T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAKTERİYOFAJ K YÜKLÜ KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

Muhammed Ömercan ÖZLEYEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Danışman

Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI

Eş Danışman

Prof. Dr. Tülin ÖZBEK

Ağustos, 2024

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAKTERİYOFAJ K YÜKLÜ KİTOSAN NANOPARTİKÜLLERİNİN SENTEZİ ve KARAKTERİZASYONU

Muhammed Ömercan ÖZLEYEN tarafından hazırlanan tez çalışması 06.09.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI Yıldız Teknik Üniversitesi Danışman	Prof. Dr. Tülin ÖZBEK Yıldız Teknik Üniversitesi Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Burçak YAVUZ, Üye
Altınbaş Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Murat TOPUZĞULLARI sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Bakteriyofaj K Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Sentezi ve Karakterizasyonu" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Muhammed Ömercan ÖZLEYEN

İmza

TEŞEKKÜR

Araştırmamı Yıldız Teknik Üniversitesi'ndeki laboratuvarlarında yürütme olanağını bana sağlayan, yüksek lisans programım boyunca sağladığı her türlü kaynak, destek ve rehberliğini esirgemediği için danışmanım Doç. Dr. Murat TOPUOĞULLARI 'na;

Bu tezin özellikle deneysel kısımlarında tüm sorularıma sabırla cevap veren ve her aşamada destekleriyle bana yardımcı olan eş danışmanım Prof. Dr. Tülin ÖZBEK‘e;

Tez çalışmam boyunca, laboratuvar ortamında litik aktivite ölçümlerinin gerçekleştirilmesi ve fajların üretimi ile temininde büyük katkı sağlayan Yıldız Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden doktora öğrencisi Berna ERDOĞDU'ya içtenlikle teşekkür ederim. Kendisinin değerli yardımları ve uzmanlığı, bu çalışmanın tamamlanmasında büyük rol oynamıştır.

Tez çalışmam boyunca her türlü maddi ve manevi destekten dolayı sevgili aileme;

Bana her zaman güvenen ve her koşulda destek veren dostlarım Gülnur POSLU ve Elif DURASİ`ye teşekkür ederim.

Muhammed Ömercan ÖZLEYEN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ vi
KISALTMA LİSTESİ vii
ŞEKİL LİSTESİ viii
TABLO LİSTESİ ix
ÖZET x
ABSTRACT xii
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 3
1.3 Hipotez 3
2 GENEL BİLGİ 4
2.1 Bakteriyofajların Tanımı ve Tarihçesi 4
2.2 Erken Dönem Uygulamalar ve Araştırmalar 4
2.3 Fajların Sınıflandırılması ve Yapısı 5
2.4 Enfeksiyon ve Replikasyon Mekanizmaları 5
2.5 Bakteriyofajların Uygulamaları 6
2.6 Bakteriyofaj K 7
2.7 Kitosan 9
2.7.1 Kitosanın Kimyasal Yapısı ve Özellikleri…….. 9
2.7.2 Antimikrobiyal Özellikleri…… 10
2.7.3 Gıda Güvemliğinde Kullanımı……..11
2.7.4 Enkapsülasyon Özellikeri……..11
2.7.5 Bakteriyofajlar ile Etkileşimi…… 11
2.7.6 Karakterizasyon Teknikleri……...12
2.8 Enkapsülasyon 12
2.8.1 Enkapsülasyon Yöntemleri……... 13
2.8.2 Enkapsülasyonda Kitosanın Avantajları……... 18
2.8.3 Kitosanın Enkapsülasyonda Kullanılmasının Zorlukları…….. 18

2.9 Bakteriyofajları Enkapsüle Etmenin Avantajları 19
2.9.1 Bakteriyofajların Enkapsülasyonunun Dezavantajları……..20

3 MALZEME VE YÖNTEMLER 23

3.1 Kimyasal Malzemeler 23
3.2 Cihazlar 23
3.3 Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanması 24
3.4 Bakteriyofaj K Yüklü Kitosan Nanapartiküllerinin Sentezi 25
3.5 Karakterizasyon Teknikleri 27
3.5.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi Analizi……27
3.5.2 Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri……. 27
3.5.3 Bakteriyofaj K Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması……...27
3.5.5 Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması……..28
3.5.6 Litik Aktivites Yöntemiyle Bakteriyofaj K Miktarının Belirlenmesi...29
3.5.7 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi…… 30

4 BULGULAR 31

4.1 Boş Kitosan Partiküllerinin Sentezi ve Karakterizasyonu 31
4.2 Bakteriyofaj K Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Sentezi 33

5 SONUÇ 43

KAYNAKÇA 45

SİMGE LİSTESİ

°C	Derece Santigrat
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

g	Gram
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
nm	Nanometre
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
rpm	Dakikadaki Tur Sayısı

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Fajların sınıflandırılması 5

Şekil 2.2 Fajların Litik Döngüsü 6

Şekil 2.3 Bakteriyofaj K`nın elektron mikroskopu altındaki görüntüsü 8

Şekil 2.4 Staphylococcus aureus hücrelerine bağlanan fajların taramalı elektron mikrokopu altındaki görüntüleri 8

Şekil 2.5 Kitosanın kimyasal yapısı 10

Şekil 2.6 Enkapsülasyon teknikleri örnekleri 13

Şekil 2.7 İyonik jelleşme yönteminin şematik gösterimi 15

Şekil 3.1 Bakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartiküllerinin üretimi 27

Şekil 4.1 Np4 kodlu boş kitosan partikülünün boyut dağılımı 32

Şekil 4.2 Np11 kodlu bakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartiküllerinin boyut dağılımı 33

Şekil 4.3 Kitosan (siyah), liyofilize bakteriyofaj K (kırmızı)ve liyofilize Np11 (mavi) örneklerinin FTIR spektrumlarıBakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartiküllerinin FTIR spektrumları 35

Şekil 4.4 NP11 kodlu örneğin 50.000x (a) ve 100.000x (b) büyütmede alınan SEM görüntüleri 36

Şekil 4.5 NP11 kodlu örneğin 50.000x (a) ve 100.000x (b) büyütmede alınan SEM görüntüleri 37

Şekil 4.6 Bakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartikülünün kümülatif salım profili 38

Şekil 4.7 Bakteriyofak K yüklü kitosan nanopartikül üretimi sırasında enkapsüle olmayan bakteriyofajların *Staphylococcus aureus*`a karşı litik aktivite testi görselleri 39

Şekil 4.8 Salım çalışmasının ilk 3 saat aralığında alınan örneklerinin litik aktivite testi görselleri 39

Şekil 4.9 Salım çalışmasının 2. gününde alınan örneklerinin litik aktivite testi görselleri 40

Şekil 4.10 Salım çalışmasının 3., 4. ve 5. günlerinde alınan örneklerinin litik aktivite testi görselleri 41

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan kimyasal listesi 23

Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasal listesi 24

Tablo 3.3 Kitosan nanopartikül hazırlanması sırasında kullanılan malzemeler, konsantrasyonları ve çalışma şartları 25

Tablo 3.4 Bakteriyofaj K yüklü kitosan partiküllerinin sentezinde kullanılan kimyasal miktarları ve hacimleri 26

Tablo 4.5 Üretilen kitosan partiküllerinin hidrodinamik çap ve polidispersite değerleri 31

Tablo 4.6 Üretilen bakteriyofaj yüklü kitosan partiküllerinin hidrodinamik çap ve polidispersite değerleri 33

ÖZET

Bakteriyofaj K Yüklü Kitosan Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Muhammed Ömercan ÖZLEYEN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI

Eş-Danışman: Prof. Dr. Tülin ÖZBEK

Bakteriyofajlar, yalnızca belirli bakterilere karşı etkinlik gösteren ve bu bakterileri enfekte eden bir virüs sınıfıdır. Özellikle antibiyotiklere dirençli bakterilere karşı kullanılabilecek önemli bir alternatif olarak öne çıkmaktadır. Ancak, çevresel faktörlere bağlı olarak yapıları bozunabilmekte ve etkinlikleri azalabilmektedir. Bakteriyofajlar enkapsüle edilerek sıcaklık, tuzluluk, pH gibi çevresel stres faktörlerine karşı korunarak stabilitelerinin ve hedef patojenlere karşı etkinliklerinin artırılması amaçlanmaktadır. Bu işlem, fajların gıda ürünlerinde etkinliğini ve kararlılığını uzun süre koruyarak patojen kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır.

Çalışmamızda, *S. aureus*'a karşı etki gösteren bakteriyofaj K'nın kitosan ile enkapsülasyonu iyonik jelleşme yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve bu işlem sonrasında fajın ilgili bakteriye karşı etkinliği araştırılmıştır. Üretilen partiküler yapılar dinamik ışık saçılması spektroskopisi, FTIR spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskobu ile karakterize edilmiştir. Enkapsüle edilmiş fajların aktivitesini ölçmek için salım çalışması yapılmış ve belirli saat aralıklarında alınan örnekler UV spektroskopisi ile incelenmiştir. Ayrıca, salım örneklerinin litik aktivitelerini ölçmek için çift agar yöntemi kullanılmış ve oluşan plaklardan enkapsülasyon verimi incelenmiştir. Gerçekleştirilen çalışmalarda partiküllerin hidrodinamik çaplarının 300-550 nm arasında ve PDI değerinin 0.230 civarında olduğu belirlenmiştir. Salım örneklerinde 3., 4. ve 5. günlerde fajların litik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Bakteriyofaj K'nın kitosan ile enkapsülasyonu sonucunda gıda koruyucusu olarak kullanılabilecek yeni bir malzeme geliştirilmesi hedeflenen bu çalışmayla, bakteriyofajların etkinliğinin ve stabilitesinin enkapsülasyonla korunabileceği ortaya koyulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyofaj K, Enkapsülasyon, Gıda güvenliği, Kontrollü salım, Litik aktivite

ABSTRACT

Synthesis and Characterization of Chitosan Nanoparticles Loaded with Bacteriophage K

Muhammed Ömercan ÖZLEYEN

Department of Biotechnology

Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI

Co-supervisor: Prof. Dr. Tülin ÖZBEK

Bacteriophages are a class of viruses that specifically target and infect certain bacteria. They are emerging as a significant alternative to antibiotics, especially against antibiotic-resistant bacteria. However, their structure can degrade and their efficacy can diminish due to environmental factors. Encapsulating bacteriophages aims to protect them from environmental stressors such as temperature, salinity, and pH, thereby enhancing their stability and effectiveness against target pathogens. This process plays a crucial role in maintaining the efficacy and stability of phages over extended periods in food products, thus aiding in pathogen control.

In this study, we aimed to develop a new material that can be used as a food preservative by encapsulating bacteriophage K with chitosan using the Ionic gelation method. For characterization, we employed Zeta Sizer, FTIR analysis, and

SEM. To measure phage activity, a release study was conducted, where samples were taken at specific time intervals and their absorbance was measured at 280 nm. Additionally, the double agar layer method was used to assess lytic activity, examining encapsulation efficiency based on the plaques formed. The Zeta Sizer results indicated that the particle size ranged from 300-550 nm with a PDI around 0.230.

Our results suggest that encapsulating bacteriophage K with chitosan enhances its stability and efficacy, demonstrating the potential of this new material for use in food preservation. This study highlights the benefits of encapsulation in improving the effectiveness and stability of bacteriophages.

Keywords: Bacteriophage K, Controlled release, Encapsulation, Food safety, Lytic activity

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Bakteriyofajlar, özel olarak bakterileri enfekte eden ve spesifik bakterilere karşı litik aktivite gösteren virüslerdir. Özellikle antibiyotiklere dirençli bakterilere karşı mücadelede antibiyotiklere alternatif olabilecek yeni bir terapötik yaklaşım olarak dikkat çekmektedir [1]. Ancak, çeşitli çevresel faktörlere bağlı duyarlılıkları nedeniyle uygulamaları kısıtlanmaktadır. Bu faktörler, bakteriyofajların yapısını bozarak etkinliklerini azaltabilmektedir. Bu gibi istenmeyen etkileri minimuma indirmek için, bakteriyofajların enkapsülasyon yaklaşımı ile koruyucu bir matris içinde muhafaza edilmesi dikkat çeken bir yaklaşımdır [2].

Bu çalışmada, enkapsülasyon süreci, kitosan kullanılarak iyonik jelleşme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Kitinden türetilen bir biyopolimer olan kitosan, biyouyumluluk, biyobozunurluk ve antimikrobiyal özelliklere sahip ve bakteriyofajlar gibi hassas biyolojik materyallerin enkapsülasyonu için ideal bir biyopolimerdir [3].

Literatürdeki çalışmalar, bakteriyofajların alginat, polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) ve jelatin gibi çeşitli polimerler kullanılarak enkapsülasyonunu araştırmıştır. Bu çalışmalar, faj stabilitesini koruma ve kontrollü salım sağlama konusunda değişen derecelerde başarı göstermiştir. Örneğin, alginat ile enkapsüle edilen fajlar, asidik koşullarda daha uzun sürede hayatta kalma becerisi sergilediği gözlemlenmiştir, PLGA ise sürekli salım sağlamış ancak asidik mikroortamların faj canlılığını etkilemesi nedeniyle çeşitli dezavantajlar ortaya çıkmıştır. Diğer yaygın olarak kullanılan bir polimer olan jelatin, biyouyumluluğu ve stabil hidrojel yapıları oluşturma yeteneği ile fajları çevresel stresten korumada başarılı sonuçlar göstermiştir [4],[5].

Diğer bir çalışmada ise, lipid bazlı enkapsülasyon tekniklerinin kullanımı araştırılmıştır. Lipozomlar, bakteriyofajları enkapsüle etmek için kullanılmış, biyouyumlu ve biyobozunur bir bariyer sağlayarak fajların stabilitesini korumuş ve salımını kontrol etmiştir. Colom ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalar, lipozom ile enkapsüle edilen bakteriyofajların çeşitli muhafaza etme koşulları altında uzun süreler boyunca litik aktivitelerini koruyabildiklerini göstermiştir ki bu da onları terapötik uygulamalar için uygun birer materyal haline getirmektedir [6].

Ancak, bugüne kadar kitosan kullanılarak bakteriyofaj K'nın enkapsülasyonu üzerine bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma, literatürdeki bu boşluğu doldurmayı amaçlayarak, kitosan ile enkapsüle edilmiş bakteriyofaj K'nın potansiyel bir gıda koruyucusu olarak önerilmesini içeren yeni bir yaklaşımı temsil etmektedir.

Bu çalışmanın özgünlüğü, kitosan ile enkapsüle edilmiş bakteriyofaj K'nın özellikle süt ürünleri için gıda endüstrisinde potansiyel uygulanabilirliğinde yatmaktadır. Bu enkapsülasyon tekniğiyle, bakteriyofajın stabilitesinin ve etkinliğinin artacağı ve aynı zamanda gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatabilecek kontrollü bir salım mekanizması sunabileceği düşünülmüştür. Kitosanın doğal antimikrobiyal özellikleri, gıda kaynaklı patojenlere karşı ek bir koruma katmanı da sağlayabilecektir.

Ayrıca, kitosan kullanılarak gerçekleştirilen enkapsülasyon süreci, bakteriyofajların biyolojik aktivitesini korumaya yardımcı olan ılıman koşulları nedeniyle avantajlıdır. Bu durum, bakteriyofajların çeşitli ortamlarda pratik olarak uygulanabilmesi için özellikle önemlidir. Kitosanın biyouyumluluğu ve biyobozunurluğu, onu çevre dostu bir seçenek haline getirmekte ve sürdürülebilir ve güvenli gıda koruma yöntemlerine yönelik mevcut eğilimlerle uyumlu hale getirmektedir [7].

Bu çalışma, kitosanın bakteriyofaj enkapsülasyonu için kullanımı ve gıda güvenliği uygulamalarındaki potansiyelini vurgulamaktadır. Özellikle Türkiye'de bakteriyofajların enkapsülasyonuna odaklanan önceki bir çalışma bulunmadığı için, bu araştırma literatürde yeni ve özgün bir çalışma olarak karşımıza çıkmaktadır.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmanın amacı, bakteriyofaj K'nın kitosan ile enkapsülasyonunu gerçekleştirerek, bu yöntemle elde edilen enkapsüle edilmiş bakteriyofajların stabilitesini ve litik etkinliğini araştırmak ve böylece terapötik ve gıda güvenliği uygulamalarında uzun süreli etkinliklerinin korunması hedeflenmektedir.

Bu kapsamda, iyonik jelleşme yöntemi kullanılarak bakteriyofaj K'nın kitosan ile enkapsülasyonu yapılmış ve elde edilen partiküllerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, belirli zaman aralıklarında yapılan salım çalışmaları ile UV spektroskopisi ve çift agar yöntemleriyle faj aktivitesi ölçülmüştür.

1.3 Hipotez

Kitosan kullanılarak yapılan enkapsülasyonun, bakteriyofajları koruyarak onların çevresel stres faktörlerine karşı dayanıklılığını artırması beklenmektedir. Bu sayede, fajların gıda ürünlerinde ve diğer uygulama alanlarında daha uzun süre aktif kalmaları sağlanacaktır. Ayrıca, kitosan esaslı partiküllerden bakteriyofaj K uzun sürede salınacağı için etkinlik süres de arttırılmış olacaktır. İyonik jelleşme yöntemi ile elde edilen nano veya mikro partiküllerin optimal boyutlarda olması, yüksek enkapsülasyon verimliliği ile sonuçlanacak ve bakteriyofajların etkinliğini maksimize edecektir.

2
GENEL BİLGİ

2.1 Bakteriyofajların Tanımı ve Tarihçesi

Bakteriyofajlar, spesifik olarak bakterileri enfekte eden ve çoğalan virüslere verilen isimdir. Fajlar, kara, deniz ve insan bağırsakları da dahil olmak üzere çok çeşitli ekosistemlerin döngüsünde rol sahibi olan, Dünya üzerindeki en fazla sayıdaki ve çeşitteki organizmalardır. Fajlar, bakteriyel konaklarına karşı yüksek bir özgüllük sergileyerek mikrobiyal araştırma ve terapötik uygulamalarda değerli bir araç haline gelmiştir. Fajlar, sadece bakteriyel hücreleri enfekte etmek için spesifikleşmiş bir mekanizmaya sahip olan, ökaryotik hücreleri enfekte eden diğer virüslerden farklı biyolojik varlıklardır [8].

