

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RUŞEYM YAĞININ  
SACCHAROMYCES CEREVISIAE HÜCRESİ İLE  
BİYOKAPSÜLASYONU VE BİYOKAPSÜLLERİN KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Nilgün ÇETİNKAYA**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Tuğça BİLENLER KOÇ**

**TEMMUZ 2021**

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RUŞEYM YAĞININ  
SACCHAROMYCES CEREVISIAE HÜCRESİ İLE  
BİYOKAPSÜLASYONU VE BİYOKAPSÜLLERİN KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Nilgün ÇETİNKAYA  
36183620009**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Tuğça BİLENLER KOÇ  
Eş Danışman: Prof. Dr. İhsan KARABULUT**

**TEMMUZ 2021**

## TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının her aşamasında yardım, öneri, bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgemededen beni her konuda yönlendiren değerli danışman ve eş danışman hocalarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Tuğça BİLENLER KOÇ'a ve Prof. Dr. İhsan KARABULUT'a,

Bilgi ve desteğini esirgemeyen Sayın hocalarım Dr. Öğr. Üyesi İncilay GÖKBULUT'a ve Dr. Öğr. Üyesi Ayla HANÇER'e,

Hayatımın her anında olduğu gibi tez çalıőmam süresinde de destek aldığım, benim için güç kaynağı olan AİLEME,

Tezin uygulama aşamasında FYL-2019-1707 No'lu proje ile araőtırmama vermiő oldukları maddi ve manevi destekten dolayı, İnönü Üniversitesi BAP birimine

teşekkür ederim.

## ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum ‘‘Ruşeym yağının *Saccharomyces cerevisiae* hücresi ile biyokapsülasyonu ve biyokapsüllerin karakterizasyonu’’ başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Nilgün ÇETİNKAYA



## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ .....	i
ONUR SÖZÜ .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ÖZET.....	viii
ABSTRACT .....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER VE UYGULAMALAR .....</b>	<b>4</b>
2.1 Ruşeym Yağı .....	4
2.1.1 Ruşeym yağı üretim yöntemleri .....	4
2.1.2 Ruşeym yağının besin değeri.....	5
2.1.3 Ruşeym yağının fonksiyonel aktivitesi ve sağlıkla ilişkisi.....	9
2.1.4 Ruşeym yağının kullanımı.....	12
2.2 Enkapsülasyon .....	14
2.2.1 Enkapsülasyon yöntemleri.....	16
2.2.2 Kabuk materyal grupları.....	18
2.3 Enkapsülasyonda Kabuk Materyal Olarak <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	20
2.3.1 Maya hücrelerinin kullanım alanları .....	21
2.3.2 Maya hücrelerinin enkapsülasyonda kullanımı .....	21
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>27</b>
3.1 Materyal.....	27
3.1.1 Ruşeym yağı ve ticari ekmek mayası .....	27
3.1.2 Besiyeri ve kimyasallar .....	27
3.2 Yöntem .....	27
3.2.1 Maya hücrelerinin geliştirilmesi.....	28
3.2.2 Manipülasyon (Plazmoliz).....	29
3.2.3 Enkapsül üretimi.....	30
3.3 Analizler .....	32
3.3.1 Ruşeym yağının kromatografik analizleri .....	32
3.3.1.1 GC-FID ile yağ asit kompozisyonu analizi .....	32
3.3.1.2 HPLC ile bileşim analizi .....	33
3.3.2 Enkapsüllerin karakterizasyon testleri.....	34
3.3.2.1 Enkapsülasyon etkinliği ve enkapsül yükleme kapasitesi.....	34
3.3.2.2 Morfolojik yapı.....	35
3.3.2.3 FT-IR spektrumu .....	35
3.3.2.4 Salınım testi .....	35
3.3.2.5 Oksidatif stabilite testleri.....	37
3.3.3 İstatistiksel analiz .....	39
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....</b>	<b>40</b>
4.1 Maya Hücrelerinin Sayımı.....	40
4.2 Ruşeym Yağının Karakterizasyonu .....	41
4.2.1 Yağ asit kompozisyonu .....	41
4.2.2 Tokoferol, fitosterol ve karoten miktarları .....	42
4.3 Enkapsüllerin Karakterizasyonu .....	45
4.3.1 Enkapsüllerin etkinlik değerleri .....	45
4.3.2 Enkapsüllerin yükleme kapasiteleri.....	48

4.3.3 Morfolojik yapı analizi (SEM analizi) .....	52
4.3.4 Salınım testi .....	54
4.3.5 FT-IR analizi .....	56
4.3.6 Oksidatif stabilite analizleri.....	59
4.3.6.1 Ransimat testi .....	59
4.3.6.2 Fırın testi.....	61
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>66</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>69</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>77</b>



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 : Ruşeym yağının tokoferol ve tokotrienol içeriği .....	7
Çizelge 2.2 : Ruşeym yağı bileşenleri ve fonksiyonel özellikleri.....	11
Çizelge 2.3 : Enkapsülasyon uygulamaları ve faydaları .....	16
Çizelge 2.4 : Enkapsülasyon yöntemlerinin gıda endüstrisindeki kullanım alanları	17
Çizelge 2.5 : Gıda endüstrisinde kullanılan doğal kaynaklı duvar malzemeleri.....	19
Çizelge 4.1 : Thoma lamı sayım sonuçları .....	41
Çizelge 4.2 : Ruşeym yağı yağ asit kompozisyonu.....	41
Çizelge 4.3 : Ruşeym yağının tokoferol, fitosterol ve karoten miktarları .....	42
Çizelge 4.4 : Enkapsülasyon etkinliği .....	45
Çizelge 4.5 : Enkapsüllerin yükleme kapasiteleri .....	49
Çizelge 4.6 : Mikroorganizmaların FT-IR frekansları ve biyomoleküler özellikleri.	57
Çizelge 4.7 : Peroksit sayısı sonuçları .....	61
Çizelge 4.8 : <i>p</i> -Anisidin sayısı sonuçları.....	64

