olarak bir yandan da psikrotrof bakterilerin gelişmesini teşvik etmektedir. Ayrıca sağım, taşıma ve depolama ekipmanlarının yetersiz dezenfeksiyonu nedeniyle süte *Pseudomonas* bulaşması söz konusu olabilmektedir (Kumaresan vd. 2007).

Pseudomonas cinsi bakteriler, geniş bir sıcaklık aralığında (4-42°C) gelişim göstermesi ile farklı habitatlarda yaşayabilen bakteriler olarak bilinmektedir. *Pseudomonas* cinsi bakteriler, sağım yerinde yoğun olarak bulunabilen ve çiğ sütteki Gram negatif bakteri grubunu temsil eden önemli bir bakteri grubudur. Bu bakteriler, soğutulmuş sütün kalite sorunları ile ilişkilendirilmektedir. *Pseudomonas* spp., soğutulmuş ortam sıcaklıklarına hızla uyum sağlayabilmekte ve düşük sıcaklıkta kısa sürede çoğalabilmektedir (De Longhi vd. 2022).

Pseudomonas cinsi bakteriler, yaklaşık olarak 272 farklı tür içeren *Pseudomonadaceae* familyasının *Gammaproteobacteria* sınıfına aittir. Bu bakteriler, saprofit aerob, çubuk şekilli, hareketli ve katalaz pozitif olup spor oluşturmeyen bakteriler dahil olmak üzere Gram negatif bakterilerin en heterojen grubu olarak kabul edilmektedir. Ayrıca bazı türleri nitratı elektron alıcısı olarak kullanıp anaerobik ortamda da gelişebilmektedir. Türlerle bağlı olarak *Pseudomonas* spp., psikrotolerant veya psikrotrofik türleri (15°C'nin altında gelişen) ve *P. aeruginosa* gibi 42°C'de gelişen termofilleri kapsamaktadır (Quintieri vd. 2019). *Pseudomonas* spp.'da bulunan birçok özellik ve mekanizma çok sayıda plazmid tarafından yönlendirilmektedir. *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* ve *P. putida* gibi süt teknolojisinde önemli sorunlar oluşturan türlerin bir kısmı floresan özellik göstermekte ve oksidaz (+) genomik grup içerisinde yer almaktadır (Kılıç 2010). *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putrefaciens* ve daha seyrek olmak üzere *Pseudomonas aeruginosa* gibi *Pseudomonas* türleri süt ürünlerinin raf ömrünü sınırlayan bakteriler olarak bilinmektedir (Kumaresan vd. 2007). Bu bakteriler, aerobik olmalarından dolayı yüzeyde gelişmekte olup pigment oluşturma özelliğine sahiptir (Kılıç 2010). *Pseudomonas* spp.'nin hayatta kalmak ve gelişebilmek için yalnızca besiyeri içerisinde bulunan temel bileşenlere (pepton, glikoz, vb.) ihtiyaç duyması ve diğer bakteri grupları gibi spesifik besin maddelerine (sistein, kazein, vb.) gereksinim duymaması rekabetçi psikrotrof bakteriler olmalarına neden olmaktadır (Zhang vd. 2020).

Pseudomonas cinsine ait bakterilerin önemli bir bölümü 7°C'de proteolitik ve lipolitik aktivite gösteren hücre dışı enzimler üretmekte ve bu enzimler sütün bozulmasına yol açarak sadece yapı ve lezzet gibi unsurların bozulmasına değil, ısı değiştiricilerde kirliliğe ve buna bağlı olarak uygulanan ısıl işlemin yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Ayrıca bu enzimler pastörizasyon işleminden sonra aktif kalmakta ve sütte bozulmaya yol açarak raf ömrünün kısalmasına neden olmaktadır (Zhang vd. 2020; Pereira vd. 2019). Örneğin, *Pseudomonas* cinsi bakteriler tarafından üretilen proteazların ondalık indirgeme süresi (D değeri) 75 °C'de yaklaşık 417 dakika ve 85 °C'de ise yaklaşık 250 dakika olup bu durum söz konusu enzimlerin normal ısıl işlem teknikleriyle inaktif hale getirilmesinin zor olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak ısıl işleme karşı stabil olan bu enzimler süt ve süt ürünlerinde kabul edilemez biyokimyasal değişikliklere, besin değerinde kayıplara ve raf ömrünün kısalmasına neden olmaktadır (Yuan vd. 2018).

Bunun yanı sıra *Pseudomonas* cinslerine ait bakteriler çiğ sütü bozan hücre dışı lipolitik ve/veya proteolitik aktivite gösterebilmekte ve çevrede bulunan fırsatçı patojenler olarak kabul edilmektedir (Meng vd. 2020; Tanaka vd. 2018). Çiğ süte uygulanan ısıtıl işlem sırasında *Pseudomonas* cinsi bakteriler yok edilse de bu bakteriler tarafından üretilen ısıtıl işleme dayanıklı lipolitik ve proteolitik enzimler ısıtıl işlem sonrası sütte kalmakta ve süütün bozulmasına neden olmaktadır (De Longhi vd. 2022; do Nascimento vd. 2022; Tanaka vd. 2018). Bu enzimlerin çiğ süte uygulanan pastörizasyon ve UHT gibi ısıtıl işlemlere dirençli olması, ısıtıl işlem sonrası enzim aktivitesine bağlı olarak süt ve süt ürünlerinin raf ömrünü kısaltmaktadır. Bunun yanı sıra 45°C'ye kadar olan sıcaklıklarda çoğalabilen *Pseudomonas* cinsi bakteriler geniş bir sıcaklık aralığında proteolitik enzimler üretebilmektedir (Ribeiro Júnior vd. 2018). Sayısı mililitrede 6-7 log kob (koloni oluşturan birim)'e ulaştığında psikrotrof bakteriler hücre dışı bu enzimleri süütün stabilitesinin neden olabilecek kadar yüksek konsantrasyonlarda üretebilmektedir. *Pseudomonas* cinslerine ait bakterilerin, diğer psikrotrof bakteriler ile karşılaştırıldığında jenerasyon süresi oldukça kısa olmakta ve 4°C'de depolanan sütte 8 gün içinde sadece tek bir hücrenin sayısı 10⁶ kob/ml'ye ulaşabilmektedir. Bu bakterilerin büyük bir kısmı (%58-91) hücre dışı proteolitik, lipolitik ve fosfolipolitik aktivite gösterme yeteneğindedir (Ecem vd. 2014). *Pseudomonas* cinslerine ait bakterilerin ürettiği proteolitik enzimler, 100°C'de 5 dakika ısıtıl işleminden sonra aktivitelerinin %40'ını ve 4°C'de 12 güne kadar depolamada ise aktivitelerinin %50'sini koruyabilmektedir (Ribeiro Júnior vd. 2018).

Pseudomonas cinslerine ait bakteriler tarafından üretilen hücre dışı enzimler çiğ süütün ısıtıl işlem stabilitesinde azalma, süt ürünlerinde ekşime, acı tat oluşumu ve lezzet kaybı gibi sorunlara yol açabilmektedir (do Nascimento vd. 2022). Aynı zamanda bu enzimler süt endüstrisi açısından peynir yapısının bozulması (yumuşak-doku kaybı) ve UHT süütün jelleşmesi gibi farklı teknolojik sorunlar da oluşturabilmektedir (De Longhi vd. 2022). UHT sütlerde depolama sürecinde meydana gelen ve hammadde kalitesinden uygulanan üretim tekniklerine kadar çeşitli nedenlerle oluşabilen jelleşme ve acılaşıma kusurları süt endüstrisinin karşı karşıya kaldığı en büyük problemler arasındadır. İçme sütü sektörünün pazar potansiyelini ve nihai ürünün raf ömrünü sınırlandıran en önemli sorunlarından biri olan jelleşme, süütün oda sıcaklığında (20°C) viskozitesinin artarak ve akıcılığının kaybolması ile gerçekleşen tersinmez bir tepkimedir (Yangılar 2020). *Pseudomonas* cinsi bakterilerin vejetatif hücrelerinin ısıtıl işlemle yok edilmesinden sonra bile kalıntı proteolitik aktivite, depolama sırasında sütte jel oluşumuna yol açabilmektedir. Hücre dışı proteinazlar, peyniraltı suyu proteinleri üzerinde çok az etki gösterebilmekte iken, hem k-kazeini hem α_{s1} -kazeini hem de β -kazeini hidrolize edebilme yeteneğine sahiptir. Söz konusu hidrolizasyon sonucunda kazein misellerinin stabilitesi bozulmakta ve bir protein jeli oluşmaktadır. Ayrıca süütün tadında değişiklikler meydana gelebilmekte ve rahatsız edici istenmeyen "acı" ve "mayalı" gibi kötü tatların oluşmasına neden olabilmektedir (Narvhus vd. 2021).

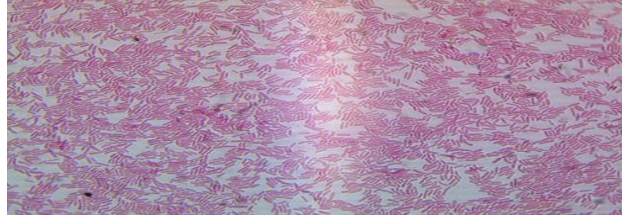
Sütte bulunan psikrotrof bakteri popülasyonunun ve söz konusu bakteri popülasyonunun ürettiği hücre dışı enzimlerin karakteristik özelliklerini belirlemek üzere yapılan bir çalışmada, çiğ sütler sağımdan hemen sonra ve buzdolabı koşullarında (7°C'de, 5 gün) muhafaza edildikten sonra analiz edilmiştir. Bu amaçla, Yeni Zelenda'nın 10 farklı bölgesinden 4 farklı periyotta (Mayıs 2016, Ağustos 2016, Kasım 2016 ve Şubat 2017) toplam 24 farklı çiğ süt örneği toplanarak psikrotrof bakteri tanılanması ve sayısı,

toplam bakteri sayısı ve psikrotrof bakteriler tarafından üretilen proteolitik ve lipolitik enzimlerin ısıl işleme karşı dayanıklılıkları araştırılmıştır. Araştırmacılar çiğ sütleri sağımdan hemen sonra analiz ettiklerinde başlangıç psikrotrof bakteri sayısını yaklaşık olarak 4 log kob/ml, toplam bakteri sayısını ise yaklaşık olarak 5 log kob/ml olarak tespit etmişlerdir. Çiğ sütlerin depolanmasından sonra ise psikrotrof bakteri sayısının yaklaşık 8 log kob/ml'ye, toplam bakteri sayısının ise yaklaşık 9 log kob/ml'ye ulaştığı belirlenmiştir. Psikrotrof bakterilerin tanımlanması sırasında en çok *Pseudomonas* cinsi bakterilere rastlanmıştır ve *Pseudomonas* cinsi bakteriler tespit edilen psikrotrof bakterilerin %74.8'ini oluşturmuştur. Psikrotrof bakterilerin %25.2'sini oluşturan bakteri türlerinin ise *Acinetobacter*, *Candida*, *Chryseobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Raoutella*, *Lactococcus*, *Hafnia*, *Filobasidium* ve *Serratia* olduğu belirlenmiştir. *Pseudomonas* cinsleri kendi içinde karşılaştırıldıklarında en fazla *P. fragi* (%10.92), *P. lundensis* (%6.72) ve *P. fluorescens* (%6.72) bakterilerinin olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar tarafından buzdolabı koşullarında 5 gün boyunca saklanan soğutulmuş sütte, 9 cins ve 20 türü temsil eden 127 izolat tanımlanmıştır. Bu durum, soğutulmuş depolanan süttün psikrotrof bakteri çeşitliliğinin, taze çiğ süttten daha fazla çeşitliliğe sahip olduğunu göstermektedir. Agar difüzyon deneyleri ile 7°C'de proteolitik ve lipolitik enzimlerin analizi sonucu izole edilen 246 bakteri suşunun 110 tanesinin proteolitik aktivite gösterdiği ve proteolitik aktivite gösteren bakteri suşlarının 94'ünün ısıya dayanıklı proteolitik enzimler ürettikleri saptanmıştır. Çalışma sonucunda *Pseudomonas* cinsi bakterilerin tek başına lipolitik veya proteolitik enzim üretebilmesinin yanında hem proteolitik hem de lipolitik enzimleri birlikte üretme yeteneğine sahip olabilecekleri değerlendirilmiştir (Zhang 2020).

Pseudomonas fluorescens sütte en yaygın bulunan *Pseudomonas* cinsine ait türlerden biridir. Sütte bozulma yapan diğer bir *Pseudomonas* cinsine ait türün ise *Pseudomonas putida* olduğu bildirilmiştir (Nicodème vd. 2005). *Pseudomonas* cinsleri içerisinde yer alan *P. putida*, esas olarak süt proteinlerini ve lipitleri parçalayan termostabil hidrolitik enzimler üreten ve böylece süt endüstrisi için büyük bir problem oluşturan önemli psikrotrof mikroorganizmalardandır (De Longhi vd. 2022). Çiğ süt mikrobiyotasında bulunan ve ısıl işlem ile canlılığını kaybetse de ürettiği hücre dışı enzimlerin yüksek sıcaklıklarda dahi inaktif olmamasından dolayı *Pseudomonas putida* süt endüstrisi için önem arz eden bir bakteridir (Bestil vd. 2023).

2.2. *Pseudomonas putida*

P. putida, esas olarak hastane enfeksiyonlarına neden olan *Pseudomonas* türlerinin floresan özellik gösteren bakteri grubuna aittir (Cornelissen vd. 2011). *P. putida*'nın araştırılmasına yönelik ilgi 1960'larda ksenobiyotiklerin biyolojik parçalanmasındaki potansiyelinin keşfedilmesiyle başlamıştır. *P. putida* sıklıkla sulardan, bitkilerden ve topraktan (özellikle kirli alanlardan) izole edilen Gram negatif ve çubuk şeklinde bir bakteridir (Şekil 2.2). *P. putida*, doğal ortamının heterojenliği, fırsatçı ve iddiasız beslenme ihtiyaçları, hızlı gelişmesi ve ayrıca oksidatif stres ve toksik kimyasallara karşı dayanıklılığı ile karakterize edilmektedir (Weimer vd. 2020).



Şekil 2.1. *Pseudomonas putida* ATCC 12633 suşunun gram boyama sonucu mikroskopta 100x büyütme objektif altındaki görüntüsü

P. putida'nın farklı suşları, sıklıkla rizosferde ve tatlı sularda yaşamakta ve çok çeşitli biyojenik ve ksenobiyotik bileşiği metabolize edebilmektedir. *P. putida*'nın çeşitli suşları, hastane ortamlarından enfeksiyon kapmış hastalardan izole edilmiştir. *P. putida*'nın neden olduğu enfeksiyonlar nadir olarak karşılaşılmakla birlikte, çoğunlukla yeni doğan bebeklerde ve kanser hastaları gibi bağışıklık sistemi zayıf kişilerde görülmektedir. Çoğu *P. putida* izolatı hastane ortamlarındaki diğer mikroorganizmalara aktarılabilen antibiyotik direnç faktörlerini kodlayan genleri taşıyan plazmidlerin vasıtasıyla antibiyotiklere karşı direnç göstermektedir (Fernández vd. 2019). Bu durum, son zamanlarda endişe kaynağı haline gelen çoklu ilaca dirençli (MDR, Multi Drug Resistance) *P. putida* suşlarının yayılmasıyla daha da kötüleşmiştir. Ayrıca hareketli genetik elemanlarda yer alan direnç faktörleri, *P. putida* tarafından diğer bakteri türlerine ve hatta yatay gen transferi ile cinslere de bulaşabilmekte ve bu bakteri antibiyotik direncinin yayılması için bir “rezervuar” rolü oynayabilmektedir (Fanelli vd. 2021).

P. putida, 0°C ila 7°C arasında özellikle de 4°C'de kısa sürede gelişim göstermesi nedeniyle süt kalitesi üzerinde büyük öneme sahiptir. Dolayısı ile *P. putida* soğukta depolanan sütler için ciddi risk oluşturmaktadır (Pereira vd. 2019). Oda sıcaklığında depolanan UHT sütlerde *P. putida*'nın meyvemsi, ekşi ve ransit bir tat oluşturduğu bildirilmiştir (Whitfield vd. 2000). Ayrıca *P. putida*'nın proteolitik ve lipolitik aktivite göstermesinden dolayı kötü aroma bileşenleri (ahır kokusu, vb.) oluşturmalarının yanı sıra pigmentasyon özelliği göstererek renk değişimlerine yol açtığı belirtilmiştir (Hayes vd. 2002).

2.3. Psikrotrof Bakterilerin Gelişiminin Önlenmesi

Gıda bozulmalarının başlıca nedeni olan düşük sıcaklıklarda gelişme gösterebilen mikroorganizmaların özellikle de psikrotrof bakterilerin ürettikleri proteolitik ve lipolitik enzimler nihai ürünün raf ömrünü sınırlandırmaktadır. Bozulmaya neden olan patojen mikroorganizmaların etkisiz hale getirilmesi ve soğukta depolanan gıdaların raf ömrünün uzatılması amacıyla soğuğa adapte olan mikroorganizmaların aktivitesinin azaltılmasına yönelik inhibe edici ısı olmayan yüksek basınç uygulamaları, süper kritik karbondioksit uygulaması (SC-CO₂), soğuk plazma uygulaması, ultraviyole ışınlama, vurgulu elektrik alan ve biyolojik inaktivatörler (biyokoruma) kullanılması gibi bir çok teknik geliştirilmiştir (Qian vd. 2023; Yangılar ve Kabil 2013). Isıl işlemlere alternatif olarak değerlendirilen ve gıda muhafaza teknolojileri arasında olan biyokoruma, ürünün raf ömrünü ve hijyenik kalitesini arttırmakta ve bahsi geçen diğer gıda muhafaza tekniklerine kıyasla ürünlerin duyuşal özellikleri ve besin değeri üzerine minimum düzeyde etki etmektedir. Güvenli şekilde kullanımıyla bakteriyosin ve bakteriyofaj uygulamaları gibi

metotları içeren biyokoruma yöntemleri gıdalarda bozulmaya neden olan mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkiye sahiptir. Bakteriyosin uygulamalarında dar aktivite spektrumu, proteolitik enzimler tarafından inaktivasyonu, starter kültürlerin kullanıldığı ürünlerin üretimi sırasında starter kültür üzerine olumsuz etkiler göstermesi, düşük üretim miktarı ve bakteriyosine dayanıklı bakterilerin gelişmesi gibi sınırlayıcı faktörler bulunmaktadır (Seçkin ve Baladura 2010).

Gıda muhafazasında bakteriyofaj ve bakteriyosinlerin kullanımı dikkate alındığında, gastrointestinal sistemde etkisini belirlemek de önemlidir. Probiyotik olarak tüketilen gıdalarda bakteriyosinlerin kullanılması durumunda bakteriyosinlerin sindirim sistemi üzerindeki etkisi hakkında daha çok bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır (Seçkin ve Baladura 2010). Konu ile ilgili literatür incelendiğinde, bakteriyofajların ağız yoluyla alınması sonucu insan vücudunda herhangi bir olumsuz etkisiye rastlanmamıştır.

Antibiyotiklerin gelişigüzel kullanımı sonucu antibiyotik kalıntılarından kaynaklanan zararlı etkilerin meydana gelmesinin ve mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direnç kazanmasının insan sağlığı için ciddi tehdit oluşturduğu bilinmektedir. Antibiyotik kalıntıları içeren hayvansal kaynaklı gıdaların uzun süreli tüketimlerinin insanlarda antibiyotik direncinin oluşmasına yol açabileceği bildirilmektedir (Hızlısoy 2018; Patel vd. 2020). Sütlerde antibiyotik kalıntısının bulunması, insan sağlığı açısından sıkıntı teşkil etmekle birlikte, süt ürünlerinin üretilmesini zorlaştırarak süt endüstri için de büyük bir sorun oluşturmaktadır. Starter kültürde yer alan bakterilerin gelişimi antibiyotik kalıntısı içeren sütlerde baskılanmakta ve bu sütlerden özellikle fermente süt ürünlerinin üretilmesi zorlaşmaktadır. Ayrıca sütteki antibiyotik kalıntılarının starter kültürde yer almayan laktik asit bakterilerini de inhibe ettiği ve çiğ süttten üretilen peynirlerde tat ve aroma kaybına sebep olduğu bildirilmektedir (Hızlısoy 2018).

Çoklu ilaca dirençli bakterilerin ortaya çıkması nedeniyle patojenik ve bozulmaya neden olan bakterilere karşı antibakteriyel ajanlar olarak litik bakteriyofaj uygulamaları değerlendirilmeye başlanmıştır (Wongyoo vd. 2023). Bakteriyofajlar yalnızca kendilerine özgü bakteri türlerine karşı aktivite gösterirken, antibiyotikler mikrobiyotayı oluşturan tüm mikroorganizmalara zarar vermektedir. Antibiyotiklerin etkisi kullanıldıktan sonra azalmakta ve bakteriler zamanla antibiyotiklere karşı direnç mekanizması geliştirebilmektedir. Buna karşın bakteriyofajlar, konakçı bakteriler ölene kadar aktivite gösterebilmekte ve bakteriler öldükten sonra inaktif hale gelmektedir. Ayrıca bakteriyofajlar, çoğunlukla nükleik asit ve proteinlerden oluştukları için toksik değildir (Ergin vd. 2021; Sarhan ve Azzazy 2015). Bunlara ek olarak bakteriyofajlar "otomatik dozlama" kapasitesine de sahiptir ki bu durum, bakteriyofaj popülasyonu arttıkça bakteri hücrelerini sırayla enfekte ettikleri anlamına gelmektedir. Konakçı bakteriye özgü olan bakteriyofajlar konakçının yokluğunda organizmanın bağışıklık sistemi tarafından elimine edilmektedir. Bakteriyofajların diğer bir avantajı ise düşük miktarlarda bile etkili olmalarıdır. Bakteriyofaj uygulaması patojen bakterileri inhibe etmek ve gelişimlerini önlemek için uygulanan diğer yöntemlere nispeten daha ucuz ve basit üretim teknolojilerine sahiptir (Choinska-Pulit vd. 2015).

2.3.1. Bakteriyofajların genel özellikleri

Kısaca faj olarak da adlandırılan bakteriyofajlar, gıda endüstrisinde biyokoruma ajanları olarak başarıyla kullanılan bakteriyel virüslerdir (Do Nascimento vd. 2022). Bakteriyofajlar, bir bakteri hücresinden yaklaşık 50 kat daha küçük olup sadece konakçı bakteriyi enfekte etmektedir (Hussain vd. 2017). Bakteriyofajların genel yapısı DNA ve RNA'dan oluşan genetik materyalin çevresini kaplayan protein zar ile bakterilere tutunup genetik materyalini aktarmaya yardımcı olan proteinleri ihtiva eden kuyruk bölümünden oluşmaktadır (Baş 2020). Bakteriyofajlar, Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses) tarafından morfolojilerine ve bulundukları nükleik aside (DNA/RNA dizisi veya türü) göre *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Myoviridae* ve *Filamentöz* bakteriyofajlar olarak sınıflandırılmaktadır. Birçok bakteriyofaj genomu çift sarmallı DNA (dsDNA)'dan oluşurken, az bir kısmı tek sarmallı DNA (ssDNA), çift sarmallı RNA (dsRNA) veya tek sarmallı RNA (ssRNA) genomlarından oluşmaktadır.

Prokaryot organizmaları enfekte eden virüsler olarak tanımlanan bakteriyofajların hayat döngüleri iki farklı şekilde gerçekleşmektedir (Ergin vd. 2017). Buna göre bakteriyofajlar litik (virulent) ve lizojenik (ılıman) olarak kategorize edilmektedir. Litik bakteriyofajlar sadece bakteri içerisinde çoğalabilen ve bakteriyi lize ederek bakterinin ölümüne neden olan hayat döngüsüne sahiptir (Kazi ve Annapure 2016). Lizojenik bakteriyofajlar ise genetik materyali olan DNA'yı bakteriye entegre ederek bakterinin ölümüne neden olmadan hayat döngüsünü gerçekleştirmektedir. Bakteriyofaj uygulamalarında en zararsız yaklaşım, litik hayat döngüsüne sahip bakteriyofajlar ile bakteri inhibisyonunu sağlamaktır (Costa vd. 2023).

Bakteriyofajlar, ilk kez 1896 yılında Ernest Hankin tarafından bakteri filtrelerinden geçebilen ve bahsi geçen zaman diliminde henüz tanımlanmamış bir maddenin antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunun bildirilmesiyle keşfedilmiştir. Ardından 1915 yılında Frederick Twort, doğal antibakteriyel ajanlar olarak bakteriyofaj kullanımını önermiştir. 1919 yılında ise Felix d'Herelle tarafından fajlar şiddetli dizanteri tedavisi için kullanılmıştır. Felix d'Herelle, bakteri inhibisyonunda plak oluşumunu virüslere bağlayarak "bakteriyofaj" terimini ilk kez kullanan bilim insanı olmuş ve 1923 yılında Uluslararası Bakteriyofaj Enstitüsü'nün kurulmasına öncülük etmiştir. 1920-1940 yılları arasında bakteriyofajlar dizanteri, kolera ve cilt hastalıkları gibi hastalıkların tedavisinde terapötik ajan olarak kullanılmıştır. Ancak, 1928 yılında penisilinin keşfiyle antibiyotik kullanımının başlaması ve antibiyotik kullanımına öncelik verilmesi bakteriyofajların kullanımını büyük ölçüde sınırlandırmıştır (Küçükdoğan vd. 2021).

Bakteriyofajlar; su, gıda güvenliği ile tarım ve hayvan sağlığı konuları ile ilgili çeşitli uygulama alanlarına sahiptir. Bakteriyofajlar; aşı ve ilaç uygulamaları, antibiyotiklere dirençli bakterilerle mücadele ve bakteri tespiti gibi farklı alanlarda kullanılabilir (Temelli ve Çetin 2011). Bakteriyofajlar, gıda güvenliği ile ilgili olarak çiftlikten sofraya kadar biyokontrol amaçlı uygulamaların tüm aşamalarında antibiyotiklere ve kimyasal koruyuculara alternatif oluşturmaktadır (Xu 2021). Bakteriyofaj uygulamaları arasında canlı hayvanlarda bakteriyofaj tedavisi ile hastalığın önlenmesi, karkas, taze meyve ve sebze gibi hammaddelerin dekontaminasyonu, ekipman ve gıda temas yüzeylerinde sanitasyon sağlanması ve raf ömrünün uzatılması yer almaktadır (Temelli ve Çetin 2011). ICTV'ye göre bakteriyofajlar morfolojilerine ve

nükleik asit bileşimlerine göre sınıflandırıldıklarında %95'inden fazlası *Caudovirales*'i temsil etmektedir. *Caudovirales* grubunun içerisindeki bakteriyofajların büyük çoğunluğunun gıda patojenleri ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Choińska-Pulit vd. 2015). Bakteriyofajların besin zinciri içinde kullanılmasının pek çok avantajı bulunmaktadır. Bu avantajların ilki, bakteriyofajların gıdalar da dâhil olmak üzere doğada yaygın olarak bulunmalarına bağlı olarak insan ve hayvan bünyesinde doğal olarak yer almalarıdır. Bu durum bakteriyofajların zararsız olduklarının göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bakteriyofajların diğer avantajları ise yüksek düzeyde spesifik olmaları, gıdalarda kullanımlarında gıdaların duyuşal özelliklerinde değişikliğe yol açmamaları ve gıda işlemede biyokoruma ajanı olarak kullanıldıklarında çeşitli yüzeylerde biyofilm oluşumunu önleyici olmaları şeklinde sıralanmaktadır (Xu 2021). Gıdalarda patojen bakterilerin kontrolünde bakteriyofajlar kullanılabilir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (USFDA-United States Food and Drug Administration)'nin 2006 yılında et ve tavuk ürünlerinde patojen bir bakteri olan *Listeria monocytogenes*'in kontrolü için bakteriyofajların kullanımını onaylanıp gıda katkı maddesi olarak GRAS (Generally Recognized as Safe-Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen) listesine eklemesini takiben gıdalarda patojen bakterilerin kontrolü için bakteriyofajların kullanımına dair akademik ve ticari amaçlı birçok çalışma yapılmıştır (Ergin vd. 2019).

Yapılan bir çalışmada *Enterobacteriaceae* familyasında yer alan, en yaygın görülen gıda patojenlerinden biri olan ve çiğ sütte de bulunan *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* (KCCM 40253) suşunun inhibisyonu P22 bakteriyofajı kullanılarak sağlanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla %4 yağlı UHT süte 10^6 kob/ml düzeyinde *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* suşu aşılanmıştır. Ardından bu sütler 10 ml'lik hacimlere bölünerek bakteriyofaj muamelesi olmadan ve farklı MOI değerlerinde (0.01, 0.1, 1, ve 10) P22 bakteriyofajı ile muamele edilerek 4°C'de 12 gün 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 4°C'de depolanan örneklerde 0., 3., 6., 9. ve 12. günlerde; 37 °C'de depolanan örneklerde ise 0., 4., 8., 16. ve 24. saatlerde toplam bakteri sayımı, pH ve renk analizleri gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon işlemi 37°C'de gerçekleştirilen örneklerde; içerisinde bakteriyofaj bulunmayan kontrol grubunun toplam bakteri sayısı 8.9 log kob/ml'ye hızla ulaşırken, bakteriyofaj uygulamasına tabi tutulmuş örneğin toplam bakteri sayısının 4. saatin sonunda 4.8 log kob/ml olduğu belirlenmiş ve 24. saatin sonunda kontrol grubu ile benzer sonuçlar göstererek 9.0 log kob/ml değerine kadar yükseldiği tespit edilmiştir. Araştırmacılar, sütün bileşiminde yer alan besin öğelerinin bakteriyofaj-bakteri adsorpsiyonunu engelleyebileceğini, bu duruma istinaden pH 4.7'de kazein miselleri ile bakteriyofaj arasında oluşan kompleks yapının bakteriyofaj adsorpsiyonunu azaltıcı yönde etki göstermiş olabileceğini ve sütte bulunan immunoglobülinlerin bakteri hücrelerinin yüzeyi üzerinde gösterdikleri yapışma-tutunma özelliklerinin bakteri ile bakteriyofaj adsorpsiyonunu azaltabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmada bu durumun konakçı bakterinin bakteriyofaja karşı hassasiyetini kaybetmesine neden olabileceği değerlendirilmiştir. Ayrıca 4°C'de 12 gün süresince depolanan kontrol ve bakteriyofaj ile muamele edilmiş örneklerin pH değerlerinde farklılık tespit edilememiş olmakla birlikte, 37°C depolanan örneklerde hafif renk değişimi olduğu saptanmıştır. Çalışma sonucunda araştırmacılar gıdalarda bakteriyofaj kullanımına yönelik daha ileri düzeyde çalışmaların yapılması gerektiğini ve patojen bakterilerin inhibisyonu için bakteriyofaj kullanmanın yararlı olabileceğini belirtmişlerdir (Phongtang vd. 2019).