Bakteriyofajların keşfi 20. yüzyılın başlarında yapılmıştır. 1915'te İngiliz bakteriyolog Frederick Twort, keşfettiği organizmayı "bakteriyolitik bir ajan" olarak tanımladı. İki yıl sonra, Fransız-Kanadalı mikrobiyolog Félix d'Hérelle bağımsız olarak bu organizmaların ilk keşfini gerçekleştirdi ve onları bakteri yiyiciler anlamına gelen bakteriyofajlar olarak adlandırdı. D'Hérelle'nin çalışması, fajların varlığını kanıtlamakla kalmayıp aynı zamanda bakteri enfeksiyonlarına karşı yeni bir terapötik çalışmanın kapısını araladı [9]. Félix d'Hérelle'nin 1917'deki öncü çalışması, bakteriyofaj araştırmaları ve terapötik uygulamalar alanında temelleri atarak mikrobiyoloji alanına katkıda bulundu.

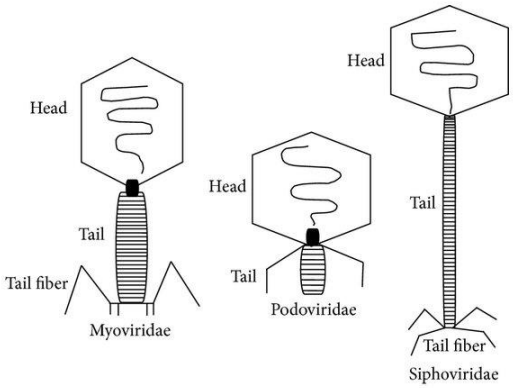
2.2 Erken Dönem Uygulamalar ve Araştırmalar

Bakteriyofajların keşfinden sonra, terapötik etkileri nedeniyle hızlıca benimsendi. 1920'ler ve 1930'larda, Fransa, Amerika Birleşik Devletleri ve Sovyetler Birliği başta olma üzere birçok ülke fajlar üzerine çalışmalara başladı. Bakteriyel dizanteri, kolera ve diğer enfeksiyonların tedavisinde başarılar kaydedildi. Ancak, 1940'larda

antibiyotiklerin keşfi ve yaygın kullanımı ile faj tedavisinin popülerliği sona erdi. Buna rağmen, Doğu Avrupa ve Sovyetler Birliği'nde, özellikle Gürcistan ve Polonya'da, faj araştırmaları ve uygulamaları uzun bir süre devam etti [10].

2.3 Fajların Sınıflandırılması ve Yapısı

Bakteriyofajlar, morfolojileri ve genetik materyallerine göre sınıflandırılır. Başlıca faj aileleri, kuyruk yapılarına göre ayırt edilen Myoviridae, Siphoviridae ve Podoviridae'dir (Şekil 2.1). Fajlar, tek veya çift zincirli olabilen DNA veya RNA genomlarına sahiptir. Bu genetik çeşitlilik ve yapısal farklılıklar, fajların farklı bakteriyel konaklara ve ortamlara uyum sağlamasına olanak tanır [11]. Ancak, 2023 yılında Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV) tarafından yapılan güncellemeyle birlikte, fajların sınıflandırılması yeniden düzenlenmiştir. Bu düzenlemeyle birlikte, fajlar artık daha detaylı genetik ve yapısal özelliklerine göre sınıflandırılmakta ve önceki üç ana gruptan daha fazla alt gruba ayrılmaktadır. Bu yeni sınıflandırma, fajların genetik çeşitliliğinin daha iyi anlaşılmasını ve farklı bakteriyel konaklarla olan ilişkilerinin daha doğru bir şekilde tanımlanmasını sağlamaktadır [96].

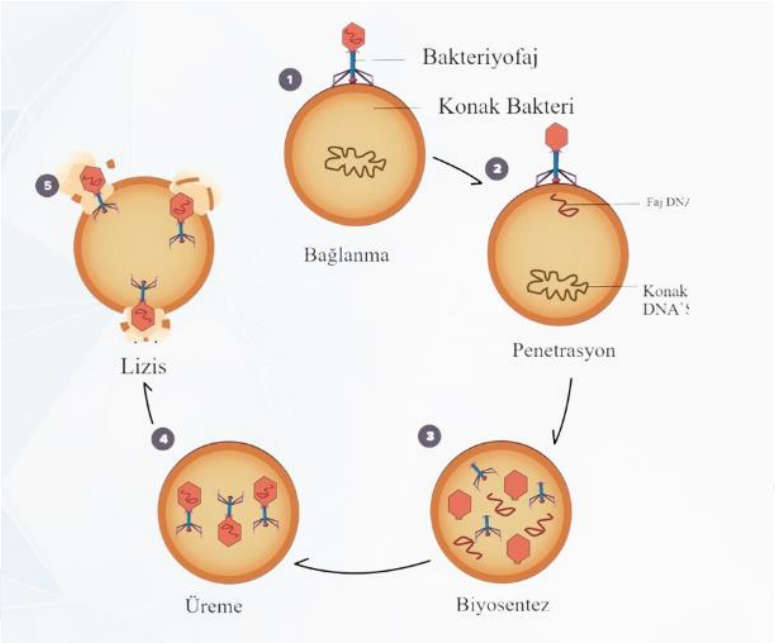


Şekil 2.1 Fajların sınıflandırılması[12]

2.4 Enfeksiyon ve Replikasyon Mekanizmaları

Fajların litik döngüsü birkaç kritik adım içerir (Şekil 2.2): bağlanma, penetrasyon, replikasyon, montaj ve salım. İlk olarak, faj spesifik reseptör bağlayıcı proteinler aracılığıyla bakteriyel hücre yüzeyine bağlanır. Ardından, fajın genetik materyali konak hücreye enjekte edilir. Konak hücrede, faj genomu bakteriyel hücreyi ele geçirerek yeni faj partikülleri üretmek için kullanılır. Bu süreç, konak hücrenin

yıkımıyla sonuçlanan litik bir döngüyü veya konak DNA'ya entegre olarak, zarar vermeden replike olan lizojenik bir döngüyü izler [13],[14].



Şekil 2.2 Fajların Litik Döngüsü[15]

Litik döngüde, fajlar konak hücreyi ele geçirerek yeni viryonlar üretir ve bu, bakteriyel hücrenin parçalanması (lizis) ve yeni faj partiküllerinin salımı ile sonuçlanır. Bu döngü, fajların hızlıca yayılmasını sağlar ve konak hücrenin ölümüne neden olur. Lizojenik döngüde ise, faj genomu konak bakteriyel genoma entegre olur ve uzun süreler boyunca uyku halinde inaktif olarak kalır. Faj DNA'sı, konak hücrenin DNA'sı ile birlikte konak hücreye zarar vermeden çoğalır. Çevresel etkiler, profajın litik döngüye girmesini ve yeni fajların üretilmesini sağlayarak konak hücrenin lizisine yol açabilir. Litik ve lizojenik döngüler fajların hayat döngüsünün parçalarını temsil eder [16].

2.5 Bakteriyofajların Uygulamaları

Bakteriyofajlar, özellikle antibiyotiklere karşı direnç geliştirmiş bakteri suşlarından kaynaklanan enfeksiyonların tedavisi için umut vadetmektedir. Faj tedavisi, spesifik fajların enfekte bir hastaya uygulanmasıyla patojenik bakterileri hedef alıp yok etmesini amaçlamaktadır. Bu yöntem, *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* gibi enfeksiyonların tedavisinde daha önce kullanılmıştır. Fajların bakteriyel konaklarına karşı spesifikliği, yararlı mikroflorayı zarara uğratma riskini azaltır ve olası yan etkileri en aza indirir [17].

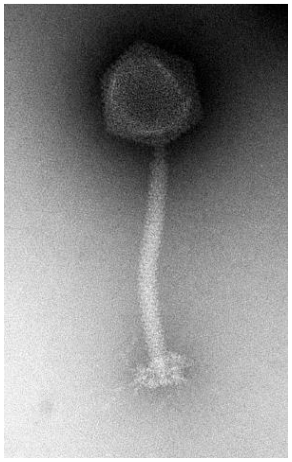
Bakteriyofajların tarım ve gıda güvenliği alanlarında kullanımı mevcuttur. Tarımda, fajlar bitkilerde ve hayvanlarda bakteriyel hastalıkları kontrol etmek için kullanılır. Kimyasal pestisitlere ve antibiyotiklere olan bağımlılığı azaltarak olası antibiyotiğe dirençli suşların oluşmasının önüne geçilmesi amaçlanmaktadır. Gıda endüstrisinde, fajlar bakteriyel kontaminasyonu kontrol etmeye yardımcı olur ve gıda ürünlerinin güvenliğini ve kalitesini arttırır. Faj bazlı biyokontrol yöntemleri, özellikle Salmonella, Listeria ve Campylobacter gibi gıdalarda üreyen patojenlere karşı etkilidir. Fajlar gıda ve tarım güvenliğinde doğal ve etkili bir çözüm yöntemi olarak öne çıkmaktadır [18].

Bakteriyofajlar, doğal ekosistemlerde bakteriyel popülasyonların düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Besin döngüsü, mikrobiyal çeşitlilik ve çevredeki bakteriyel patojenlerin kontrolüne önemli bir rol oynarlar. Fajlar, kara, su ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinde mikrobiyal toplulukların dinamiklerinde önemli bir role sahiptirler. Ekolojik etkilerini anlamak, çevresel patolojik dinamiklerini çözmede büyük önem taşımaktadır. Fajlar mikrobiyal popülasyon üzerinde belirleyici bir unsurdur [19],[20].

2.6 Bakteriyofaj K

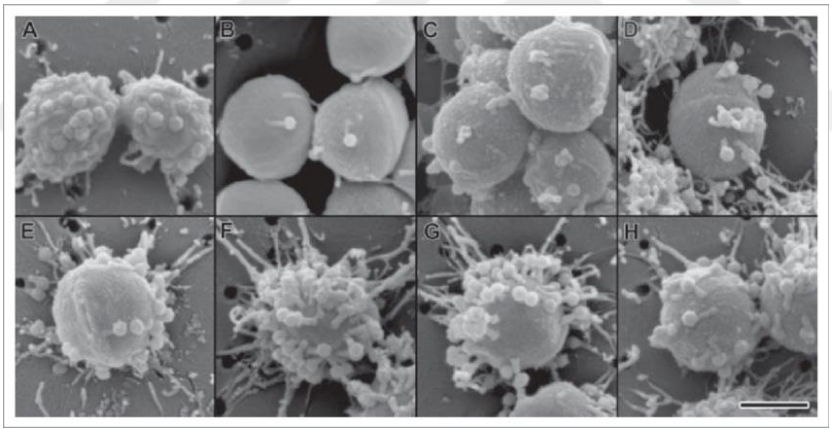
Birçok faj türü arasında, Bakteriyofaj K, faj tedavisi ve gıda güvenliği konusunda büyük bir potansiyele sahiptir. Bakteriyofaj K, insanlarda ve hayvanlarda çeşitli enfeksiyonlardan sorumlu olan yaygın bir patojen olan *Staphylococcus aureus*'u hedef alan litik bir faj türüdür [21].

Bakteriyofaj K, Myoviridae ailesinin bir üyesidir ve bir ikosahedral baş ve kontraktil bir kuyruktan oluşan tipik bir morfolojiye sahiptir (Şekil 2.3). Genomu, faj replikasyonu ve konak hücre lizisi için gerekli proteinleri kodlayan çift sarmallı DNA'dan oluşur [22].



Şekil 2.3 Bakteriyofaj K`nın elektron mikroskopu altındaki görüntüsü [23]

Bakteriyofaj K, bakteriyel konağını enfekte etmek için litik döngüyü takip eder. *Staphylococcus aureus*'un yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanır (Şekil 2.4), DNA'sını enjekte eder ve hızla bakteri hücresini ele geçirerek yeni faj partikülleri üretir. Bu süreç, bakteriyel hücrenin lizisi ile sonuçlanır ve yeni viryonların konak hücreden salınarak diğer bakteri hücrelerini enfekte etmesinin önünü açar [22].



Şekil 2.4 Staphylococcus aureus hücrelerine bağlanan fajların taramalı elektron mikrokopu altındaki görüntüleri[24]

Bakteriyofaj K, özellikle süt ürünleri endüstrisinde gıda güvenliği uygulamaları için geniş çapta incelenmiştir. *Staphylococcus aureus*'u hedef alma ve enfekte etme yeteneği, süt ürünlerinde bakteriyel kontaminasyonu önlemek ve kontrol etmek için ideal bir aday haline getirir. Faj K, çiğ süt, peynir ve diğer süt ürünlerinin güvenliğini sağlamak ve raf ömrünü uzatmak için kullanılabilir [25]. Bakteriyofaj K'nın *Staphylococcus aureus*'u hedef alma etkinliği, süt ürünlerinde gıda güvenliğini artırmak için değerli bir araç haline getirir.

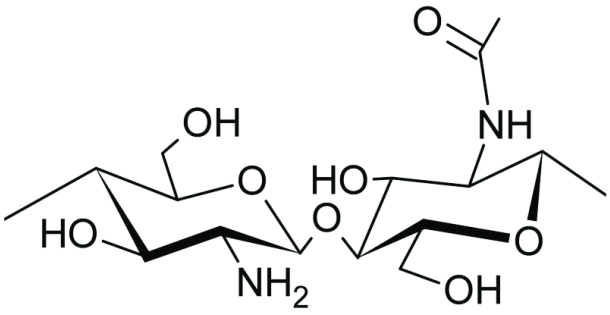
Devam eden araştırmalar, Bakteriyofaj K'nın çeşitli uygulamalardaki kullanımını optimize etmeyi amaçlamaktadır. Çalışmalar, faj formülasyonlarını daha etkin hale getirmeyi, faj-konak etkileşimlerini anlamayı ve bakteriyel direnci aşmak için stratejiler geliştirmeyi hedeflemektedir [26]. Faj K'nın antibiyotikler veya diğer fajlarla birlikte kullanıldığı kombinasyon tedavilerinde de yüksek bir potansiyel vadetmektedir

2.7 Kitosan

Kitosan, kitin'den üretilen bir biyopolimerdir ve keşfi 19. yüzyılın başlarına dayanır. Kitin ilk olarak 1811 yılında mantarlardan izole edilerek Fransız kimyager Henri Braconnot tarafından keşfedilmiştir. Braconnot'un keşfettiği bu yeni madde geleneksel çözücülere karşı dirençli olduğunun anlaşılmasıyla kısa zamanda ilgi çeken bir çalışma alanı haline gelmiştir. Kitosanın ilk karakterize edilmesi ise 1850 yılında Charles Rouget tarafından gerçekleştirilmiştir. Rouget, kitine alkalin ile bir işlem uygulayarak günümüzde kitosan olarak bilinen daha çözünebilir bir forma gelmesini sağlamıştır. Bu çalışma, kitosanın günümüzde çeşitli alanlarında kullanılabilen bir materyal haline gelmesinin başlangıç noktasıdır [27].

2.7.1 Kitosanın Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Kitosan, β-(1→4)-bağlı D-glukozamin ve N-asetil-D-glukozamin birimlerinden oluşan doğrusal bir polisakkarittir (Şekil 2.5). Deasetilasyon derecesi (DD), polimerdeki D-glukozamin birimlerinin yüzdesini ifade eder ve genellikle %70 ile %95 arasında değişir. DD değeri, kitosanın çözünürlüğünü, biyolojik aktivitesini ve mekanik özelliklerini belirlenmesindeki en öneli ölçüttür. Daha yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosan, asidik çözeltilerde daha iyi çözünürlük gösterir [28]. Bu da kitosanın film, lif ve nanopartikül gibi çeşitli formlarda işlenebilmesine olanak sağlar. Molekül ağırlığı ise kitosanın viskozitesini ve film oluşturma yeteneklerini üzerinde önemli bir etkendir ve uygulama alanları belirlenirken genellikle molekül ağırlığı dikkate alınır [29].



Şekil 2.1 Kitosanın kimyasal yapısı [30]

2.7.2 Antimikrobiyal Özellikleri

Kitosan bakteriler, mantarlar ve virüslere karşı yüksek bir antimikrobiyal aktivite gösterir. Bu özellik, büyük ölçüde, polikationik yapısından kaynaklanmaktadır, bu yapı negatif yüklü olan mikrobiyal hücre zarı ile etkileşime girerek hücre zarını bozar ve hücre içi organellerinin dışarı sızmasına yol açar. Bu antimikrobiyal aktivite, kitosanı gıda güvenliği, yara iyileşmesi ve su arıtma gibi uygulamalar için mükemmel bir aday yapar. Çalışmalar, kitosanın *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* gibi çok çeşitli patojenlerin büyümesini engelleyebileceğini göstermiştir [31],[32].

Kitosan, tıbbi ve farmasötik uygulamalar için temel şart olan biyouyumluluk ve biyobozunurluk açısından çok yüksek verime sahiptir. İnsan vücudu tarafından iyi tolere edilebilen ve toksik etki göstermeyen bir bileşiktir, sadece minimal dozda bağışıklık tepkilerine neden olur. Lizozim gibi enzimler, kitosanı toksik olmayan oligosakkaritler ve glukozaminlere kadar parçalayabilir ve bu bileşenler vücut tarafından doğal olarak metabolize edilip atılır. Bu biyobozunurluk, özellikle kitosanın vücut tarafından güvenli bir şekilde absorbe edilmesi veya atılması gerektiği uygulamalarda, örneğin ilaç taşıma sistemleri ve doku mühendisliği iskelelerinde, büyük önem taşır [33],[34].

Kitosanın film oluşturma yeteneği çeşitli endüstrilerde geniş çapta kullanılır. Bu filmler, oksijen ve neme karşı mükemmel bariyer özellikleri ile bilinir, bu da gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatabilir ve farmasötik ürünleri çevresel bozunmadan koruyabilir. Kitosan filmleri, ayrıca yara örtülerinde kullanılır ve enfeksiyonlara karşı koruyucu bir bariyer görevi görmesinin yanı sıra yara iyileşmesini hızlandırır [35]. Kitosan filmlerinin mekanik özellikleri, deasetilasyon derecesi ve molekül

ağırlığı ayarlanarak karakterize edilebilir, bu da esnek ambalajlardan sert biyomedikal implantlara kadar geniş bir uygulama alanına sahip olmasını sağlar.

2.7.3 Gıda Güvemliğinde Kullanımı

Gıda endüstrisinde, kitosan antimikrobiyal özellikleri nedeniyle doğal bir koruyucu olarak görev alır. Meyve, sebze, et ve deniz ürünlerinin üzerine kaplama olarak uygulanarak raf ömrünü uzatılmasına olanak sağlar ve mikrobiyal kontaminasyonu azaltır. Kitosan ayrıca, koruyucu özelliklerini geliştirmek amacı ile gıdalarda ambalaj malzemelerine de dahil edilebilir. Ek olarak, kitosanın ağır metaller ve pestisitlerle bağlanma ve bunları gıdalardan uzaklaştırma yeteneği olduğu keşfedilmiştir, bu da gıda güvenliğine katkı sağlamasına olanak sağlar [35],[36].

2.7.4 Enkapsülasyon Özellikeri

Kitosanın jel oluşturma ve biyoaktif bileşikleri enkapsüle etme özelliği, onu ilaç taşıma ve kontrollü salım sistemleri için mükemmel bir malzeme seçeneği olarak önümüze çıkartmaktadır. Enkapsülasyon, hassas bileşenleri çevresel etkilerden koruyan ve kontrollü salımına olanak tanıyan bir kitosan matrisi oluşturmayı hedeflemektedir. Bu özellik, stabilite ve hedeflenmiş bileşiğin ya da materyalin taşınımının önemli olduğu farmasötik uygulamalar için çok önemlidir. Örneğin, kitosan bazlı nanopartiküller; ilaçlar, proteinler ve nükleik asitleri enkapsüle etmek için yaygınca kullanılır ve bu terapötik ajanların vücutta belirli hedef bölgelere verimli bir şekilde taşınmasını sağlar [37].

2.7.5 Bakteriyofajlar ile Etkileşimi

Kitosanın pozitif yüklü olması, negatif yüklü bakteriyofajlarla etkili bir şekilde etkileşime girmesini sağlayarak onların enkapsüle edilmesi ve stabilizasyonunu kolaylaştırır. Bu etkileşim, bakteriyofajların hedef bölgelere ulaşmasına kolaylık sağlar, onları çevresel etkenlerden korur ve terapötik etkinliklerini arttırır. Kitosan ile enkapsüle edilmiş bakteriyofajlar, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde ve gıda güvenliğinin artırılmasında potansiyel bir yaklaşım alanıdır. Bu teknik, bakteriyofajları stabilize etmekle kalmaz, aynı zamanda kontrollü salımlarına olanak tanıyarak sürekli devam eden bir antimikrobiyal aktivite oluşmasını sağlar [38],[39].

2.7.6 Karakterizasyon Teknikleri

Kitosanın karakterizasyonu, molekül ağırlığını, deasetilasyon derecesini ve fizikokimyasal özelliklerini belirlemek için çeşitli analitik teknikler içerir. Fonksiyonel grupların tanımlanması için Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi, yapısal analiz için Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopisi ve molekül ağırlığı belirlenmesi için Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) en çok kullanılan teknikler arasındadır. Bu teknikler, çeşitli uygulamalarda kullanılan kitosanın kalitesini ve stabilizasyonunu sağlamak için gereklidir. Ayrıca, kristalin yapıyı ve termal özellikleri incelemek için X-ışını kırınımı (XRD) spektroskopisi ve diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) gibi diğer yöntemler de yaygınca kullanılır [40],[3].

2.8 Enkapsülasyon

Enkapsülasyon, hedef ajanları taşıyıcı bir malzeme içinde hapsedilmesini hedefleyen bir süreçtir ve birkaç 10 yıldır etkin olarak kullanılmaktadır. Enkapsülasyon teknikleri 20.yüzyılın başında keşfedilmeye başlanmıştır, Öncelikle çeşitli ilaçların stabilitesini korumak ve kontrollü salımını gerçekleştirmek amacı ile kullanılmıştır[41]. Zamanla bu teknoloji gelişmiş ve gıda güvenliği, biyoteknoloji ve tarım gibi çeşitli alanlarda uygulamayla başlanmıştır. Enkapsülasyonun temel prensibi, hassas bileşiklerin etrafında koruyucu bir bariyer oluşturarak

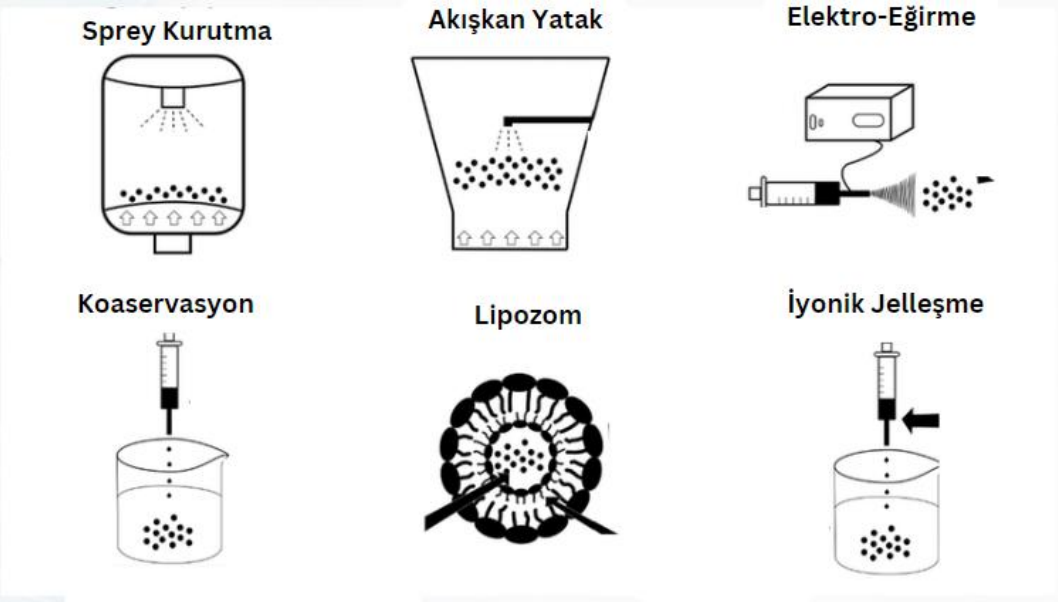
Enkapsülasyon teknikleriyle, aktif ajanların ışık, oksijen, nem ve sıcaklık gibi çevresel faktörlerden korunması hedeflenir ve birçok uygulamada kullanılır. Bu koruma ile, kapsüllenen bileşiklerin öngörülen raf ömrü boyunca stabil ve etkili kalması sağlanır. Örneğin, gıda endüstrisinde kapsülleme, gıda ürünlerinin tat, renk ve besin değerini korumaya yardımcı olur. İlaçlarda ise, ilaçların vücutta hedef bölgeye hassas bir şekilde teslim edilmesini sağlayarak yan etkileri azaltır ve tedavi sonuçlarını iyileştirir [41]. Ayrıca tarımda, böcek ilaçları ve gübrelerin kontrollü bir şekilde uygulanması sağlanır ve çevresel kirliliği azaltmak ile birlikte ürün verimini artırır.

Enkapsülasyon tekniklerini özel kılan yararlar ise, aktif ajanların stabilitesini ve salımını kontrol etme konusunda sağladığı çok yönlülük ve etkinliktir. Kontrollü

bir salım mekanizması yaratılmasını sağlayarak, aktif bileşiklerin optimal hızda ve istenilen hedef bölgede salımına olanak sağlar ve verimlerini arttırır. Bu teknoloji, çevresel faktörlerden kaynaklanan etkiler ile bozunabilecek hassas bileşikler için özellikle önemlidir [42]. Farklı uygulamalara ve malzemelere uygun hale getirilebilmesi, enkapsülasyonu birçok endüstride değerli bir araç haline getirir.

2.8.1 Enkapsülasyon Yöntemleri

Enkapsülasyon teknikleri çok çeşitli olmakla beraber her yöntem kendi içinde hedeflenen bileşik ve materyal özelinde önemli ve spesifiktir (Şekil 2.6). Her yöntemin kendi içinde avantajları ve dezavantajları bulunmakla birlikte, doğru yöntemin seçimi tamamen araştırmacının hedefine ve aktif ajanın türüne, bulunduğu çevre koşullarına göre değişiklik göstermektedir. Bu yöntemlerin bazıları; sprey kurutma, koaservasyon, dondurarak kurutma ve iyonik jelleşme yöntemleridir [43].



Şekil 2.1 Enkapsülasyon teknikleri örnekleri[44]

- Sprey Kurutma Yöntemi

Sprey kurutma, sıvı bir kaynağın ısıtılan bir gaz aracılığıyla hızlı bir şekilde kurutulması prensibine dayanan ve yaygın olarak kullanılan bir enkapsülasyon yöntemidir. Bu teknik, probiyotikler ve vitaminler gibi ısıya duyarlı bileşenler için özelleştirilmiş olarak kullanılır. Sprey kurutma, büyük ölçekli üretim için tercih edilen, kısmen daha az maliyetli ve ölçeklendirilebilir bir yöntem olarak karşımıza

çıkar. Ancak, yüksek sıcaklıklar hassas bileşikleri bozabilir ve biyolojik aktivitelerini azaltabilir [45].

Süreç, bir besleme çözeltisinin hazırlanması ile başlar, ardından bu sıvı bileşen ince damlacıklar halinde atomize edilir. Ardından bu oluşturulan damlacıklar, sıcak hava akımı ile hızla kurutularak kuru partiküller oluşması sağlanır. Enkapsüle edilen malzeme ince bir toz olarak mekanizmanın alt hazinesinden toplanır ve kolayca sıvı ortamlarda yeniden kullanılabilir [46].

Sprey kurutma, iyi akış özelliklerine sahip tozlar üretmek için özellikle yararlıdır ve bu tozlar çeşitli formülasyonlara kolayca kullanılabilir.

- Koaservasyon

Koaservasyon, polimer açısından zengin olan koaservatın, polimer açısından daha zayıf olan bir çözelti içinden faz ayrımı yapılması prensibine dayanır. Bu teknik, özellikle yağlar, aromatik bileşikler ve biyoaktif bileşiklerin enkapsülasyonu için kullanışlıdır. Koaservasyon süreci, aktif ajanın etrafında yarı geçirgen bir zar oluşturarak kontrollü salıma olanak tanır. Koaservasyon kullanılan bileşiklere göre kısmen basit ve komplike bir yöntem olabilir ve bir veya birden fazla polimer kullanılarak uygulanabilir. Sürecin karmaşıklığı kimi zaman zorlayıcı olabilir ve pH ve sıcaklık gibi çevresel koşullara duyarlılık, enkapsüle edilen ürünün stabilitesini etkileyebilir [47],[48]

Koaservasyon, yüksek verimlilikle geniş bir yelpazedeki maddelerin enkapsülasyonuna olanak tanır. Özellikle diğer tekniklerle enkapsülasyonu zor olan hidrofobik bileşiklerin enkapsülasyonunda kullanışlıdır.

- Dondurarak Kurutma (Liyofilizasyon)

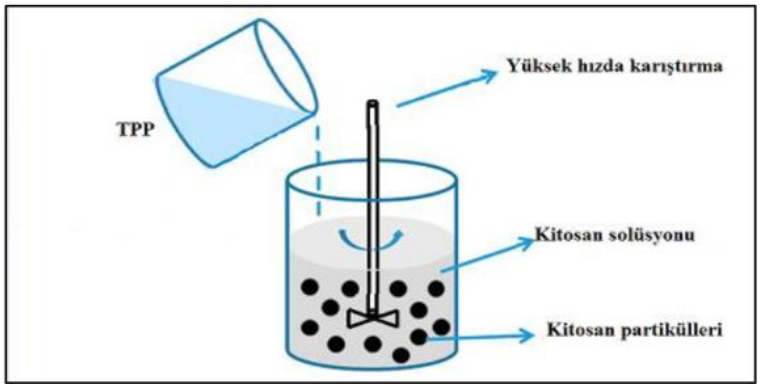
Dondurarak kurutma veya liyofilizasyon, ısıya duyarlı biyoaktif bileşiklerin yapısal bütünlüğünü ve aktivitesini korumayı amaçlayan bir kurutma sürecidir. Bu yöntem, malzemeyi dondurmayı ve ardından çevredeki basıncı düşürerek donmuş suyun süblimleşmesini sağlar. Dondurarak kurutma, biyoaktiviteyi korumada son derece etkilidir ve uzun süreli depolama gerektiren durumlar için mükemmel bir yöntemdir [49]. Ancak, nispeten pahalı ve zaman alıcıdır, bu da bazı uygulamalar için kullanımını sınırlayabilir.

Dondurarak kurutma, kolayca hidrasyon sağlayan gözenekli yapılar üretilmesini sağlar, bu da yeniden hidrasyonun gerekli olduğu uygulamalar için idealdir. Genellikle biyoaktivitenin uzun süreli depolama boyunca korunması gereken ilaçlar, probiyotikler ve gıda ürünleri için kullanılır.

- İyonik Jelleşme

Bu tez çalışmsında kullanılan iyonik jelleşme yöntemi, multivalent iyonların varlığında polielektrolitlerin jelleşmesini içeren hassas ve etkili bir enkapsülasyon yöntemidir. Biyouyumluluğu ve biyobozunurluğu korunmasının amaçlanması nedeniyle bu yöntemde yaygın olarak kullanılan katyonik bir polisakkarit olan kitosandır. Süreç tipik olarak, kitosan ve tripolifosfat (TPP) gibi bir karşı iyonik ajan arasındaki etkileşimi içerir ve bu yöntem ile hidrojel oluşması sağlanır [50].

İyonik jelleşme, hassas proteinler ve peptitlerin biyoaktivitesini koruyan hassas ve yüksek enkapsülasyon verimliliği sağlayan çeşitli ve avantajlı bir yöntemdir. Bu yöntem, terapötik proteinler, enzimler ve bakteriyofajların enkapsülasyonunu sağlanmasında oldukça kullanılışlıdır, ayrıca bozulmaya karşı koruma ve kontrollü salım imkânı sunar [51]. Enkapsüle edilen proteinler işlevselliklerini büyük ölçüde korur, bu da iyonik jelleşmeyi biyomedikal ve gıda uygulamaları için tercih edilen bir yöntem haline getirir. Ancak, yöntem yalnızca iyonik veya polielektrolit malzemelerin kullanımı ile sınırlıdır ve jelin sağlamlığı ortamın pH ve iyonik yapısına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir [52].



Şekil 2.2 İyonik jelleşme yönteminin şematik gösterimi

İyonik jelleşme yöntemi, ılıman koşulları ve yüksek enkapsülasyon verimliliği nedeniyle büyük avantaj sağlayan bir prosestir. Bu süreç, aktif ajanları enkapsüle eden hidrojeller oluşturmak için kitosanın tripolifosfat (TPP) gibi multivalent iyonların varlığında jelleşmesini sağlar. Süreç, kitosanın amino gruplarını protonlamak ve çözünür hale getirmek için asidik bir çözeltide çözülmesiyle başlar. Bu ilk adım kritiktir, çünkü kitosanın tamamen çözünmesini ve sonraki jelleşme sürecine hazır olmasını açısından önemlidir [50],[52].

Kitosan çözeltisine TPP gibi anyonik bir çapraz bağlayıcı eklenmesiyle çözeltide jelleşme gerçekleşir. Katyonik kitosan ile anyonik TPP arasındaki etkileşim, aktif ajanları enkapsüle eden bir jel ağı oluşmasına olanak sağlar [53]. Jelleşme süreci hızlıdır ve oda sıcaklığında gerçekleşir, bu da enkapsüle edilen ajanların biyoaktivitesini korunmasına büyük ölçüde yardımcı olur.

Oluşan partiküller, reaksiyona girmemiş malzemeleri uzaklaştırmak için çöktürülür ve yıkanır. Bu adım, nihai ürünün saflığını ve kalitesinin korunmasına büyük ölçüde olanak sağlar, bu da enkapsüle edilen ajanların etkinliğini ve güvenliğini korumak için esastır.

İyonik jelleşme yöntemi birkaç ana nedenden dolayı tercih edilmektedir. İlk olarak, yüksek sıcaklıklar veya organik çözücüler gerektirmeyen nispeten risksiz bir işlemdir, bu da ısıya duyarlı ve biyoaktif bileşiklerin, örneğin proteinler ve peptitlerin enkapsülasyonu için idealdir. Bu özellikler, enkapsüle edilen ajanların biyolojik aktivitelerini ve etkinliklerini korumasını sağlar [53].

İkinci olarak, jelleşme süreci kitosan ve çapraz bağlayıcının konsantrasyonunun yanı sıra çözeltinin pH ve iyonik yükünün ayarlanmasıyla kolayca kontrol edilebilir. Bu, ilaç dağıtımı, gıda muhafazası veya diğer kullanımlar için tasarlanmış özel özelliklere sahip hidrojellerin üretilmesine olanak tanır. Bu esneklik, farklı uygulamalara uygun hidrojel sistemlerinin geliştirilmesini sağlar [50].

Üçüncü olarak, iyonik jelleşme yüksek enkapsülasyon verimliliği sağlar, yani istatistiksel olarak aktif ajanın büyük bir kısmı hidrojel matrisi içinde başarılı bir şekilde enkapsüle edilir. Bu, özellikle terapötik tedaviler gibi yüksek dozda aktif ajanın gerektiği uygulamalarda bu yöntemi önemli bir aday olarak önümüze çıkarır. Bu yüksek verimlilik, hedeflenen etkinin elde edilmesi ve tedavi süreçlerinin optimize edilmesi açısından kritiktir [50],[51],[52].