Grygorcewicz vd. (2019) yaptıkları çalışmada çiğ ve filtre edilmiş sütlerde *E. coli* O157:H7 bakterisinin inaktivasyonunu bakteriyofaj uygulaması ile sağlamaya çalışmışlardır. Bu amaçla araştırmacılar Shiga toxini üreten 2 farklı *E. coli* O157:H7 suşu kullanmışlardır. Bu suşlar *E. coli* O157:H7 A1 ve *E. coli* O157:H7 A2 olarak kodlanmış olup sırasıyla insan dışkısı ve çiğ sütte izole edilmiştir. Çalışmada çiğ süt, filtre edilerek ve filtre edilmeden olmak üzere iki farklı şekilde kullanılmıştır. Filtre edilmiş sütü hazırlamak için çiğ süt 0.2 µm filtreden geçirilmiştir. Her iki süt grubuna da son derişimi 10 mM olacak şekilde MgSO₄ ve CaCl₂ ilave edilmiştir. Filtre edilen sütlere 10⁵ kob/ml olacak şekilde *E. coli* O157:H7 A1 ve A2 suşları aşılanmıştır. Bu sütler MOI (multiplicity of infection-enfeksiyon sıklığı) değeri 5 olacak şekilde bakteriyofaj uygulandıktan sonra hem 4°C’de hem de 25°C’de 10 gün süreyle depolanmıştır. Filtre edilmemiş süte de yine 10⁵ kob/ml olacak şekilde *E. coli* O157:H7 A2 suşu aşılanarak MOI değeri 50 olacak şekilde bakteriyofaj uygulanarak 25 °C’de 12 saat depolanmıştır. MOI değeri 5 olan filtre edilmiş sütte 25°C’de *E. coli* O157:H7 A2 suşu sayısı 24 saatin sonunda 4.1 log kob/ml olarak tespit edilmiş ve bu süt, çalışmada en yüksek azalmayı gösteren örnek grubu olmuştur. Çalışmada 25°C’de *E. coli* O157:H7 A2 suşu sayısı 10. günün sonunda 0.7 log kob/ml’ye kadar azalırken, kontrol örneğinde *E. coli* O157:H7 A2 suşu sayısı 7.3 log kob/ml olarak saptanmıştır. Filtre edilip bakteriyofaj uygulaması yapıldıktan sonra 4°C’de 10 gün depolanan süt örneklerinde kontrol örneğine göre *E. coli* O157:H7 A2 suşu sayısının 2.11 log birim daha az olduğu tespit edilmiştir. 25°C’de *E. coli* O157:H7 A1 suşu kontrol örneğine göre 2.97 log birimlik azalma göstermiş ve en düşük *E. coli* O157:H7 A1 suşu sayısı 96. saatin sonunda saptanmıştır. Depolamanın 10. gününde ise *E. coli* O157:H7 A2 suşu sayısı kontrol örneğinden 6.23 log birim daha az tespit edilirken, 4°C’de depolanan *E. coli* O157:H7 A1 suşu sayısının kontrol örneğine göre 1.56 log birim daha düşük olduğu belirlenmiştir. MOI değeri 50 olan ve *E. coli* O157:H7 A2 suşu aşılanarak hazırlanan süt örneklerinde 25°C’de 4. saatin sonunda *E. coli* O157:H7 A2 sayısı 4.2 log birimlik azalma göstermiş ve 6. saatin sonunda bakteri tespit edilememiştir. Çalışma sonucunda araştırmacılar bakteriyofajların, süt ve süt ürünlerinde başarılı bir şekilde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Yapılan bir başka çalışmada, düşük sıcaklıklarda canlı kalıp ısıya dirençli hücre dışı enzimler üreterek UHT sütlerde bozulmaya neden olan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 suşunun yeni izole edilen litik bir bakteriyofaj ile tam yağlı UHT sütte biyokontrol ajanı olarak etkinliği araştırılmıştır. Araştırmacılar, tam yağlı UHT sütleri başlangıç düzeyi 3 log kob/ml ve 5 log kob/ml olacak şekilde *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 suşlarının inokülasyonunu takiben sırasıyla 4 POB /ml ve 6 POB/ml olmak iki farklı konsantrasyon düzeyinde *Pseudomonas aeruginosa*’ya spesifik olan ve litik aktivite gösteren PAer.5-1 bakteriyofaj uygulamasını gerçekleştirerek 4°C’de 24 saat süresince depolamışlardır. Çalışmada depolamanın 1., 3., 6. ve 24. saatlerinde *Pseudomona aeruginosa* ATCC 15442 suşunun sayısı ve PAer.5-1 bakteriyofajının titresi tespit edilmiştir. Çalışmanın kontrol grubunu ise sadece *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 suşunun ilave edildiği tam yağlı UHT süt oluşturmuştur. Depolama sonucunda çalışmanın kontrol grubunda *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 suşunun sayısının sabit kaldığı belirlenmiştir. Bakteriyofaj ilave edilen tam yağlı UHT süt grubunda ise *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 suşunun sayısının 1. saatten itibaren her iki MOI değerinde de tespit sınırının (1.30 log kob/ml) altında kaldığı saptanmıştır. Çalışma sonucunda araştırmacılar litik etki gösteren bir bakteriyofaj uygulamasıyla *Pseudomona*

aeruginosa ATCC 15442 suşunun herhangi bir kimyasal koruyucu kullanmadan sütte elimine edilebileceği sonucuna varmışlardır (Bestil vd. 2023).

Uygun koruma koşulları sağlanamadığında sıvı halde çözeltiler, gliserol veya besiyeri içerisinde depolanan veya aerosol halde depolanan bakteriyofajların canlılığını kaybedeceği literatürde bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda hazırlanan başlangıç sıvı ve aerosol halde olan bakteriyofaj preparatlarının titrelerinin çevresel faktörlerden etkilenecek (pH, nem, sıcaklık, çözeltinin bileşenleri, vb.) hızla azaldığı tespit edilmiştir. (Xiao vd. 2022; Flint vd. 2023). Önceki çalışmalarda mikrokapsülleme tekniğinin bakteriyofajları olumsuz gastrointestinal koşullara karşı koruyabildiği ve hedef bölgeye ulaşmak için bakteriyel virüslerin salınımının kontrol edilebildiği gösterilmiştir (Ergin vd. 2021). Mikrokapsülleme, fajları canlı tutmak, işleme ve depolama sırasında hücre canlılığını korumak için etkili bir stratejidir. Ayrıca depolama, uygulama ve taşıma kolaylığı sağlamak için fajın toz formunda kapsüllenmesi tercih edilmektedir (Choi vd. 2023).

2.4. Püskürterek kurutma

Bakteriyofajların kullanımında çeşitli zorluklarla karşılaşmaktadır. Bu zorluklar, çevresel faktörlerin de dahil olduğu teknolojik bariyerlerdir. Bakteriyofajlar, faj terapisinin uygulandığı sırada hayvanların gastrointestinal sistemlerinde bulunan asit ve safra tuzu streslerine karşı direnç gösterememesi veya gıda işleme sistemlerinde biyokontrol amacıyla uygulanırken düşük veya yüksek sıcaklıklara ve kimyasallara karşı koyamamaları nedeniyle aktivitelerini yitirebilmektedir. Bahsi geçen bu ve buna benzer durumlardan dolayı bakteriyofajları potansiyel çevresel etkilere karşı koruma ihtiyacı doğmuştur. Çevresel stres koşullarına karşı bakteriyofajların en iyi koruma yolu kapsülleme teknolojisidir (Hussain vd. 2017).

Bakteriyofajların uzun süre depolanmasında kurutma işleminden yararlanılmaktadır. Bakteriyofajların kurutulmasında en yaygın kullanılan yöntemlerden biri püskürterek kurutmadır (Carrigy 2019). Yakın tarihe kadar bakteriyofajlar genellikle süspansiyon formunda uygulanmıştır. Süspansiyon formundaki bakteriyofajlar 2-8°C’lerde kısa (haftalar) ve orta (aylar) depolama sürelerinde stabiliteyi koruyabilmektedir. Bazı durumlarda bakteriyofajların stabiliteyi arttırmak için albuminler, tuzlar veya jelatinler gibi ajanlar bakteriyofaj süspansiyonlarına eklenebilmektedir. Dondurma veya dondurarak kurutma yöntemleri depolama süresini uzatmakla birlikte, bu yöntemler yüksek miktarda enerji sarfıyatı gerektirmektedir (Tabare vd. 2021).

Püskürterek kurutma tekniğinde sıvı halde bulunan hammadde, kurutma kulesine atomizer yardımıyla nozülünden geçerek yüksek bir hız ve basınçla püskürtülmekte ve işlem sonunda granül halinde kurutulmuş ürün elde edilmektedir. Püskürtmeli kurutucu kullanarak mikroorganizmaların muhafazası amacıyla yapılmış pek çok çalışma mevcuttur (Nale 2013; Öztürk ve Çakır 2015). Mikroenkapsülasyon teknikleri arasında yer alan püskürterek kurutma, sıvı formülasyonu toz formda ürüne dönüştürmede esnek çalışma koşullarında (sıcaklık, besleme hızı, vb.) uygulanabilen ekonomik bir yöntemdir. İlaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılan püskürterek kurutma; hızlı, sürekli ve tekrarlanabilir olması ile bakteriyofajların toz formda uzun süreli depolanmasında dondurarak kurutmaya göre daha avantajlıdır. Ayrıca püskürterek kurutma, çeşitli form

ve boyutlara sahip olacak şekilde stabil parçacıkları üretebilmek için uygun bir yöntemdir (Tabare vd. 2021). Püskürterek kurutma; partikül boyutu, yoğunluğu, yüzey bileşimi ve boyut dağılımı gibi toz özelliklerinin kontrol edilebildiği düşük maliyetli bir teknoloji olmasından dolayı, gıda ve ilaç sektörlerinde biyoaktif maddelerin korunmasında sıklıkla kullanılmaktadır (Carrigy 2019). Püskürterek kurutmada yüksek sıcaklıklarda (110-200°C) hava kullanılsa da hem sıcak havaya maruz kalma süresi kısa, hem de kuruyan ürünün sıcaklığı 40-70°C'lerde olmaktadır (Özkan Güner 2017; Rezvankhah vd. 2020). Ancak kurutma için yüksek sıcaklıklara çıkılması ve püskürtme işlemi sırasındaki mekanik stres bakteriyofaj stabilitesinin bozulmasına neden olabilmektedir. Bununla birlikte, inhalasyon (nefesle içe çekilen) yoluyla uygulanan ilaçların yapımında kullanılmak üzere başta *Pseudomonas* cinslerine karşı olmak üzere bakteriyofajların püskürterek kurutulduğu çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Chang vd. 2019; Leung vd. 2018; Zhang vd. 2020). Püskürterek kurutmanın düşük sıcaklıklarda bile toz oluşumu sağlayarak bakteriyofaj da dahil olmak üzere ısıya duyarlı materyaller için oldukça etkili bir teknik olduğu bildirilmektedir. Püskürterek kurutma sırasında tipik olarak laktoz, trehaloz, mannitol ve polietilen glikol gibi şekerler ve polimerler, bakteriyofaj kapsülleme için yardımcı maddeler olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Choi vd. 2022). Kapsülleme işleminde aljinat, kitosan, etil selüloz, karboksimetilselüloz, hidroksipropil metil selüloz, karregen, peyniraltı suyu proteinleri, jelatin, pektin, nişasta, keçiyoynuzu gamı gibi materyallerin kullanımı tercih edilmektedir (Choińska Pulit vd. 2015).

Probiyotik bakterilerin, proteolitik aktivite gösteren bakterilerin ve bakteriyofajların araştırıldığı birçok çalışmada enkapsülasyon teknikleri kullanılmıştır. Enkapsülasyon tekniği ile kapsülasyon işlemi sırasında kullanılan taşıyıcı materyal (duvar malzemesi) ve bu materyalin oranı mikroorganizmaların canlılığını etkilemektedir (Noor vd. 2022). Enkapsülasyonda kullanılan taşıyıcı materyal, raf ömrünü, kapsül verimliliğini ve kapsülleme kapasitesini doğrudan etkilemektedir (Bhagwatvd. 2020).

Bakteriyofaj uygulamasının başarılı olabilmesi için en önemli gerekliliklerden biri stabilitedir. Bakteriyofajların cinslerine göre stabilite kavramı değişkenlik göstermektedir. Bazı bakteriyofajlar için birkaç gün aktivitelerini korumaları stabil olarak kabul edilmelerinde yeterli iken, bazı bakteriyofajların stabil sayılmaları için aktivitelerini yıllarca korumaları gerekmektedir. Söz konusu durum nedeniyle, literatürde bakteriyofajların uzun süre korunmaları ve depolanmaları için genel güvenilir yöntemler net olarak ortaya konulamamıştır (Jończyk Matysiak vd. 2019). Protein bir zarf içinde paketlenmiş nükleik asitten oluşan kararsız yapısı bakteriyofajları, yüksek ve düşük sıcaklık, pH, tuz ve ışık gibi çevresel faktörlere karşı hassas hale getirmektedir. Başarılı bir bakteriyofaj uygulaması için bakteriyofajların üretim, depolama ve uygulama sırasında yüksek titrelerde aktif olarak kalması gerekmektedir. Bakteriyofajlar sıvı besiyeri ortamlarında veya tampon çözelti içerisinde 2-8°C'lerde depolama gerektirmekte ve buna rağmen aktivitelerini depolama süresi (1 yıl) sonunda kaybedebilmektedir. Bakteriyofajların toz formunda olması, sıvı formuna kıyasla uzun raf ömrü ve kolay depolama gibi bazı avantajlar sağlamaktadır (Ergin 2022).

Bakteriyofajların sadece tampon çözelti içerisinde kurutulduğunda titrelerinde 1-10 log azalma olduğu tespit edilirken, taşıyıcı materyal olarak sakkaroz, laktoz ve thereloz gibi şekerlerin kurutma çözeltisine eklenmesinin kurutma işlemi ve depolama sırasında bakteriyofajlar için yüksek düzeyde koruma sağladığı bildirilmiştir. Bu durumun, şekerlerin yüksek camsı geçiş sıcaklığından kaynaklandığı ve ayrıca su ikamesi olarak

peyniraltı suyu proteinlerinin bakteriyofajları stabilize etmede önemli rol oynadığı belirtilmiştir. Kurutma işlemi sırasında su molekülleri ve bakteriyofajı kaplayan proteinler arasında kurulan hidrojen bağı, taşıyıcı materyal olan proteinin açılmasını önlemek ve bakteriyofajları amorf camsı matris içinde hareketsiz hale getirmek için yardımcı maddelere bağlanarak faj titresini değiştirilebilmektedir. Kurutma işlemi sırasında şekerlerin kristallenmesi bakteriyofajları öldürmektedir. Bu nedenle amorf şeker bileşenlerinin camsı geçiş sıcaklıklarının depolama sıcaklığının altında kalması çok önemlidir (Leung vd. 2018). Kurutma işlemi sırasında bakteriyofaj aktivitesini maksimum düzeyde korumak ve kurutma işleminin bakteriyofaj üzerindeki zararlı etkilerini minimize etmek için taşıyıcı materyaller kullanılmaktadır. Polisakkaritler ve disakkaritler (maltodekstrin, dekstran, trehaloz, laktoz, sükroz), proteinler (kazein, peyniraltı suyu protein izolatu, laktoferrin) ve bunların karışımları bakteriyofaj tozlarının üretiminde en çok kullanılan taşıyıcı materyallerdir (Ergin 2022).

Yüksek molekül ağırlıklı bir polisakkarit olan maltodekstrin, püskürterek kurutma işleminde biyomoleküllerin stabilitesini korumak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Choi vd. 2022). Taşıyıcı materyal olarak kullanılan maltodekstrin, mısır nişastasının asidik veya enzimatik yöntemle kısmi hidrolizi sonucunda elde edilen, dekstrozu eş değeri 20 veya 20'den küçük olan bir maddedir. Maltodekstrin, yüzey aktif bir bileşen olup çözeltileri düşük viskoziteye sahiptir. Gıda endüstrisinde katı ve sıvı yağların, vitaminlerin, mineral maddelerin ve renk maddelerinin mikroenkapsülasyonunda kullanıldığında Maillard reaksiyonunun hızını düşürmesi ve emülsifiye edici özelliğinin düşük olmasından dolayı yardımcı taşıyıcı materyal olarak kullanılmaktadır (Türker vd. 2018).

Maltodekstrin ve diğer karbonhidratlardan oluşan bir ikili sistemin, nem içeriği, su aktivitesi, higroskopisite ve camsı geçiş sıcaklığı açısından biyomolekül stabilitesini artırabileceği bildirilmektedir (Choi vd. 2022). Ayrıca, polisakkarit-protein karışımları mikroorganizmaların ve gıdaların çevresel stres faktörlerinden korunmaları ve uzun süre depolanmalarına katkı sağlamaktadır (Chávez ve Ledebøer 2007). Peyniraltı suyu proteinleri amfoterik karaktere sahip olmalarından dolayı kapsülleme işleminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Peyniraltı suyu proteinleri, peynir yapımının yan ürünü olup düşük maliyetlidir. Peyniraltı suyu proteinleri hafif jelleşme durumu, biyo-uyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, toksik olmama ve pH değeri açısından biyoaktif bileşenlerin kapsüllemesinde kullanılabilir. Ayrıca bu proteinler, aljinat gibi negatif yüklü polisakkaritlerle kolayca karışabilme özelliğine sahiptir (Choińska-Pulit vd. 2015; Tang vd. 2013). Peyniraltı suyu proteini izolatu, mide asidine karşı bakteriyofajlar için iyi bir koruma oluşturmakta, ancak peyniraltı suyu proteininin taşıyıcı materyal olarak tek başına kullanılması fiziksel olarak güçlü ve stabil bir yapı sağlamayabilmektedir. Taşıyıcı materyal bileşiminde karbonhidratların bulunması, kuruyan damlacıkların çevresinde bir kabuk tabakası oluşumuna katkıda bulunarak etken madde için koruma sağlamaktadır (Ergin 2022). Literatürde, püskürterek kurutulmuş polisakkarit bileşenlerini içeren taşıyıcı materyallerinin yüzeylerinin son derece girintili olduğundan bahsedilirken, peyniraltı suyu proteinlerinin taşıyıcı materyal olarak kullanılması sonucunda elde edilen mikrokapsüllerin pürüzsüz ve girintisiz bir yüzeye sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca araştırmacılar kapsülasyon işlemi sırasında peyniraltı suyu proteinlerinin maltodekstrin ile kullanılmasının yüzey girintilerini en aza indirebileceğini belirtmişlerdir. Protein ve karbonhidratların bu amaçla birlikte kullanımı

mikrokapsüllerin yüzeysel kırılmalarını sınırlandırmakta ve mikrokapsüllerin çekirdek duvarının fonksiyonelliğini arttırarak depolama süresince çekirdekte bulunan materyalin bozulmasını ve kaybını önlemektedir. Birlikte kullanımda peyniraltı suyu proteinleri emülsifiye edici ve film oluşturuvcu, karbonhidratlar ise esas matriksi oluşturuvcu materyaller olarak görev yapmaktadır (Aloğlu ve Öner 2010).

Bakteriyofajlar, kurutulması sırasında ve/veya kurutulduktan sonra depolama sürecinde fiziksel ve kimyasal streslerle karşılaşabilmektedir. Bu durum toz formda bulunan bakteriyofaj ürünlerinin dikkatli bir şekilde üretilmesini gerektirmektedir. Depolama süresince bakteriyofajın aktivitesini kaybetmemesi ve faj titresinde azalma meydana gelmemesi gerekmektedir. Bakteriyofajlar stabilitesinin korunması için püskürterek kurutma, püskürterek dondurarak kurutma veya dondurarak kurutma gibi farklı teknikler kullanılarak kapsüllenmektedir. Bakteriyofajların kapsüllenmesi sırasında formülasyonunda kullanılan maddelerin fiziksel ve kimyasal özellikleri ile kapsülleme tekniğı oldukça önemlidir. Bakteriyofajlar protein yapısında olması sebebiyle organik çözücüler, yüksek sıcaklık ve pH gibi proteinleri denatüre eden etkenlere karşı hassastır. Bakteriyofajların kurutma işlemi ile kapsüllenmesinde, formülasyonun hazırlanması sürecinde uygulanan karıştırma ve çalkalama işlemleri ve kurutma işlemi sırasındaki kuruma gerilmeleri gibi mekanik stresler dikkatlice değerlendirilmelidir. Bakteriyofajların kapsüllenmesinde mevcut İyi Üretim Uygulamaları (cGMP) ile uyumlu, ölçeklenebilir ve düşük maliyetli süreçlere ihtiyaç bulunmaktadır (Malik 2021).

Konu ile ilgili yapılan bir çalışmada laktoz ve lösın içeren bakteriyofaj tozlarının depolama süresince stabilitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, antibiyotik direncine sahip patojen bakterilerden biri olan *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı aktif olan üç farklı litik bakteriyofaj (PEV1, PEV20, PEV61), taşıyıcı materyal olarak laktoz ve lösın içeren çözeltiler yardımıyla püskürtmeli kurutucuda kurutulmuştur. Hacmi 200 ml ve konsantrasyonu 25 mg/ml, pH değeri ise 7.4 olacak şekilde hazırlanmış besleme çözeltilisine 2 ml bakteriyofaj süspansiyonu (10^{10} POB/ml) eklenerek püskürtmeli kurutucuya beslenecek olan çözelti hazırlanmıştır. Çözelti içerisinde laktoz ve lösın oranları sırasıyla %55- 90 ve %45-10 arasında değişmiştir. Üretilen bakteriyofaj tozları 20°C'de farklı koşullarda (%15 bağıl neme sahip akrilik kutularda ve %60 bağıl neme sahip alüminyum paketler içerisinde) 12 ay süresince depolanmıştır. Püskürterek kurutma koşulları; giriş sıcaklığı 60°C, besleme hızı 2 ml/dakika ve çıkış sıcaklığı 40-41°C olacak şekilde belirlenmiştir. Kurutma sırasında bakteriyofaj tozlarının 2 µm'den daha küçük küresel parçacıklar haline geldiğı gözlenmiştir. Taşıyıcı materyalleri içeren kurutma çözeltilisinde laktoz konsantrasyonunun azalmasının ve lösın konsantrasyonunun artmasının, pürüzlü yüzeylere sahip düzensiz daire şeklinde parçacıkların oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir. Bakteriyofaj tozlarının 12 aylık depolama sürecinde partikül boyutlarında istatistiksel olarak önemli bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Bakteriyofaj tozlarının termal özellikleri incelendiğinde, elde edilen toz örneklerin camsı geçiş sıcaklıklarının 60-63°C'ler arasında değiştiğı ve tozların amorf yapıya sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca 12 aylık depolama süresinin sonunda toz örneklerin camsı geçiş sıcaklıklarının 4 ile 9°C'ler arasında değişen düzeylerde arttığı saptanmıştır. Çalışmada tüm bakteriyofaj tozlarının sorpsiyon izotermeleri incelendiğinde, re-kristalizasyon olayı gözlemlenmiş ve bu durumun tozların önce nem çekip ardından da nem kaybederek kristallenmesinden kaynaklandığı değerlendirilmiştir. Stabiliteleri açısından ise tüm bakteriyofajların püskürterek kurutma sırasında faj titrelerinin yaklaşık olarak 0.5 log

birim azaldığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte 12 aylık depolama sürecinin ilk ayında bakteriyofajların neredeyse tamamının stabilitesini büyük ölçüde koruduğu saptanmıştır. Araştırmacılar, %90 laktoz içeren PEV61 bakteriyofajının tüm depolama süresince faj stabilitesinin yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Depolama sonunda PEV61 bakteriyofajının %70 ve %80 laktoz içeren çözeltilerinin faj titresinin sırasıyla 0.5 log ve 0.4 log birim azaldığı belirlenmiştir. PEV61 bakteriyofajının %55'ten daha düşük laktoz içeriğine sahip çözeltilerinin kurutulması ile üretilen bakteriyofaj tozlarının faj titresinin ise depolamanın 6. ayında yaklaşık 0.7 log POB/ml'ye kadar düştüğü ve 12. aydaki faj titresinin 1.2 log POB/ml olduğu saptanmıştır. Çalışmada PEV1 ve PEV20 bakteriyofajları için de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Çalışma sonunda taşıyıcı materyal bileşiminde şeker içeriğinin yüksek olmasının bakteriyofajların stabilitesinin korunmasında olumlu etki sağladığı değerlendirilmiştir (Chang vd. 2019).

Konu ile ilgili yapılan başka bir çalışma PEV2 (*Podovirus*) ve PEV40 (*Myovirus*) *Pseudomonas* bakteriyofajları trehaloz (%70 ve %60) ve lösün (%30 ve %40) içeren çözeltiler kullanılarak püskürterek kurutulmuştur. Elde edilen bakteriyofaj tozları 4 ile 20°C'lerde vakumlu ambalajlarda 12 ay süresince depolanmıştır. Püskürterek kurutma koşulları; giriş sıcaklığı 60°C, besleme hızı 1.8 ml/dakika ve çıkış sıcaklığı 40-45°C olacak şekilde belirlenmiştir. Üretilen bakteriyofaj tozlarının yüzeylerinin çoğunlukla kristal lösünle kaplanmış olduğu tespit edilmiştir. Depolama süresince bakteriyofaj tozlarının morfolojik yapılarında önemli bir değişim olmadığı saptanmıştır. PEV 40 bakteriyofajını içeren tozların partikül boyutunun, PEV2 bakteriyofajını içeren tozlara göre daha büyük olduğu belirlenmiştir. Ayrıca %70 trehaloz ve %30 lösün karışımından oluşan çözelti içinde kurutulan PEV2 fajının her iki depolama sıcaklığında da 12 ay süresince aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. PEV2 bakteriyofajını içeren %60 trehaloz ve %40 lösün karışımından oluşan çözeltinin kurutulması ile elde edilen tozlarda ise 20°C'de depolanan örneklerde PEV2 bakteriyofajının titresindeki azalmanın püskürterek kurutma işleminden hemen sonra 0.67 log birim olduğu tespit edilirken, söz konusu azalmanın 12 ay depolama süresinin sonunda 1.54 log birim olduğu saptanmıştır. Her iki depolama sıcaklığı ve çözelti için PEV40 bakteriyofajının faj titresindeki azalmanın 12 ay sonunda 1 log birimden düşük olduğu belirlenmiştir (Leung vd. 2018).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Pseudomonas phage gh-1 (ATCC 12633-B1) bakteriyofajı ve *Pseudomonas putida* (ATCC 12633) suşu Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC)'ndan, bakteriyofaj ve bakterilerin gelişmesi için kullanılacak besiyeri ortamları Sigma Aldrich Co. (St. Louis, Amerika Birleşik Devletleri) ve Merck KGa (Darmstadt, Almanya) firmalarından satın alınmıştır. Çalışmada kullanılan çiğ süt Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi'ne bağlı Süt İşletmesi'nden temin edilmiştir. Tam yağlı UHT (%3 yağlı, %8.2 yağsız süt kurumaddesi, %4.5 laktoz ve %3.5 protein) sütler Antalya'da bulunan yerel marketlerden satın alınmıştır. Ayrıca yaklaşık %97 kurumadde içeriğine sahip yağsız süt tozu Ekiciler Süt Gıda Tar. Hay. San. ve Tic. A. Ş. (Antalya)'den temin edilmiştir. Bakteriyofaj tozlarının üretimi ve sütlerde yapılan denemeler ve analizler Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.2. Metot

Tez çalışması kapsamında, püskürtmeli kurutucu kullanılarak *Pseudomonas phage gh-1* (ATCC 12633-B1) bakteriyofajının taşıyıcı materyal olarak seçilen maltodekstrin ve peyniraltı suyu protein izolatının farklı oranlarda kullanılması ile kurutulmasının optimize edilmesi ve elde edilen bakteriyofaj tozunun model gıda olarak seçilen sütte psikrotrof bir bakteri olan *Pseudomonas putida* ATCC 12633'ün (*P. putida*) gelişmesini önlemede etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikle *P. putida* bakterisi geliştirilerek gelişim eğrisi çıkarılmıştır. Gelişim eğrisinin oluşturulmasının ardından *P. putida* bakterisinin besiyerinde ve UHT sütlerde proteolitik aktivitesi tespit edilmiştir. Bu işlemleri takiben *Pseudomonas phage gh-1* bakteriyofajının geliştirilerek çoğaltılması sağlanmıştır. Çoğaltılan sıvı *Pseudomonas phage gh-1* bakteriyofajının özelliklerinin belirlenmesi amacıyla farklı sıcaklık ve pH değerlerine karşı direncinin tespiti ile farklı konsantrasyondaki bakteriyofajın konakçı bakteriye karşı aktivitesinin belirlenmesi analizleri gerçekleştirilmiştir. Ardından sıvı formda çoğaltılan ve 4°C'de depolanan *Pseudomonas phage gh-1* bakteriyofajının kurutularak bakteriyofaj tozu elde edilmesi amacıyla püskürtmeli kurutucuda optimizasyon çalışması yapılmıştır. Yapılan optimizasyon işlemi ile bakteriyofaj tozunun elde edilmesinde 3 bağımsız değişken (taşıyıcı materyaldeki maltodekstrin oranı, taşıyıcı materyaldeki peyniraltı suyu protein izolatı oranı ve kurutma çıkış sıcaklığı) kullanılarak bakteriyofaj titresinde en az kayıp olması ve en yüksek çözünürlük değerlerinin elde edilmesi için püskürtmeli kurutucu ile kurutma işlemleri gerçekleştirilmiştir. Optimum değerlerde üretilen bakteriyofaj tozları ve bakteriyofajların sıvı formları 6 ay süre ile 4°C'de depolanmıştır. Bakteriyofaj tozu örneklerinde çözünme, faj titresi, partikül boyutu, kurumadde, su aktivitesi, yığın yoğunluğu, renk, camsı geçiş sıcaklığı ve görüntüleme analizleri yapılmıştır. Ayrıca depolamanın 1., 3. ve 6. aylarında sütte bakteriyofaj uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, *P. putida* bakterisi ile *Pseudomonas putida gh-1* bakteriyofajını farklı konsantrasyonlarda (10^6 ve 10^8 POB/ml) ve formlarda (sıvı ve toz) içeren süt örneklerinde 72 saatlik depolama süresince 4 ve 10°C'lerde proteolitik aktivite, viskozite ve pH değerleri ile bakteri sayılarının ve faj titreleri tespit edilmiştir.