Son olarak, iyonik jelleşme ile üretilen hidrojeller biyouyu52mlu ve biyobozunur özelliklere sahiptir, bu da onları biyomedikal uygulamalar için uygun hale getirmektedir. Bu hidrojeller, zamanla bozunacak şekilde tasarlanabilir, böylece enkapsüle edilen ajanı kontrollü bir şekilde salınır ve potansiyel yan etkileri veya toksisiteyi en aza indirir. Bu özellikler, güvenli ve etkili tedavi sağlamak açısından kritik öneme sahiptir [54].

- Çeşitli Alanlardaki Uygulamaları

Enkapsülasyon teknikleri, özellikle protein bazlı bileşiklerde, birçok alanda geniş uygulama alanlarına sahiptir: İlaçlarda Enkapsülasyon, terapötik ajanların stabilitesini ve biyoyararlanımını artırmak için tercih edilir ve ilaç taşıma sistemlerinde yaygınca kullanılır. Örneğin, protein bazlı nanopartiküller, ilaç moleküllerini enkapsüle etmek için kullanılır ve hedefe yönelik ilaç molekülü teslimi ve kontrollü salımı sağlar. Bu yaklaşım, terapötik ajanların taşınma sırasında stabilitesinin korunmasını ve belirli etki noktalarında serbest bırakılmasını sağlayarak etkinliklerini artırmakla beraber yan etkileri de oldukça azaltır [55], [56].

Biyoteknolojide, enkapsülasyon teknikleri enzimleri immobilize etmek amacı ile uygulanır, bu da enzimlerin stabilitesini ve sürdürülebilirliğini artırır. Bu uygulama, enzim aktivitesinin uzun süreler boyunca korunmasının gerektiği endüstriyel süreçler için kritiktir. Enkapsülasyon, enzimleri zorlu işlem koşullarından korur ve kontrollü salımlarına olanak tsağlar, böylece biyoteknolojik uygulamalarda yüksek verim sağlar [57],[58].

Gıda endüstrisinde, fonksiyonel bileşenleri korumak amacı ile enkapsülasyon işlemi kullanılır. Probiyotikler, vitaminler ve biyoaktif peptitler gibi bileşenler, işleme ve depolama sırasında bozunmaya karşı korunması gerekmektedir. Enkapsülasyon, bu bileşenlerin stabilitesini ve raf ömrünü artırır, tüketildiklerinde biyoyararlanımlarını artar [59]. Süt ürünlerinde, kitosan ile enkapsüle edilmiş bakteriyofajlar, gıda kaynaklı patojenlerin büyümesini etkili bir şekilde inhibe ederek gıda güvenliğini arttırabilir ve raf ömrünün kısmen uzatılması sağlanır.

2.8.2 Enkapsülasyonda Kitosanın Avantajları

Kitosan, enkapsülasyon için birçok önemli avantaja sahiptir. Biyouyumluluğu ve biyobozunurluğu sayesinde toksik değildir ve biyolojik dokular tarafından iyi tolere edilir, bu da onu tıbbi uygulamalar için iyi bir materyal haline getirir. Biyobozunurluğu, çevresel etkiyi azaltarak toksik olmayan yan ürünlere ayrışmasını sağlar. Bu, özellikle biyolojik dokular ile uzun süreli uyumluluğun gerekli olduğu biyomedikal işlemler için önemlidir [60],[61].

Kitosanın bir diğer önemli avantajı, antimikrobiyal özellikleridir. Bu antimikrobiyal aktivite, gıda muhafazası ve biyomedikal uygulamalar için kitosanı oldukça önemli bir materyal olarak önümüze çıkarır, gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatmaya ve enkapsüle edilmiş ilaçları mikrobiyal kontaminasyondan korunmasına olanak sağlar. Bu özellik, gıda ambalajlarında güvenliği artırmak ve bozulabilir ürünlerin raf ömrünü uzatmak için kullanılabilir [62],[63].

Ek olarak, kitosanın film oluşturma yeteneği enkapsülasyon işlemleri için çok değerlidir. Kitosan, enkapsüle edilmiş materyaller için koruyucu bariyer görevi gören güçlü ve esnek filmler oluşturma yeteneğine sahiptir. Bu özellik, özellikle gıda ambalajı ve ilaç dağıtım sistemlerinde kullanımı için çok önemlidir. Örneğin, taze ürünlerin kaplanmasında kullanılan kitosan filmleri, ürünlerin raf ömrünün uzamasına yarar sağlayabilir [64],[65].

Ayrıca, kitosanın hidrojel oluşturma yeteneği, enkapsüle edilmiş ajanların kontrollü salımına olanak sağlar. Bu, ilaç dağıtım uygulamalarında kritik öneme sahiptir, çünkü ilacın doğru zamanda ve doğru yerde salınması tedavinin verimliliği ve etkisi açısından önemli bir ölçüttür. Hidrojeller, geniş bir yelpazede biyoaktif molekülleri enkapsüle edebilir ve sürekli salımına olanak sağlayabilir [66],[67].

2.8.3 Kitosanın Enkapsülasyonda Kullanılmasının Zorlukları

Avantajlarına rağmen, kitosanın enkapsülasyonunda kullanımına ilişkin birkaç zorluk bulunmaktadır. Ana sorunlardan biri çözünürlüğüdür. Kitosan sadece asidik koşullarda çözünür, bu da uygulama alanını sınırlayabilir [68]. Tam çözünmeyi sağlamak ve çeşitli pH ortamlarında stabiliteyi korumak zor olabilir. Bu, optimal çözünürlüğü ve işlevselliği sağlamak için dikkatli formülasyon işlemleri yapılması ve pH seviyelerinin ayarlanmasını gerektirir [69].

Bir diğer zorluk, yığın bazında değişkenliktir. Kitosanın özellikleri, üretildiği kaynağa ve işleme yöntemlerine bağlı olarak değişebilir, bu da enkapsüle edilmiş ürünlerin performansında bazı sorunlara yol açabilir. Bu değişkenlik, kitosan bazlı formülasyonların tekrarlanabilirliğini ve etkinliğini etkileyebilir, bu da sıkı kalite kontrol önlemlerini gerekli kılar [70],[71]**.**

Son olarak, kitosan filmleri esnek olmasına rağmen, mekanik dayanımları sentetik polimerlere kıyasla daha düşük kalır. Bu durum, yüksek dayanıklılık gerektiren uygulamalarda kullanım alanlarını sınırlayabilir [72]. Kitosan filmlerinin mekanik özelliklerini çapraz bağlama veya diğer malzemelerle işlenmesiyle mekanik dayanıklılığını arttırmak, aktif araştırma konularından biridir [73].

2.9 Bakteriyofajları Enkapsüle Etmenin Avantajları

Bakteriyofajların enkapsülasyonu, stabiliteyi artırmak, çevresel faktörlerinden korumak ve terapötik ve gıda güvenliği uygulamaları için kontrollü salımlarını sağlamak adına umut verici bir strateji olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu bölüm, bakteriyofajların enkapsülasyonunun avantajlarını ve dezavantajlarını, özellikle pratik uygulamaları ve potansiyel zorluklara odaklanarak incelemektedir.

Bakteriyofajların enkapsülasyonunun önemli bir avantajı, ulaşılan artırılmış stabilitedir. Enkapsülasyon, bakteriyofajları UV radyasyonu, sıcaklık değişimleri ve tuzluluk gibi olumsuz çevresel koşullardan korur. Bu koruma, bakteriyofajların uzun süre boyunca canlı ve etkili kalmasını sağlar, bu da hem terapötik uygulamalar hem de gıda güvenliği açısından kritik öneme sahiptir. Örneğin, enkapsüle edilmiş bakteriyofajlar, aktivite kaybı olmadan daha uzun süre muhafaza edilebilir, bu da onları ticari ve klinik kullanım için daha pratik hale getirir. Çalışmalar, enkapsüle edilmiş bakteriyofajların stres unsurlarına maruz kaldıklarında, enkapsüle edilmemiş olanlara göre enfektivitesini çok daha iyi koruduğunu göstermiştir. Örneğin, yakın tarihli bir çalışma, aljinat mikroküreler içinde enkapsüle edilmiş bakteriyofajların, serbest fajları tipik olarak inaktive eden mide asidine maruz kaldıktan sonra aktivitelerini koruduğunu göstermiştir [74][75].

Enkapsülasyon işleminin bir diğer önemli avantajı, bakteriyofajların kontrollü salımıdır. Enkapsülasyon, bakteriyofajların optimal zaman ve yerde salımını sağlayarak zamanlama ve hedefleme imkânı sunar. Bu kontrollü salım

mekanizması, özellikle terapötik uygulamalarda faydalıdır; çünkü enfeksiyon bölgesine yüksek konsantrasyonlarda fajların doğrudan verilmesiyle bakteriyofaj tedavisinin etkinliğini artırabilir [76]. Bu hedeflenmiş yaklaşım, hedef dışı etkilerin potansiyelini en aza indirir ve terapötik etkiyi maksimize eder. Ayrıca, enkapsülasyon, bakteriyofajları konakçı bağışıklık sisteminden koruyarak, fajların hedefe ulaşmadan önce bağışıklık yanıtı ile nötralize edilme olasılığını azaltır. Bu bağışıklıktan kaçış, terapötik uygulamalarda, bakteriyofajların konakçı vücudunda aktif ve etkili kalmasını sağlamak için kritik öneme sahiptir. Son araştırmalar, enkapsüle edilmiş bakteriyofajların, serbest fajlara kıyasla bağışıklık sistemi tarafından tespit edilmekten daha etkili bir şekilde kaçabildiğini, bu durumun daha uzun etki sürelerine ve gelişmiş terapötik sonuçlara yol açtığını göstermiştir [77].

Enkapsülasyon aynı zamanda bakteriyofajların hayatta kalma sürelerini uzatarak sık üretim ihtiyacını azaltır ve genel maliyetleri düşürür. Bu uzatılmış yaşam döngüsü, ticari uygulanabilirlik ve düşük kaynaklı ortamlarda pratik uygulamalar açısından özellikle önemlidir. Enkapsüle edilmiş bakteriyofajların, enkapsüle edilmemiş muadillerine kıyasla aktivitelerini önemli ölçüde daha uzun süre koruduğu gösterilmiştir, bu da onları uzun süreli depolama ve dağıtım için daha uygun hale getirir. Örneğin, nişasta bazlı bir matris içinde fajların enkapsülasyonu üzerine yapılan bir çalışmada, enkapsüle edilmiş fajların oda sıcaklığında bir yıldan daha fazla canlı kaldığı, enkapsüle edilmemiş fajların ise sadece birkaç ay canlı kaldığı bulunmuştur. Ayrıca, enkapsüle edilmiş bakteriyofajlar, sıvı ortamlar, jeller ve tozlar dahil olmak üzere çeşitli formülasyonlara dahil edilebilir, bu da onları farklı uygulamalar için çok yönlü hale gelmesini sağlar. Örneğin, gıda güvenliğinde, enkapsüle edilmiş bakteriyofajlar, bakteri kontaminasyonunu önlemek için kaplama materyali olarak kullanılabilir veya ambalaj malzemelerine dahil edilebilir. Bu çok yönlülük, onların farklı endüstriler ve ürünler genelinde uygulanabilirliğini artırır [78],[79]. Yakın tarihli bir uygulama, *Listeria monocytogenes*'in büyümesini engellemek için peynir ambalajında enkapsüle edilmiş bakteriyofajların kullanılmasını içermekte olup, kontaminasyon seviyelerini önemli ölçüde azaltığını göstermiştir [80],[81].

2.9.1 Bakteriyofajların Enkapsülasyonunun Dezavantajları

Yukarıda bahsedilen avantajlara rağmen, bakteriyofajların enkapsülasyonunda dikkate değer bazı dezavantajlar da bulunmaktadır. Ana zorluklardan biri,

enkapsülasyon süreci sırasında olası aktivite kaybıdır. pH, sıcaklık ve enkapsülasyon malzemesinin seçimi gibi faktörler, bakteriyofajların canlılığını ve etkinliğini etkileyebilir. Enkapsülasyon koşulları optimize edilmezse, bu süreç, bakteriyofaj aktivitesinde azalmaya yol açabilir ve terapötik potansiyellerini tehlikeye atabilir. Enkapsülasyon sürecinin, bakteriyofajların enfektivitesini ve fonksiyonelliğini koruduğundan emin olmak, pratik uygulamalardaki başarıları için kritiktir [82],[83]. Örneğin, bir çalışma, polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) nanopartiküllerinde bakteriyofajların enkapsülasyonunun, nanopartiküllerin içindeki asidik mikroçevre nedeniyle bakteriyofaj aktivitesinde önemli bir azalmaya yol açtığını tespit edilmiştir [84].

Bir diğer önemli dezavantajı, enkapsülasyon süreçleriyle ilişkili karmaşıklık ve maliyettir. Genellikle özel ekipmanlar ve malzemelerin kullanılmasını gerektiren bir süreçtir, bu da özellikle sınırlı kaynak bulunan ortamlarda enkapsüle edilmiş bakteriyofaj ürünlerinin ölçeklenebilirliğini ve ticari uygulanabilirliğini sınırlayabilir. Ekonomik ve teknik zorluklar, bu ürünlerin büyük ölçekli üretimine önemli engeller oluşturabilir. Bu teknolojiyi geniş çapta kullanılabilir ve pratik hale getirmek için maliyet etkin ve ölçeklenebilir enkapsülasyon tekniklerinin geliştirilmesi esastır. Örneğin, alginat enkapsülasyonu nispeten ucuz ve basit olmasına rağmen, PLGA gibi sentetik polimerleri içeren yöntemler daha maliyetli ve karmaşıktır, bu da onların büyük ölçekli uygulamalarda kullanımını sınırlamaktadır [85],[86].

İstenilen salım kinetiğine ulaşmak, bakteriyofaj enkapsülasyonunda karşılaşılan bir diğer zorluktur. Kontrollü salım bir avantaj olsa da, bakteriyofajların optimal hız ve konumda salımı sağlamak zor bir süreçtir. Enkapsülasyon malzemesinin bozunma hızı ve çevresel koşullar gibi faktörler salım kinetiğini etkileyebilir ve potansiyel olarak optimal olmayan terapötik sonuçlara yol açabilir. Enkapsülasyon matrisinin stabilite ve salım özelliklerini dengelemek, enkapsüle edilmiş bakteriyofajların etkinliğini maksimize etmek için önemlidir. Örneğin, yapılan araştırmalar, kitosan-alginat mikroküre lerinde bakteriyofajların salım hızının çapraz bağlanma yoğunluğunun değiştirilmesiyle ayarlanabileceğini göstermiştir, ancak bu, enkapsülasyon süreci üzerinde hassas bir kontrol gerektirmektedir [87],[88].

Ayrıca, enkapsüle edilmiş bakteriyofajlar depolama veya uygulama sırasında agregat oluşturabilir, bu da etkinliklerini azaltabilir. Enkapsüle edilmiş bakteriyofaj

formülasyonlarının geliştirilmesinde, homojen dağılımın sağlanması ve agregasyonun önlenmesi zor bir süreçtir. Agregasyon, düzensiz dozlamaya ve azaltılmış biyoyararlanıma yol açabilir, bu da enkapsüle edilmiş bakteriyofajların etkinliğini zayıflatır. Enkapsülasyon teknolojilerinin başarılı bir şekilde uygulanabilmesi için agregasyonu önleme stratejileri ve tutarlı performansın sağlanması gereklidir. Son araştırmalar, enkapsüle edilmiş bakteriyofajların agregasyonunu önlemek için yüzey aktif maddeler ve stabilizatörlerin kullanımının etkisi olduğunu göstermiş ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir [78],[89].

Özetle, bakteriyofajların enkapsülasyonu, artırılmış stabilizasyon, kontrollü salım, konakçının bağışıklık sisteminden korunma, uzatılmış depolama süresi ve uygulamada çok yönlülük gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır. Bu faydalar, enkapsülasyonu hem terapötik hem de gıda güvenliği uygulamaları için değerli bir teknoloji haline getirmektedir. Ancak, aktivite kaybı potansiyeli, enkapsülasyon sürecinin karmaşıklığı ve maliyeti, istenen salım kinetiğine ulaşma ve agregasyonun önlenmesi gibi önemli zorluklar da bulunmaktadır. Bu zorlukların optimize edilmiş enkapsülasyon teknikleri ve malzemelerle ele alınması, enkapsüle edilmiş bakteriyofajların çeşitli uygulamalardaki tam potansiyelinin gerçekleştirilmesi için kritik olacaktır.

3
MALZEME VE YÖNTEMLER

3.1 Kimyasal Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasal malzemelerin listesi Tablo 3.1`de verilmiştir. Kulamılan kimyasallar sırası ile Sodyum tripolifosfat, düşük moleküler ağırlıklı Kitosan ve Aseti asittir.

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan kimyasal listesi

Kimyasal Adı	Firma İsmi	Kullanım Amacı
Sodyum tripolifosfat	Sigma-Aldrich	Çapraz Bağlayıcı Ajan
Düşük moleküler ağırlıklı Kitosan	Sigma-Aldrich	Polimer Sentezi
Asetik asit	Sigma-Aldrich	Çözücü

3.2 Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazların listesi Tablo 3.2`de verilmiştir. Kullanılan cihazlar sırası ile Taramalı elektron mikroskopu, FT-IR, liyafilziatör, soğutmalı santrifüj, ultra saf su cihazı, manyetik karıştırıcı, inkübatör, santrifüj ve sonikatördür.

Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasal listesi

Cihaz İsmi	Modeli
Taramalı Elektron Mikroskopu	FEI (PHILIPS) XL30 SFEG SEM
FT-IR	Nicolet™ iS™ 10
Liyofilizatör	Telstar Cryodos
Soğutmalı Santrifüj	Sigma
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore MilliQ Gradient
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph
İnkübatör	Binder and Memmert UN55
Santrifüj	Himac
Sonikatör	Bandelin Sonoplus

3.3 Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Bakteriyofaj K yüklü kitosan partiküllerinin üretiminde önce öncelikle boş ve model bir protein olan BSA yüklü kitosan partikülleri hazırlanmıştır. Kitosan nanopartikülleri, literatürde belirtilen iyonik jelleşme yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Örnek bir sentez yöntemi aşağıda verilmiştir: İlk olarak, kitosan çözeltisi %2'lik asetik asit çözeltisinde 4 mg/ml konsantrasyonda hazırlanmıştır. Bu amaçla, 10 ml %2'lik asetik asit çözeltisinde 40 mg kitosan, manyetik karıştırıcı içerisinde 24 saat boyunca çözülmeye bırakılmıştır. Daha sonra, farklı konsantrasyonlarda sodyum trifosfat solüsyonu +4°C'de 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda çözülmeye bırakılmıştır [3]. Çapraz bağlanmanın sağlanması için, mikroenjektör aracılığıyla manyetik karıştırıcıda karışmakta olan kitosan çözeltisine damlatılmıştır, Çapraz bağlanmanın tamamlanması için çözelti, 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda bekletilmiştir.

Daha sonra, çözeltinin homojenizasyonunun sağlanması için Prob Sonikatör (Bandelin Sonoplus) cihazında %75 güç ayarında 7 dakika boyunca buz banyosunda sonikasyon yapılmıştır. Daha sonra elde edilen çözelti içerisindeki partiküller boyut analizleri yapılmıştır. ZetaSizer Nano ZS Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Spektrometresi (Malvern/Zen3600) cihazı ile yapılmıştır. Homojenize edilen çözelti, 9000 devir/dakika'da 30 dakika santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Süpernatant ayrı bir santrifüj tüpüne aktarıldıktan

sonra, pelletin üzerine 10 ml daha saf su eklenmiş ve 9000 devir/dakika'da 30 dakika daha santrifüjlenerek yıkanmıştır. Çöken partiküller, son olarak liyofilize edilmiş ve toz halde elde edilen partiküller ileri analizlerde kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Bu örnek sentez yöntemi kullanılarak farklı kimyasallar, konsantrasyonlar ve çalışma şatlarında kiosan partikülleri üretilmiştir. Tablo 3.3`de gerçekleştirilen kitosan partikül üretiminde kullanılan kimyasallar, konsantrasyonlar ve çalışma şartları verilmiştir.

Tablo 3.3 Kitosan nanopartikül hazırlanması sırasında kullanılan malzemeler, konsantrasyonları ve çalışma şartları

Örnek Kodu	BSA	Faj K	Sodyum tri Konsantrasyonu (%)	Sodyum tripolifosfat Miktarı (mL)	pH
Np1	Yok	Yok	0.1	2.0	3.4
Np2	Yok	Yok	0.3	2.0	3.4
Np3	Yok	Yok	0.3	2.5	3.4
Np4	Yok	Yok	0.3	3.0	3.4
Np5	Yok	Yok	0.1	1.0	3.4
Np6	Yok	Yok	0.2	2.0	3.4
Np7	Yok	Yok	0.2	0.5	3.4
Np8	Yok	Yok	0.3	4.0	3.4
Np9	Var	Yok	0.1	2.0	3.4
Np10	Var	Yok	0.3	3.0	3.4

3.4 Bakteriyofaj K Yüklü Kitosan Nanapartiküllerinin Sentezi

Boş nanopartiküllerle yapılan denemeler sonucunda, en iyi formülasyonu sağlamak için belirlenen parametreler değiştirilerek bakteriyofaj K yüklü nanopartikül sentezi çalışmları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda yapılan denemelerde kullanılan ajanlar ve bileşimleri Tablo 3.4`te özetlenmektedir:

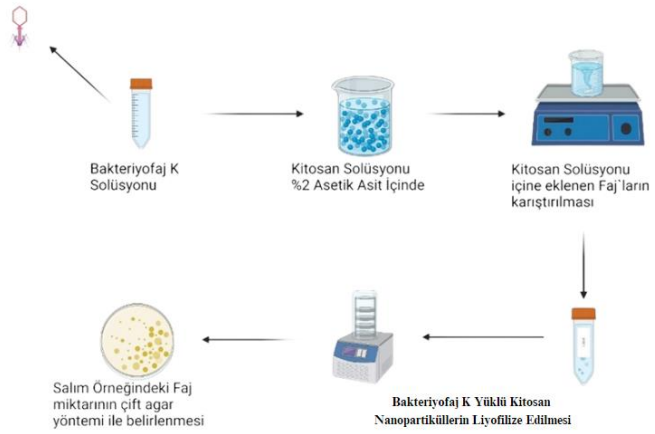
Tablo 3.4 Bakteriyofaj K yüklü kitosan partiküllerinin sentezinde kullanılan kimyasal miktarları ve hacimleri

Örnek Kodu	BSA	Faj K	Sodyum tripolifosfat Konsantrasyonu (%)	Sodyum tripolifosfat Miktarı (mL)
Np11	Yok	Var	0.3	3.0
Np12	Yok	Var	0.3	2.5
Np13	Yok	Var	0.3	3.0
Np14	Yok	Var	0.2	3.0

Örnek bir bakteriyofaj K yüklü kitosan partikül sentez yöntemi şu şekildedir: Bakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartiküllerinin sentezlenmesi için ilk olarak, %2'lik asetik asit solüsyonunda 10 ml düşük moleküler ağırlıklı kitosan çözeltisi (4 mg/ml) hazırlanmış ve homojenizasyon sağlamak amacıyla manyetik karıştırıcıda 24 saat boyunca karıştırılmıştır. Ardından, çeşitli konsantrasyonlarda ve hacimlerde sodyum trifosfat (TTP) solüsyonları hazırlanmış ve 30 dakika boyunca +4°C'de manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde Prof. Dr. Tülin Özbek'in laboratuvarında Doktora Öğrencisi Berna Erdoğdu tarafından hazırlanan 10^{10} PFU/ml konsantrasyonundaki 1 ml bakteriyofaj K suşu, enjektör kullanılarak manyetik karıştırıcıda 600 rpm hızında karıştırılmakta olan %2'lik kitosan çözeltisine yavaşça damlatılmıştır. Çapraz bağlanmanın sağlanması için, farklı hacimlerde TPP çözeltisi enjektör ile ayrı seferlerde çözeltiye eklenmiş ve reaksiyonun tamamlanması için oda sıcaklığında 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

Daha sonra, çözelti dikkatlice 50 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmış ve buz banyosunda %75 güçte 7 dakika boyunca Prob Sonikatör (Bandelin Sonoplus) cihazında homojenizasyon sağlanmıştır. Homojenize edilen nanopartiküller, 9000 rpm hızında 30 dakika boyunca Soğutmalı Santrifüj (Hettich Zentrifugen) cihazında +4°C'de santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Süpernatant, ileri testler için başka bir 50 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmış ve +4°C'de muhafaza edilmiştir. Pelletin üzerine 10 ml ultra saf su eklenmiş ve 9000 rpm hızında 30 dakika boyunca yeniden soğutmalı santrifüjde +4°C'de santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatant yine başka bir 50 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmış ve +4°C'de muhafaza edilmiştir. Pellet ise enkapsülasyon verimi, bakteriyofajların litik aktivite ve salım testlerinin

gerçekleştirilebilmesi için Liyofilizatör (Telstar) cihazında 48 saat boyunca kurutulmuş ve elde edilen nanopartiküller +4°C'de muhafaza edilmiştir. Gerçekleştirilen üretim aşamaları Şekil 3.8'de şematize edilmiştir.



Şekil 3.1 Bakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartiküllerinin üretimi

3.5 Karakterizasyon Teknikleri

3.5.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi Analizi

Bakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartiküllerinin, düşük moleküler ağırlıklıtaki kitosanın ve liyofilize edilmiş olan bakteriyofaj K`nın yapısındaki fonksiyonel grupların belirlenmesi için FT-IR spektroskopisi (Shimadzu, Prestige 2100) kullanılmıştır. Liyofilize edilen kuru nanojellerin FT-IR spektrumu ATR aparatı kullanılarak 600-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında ölçülmüştür.

3.5.2 Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Bu çalışmada boş ve bakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartiküllerin boyutu, polidispersite indeksi (PDI) Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Boyut analizleri; 4.0 mV He-Ne lazer lamba ile donatılmış cihazda dinamik ışık saçılması (DLS) yöntemiyle 25°C'de ±0,1°C hassasiyeti ile otomatik modda 3 tekrarlı yapılmış ve ortalaması alınmıştır Tüm nanopartiküllerin ortalama hidrodinamik çapı, PDI ölçümleri 0.8872 cP viskozite ve 1.330 kırılma indisinde alınmıştır.

3.5.3 Bakteriyofaj K Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Bakteriyofaj K yüklü kitosan partiküllerinin enkapsülasyon etkinliği ve etken madde yükleme kapasitesinin hesaplanması için, bakteriyofaj K suşunun stok

çözeltisi (10^{10} PFU/ml) $5x10^9$, 10^9, $5x10^8$, 10^8, $5x10^7$ ve 10^7 PFU/ml konsantrasyonlarına seyreltilerek 6 farklı konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır. Her bir numunenin Ultraviyole ve Görünür Bölge (UV-VIS) spektroskopisi kullanılarak 280 nm'de absorbans değerleri ölçülmüş ve konsantrasyon-absorbans kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Bu yöntem, Bakteriyofaj K'nın çeşitli konsantrasyonlarının absorbans değerlerini belirlemekte ve bu veriler ışığında enkapsülasyon etkinliği ve etken madde yükleme kapasitesini hesaplamaktadır.

İn vitro salım çalışmasında salınan ilaç miktarının hesaplanabilmesi için, liyofilize edilmiş Bakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartiküllerinden 2 mg örnek tartılmış ve bu örnek 2 ml PBS çözeltisinde +4°C'de çözünmeye bırakılmıştır. Belirli saat aralıklarında örnekler alınarak, her bir örnek soğutmalı santrifüj (Nüve) cihazında +4°C'de 10 dakika boyunca 9000 rpm hızında santrifüj edilmiştir. Üst fazın UV-VIS spektroskopisi kullanılarak 280 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Daha sonra çöktürülen pellet, PBS ile süspanse edilerek salım çalışması yapılan stok örneğe geri eklenmiştir.

3.5.4 Reaksiyon Veriminin Hesaplanması (RV%)

Liyofilize edilerek katı olarak elde edilen nanopartiküller hassas terazi ile tartılmıştır. Kuru nanopartikül miktarının, nanopartikül hazırlanmasında kullanılan toplam madde miktarına oranlanmasıyla (Eşitlik 3.1) reaksiyon verimi elde edilmiştir.

$$RV(\%) = \left(\frac{\text{Üretilen Nanopartikül Miktarı (mg)}}{\text{Başlangıçtaki Toplam Madde Miktarı (mg)}} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

Toplam madde miktarı nanopartikül üretiminde kullanılan başlangıçtaki toplam kitosan miktarıyken, üretilen nanopartikül miktarı ise sentezlenen nanopartiküllerin liyofilizatör ile kurutulmasından sonra hassas terazi ile tartılan katı kütlesidir.

3.5.5 Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması

Bakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartiküllerinin yükleme kapasitesi, indirekt yöntem ile hesaplanmıştır. Enkapsüle edilen bakteriyofaj K miktarı, UV-VIS spektroskopisi kullanılarak tayin edilmiştir. Yüklenmiş olan etken madde miktarı, salım çalışması sırasında belirli saat aralıklarında alınan salım örneklerinin 280

nm'de UV-VIS spektroskopisi ile ölçülen absorbans değerlerinin, daha önce çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan bakteriyofaj K örneklerinden oluşturulmuş olan kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Enkapsüle edilen etken madde miktarı, başlangıçta eklenen bakteriyofaj K suşunun PFU değerine bölünmesi ile yükleme kapasitesi (Eşitlik 3.2) hesaplanmıştır.

$$\text{YK}\ (\%) = \left(\frac{\text{Enkapsüle Edilen Etken Madde Miktarı (PFU)}}{\text{Başlangıçtaki Bakteriyofaj K Miktarı (PFU)}} \right) \times 100$$

(3.2)

3.5.6 Litik Aktivites Yöntemiyle Bakteriyofaj K Miktarının Belirlenmesi

İyonik jelleşme yöntemi ile enkapsülasyon işlemi gerçekleştirilen bakteriyofaj K yüklü kitosan partiküllerinin üretimi sırasında muhafaza edilen süpernatantların ve partiküller içerisine enkapsüle olan bakteriyofaj K'ların litik aktivitesinin ölçümü, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde Prof. Dr. Tülin Özbek'in laboratuvarında, doktora öğrencisi Berna Erdoğdu tarafından yapılmıştır. Yöntem, literatürde benzer çalışmalarda uygulanan yöntemler doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Yüksek titredeki bakteriyofaj K filtratı PEG 8000 ile konsantre edilmiş ve SM buffer'a aktarılarak kloroform ile saflaştırılmıştır. Kullanılana kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir. Başlangıçta kullanılan faj filtratının ve enkapsüle edilmiş fajın salınım örnekleri değerlendirilirken kullanılan çift agar yöntemi özetle şu şekildedir: 100 µl *S. aureus* kültürü ile 100 µl faj filtratı (salım örneği) 1 saat preinkübasyon yapılır ve %0.5'lik üst agar eklenerek %1.5'lik alt agar üzerine dökülür. 37°C'de gece boyunca inkübasyon yapılır. Faj konsantrasyonu, Eşitlik 3.3'te verilen aşağıdaki formüle göre hesaplanır [90][91].

$$\text{PFU/mL} = \frac{\text{plak sayısı}}{\text{eklenen faj filtratı (mL)} \times \text{dilüsyon katsayısı}}$$

(3.3)

Bu yöntem, süpernatantta bulunan ve enkapsüle edilemeyen ya da enkapsüle edilmiş Bakteriyofaj K'nın litik aktivitesinin ölçülmesini sağlar ve nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliğini değerlendirmek için kullanılır.

3.5.7 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Üretilen nanopartiküllerin morfoloji ölçümleri, Boğaziçi Üniversitesi Kandilli Kampüsü İleri Teknolojiler Araştırma Geliştirme Merkez Laboratuvarında, Philips-FEI XL30 ESEM-FEG Taramalı Elektron Mikroskobu ve Enerji Dağılımlı X-Işınları Analizörü/Görüntü Analizleri Sistemi kullanılarak yapılmıştır. Örnekler öncesinde Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda Argon gazı altında altın-paladyum ile bir saat boyunca kaplanmıştır.

4
BULGULAR

Bu çalışmada, iyonik jelleşme yöntemi ile sentezlenen Bakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartiküllerinin sentezi, karakterizasyonu ve biyolojik etkinliğinin incelenmesi araştırılmıştır.

Öncelikle boş kitosan partiküllerinin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonrasında ise, bakteriyofaj K yüklü kitosan partiküllerin karakterizasyonu, in vitro salım ve biyolojik etkinlik sonuçları verilmiştir. Bakteriyofaj K'nın litik aktivite testlerinde, çift agar yöntemi kullanılarak *S. aureus*'a karşı incelenmiştir

4.1 Boş Kitosan Partiküllerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

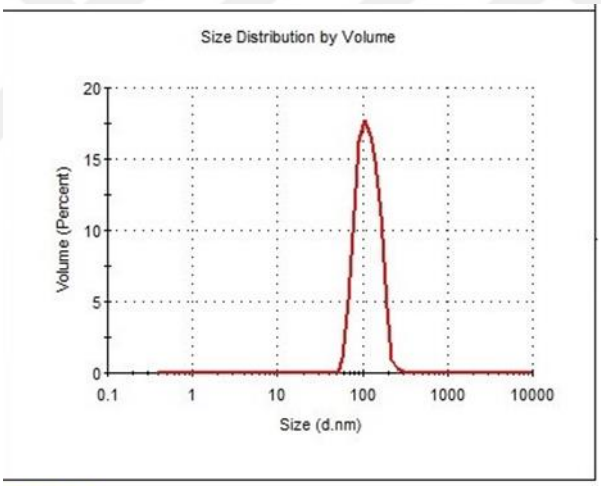
Bu çalışmada üretilen nanopartiküllerin boyutu ve boyut dağılımı, sodyum trifosfatın konsantrasyonu ile doğrudan ilişkilidir. Bu sebeple deneysel kısımda Tablo 3.1'de verilen farklı konsantrasyonlarda boş kitosan partikülleri üretilmiştir. Elde edilen boyut ve PDI değerleri Tablo 4.5'de verilmektedir. Bu çalışmalarda Np10'da ayrıca BSA da eklenerek partikül oluşumundaki etkisi incelenmiştir. Partikül güretiminde BSA eklenmesinin, bakteriyofaj K'nın protein temelli bir yapı olmasından dolayı bir ön bilgi olacağı düşünülmüştür.

Tablo 4.1 Üretilen kitosan partiküllerinin hidrodinamik çap ve polidispersite değerleri

Örnek Kodu	Hidrodinamik Çap (nm)	PDI
Np1	395	0,43
Np2	395	0,23
Np3	290	0,21
Np4	140,7	0,26
Np5	1132	0,8
Np6	662	0,4
Np7	849	0,56
Np8	462	0,31
Np9	400	0,4
Np10	282	0,29

Kitosan partiküllerin sentezi sırasında kullanılan kitosan çözeltisi farklı yöntemlerle hazırlanmıştır: soğuk suda çözünmesi, ısıtılarak çözünmesi, %2 ve %1 asetik asit içerisinde çözünmesi, çözeltinin pH 3,4'te hazırlanması ve çözeltinin pH'ının 5,6'ya çıkarılması gibi. Sonuç olarak, soğuk %2'lik asetik asit çözeltisinde pH 5,6'ya ayarlanarak hazırlandığında kitosanın tam olarak çözündüğü ve berrak bir çözelti elde edildiği görülmüştür. Çapraz bağlayıcı olarak, literatürdeki çalışmalar temel alınarak en uygun ajan olan sodyum trifosfat tercih edilmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde, Np1-4 örneklerinde eklenen sodyum tripolifosfat miktarı arttıkça boyut küçülmektedir ve en küçük hidrodinamik çap Np4 kodlu örnekte elde edilmiştir. Yapılan boyut ölçümüne göre Np4 kodlu boş nanopartikülün hidrodinamik çapının 140,7 nm olduğu ve 0,229 PDI değeri ile monodispers dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca Şekil 4.9'da görüldüğü üzere herhangi bir ikincil agregasyon gözlenmemiştir. Bu sonuçlar, homojen boyut dağılımı gösteren nanoboyutlu boş kitosan nanopartiküllerinin başarıyla üretildiğini göstermektedir.



ŞİDDET

No	Pik1 d.nm	A. % Percent	Gen. d.nm	Pik2 d.nm	A. % Percent	Gen. d.nm	Pik3 d.nm	A. % Percent	Gen. d.nm	Pik4 d.nm	A. % Percent	Gen. d.nm
294	140,7	100,0	45,05	0,000	0,0	0,000	0,000	0,0	0,000	0,000	0,0	0,000

Şekil 4.1 Np4 kodlu boş kitosan partikülünün boyut dağılımı

Toplamda en az sodyum tripolifosfat eklenen Np5 ve Np7 kodlu örneklerinde ise en büyük hidrodinamik çap değerleri elde edilmiştir. BSA eklenen Np10 kodlu örnekte ise Np4 kodlu örnekteki aynı şartlarda çalışılmıştır ve bu nanopartikülün yaklaşık 2 katı boyut ve yaklaşık aynı PDI değeri elde edilmiştir. Boyuttaki bu artış BSA moleküllerinin nanopartikül içerisine enkapsüle olduğunu göstermektedir.

Ayrıca, yine protein esaslı bakteriyofaj K'nın da bu şartlarda enkapsüle edilebileceğini göstermektedir.

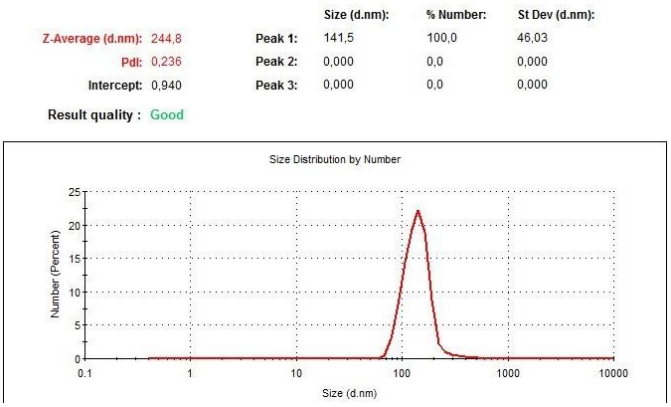
4.2 Bakteriyofaj K Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Sentezi

Tez çalışmasının sonraki basamağında bakteriyofaj K yüklü kitosan nanoprtikülleri üretilmiştir. Bununla ilgili olarak 4 farklı sentez gerçekleştirilmiştir. Bu sentezlerde de sodyum tripolifosfat miktarları değiştirilmiştir. Elde edilen boyut ve PDI değerleri Tablo 4.6'de verilmektedir. Sonuçlardan görüleceği üzere yine en yüksek miktarda sodyum tripolifosfat eklenen örnek olan Np11'de en düşük hidrodinamik çap (245 nm) elde edilmiştir. AyrıcaPDI değeri de 0,24 olarak belirlenmiştir. Np12 örneğinde sadece boyut artışı olurken Np13 örneğinde hem boyut hem de PDI değeri önemli derecede artmıştır.

Tablo 4.2 Üretilen bakteriyofaj yüklü kitosan partiküllerinin hidrodinamik çap ve polidispersite değerleri

Örnek Kodu	Hidrodinamik Çap (nm)	PDI
Np11	245	0,24
Np12	290	0,23
Np13	551	0,51

Şekil 4.2'de Np11 örneğine ait boyut dağılım grafiği verilmektedir. Örnekte herhangi bir ikincil agregat oluşumu görülmemiştir. Sonuç olarak homojen boyut dağılımı gösteren, çapı 300 nm'den nanopartiküller başarıyla sentezlenmiştir.



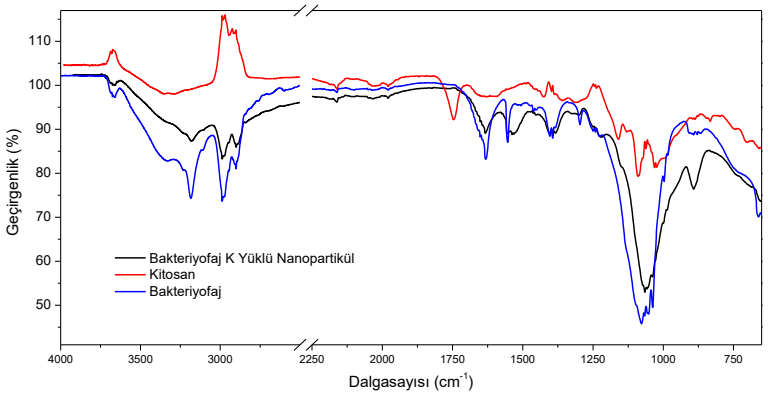
Şekil 4.2 Np11 kodlu bakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartiküllerinin boyut dağılımı

Çalışmanın sonraki aşamalarında Np11 kodlu örnek kullanılarak devam edilmiştir. Üretilen Np11 kodlu nanopartikülün kimyasal yapısı ve bakteriyofajları olası yüzey adsorpsiyonlarının tespiti için kitosan, liyofilize bakteriyofaj K ve liyofilize Np11 örneklerinin FTIR spektrumları alınmıştır. Şekil 4.11'de bu örneklere ait FTIR spektrumları verilmektedir. Kitosanın FTIR spektrumunda;

- 3291 cm^{-1}deki bant O-H gerilmesine,
- 2921 cm^{-1}'deki bant alifatik C-H gerilmesine,
- 1741 cm^{-1}'deki bantın asetil grubunun bağlı olduğu amid bağı bükülmesine,
- 1645, 1599 ve 1423 cm^{-1}'deki bantlar amin gruplarının N-H bükülme titreşimleri ve C-H bükülmesine,
- 1375 ve 1325 cm^{-1}'deki bantlar C-H bükülmesine
- 1153, 1066 ve 1032 cm^{-1}'deki bantlar C-O-C gerilmesine,
- 898 cm^{-1}'deki bant ise glikosidik bağların C-H bükülmesine aittir.

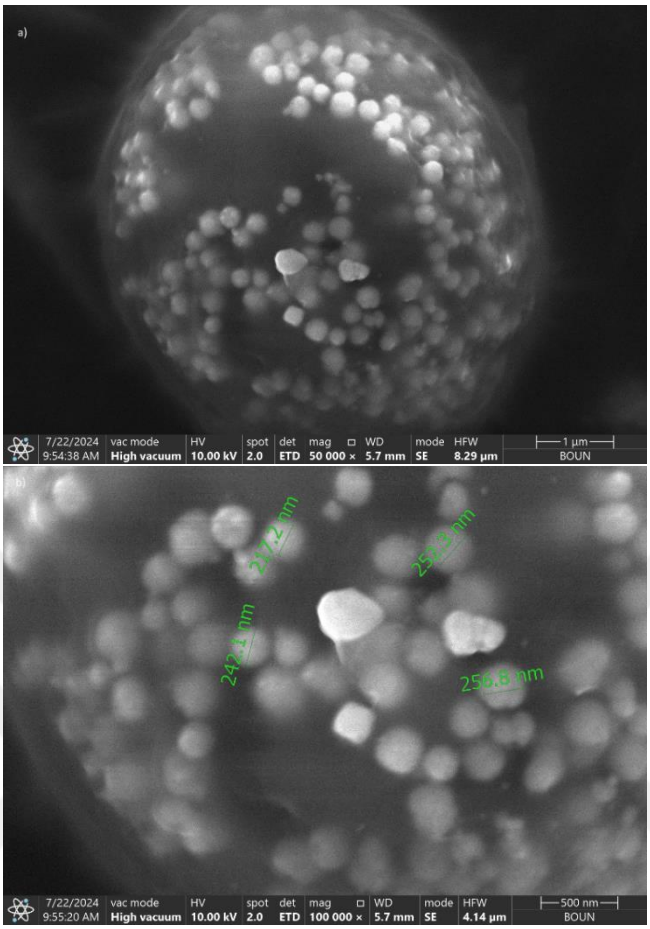
Şekil 4.3'de bakteriyofaj K'nın FTIR spektrumunda karakteristik bantları görülmektedir. Bakteriyofaj K'nın spektrumunda, O-H gerilmesi, C=O gerilmesi, C=C ve amin grupları için sırasıyla 3433 cm^{-1}, 1602 cm^{-1}, 1105 cm^{-1} ve 898 cm^{-1}'de karakteristik bantlar bulunmaktadır.

Bakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartiküllerinin spektrumuna bakıldığında ise, bakteriyofaj K'ya ait olan karakteristik bantların baskın olarak gözlemlenmektedir. Bu durum kitosan yüzeyinde adsorbe durumda bakteriyofaj K'ların bulunduğunu göstermektedir.



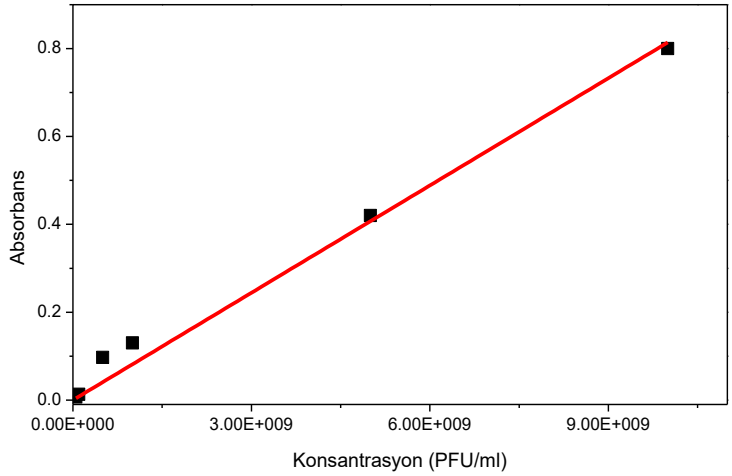
Şekil 4.3 Kitosan (siyah), liyofilize bakteriyofaj K (kırmızı)ve liyofilize Np11 (mavi) örneklerinin FTIR spektrumlarıBakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartiküllerinin FTIR spektrumları

Bakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartiküllerinin karakterizasyonu için ayrıca morfolojik inceleme de yapılmıştır. SEM analizleri, nanopartiküllerin morfolojisi ve yüzey özellikleri hakkında detaylı bilgi sağlamıştır. Np11 kodlu örneğe ait SEM görüntüleri Şekil 4.12`de gösterilmektedir. Np11 kodlu örnekte gözlemlenen kitosan nanopartikülleri, küresel bir morfoloji sergilemektedir. Bu morfoloji, partiküllerin homojen bir şekilde dağıldığını ve düzenli bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. SEM görüntülerinde görülen partiküllerin boyutları, yaklaşık 200-300 nm aralığındadır ve dinamik ışık saçılması (DLS) ölçümleriyle elde edilen boyut değerleriyle de uyum içindedir. Partiküllerin yüzeyi ise genel olarak pürüzsüz bir yapı sergilemektedir. Bu görseller, bakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartiküllerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini gösteren diğer önemli bir sonuçtur.



Şekil 4.4 NP11 kodlu örneğin 50.000x (a) ve 100.000x (b) büyütmede alınan SEM görüntüleri

Np11 kodlu Bakteriyofaj K yüklü nanopartikülün kimyasal ve fizikokimyasal olarak karakterizasyonu tamamlandıktan ve başarıyla üretildiği gösterildikten sonra enkapsülasyon etkinliğini ve salım profilini incelemek üzere ilk olarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bakteriyofaj K yükleme veriminin hesaplanması amacıyla kalibrasyon eğrisinin elde edilmesi için, 6 farklı konsantrasyonda bakteriyofaj K çözeltileri hazırlanmış ve UV-VIS spektroskopisi kullanılarak 280 nm'de absorbans değerleri tespit edilmiştir. Bu veriler kullanılarak, Şekil 4.13'de görülen kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Bu analizler, bakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği ve salım çalışmalarının doğru bir şekilde değerlendirilmesi için gereklidir.



Şekil 4.5 NP11 kodlu örneğin 50.000x (a) ve 100.000x (b) büyütmede alınan SEM görüntüleri

Çizilen kalibrasyon eğrisine göre molar absorbsiyon katsayısı $8{,}14\times10^{-11}$ ml/PFU.cm ve regresyon katsayısı ise R^2=0.9965 olarak bulunmuştur. Enkapsülasyon etkinliği, yükleme kapasitesi ve salım çalışması hesaplamalarında oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılmıştır.

Başlangıçta 10×10^{10} PFU miktarında bakteriyofaj K kullanılmıştır. Partikül üretimi sonrasında üst fazda kalan bakteriyofaj K miktarı UV-VIS spektrofotometre ile belirlenerek enkapsülasyon etkinliği değeri;

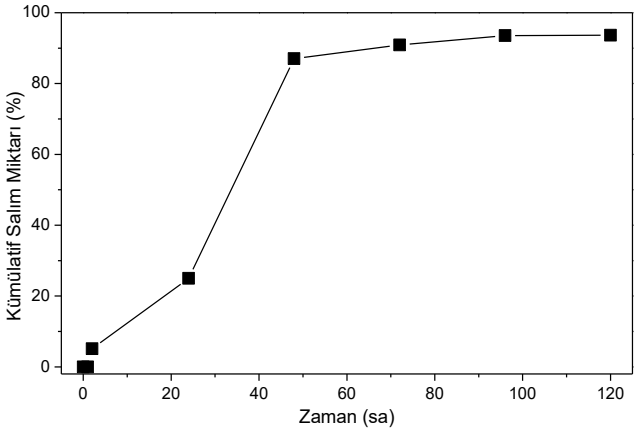
%EE = %40,76

olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç, bakteriyofaj K'nın kitosan nanopartiküllerine enkapsüle edildiğini göstermektedir.

Enkapsülasyon işlemi sonunda 33 mg nanopartikül elde edilmiş ve salım çalışmasında bu nanopartiküllerin 2 mg'ı kullanılmıştır.

Bakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartiküllerinin salım profili, hazırlanan PBS çözeltisi içinde incelenmiştir. Liyofilize edilen nanopartiküller, belirli saat aralıklarında alınan örneklerin 280 nm'de absorbans değerleri okunarak in vitro salım çalışmasında değerlendirilmiştir. Bu absorbans değerleri, salınan bakteriyofaj K miktarını belirlemek için kullanılmıştır. 280 nm'de elde edilen absorbans değerlerine uygun olarak hesaplanan kümülatif salım profili grafiği Şekil 4.6'da verilmektedir. 5 gün sonunda yüklü bakteriyofajların %90'ından fazlasını saldığı

bulunmuştur. İlk 2 saatte ise sadece yaklaşık %5 oranında yüklü bakteriyofajın salımı gerçekleşmiştir.



Şekil 4.6 Bakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartikülünün kümülatif salım profili

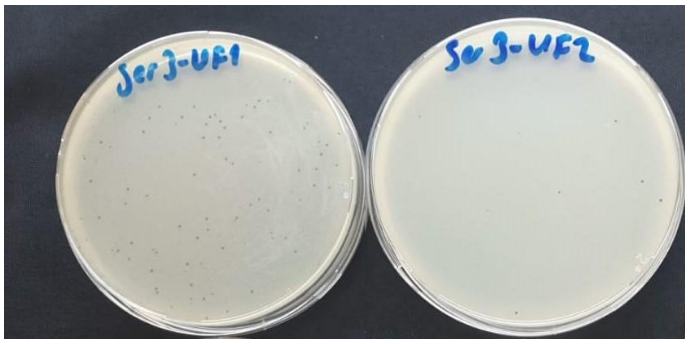
Çalışmanın son aşamasında ise karakterizasyonu tamamlanan nanopartiküllerdeki fajların biyolojik aktivitesi incelenmiştir. Bakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartiküllerinin etkinliği, çift agar yöntemi kullanılarak *Staphylococcus aureus*`a karşı değerlendirilmiştir. Bu çalışmalar, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak, enkapsülasyon işlemi sırasında enkapsüle edilemeyen bakteriyofaj K örnekleri, santrifüj sırasında yıkama ile süpernatantlarda toplanmış ve muhafaza edilmiştir. Bu örneklerin litik aktivitesi değerlendirilmiştir. Bu amaçla, Np11 kodlu örnekten elde edilen UF1 ve UF2 üst fazları için yapılan çift agar yöntemi sonuçları Şekil 4.15'de gösterilmektedir. UF1 için ortalama 45 plak tespit edilmiştir ve bu sayı $4{,}5\times10^2$ PFU/ml litik aktiviteye karşılık gelmektedir. UF2 için ise $1{,}0\times10^2$ PFU/ml litik aktivite tespit edilmiştir.

Bu verilere göre, toplamda $5{,}5\times10^2$ PFU/ml litik aktivite korunmuştur. Başlangıçta enkapsüle edilemeyen toplam bakteriyofaj miktarına kıyasla, litik aktivitesini koruyan bakteriyofaj oranı:

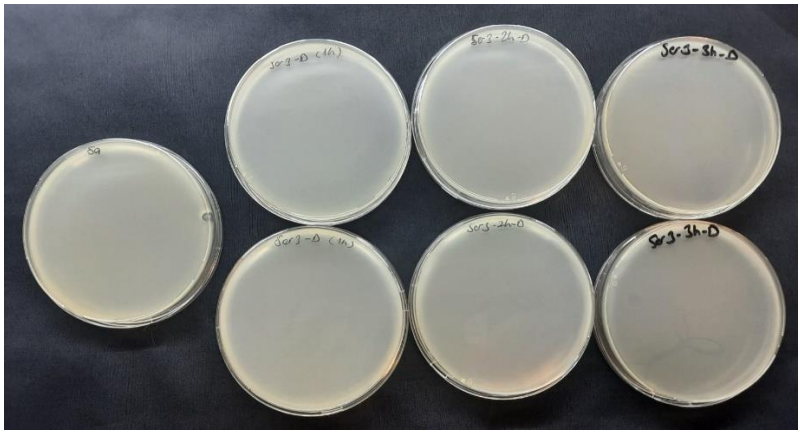
≈%0,000153 olarak tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar, enkapsüle edilemeyen bakteriyofajların çok küçük bir kısmının litik aktivitesini koruduğunu göstermektedir.