3.2.1. *Pseudomonas putida* ATCC 12633 suşunun aktifleştirilmesi ve gelişim eğrisinin oluşturulması

Çalışmada orijinal ampulündeki *P. putida* suşu kullanım talimatına uygun olarak Nutrient sıvı besiyeri (Sigma Aldrich Co.) içerisine aşıl原因arak çalkalamalı inkübatörde (ZHWHY-200B, Zhicheng, Zhicheng Instrument, Shanghai, Çin Halk Cumhuriyeti) 30°C’de 24 saat 100 rpm’de inkübe edilmiştir (Munna vd. 2015). İnkübasyon bitiminde karışım, santrifüj koşulları 5200 g, 5°C ve 5 dakika olacak şekilde santrifüj (UniCen MR, Herolab GmbH, Wiesloch, Almanya) 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 hacimde konularak ve sonraki analizlerde kullanılmak üzere -80°C’de depolanmıştır (Ergin 2013). Konakçı bakterinin gelişim eğrisinin oluşturulması için stok *P. putida*, Nutrient sıvı besiyeri içerisine aşıl原因arak çalkalamalı inkübatörde 30°C’de 24 saat 100 rpm’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince birer saat aralıklarla örnek alınarak konakçı bakterinin sayımı gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Nutrient agar (Sigma Aldrich Co.) kullanılarak dökme plak yöntemi ile petri kutularına ekimi takiben aerobik ortamda 30°C’de 1-2 gün süreyle inkübasyon sonrası sayım yapılmıştır. Ayrıca, *P. putida* bakterisini içeren Nutrient sıvı besiyerinin optik yoğunluk (OD) değerini belirlemek üzere 620 nm’de spektrofotometri cihazı (UV-Visible Spectrophotometer, Thermo scientific Evolution Array, Thermo Fisher Scientific, Seul, Güney Kore) ile ve 600 nm’de McFarland cihazı (Den-18, McFarland, Kaliforniya, Amerika Birleşik Devletleri) ile absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen veriler kullanılarak *P. putida* suşunun gelişim eğrisi oluşturulmuştur.

3.2.2. *Pseudomonas putida* ATCC 12633’nin proteolitik aktivitesinin besiyerinde tespiti

P. putida ATCC 12633’nin proteolitik aktivitesi Le-Nguyen vd. (2020)’nin kullandıkları yöntem ile belirlenmiştir. Gelişim eğrisi oluşturularak stok kültür olarak hazırlanan *P. putida*, Nutrient sıvı besiyeri içerisine aşıl原因mış ve optimum gelişim gösterdiği koşullarda (30°C’de 24 saat 100 rpm çalkalama hızında) inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından *P. putida* içeren Nutrient sıvı besiyerinin OD değerini belirlemek üzere 600 nm’de McFarland cihazı ile absorbans değerleri ölçülmüştür. Sıvı besiyeri içerisinde OD değeri 2.8 olarak tespit edilen *P. putida*, proteolitik aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Agar Spot yöntemi ile yapılan ekimde kullanılmıştır. *P. putida*’nın proteolitik aktivitesinin belirlenmesi amacıyla %1 yağsız süt tozu içeren Plate Count Agar (PCA, Sigma Aldrich Co.) besiyeri hazırlanarak OD değeri 2.8’e ulaşmış olan bakteri kültürü spot yöntemi ile ekim yapılarak 37°C’de 4 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Şeffaf olarak gözüken ve ‘Transparan zone’ olarak adlandırılan bakteri kültürleri proteaz pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.3. *Pseudomonas putida* ATCC 12633'nin UHT sütler içerisinde proteolitik aktivitesinin tespiti ve UHT sütlerin viskozite ve pH değerleri üzerine etkisinin tespiti

P. putida ATCC 12633 suşunun gelişiminin süttün proteolitik aktivitesine etkisini belirlemek amacıyla sıvı besiyeri içerisinde OD değeri 2.8'e ulaşana kadar geliştirilen *P. putida*'nın ringer çözeltilisinde ($\frac{1}{4}$ kuvvetinde, LB.M.115525.0001, Merck KGa) uygun desimal seri dilüsyonlar (10^{-1} - 10^{-5}) hazırlanmıştır. Hazırlanan uygun desimal seri dilüsyonlar UHT sütleri ilave edilerek (2 ml seri dilüsyon + 18 ml UHT süt) 4, 10 ve 30°C'lerde 48 saat depolanmıştır. Bakteri aşılama sütleri haricinde kontrol grubu olarak sadece UHT süt örnekleri de diğer örneklerle aynı koşullarda depolanmıştır. Depolamanın 0., 12., 36. ve 48. saatlerinde proteolitik aktivite değerleri ve *P. putida* sayımı ile pH ve viskozite analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. Proteolitik aktivite analizi

Sütlerde proteolitik aktivite analizi spektrofotometrik olarak Church vd. (1983)'ün belirttikleri yöntemle yapılmıştır. Analiz için öncelikle OPA (o-fitaldialdehit) çözeltisi hazırlanmıştır. Bu amaçla 50 ml'lik balon jöjeye 0.95 g sodyum tetra borat, 0.5 g sodyum deoksil sülfat ve 0.1 ml 2-merkaptetanöl eklenerek karıştırılmış ve balon jöje çizgisine kadar saf su ile tamamlanmıştır (A). Bir deney tüpünde 40 mg o-fetaldehit, 1 ml metanol içinde çözündürülmüştür (B). Sonrasında A ve B çözeltileri karıştırılarak OPA çözeltisi elde edilmiştir. Homojen hale getirilen 30°C'deki örnekten 1 ml deney tüpüne alınmış ve üzerine 0.68 N TCA (Triklör asetik asit) çözeltisinden 2.2 ml eklenip karıştırılmış ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 6000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen filtrattan 50 µl alınarak üzerine 1 ml OPA çözeltisi eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra 340 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçüm yapılmıştır.

3.2.3.2. Viskozite analizi

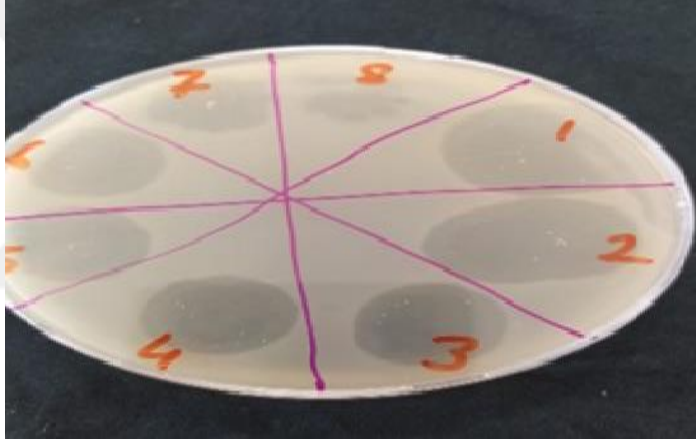
Sütlerin viskozite değerleri Coghetto vd. (2016)'nın kullandıkları yöntem modifiye edilerek Brookfield DV II+ viskozimetresi (Model DV II+Pro, Brookfield Engineering Laboratories Inc, Middleboro, MA, Amerika Birleşik Devletleri) ile belirlenmiştir. Sütlerin viskozite ölçümü 25°C'de, 100 rpm hızda ve SC21 nolu spindle kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.3. pH analizi

Sütlerin pH değeri Orion 2 Star (Orion 2 Star, Thermo Scientific, Fisher Scientific, Bremen, Almanya) marka dijital pH metre kullanılarak tespit edilmiştir.

3.2.4. *Pseudomonas* phage gh-1 bakteriyofajının aktifleştirilmesi, çoğaltılması ve titresinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan orijinal ampulündeki *Pseudomonas* phage gh-1 bakteriyofajı, kullanım talimatına uygun olarak Nutrient agar (Sigma Aldrich Co.) ve Nutrient yumuşak agar kullanılarak aktif hale getirilmiştir. *Pseudomonas* phage gh-1 bakteriyofajının çoğaltılması için, içerisinde 2.5 ml Nutrient yumuşak agar bulunan tüplere hacmi yaklaşık olarak 0.1 ml olacak şekilde 30°C’de 18-24 saat geliştirilmiş ve OD değeri 2.8 olan *P. putida* ATCC 12633 konakçı bakteri eklenerek tüp içeriği, petri kutusundaki Nutrient agar üzerine dökülüp homojen şekilde yayılmıştır. Yumuşak agar katılaştıktan sonra 1 ml sıvı besiyeri içerisinde çözündürülen orijinal ampulündeki bakteriyofaj tozundan steril ringer çözeltisi kullanılarak 10^8 düzeyine kadar seyrelti dizisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerden agar spot yöntemi ile ekim yapılmıştır. Ekim yapılan petriler 30°C’de 24 saat süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda Şekil 3.1’de görüldüğü gibi konakçı bakteri olan *P. putida* suşu üzerinde kalan berrak dairesel plakların *Pseudomonas* phage gh-1 bakteriyofajının varlığını göstermektedir (Adams 1959).



Şekil 3.1. Spot testi ile *Pseudomonas* phage gh-1 bakteriyofajının Nutrient agar ve Nutrient yumuşak agar besiyerleri kullanarak konakçı bakteri olan *P. putida* ATCC 12633 suşu üzerinde gelişiminin belirlenmesi

Spot testi sonucunda *Pseudomonas* phage gh-1 bakteriyofajının varlığı tespit edilen uygun dilüsyonlardan *Pseudomonas* phage gh-1 bakteriyofajını çoğaltmak için ekim yapılmıştır. İnkübasyondan sonra katı agar, üzerine 2-3 ml Nutrient sıvı besiyeri ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletilerek katı agar üzerinde bulunan yumuşak agar bir pipet ucu ve steril kaşık yardımıyla steril santrifüj tüpüne aktarılıp santrifüj (3000 rpm, 4°C’de 10 dakika) edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte kalan sıvı kısım, 0.22 µm gözenek çapına sahip filtreden (094.07.003, Isolab Laborgerate GmbH, Wertheim, Almanya) geçirilip diğer analizlerde kullanılmak üzere hazırlanan sıvı formdaki bakteriyofaj solüsyonu, cam deney tüplerinde faj titresi 10^{14} POB/ml olana kadar çoğaltma işlemine tabi tutulmuştur.

Bakteriyofaj titresi (POB/ml), Sambrook vd. (2001)’nin bildirdikleri çift tabaka agar yöntemi modifiye edilerek ve Nutrient agar kullanılarak belirlenmiştir. 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 10^8 düzeyine kadar seyrelti dizisi hazırlanmıştır. *P. putida* ATCC 12633 konakçı bakteri 30°C 'de 18-24 saat Nutrient sıvı besiyerinde geliştirilerek OD değeri 2.8 olarak tespit edildikten sonra 0.3 ml alınıp, 45°C 'deki su banyosunda (JSWB 22-T, JSR, Chungcheongnam-do, Güney Kore) tutulan ve içerisinde 2.5 ml yumuşak agar bulunan test tüplerine (16x100 mm) aktarılmıştır. Hazırlanan seyreltik bakteriyofaj çözeltilerinden de yumuşak agar içerisine 0.1 ml ilave edilmiş ve konakçı bakteriye adsorbsiyonu için 10 dakika oda sıcaklığında ($20-25^{\circ}\text{C}$ 'de) bekletilmiştir. Tüpler birkaç saniye vorteksle (Velp Classic Vortex, Velp Scientifica, Usmate, İtalya) karıştırıldıktan sonra petri kutusunda daha önceden hazırlanan alt tabaka (katı agar) üzerine dökülüp homojen bir şekilde yayılmış ve yumuşak agarın katılaşması için 5-10 dakika beklenmiştir. Ardından petri kutuları 30°C 'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve son aşamada petri kutularında, bakteriyofaj uygulama bölgelerindeki lize plakları (berrak plaklar) (Şekil 3.2.) sayılarak bakteriyofaj titreleri belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Çift tabaka bakteriyofaj ekim yöntemi ile *Pseudomonas* phage gh-1 bakteriyofajının faj titresinin belirlenmesi sırasında oluşan berrak plaklar

3.2.5. Sıvı formda olan bakteriyofajların özelliklerinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan bakteriyofajların sıvı formları, çoğaltma işlemi tamamlanınca cam deney tüplerinden polipropilen özelliğe sahip DNase ve RNase enzimleri içermeyen steril falkon tüplere aktararak (078.02.005, Isolab) buzdolabı koşullarında (4°C 'de) 6 ay süreyle depolanmıştır. Depolanan sıvı faj formu, sütte bakteriyofaj uygulamalarının gerçekleştirildiği zaman aralıklarında titreleri belirlenerek toz formda bulunan bakteriyofajlarla birlikte sütte gerçekleştirilen uygulamalarda kullanılmıştır.

3.2.5.1. Bakteriyofajların farklı sıcaklık değerlerine karşı direncinin tespiti

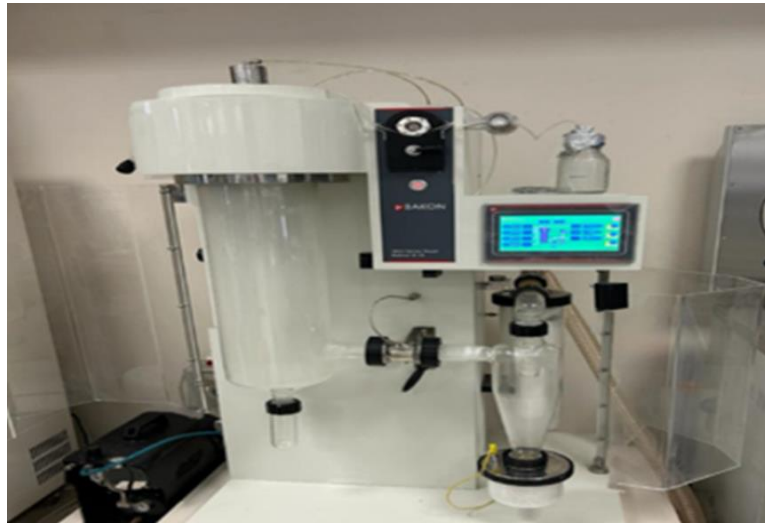
Pseudomonas phage gh-1 bakteriyofajın farklı sıcaklık değerlerindeki aktivitesinin belirlenmesinde, Hu vd. (2015)'in belirttikleri yöntemin modifiye edilmiş hali kullanılmıştır. Bu amaçla, 30°C'de 18-24 saat geliştirilmiş olan ve bakteri konsantrasyonu 10^7 kob/ml olan *Pseudomonas putida* ATCC 12633 konakçı bakteri ve titresi 10^5 POB/ml olan bakteriyofaj örnekleri kullanılmıştır. Sıcaklık değerlerine karşılık bakteriyofaj aktivitesinin analizi için 100 µl bakteri ve 100 µl bakteriyofaj, 9.8 ml Nutrient sıvı besiyerine eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletmenin ardından 4, 25 ve 37°C'lerde 72 saat süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0., 24. ve 72. saatlerinde çözeltilerden örnek alınarak bakteriyofaj titresi belirlenmiştir.

3.2.5.2. Bakteriyofajların farklı pH değerlerine karşı direncinin tespiti

Pseudomonas phage gh-1 bakteriyofajın farklı pH değerlerindeki aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Nutrient sıvı besiyerinin pH değeri 1 M HCl veya 1 M NaOH ile 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0'a ayarlanıp Hu vd. (2015)'in belirttikleri yöntemin modifiye edilmiş hali kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz için 30°C'de 18-24 saat geliştirilmiş ve bakteri konsantrasyonu 10^7 kob/ml olan *Pseudomonas putida* ATCC 12633 konakçı bakteri ve titresi 10^5 POB/ml olan bakteriyofaj örnekleri kullanılmıştır. Farklı pH değerlerine karşılık bakteriyofaj aktivitesinin analizi için 100 µl bakteri ve 100 µl bakteriyofaj 9.8 ml Nutrient sıvı besiyeri içerisinde 25°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0., 24., 48. ve 72. saatlerinde çözeltilerden örnek alınarak bakteriyofaj titresi belirlenmiştir.

3.2.6. Bakteriyofaj kurutulması ve optimizasyonu

Konsantrasyonu 10^{14} POB/ml olacak şekilde çoğaltılan *Pseudomonas* phage gh-1 bakteriyofajı püskürtmeli kurutucu (Unopex B 15, Bak-On Makine Mühendislik Ltd. Şti., İzmir, Türkiye) kullanılarak kurutulmuştur (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Kurutma işlemlerinde kullanılan püskürtmeli kurutucu

Püskürterek kurutmada maltodekstrin ve peyniraltı suyu proteini izolatu oranları ile ürün çıkış sıcaklıklarının optimize edilmesi amacıyla optimizasyon çalışmaları Design Expert 8.0.7.1 Analiz Programı (Trial version, State-Ease Inc. Minneapolis, Amerika Birleşik Devletleri) Box-Behnken deneme desenine göre gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Box-Behnken Cevap Yüzey Yöntemi'ne göre oluşturulan deneme deseni

Deneme Sayısı	Bağımsız değişkenler		
	Maltodekstrin (%)	Peyniraltı suyu protein izolatu (%)	Çıkış sıcaklığı (°C)
1	12	12	50
2	9	0	60
3	9	12	60
4	9	6	50
5	9	6	50
6	12	0	50
7	6	0	50
8	9	6	50
9	12	6	60
10	9	6	50
11	6	6	60
12	9	0	40
13	12	6	40
14	9	6	50
15	6	12	50
16	6	6	40
17	9	12	40

Bakteriyofajın püskürterek kurutma işleminde taşıyıcı materyalin hazırlanması için farklı oranlarda maltodekstrin (%6-12) ve peyniraltı suyu proteini izolatu (%0-12) deiyonize suda çözündürülmüştür (Behboudi-Jobbehdar vd. 2013; Menezes vd. 2018). Ardından, elde edilen çözeltiler su banyosunda (Brookfield TC-502, Brookfield Engineering Laboratories, Wisconsin, Amerika Birleşik Devletleri) karıştırılarak 80°C'ye ısıtılmış ve 20 dakika bekletildikten sonra hızla oda sıcaklığına (20-25°C) soğutulmuştur (Tang vd. 2015). Soğutulan çözeltilere titresini 10^9 - 10^{10} POB/g olacak şekilde bakteriyofaj çözeltilerinden eklenmiştir (Leung vd. 2018). Karıştırma işleminden sonra bakteriyofaj içeren çözeltiler 10 ml/dakika besleme hızında, %70 aspiratör oranında, 7 litre/dakika kompresör basıncında sisteme beslenmiştir. Sistemin çıkış sıcaklığı, 40-60°C'ye ayarlanmıştır.

3.2.7. Bakteriyofaj tozlarının analizleri

Püskürterek kurutma işleminin optimizasyonu sırasında gerçekleştirilen tüm denemeler sonucunda üretilen toz örneklerde bakteriyofaj titresi, çözünabilirlik, kurumadde, su aktivitesi, yığın yoğunluğu, partikül boyutu, renk ve camsı geçiş sıcaklığı belirlenmiş ve Taramalı Elektron Mikroskopu (Scanning Electron Microscopy, SEM) kullanılarak toz örneklerin görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir. Deneme üretimleri sonrasında tespit edilen optimum koşulda üretilen toz örnekler 6 ay süreyle 4°C’de depolanmıştır. Optimum noktada üretilen toz örneklerinde depolamanın 1. gününde bakteriyofaj titresi, çözünabilirlik, kurumadde, su aktivitesi, yığın yoğunluğu, partikül boyutu, renk, camsı geçiş sıcaklığı ve görüntüleme analizleri yapılmıştır. Toz örnekleri için depolamanın 3. ve 6. aylarında bahsi geçen analizlerden görüntüleme ve partikül boyutu analizleri hariç diğer analizler gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.1. Toz örneklerindeki bakteriyofaj titresinin belirlenmesi

Üretilen bakteriyofaj tozlarının faj titresi, *Pseudomonas* phage gh-1 bakteriyofajının aktifleştirilmesi, çoğaltılması ve titresinin belirlenmesi başlığı altında belirtildiği gibi çift tabaka agar yönteminin modifiye edilmiş hali kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla 0.1 g *Pseudomonas* phage gh-1 bakteriyofaj tozu 900 µl steril ringer çözeltisinin içerisine ilave edilerek homojen bir şekilde karıştırılmış ve uygun seri dilüsyonlar hazırlanılarak çift tabaka agar yöntemiyle faj titreleri tespit edilmiştir.

3.2.7.2. Bakteriyofaj tozlarının çözünürlük analizi

Toz örneklerin çözünme oranı Laokuldilok ve Kanha (2015) tarafından bildirilen yöntemle göre belirlenmiştir. Bu amaçla 1 g örnek, oda sıcaklığındaki 10 ml saf su içerisinde manyetik karıştırıcıda 30 dakika süreyle karıştırılıp çözündürülerek elde edilen çözelti, santrifüj tüplerine aktararak 6988 rpm’de 20 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında üstte kalan sıvının tamamı, önceden darası alınmış cam petri kaplarına aktarılmış ve 105°C’de sabit tartıma gelinceye kadar etüvde (Binder ED56, Binder GmbH, Tübingen, Almanya) kurutulmuştur. Ağırlık farkından yararlanılarak %çözünme oranı tespit edilmiştir.

3.2.7.3. Bakteriyofaj tozlarının kurumadde miktarının ve su aktivitesinin tespiti

Toz örneklerin kurumadde miktarı gravimetrik ile belirlenmiştir. Toz örneklerden önceden kurutulup darası alınmış petri kaplarına 1.5 g tartılmış ve 105°C’de sabit tartıma gelinceye kadar etüvde kurutma işlemi yapılmıştır (Martins vd. 2019). Toz örneklerin su aktivite değerleri, su aktivitesi ölçüm cihazı (AquaLab 4TE, AquaLab, Washington, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak 25°C’de belirlenmiştir (Tontul vd. 2018).

3.2.7.4. Bakteriyofaj tozlarının yığın yoğunluğunun tespiti

Toz örneklerin yığın yoğunluğunun analizi için darası alınan ölçü silindirine 10 ml hizasına gelinceye kadar toz örnek doldurularak tartımı yapılmıştır. Yığın yoğunluğu, tartım miktarının 10’a bölünmesiyle hesaplanmıştır (Laokuldilok ve Kanha 2015).

3.2.7.5. Bakteriyofaj tozlarının renk analizi

Toz örneklerin renk analizi, kolorimetre cihazı (CR400, Konica Minolta, Osaka, Japonya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. L^* , a^* , b^* , kroma (c^*) ve Hue açısı (h^*) değerlerinin ölçümü için cihaz, standart beyaz plaka (Y-82.80, x-0.3194, y-0.3264) kullanılarak kalibre edilmiştir (Tontul vd. 2018).

3.2.7.6. Bakteriyofaj tozlarının camsı geçiş sıcaklıklarının tespiti

Toz örneklerin camsı geçiş sıcaklığı, Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (Differential Scanning Calorimeter-DSC) (DSC 6000, PerkinElmer, Waltham, MA, Amerika Birleşik Devletleri) ile Laokuldilok ve Kanha (2015)'in bildirdikleri yöntemle göre belirlenmiştir.

3.2.7.7. Bakteriyofaj tozlarının SEM ile görüntülenmesi

Toz örneklerin SEM ile görüntülenmesi Gomez-Mascaraque vd. (2016)'nin belirttikleri yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Analizlerin uygulanmasında Zeiss Leo 1430 cihazı (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Almanya) kullanılmıştır.

3.2.7.8. Bakteriyofaj tozlarının partikül boyut analizi

Partikül boyut analizleri lazer difraksiyon prensibi ile çalışan parçacık boyut analiz cihazı (Malvern Mastersizer 2000S, Malvern Instruments Ltd., Worcs, İngiltere) ve bu cihaza bağlanan toz modülü (Malvern Hydro 2000S) kullanılarak Fuchs vd. (2006)'nin bildirdikleri yöntemle göre yapılmıştır. Analizler örneklerin 2-propanol içerisinde disperse edilmesiyle gerçekleştirilmiş olup cihazın yazılımı (Malvern Application Ver. 5.60) yardımıyla hacim ağırlıklı ortalama ($D[4,3]$), yüzey ağırlıklı ortalama (d_{10} , d_{50} ve d_{90}) değerleri (μm) belirlenmiştir.

3.2.8. Sütte yapılan uygulama ve analizler

3.2.8.1. Sütlerin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

Çalışma süresince bakteriyofaj tozlarının depolama sırasındaki analiz günlerinde temin edilen çiğ sütlerin toplam kurumadde, yağ, protein ve kül miktarları ile pH ve titrasyon asitliği değerleri belirlenmiştir.

Kurumadde tayini

Çalışmada kullanılan çiğ süt örneklerinde kurumadde miktarı TS 1018 Çiğ Süt Standardı'nda verilen metotta göre gravimetrik yöntem kullanılarak tespit edilmiştir (Anonim 1994).

Yağ tayini

Çiğ süt örneklerinin yağ içeriği bütirometre kullanılarak Gerber yöntemi ile saptanmıştır (Anonim 1995).

Protein tayini

Çalışmada kullanılan çiğ sütlerde azot miktarı Kjeldahl yöntemine göre belirlenmiş ve elde edilen değerler 6.38 faktörüyle çarpılarak protein miktarları belirlenmiştir (Kurt vd. 1993).

Kül tayini

Çiğ süt örneklerinin kül miktarı gravimetrik yöntem kullanılarak tespit edilmiştir (Kurt vd. 1993).

pH tayini

Hem çiğ süt hem ısıtılmış işlem görmüş süt örneklerinin pH değeri Orion 2 Star (Orion 2 Star, Thermo Scientific, Fisher Scientific, Bremen, Almanya) marka dijital pH metre kullanılarak tespit edilmiştir.

Titrasyon asitliği tayini

Hem çiğ süt hem ısıtılmış işlem görmüş süt örneklerinin titrasyon asitliği tayini TS 1018 Çiğ Süt Standardı'nda belirtilen Soxhlet-Henkel yöntemi ile yapılmış olup sonuçlar %laktik asit cinsinden hesaplanmıştır (Anonim 1994).

3.2.8.2. Sütlerin mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesi

Çiğ sütler 121°C'de 15 dakika ısıtılmış işleme tabi tutulmuştur. Isıtılmış işlem görmüş sütte uygun seri dilüsyonlar hazırlanarak mikrobiyolojik ekimler gerçekleştirilmiştir. Yapılan mikrobiyolojik ekimler sonucunda psikrotrof mikroorganizma, toplam mezofilik aerobik bakteri, maya ve koliform bakteri sayımı gerçekleştirilmiştir.

Seri dilüsyonların hazırlanması

Isıtılmış işlem görmüş süt örneklerinde mikrobiyolojik ekimler yapılmadan önce aseptik şartlar altında 1/4 kuvvetinde ringer çözeltisinden uygun seri dilüsyonlar hazırlanmıştır (Anonymous 2001).

Psikrotrof bakteri sayımı

Psikrotrof bakteri sayımı, PCA (Sigma Aldrich Co.) besiyeri ortamında dökme plak yöntemiyle 4-6°C'de 10 gün süreyle inkübasyon sonucunda yapılmıştır (Júnior vd. 2018).

Toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı

Toplam mezofilik aerobik bakteri sayımında PCA (Sigma Aldrich Co.) besiyeri kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan yayma plak yöntemi ile ekim yapılan petri kutuları, aerobik ortamda 30°C'de 2 gün süreyle inkübe edilmiştir (Mainville vd. 2001).

Maya sayımı

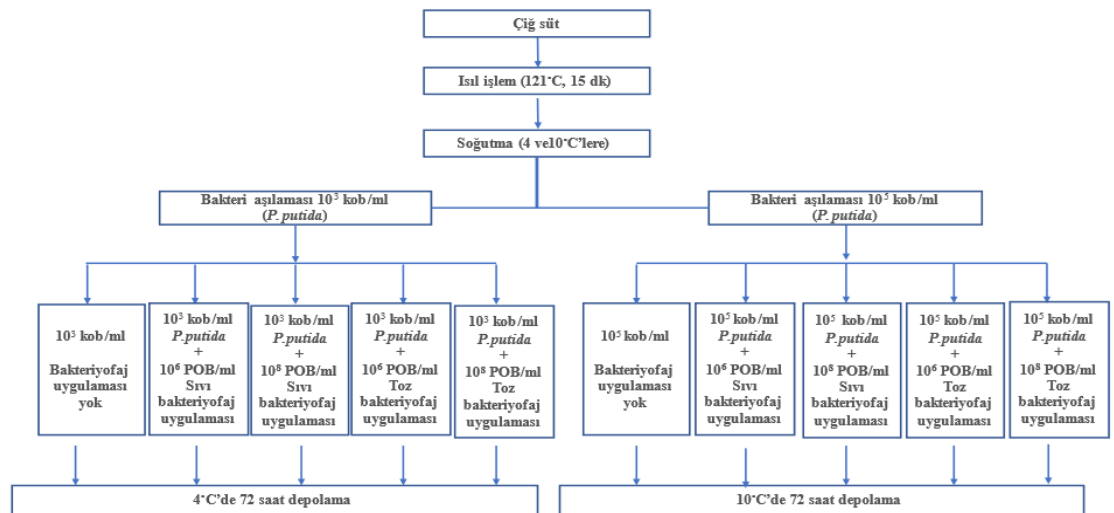
Maya sayımında Yeast Extract Glucose Chloramphenicol (YGC) Agar (Sigma Aldrich Co.) besi ortamı olarak kullanılmıştır. Uygun dilüsyonlardan yayma plak yöntemi ile ekim yapılan petri kutuları, aerobik ortamda 25°C’de 3-5 gün süreyle inkübe edilmiştir (Witthuhn vd. 2005).

Koliform bakteri sayımı

Koliform bakteri sayımı, Violet Red Bile Agar besiyeri (Sigma Aldrich Co.) kullanılarak ve petri kutuları 24-48 saat 37°C’de inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir (Çelik vd. 2019).

3.2.8.3. Sütlerde bakteriyofaj uygulaması

Süt örneklerinde bakteriyofaj uygulaması Şekil 3.4'te görüldüğü şekilde gerçekleştirilmiştir. Isıl işlem sonrasında 4°C ve 10°C'ye soğutulmuş sütler *P. putida* ATCC 12633 suşu başlangıç konsantrasyonu sırasıyla 10³ ve 10⁵ kob/ml olacak şekilde aşılanmıştır. Bakteri başlangıç konsantrasyonları *P. putida*'nın UHT sütler içerisinde gelişiminin ve proteolitik aktivitesinin tespiti sırasında elde edilen sonuçlar değerlendirilerek belirlenmiştir. Bakteri inokülasyonu sonrasında sütler titresini 10⁶ ve 10⁸ POB/ml olacak şekilde *Pseudomonas* phage gh-1 bakteriyofajının sıvı ve toz formlarda hazırlanmış olan preparatları ilave edilerek sütler 72 saat 4°C ve 10°C'lerde depolanmıştır.



Şekil 3.4. Süt örneklerinde bakteriyofaj uygulaması

Çalışmanın kontrol gruplarını 4 ve 10°C’lerde bakteri aşılınmamış ve bakteriyofaj uygulaması yapılmamış olan süt örnekleri oluşturmuştur. Süt örneklerinde 72 saat boyunca her 12 saatte bir pH, viskozite, proteolitik aktivite ve *P. putida* sayımı ile faj titresi

belirlenmiştir. Süt uygulaması sırasında gerçekleştirilen pH, viskozite ve proteolitik aktivite analizleri; *Pseudomonas putida* ATCC 12633'nin UHT sütler içerisinde proteolitik aktivitesinin tespiti ve UHT sütlerin viskozite ve pH değerleri üzerine etkisinin tespiti başlığı altında belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Süt örneklerinin faj titresi ise *Pseudomonas* phage gh-1 bakteriyofajının aktifleştirilmesi, çoğaltılması ve titresinin belirlenmesi başlığı altında belirtildiği şekilde yapılmıştır. Çalışmadaki süt örneklerine ait isimlendirmeler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Bakteri ve bakteriyofaj içermeyen kontrol grubu dahil *P. putida* ATCC 12633 aşılaman ve *Pseudomonas* phage gh-1 bakteriyofajı uygulanan sütörneklerinin isimlendirilmesi

A	Bakteriyofaj uygulaması olmaksızın başlangıç konsantrasyonu 10^3 kob/ml olacak şekilde <i>P. putida</i> ATCC 12633 suşunun aşılandığı ve sonrasında 10°C 'de depolanan süt örneği
B	Bakteriyofaj uygulaması olmaksızın başlangıç konsantrasyonu 10^5 kob/ml olacak şekilde <i>P. putida</i> ATCC 12633 suşunun aşılandığı ve sonrasında 10°C 'de depolanan süt örneği
C	Başlangıç bakteri konsantrasyonu 10^3 kob/ml olacak şekilde <i>P. putida</i> ATCC 12633 suşunu ve 10^6 POB/ml <i>P. putida</i> gh-1 bakteriyofajını içeren tozun aşılandığı ve sonrasında 10°C 'de depolanan süt örneği
D	Başlangıç bakteri konsantrasyonu 10^3 kob/ml olacak şekilde <i>P. putida</i> ATCC 12633 suşunu ve 10^8 POB/ml <i>P. putida</i> gh-1 bakteriyofajını içeren tozun aşılandığı ve sonrasında 10°C 'de depolanan süt örneği
E	Başlangıç bakteri konsantrasyonu 10^5 kob/ml olacak şekilde <i>P. putida</i> ATCC 12633 suşu ve 10^6 POB/ml <i>P. putida</i> gh-1 bakteriyofajını içeren tozun aşılandığı ve sonrasında 10°C 'de depolanan süt örneği
F	Başlangıç bakteri konsantrasyonu 10^5 kob/ml olacak şekilde <i>P. putida</i> ATCC 12633 suşunu ve 10^8 POB/ml <i>P. putida</i> gh-1 bakteriyofajını içeren tozun aşılandığı ve sonrasında 10°C 'de depolanan süt örneği
G	Başlangıç bakteri konsantrasyonu 10^3 kob/ml olacak şekilde <i>P. putida</i> ATCC 12633 suşunu ve 10^6 POB/ml <i>P. putida</i> gh-1 bakteriyofajını içeren sıvının aşılandığı ve sonrasında 10°C 'de depolanan süt örneği
H	Başlangıç bakteri konsantrasyonu 10^3 kob/ml olacak şekilde <i>P. putida</i> ATCC 12633 suşunu ve 10^8 POB/ml <i>P. putida</i> gh-1 bakteriyofajını içeren sıvının aşılandığı ve sonrasında 10°C 'de depolanan süt örneği
I	Başlangıç bakteri konsantrasyonu 10^5 kob/ml olacak şekilde <i>P. putida</i> ATCC 12633 suşunu ve 10^6 POB/ml <i>P. putida</i> gh-1 bakteriyofajını içeren sıvının aşılandığı ve sonrasında 10°C 'de depolanan süt örneği
J	Başlangıç bakteri konsantrasyonu 10^5 kob/ml olacak şekilde <i>P. putida</i> ATCC 12633 suşunun ve 10^8 POB/ml <i>P. putida</i> gh-1 bakteriyofajını içeren tozun aşılandığı ve sonrasında 10°C 'de depolanan süt örneği
K	Bakteriyofaj uygulaması olmaksızın başlangıç konsantrasyonu 10^3 kob/ml olacak şekilde <i>P. putida</i> ATCC 12633 suşunun aşılandığı ve sonrasında 4°C 'de depolanan süt örneği
L	Bakteriyofaj uygulaması olmaksızın başlangıç konsantrasyonu 10^5 kob/ml olacak şekilde <i>P. putida</i> ATCC 12633 suşunun aşılandığı ve sonrasında 4°C 'de depolanan süt örneği

Çizelge 3.2.'nin devamı

M	Başlangıç bakteri konsantrasyonu 103 kob/ml olacak şekilde P. putida ATCC 12633 suşunun ve 106 POB/ml P. putida gh-1 bakteriyofajını içeren tozun aşılandığı ve sonrasında 4°C'de depolanan süt örneği
N	Başlangıç bakteri konsantrasyonu 103 kob/ml olacak şekilde P. putida ATCC 12633 suşunun ve 108 POB/ml P. putida gh-1 bakteriyofajını içeren tozun aşılandığı ve sonrasında 4°C'de depolanan süt örneği
O	Başlangıç bakteri konsantrasyonu 105 kob/ml olacak şekilde P. putida ATCC 12633 suşunun ve 106 POB/ml P. putida gh-1 bakteriyofajını içeren tozun aşılandığı ve sonrasında 4°C'de depolanan süt örneği
P	Başlangıç bakteri konsantrasyonu 105 kob/ml olacak şekilde P. putida ATCC 12633 suşunun ve 108 POB/ml P. putida gh-1 bakteriyofajını içeren tozun aşılandığı ve sonrasında 4°C'de depolanan süt örneği
R	Başlangıç bakteri konsantrasyonu 103 kob/ml olacak şekilde P. putida ATCC 12633 suşunun ve 106 POB/ml P. putida gh-1 bakteriyofajını içeren sıvının aşılandığı ve sonrasında 4°C'de depolanan süt örneği
S	Başlangıç bakteri konsantrasyonu 103 kob/ml olacak şekilde P. putida ATCC 12633 suşunun ve 108 POB/ml P. putida gh-1 bakteriyofajını içeren sıvının aşılandığı ve sonrasında 4°C'de depolanan süt örneği
T	Başlangıç bakteri konsantrasyonu 105 kob/ml olacak şekilde P. putida ATCC 12633 suşunun ve 106 POB/ml P. putida gh- bakteriyofajını içeren sıvının aşılandığı ve sonrasında 4°C'de depolanan süt örneği
U	Başlangıç bakteri konsantrasyonu 105 kob/ml olacak şekilde P. putida ATCC 12633 suşunun ve 108 POB/ml P. putida gh-1 bakteriyofajını içeren sıvının aşılandığı ve sonrasında 4°C'de depolanan süt örneği
V	4°C'de depolanan bakteri ve/veya bakteriyofaj içermeyen süt örneği - Kontrol grubu
X	10°C'de depolanan bakteri ve/veya bakteriyofaj içermeyen süt örneği - Kontrol grubu

3.2.9. İstatistiksel analizler

Araştırma 2 tekerrürlü yapılmış ve analizler iki paralelli olarak gerçekleştirilmiştir. Araştırmalar varyans analizine tabi tutulmuş ve farklı bulunan sonuçlar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile karşılaştırılmıştır (Düzgüneş vd. 1987). 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. Optimizasyon işleminin gerçekleştirilmesi sırasında bakteriyofaj canlılığının bir göstergesi olan faj titresinin en yüksek olduğu ve bakteriyofaj tozlarının çözünabilirlik değerinin en yüksek olduğu değerler ile söz konusu bu iki özelliği bir arada bulunduran cevapların her biri için belirlenen en uyumlu modelin regresyon eşitlikleri (a) cevap yüzey metodu ile oluşturulmuştur.

$$FC/TÇ=\beta_0+\beta_1A+\beta_2B+\beta_3C+\beta_4AB+\beta_5AC+\beta_6BC+\beta_7A+\beta_8B+\beta_9C+h\dots \quad (a)$$

Bu eşitlikte;

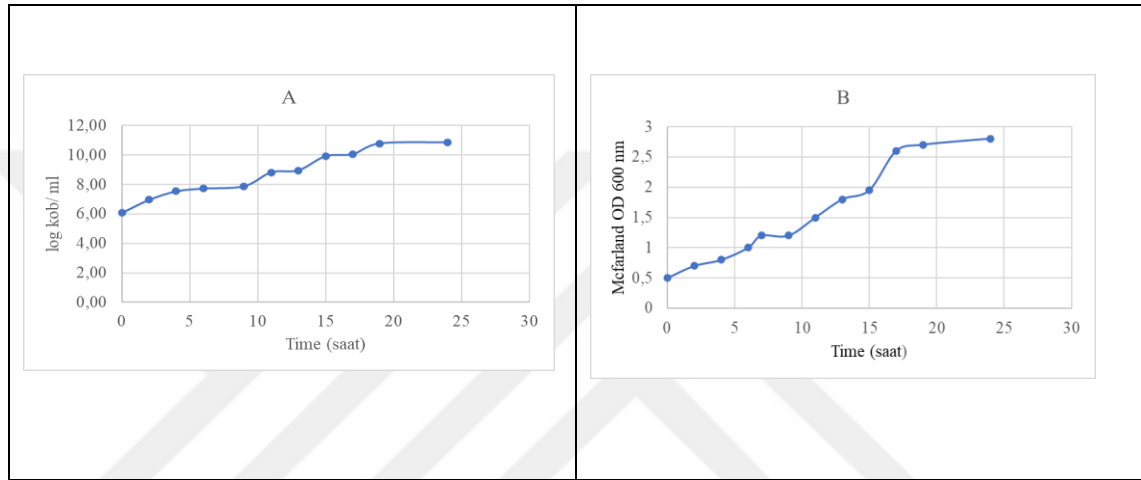
FC: Üretilen bakteriyofaj tozlarının sahip olduğu *Pseudomonas* phage gh-1 bakteriyofaj titresini (POB/g), TÇ: Bakteriyofaj tozlarının çözünabilirlik değerini (%), A: Taşıyıcı materyallerden oluşan çözeltilerinde bulunan maltodekstrin oranını (%), B: Taşıyıcı materyallerden oluşan çözeltilerinde bulunan peyniraltı suyu izolatı protein oranını, C: Püskürterek kurutma işlemi sırasında uygulanan çıkış sıcaklık değerini, 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.

Modeller oluşturulurken istatistiksel olarak önem düzeyleri %95 güven aralığında F-değeri ($p<0.05$) ile ölçülerek modelin değerlendirilmesi sırasında saf hata, varyasyon katsayısı (CV), tahmini hataların karelerinin toplamı (PRESS), regresyon katsayısı (R^2), düzeltilmiş regresyon katsayısı (R^2_{drl}), tahmini belirleme katsayısı (Pred- R^2) ve yeterli kesinlik parametreleri kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *Pseudomonas putida* ATCC 12633 Suşunun Aktifleştirilmesi ve Gelişim Eğrisi

Nutrient sıvı besiyerine aşıl原因an bakteri, çalkalamalı inkübatörde 100 rpm çalkalama hızında 30°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon başlangıç OD (600 nm) değeri 0.5 olarak ayarlanmış olup inkübasyon sonundaki OD değeri ise 2.8 olarak belirlenmiştir. Şekil 4.1’de görüldüğü gibi oluşturulan gelişim eğrilerinde çoğalma evresi olarak *Pseudomonas putida*’nın sayısının 10.85 log kob/mL ve OD₆₀₀ değerinin 1.0 olduğu 6. saatin uygun olduğu değerlendirilmiştir.



Şekil 4.1. A: Çalkalamalı inkübatörde geliştirilen *P. putida* ATCC 12633’nin mikrobiyolojik sayım sonuçları ile oluşturulan gelişim eğrisi, B: Çalkalamalı inkübatörde geliştirilen *P. putida* ATCC 12633’nin bulunduğu sıvı besiyerinin OD₆₀₀ değerlerinin ölçülmesi ile oluşturulan gelişim eğrisi

4.2. *Pseudomonas putida* ATCC 12633’nin Proteolitik Aktivitesinin Tespiti

P. putida ATCC 12633’nin proteolitik aktivitesinin tespitinde öncelikle %1 yağsız süt tozu içeren PCA besiyerinde gelişme göstermiş bakteri solüsyonu agar spot yöntemiyle damlatıldığı bölgelerde gelişerek zon oluşturup oluşturmadığı belirlenmiştir. *P. putida* ATCC 12633’nin yağsız süt tozu içeren PCA agarda zon oluşturmamasından (Şekil 4.2) dolayı proteolitik aktivitesi var olarak değerlendirilerek bir sonraki aşama olan sütlerde proteolitik aktivitesine yönelik analizler yapılmıştır.



Şekil 4.2. *Pseudomonas putida* ATCC 12633' nin %1 yağsız süt tozu içeren PCA besiyerinde gelişimi

4.3. *Pseudomonas putida* ATCC 12633 Aşıl原因an UHT Sütlerde Bakteri Gelişimi, Proteolitik Aktivite ve Viskozite Sonuçları

UHT sütler son konsantrasyonu 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 ve 10^4 kob/ml olacak şekilde hazırlanan *P. putida* ATCC 12633 bakterisi çözeltilerinden inokülasyon gerçekleştirilmiş ve sırasıyla süt örnekleri P8, P7, P6, P5 ve P4 olarak kodlanmıştır. Kontrol örneğini ise bakteri aşılması yapılmayan, diğer örneklerle aynı koşullarda depolanan UHT sütler oluşturmuştur.

Bakteri aşılıp 30°C 'lerde 24 saat süresince depolanan süt örneklerinin, pH değerleri, proteolitik aktivite değerleri ve *P. putida* ATCC 12633 sayısı ile viskozite değerleri 12 saatlik periyotlarla belirlenmiştir (Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3). Gerçekleştirilen analizler sonucunda pH, proteolitik aktivite ve viskozite değerlerinin sırasıyla 4.98-6.72, 0.10-0.36 (340 nm'de absorbans değeri) ve 1.5-211 cP arasında değiştiği saptanırken, bakteri sayılarının ise 5.51-9.13 log kob/ml olacak şekilde değiştiği tespit edilmiştir.

P. putida ATCC 12633 aşıl原因an sütlerde 24 saatlik depolama süresince pH değeri azalmıştır. Yapılan analizler sonucunda artan bakteri sayısına ve proteolitik aktiviteye bağlı olarak viskozite değerleri de artış göstermiştir. Başlangıçta 6.59 kob/ml *Pseudomonas putida* (10^8 . dilüsyon) aşıl原因an sütler 24. saat süresince 30°C 'de depolama sonunda artan proteolitik aktivite nedeniyle Şekil 4.3'te görüldüğü gibi katı hal almıştır.



Şekil 4.3. *Pseudomonas putida* (10^{-1} . dilüsyon- 10^8 kob/ml *Pseudomonas putida* içeren süt örneği) aşıl原因mış sütlerin 30°C 'de 24. saatlik depolama sonunda görünümü

Süt ve süt ürünlerindeki *Pseudomonas*'ı etkili bir şekilde kontrol etmek için fajlardan nasıl yararlanılabileceğinin araştırıldığı bir çalışmada, ısıya dayanıklı proteaz üreten *Pseudomonas putida* grubunun üyelerinden biri olan *Pseudomonas mosselii* bakterisine özgü bireysel bakteriyofaj ve bakteriyofaj kokteyllerinin *P. mosselii* bakterisi

üzerine etkinliği belirlenmiştir. Söz konusu çalışma kapsamında öncelikle *P. mosselii* bakterisinin sütlerde göstermiş olduğu proteolitik aktivite tespit edilmiştir. Başlangıç bakteri sayısı 1.7 log kob/ml olacak şekilde *P. mosselii* bakterisinin aşılandığı sütlerde 30°C’de 24 saatlik depolama sonucunda bakteri sayısının 9.48 log kob/ml’ye ulaştığı saptanırken, en yüksek proteolitik aktivite değerine 24. saatin sonunda ulaşıldığı belirlenmiştir. Bakteri sayısının artmasının sütlerde proteolitik aktiviteyi arttırdığı belirtilmiştir (Wangyoo vd. 2023). Bu çalışmanın sonuçlarının, çalışmamızda elde edilen sonuçlarla genel olarak uyumlu olduğu, iki çalışma arasındaki bazı farklılıkların ise bakteri suşunun ve ölçüm yöntemlerinin farklı olmasından kaynaklanmış olabileceği değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.1. Süt örneklerinde pH değerlerinin 30°C’de 24 saat depolama sırasında değişimi

Örnekler	Depolama zamanı		
	0. saat	12. saat	24. saat
Kontrol	6.72 ±0.01**	6.18±0.00	6.01±0.02
P8*	6.67±0.03	6.11±0.01	4.98±0.01
P7	6.65±0.00	6.42±0.03	5.13±0.01
P6	6.60±0.00	6.52±0.02	5.52±0.00
P5	6.63±0.04	6.20±0.00	5.95±0.04
P4	6.65±0.00	6.15±0.00	6.02±0.03

* P8: 10⁸ kob/ml olacak şekilde *Pseudomonas putida* aşılannmış olan süt örneği, P7: 10⁷ kob/ml olacak şekilde *Pseudomonas putida* aşılannmış olan süt örneği, P6: 10⁶ kob/ml olacak şekilde *Pseudomonas putida* aşılannmış olan süt örneği, P5: 10⁵ kob/ml olacak şekilde *Pseudomonas putida* aşılannmış olan süt örneği, P4: 10⁴ kob/ml olacak şekilde *Pseudomonas putida* aşılannmış olan süt örneği ** Sonuçlar, ortalama değer ± standart sapma olarak verilmiştir.

Çizelge 4.2. *Pseudomonas putida* bakterisinin farklı konsantrasyonlarda aşılandığı süt örneklerinde 30°C’de 24 saat depolama sırasında proteolitik aktivite değerlerinin (340 nm’de absorbens değeri) ve *Pseudomonas putida* sayılarının (log kob/g) değişimi

Örnek	Depolama zamanı					
	0. saat		12. saat		24. saat	
	Proteolitik aktivite	Bakteri sayısı	Proteolitik aktivite	Bakteri sayısı	Proteolitik aktivite	Bakteri sayısı
Kontrol	0.10±0.01*	t.e.**	0.11±0.01	t.e.	0.17±0.01	t.e.
P8	0.27±0.00	6.59±0.03	0.25±0.00	7.20±0.02	0.36±0.00	9.13±0.00
P7	0.24±0.00	6.31±0.01	0.17±0.01	7.16±0.03	0.28±0.01	8.94±1.16
P6	0.22±0.00	5.98±0.22	0.19±0.00	6.72±0.24	0.23±0.02	8.97±1.12
P5	0.22±0.01	5.99±0.01	0.21±0.02	6.99±0.20	0.27±0.00	8.96±0.04
P4	0.14±0.00	5.51±0.03	0.20±0.00	6.51±0.03	0.23±0.00	8.53±0.02

* P8: 10⁸ kob/ml olacak şekilde *Pseudomonas putida* aşılannmış olan süt örneği, P7: 10⁷ kob/ml olacak şekilde *Pseudomonas putida* aşılannmış olan süt örneği, P6: 10⁶ kob/ml olacak şekilde *Pseudomonas putida* aşılannmış olan süt örneği, P5: 10⁵ kob/ml olacak şekilde *Pseudomonas putida* aşılannmış olan süt örneği, P4: 10⁴ kob/ml olacak şekilde *Pseudomonas putida* aşılannmış olan süt örneği. * Sonuçlar, ortalama değer ± standart sapma olarak verilmiştir. **t.e. tespit edilemedi.

Çizelge 4.3. Süt örneklerinde viskozite değerlerinin (cP) 30°C’de 24 saat depolama sırasında değişimi

Örnekler	Depolama zamanı		
	0. saat	12. saat	24. saat
Kontrol	1.50±0.00*	2.50±0.00	5.50±0.03
P8	2.00±0.61	94.18±15.95	211.00±9.11
P7	2.50±0.09	42.91±3.51	113.45±9.45
P6	2.50±0.26	32.20±1.85	100.00 ±10.01
P5	2.00±0.25	31.31±2.72	105.30±12.10
P4	2.00±0.66	12.70±3.23	75.47±0.05

* P8: 10⁸ kob/ml olacak şekilde *Pseudomonas putida* aşılantısı olan süt örneği, P7: 10⁷ kob/ml olacak şekilde *Pseudomonas putida* aşılantısı olan süt örneği, P6: 10⁶ kob/ml olacak şekilde *Pseudomonas putida* aşılantısı olan süt örneği, P5: 10⁵ kob/ml olacak şekilde *Pseudomonas putida* aşılantısı olan süt örneği, P4: 10⁴ kob/ml olacak şekilde *Pseudomonas putida* aşılantısı olan süt örneği. * Sonuçlar, ortalama değer ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.4. Sıvı formda olan bakteriyofajların bazı özellikleri

4°C’de 6 ay süreyle depolanan sıvı faj formunun 1.,3. ve 6. aylarda faj titreleri tespit edilmiştir. Depolamanın ilk gününde sıvı formda bulunan *Pseudomonas phage gh-1* bakteriyofajın faj titresi 10¹⁴ log POB/ml olarak tespit edilirken, depolamanın 1. ayında söz konusu bu değer 7 log POB/ml’ye düştüğü tespit edilmiştir. Depolamanın 3. ve 6. ayında ise sıvı formda bakteriyofaj sayılarının tespit edilebilir limitin altında kalmasından dolayı tespit edilememiştir.

4.4.1. Sıvı formda bulunan bakteriyofajların farklı sıcaklık değerlerine karşı gösterdikleri aktivite değerleri

Pseudomonas phage gh-1 bakteriyofajın farklı sıcaklık değerlerindeki aktivitesinin belirlenmesi amacıyla 30°C’de 18-24 saat geliştirilmiş olan ve bakteri konsantrasyonu 10⁷ kob/ml olan *Pseudomonas putida* ATCC 12633 konakçı bakteri ve titresi 10⁵ POB/ml olan bakteriyofaj örnekleri kullanılmıştır. İnkübasyonun 0., 24. ve 72. saatlerinde çözeltilerden örnek alınarak *Pseudomonas putida* sayısı ve bakteriyofaj titresi belirlenmiştir. Çizelge 4.4’den de anlaşılacağı üzere *Pseudomonas putida gh-1* bakteriyofajı en yüksek etkinliği 25°C’de gösterirken, en düşük etkinliği ise 37°C’de gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durumun 25°C ‘nin *Pseudomonas putida* bakterisinin optimum gelişme sıcaklığı olan 30°C’ye yakın olmasından ve bu sıcaklıkta bakteri aktivitesinin yüksek olmasıyla fajın daha iyi aktivite göstermesinden kaynaklandığı değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.4. *Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas* phage gh-1 bakteriyofajın farklı sıcaklık değerlerindeki sayıları

Sıcaklık	Depolama zamanı (saat)	<i>Pseudomonas putida</i> sayısı (log kob/ml)	<i>Pseudomonas putida</i> gh-1 bakteriyofaj titresi (log POB/ml)
4°C	0	7.03±0.01	5.25±0.05
	24	5.60±0.02	6.50±0.02
	72	5.00±0.20	6.75±0.08
25°C	0	7.00±0.00	5.35±0.02
	24	5.50±0.05	6.25±0.00
	72	3.20±0.00	8.10±0.00
37°C	0	7.00±0.35	5.10±0.02
	24	6.50±0.50	6.00±0.05
	72	6.00±0.35	6.20±0.00

* Sonuçlar, ortalama değer ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.4.2. Sıvı formda bulunan bakteriyofajların farklı pH değerlerine karşı gösterdikleri aktivite değerleri

Pseudomonas phage gh-1 bakteriyofajın farklı pH değerlerindeki aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Nutrient sıvı besiyerinin pH değeri 1 M HCl veya 1 M NaOH ile 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 ve 8.0'a ayarlanıp, analiz için 30°C'de 18-24 saat geliştirilmiş ve bakteri konsantrasyonu 10⁷ kob/ml olan *Pseudomonas putida* ATCC 12633 konakçı bakteri ve titresi 10⁵ POB/ml olan bakteriyofaj örnekleri kullanılmıştır. Bakteri ve bakteriyofaj örnekleri Nutrient sıvı besiyeri içerisinde 25°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0., 24., 48. ve 72. saatlerinde çözeltilerden örnek alınarak bakteri sayısı ve bakteriyofaj titresi belirlenmiştir. Gerçekleştirilen bu analizde *Pseudomonas putida* ATCC 12633 konakçı bakteri pH değeri 4.0 ve 5.0 olan sıvı besiyerinde gelişim gösterememiş ve bu yüzden bu pH değerlerinde bakteriyofaj etkinliği test edilememiştir.

Pseudomonas putida ATCC 12633 konakçı bakterisinin optimum gelişme pH değeri 7'dir. Çizelge 4.5'te görüldüğü üzere bakteri gelişimi için en uygun pH değeri 7'de sıvı formda bulunan bakteriyofajın etkinliğinin maksimuma ulaştığı (72. saatte 8.10 log POB/ml) tespit edilmiştir. pH 8 değerinde ise pH 6 değerine göre bakteriyofaj titrelerinin depolama zaman aralıklarında daha düşük olduğu saptanmıştır. Analiz sonucunda bakteriyofaj örneklerinin pH 7'de aktivitelerini en yüksek düzeyde gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.5. *Pseudomonas putida* ve *Pseudomonas phage gh-1* bakteriyofajın farklı pH değerlerindeki sayıları

pH	Depolama zamanı (saat)	<i>Pseudomonas putida</i> sayısı (log kob/ml)	<i>Pseudomonas putida</i> gh-1 bakteriyofaj titresi (log POB/ml)
6	0	7.00±0.01	5.30±0.05
	24	5.40±0.02	6.70±0.02
	48	4.20±0.10	6.80±0.00
	72	3.00±0.20	6.95±0.00
7	0	7.00±0.00	7.10±0.02
	24	5.50±0.05	7.25±0.00
	48	4.45±0.00	7.85±0.03
	72	3.20±0.00	8.10±0.00
8	0	7.00±0.35	5.10±0.02
	24	6.20±0.50	6.00±0.05
	48	5.50±0.00	6.18±0.00
	72	5.00±0.35	6.20±0.00

* Sonuçlar, ortalama değer ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.5. *Pseudomonas phage gh-1* Bakteriyofajının Püskürtülerek Kurutulması ve Optimizasyonu

Pseudomonas phage gh-1 bakteriyofajının kurutulması için taşıyıcı materyaldeki maltodekstrin ve peyniraltı suyu proteini izolatu oranları ile ürün çıkış sıcaklıklarının optimize edilmesi amacıyla gerçekleştirilen 17 farklı uygulamadan oluşan deneme deseni kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmasında ilk olarak bağımlı değişkenlerin bağımsız değişkenler üzerinden ifade edilebilmesi amacıyla kullanılacak olan matematiksel model belirlenmiş ve bu amaçla test edilen modellerin istatistiksel olarak önemlilik seviyeleri (p değeri) ve belirleme katsayısından (R^2) yararlanılmıştır. Deneme desenlerine ait kurutma işleminin gerçekleştirilmesi için hazırlanan taşıyıcı materyal çözeltilerinin içerisine son konsantrasyonu 10^{10} - 10^{11} POB/ml olacak şekilde sıvı formda bakteriyofaj çözeltilisi ilave edilmiştir. Üretilen bakteriyofaj tozlarının faj titresi (POB/g) ve tozların çözünürlük değerleri (%) cevap olarak kullanılmıştır. Bakteriyofaj tozlarının faj titreleri ve çözünürlük değerleri Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Box-Behnken Cevap Yüzey Yöntemi'ne göre oluşturulan deneme desenine göre üretilen bakteriyofaj tozlarında gerçekleştirilen faj titresi ve çözünürlük analizlerine ait sonuçlar

Deneme Sayısı	Taşıyıcı materyaldeki maltodekstrin oranı (%)	Taşıyıcı materyaldeki peyniraltı suyu protein izolatu oranı (%)	Kurutma çıkış sıcaklığı (°C)	Faj titresi (POB/g)	Çözünürlük (%)
1	12	12	50	8.55±0.05*	67.47±1.40
2	9	0	60	7.24±0.24	68.61±2.13
3	9	12	60	8.41±0.29	60.97±4.45
4	9	6	50	11.52±0.01	82.98±1.81
5	9	6	50	10.22±0.22	83.74±0.17
6	12	0	50	8.48±0.02	84.46±0.72
7	6	0	50	8.31±0.01	81.98±1.81
8	9	6	50	11.71±0.09	86.07±0.71
9	12	6	60	8.59±0.01	63.22±1.90
10	9	6	50	11.55±0.15	81.10±0.83
11	6	6	60	8.48±0.03	80.19±0.19
12	9	0	40	9.00±0.00	82.29±1.24
13	12	6	40	9.52±0.01	81.21±0.69
14	9	6	50	11.60±0.03	84.07±1.93
15	6	12	50	9.69±0.04	83.43±1.32
16	6	6	40	9.59±0.03	76.53±2.33
17	9	12	40	10.77±0.03	70.26±1.09

* Sonuçlar, ortalama değer ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.5.1. Bakteriyofaj tozlarının faj titresi (POB/ml) değerleri

Deneme desenine göre üretilen 17 bakteriyofaj tozunun faj titreleri 7.24±0.24 POB/ml ile 11.71±0.09 POB/g değerleri arasında değişim göstermiştir. En düşük faj titresi, taşıyıcı materyalin yalnızca %9 oranında maltodekstrin içerdiği ve kurutma çıkış sıcaklığının 60°C'ye ayarladığı üretimden elde edilen bakteriyofaj tozunda tespit edilmiştir. En yüksek faj titresi ise %9 maltodekstrin ve %6 peyniraltı suyu protein izolatu içeren taşıyıcı materyalin kullanıldığı ve kurutma çıkış sıcaklığının 50°C olduğu üretimlerden elde edilen bakteriyofaj tozlarında saptanmıştır.