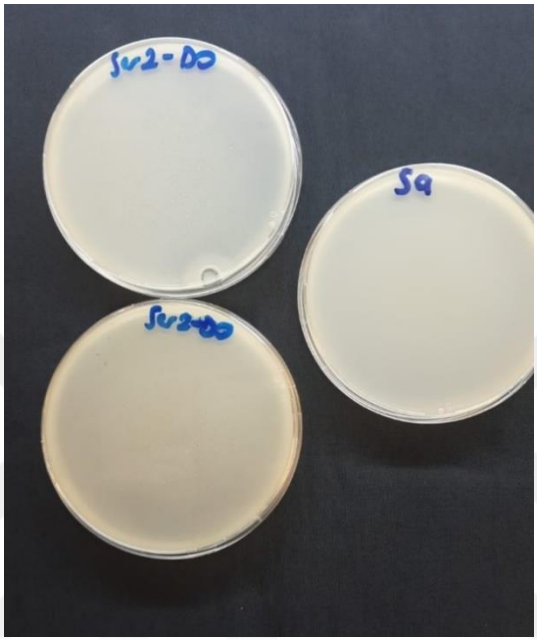
Şekil 4.7 Bakteriyofak K yüklü kitosan nanopartikül üretimi sırasında enkapsüle olmayan bakteriyofajların *Staphylococcus aureus*`a karşı litik aktivite testi görselleri

Çalışmanın sonraki aşamasında salım örneklerinin litik aktivitesi incelenmiştir. İlk 3 saatte alınan örneklerin litik aktivite testleri gerçekleştirildiğinde Şekil 4.16'da gösterildiği üzere herhangi bir litik aktivite ya da plak oluşumu görülmemiştir. Ancak belirtmek gerekir ki, 2. ve 3. saatlerde alınan örneklerde yapılan çalışmalarda tek düze ve morfolojileri bozuk plak benzeri yapılar görünmüştür. Ancak, bu yapılar literatürdeki standartlara uymadığı için negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar, salım çalışmasının başlangıcında bakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartiküllerinin *S. aureus* üzerinde litik aktivite göstermediğini, ancak bazı morfolojileri bozuk plak benzeri yapıların oluşabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.8 Salım çalışmasının ilk 3 saat aralığında alınan örneklerinin litik aktivite testi görselleri

Şekil 4.17`de, 2. gün alınan salım örneğinin çift agar yöntemi ile yapılan litik aktivite testi sonuçları gösterilmektedir. Salım çalışmasının 2. gününde alınan salım örneği ile yapılan litik aktivite testlerinde 5 plak sayılmıştır. Ancak, bu plak oluşumları morfolojik olarak literatürdeki plak oluşum standartları ile uyuşmadığı için kontaminasyon kaynaklı olabileceği düşünülerek negatif olarak değerlendirilmiştir.

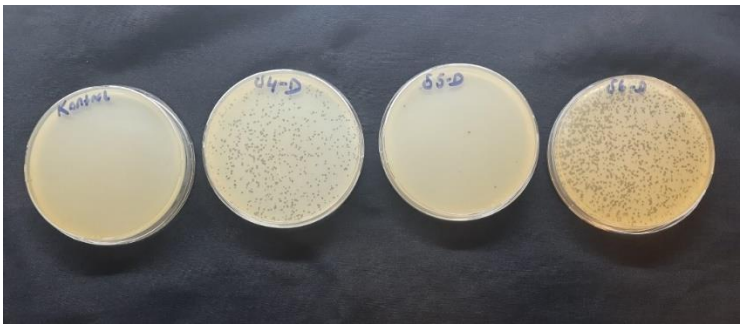


Şekil 4.9 Salım çalışmasının 2. gününde alınan örneklerinin litik aktivite testi görselleri

Salım çalışmasının 3., 4. ve 5.gününde alınan salım örnekleri üzerinde yapılan litik aktivite testi sonuçları Şekil 4.18'de gösterilmiştir. Alınan 3 örnekte de litik aktivite tespit edilmiş ve aktiviteleri sırasıyla;

- 3. gün: $2{,}36\times10^3$ PFU/ml
- 4. gün: 6×10 PFU/ml
- 5. gün: $4{,}65\times10^3$ PFU/ml

olarak belirlenmiştir. Rapor edilen sonuçların değerlendirilmesinde, 4. günde alınan salım örneğindeki litik aktivite düşüşünün kullanılan PBS'e bağlı bir kontaminasyondan ya da örnek hazırlanması sırasında oluşan bir mekanik hasardan kaynaklı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.10 Salım çalışmasının 3., 4. ve 5. günlerinde alınan örneklerinin litik aktivite testi görselleri

UV-VIS spektrofotometre ile tespit edilen enkapsüle bakteriyofaj K miktarı $2{,}47\times10^{8}$ PFU/ml'dir. Salım çalışması sonucunda 3., 4. ve 5.günlerde tespit edilen litik aktivite gösteren faj miktarlarının toplamı alındığında toplam litik aktivite gösteren faj miktarı:

$7{,}11 \times 10^{3}$ PFU/ml

olarak belirlenmektedir. Enkapsüle edilen bakteriyofaj K miktarına kıyasla litik aktivite gösteren bakteriyofaj oranı ise:

≈%0,00288

Olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç, salım çalışmasının 3., 4. ve 5. günlerinde litik aktivite gösteren bakteriyofaj K miktarının enkapsüle edilen toplam miktara göre oldukça düşük bir yüzde olduğunu göstermektedir. Bu düşük litik aktivite oranı, bakteriyofajların enkapsülasyon işlemi sırasında stabilitesinin korunmasının zor olduğunu ve salım sonrası etkinliğin azaldığını göstermektedir. Literatürde, çeşitli çalışmalarda bakteriyofajların farklı polimerlerle enkapsüle edilmesi ve sonrasında litik aktivitelerinin değerlendirilmesi üzerine araştırmalar yapılmıştır. Örneğin, bir çalışmada, *E. coli* fajı ZCEC5, kitosan-aljinat boncukları içinde enkapsüle edilmiştir ve litik aktivite oranı yaklaşık %88 olarak belirlenmiştir [92]. Başka bir çalışmada, *Salmonella enterica*'ya karşı etkili olan bir faj kokteyli, jelatin ve pullulan polimerlerinden oluşan filmlere entegre edilmiştir ve litik aktivite oranı %48 olarak hesaplanmıştır [93]. Bir başka çalışmada, kitosan nanopartikülleri içine enkapsüle edilen faj kokteylinin, serbest bırakıldıktan sonra litik aktivitesini %94,6 oranında koruduğu gözlemlenmiştir [94]. Ayrıca, alginat bazlı bir polimerle enkapsüle edilen fajların, litik aktivitesini %52 oranında koruduğu belirtilmiştir

[95]. Bu çalışmalar, kullanılan polimer ve enkapsülasyon yöntemine bağlı olarak litik aktivitenin değişkenlik gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

5
SONUÇ

Bu çalışmada, *Staphylococcus aureus*'a karşı litik aktivite gösteren bakteriyofaj K'nın kitosan ile enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Enkapsülasyonun amacı, bakteriyofajların stabilitesini artırmak ve çevresel faktörlere karşı koruma sağlayarak, gıda güvenliği ve terapötik uygulamalarda uzun süreli etkinliklerini korumaktır. Çalışmanın sonucunda elde edilen bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- Öncelikle uygun iyonik jelleşme şartlarının belirlenmesi için bileşenlerin farklı oranlarıdan kitosan poartiküller üretilmiş ve bu partiküllerden dar bir boyut dağımı gösteren ve 300 nm'den küçük partikül üğretilen yöntem belirlenmiştir.

- Belirlenen iyonik jelleşme şartlarıyla bakteriyofaj K'nın başarılı bir şekilde kitosan nanopartiküllerine enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Dinamik ışık saçılması (DLS) ile yapılan analizlerde, oluşan nanopartiküllerin ortalama hidrodinamik çapı 244,8 nm olarak ölçülmüş ve PDI değeri 0,238 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, nanopartiküllerin monodispers bir dağılım gösterdiğini ortaya koymuştur.

- SEM görüntüleri küresel morfolojiye sahip nanopartiküllerin oluştuğunu ve homojen bir boyut dağılımının bulunduğunu göstermiştir. Ayrıca bu yöntemde elde edilen boyut değerleri DLS yöntemiyle de uyumlu çıkmıştır.

- FTIR spektroskopisi ile yapılan analizler, kitosan ve bakteriyofaj K'nın karakteristik fonksiyonel gruplarının varlığını doğrulamış ve partikül yüzeyinde faj adsorpsiyonu bulunduğu gösterilmiştir.

Enkapsülasyon verimi yaklaşık %40,76 olarak hesaplanmıştır. İn vitro salım çalışmaları sonucunda ise, 5 günde enkapsüle fajların %90'ından fazlasını salındığı gösterilmiştir.

- Çift agar yöntemi kullanılarak yapılan litik aktivite testlerinde, enkapsüle edilen ve serbest bırakılan bakteriyofajların *S. aureus*'a karşı etkinliği değerlendirilmiştir. 3., 4. ve 5. günlerde alınan salım örneklerinde litik

aktivite gözlemlenmiş ve sırasıyla $2{,}36x10^3$, 6x10 ve $4{,}65x10^3$ PFU/ml değerleri elde edilmiştir.

- Litik aktivite testi sonuçlarının UV-Vİs spektrometresiyle elde edilen değerlerden oldukça düşük olması kullanılan iyonik jelleşme yöntemiyle enkapsülasyon işlemi sırasında fajların aktivite kaybına uğradığını göstermiştir.

Elde edilen bulgular, bakteriyofaj K'nin kitosan ile enkapsüle edilebildiğini ancak biyolojik aktivite kaybına yol açabileceğini göstermiştir. Gelecek çalışmalarda, farklı sentez parametrelerinin (kitosan konsantrasyonu, çapraz bağlayıcı oranı vb.) bakteriyofaj enkapsülasyonu üzerindeki etkileri daha ayrıntılı olarak incelenmesi ve özellikle biyolojik etkinlik üzerine etkisi ayrıntılı araştırılmalıdır. Bu optimizasyon çalışmaları, enkapsülasyon verimini artırabildiği gibi salım profilini ve litik aktivitiyi değiştirebilecektir. Ayrıca, farklı bakteriyofaj türlerinin kitosan ile enkapsülasyonu araştırılabilir. Bu sayede, bu yöntemin diğer fajlarda da litik aktiviteye etkisi incelenebilecektir. Enkapsüle edilen bakteriyofajların biyouyumluluğu ve güvenilirliği üzerine yapılacak in vitro çalışmalar da, terapötik uygulamalarda kullanımlarının önünü açacaktır.

Ayrıca, kitosan ve diğer biyopolimerlerin bakteriyofajların enkapsülasyonu ve stabilizasyonunda daha fazla araştırılması, bu alanda yenilikçi çözümlerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Bu çalışmalar, ilaç, gıda, kozmetik ve diğer endüstrilerde uygulanabilirliğini artıracaktır.

Sonuç olarak, bu çalışma, kitosan ile yapılan bakteriyofaj K enkapsülasyonunun potansiyelini ortaya koyarak, gıda güvenliği ve terapötik uygulamalar için yeni bir yaklaşım sunmaktadır. Elde edilen bakteriyofaj K yüklü kitosan nanopartiküllerinin gıda güvenliği ve terapötik uygulamalar için kullanım potansiyeli bulunmakta ancak biyolojik aktivitesinin yükseltilmesine yönelik ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKÇA

[1] S. Samir, “Bacteriophages as Therapeutic Agents: Alternatives to Antibiotics,” *Recent Patents on Biotechnology*, vol. 15, Jan. 2021.

[2] D. Romero-Calle, R. G. Benevides, A. Góes-Neto, and C. Billington, “Bacteriophages as Alternatives to Antibiotics in Clinical Care,” *Antibiotics*, vol. 8, no. 3, Sep. 2019.

[3] N. I. Buyuk, P. P. Arayici, S. Derman, and Z. M. Yucel, “Synthesis of Chitosan Nanoparticles for Controlled Release of Amiodarone,” *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 82, no. 1, pp. 131–138, Feb. 2020.

[4] S.-G. Kim *et al*., “Prolongation of Fate of Bacteriophages In Vivo by Polylactic-Co-Glycolic-Acid/Alginate-Composite Encapsulation,” *Antibiotics*, vol. 11, no. 9, p. 1264, Sep. 2022.

[5] A. Entezari *et al*., “Comprehensive Characterization of Gelatin-Pullulan Blend Films Incorporated with Bacteriophages: Assessing Physicochemical, Mechanical, Optical, Thermal, and Antimicrobial Properties,” *Food and Bioprocess Technology*, May 2024.

[6] H. K. Büyükbayraktar *et al*., “Effect of Polycation Coating on the Long-Term Pulsatile Release of Antigenic ESAT-61–20 Peptide from PLGA Nanoparticles,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 228, pp. 113421, Aug. 2023.

[7] A. Mohanty, B. Shaw, N. Pradeep, N. K. Singh, and K. Venkateswaran, “Exploring the Potential of Bacteriophages on Earth and Beyond,” *Journal of the Indian Institute of Science*, vol. 103, no. 3, pp. 711–720, May 2023.

[8] W. C. Summers, "Felix Hubert d’Herelle (1873–1949): History of a Scientific Mind," *Bacteriophage*, vol. 6, p. 1270090, Jun. 2016.

[9] W. C. Summers, “The Discovery of Bacteriophages and the Historical Context,” *Springer eBooks*, vol. 25, pp. 387–400, Jan. 2021.

[10] M. Lobocka, H. Ackermann, A. Kropinski, J. Kuhn, and E. Adriaenssens, “To Create One (1) New Genus, Kayvirus, Including Six (6) New Species within the Family Myoviridae,” vol. 2, no. 1, 2015.

[11] L. A. Estrella *et al*., "Characterization of Novel *Staphylococcus aureus* Lytic Phage and Defining Their Combinatorial Virulence Using the OmniLog System," *Bacteriophage*, vol. 6, no. 3, p. 1219440, Jul. 2016.

[12] M. Elbreki, R. P. Ross, C. Hill, J. O'Mahony, O. McAuliffe, and A. Coffey, "Bacteriophages and Their Derivatives as Biotherapeutic Agents in Disease Prevention and Treatment," *Journal of Viruses*, vol. 2014, pp. 1–20, 2014.

[13] I. U. Haq, W. N. Chaudhry, M. N. Akhtar, S. Andleeb, and I. Qadri, "Bacteriophages and Their Implications on Future Biotechnology: A Review," *Virology Journal*, vol. 9, no. 1, Jan. 2012.

[14] T. S. Sada and T. S. Tessema, "Isolation and Characterization of Lytic Bacteriophages From Various Sources in Addis Ababa Against Antimicrobial-Resistant Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains and Evaluation of Their Therapeutic Potential," *BMC Infectious Diseases*, vol. 24, no. 1, Mar. 2024.

[15] O. Adesanya, T. Oduselu, O. Akin-Ajani, O. M. Adewumi, and O. G. Ademowo, "An Exegesis of Bacteriophage Therapy: An Emerging Player in the Fight Against Anti-Microbial Resistance," *AIMS Microbiology*, vol. 6, no. 3, pp. 204–230, 2020.

[16] M. Zhang, T. Zhang, M. Yu, Y.-L. Chen, and M. Jin, "The Life Cycle Transitions of Temperate Phages: Regulating Factors and Potential Ecological Implications," *Viruses*, vol. 14, no. 9, p. 1904, 2022.

[17] Z. Chegini, A. Khoshbayan, S. Vesal, A. Moradabadi, A. Hashemi, and A. Shariati, "Bacteriophage Therapy for Inhibition of Multi Drug-Resistant Uropathogenic Bacteria: A Narrative Review," *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, vol. 20, no. 1, Apr. 2021.

[18] I. Union and I. Union, "International Journal of Food Microbiology." *Elsevier Science Publishers B.V.: Amsterdam, The Netherlands*, vol. 20, no. 1, Jul. 1984.

[19] L. P. P. Braga *et al*., "Impact of Phages on Soil Bacterial Communities and Nitrogen Availability Under Different Assembly Scenarios," *Microbiome*, vol. 8, no. 1, Apr. 2020.

[20] Y. Wang, Y. Liu, Y. Wu, N. Wu, W. Liu, and X. Wang, "Heterogeneity of Soil Bacterial and Bacteriophage Communities in Three Rice Agroecosystems and Potential Impacts of Bacteriophage on Nutrient Cycling," *Environmental Microbiome*, vol. 17, no. 1, Apr. 2022.

[21] S. Tasdurmazli, S. Dokuz, B. Erdogdu, I. Var, J. Y.-S. Chen, and T. Ozbek, "The Evaluation of Biotechnological Potential of Gp144, the Key Molecule of Natural Predator Bacteriophage K in *Staphylococcus aureus* Hunting Mechanism," *Biotechnology Journal*, vol. 18, no. 10, Jun. 2023.

[22] A. H. Azam and Y. Tanji, "Peculiarities of *Staphylococcus aureus* Phages and Their Possible Application in Phage Therapy," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 103, no. 11, pp. 4279–4289, Apr. 2019.

[23] M. Lobocka, H. Ackermann, A. Kropinski, J. Kuhn, and E. Adriaenssens, "To Create One (1) New Genus, Kayvirus, Including Six (6) New Species Within the Family *Myoviridae*," vol. 2, no. 1, 2015.

[24] L. A. Estrella *et al*., "Characterization of Novel *Staphylococcus aureus* Lytic Phage and Defining Their Combinatorial Virulence Using the OmniLog System," *Bacteriophage*, vol. 6, no. 3, p. 1219440, Jul. 2016.