Gerçekleştirilen ANOVA analizi sonuçlarına göre, bakteriyofaj tozlarının canlılık değerlerinin model ile uyumlu olduğu tespit edilirken ($p<0.05$), model uyumsuzluk değerinin parametreler üzerinde istatistiksel olarak önemli olduğu ($p<0.05$) saptanmıştır (Çizelge 4.7). Bakteriyofaj tozlarının faj titresi değerleri üzerine taşıyıcı materyalin bileşiminde yer alan %peyniraltı suyu protein izolatu oranı ile püskürterek kurutma işleminde seçilen kurutma çıkış sıcaklığının ve bahsi geçen bu parametrelerin birbiri ile

interaksiyonunun etkisi ile taşıyıcı materyalin bileşiminde yer alan %maltodekstrin oranı ve kurutma çıkış sıcaklığının interaksiyonunun istatistiksel açıdan önemli olduğu ($p<0.05$) tespit edilmiştir. Yapılan ANOVA analizinde model denkleminin yeterli kesinliğin göstergesi olan sinyal gürültü oranı, kapsül yükleme verimliliği için 10.75 olarak belirlenmiş ve bu değer 4'ün üzerinde olması model denkleminin yeterli olduğunu göstermiştir. Önerilen model denklemin R^2 ve R^2 dzl değerleri sırasıyla 0.90 ve 0.85 olarak tespit edilmiştir. Bahsi geçen bu değerlerin 1'e yakın olması denklemin sonuçlarının deneysel verileri başarılı bir şekilde temsil ettiğini göstermiştir (Ergin 2019). Ayrıca model uyumluluğuna ait diğer istatistiksel parametreler incelendiğinde ise model uyumsuzluk seviyesinin önemsiz olduğu ($p>0.05$) belirlenmiştir.

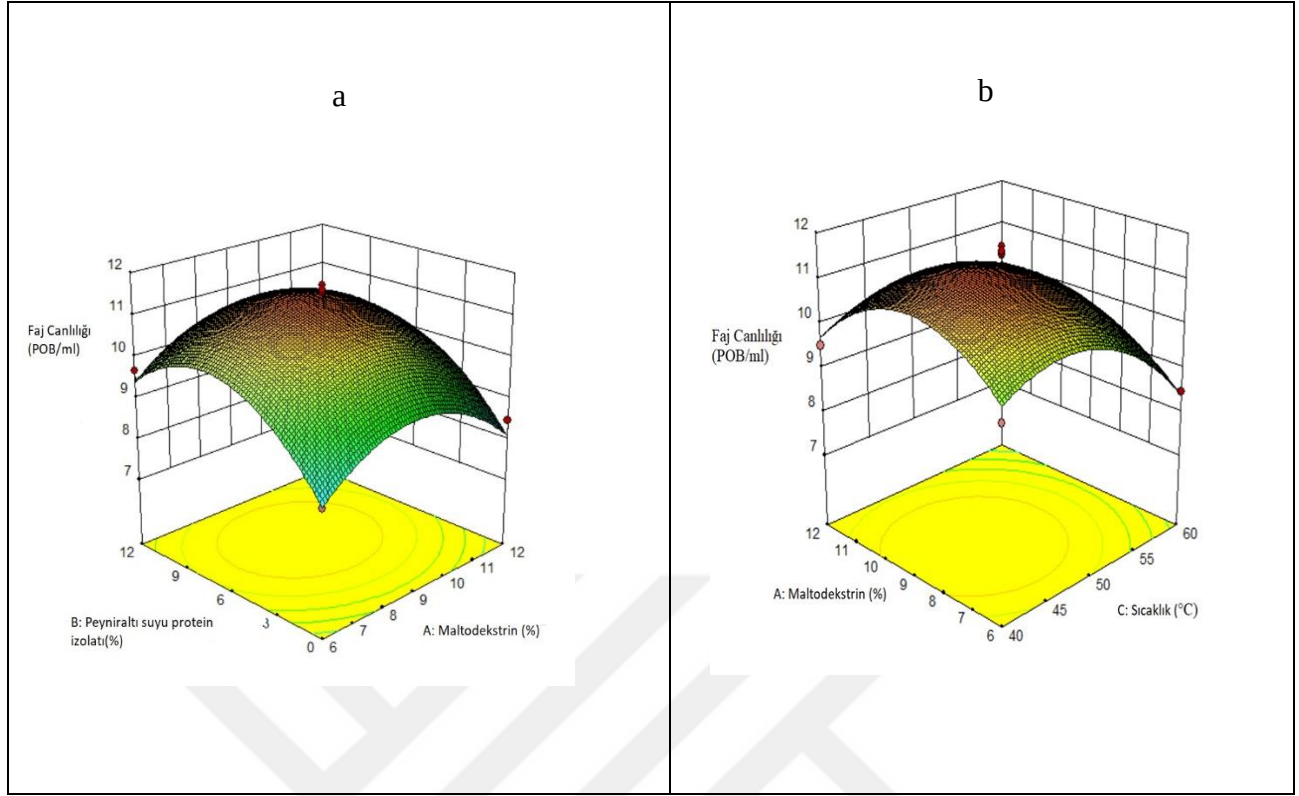
Çizelge 4.7. Bakteriyofaj tozlarının canlılık değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA sonuçları ve model uyumluluğu ile ilgili istatistiksel veriler

Varyasyon Kaynakları	SD	HKT	p değeri
Model (Kuatratik)	6	28.34	0.0001*
A	1	0.11	0.5621*
B	1	2.41	0.0178
C	1	4.74	0.0026*
AB	1	5.93	0.0013*
AC	1	7.98	0.0004*
B ²	1	4.99	0.0022
C ²	10	3.01	
Kalıntı	6	1.47	0.7024
Model uyumsuzluğu	6	0.25	0.7024
Saf hata	16	28.34	0.5621
Toplam	6	31.35	
Model	R^2	R^2 dzl	CV%
Kuatratik	0.90	0.85	5.71
			PRESS
			8.29
			Yeterli Kesinlik
			10.75

* $p<0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli, A: Taşıyıcı materyaldeki %maltodekstrin oranı, B: Taşıyıcı materyaldeki %peyniraltı suyu protein izolatu oranı, SD: Serbestlik derecesi, HKT: Hata Kareler Toplamı, R^2 dzl: Düzeltilmiş R^2

Bakteriyofaj tozlarının canlılık değerleri için istatistiksel açıdan önemli varyasyon kaynakları kullanılarak $FC=11.32-0.12A+0.55B-0.77C-1.19A^2-1.38B^2-1.09C^2$ ikinci dereceden polinomial model eşitliği elde edilmiştir. İşlem değişkenlerinin faj canlılık 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 4.4.a, Şekil 4.4.b. ve Şekil 4.4.c'de bakteriyofaj tozlarında bulunan faj titresinin göstergesi olan faj titresini üzerinde etkili ve etkisiz olan faktörlere ait yanıt yüzey grafikleri ve eş yükselti eğrileri yer almaktadır.

Bakteriyofaj tozlarının canlılık değerleri için istatistiksel açıdan önemli varyasyon kaynakları kullanılarak oluşturulan ikinci dereceden polinomial eşitlik ile yanıt yüzey grafiklerine ait eş yükselti eğrileri incelendiğinde, bakteriyofaj tozlarının üretimi için hazırlanan taşıyıcı materyallerin bileşiminde yer alan peyniraltı suyu protein izolatu oranının artmasıyla faj titresinin arttığı tespit edilmiştir. Bakteriyofaj tozlarının üretimi için hazırlanan taşıyıcı materyallerin bileşiminde yer alan maltodekstrin oranı ile kurutma çıkış sıcaklık değerinin bakteriyofaj tozlarının faj titresini üzerine etkisinin hem arttırıcı hem de azaltıcı yönde etkisinin olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.4.a: Sabit sıcaklık değerinde taşıyıcı materyaldeki peyniraltı suyu protein izolatı ve maltodekstrin oranlarının bakteriyofaj tozlarının canlılığı üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu, **b:** Taşıyıcı materyaldeki sabit peyniraltı suyu protein izolat oranında, taşıyıcı materyaldeki maltodekstrin oranı ile kurutma çıkış sıcaklık değerinin bakteriyofaj tozlarının canlılığı üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu.

Yapılan bir çalışmada *Pseudomonas* cinsi bakterilere etki eden litik döngüye sahip ve iki farklı morfolojik özellikteki PEV2 (*Podovirüs*) ve PEV40 (*Myovirüs*) bakteriyofajlar püskürtülerek kurutulmuştur. Püskürterek kurutma işlemi sırasında taşıyıcı materyaller olarak thereloz ve lösün kullanılmıştır. Püskürterek kurutma işleminden hemen sonra PEV2 ve PEV40 bakteriyofajlarının titreleri sırasıyla 1.4×10^9 ve 2.2×10^8 POB/g olarak tespit edilmiş ve kurutulmadan önce hazırlanan çözeltinin başlangıç faj titresi ile toz formunun faj titresi arasında farklılık olmadığı, kurutma işlemi ile faj titresinde sadece 0.77 POB/ml birim azalma olduğu belirlenmiştir (Leung vd. 2018). Yapılan bu çalışma sonucunda püskürterek kurutma işlemi için hazırlanan taşıyıcı çözeltisi içine eklenen sıvı formdaki bakteriyofaj konsantrasyonunun çözelti içerisinde %9 maltodekstrin ve %6 peyniraltı suyu protein izolatı içeren taşıyıcı materyalin kullanıldığı ve kurutma çıkış sıcaklığının 50°C olduğu kurutma işlemleri dışında kalan tüm denemelerde bakteriyofaj tozlarının titrelerinin başlangıçta taşıyıcı materyallerin bulunduğu çözelti içerisindeki bakteriyofaj konsantrasyonuna göre azaldığı saptanmıştır. Çalışmamız sonucunda deneme desenlerine bağlı olarak üretilen bakteriyofaj tozlarında belirlenen faj titreleri genel olarak bahsi geçen çalışma ile uyumlu olmakla birlikte, bazı farklılıkların kullanılan taşıyıcı materyallerin bileşiminin ve püskürterek kurutma işlemine ait işlem parametrelerinin (kurutma çıkış sıcaklığı, besleme hızı, vb.) farklı olmasından kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir.

4.5.2. Bakteriyofaj tozlarının çözünübilirlik değerleri

Box-Behnken deneme desenine göre üretilen 17 farklı üretim sonucunda elde edilen çözünübilirlik değerleri incelendiğinde, en düşük çözünübilirlik değeri (63.22 ± 1.90) 60°C kurutma çıkış sıcaklığında, %12 maltodekstrin ve %6 peyniraltı suyu protein izolatu içeren taşıyıcı materyal kullanılarak gerçekleştirilen üretim sonucunda elde edilen bakteriyofaj tozunda tespit edilmiştir. En yüksek çözünübilirlik değeri (86.07 ± 0.71) ise üretiminde kurutma çıkış sıcaklığının 50°C olduğu ve %9 maltodekstrin ve %6 peyniraltı suyu protein izolatu içeren taşıyıcı materyalin kullanıldığı bakteriyofaj tozunda saptanmıştır.

Gerçekleştirilen ANOVA analizi sonuçlarına göre, bakteriyofaj tozlarının çözünübilirlik değerlerinin model ile uyumlu olduğu ($p < 0.05$) tespit edilirken, model uyumsuzluk değerinin parametreler üzerinde etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p > 0.05$) saptanmıştır (Çizelge 4.8). Bakteriyofaj tozlarının çözünübilirlik değerleri üzerine taşıyıcı materyallerin bileşimde yer alan %maltodekstrin oranı ile %peyniraltı suyu protein izolatu oranının, püskürterek kurutma işleminde seçilen kurutma çıkış sıcaklığının ve bahsi geçen bu parametrelerin birbiri ile etkileşiminin istatistiksel açıdan önemli olduğu ($p < 0.05$) belirlenmiştir. Yapılan ANOVA analizinde yeterli kesinliğin 4'ün üzerinde çıkması çalışmada kullanılan model denkleminin yeterli olduğunu göstermektedir. Önerilen model denklemde R^2 ve R^2 dzl değerleri sırasıyla 0.97 ve 0.95 olarak tespit edilmiştir. Bahsi geçen bu değerlerin 1'e yakın olması denklem sonuçlarının deneysel verileri başarılı bir şekilde temsil ettiğini göstermiştir.

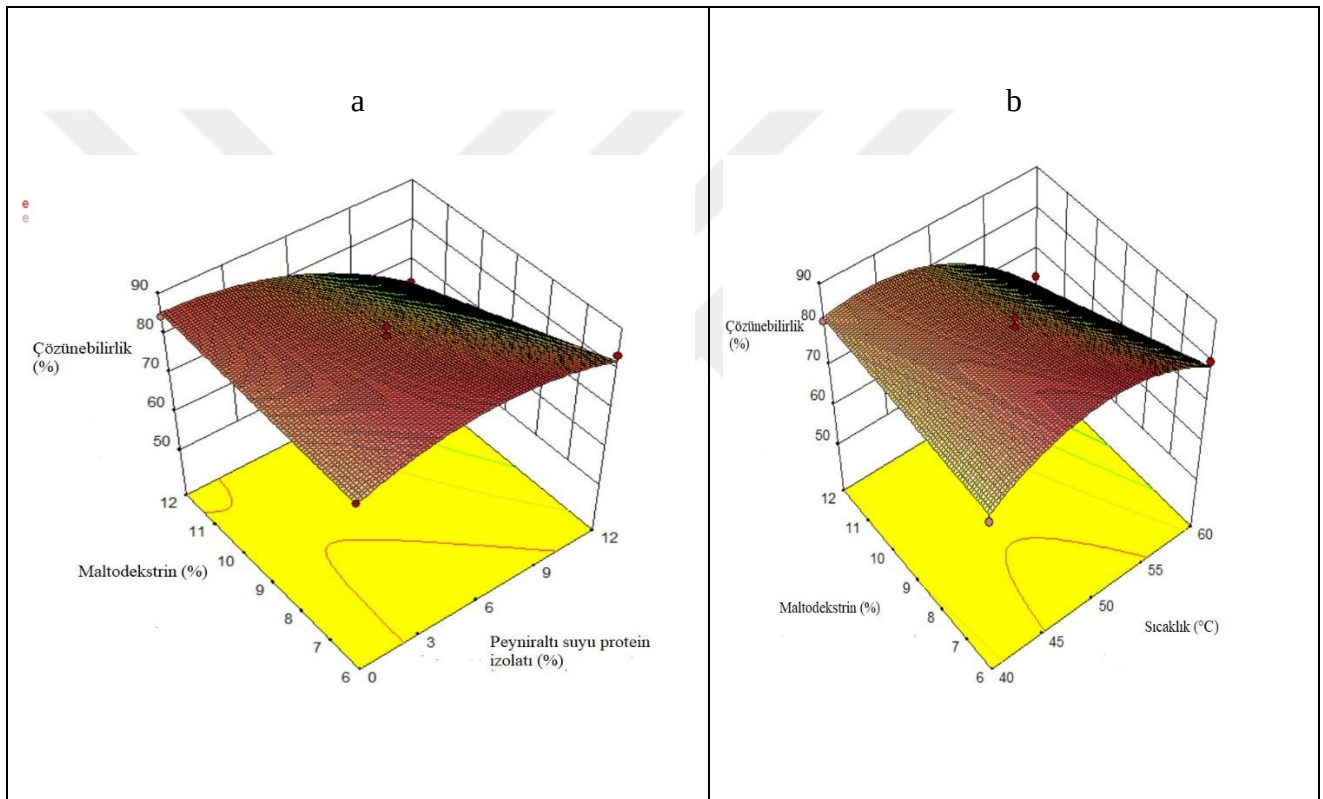
Çizelge 4.8. Bakteriyofaj tozlarının çözünübilirlik değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA sonuçları ve model uyumluluğu ile ilgili istatistiksel veriler

Varyasyon Kaynakları	SD	HKT	p değeri
Model (Kuatratik)	7	1212.02	$< 0.0001^*$
A	1	103.46	0.0007*
B	1	216.63	$< 0.0001^*$
C	1	207.26	$< 0.0001^*$
AB	1	114.92	0.0005*
AC	1	117.18	0.0004*
B ²	1	118.27	0.0004*
C ²	1	311.56	$< 0.0001^*$
Kalıntı	9	36.56	
Model uyumsuzluğu	5	23.58	0.3693
Saf hata	4	12.98	
Toplam	16	1248.57	
Model	R^2	R^2 dzl	CV% PRESS Yeterli Kesinlik
Kuatratik	0.97	0.95	2.61 180.05 18.69

* $p < 0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli, A: Taşıyıcı materyaldeki %maltodekstrin oranı, B: Taşıyıcı materyaldeki %peyniraltı suyu protein izolatu oranı, SD: Serbestlik derecesi, HKT: Hata Kareler Toplamı, R^2 dzl: Düzeltilmiş R^2

Bakteriyofaj tozlarının çözünübilirlik değerleri için istatistiksel açıdan önemli varyasyon kaynakları kullanılarak $T\check{C}=83.72-3.60A-5.20B-5.09C-5.36AB-5.41AC-5.29B^2-8.59C^2$ ikinci dereceden polinomiyal model eşitliği elde edilmiştir. İşlem değişkenlerinin bakteriyofaj tozlarının çözünübilirlik 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 4.5'te bakteriyofaj tozlarında bulunan faj tozlarının çözünübilirlik değerleri (%) üzerine etkili ve etkisiz olan faktörlere ait yanıt yüzey grafikleri ve eş yükselti eğrileri yer almaktadır. Hem bakteriyofaj tozlarının üretimi için hazırlanan taşıyıcı materyallerin bileşiminde yer alan peyniraltı suyu protein izolatu ve maltodekstrin oranlarının artmasının hem de püskürtmeli kurutucu çıkış sıcaklığının artmasının bakteriyofaj tozlarının çözünübilirliğinde azalmaya yol açtığı saptanmıştır (Şekil 4.5.a-b).



Şekil 4.5. a: Sabit sıcaklık değerinde taşıyıcı materyallerdeki peyniraltı suyu protein izolatu ve maltodekstrin oranlarının bakteriyofaj tozlarının çözünübilirliği üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu, b: Taşıyıcı materyallerdeki sabit peyniraltı suyu protein izolat oranında, taşıyıcı materyallerdeki maltodekstrin oranı ile kurutma sıcaklık değerinin bakteriyofaj tozlarının çözünübilirliği üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu.

Çözünürlüğün, kurutma çıkış sıcaklığının 50°C olduğunda maksimum değere ulaştığı saptanmıştır. Taşıyıcı materyallerdeki peyniraltı suyu protein izolatu ve maltodekstrin karışımlarının kurutma işlemlerinde oluşturdukları kovalent protein-polisakkarit kompleksler, ucuz ve etkili gıda bileşenleri olarak gıdalarda kullanım ile ilgili olarak önemli işlevsel özelliklere sahiptir (Akhtar ve Dickinson 2007). Kurutma işlemi sırasında sıcaklığa maruz kalmasından dolayı peyniraltı suyu proteinlerinin hidrofobik

bölgelerinde azalma meydana gelmektedir (Mulcahy vd. 2017). Bu durum peyniraltı suyu proteini içeren toz ürünlerin çözünürlüğünü düşürebilmektedir. Çalışmamızda taşıyıcı materyallerdeki peyniraltı suyu protein izolatu oranının artmasıyla bakteriyofaj tozlarının çözünübilirlik değerlerinin azalmasının bu durumdan kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir. Ergin (2023) tarafından yapılan bir çalışmada Felix O1 bakteriyofajını üç farklı yöntemle (elektropüskürtme, püskürterek kurutma ve dondurarak kurutma) kapsüllenerek üretilen bakteriyofaj tozlarının çözünübilirlik değerleri incelemiş ve bakteriyofaj tozlarının çözünübilirlik değerlerinin %82.59 ile %94.77 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Çalışmamız kapsamında üretilen bakteriyofaj tozlarında tespit edilen çözünübilirlik değerleri diğer çalışmalarla genel olarak uyumluluk göstermekle birlikte bazı farklılıkların optimize edilen parametrelerden (taşıyıcı materyallerdeki maltodekstrin ve peyniraltı suyu protein izolatu oranları ve kurutma çıkış sıcaklığı) kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir.

4.5.3. Bakteriyofaj tozlarının su aktivitesi ve kurumadde değerleri

Gıdalarda nem miktarı ve su aktivitesi değeri, yapıda mevcut olan suyun mikrobiyal ve biyokimyasal reaksiyonları etkilemektedir. Yüksek nem ve su aktivitesi değerlerinde bu reaksiyonlar daha hızlı gerçekleşmekte ve ürünün raf ömrü daha kısa olmaktadır (Laroche vd. 2005).Bakteriyofaj tozlarına ait ortalama su aktivitesi değerleri Çizelge 4.9’da sunulmuştur. Bakteriyofaj toz örneklerinin su aktivitesi değerlerinin 0.15-0.38 arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.9. Box-Behnken Cevap Yüzey Yöntemi’ne göre oluşturulan deneme desenine bağlı olarak üretilen bakteriyofaj tozlarında gerçekleştirilen su aktivitesi ve kurumadde analizlerine ait sonuçlar

Deneme Sayısı	Taşıyıcı materyallerdeki maltodekstrin oranı (%)	Taşıyıcı materyallerdeki peyniraltı suyu protein izolatu oranı (%)	Kurutma çıkış sıcaklığı (°C)	Su aktivitesi (a _w)	Kurumadde (%)
1	12	12	50	0.16±0.00	96.00±0.00
2	9	0	60	0.37±0.03	92.50±0.50
3	9	12	60	0.16±0.00	92.05±0.30
4	9	6	50	0.26±0.00	93.70±0.04
5	9	6	50	0.25±0.00	93.44±0.01
6	12	0	50	0.15±0.00	95.46±0.34
7	6	0	50	0.30±0.00	94.37±0.04
8	9	6	50	0.13±0.02	92.90±0.20
9	12	6	60	0.31±0.00	94.35±0.35
10	9	6	50	0.22±0.01	94.67±0.04
11	6	6	60	0.31±0.01	92.31±0.42
12	9	0	40	0.20±0.00	95.48±0.27
13	12	6	40	0.30±0.00	95.99±0.21
14	9	6	50	0.13±0.02	91.72±0.35
15	6	12	50	0.31±0.00	90.43±0.20
16	6	6	40	0.31±0.00	94.56±0.29
17	9	12	40	0.38±0.00	95.39±0.39

* Sonuçlar, ortalama değer ± standart sapma olarak verilmiştir.

Çizelge 4.10’da verilen ANOVA analiz sonuçlarına göre bakteriyofaj tozlarının su aktivitesi değerleri incelendiğinde, kuadratik modelin önerildiği ve taşıyıcı materyaldeki maltodekstrin ve peyniraltı suyu protein izolatu oranlarının ve püskürtmeli kurutucu çıkış sıcaklık değeri ile bu değerlerin interaksiyonunun su aktivitesi üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.10. Bakteriyofaj tozlarının su aktivitesi değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA sonuçları ve model uyumluluğunun test edilebilmesi için kullanılan istatistiksel veriler

Varyasyon Kaynakları	SD	HKT	p değeri		
Model (Kuadratik)	9	0.071	0.3564		
A	1	0.012	0.1993		
B	1	6.090E-004	0.7573		
C	1	2.992E-003	0.4992		
AB	1	3.739E-003	0.4519		
AC	1	0.021	0.0983		
CB	1	2.228E-003	0.5582		
A ²	1	4.330E-004	0.7942		
B ²	1	0.014	0.1629		
C ²	1	0.015	0.1528		
Kalıntı	7	0.041	0.5831		
Model uyumsuzluğu	3	0.015	0.3564		
Saf hata	4	0.027	0.1993		
Toplam	16	0.11			
Model	R ²	R ² dzl	CV%	PRESS	Yeterli Kesinlik
Kuadratik	0.63	0.17	30.88	0.28	4.60

A: Taşıyıcı materyaldeki %maltodekstrin oranı, B: Taşıyıcı materyaldeki %peyniraltı suyu protein izolatu oranı, SD: Serbestlik derecesi, HKT: Hata Kareler Toplamı, R²dzl: Düzeltilmiş R²

T4 bakteriyofajının maltodekstrin ve therekoz ile kaplanıp püskürtülerek kurutulduğu bir çalışmada bakteriyofaj tozlarının su aktivitesi değerlerinin 0.26 ile 0.29 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Choi 2023). *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG bakterisinin püskürterek ve dondurarak kurutulmasıyla kapsüllendiği bir çalışmada, elde edilen toz örneklerin su aktivitesi değerleri 0.03 ile 0.47 arasında değişim göstermiştir (Jayaprakash vd. 2023). Önceki çalışmalarla ilgili bahsi geçen su aktivitesi değerleri ile çalışmamızda tespit edilen su aktivitesi değerleri karşılaştırıldığında, değerler arasında genel olarak uyumluluk olduğu, bazı farklılıkların ise kullanılan taşıyıcı materyalin bileşimindeki farklılıklardan ve püskürterek kurutma işlemine ait işlem parametrelerinden (kurutma çıkış sıcaklığı, besleme hızı, vb.) kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.11’de görüldüğü üzere üretilen 17 farklı bakteriyofaj toz örneğinin kurumadde değerlerine ait analiz sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; varyasyon kaynakları olan taşıyıcı materyallerdeki çözeltisindeki maltodekstrin oranı, taşıyıcı materyaldeki peyniraltı suyu protein izolatu oranı ve kurutma çıkış sıcaklık değerleri ile bunların interaksiyonunun etkisinin önemli olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.11. Bakteriyofaj tozlarının kurumadde değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA sonuçları ve model uyumluluğu ile ilgili istatistiksel veriler

Varyasyon Kaynakları	SD	HKT	p değeri
Model (Lineer)	0	0.00	-
Kalıntı	16	43.27	-
Model uyumsuzluğu	12	2.63	0.6033*
Toplam	16	43.27	
Model	R ²	R ² dzl	CV%
Lineer	0.00	-0.1289	1.75
		PRESS	Yeterli Kesinlik
		48.85	0.00

*p>0.05 seviyesinde istatistiksel olarak önemli değil, HKT: Hata Kareler Toplamı, R²dzl: Düzeltilmiş R²

Bakteriyofaj tozlarına ait ortalama kurumadde değerleri Çizelge 4.9’da verilmiştir. Bakteriyofaj toz örneklerinin kurumadde değerlerinin %91.72-96.00 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Püskürterek kurutma yöntemi ile elde edilen toz gıdaların nem içeriklerinin üretim şartlarına bağlı olmakla beraber genellikle %2-10 arasında değiştiği bilinmektedir (Rodríguez-Hernández vd. 2005). Çalışmamıza ait sonuçlar bu bilgiler doğrultusunda değerlendirildiğinde elde edilen bakteriyofaj tozlarının kurumadde değerlerinin toz gıdaların nem içeriğine uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

4.5.4. Bakteriyofaj tozlarına ait yığın yoğunluk değerleri

Yığın yoğunluk ve boyut dağılımı gibi makroskobik toz özellikleri, doğrudan parçacık morfolojisi dağılımlarıyla ve dolayısıyla taşıyıcı çözelti bileşimi ve kurutma koşullarıyla ilişkilidir (Both vd. 2020). Ayrıca yığın yoğunluk toz ürünün depolanmasını etkileyebilecek önemli bir kalite parametresidir (Ergin 2022).

Bakteriyofaj tozlarına ait ortalama yığın yoğunluk değerleri Çizelge 4.12’de sunulmuştur. Bakteriyofaj toz örneklerinin yığın yoğunluk değerlerinin 0.33-0.42 g/ml arasında değiştiği tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, sadece peyniraltı suyu kullanılarak dondurarak kurutma ve peyniraltı suyu proteini ve inülin karışımı kullanılarak püskürtmeli kurutma ile üretilen havuç tozunun yığın yoğunluklarının sırasıyla 0.26 ve 0.34 g/ml olarak saptanmıştır. Çalışmamızda bulunan sonuçlar ile yukarıda bahsi geçen çalışmada tespit edilen değerler arasındaki farklılıkların kurutulan materyal farklılığı ile kurutma işlemi sırasında uygulanan (sıcaklık, besleme debisi, vb.) işlemlerinden ve kurutma işlemi için kullanılan taşıyıcı materyal farklılıklarından kaynaklandığı değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.12. Box-Behnken Cevap Yüzey Yöntemi’ne göre oluşturulan deneme desenine bağlı olarak üretilen toz örneklerin yığın yoğunluk analiz sonuçları

Deneme Sayısı	Taşıyıcı materyallerdeki maltodekstrin oranı (%)	Taşıyıcı materyallerdeki peyniraltı suyu protein izolatu oranı (%)	Kurutma çıkış sıcaklığı (°C)	Yığın yoğunluk (g/ml)
1	12	12	50	0.34±0.00
2	9	0	60	0.37±0.05
3	9	12	60	0.33±0.01
4	9	6	50	0.37±0.01
5	9	6	50	0.38±0.01
6	12	0	50	0.37±0.01
7	6	0	50	0.42±0.01
8	9	6	50	0.38±0.01
9	12	6	60	0.42±0.02
10	9	6	50	0.38±0.02
11	6	6	60	0.43±0.00
12	9	0	40	0.35±0.01
13	12	6	40	0.34±0.00
14	9	6	50	0.37±0.00
15	6	12	50	0.36±0.01
16	6	6	40	0.38±0.01
17	9	12	40	0.40±0.01

* Sonuçlar, ortalama değer ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.5.5. Bakteriyofaj tozlarına ait renk analiz sonuçları

Bakteriyofaj tozlarına ait renk analiz sonuçları Çizelge 4.13’te verilmiştir. Renk analizlerinde L^* için değeri koyuluk ifadesi 0’a yaklaşımın arttığını, açıklık ifadesi ise 100’e yaklaşımın arttığını temsil etmektedir. Bir diğer parametre olan a değerinin “+” olması kırmızılık değerini gösterirken, “-” olması ise yeşillik değerini temsil etmektedir. Renk analizinin diğer bir parametresi olan b değeri mavilik-sarılık derecelerini ifade ederken “+” olması sarıya “-” olması mavi renge yaklaştığını belirtmektedir. Hue açısı (h^*) ve kroma (c^*) değerleri ise rengin doygunluk düzeyini ifade etmektedir (Cemeroğlu 2007). Bakteriyofaj tozlarının ortalama L^* , a^* , b^* , c^* ve h^* değerlerinin sırasıyla 92.51-95.53, -0.40-0.02, 1.94-8.03, 1.69-8.04 ve 89.45-93.88 arasında değiştiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.13’te verilen bakteriyofaj tozlarına ait L^* değerlerinin istatistiksel olarak incelenmesi amacıyla Çizelge 4.14’te görüldüğü gibi ANOVA analizi gerçekleştirilmiştir. ANOVA analizi sonucunda ana varyasyon kaynakları olan taşıyıcı materyaldeki maltodekstrin ve peyniraltı suyu protein izolatu oranları ile püskürtmeli kurutucu çıkış sıcaklık değerleri ve bahsi geçen bu parametrelerin birbirleriyle etkileşiminin bakteriyofaj tozlarının L^* değerleri üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir. Ayrıca bakteriyofaj tozlarına ait L^* değerleri ile model arasında uyumsuzluk ($p>0.05$) belirlenirken, model uyumsuzluğunun da bakteriyofaj tozlarının L^* değerleri üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0.05$) saptanmıştır.

Çizelge 4.13. Box-Behnken Cevap Yüzey Yöntemi'ne göre oluşturulan deneme desenine bağlı olarak üretilen toz örneklerin renk analiz sonuçları

Deneme Sayısı	L* değeri	a* değeri	b* değeri	c* değeri	h* değeri
1	94.32±0.2*	-0.10±0.04*	5.67±0.43*	5.67±0.42*	91.05±0.4*
2	94.88±0.16	-0.01±0.01	2.06±0.02	2.06±0.02	90.22±0.15
3	92.78±1.04	-0.26±0.02	5.33±0.18	5.47±0.04	92.70±0.26
4	93.77±0.02	-0.24±0.04	6.15±0.18	6.15±0.18	92.21±0.44
5	93.54±0.09	-0.18±0.00	5.80±0.02	5.80±0.02	91.74±0.00
6	94.63±0.00	0.02±0.04	2.28±0.04	2.28±0.04	89.63±0.81
7	95.53±0.00	0.02±0.00	1.94±0.05	1.94±0.05	89.45±0.07
8	93.55±0.00	-0.28±0.00	5.23±0.00	5.24±0.00	93.02±0.00
9	93.72±0.19	-0.40±0.05	5.86±0.03	5.87±0.03	93.88±0.50
10	92.51±0.00	-0.22±0.00	5.23±0.03	5.48±0.00	92.28±0.00
11	93.57±0.00	-0.23±0.00	5.97±0.00	5.98±0.00	92.29±0.00
12	95.00±0.11	-0.09±0.01	1.69±0.06	1.69±0.06	92.94±0.27
13	94.55±0.15	-0.28±0.00	4.53±0.09	4.63±0.00	93.45±0.01
14	94.07±0.05	-0.40±0.15	5.24±0.01	5.51±0.01	92.53±0.38
15	93.05±0.00	-0.22±0.00	8.03±0.21	8.04±0.20	92.89±1.18
16	93.07±0.39	-0.40±0.15	6.42±0.01	6.43±0.01	91.62±0.07
17	94.03±0.15	-0.08±0.02	6.12±0.01	6.12±0.01	90.71±0.15

L* değeri; açıklık (100) ve koyuluk (0), a* değeri kırmızı (+a) ve yeşillik (-a), b değeri; sarı (+b) ve mavi (-b), c*değeri kroma doygunluk, h*değeri; Hue açısı, * Sonuçlar, ortalama değer ± standart sapma olarak verilmiştir.

Çizelge 4.14. Bakteriyofaj tozlarının renk analizine ait L* değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA sonuçları ve model uyumluluğunun test edilebilmesi için kullanılan istatistiksel veriler

Varyasyon Kaynakları	SD	HKT	p değeri
Model (Kuatratik)	9	8.27	0.2191
A	1	2.41	0.0645
B	1	0.60	0.3099
C	1	0.086	0.6913
AB	1	0.026	0.8253
AC	1	0.090	0.6849
CB	1	1.54	0.1238
A ²	1	2.34	0.0677
B ²	1	0.56	0.3276
C ²	1	0.32	0.4485
Kalıntı	7	3.52	
Model uyumsuzluğu	3	2.53	0.1342
Saf hata	4	0.99	
Toplam	16	11.79	
Model Kuadratık	R ²	R ² dzl	CV%
	0.70	0.31	0.75
			PRESS
			41.97
			Yeterli Kesinlik
			4.063

Her ne kadar istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiş olsa da bakteriyofaj tozlarının üretimi için hazırlanan taşıyıcı materyalin bileşiminde yer alan peyniraltı suyu protein izolatının oranının ve püskürtmeli kurutucu çıkış sıcaklık değerinin artması L* değerinde artışa neden olmuştur. İstatistiksel olarak benzer bir durum olmakla birlikte, taşıyıcı materyalin bileşiminde yer alan maltodekstrin miktarının artması ise L* değerinde azalmaya neden olduğu saptanmıştır.

L* değeri, ışının kırılmasını etkileyen bir faktördür. Püskürterek kurutma işlemi sırasında karbonhidratlar ve protein arasında sıcaklığın da etkisiyle Maillard reaksiyonu gerçekleşerek son ürünün L* değeri düşebilmektedir (Ergin 2023). Yapılan bir çalışmada enterokok türlerine ait probiyotik suşlar taşıyıcı materyal olarak maltodekstrin ve peyniraltı suyu proteini kullanılarak püskürtmeli kurutucuda kurutulmuştur. Elde edilen toz ürünlerin L* değerleri 70.03-70.59 arasında değişim göstermiştir (Baghwat vd. 2020). Çalışmamızda bulunan L* değerleri ile literatürde bahsi geçen çalışmanın sonuçları arasında bazı farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Bu durumun püskürterek kurutma işlemine ait işlem parametrelerinden (sıcaklık, besleme hızı, vb.) ve kullanılan taşıyıcı materyalin bileşiminde maltodekstrin ve peyniraltı suyu proteini oranlarının farklı olmasından kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir.

Bakteriyofaj tozlarına ait a* değerlerinin istatistiksel olarak incelenmesi amacıyla Çizelge 4.15'te görüldüğü gibi ANOVA analizi gerçekleştirilmiştir. ANOVA analizi sonucunda ana varyasyon kaynakları olan taşıyıcı materyaldeki maltodekstrin ve peyniraltı suyu protein izolatu oranları ile püskürtmeli kurutucu çıkış sıcaklık değerleri ile bahsi geçen bu parametrelerin birbirleriyle interaksiyonun bakteriyofaj tozlarının a* değerleri üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca bakteriyofaj tozlarına ait a* değerleri ile model arasında uyumsuzluk ($p>0.05$) belirlenirken, model uyumsuzluğunun da bakteriyofaj tozlarının a* değerleri üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.15. Bakteriyofaj tozlarının renk analizine ait a* değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA sonuçları ve model uyumluluğunun test edilebilmesi için kullanılan istatistiksel veriler

Varyasyon Kaynakları	SD	HKT	p değeri		
Model (Kuatratik)	9	0.19	0.1726		
A	1	0.021	0.2027		
B	1	5.000E-005	0.9466		
C	1	3.781E-004	0.8541		
AB	1	0.043	0.0811		
AC	1	6.400E-003	0.4581		
CB	1	3.063E-004	0.8685		
A ²	1	0.066	0.0394		
B ²	1	4.939E-003	0.5125		
C ²	1	0.043	0.0826		
Kalıntı	7	0.073	0.2967		
Model uyumsuzluğu	3	0.041	0.1726		
Saf hata	4	0.032	0.2027		
Toplam	16	0.27	0.9466		
Model	R ²	R ² dzl	CV%	PRESS	Yeterli Kesinlik
Kuatratik	0.73	0.38	55.51	0.71	4.052

A: Taşıyıcı materyaldeki %maltodekstrin oranı, B: Taşıyıcı materyaldeki %peyniraltı suyu protein izolatu oranı, SD: Serbestlik derecesi, HKT: Hata Kareler Toplamı, R²dzl: Düzeltilmiş R²

Mikrokapsüllerin daha düşük parlaklığı ve sarımsı renge doğru eğilimlerinin kapsülleme için kullanılan peyniraltı suyu proteini ve benzeri bileşenlerin varlığından kaynaklandığı bildirilmiştir (Baghwat vd. 2020). Renk analizine ait bir parametre olan b* değerinin artması sarı rengin göstergesi iken, azalması ise mavi rengin arttığını göstermektedir.

Çizelge 4.16’da görüldüğü üzere bakteriyofaj toz örneklerinin b* değerlerine ait analiz sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, varyasyon kaynakları olan taşıyıcı materyaldeki maltodekstrin ve peyniraltı suyu protein izolatu oranları ve kurutma çıkış sıcaklık değerlerinin ve bunların interaksyonunun toz örneklerin b* değerlerine üzerinde istatistiksel olarak önemli bir etkisinin olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.16. Bakteriyofaj tozlarının renk analizine ait b* değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA sonuçları ve model uyumluluğunun test edilebilmesi için kullanılan istatistiksel veriler

Varyasyon Kaynakları	SD	HKT	p değeri
Model (Lineer)	3	19.94	0.0974*
A	1	16.68	0.0242
B	1	0.73	0.6037
C	1	2.54	0.3376
Kalıntı	13	33.35	0.2133
Model uyumsuzluğu	9	28.04	0.0974
Saf hata	4	5.31	0.0242
Toplam	16	53.29	0.6037
Model	R ²	R ² dzl	CV%
Lineer	0.38	0.23	32.60
		PRESS	Yeterli Kesinlik
		58.30	5.168

* $p>0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli. A: Taşıyıcı materyaldeki %maltodekstrin oranı, B: Taşıyıcı materyaldeki %peyniraltı suyu protein izolatu oranı, SD: Serbestlik derecesi, HKT: Hata Kareler Toplamı, R² dzl: Düzeltilmiş R²

Bakteriyofaj toz örneklerinin c* değerleri üzerine ana varyasyon kaynakları olan taşıyıcı materyaldeki maltodekstrin ve peyniraltı suyu protein izolatu oranları ve kurutma çıkış sıcaklık değerlerinin c* değeri üzerine etkisini incelemek amacıyla Çizelge 4.17’de görüldüğü gibi ANOVA analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde, modelin lineer olduğu tespit edilirken, bahsi geçen ana varyasyon kaynakları ile model uyumsuzluğunun etkisinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu ($p>0.05$) saptanmıştır.

Çizelge 4.17. Bakteriyofaj tozlarının renk analizine ait c* değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA sonuçları ve model uyumluluğunun test edilebilmesi için kullanılan istatistiksel veriler

Varyasyon Kaynakları	SD	HKT	p değeri
Model (Lineer)	3	20.78	0.0876*
A	1	17.57	0.0210
B	1	0.83	0.5776
C	1	2.38	0.3514
Kalıntı	13	33.15	0.1927
Model uyumsuzluğu	9	28.19	0.0876
Saf hata	4	4.95	0.0210
Toplam	16	53.93	0.5776
Model	R ²	R ² dzl	CV%
Lineer	0.38	0.24	32.19
		PRESS	Yeterli Kesinlik
		58.11	5.23

* $p>0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli. A: Taşıyıcı materyaldeki %maltodekstrin oranı, B: Taşıyıcı materyaldeki %peyniraltı suyu protein izolatu oranı, SD: Serbestlik derecesi, HKT: Hata Kareler Toplamı, R²dzl: Düzeltilmiş R²

İstatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilse de üretilen 17 farklı bakteriyofaj tozunun c* değerleri incelendiğinde, taşıyıcı materyaldeki %maltodekstrin oranı, taşıyıcı materyaldeki %peyniraltı suyu protein izolatu oranı ve kurutma çıkış sıcaklık değeri ile

bu parametrelerin interaksyonunun bakteriyofaj tozlarının c* değerleri üzerine etkisinin önemli olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir. Üç boyutlu grafikler incelendiğinde ise ana varyasyon kaynakları ile c* değerleri arasında doğrusal bir ilişki kurulamamıştır.

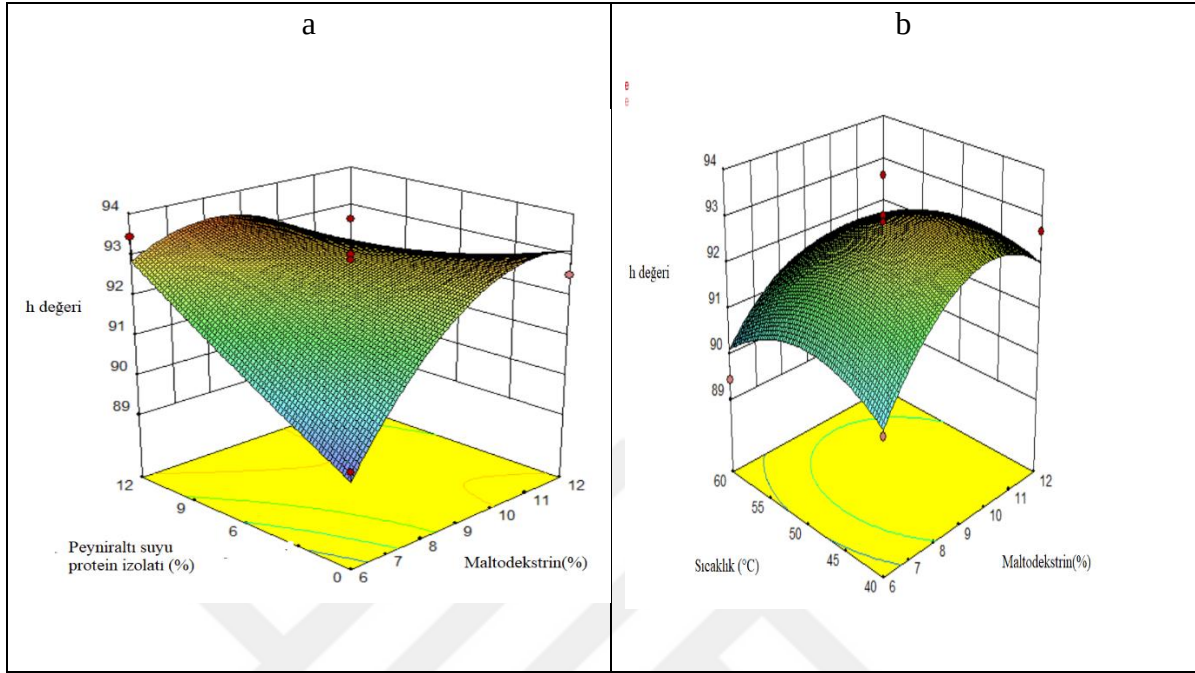
Çizelge 4.18’de verilen ANOVA analizi sonuçlarına göre, bakteriyofaj tozlarının h* değerlerinin model ile uyumlu olduğu ($p<0.05$) gözlenmiştir. Ayrıca h* değerleri üzerine taşıyıcı materyaldeki maltodekstrin oranının etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu ($p<0.05$) tespit edilirken, taşıyıcı materyaldeki peyniraltı suyu protein izolatu oranı ve kurutma çıkış sıcaklık değerinin ve bu değerlerin birbiriyle interaksyonunun etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı ($p>0.05$) saptanmıştır.

Çizelge 4.18. Bakteriyofaj tozlarının renk analizine ait h* değerleri üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA sonuçları ve model uyumluluğunun test edilebilmesi için kullanılan istatistiksel veriler

Varyasyon Kaynakları	SD	HKT	p değeri		
Model (Kuatratik)	9	23.38	0.0270*		
A	1	2.25	0.0837*		
B	1	1.27	0.1737		
C	1	1.42	0.1531		
AB	1	7.01	0.0093		
AC	1	0.37	0.4397		
CB	1	0.81	0.2673		
A ²	1	6.93	0.0095		
B ²	1	0.023	0.8447		
C ²	1	2.81	0.0590		
Kalıntı	7	3.88	0.3073		
Model uyumsuzluğu	3	2.16	0.0270		
Saf hata	4	1.72	0.0837		
Toplam	16	27.26	0.1737		
Model	R ²	R ² dzl	CV%	PRESS	Yeterli Kesinlik
Kuatratik	0.85	0.67	0.81	37.32	6.982

* $p<0.05$ seviyesinde istatistiksel olarak önemli. A: Taşıyıcı materyaldeki %maltodekstrin oranı, B: Taşıyıcı materyaldeki %peyniraltı suyu protein izolatu oranı, SD: Serbestlik derecesi, HKT: Hata Kareler Toplamı, R²dzl: Düzeltilmiş R²

Bakteriyofaj tozlarının h* değerleri için istatistiksel açıdan önemli varyasyon kaynakları kullanılarak $h^*=92.87+0.53A+0.40B-0.42C-1.32AB-0.31AC-0.45BC-1.28A^2+0.074B^2-0.82C^2$ ikinci dereceden polinomiyal model eşitliği elde edilmiştir. İşlem değişkenlerinin h* değerleri üzerindeki etkilerinin gözlemlenebilmesi için elde edilen modeller kullanılarak yanıt yüzey grafikleri ve eş yükselti eğrileri oluşturulmuştur (Şekil 4.10). Her ne kadar istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiş olsa da taşıyıcı materyaldeki maltodekstrin oranının ve taşıyıcı materyaldeki peyniraltı suyu protein izolatu oranının artmasıyla h* değerinin arttığı, kurutma çıkış sıcaklık değerinin artmasıyla h* değerinin azaldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. a: Sabit sıcaklık değerinde taşıyıcı materyaldeki peyniraltı suyu protein izolatı ve maltodekstrin oranlarının bakteriyofaj tozlarının h^* değeri üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu, b: Taşıyıcı materyaldeki sabit peyniraltı suyu protein izolat oranında, taşıyıcı materyaldeki maltodekstrin oranı ile kurutma çıkış sıcaklık değerinin bakteriyofaj tozlarının h^* değeri üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu.

4.5.6. Bakteriyofaj tozlarının camsı geçiş sıcaklık değerleri

Bakteriyofaj tozlarının üretimlerinde taşıyıcı materyalin bileşiminde yer alan maltodekstrin ve peyniraltı suyu protein izolatının camsı geçiş sıcaklıkları sırasıyla 148.60°C ve 153.30°C olarak saptanmıştır. Bakteriyofaj tozlarının camsı geçiş sıcaklıklarının 101.91°C-169.98°C arasında değiştiği saptanmıştır (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19. Box-Behnken Cevap Yüzey Yöntemi'ne göre oluşturulan deneme desenine bağlı olarak üretilen toz örneklerin camsı geçiş sıcaklık değerleri

Deneme Sayısı	Taşıyıcı materyaldeki maltodekstrin oranı (%)	Taşıyıcı materyaldeki peyniraltı suyu protein izolatu oranı (%)	Kurutma çıkış sıcaklığı (°C)	Camsı geçiş sıcaklığı (T _g) (°C)
1	12	12	50	101.91
2	9	0	60	138.62
3	9	12	60	114.36
4	9	6	50	139.51
5	9	6	50	143.90
6	12	0	50	157.73
7	6	0	50	143.61
8	9	6	50	153.66
9	12	6	60	138.00
10	9	6	50	147.47
11	6	6	60	151.79
12	9	0	40	162.88
13	12	6	40	169.65
14	9	6	50	169.98
15	6	12	50	152.98
16	6	6	40	132.43
17	9	12	40	148.84

Püskürterek kurutma işleminde dikkat edilmesi gereken önemli noktalardan biri ürünün camsı geçiş sıcaklığıdır. Camsı geçiş sıcaklığı (T_g) sert, katı ve amorf bir maddenin yumuşak, kauçuk benzeri ve sıvı bir faza dönüştüğü sıcaklıktır. Püskürterek kurutma işlemi sırasında kullanılan materyallerin camsı geçiş sıcaklıklarının düşük olması yapışma, kabuk bağlama ve topaklanma gibi istenmeyen fiziksel değişikliklere neden olabilmektedir. Yağsız süt, maltodekstrin ve proteinlerden oluşan çözeltilerin püskürterek kurutma işleminde kullanılması sonucunda yapışma olmadığı ve bu durumun yüksek camsı geçiş sıcaklığından kaynaklandığını bildirilmiştir (Özdemir vd. 2021).

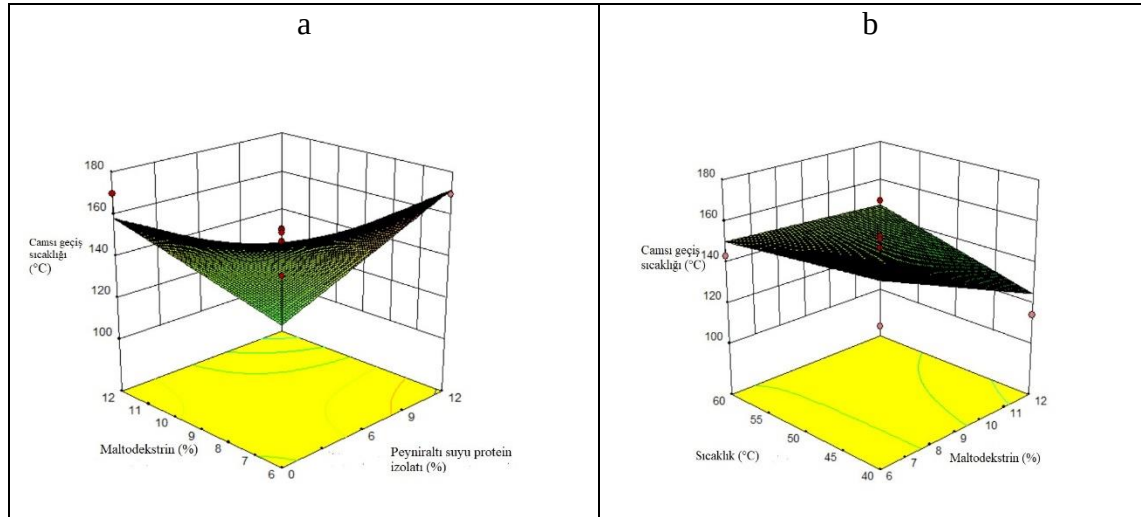
Çalışmamızda üretilmiş olan bakteriyofaj tozlarının camsı geçiş sıcaklığının ANOVA analizine ait sonuçlar Çizelge 4.20'de verilmiştir. Bakteriyofaj tozlarına ait camsı geçiş sıcaklıkları ile model arasında uyumsuzluk olduğu ($p>0.05$) belirlenirken, model uyumsuzluğunun da bakteriyofaj tozlarının camsı geçiş sıcaklıkları üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu ($p<0.05$) saptanmıştır. Ana varyasyon kaynakları olan taşıyıcı materyaldeki maltodekstrin ve peyniraltı suyu protein izolatu oranları ve kurutma çıkış sıcaklık değerleri ile bu parametrelerin birbiriyle etkileşiminin bakteriyofaj tozlarının camsı geçiş sıcaklıkları üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu ($p>0.05$) tespit edilmiştir.

Çizelge 4.20. Bakteriyofaj tozlarının camsı geçiş sıcaklığı üzerine bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren ANOVA sonuçları ve model uyumluluğunun test edilebilmesi için kullanılan istatistiksel veriler

Varyasyon Kaynakları	SD	HKT	p değeri		
Model (Küçük)	6	2832.73	0.1317*		
A	1	694.15	0.1035		
B	1	56.76	0.6195		
C	1	95.01	0.5224		
AB	1	1599.60	0.0216		
AC	1	217.42	0.3397		
CB	1	169.78	0.3964		
Kalıntı	10	2162.50			
Model uyumsuzluğu	6	1994.06	0.0327**		
Saf hata	4	168.44			
Toplam	16	4995.23			
Model	R ²	R ² dzl	CV%	PRESS	Yeterli Kesinlik
Kuadratik	0.96	0.86	30.88	10169.11	6.213

* p>0.05 seviyesinde istatistiksel olarak önemli değil, ** p<0.05 düzeyinde istatistiksel olarak önemli, HKT: Hata Kareler Toplamı, R²dzl: Düzeltilmiş R²

Bakteriyofaj tozlarının camsı geçiş sıcaklık değerleri için istatistiksel açıdan önemli varyasyon kaynakları kullanılarak $T_g = 145 - 9.32A - 2.66B + 3.45C - 20AB + 7.37AC - 6.51BC$ ikinci dereceden polinomial model eşitliği elde edilmiştir. İşlem değişkenlerinin bakteriyofaj tozlarının camsı geçiş sıcaklık 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 4.11'te bakteriyofaj tozlarının camsı geçiş sıcaklık değerleri üzerine etkili ve etkisiz olan faktörlere ait yanıt yüzey grafikleri ve eş yükselti eğrileri yer almaktadır. Her ne kadar istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiş olsa da bakteriyofaj tozlarının üretimi için hazırlanan taşıyıcı materyalin bileşiminde yer maltodekstrin oranının artmasıyla camsı geçiş sıcaklığının azaldığı ve taşıyıcı materyaldeki peyniraltı suyu protein izolatu oranının artmasıyla ise bakteriyofaj tozlarına ait camsı geçiş sıcaklıklarının arttığı tespit edilmiştir. (Şekil 4.11.a). Püskürterek kurutma işlemi sırasında kurutma çıkış sıcaklığının artmasının, bakteriyofaj tozlarına ait camsı geçiş sıcaklık değerlerinin yükselmesine neden olduğu saptanmıştır (Şekil 4.11.b).



Şekil 4.7. a: Sabit sıcaklık değerinde taşıyıcı materyaldeki peyniraltı suyu protein izolatu ve maltodekstrin oranlarının bakteriyofaj tozlarının camsı geçiş sıcaklık değeri üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu, b: Taşıyıcı materyaldeki sabit peyniraltı suyu protein izolat oranında, taşıyıcı materyaldeki maltodekstrin oranı ile kurutma çıkış sıcaklık değerinin bakteriyofaj tozlarının camsı ge.iş sıcaklık değeri üzerine etkisinin yüzey fonksiyonu.

Yapılan bir çalışmada *Pseudomonas* türlerine özgü üç farklı litik döngüye sahip olan bakteriyofajlar (PEV1, PEV20 ve PEV61) laktoz ve lösin kullanılarak püskürtmeli kurutucuda kurutulmuştur. Çalışmada faj tozlarının camsı geçiş sıcaklıklarının 60-63°C arasında değiştiğini tespit edilmiştir (Chang vd. 2019). Çalışmamızda bakteriyofaj tozlarına ait camsı geçiş sıcaklık değerlerinin, bahsi geçen çalışmadaki değerlerden farklı olduğu görülmüş ve bu durumun kullanılan taşıyıcı materyal ile püskürterek kurutma işlemine ait işlem parametrelerinin (kurutma çıkış sıcaklığı, besleme hızı, vb.) farklılığından kaynaklanmış olabileceği değerlendirilmiştir.

4.5.7. Bakteriyofaj tozlarının partikül boyut analizi sonuçları

Partikül boyutu dağılımı, üretilen kapsüllerin gıda içerisine ilave edilmesini doğrudan etkileyen en önemli fiziksel özelliklerden biridir (Hökelekli 2021).

Bakteriyofaj tozlarının partikül boyutu ortalama hacimsel alan boyutu $D_{4,3}$ olarak ifade edilmiş ve aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$D_{4,3} = [\sum ni(di)]^4 \div [\sum ni(di)^3]$$

Bu eşitlikte n_i ; d_i çapına sahip partikül sayısını ifade etmektedir. Açıklık yani span değeri olarak ifade edilen değer ise yığın içindeki partiküllerin dağılımını ifade etmekte olup aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\text{Span} = ((d_{90} - d_{10}) \div (d_{50}))$$

Parçacık büyüklüğünü ifade etmek için kullanılan diğer bir değer d_x değeridir. d_x değerini temsil eden d_{10} , d_{50} ve d_{90} değerleri parçacıkların sırasıyla %10, %50 ve

%90'nın kendisinden küçük olduğu değerdir. Buradaki d_{90} , d_{50} ve d_{10} değerleri kümülatif hacme sahip eşdeğer hacimsel çapları ifade etmektedir. Partikül boyut analizine ait sonuçlar Çizelge 4.21'de görülmektedir.