[25] R. M. Carlton, W. H. Noordman, B. Biswas, E. D. de Meester, and M. J. Loessner, "Bacteriophage P100 for Control of *Listeria monocytogenes* in Foods: Genome Sequence, Bioinformatic Analyses, Oral Toxicity Study, and Application," *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, vol. 43, no. 3, pp. 301–312, Dec. 2005.

[26] O. Boyacioglu, A. Sulakvelidze, M. Sharma, and I. Goktepe, "Effect of a Bacteriophage Cocktail in Combination With Modified Atmosphere Packaging in Controlling *Listeria monocytogenes* on Fresh-Cut Spinach," *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, vol. 55, no. 1, pp. 74–79, Jun. 2016.

[27] G. Crini, "Historical Landmarks in the Discovery of Chitin," *Sustainable Agriculture Reviews 35*, pp. 1–47, Sep. 2019.

[28] I. Aranaz *et al*., "Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications," *Polymers*, vol. 13, no. 19, p. 3256, Sep. 2021.

[29] S. Hsu, S. W. Whu, C.-L. Tsai, Y.-H. Wu, H.-W. Chen, and K.-H. Hsieh, "Chitosan as Scaffold Materials: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation," *Journal of Polymer Research*, vol. 11, no. 2, pp. 141–147, Jun. 2004.

[30] B. E. Teixeira-Costa and C. T. Andrade, "Chitosan as a Valuable Biomolecule from Seafood Industry Waste in the Design of Green Food Packaging," *Biomolecules*, vol. 11, no. 11, p. 1599, Oct. 2021.

[31] C.-L. Ke, F.-S. Deng, C.-Y. Chuang, and C.-H. Lin, “Antimicrobial Actions and Applications of Chitosan,” *Polymers*, vol. 13, no. 6, p. 904, Mar. 2021.

[32] L. G. Confederat, C. G. Tuchilus, M. Dragan, M. Sha’at, and O. M. Dragostin, “Preparation and Antimicrobial Activity of Chitosan and Its Derivatives: A Concise Review,” *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 26, no. 12, Jun. 2021.

[33] O. Khubiev, A. R. Egorov, A. A. Kirichuk, B. H. Хрусталев, A. G. Tskhovrebov, and A. S. Kritchenkov, “Chitosan-Based Antibacterial Films for Biomedical and Food Applications,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, no. 13, p. 10738, Jun. 2023.

[34] N. Morin-Crini, E. Lichtfouse, G. Torri, and G. Crini, “Applications of Chitosan in Food, Pharmaceuticals, Medicine, Cosmetics, Agriculture, Textiles, Pulp and Paper, Biotechnology, and Environmental Chemistry,” *Environmental Chemistry Letters*, vol. 23, Jul. 2019.

[35] M. Kurek, I. E. Garofulić, M. T. Bakić, M. Ščetar, V. D. Uzelac, and K. Galić, “Development and Evaluation of a Novel Antioxidant and pH Indicator Film Based on Chitosan and Food Waste Sources of Antioxidants,” *Food Hydrocolloids*, vol. 84, pp. 238–246, Nov. 2018.

[36] U. Shahbaz, S. Basharat, U. Javed, *et al*., “Chitosan: A Multipurpose Polymer in Food Industry,” *Polymer Bulletin*, vol. 80, pp. 3547–3569, 2023.

[37] K. Jafernik, A. Ładniak, E. Blicharska, K. Czarnek, H. Ekiert, A. E. Wiącek, and A. Szopa, “Chitosan-Based Nanoparticles as Effective Drug Delivery Systems: A Review,” *Molecules*, vol. 28, 2023.

[38] G. Rahimzadeh *et al*., “Encapsulation of Bacteriophage Cocktail Into Chitosan for the Treatment of Bacterial Diarrhea,” *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, p. 15603, Aug. 2021.

[39] M. Sikora, S. Wąsik, J. Semaniak, Z. Drulis-Kawa, M. Wiśniewska-Wrona, and M. Arabski, “Chitosan-Based Matrix as a Carrier for Bacteriophages,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 108, no. 1, Jan. 2024.

[40] R. C. Choudhary *et al*., “Characterization Methods for Chitosan-Based Nanomaterials,” in *Plant Nanobionics*, R. Prasad, Ed. Cham: Springer, 2019.

[41] G. Kerch and V. Korkhov, “Effect of Storage Time and Temperature on Structure, Mechanical and Barrier Properties of Chitosan-Based Films,” *European Food Research and Technology*, vol. 232, pp. 17–22, 2011.

[42] J. Tahmaz, “Encapsulation and Its Possible Application in the Technology of Ready-Made and Ready to Eat Food: A Review,” in *32nd Scientific-Expert Conference of Agriculture and Food Industry*, M. Brka *et al.*, Eds. Cham: Springer, 2023, *Lecture Notes in Bioengineering*.

[43] D. Řepka, A. Kurillová, Y. Murtaja, and L. Lapčík, “Application of Physical-Chemical Approaches for Encapsulation of Active Substances in Pharmaceutical and Food Industries,” *Foods*, vol. 12, no. 11, p. 2189, May 2023.

[44] S. Valdivia Rivera, N. Pacheco López, M. Lizardi-Jiménez, T. Ayora, N. García-Cruz, and J. C. Cuevas-Bernardino, “Encapsulation of Microorganisms for Bioremediation: Techniques and Carriers,” *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, vol. 20, 2021.

[45] Z. Fang and B. Bhandari, “Spray Drying of Bioactives,” in *Engineering Foods for Bioactives Stability and Delivery*, Y. Roos and Y. Livney, Eds. New York, NY: Springer, 2017, *Food Engineering Series*.

[46] R. Rajam and P. Subramanian, “Encapsulation of Probiotics: Past, Present and Future,” *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, vol. 11, p. 46, 2022.

[47] Y. P. Timilsena, T. O. Akanbi, N. Khalid, B. Adhikari, and C. J. Barrow, “Complex Coacervation: Principles, Mechanisms and Applications in Microencapsulation,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 121, pp. 1276–1286, 2019.

[48] G. Purohit and D. S. Rawat, “Characterization Techniques for Chitosan and Its Based Nanocomposites,” in *Chitosan-Based Nanocomposite Materials*, S. Gulati, Ed. Singapore: Springer, 2022.

[49] C. Gómez-Gaete, J. Avendaño-Godoy, D. Escobar-Avello, *et al.*, “Revolutionizing Fruit Juice: Exploring Encapsulation Techniques for Bioactive Compounds and Their Impact on Nutrition, Flavour and Shelf Life,” *Food Production, Processing and Nutrition*, vol. 6, p. 8, 2024.

[50] N. H. Hoang, T. Le Thanh, R. Sangpueak, J. Treekoon, C. Saengchan, W. Thepbandit, N. K. Papathoti, A. Kamkaew, and N. Buensanteai, “Chitosan Nanoparticles-Based Ionic Gelation Method: A Promising Candidate for Plant Disease Management,” *Polymers*, vol. 14, no. 4, p. 662, Feb. 2022.

[51] E. S. Kim, Y. Baek, H.-J. Yoo, J.-S. Lee, and H. G. Lee, “Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles Prepared by Ionic Gelation Improve the Antioxidant Activities of Astaxanthin in the In Vitro and In Vivo Model,” *Antioxidants*, vol. 11, no. 3, p. 479, 2022.

[52] J. Wang, H. Tan, A. Yu, P. Ling, H. Lou, G. Zhai, and J. Wu, “Preparation of Chitosan-Based Nanoparticles for Delivery of Low Molecular Weight Heparin,” *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 7, no. 5, pp. 696–703, Oct. 2011.

[53] E. Bahreini, K. Aghaiypour, R. Abbasalipourkabir, A. Rezaei, M. Goodarzi, and M. Saidijam, “Preparation and Nanoencapsulation of L-Asparaginase II in Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticles and In Vitro Release Study,” *Nanoscale Research Letters*, vol. 9, p. 340, 2014.

[54] G. Michailidou, N. M. Ainali, E. Xanthopoulou, S. Nanaki, M. Kostoglou, E. N. Koukaras, and D. N. Bikiaris, “Effect of Poly(Vinyl Alcohol) on Nanoencapsulation of Budesonide in Chitosan Nanoparticles via Ionic Gelation and Its Improved Bioavailability,” *Polymers*, vol. 12, no. 5, p. 1101, 2020.

[55] K. G. H. Desai and H. Jin Park, “Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients,” *Drying Technology*, vol. 23, no. 7, pp. 1361–1394, Jul. 2005.

[56] K. G. Desai, “Chitosan Nanoparticles Prepared by Ionotropic Gelation: An Overview of Recent Advances,” *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, vol. 33, no. 2, pp. 107–158, 2016.

[57] S. A. Agnihotri, N. N. Mallikarjuna, and T. M. Aminabhavi, “Recent Advances on Chitosan-Based Micro- and Nanoparticles in Drug Delivery,” *Journal of Controlled Release*, vol. 100, no. 1, pp. 5–28, Nov. 2004.

[58] P. Calvo, C. Remun-Lopez, J. L. Vila-Jato, and M. J. Alonso, “Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers,” *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 63, no. 1, pp. 125–132, Jan. 1997.

[59] S. A. Agnihotri, N. N. Mallikarjuna, and T. M. Aminabhavi, “Recent Advances on Chitosan-Based Micro- and Nanoparticles in Drug Delivery,” *Journal of Controlled Release*, vol. 100, no. 1, pp. 5–28, Nov. 2004.

[60] M. Rinaudo, “Chitin and Chitosan: Properties and Applications,” *Progress in Polymer Science*, vol. 31, no. 7, pp. 603–632, Jul. 2006.

[61] H. No, “Antibacterial Activity of Chitosans and Chitosan Oligomers With Different Molecular Weights,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 74, no. 1–2, pp. 65–72, Mar. 2002.

[62] I. M. Helander, E.-L. Nurmiaho-Lassila, R. Ahvenainen, J. Rhoades, and S. Roller, “Chitosan Disrupts the Barrier Properties of the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria,” *International Journal of Food Microbiology*, vol. 71, no. 2–3, pp. 235–244, Dec. 2001.

[63] M. Vargas, A. Albors, A. Chiralt, and C. González-Martínez, “Characterization of Chitosan–Oleic Acid Composite Films,” *Food Hydrocolloids*, vol. 23, no. 2, pp. 536–547, Mar. 2009.

[64] M. Vargas, A. Albors, A. Chiralt, and C. González-Martínez, “*Characterization of chitosan–oleic acid composite films*,” Food Hydrocolloids, vol. 23, no. 2, pp. 536–547, Mar. 2009.

[65] M. Rinaudo, “Main Properties and Current Applications of Some Polysaccharides as Biomaterials,” *Polymer International*, vol. 57, no. 3, pp. 397–430, 2008.

[66] M. Lavertu *et al*., “A Validated 1H NMR Method for the Determination of the Degree of Deacetylation of Chitosan,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 32, no. 6, pp. 1149–1158, Aug. 2003.

[67] R. V. Kumaraswamy *et al*., “Engineered Chitosan-Based Nanomaterials: Bioactivities, Mechanisms and Perspectives in Plant Protection and Growth,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 113, pp. 494–506, Jul. 2018.

[68] S. P. Facchi *et al*., “Preparation and Cytotoxicity of N-Modified Chitosan Nanoparticles Applied in Curcumin Delivery,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 87, pp. 237–245, Jun. 2016.

[69] A. Negi and K. K. Kesari, “Chitosan Nanoparticle Encapsulation of Antibacterial Essential Oils,” *Micromachines*, vol. 13, no. 8, p. 1265, Aug. 2022.

[70] A. K. Grewal and R. K. Salar, “Chitosan Nanoparticle Delivery Systems: An Effective Approach to Enhancing Efficacy and Safety of Anticancer Drugs,” *Nano TransMed*, pp. 100040, Jun. 2024.

[71] M. Yanat and K. Schroën, “Preparation Methods and Applications of Chitosan Nanoparticles; With an Outlook Toward Reinforcement of Biodegradable Packaging,” *Reactive and Functional Polymers*, vol. 161, p. 104849, Apr. 2021.

[72] T. Ahmed and B. Aljaeid, “Preparation, Characterization, and Potential Application of Chitosan, Chitosan Derivatives, and Chitosan Metal Nanoparticles in Pharmaceutical Drug Delivery,” *Drug Design, Development and Therapy*, p. 483, Jan. 2016.

[73] B. Loh, V. S. Gondil, P. Manohar, F. M. Khan, H. Yang, and S. Leptihn, “Encapsulation and Delivery of Therapeutic Phages,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 87, no. 5, Feb. 2021.

[74] A. Choińska-Pulit, P. Mituła, P. Śliwka, W. Łaba, and A. Skaradzińska, “Bacteriophage Encapsulation: Trends and Potential Applications,” *Trends in Food Science & Technology*, vol. 45, no. 2, pp. 212–221, Oct. 2015.

[75] C. J. Cremin, S. Dash, and X. Huang, “Big Data: Historic Advances and Emerging Trends in Biomedical Research,” *Current Research in Biotechnology*, vol. 4, pp. 138–151, 2022.

[76] B. Loh, V. S. Gondil, P. Manohar, F. M. Khan, H. Yang, and S. Leptihn, “Encapsulation and Delivery of Therapeutic Phages,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 87, no. 5, Feb. 2021.

[77] D. J. Malik *et al*., “Formulation, Stabilization and Encapsulation of Bacteriophage for Phage Therapy,” *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 249, pp. 100–133, Nov. 2017.

[78] G. Rahimzadeh *et al*., “Encapsulation of Bacteriophage Cocktail Into Chitosan for the Treatment of Bacterial Diarrhea,” *Scientific Reports*, vol. 11, no. 1, p. 15603, Aug. 2021.

[79] I. Kawacka, A. Olejnik-Schmidt, M. Schmidt, and A. Sip, “Effectiveness of Phage-Based Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Food Products and Food Processing Environments,” *Microorganisms*, vol. 8, no. 11, p

[80] M. J. Estorninho and P. Teixeira, “Fighting *Listeria monocytogenes* With Bacteriophages: Biotechnology for Food Safety,” *Sustainable Development Goals Series*, pp. 265–271, Jan. 2023.

[81] D. J. Malik *et al*., “Formulation, Stabilization and Encapsulation of Bacteriophage for Phage Therapy,” *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 249, pp. 100–133, Nov. 2017.

[82] D. Rosner and J. Clark, “Formulations for Bacteriophage Therapy and the Potential Uses of Immobilization,” *Pharmaceuticals*, vol. 14, no. 4, p. 359, Apr. 2021.

[83] R. Jamaledin *et al*., “PLGA Microparticle Formulations for Tunable Delivery of a Nano-Engineered Filamentous Bacteriophage-Based Vaccine: In Vitro and In Silico-Supported Approach,” *Journal of Nanostructure in Chemistry*, Jan. 2023.

[84] D. J. Malik *et al*., “Formulation, Stabilization and Encapsulation of Bacteriophage for Phage Therapy,” *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 249, pp. 100–133, Nov. 2017.

[85] B. Reyneke, B. Havenga, M. Waso-Reyneke, S. Khan, and W. Khan, “Benefits and Challenges of Applying Bacteriophage Biocontrol in the Consumer Water Cycle,” *Microorganisms*, vol. 12, no. 6, p. 1163, Jun. 2024.

[86] A. S. Abdelsattar, F. Abdelrahman, A. Dawoud, I. F. Connerton, and A. El-Shibiny, “Encapsulation of *E. coli* Phage ZCEC5 in Chitosan-Alginate Beads as a Delivery System in Phage Therapy,” *AMB Express*, vol. 9, no. 1, Jun. 2019.

[87] M. Hasan, K. Elkhoury, C. J. F. Kahn, E. Arab-Tehrany, and M. Linder, “Preparation, Characterization, and Release Kinetics of Chitosan-Coated Nanoliposomes Encapsulating Curcumin in Simulated Environments,” *Molecules*, vol. 24, no. 10, p. 2023, May 2019.

[88] B. Loh, V. S. Gondil, P. Manohar, F. M. Khan, H. Yang, and S. Leptihn, “Encapsulation and Delivery of Therapeutic Phages,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 87, no. 5, Feb. 2021.

[89] L. D. Melo *et al*., “Development of a Phage Cocktail to Control *Proteus mirabilis* Catheter-Associated Urinary Tract Infections,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, p. 1024, Jun. 2016.

[90] A. M. Kropinski, A. Mazzocco, T. E. Waddell, E. Lingohr, and R. P. Johnson, “Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay,” *Methods in Molecular Biology*, pp. 69–76, 2009.

[91] A. S. Abdelsattar, F. Abdelrahman, A. Dawoud, *et al*., “Encapsulation of *E. coli* Phage ZCEC5 in Chitosan-Alginate Beads as a Delivery System in Phage Therapy,” *AMB Express*, vol. 9, no. 87, 2019.

[92] A. Entezari, J. C. C. P. Costa, R. Morcillo-Martín, *et al*., “Comprehensive Characterization of Gelatin-Pullulan Blend Films Incorporated With

Bacteriophages: Assessing Physicochemical, Mechanical, Optical, Thermal, and Antimicrobial Properties," *Food Bioprocess Technology*, 2024.

[93] G. Rahimzadeh, M. Saeedi, M. Moosazadeh, *et al*., "Encapsulation of Bacteriophage Cocktail Into Chitosan for the Treatment of Bacterial Diarrhea," *Scientific Reports*, vol. 11, no. 15603, 2021.

[94] L. S. Batalha, M. T. P. Gontijo, A. V. N. de Carvalho Teixeira, D. M. G. Boggione, M. E. Soto Lopez, M. R. Eller, and R. C. S. Mendonça, "Encapsulation in Alginate-Polymers Improves Stability and Allows Controlled Release of the UFV-AREG1 Bacteriophage," *Food Research International*, vol. 139, p. 109947, 2021.

[95] Y. Zhu, J. Shang, C. Peng, and Y. Sun, "Phage Family Classification Under Caudoviricetes: A Review of Current Tools Using the Latest ICTV Classification Framework," Frontiers in Microbiology, vol. 13, Dec. 2022.