Çizelge 4.21. Box-Behnken Cevap Yüzey Yöntemi'ne göre oluşturulan deneme desenine bağlı olarak üretilen bakteriyofaj tozlarında gerçekleştirilen partikül boyut analizlerine ait sonuçlar

Deneme Sayısı	Span	D _{4,3} (μm)	d(0.1) (μm)	d(0.5) (μm)	d(0.9) (μm)
1	1.54±1.12*	13.85±0.61	5.75±0.18	13.23±0.30	22.43±0.37
2	1.13±0.25	17.84±0.77	0.36±6.37	16.24±0.02	31.61±0.46
3	1.26±0.22	9.53±0.37	4.23±0.12	9.32±0.01	14.90±0.36
4	1.66±0.01	12.88±0.43	4.45±0.22	11.46±0.85	23.46±0.23
5	1.66±0.05	18.33±0.02	5.92±0.01	16.10±0.77	32.75±0.36
6	1.29±0.20	16.81±0.45	5.92±0.01	15.75±0.20	29.45±0.30
7	1.52±0.07	19.71±0.48	7.59±0.22	19.19±0.23	32.36±0.20
8	1.62±0.09	12.51±0.60	4.36±0.07	12.20±0.77	20.20±0.50
9	1.75±0.08	22.70±0.73	7.10±0.07	19.35±0.03	38.52±0.63
10	1.52±0.66	27.41±0.12	7.27±0.20	24.23±0.07	49.55±0.77
11	1.50±0.56	18.66±0.45	6.39±0.16	16.78±0.15	31.86±0.36
12	1.51±0.56	21.82±0.60	7.41±0.02	20.59±0.21	38.22±0.20
13	0.66±0.40	11.90±0.73	4.27±0.02	11.03±0.36	20.95±0.30
14	2.05±0.78	34.23±0.35	22.24±0.02	34.86±0.23	45.24±0.60
15	1.75±0.89	29.58±0.35	7.07±0.03	20.82±0.23	49.69±0.20
16	1.36±0.40	27.41±0.35	7.27±0.01	24.23±0.04	49.55±0.50
17	1.36±0.56	13.20±0.40	5.43±0.01	12.24±0.02	22.31±0.03

* Sonuçlar, ortalama değer ± standart sapma olarak verilmiştir.

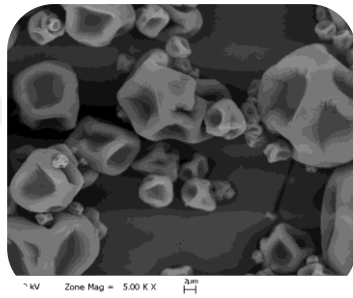
Deneme desenine göre üretilen bakteriyofaj tozlarına ait örneklerin span değerleri 0.66 ile 1.66 arasında değişirken, bakteriyofaj tozlarına ait $D_{4,3}$ değeri, $d(0.1)$, $d(0.5)$ ve $d(0.9)$ değerlerinin sırasıyla 9.53-34.23, 0.36-22.24, 9.32- 34.86 ve 14.90-32.75 arasında değiştiği saptanmıştır.

4.5.8. Bakteriyofaj tozlarına ait görüntüler

Bakteriyofaj tozlarının SEM görüntüleri (500X) Şekil 4.12'de verilmiştir. Elde edilen kapsüllerin elektron mikroskobu ile görüntülenmesi mikrokürelerin yapısı hakkında bilgi vermenin yanı sıra kapsüllerin işleme ve depolama koşullarına bağlı olarak yapılarındaki değişimin tespit edilmesine yardımcı olmaktadır (Tang vd. 2015).

Konu ile ilgili yapılan bir çalışmada üç farklı matriks kullanılarak (yağsız süt tozu, arabik gam ve maltodekstrin) *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG bakterisi üç farklı metotla (püskürterek kurutma, dondurarak kurutma ve elektrostatik püskürterek kurutma) kurutulmuş ve elde edilen mikrokapsüller taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir. Püskürterek kurutma ile elde edilen mikrokapsüllerin yüzeylerinin çıkıntılı ve çukur olduğu ve küresel bir yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. Özellikle püskürterek kurutma ile elde edilmiş olan mikropartiküllerin kümelenmiş olduğunu belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, mikrokapsüllerin yapılarındaki çukurlukların ve çökmelerin suyun hızlı buharlaşmasına bağlı olarak artan yüksek iç basınç nedeniyle meydana geldiği değerlendirilmiştir. Bu durumun yanı sıra kurutma işlemi sonucunda

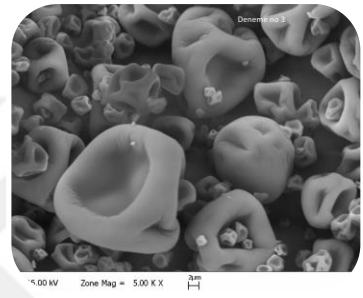
mikrokapsüllerin yüzeyinde çatlak veya kırıklıkların olmasının, kapsül verimliliğini düşüreceği ve gaz geçirgenliğinin artışı ile mikropartiküllerin raf ömrünün azaltılabileceği değerlendirilmiştir (Jayaprakash vd. 2023). Literatürdeki bu bilgilere dayanarak çalışmamızda elde edilen SEM görüntüleri incelendiğinde, yüzeyinde çatlak olan mikropartiküllerden oluşan bakteriyofaj tozlarının canlılık değerlerinin en az olduğu (Deneme no 2) ve bu durumun yüksek sıcaklıkta kurutma işleminden ve taşıyıcı materyalde sadece maltodekstrin kullanılmasından kaynaklı olabileceği değerlendirilmiştir. Ayrıca taşıyıcı materyalde peyniraltı suyu protein izolatu oranının artmasının kapsüllerin kümelenmesini artırdığı ve tozların daha küresel yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. Kurutma çıkış sıcaklığının artmasıyla kapsüllerin yüzeylerindeki büzüşmelerin arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca araştırmacıların yaptıkları değerlendirmeler dikkate alındığında çalışmamızda tespit edilen sonuçların uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.



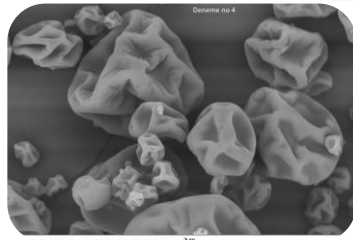
Deneme No 1



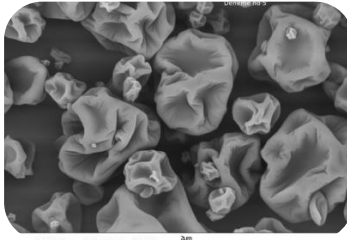
Deneme No 2



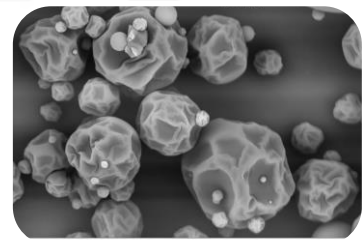
Deneme No 3



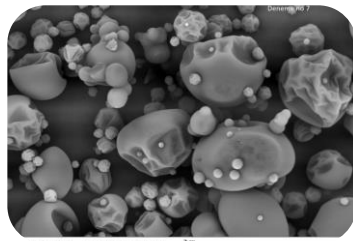
Deneme No 4



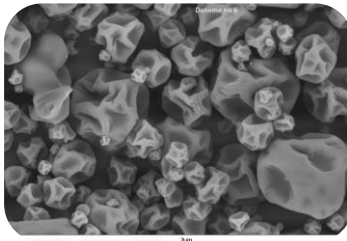
Deneme No 5



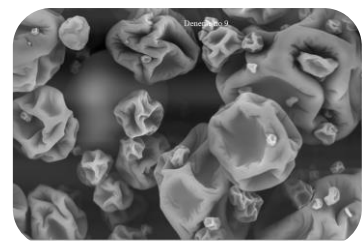
Deneme No 6



Deneme No 7

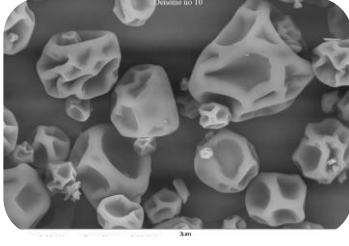


Deneme No 8

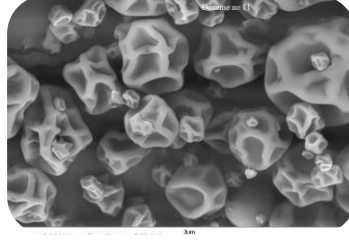


Deneme No 9

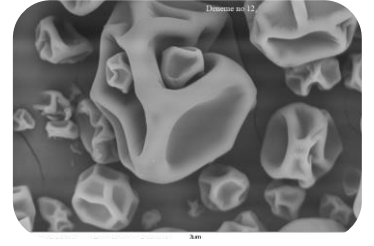
Şekil 4.8. Bakteriyofaj tozlarına ait SEM görüntüleri



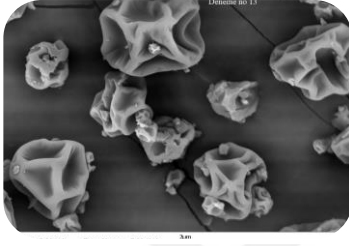
Deneme No 10



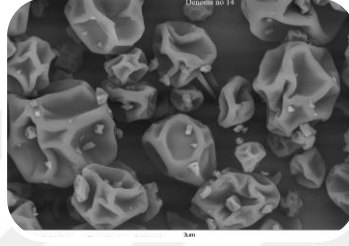
Deneme No 11



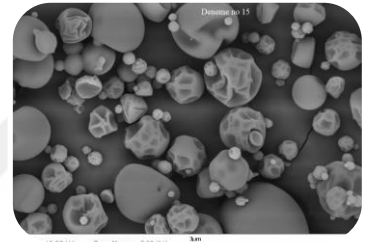
Deneme No 12



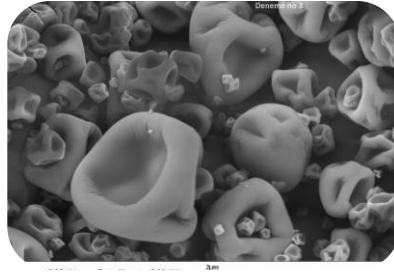
Deneme No 13



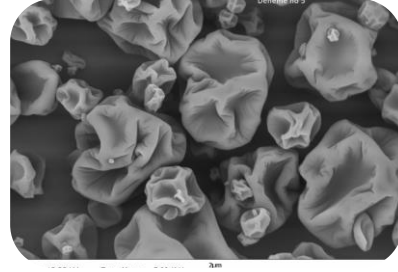
Deneme No 14



Deneme No 15



Deneme No 16



Deneme No 17

Şekil 4.8.'in devamı

4.5.9. Optimizasyon çalışmasına ait sonuçların deneysel olarak doğrulanması

Pseudomonas putida gh-1 bakteriyofajının püskürtülerek kurutulmasıyla elde edilen bakteriyofaj tozlarının optimum değerleri için işlem koşulları olarak seçilen taşıyıcı materyaldeki peyniraltı suyu proteini izolatu ve maltodekstrin oranları ve kurutma çıkış sıcaklık değerinde en yüksek canlılık ve en yüksek çözünabilirliğe sahip bakteriyofaj tozlarının üretimi istenebilirlik fonksiyonu yaklaşımı ve eş yükselti eğrilerinin kullanılmasıyla optimize edilmiştir. Ayrıca optimum noktaların belirlenmesinde ikinci dereceden polinomiyal modeller kullanılmıştır.

Aynı anda en yüksek canlılık ve en yüksek çözünabilirliğe sahip bakteriyofaj tozlarının üretilmesi için Yanıt Yüzey Metodu ile istenebilirlik fonksiyonu yaklaşımı uygulandığında optimum nokta için tek bir çözüm önerilmiştir. Sunulan çözümde *Pseudomonas putida* gh-1 bakteriyofajının kurutulması amacıyla hazırlanan taşıyıcı materyaldeki maltodekstrin oranı %8.49, peyniraltı suyu protein izolatu oranı ise %5.66 olarak belirlenmiş ve kurutma çıkış sıcaklık değeri ise 47°C olarak tespit edilmiştir. Önerilen bu koşullarda gerçekleştirilen püskürtmeli kurutma işlemi sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.22’de görüldüğü gibi doğrulanmıştır. Doğrulama işlemi sonucunda teorik ve deneysel verilerin birbiri ile uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.22.Optimum noktada doğrulama deney sonuçları

	Optimum faj titresi (log POB/g)	Optimum çözünabilirlik (%)
Tahminlenen değer	11.42	84.92
Deneysel değer	11.71	85.05
Hata (%)	2.71	0.16

Optimum değerlerde elde edilen *Pseudomonas putida* gh-1 bakteriyofaj tozu 6 ay süreyle polipropilen falkon tüpler içerisinde 4°C’de depolanmış ve depolamanın 1., 3. ve 6. aylarında ısıtma işlemi görmüş sıklere uygulanmıştır.

4.5.10. Optimum değerlerde üretilen bakteriyofaj tozlarına ait analiz sonuçları

Optimum değerlerde elde edilen *Pseudomonas putida* gh-1 bakteriyofaj tozlarında ait 6 aylık depolama boyunca depolamanın 1., 3. ve 6. aylarında gerçekleştirilen analiz sonuçları Çizelge 4.23 ve Çizelge 4.24’de verilmiştir. Faj

titresi, çözünübilirlik, su aktivitesi, kurumadde, yığın yoğunluk, camsı geçiş sıcaklığı analizlerine ait sonuçlar Çizelge 4.23'te görülmektedir.

Çizelge 4.23. Optimum değerlerde elde edilen *Pseudomonas putida* gh-1 bakteriyofaj tozlarının faj titresi, çözünübilirlik, su aktivitesi, kurumadde, yığın yoğunluk, camsı geçiş sıcaklığı analizlerine ait sonuçlar

Depolama (ay)	Optimum faj titresi (log POB/g)	Optimum çözünübilirlik (%)	Su aktivitesi (a _w)	Kurumadde (%)	Yığın yoğunluk (g/ml)	Camsı geçiş sıcaklığı (T _g) (°C)
1	11.71±0.05	85.05±0.07	0.21±0.00	96.60±0.03	0.34±0.00	147.39±0.03
3	11.65±0.03	85.12±0.05	0.22±0.10	94.20±0.00	0.35±0.05	147.68±0.38
6	11.58±0.02	84.75±0.20	0.25±0.05	94.02±0.07	0.36±0.00	152.10±0.25

* Sonuçlar, ortalama değer ± standart sapma olarak verilmiştir.

Çizelge 4.23 incelendiğinde bakteriyofaj tozlarının faj canlılığının bir göstergesi olan faj titresinin ve çözünübilirlik oranlarının azalmadığı, depolamanın başlangıç koşullarında mevcut olan özelliklerini koruduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.24'te ise optimum değerlerde elde edilen *Pseudomonas putida* gh-1 bakteriyofaj tozlarında ait 6 aylık depolama boyunca depolamanın 1., 3. ve 6. aylarında gerçekleştirilen renk analizlerine ait sonuçlar yer almaktadır. Renk analiz sonuçları irdelendiğinde, depolama boyunca renk değerlerinin stabilitesini koruduğu değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.24. Optimum değerlerde elde edilen *Pseudomonas putida* gh-1 bakteriyofaj tozlarında ait renk analiz sonuçları

Depolama (ay)	L* değeri	a* değeri	b* değeri	c* değeri	h* değeri
1	92.35±0.02	-0.41±0.00	1.95±0.00	1.68±0.00	89.45±0.05
3	95.00±0.00	-0.02±0.00	8.03±0.00	8.05±0.02	93.85±0.08
6	93.56±0.20	-0.28±0.03	7.20±0.00	7.16±0.03	87.65±0.06

* Sonuçlar, ortalama değer ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.6. Sütte yapılan uygulama ve analizlere ait sonuçlar

4.6.1. Çiğ ve ısıtılmış işlem görmüş sültere ait fizikokimyasal ve mikrobiyolojik analiz sonuçları

Çiğ sülterin ortalama olarak toplam kurumadde miktarı %11.40-11.75, kül miktarı %0.75-0.80, yağ miktarı %3.45-3.50, protein miktarı %3.4-3.8 ve titrasyon asitliği ile pH değerleri ise sırasıyla %0.10-0.15 ve 6.82-6.85 arasında değişmiştir. Çiğ sülter otoklavda 121°C’de 15 dakika ısıtılmış işlem tabi tutulduktan sonra steril olarak örnek alınmış ve titrasyon asitliği ile pH değerlerinin belirlenmesinin ardından mikrobiyolojik ekimleri yapılmıştır. Isıtılmış görmüş sülterin pH değerleri ile titrasyon asitliği değerlerinin sırasıyla 6.60-6.65 ve %0.25-0.28 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Isıtılmış işlem görmüş sültere ait mikrobiyolojik analizler sonucunda maya, koliform, psikrotrof ve toplam mezofilik aerobik bakteriye rastlanılmamıştır.

4.6.2. Bakteriyofaj uygulaması yapılan ısıtılmış işlem görmüş sültere ait analiz sonuçları

Isıtılmış işlem tabi tutulup bakteriyofaj uygulanan ve uygulanmayan sülter örneklerine ait pH, viskozite, proteolitik aktivite ve bakteri sayısı ile bakteriyofaj titresini belirlemeye yönelik analizlere ait sonuçlar 10°C’de depolananlar için Çizelge 4.25’te, 4°C’de depolananlar için ise Çizelge 4.26’da verilmiştir.

Çizelge 4.25 incelendiğinde; 10°C’de depolanan sülter örneklerinin pH değerleri 4.98-6.60 arasında değişim gösterirken, bu örneklerde tespit edilen *P. putida* ATCC 12633 sayıları ile *Pseudomonas putida* gh-1 bakteriyofajı titrelerinin sırasıyla 2.95-5.72 log kob/ml ve 4.97-9.95 log POB/ml arasında değiştiği bulunmuştur. Sülter örneklerinin viskozite değerlerinin 2.00-203.50 cP aralığında değiştiği saptanırken, proteolitik aktivite değerlerinin ise 0.10 ile 0.61 (340 nm’de absorbens değeri) arasında değiştiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.26 incelendiğinde; 4°C’de depolanan sülter örneklerinin pH değerleri 5.00-6.60 arasında değişim gösterirken, 4°C’de depolanan sülter örneklerinde tespit edilen *Pseudomonas putida* sayıları ile *Pseudomonas putida* gh-1 bakteriyofajı titrelerinin sırasıyla 2.93-5.68 log kob/ml ve 5.08-8.70 log POB/ml arasında değiştiği belirlenmiştir. Sülter örneklerinin viskozite değerlerinin 2.00-90 cP aralığında değiştiği saptanırken, proteolitik aktivite değerlerinin ise 0.10 ile 0.61 (340 nm’de absorbens değeri) arasında değiştiği belirlenmiştir.

Yalnızca *Pseudomonas putida* bakterisinin aşılansarak 10°C’de ve 4°C’de depolanması sırasında elde edilen analiz verileri değerlendirildiğinde, bakteri sayısındaki artışa bağılı olarak proteolitik aktivitenin arttığı ve bu durum sonucunda viskozitenin de arttığı belirlenmiştir. Ayrıca bakteriyofaj tozu ile bakterinin aynı anda aşılansmasıyla sülterde bakteri gelişiminin engellendiği ve azalan bakteri sayısına paralel olarak sülter örneklerinin düşük proteolitik aktiviteyle birlikte düşük viskozite değerlerine sahip olduğu görülmüştür. Ancak sıvı bakteriyofaj çözeltisinin aşılansmasıyla hazırlanan sülter örneklerinde depolanmanın

48. saatinden itibaren bakteriyofaj canlılığının bir göstergesi olan faj titresinin azalmaya ve bakteri sayısının ise artmaya başladığı tespit edilmiştir. Toz bakteriyofaj örneklerinin süt örneklerine aşılınmasıyla ise bakteri sayısının artmadığı, bakteriyofajın depolama süresince etkili olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.25. Sıvı ve toz formlarda bakteriyofaj uygulaması yapılan/yapılmayan ve sonrasında 10°C’de depolanan sütlere ait pH, viskozite, proteolitik aktivite değerleri ve bakteri sayısı ile bakteriyofaj titresi

Örnek	Depolama zamanı (saat)	pH	Viskozite (cP)	Proteolitik aktivite (340 nm’de absorbens değeri)	<i>Pseudomonas putida</i> sayısı (log kob/ml)	<i>Pseudomonas putida</i> gh-1 bakteriyofaj titresi (log POB/ml)
A	0.	6.57±0.01	2.50±0.00	0.10±0.01	3.32±0.02	t.e.
	12.	6.33±0.03	7.87±0.88	0.24±0.01	5.33±0.03	t.e.
	24.	6.25±0.00	10.00±1.00	0.24±0.00	5.82±0.02	t.e.
	36.	6.05±0.02	14.50±4.50	0.28±0.00	6.56±0.01	t.e.
	48.	5.81±0.03	31.00±2.50	0.32±0.01	7.98±0.00	t.e.
	60.	5.51±0.05	54.00±3.50	0.36±0.00	8.73±0.02	t.e.
	72.	5.12±0.01	105.00±0.10	0.41±0.01	8.92±0.02	t.e.
B	0.	6.58±0.02	2.00±0.01	0.10±0.00	5.47±0.07	t.e.
	12.	6.19±0.01	3.25±0.25	0.15±0.02	6.46±0.10	t.e.
	24.	6.11±0.01	32.50±2.5	0.22±0.00	6.96±0.03	t.e.
	36.	6.15±0.01	49.25±0.75	0.29±0.00	7.45±0.05	t.e.
	48.	5.73±0.01	86.00±3.5	0.36±0.02	7.97±0.02	t.e.
	60.	5.38±0.02	170.00±0.00	0.43±0.01	8.63±0.09	t.e.
	72.	4.98±0.02	203.50±1.5	0.61±0.01	9.47±0.07	t.e.
C	0.	6.58±0.02	2.50±0.00	0.10±0.00	3.46±0.10	6.29±0.11
	12.	6.55±0.00	3.00±0.00	0.11±0.01	3.15±0.02	7.02±0.06
	24.	6.50±0.00	3.50±0.00	0.11±0.02	3.23±0.03	7.68±0.03
	36.	6.48±0.01	3.50±0.00	0.13±0.00	3.24±0.03	7.73±0.01
	48.	6.45±0.00	4.00±0.00	0.14±0.00	3.39±0.09	7.80±0.04
	60.	6.43±0.02	5.00±0.02	0.16±0.00	3.86±0.12	7.08±0.00
	72.	6.42±0.00	5.50±0.00	0.18±0.00	3.86±0.00	6.87±0.03
D	0.	6.60±0.01	2.00±0.00	0.10±0.00	3.56±0.02	7.29±0.02
	12.	6.61±0.00	2.00±0.00	0.11±0.01	2.95±0.02	8.02±0.01
	24.	6.56±0.01	2.00±0.00	0.13±0.00	2.93±0.01	8.68±0.03
	36.	6.52±0.02	2.50±0.01	0.13±0.00	2.85±0.00	9.73±0.02
	48.	6.50±0.01	2.48±0.02	0.14±0.00	2.98±0.08	9.80±0.01
	60.	6.49±0.00	2.50±0.00	0.16±0.01	3.28±0.05	8.08±0.01
	72.	6.48±0.01	2.50±0.00	0.17±0.00	3.59±0.03	7.87±0.04
E	0.	6.60±0.02	2.50±0.00	0.10±0.00	4.96±0.02	6.48±0.02
	12.	6.60±0.03	2.50±0.01	0.10±0.01	4.63±0.01	6.99±0.01
	24.	6.54±0.01	2.50±0.01	0.13±0.00	3.95±0.01	7.33±0.18
	36.	6.51±0.02	2.75±0.02	0.15±0.00	3.24±0.01	8.72±0.08
	48.	6.50±0.02	3.25±0.03	0.15±0.02	2.89±0.03	8.66±0.03
	60.	6.50±0.01	3.50±0.05	0.18±0.01	3.10±0.01	7.04±0.09
	72.	6.50±0.02	3.50±0.02	0.18±0.01	3.34±0.02	6.93±0.02
F	0.	6.65±0.00	2.00±0.00	0.10±0.00	5.65±0.09	8.28±0.05
	12.	6.60±0.00	2.00±0.00	0.10±0.01	4.50±0.50	9.47±0.47
	24.	6.59±0.00	2.50±0.00	0.15±0.00	3.59±0.46	8.99±0.18
	36.	6.55±0.00	2.50±0.00	0.17±0.02	3.14±0.00	8.78±0.04
	48.	6.53±0.00	2.50±0.00	0.17±0.00	3.88±0.04	8.70±0.19
	60.	6.50±0.00	2.50±0.00	0.18±0.00	3.90±0.02	7.36±0.36
	72.	6.50±0.00	2.50±0.00	0.19±0.00	4.01±0.02	6.89±0.04

Çizelge 4.25.'in devamı

G	0.	6.64±0.04	2.50±0.00	0.10±0.00	3.55±0.01	5.29±0.00
	12.	6.63±0.00	3.00±0.00	0.14±0.01	3.18±0.01	6.52±0.56
	24.	6.52±0.00	6.50±2.25	0.19±0.00	3.22±0.00	7.73±0.11
	36.	6.47±0.02	11.25±1.25	0.22±0.00	3.29±0.00	6.80±0.04
	48.	6.33±0.01	18.75±0.00	0.27±0.01	3.43±0.02	6.76±0.00
	60.	6.20±0.00	20.00±0.00	0.29±0.00	3.69±0.09	6.37±0.53
	72.	6.11±0.01	33.50±1.50	0.30±0.00	4.36±0.50	6.08±0.00
H	0.	6.60±0.2	2.00±0.00	0.11±0.01	3.51±0.01	7.42±0.12
	12.	6.59±0.00	2.50±0.01	0.12±0.02	2.88±0.00	7.99±0.09
	24.	6.56±0.00	8.50±0.25	0.12±0.01	2.82±0.07	8.68±0.01
	36.	6.53±0.00	10.25±0.75	0.21±0.01	2.80±0.01	9.73±0.53
	48.	6.50±0.02	13.75±0.05	0.22±0.02	3.04±0.09	9.24±0.01
	60.	6.48±0.00	17.75±0.25	0.24±0.02	3.23±0.09	8.52±0.00
	72.	6.41±0.01	20.25±0.05	0.27±0.00	3.52±0.04	8.24±0.01
I	0.	6.65±0.02	2.50±0.25	0.10 ±0.00	5.72±0.02	6.46 ±0.06
	12.	6.60±0.00	3.25±0.25	0.12 ±0.01	4.14±0.04	6.95±0.05
	24.	6.59±0.00	6.25±20.00	0.14±0.00	3.86±0.16	7.75±0.02
	36.	6.55±0.00	10.00±1.25	0.18±0.00	3.25±0.04	8.72±0.02
	48.	6.53±0.01	15.00±0.01	0.20±0.01	2.99±0.00	8.57±0.21
	60.	6.50±0.00	22.75±2.25	0.25±0.02	3.57±0.02	7.28±0.02
	72.	6.50±0.08	29.25±0.75	0.31±0.01	3.74±0.00	6.80±0.01
J	0.	6.65±0.00	2.00±0.00	0.10±0.00	5.65 ± 0.03	8.21±0.07
	12.	6.60±0.01	2.00±0.00	0.11±0.01	4.00 ±0.02	9.95±0.02
	24.	6.62±0.02	2.50±0.00	0.13±0.01	3.75 ±0.03	9.30±0.00
	36.	6.59±0.00	2.50±0.00	0.15±0.02	3.08 ±0.01	8.80±0.01
	48.	6.55±0.01	3.50±0.01	0.17±0.02	2.68 ±0.01	8.71±0.13
	60.	6.53±0.01	6.75±0.02	0.18±0.01	3.81 ±0.00	7.30±0.22
	72.	6.50±0.01	7.50±0.02	0.19±0.01	3.89 ±0.04	6.77±0.04

Çizelge 4.26. Sıvı ve toz formlarda bakteriyofaj uygulaması yapılan/yapılmayan ve sonrasında 4°C’de depolanan sütlere ait pH, viskozite, proteolitik aktivite değerleri ve bakteri sayısı ile bakteriyofaj titresi

Örnek	Depolama zamanı (saat)	pH	Viskozite (cP)	Proteolitik aktivite (340 nm’de absorbans değeri)	<i>Pseudomonas putida</i> sayısı (log kob/ml)	<i>Pseudomonas putida</i> gh-1 bakteriyofaj titresi (log POB/ml)
K	0.	6.57±0.01	2.50 ±0.02	0.11±0.01	3.30±0.03	t.e.
	12.	6.45±0.00	3.00±0.00	0.13±0.00	4.33±0.02	t.e.
	24.	6.24±0.00	5.50±0.00	0.16±0.01	4.86±0.02	t.e.
	36.	6.24±0.01	11.75±0.00	0.18±0.01	5.02±0.03	t.e.
	48.	6.10±0.00	16.25±1.25	0.21±0.00	5.56±0.09	t.e.
	60.	6.04±0.01	18.00±1.00	0.23±0.00	6.98±0.00	t.e.
	72.	5.83±0.02	22.50±0.50	0.27±0.01	7.73±0.01	t.e.
L	0.	6.60±0.01	3.50±0.01	0.13±0.01	5.30±0.01	t.e.
	12.	6.43±0.01	4.00±0.01	0.14±0.03	5.38±0.05	t.e.
	24.	6.06±0.01	15.75±0.04	0.29±0.02	6.00±0.10	t.e.
	36.	5.79±0.01	21.00±0.01	0.33±0.03	6.73±0.20	t.e.
	48.	5.43±0.02	32.00±0.03	0.42±0.02	7.35±0.03	t.e.
	60.	5.20±0.00	66.50±0.01	0.48±0.03	7.54±0.05	t.e.
	72.	5.00±0.01	90.00±0.01	0.50±0.00	8.54±0.05	t.e.
M	0.	6.61±0.00	2.50±0.02	0.11±0.01	3.39±0.09	6.24±0.02
	12.	6.57±0.00	3.00±0.02	0.11±0.01	3.16±0.10	6.02±0.02
	24.	6.51±0.00	0.12±0.00	3.24±0.01	5.68±0.08	5.68±0.03
	36.	6.48±0.00	3.00±0.00	0.14±0.01	3.25±0.05	5.73±0.04
	48.	6.43±0.00	3.50±0.00	0.14±0.01	3.39±0.09	5.80±0.05
	60.	6.42±0.00	4.00±0.00	0.16±0.02	3.88±0.08	5.08±0.5
	72.	6.42±0.00	5.50±0.00	0.17±0.00	3.92±0.00	4.87±0.00
N	0.	6.60±0.00	2.00±0.00	0.10±0.00	3.44±0.05	6.79±0.07
	12.	6.61±0.00	2.50±0.00	0.11±0.00	2.96±0.04	7.02±0.02
	24.	6.56±0.00	2.50±0.00	0.13±0.00	2.93±0.05	6.86±0.05
	36.	6.52±0.00	2.50±0.00	0.13±0.02	2.85±0.04	7.53±0.60
	48.	6.50±0.00	2.50±0.00	0.13±0.04	3.48±0.05	7.92±0.00
	60.	6.49±0.00	2.50±0.00	0.16±0.00	3.40±0.04	7.58±0.00
	72.	6.48±0.00	2.50±0.00	0.18±0.00	3.66±0.04	7.37±0.00
O	0.	6.60±0.00	2.50±0.00	0.10±0.00	5.46±0.00	6.38±0.03
	12.	6.60±0.00	2.50±0.00	0.10±0.00	4.13±0.00	6.93±0.04
	24.	6.57±0.00	2.50±0.00	0.11±0.00	3.93±0.00	7.71±0.00
	36.	6.54±0.00	2.50±0.00	0.12±0.00	3.24±0.00	8.68±0.50
	48.	6.51±0.00	2.75±0.00	0.15±0.00	2.92±0.00	8.60±0.40
	60.	6.50±0.00	3.25±0.00	0.15±0.00	3.60±0.00	7.13±0.12
	72.	6.50±0.00	3.50±0.00	0.18±0.00	3.84±0.00	6.87±0.00
P	0.	6.65±0.00	2.00±0.00	0.10±0.00	5.65±0.00	8.27±0.00
	12.	6.60±0.00	2.00±0.00	0.10±0.00	4.00±0.00	9.95±0.04
	24.	6.60±0.00	6.60±0.00	6.60±0.00	6.60±0.00	6.60±0.00
	36.	6.59±0.00	2.50±0.05	0.15±0.00	3.09±0.00	8.78±0.07
	48.	6.55±0.05	2.50±0.00	0.17±0.00	2.64±0.05	8.70±0.09
	60.	6.53±0.00	2.50±0.00	0.15±0.00	3.71±0.00	7.27±0.04
	72.	6.50±0.00	2.50±0.00	0.18±0.00	3.84±0.00	6.80±0.04

Çizelge4.26.'nın devamı

R	0.	6.64±0.05	2.50±0.00	0.10±0.05	3.55±0.05	5.29±0.04
	12.	6.63±0.04	3.00±0.00	0.13±0.00	3.57±0.01	6.52±0.04
	24.	6.52±0.20	3.00±0.00	0.16±0.00	3.23±0.01	6.71±0.00
	36.	6.47±0.00	3.00±0.00	0.19±0.00	3.29±0.01	6.73±0.05
	48.	6.33±0.00	14.00±0.00	0.22±0.00	3.43±0.05	5.80±0.09
	60.	6.20±0.00	18.50±0.00	0.26±0.05	3.69±0.01	5.58±0.11
	72.	6.11±0.00	26.50±0.00	0.29±0.00	4.36±0.01	5.37±0.00
S	0.	6.60±0.00	2.00±0.00	0.11±0.00	3.51±0.03	7.42±0.00
	12.	6.59±0.00	2.50±0.00	0.11±0.01	2.86±0.01	8.16±0.05
	24.	6.56±0.00	4.25±0.00	0.13±0.01	2.81±0.00	8.21±0.05
	36.	6.53±0.00	8.50±0.00	0.18±0.01	2.80±0.00	7.73±0.00
	48.	6.50±0.00	10.25±0.00	0.22±0.05	3.04±0.00	7.24±0.00
	60.	6.48±0.00	16.00±0.00	0.23±0.01	3.23±0.00	7.23±0.00
	72.	6.41±0.00	19.75±0.00	0.25±0.00	4.52±0.02	7.13±0.02
T	0.	6.60±0.00	2.50±0.00	0.10±0.00	5.72±0.00	6.46±0.00
	12.	6.29±0.00	3.25±0.00	0.12±0.00	4.14±0.00	6.95±0.00
	24.	6.57±0.00	6.25±0.02	0.14±0.00	3.86±0.00	7.75±0.00
	36.	6.54±0.00	10.00±0.00	0.18±0.00	3.25±0.02	8.72±0.02
	48.	6.51±0.00	15.00±0.00	0.20±0.00	2.99±0.02	8.57±0.02
	60.	6.50±0.00	22.75±0.00	0.25±0.00	3.57±0.00	7.28±0.00
	72.	6.50±0.00	29.25±0.02	0.31±0.00	3.74±0.00	6.80±0.00
U	0.	6.64±0.00	2.50±0.00	0.10±0.03	3.55±0.00	5.29±0.00
	12.	6.63±0.00	3.00±0.00	0.13±0.00	3.57±0.00	6.52±0.02
	24.	6.52±0.00	3.00±0.00	0.16±0.00	3.23±0.00	6.71±0.02
	36.	6.47±0.00	3.00±0.00	0.19±0.02	3.29±0.00	6.73±0.00
	48.	6.33±0.00	14.00±0.00	0.22±0.02	3.43±0.00	5.80±0.00
	60.	6.20±0.00	18.50±0.00	0.26±0.00	3.69±0.00	5.58±0.00
	72.	6.11±0.00	26.50±0.00	0.29±0.00	4.36±0.00	5.37±0.00

5. SONUÇLAR

Bu doktora tez çalışmasında, püskürtmeli kurutucu ile *Pseudomonas phage gh-1* (ATCC 12633-B1) bakteriyofajı farklı taşıyıcı materyaller kullanılarak kurutulmuş ve elde edilen bakteriyofaj tozunun model gıda olarak seçilen sütte psikrotrof bir bakteri olan *Pseudomonas putida* ATCC 12633'ün gelişmesini önlemede etkinliği araştırılmıştır. Kurutma işlemi, 3 bağımsız değişken (taşıyıcı materyaldeki maltodekstrin oranı, taşıyıcı materyaldeki peyniraltı suyu protein izolatu oranı ve kurutma çıkış sıcaklığı) kullanılarak bakteriyofaj titresinde en az kayıp olacak ve en yüksek çözünübilirlik değerleri elde edilecek şekilde optimize edilmiştir. Çalışmamız kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

Proteolitik aktiviteye sahip olduğu belirlenen *Pseudomonas putida* ATCC 12633'ün aşılandığı sütlerde bakteri gelişimine bağlı olarak depolama süresince pH değerinin azaldığı, proteolitik aktivite ve viskozite değerlerinin arttığı saptanmıştır. Bakteriyofaj tozlarının faj titreleri 7.24 ± 0.24 POB/ml ile 11.71 ± 0.09 POB/ml değerleri arasında değişim göstermiştir. En düşük faj titresi 60°C kurutma çıkış sıcaklığında ve yalnızca %9 oranında maltodekstrin içeren taşıyıcı materyal kullanılarak gerçekleştirilen üretimden elde edilen bakteriyofaj tozunda tespit edilmiştir. En yüksek faj titresi ise %9 maltodekstrin ve %6 peyniraltı suyu protein izolatından oluşan taşıyıcı materyalin kullanıldığı ve kurutma çıkış sıcaklığının 50°C olduğu şekilde gerçekleştirilen üretimden elde edilen bakteriyofaj tozlarında saptanmıştır.

Bakteriyofaj tozlarında en düşük çözünübilirlik değeri 60°C kurutma çıkış sıcaklığında ve %12 maltodekstrin ve %6 peyniraltı suyu protein izolatu içeren taşıyıcı materyal kullanılarak gerçekleştirilen üretimden elde edilen bakteriyofaj tozunda tespit edilmiştir. En yüksek çözünübilirlik değeri ise 50°C kurutma çıkış sıcaklığında ve %9 maltodekstrin ve %6 peyniraltı suyu protein izolatu içeren taşıyıcı materyal kullanılarak yapılan üretim sonucunda elde edilen bakteriyofaj tozunda saptanmıştır.

Optimizasyon çalışması sonucunda önerilen teorik koşullar deneysel olarak gerçekleştirilmeye çalışılmış ve optimum noktaların deneysel doğrulaması yapıldığında, teorik ve deneysel koşulların birbiri ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Optimum koşullarda üretilen bakteriyofaj tozları sahip oldukları faj canlılığının bir göstergesi olan faj titresi değerini depolama süresince korumuştur. Aynı koşullarda depolanan sıvı bakteriyofaj çözeltisinde depolamanın üçüncü ayında faj titresi tespit edilememiştir. Ayrıca sıvı ve toz bakteriyofajların bakteri aşılama süte uygulanması ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, toz forma sahip *Pseudomonas phage gh-1* uygulamasının *Pseudomonas putida* ATCC 12633'ün gelişmesini önlemesine bağlı olarak depolama süresince süt örneklerinin fizikokimyasal özelliklerinde önemli bir değişiklik tespit edilememiştir. Bununla birlikte sıvı formdaki *Pseudomonas phage gh-1* uygulamasının ise depolama süresince aktivitesini kaybettiği ve bunun sonucunda yeniden bakteri gelişimine olanak verebileceği sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda *Pseudomonas putida* bakteriyofajının bir optimizasyon çalışması ile püskürtmeli kurutucuda farklı taşıyıcı materyaller kullanılarak kurutulması ve elde edilen bakteriyofaj tozunun özelliklerinin belirlenip model gıda olarak seçilen sütte *Pseudomonas putida*'ya karşı antimikrobiyal etkinliğinin ortaya konulması hedeflenmiş ve bu hedefe ulaşıldığı değerlendirilmiştir. Bu çalışma sonucunda; sıvı ve toz formlardaki bakteriyofaj preparatlarının süte eklenmesinin, üretmiş oldukları ısıl işleme dirençli proteolitik enzimlerle içme sütlerinde jelleşmeye neden olabilen *Pseudomonas* cinsine ait bakterilerin gelişmesini önleyebileceği düşünülmektedir. Böylelikle bu araştırma sonucunda, içme sütlerinde en önemli sorunlardan biri olan jelleşmenin önüne geçilmesi ile ilgili olarak yeni bir yaklaşım ortaya konulmuştur. Ayrıca bundan sonraki araştırmalarda farklı psikrotrof bakterilerin bakteriyofajlarını içeren kokteyl bakteriyofaj tozların üretimi ve etkinliği üzerinde çalışılmasının süt sektörünün yaşadığı jelleşme sorunun çözümüne katkı sağlayabileceği değerlendirilmiştir.



6. KAYNAKLAR

- Acordi Menezes, L.A., Matias de Almeida, C.A., Mattarugo, N.M.D.S., Ferri, E.A. V., Bittencourt, P.R.S., Colla, E., Drunkler, D.A. 2018. Soy extract and maltodextrin as microencapsulating agents for *Lactobacillus acidophilus*: a model approach. *Journal of Microencapsulation*, 35(7-8):705-719.
- Anonim 1: Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği. 2000. Tebliğ No: 2000/6. [Son erişim tarihi: 08.07.2024]
- Anonim 2: Hayvansal Gıdalar İçin Özel Hijyen Kuralları Yönetmeliği. 2011. Resmî Gazete Sayı: 28155 [Son erişim tarihi: 08.07.2024]
- Anonim. 1995. TS 8189 Sütte Yağ Tayini-Gerber Metodu Standardı. Türk Standartları Enstitüsü, 10 ss, Ankara.
- Anonim. 2002. TS 1018 İnek Sütü-Çiğ Standardı. Türk Standartları Enstitüsü, 14 ss, Ankara.
- Aloğlu, H. Ş., & Öner, Z. (2010). Peyniraltı suyu proteinlerinin mikroenkapsülasyon teknolojisinde kaplama materyali olarak kullanım olanakları. *Akademik Gıda*, 8(3), 38-42.
- Ateba, C.N., Akindolire, M.A. 2019. Isolation and characterisation of bacteriophages with lytic activity against virulent *Escherichia coli* O157: H7: Potential bio-control agents. *Preprints*, 20191.0132.v1
- Bao, H., Zhang, H., Wang, R. 2011. Isolation and characterization of bacteriophages of *Salmonella enterica* serovar pullorum. *Poultry Science*, 90(10): 2370-2377.
- Behboudi-Jobbehdar, S., Soukoulis, C., Yonekura, L., Fisk, I. 2013. Optimization of spray-drying process conditions for the production of maximally viable microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. *Drying Technology*, 31(11):1274-1283.
- Bendicho, S., Marti, G., Hernández, T., Martin, O. 2002. Determination of proteolytic activity in different milk systems. *Food Chemistry*, 79 (2): 245-249.
- Capodifoglio, E., Vidal, A.M.C., Lima, J.A.S., Bortoletto, F., D'Abreu, L.F., Gonçalves, A.C.S., Vaz, A.C.N., de Carvalho Balieiro, J.C., Netto, A.S. 2016. Lipolytic and proteolytic activity of *Pseudomonas* spp. isolated during milking and storage of refrigerated raw milk. *Journal of Dairy Science*, 99 (7): 5214-5223.
- Carrigy, N.B. 2019. Engineering stable bacteriophage dosage forms active against antibiotic-resistant bacteria for respiratory delivery and food safety applications. Ph.D. thesis, Alberta University, Canada.

- Chang, R.Y.K., Wallin, M., Kutter, E., Morales, S., Britton, W., Li, J., Chan, H.-K. 2019. Storage stability of inhalable phage powders containing lactose at ambient conditions. *International Journal of Pharmaceutics*, 560:11-18.
- Chatain-Ly, M.H. 2014. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in Microbiology*, 5:51.
- Chávez, B.E., Ledebøer, A.M. 2007. Drying of probiotics: Optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying Technology*, 25(7-8):1193-1201.
- Choi, I., Lee, J.-S., Han, J. 2023. Maltodextrin-trehalose miscible system-based bacteriophage encapsulation: Studies of plasticizing effect on encapsulated phage activity and food application as an antimicrobial agent. *Food Control*, 146:109550.
- Choińska-Pulit, A., Mituła, P., Śliwka, P., Łaba, W., Skaradzińska, A. 2015. Bacteriophage encapsulation: Trends and potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, 45 (2): 212-221.
- Çaylak-Taş, T., Yuvalı Çelik, G., Onbaşılı, D. (2013). Investigation of proteolytic, lipolytic activities and antibiotics susceptibility of some *Pseudomonas* bacteria isolated from raw milks. *Türk Hij Den Biyol Derg*, 70, 147-152.
- Çelik, M.N., Vural, A., Erkan, M.E. 2019. Diyarbakır Yöresindeki Çiğ Koyun Sütlerinin Mikrobiyolojik, Fiziko-Kimyasal ve Organoleptik Özelliklerinin Araştırılması. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16 (3): 178-183.
- De Longhi, R., de Souza Correia, S., Bruzaroski, S.R., Poli-Frederico, R.C., Fagnani, R., de Santana, E.H.W. 2022. *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* from refrigerated raw milk: genetic diversity and lipoproteolytic activity. *Journal of Dairy Research*, 89 (1): 86-89.
- do Nascimento, E.C., Sabino, M.C., da Roza Corguinha, L., Targino, B.N., Lange, C.C., de Oliveira Pinto, C.L., de Faria Pinto, P., Vidigal, P.M.P., Sant'Ana, A.S., Hungaro, H.M. 2022. Lytic bacteriophages UFJF_PfDIW6 and UFJF_PfSW6 prevent *Pseudomonas fluorescens* growth in vitro and the proteolytic-caused spoilage of raw milk during chilled storage. *Food Microbiology*, 101:103892.
- Ecem, A., Yerlikaya, O., KINIK, Ö. 2014. Psikrotrof bakterilerin çiğ süt ve süt ürünleri kalitesine etkisi. *Akademik Gıda*, 12 (4): 68-78.
- Ergin, F. 2013. Farklı Sıcaklık-Süre Kombinasyonlarında Isıl Strese Maruz Bırakılan *L. acidophilus*'un Dondurma Üretiminde Kullanımının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Türkiye.

- Ergin, F. 2022. Effect of freeze drying, spray drying and electrospraying on the morphological, thermal, and structural properties of powders containing phage Felix O1 and activity of phage Felix O1 during storage. *Powder Technology*, 404:117516.
- Ergin, F., Atamer, Z., Göcer, E.M.C., Demir, M., Hinrichs, J., Kucukcetin, A. 2021. Optimization of Salmonella bacteriophage microencapsulation in alginate-caseinate formulation using vibrational nozzle technique. *Food Hydrocolloids*, 113:106456.
- Ergin, F., Gökçe, Ö., Küçükçetin, A. 2019. UHT İçme Sütlerinde Jelleşme Sorunu: Çiğ Süt Özelliklerinin ve İşlem Değişkenlerinin Etkisi. *Akademik Gıda*, 17 (4): 517-525.
- Ergin, F.ve Küçükçetin, A. 2018. UHT İçme Sütlerinde Jelleşme Sorunu: Enzimlerin Etkisi. *Akademik Gıda*, 16 (3): 313-322.
- Ergin, F., Yıldız, G., Göcer, E.M.Ç., Küçükçetin, A. 2017. Bakteriyofajların antibakteriyel ajan olarak kullanımı. *Akademik Gıda*, 15 (2): 172-181.
- Fanelli, F., Caputo, L., Quintieri, L. 2021. Phenotypic and genomic characterization of *Pseudomonas putida* ITEM 17297 spoiler of fresh vegetables: Focus on biofilm and antibiotic resistance interaction. *Current Research in Food Science*, 4:74-82.
- Fernández, L., Gutiérrez, D., García, P., Rodríguez, A. 2019. The perfect bacteriophage for therapeutic applications—a quick guide. *Antibiotics*, 8 (3): 126.
- Fuchs, M., Turchiuli, C., Bohin, M., Cuvelier, M.E., Ordonnaud, C., Peyrat-Maillard, M.N., Dumoulin, E. 2006. Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration. *Journal of Food Engineering*, 75(1): 27-35.
- Gomez-Mascaraque, L.G., Morfin, R.C., Pérez-Masiá, R., Sanchez, G., Lopez-rubio, A., 2016. Optimization of electrospraying conditions for the microencapsulation of probiotics and evaluation of their resistance during storage and in-vitro digestion. *LWT-Food Science and Technology*, 69:438-446.
- Hızlısoy, H. 2018. Sütte antibiyotik kalıntı durumunun incelenmesi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15 (2): 169-178.
- Hu, Z., Meng, X.-C., Liu, F. 2016. Isolation and characterisation of lytic bacteriophages against *Pseudomonas* spp., a novel biological intervention for preventing spoilage of raw milk. *International Dairy Journal*, 55:72-78.
- Hussain, M.A., Liu, H., Wang, Q., Zhong, F., Guo, Q., Balamurugan, S. 2017. Use of encapsulated bacteriophages to enhance farm to fork food safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57 (13): 2801-2810.

- Jończyk-Matysiak, E., Łodej, N., Kula, D., Owczarek, B., Orwat, F., Międzybrodzki, R., Neuberg, J., Bagińska, N., Weber-Dąbrowska, B., Górski, A. 2019. Factors determining phage stability/activity: challenges in practical phage application. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 17 (8): 583-606.
- Júnior, J.R., De Oliveira, A., Silva, F.d.G., Tamanini, R., de Oliveira, A., Beloti, V. 2018. The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *Journal of Dairy Science*, 101 (1): 75-83.
- Kumaresan, G., Annalvilli, R., Sivakumar, K. 2007. Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of storage. *Journal of Applied Science Research*, 3:1383-1387.
- Kurt, A., Cakmakci, S., Caglar, A. 1993. Sut ve mamulleri muayene ve analiz metotları rehberi. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, 18:1-238.
- Küçükdoğan, Y., Bayrak, R., Esmer, E., Başaran, P. (2021). Gıda teknolojilerinde inovatif bir yaklaşım olarak “Bakteriyofajlar”. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (27), 6-16.
- Laokuldilok, T., Kanha, N. 2015. “Effects of processing conditions on powder properties of black glutinous rice (*Oryza sativa* L.) bran anthocyanins produced by spray drying and freeze drying.”, *LWT-Food Science and Technology*, 64(1):405-411.
- Le Nguyen, D.D., Te Do, H., Luong, T.P.L. 2020. Proteolytic and lipolytic activities of *Pseudomonas* spp. isolated from raw milk in Mekong Delta-Vietnam. *Chemical Engineering Transactions*, 78:517-522.
- Leung, S.S., Parumasivam, T., Nguyen, A., Gengenbach, T., Carter, E.A., Carrigy, N.B., Chan, H.K. 2018. Effect of storage temperature on the stability of spray dried bacteriophage powders. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 127:213-222.
- Martins, E., Cnossen, D.C., Silva, C.R.J., Junior, J.C., Nero, L.A., Perrone, I.T., Carvalho, A.F. 2019. Determination of ideal water activity and powder temperature after spray drying to reduce *Lactococcus lactis* cell viability loss. *Journal of Dairy Science*, 102(7):6013-6022.
- Mainville, I., Montpetit, D., Durand, N., Farnworth, E.R. 2001. Deactivating the bacteria and yeast in kefir using heat treatment, irradiation and high pressure. *International Dairy Journal*, 11 (1-2): 45-49.
- Malik, D.J. 2021. Bacteriophage encapsulation using spray drying for phage therapy. *Current Issues in Molecular Biology*, 40 (1): 303-316.
- Meng, L., Zhang, Y., Liu, H., Zhao, S., Wang, J., Zheng, N. 2017. Characterization of *Pseudomonas* spp. and associated proteolytic

- properties in raw milk stored at low temperatures. *Frontiers in Microbiology*, 8:2158.
- Meng, L., Liu, H., Lan, T., Dong, L., Hu, H., Zhao, S., Zhang, Y., Zheng, N., Wang, J. 2020. Antibiotic resistance patterns of *Pseudomonas* spp. isolated from raw milk revealed by whole genome sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 11:1005.
- Munna, M.S., Zeba, Z., Noor, R. 2015. Influence of temperature on the growth of *Pseudomonas putida*. *Stamford Journal of Microbiology*, 5 (1): 9-12.
- Narvhus, J.A., Bækkelund, O.N., Tidemann, E.M., Østlie, H.M., Abrahamsen, R.K. 2021. Isolates of *Pseudomonas* spp. from cold-stored raw milk show variation in proteolytic and lipolytic properties. *International Dairy Journal*, 123:105049.
- Nicodème, M., Grill, J.P., Humbert, G., Gaillard, J.L. 2005. Extracellular protease activity of different *Pseudomonas* strains: dependence of proteolytic activity on culture conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 99 (3): 641-648.
- Okuno, N., Freire, I., Silva, C., Marin, V. 2021. *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas* spp. isolated from fresh Minas cheeses in Rio de Janeiro. *Revista De Ciência Veterinária E Saúde Pública*, 8 (1): 012-027.
- Öztürk, S., Çakır, İ. (2015). Mikroorganizma kültürlerinin korunmasında kullanılan kurutma yöntemleri. *Akademik Gıda*, 13(1), 94-100.
- Özkan Güner, K. 2017. Fındık hammaddesinde püskürtmeli kurutma ve dondurarak kurutma yöntemleri ile fındık sütü tozu eldesi ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Sebahattin Zaim Üniversitesi, İstanbul.
- Patel, N., Kumar, R., Savalia, C., Desai, D., Kalyani, I. 2020. Dietary exposure and risk assessment of antibiotics residues in marketed bovine raw milk. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 8(4): 1823-1827
- Phongtang, W., Choi, G.-P., Chukeatirote, E., Ahn, J. 2019. Bacteriophage control of *Salmonella Typhimurium* in milk. *Food Science and Biotechnology*, 28 (1): 297-301.
- Rezvankhah, A., Emam-Djomeh, Z., Askari, G. 2020. Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: A review. *Drying Technology*, 38 (1-2): 235-258.
- Ribeiro Júnior, J.C., Teider Junior, P.I., Oliveira, A.L., Rios, E.A., Tamanini, R., Beloti, V. 2018. Proteolytic and lipolytic potential of *Pseudomonas* spp. from goat and bovine raw milk. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38:1577-1583.

- Rodríguez-Hernández, G., González-García, R., Grajales-Lagunes, A., Ruiz-Cabrera*, M. and Abud-Archila, M. 2005. Spray-drying of cactus pear juice (*Opuntia streptacantha*): Effect on the physicochemical properties of powder and reconstituted product. *Drying Technol.*, 23 (4): 955-973.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 2001. *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarhan, W.A., Azzazy, H.M. 2015. Phage approved in food, why not as a therapeutic? *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 13 (1): 91-101.
- Saygılı, D., Karagözlü, C. (2017). Bacteriophage encapsulation and potential applications, 42(1):58-66.
- Stoeckel, M., Lidolt, M., Achberger, V., Glück, C., Krewinkel, M., Stressler, T., von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S., Fischer, L. 2016. Growth of *Pseudomonas weihenstephanensis*, *Pseudomonas proteolytica* and *Pseudomonas* sp. in raw milk: Impact of residual heat-stable enzyme activity on stability of UHT milk during shelf-life. *International Dairy Journal*, 59:20-28.
- Tabare, E., Glonti, T., Cochez, C., Ngassam, C., Pirnay, J.-P., Amighi, K., Goole, J. 2021. A Design of Experiment Approach to Optimize Spray-Dried Powders Containing *Pseudomonas aeruginosa* Podoviridae and Myoviridae Bacteriophages. *Viruses*, 13 (10): 1926.
- Tanaka, C., Yamada, K., Takeuchi, H., Inokuchi, Y., Kashiwagi, A., Toba, T. 2018. A lytic bacteriophage for controlling *Pseudomonas lactis* in raw cow's milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 84 (18): e00111-00118.
- Tang, Z., Huang, X., Sabour, P.M., Chambers, J.R., Wang, Q. 2015. Preparation and characterization of dry powder bacteriophage K for intestinal delivery through oral administration. *LWT-Food Science and Technology*, 60 (1): 263-270.
- Teh, K.H., Flint, S., Palmer, J., Lindsay, D., Andrewes, P., Bremer, P. 2011. Thermo-resistant enzyme-producing bacteria isolated from the internal surfaces of raw milk tankers. *International Dairy Journal*, 21 (10): 742-747.
- Temelli, S., Çetin, E. 2011. Gıdalarda patojen kontrolünde bakteriyofaj kullanımı. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 30 (2): 45-52.
- Türker, İ., Koç, B., İşleroğlu, H. (2018). püskürtmeli-dondurarak kurutma işleminin maltodekstrinin fiziksel özellikleri üzerine etkisi. *GIDA/The Journal of FOOD*, 43(2).

- Tontul, İ., Ergin, F., Eroğlu, E., Küçükçetin, A., Topuz, A. 2018. Physical and microbiological properties of yoghurt powder produced by refractance window drying. *International Dairy Journal*, 85:169-176
- Vonasek, E., Le, P., Nitin, N. 2014. Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release. *Food Hydrocolloids*, 37:7-13.
- Yang, Y., Shen, W., Zhong, Q., Chen, Q., He, X., Baker, J. L., Le, S. (2020). Development of a bacteriophage cocktail to constrain the emergence of phage-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*, 11, 327.
- Yangılar, F., Kaçar, M. (2020). Yetersiz ve Dengesiz Beslenmeyle İlişkili Sağlık Sorunları, Gıda Endüstrisindeki Teknolojik Uygulamalar ve Öneriler. *Türkiye Sağlık Bilimleri ve Araştırmaları Dergisi*, 3(2), 61-74.
- Yuan, Y., Liu, S., Zhang, J., Zhang, Y., Dong, C., Lin, L. (2018). Unsupervised image super-resolution using cycle-in-cycle generative adversarial networks. In *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition workshops* (pp. 701-710).
- Zhang, Y., Zhang, H., Ghosh, D. 2020. The stabilizing excipients in dry state therapeutic phage formulations. *AAPS Pharmaceutical Science and Technology*, 21:1-14.
- Witthuhn, R., Schoeman, T., Cilliers, A., Britz, T. 2005. Impact of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of Kefir grains. *Food Microbiology*, 22 (4): 337-344.

ÖZGEÇMİŞ

MERVE AL

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi
2018-2024	Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2015-2018	Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2010-2015	Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1- Al M., Ersöz F., Özaktaş T., Özçelik A., Küçükçetin A., "Comparison of the effects of adding microbial transglutaminase to milk and ice cream mixture on the properties of ice cream", *International Journal of Dairy Technology*, vol.73, no.3, pp.578-584, 2020

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- Al M., Ergin F., Küçükçetin A. Effects of Using Transglutaminase on Physicochemical, Microbiological and Sensorial Properties of Non-fat Stirred Yoghurt. 3. Uluslararası Multidisipliner Doğa Bilimleri ve Mühendislik Kongresi, 7-8 Aralık 2023, Ankara, Türkiye.

2- Al M., Ergin F., Küçükçetin A. Determination of Physicochemical Properties of Ayran Produced from Different Milks. International Symposium on Advanced Engineering Technologies, 16 Haziran 2022, Kahramanmaraş, Türkiye.

3- AL, M. ve Küçükçetin, A. 2017. Transglutaminaz Enziminin Dondurma Üretiminde Kullanılması. İç Anadolu Bölgesi 3. Tarım ve Gıda Kongresi. 26-28 Ekim, Sivas, Türkiye

4- Küçükçetin, A., AL, M., Ergin, F. ve Çomak Göçer, E.M. 2016. Glikomannanların Özellikleri ve Gıda Endüstrisinde Kullanımı. 12. Gıda Kongresi. 5-7 Ekim, Edirne, Türkiye