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 : Tokoferol ve tokotrienollerin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2.2 : Sterollerin kimyasal yapısı.....	8
Şekil 2.3 : Lutein ve $\beta$ -karoten'in kimyasal yapısı .....	9
Şekil 2.4 : Maya hücresi yapı bileşenleri .....	21
Şekil 3.1 : Sıkıştırılmış ticari ekmek mayası.....	28
Şekil 3.2 : Maya hücrelerinin yıkaması.....	28
Şekil 3.3 : Kabuk materyal hazırlığı .....	29
Şekil 3.4 : Dondurarak kurutulmuş kabuk materyaller: (a)Plazmolize edilmeyen hücre. (b)Plazmolize edilmiş hücre.....	30
Şekil 3.5 : Ultraturax cihazı ve merkez materyallerin homojenizasyonu .....	31
Şekil 3.6 : Thoma lamında hücre sayımı.....	31
Şekil 3.7 : Enkapsül üretimi.....	32
Şekil 3.8 : Ransimat 892 cihazı .....	37
Şekil 3.9 : Fırın testi .....	38
Şekil 4.1 : Thoma lamında sayım: (a)Plazmolize edilmeyen hücre sayımı. (b)Plazmolize edilmiş hücre sayımı .....	40
Şekil 4.2 : Enkapsül örneklerinin etkinlik oranları .....	48
Şekil 4.3 : Enkapsül örneklerinin yükleme kapasiteleri .....	51
Şekil 4.4 : Kontrol grubu, boş enkapsüllerin SEM görüntüleri: (a)Boş plazmoliz su. (b)Boş plazmoliz edilmeyen su. (c)Boş canlı su.....	52
Şekil 4.5 : Dolu enkapsüllerin SEM görüntüleri: (a)Plazmoliz su. (b)Plazmoliz edilmeyen su. (c)Canlı su. ....	53
Şekil 4.6 : Enkapsüllerin insan sindirim sisteminin taklit edildiği koşullarda belirlenen salınım profilleri .....	55
Şekil 4.7 : FT-IR spektrumu .....	56
Şekil 4.8 : Ransimat test sonuçları .....	60
Şekil 4.9 : Peroksit sayısı .....	62
Şekil 4.10 : <i>p</i> -Anisidin sayısı .....	64



## SEMBOLLER VE KISALTMALAR

<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>g</b>	: Gram
<b>kg</b>	: Kilogram
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>cm<sup>3</sup></b>	: Santimetre küp
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>L</b>	: Litre
<b>dk</b>	: Dakika
<b>sa</b>	: Saat
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>ppm</b>	: Milyon başına düşen birim
<b>mol</b>	: Avogadro sayısı kadar atom ya da molekül içeren madde miktarı
<b>m</b>	: Kütle
<b>v</b>	: Hacim
<b>Tween 80</b>	: Polioksietilen(20) sorbitan monooleat
<b>rpm</b>	: 1 dakika içerisinde gerçekleştirilen dönüş/devir sayısı
<b>EE</b>	: Enkapsülasyon etkinliği
<b>EY</b>	: Enkapsül yükleme kapasitesi
<b>β-SD</b>	: Beta-Siklodekstrin
<b>GRAS</b>	: Generally Recognized as Safe (Genel olarak güvenilir kabul edilen)
<b>FDA</b>	: U.S. Food and Drug Administration (Amerikan gıda ve ilaç dairesi)
<b>EFSA</b>	: European Food Safety Authority
<b>KMS</b>	: Karboksi Metil Selüloz
<b>TEM</b>	: Transmission Electron Microscope
<b>SEM</b>	: Scanning Electron Microscope
<b>FT-IR</b>	: Fourier Transform Infrared
<b>HPLC</b>	: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
<b>GC-FID</b>	: Gas Chromatography-Flame Ionization Detection
<b>meq</b>	: Miliekivalan

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### RUŞEYM YAĞININ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* HÜCRESİ İLE BİYOKAPSÜLASYONU VE BİYOKAPSÜLLERİN KARAKTERİZASYONU

NİLGÜN ÇETİNKAYA

İnönü Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

77+ix sayfa

2021

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tuğça BİLENLER KOÇ

Un üretimi esnasında yan ürün olarak ortaya çıkan ruşeym, yaklaşık %11 oranında yağ içermektedir. Ruşeym yağı, fitosteroller, polikosanoller, tiamin, riboflavin ve niasin gibi değerli fitokimyasallar bakımından oldukça zengin bir kaynak olmasının yanı sıra, bilinen bitkisel yağlar içerisinde en yüksek  $\alpha$ -tokoferol içeriğine sahiptir. Aynı zamanda güçlü biyoaktivite gösteren oleik ve linoleik asit gibi çevre koşullarına karşı kararsız olan ve kolaylıkla okside olabilen kıymetli bileşenlerin iyi bir kaynağıdır. Stabilitesinin düşük olması sebebiyle gıda üretim proseslerinde ve depolama süreçlerinde kontrolü zor ve buna bağlı olarak da kullanımı oldukça sınırlıdır. Bu sebepten insan beslenmesinde yeterince kullanılmamaktadır. Bu çalışmanın amacı ruşeym yağının, *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri kullanılarak kapsüllemeyle oksidasyon problemini çözmek ve kontrollü salınımı gerçekleştirmektir. Çalışma kapsamında merkez materyal olarak kullanılan ruşeym yağının yağ asit kompozisyonu ve besinsel özelliklerinin belirlenmesinden sonra enkapsül üretimi gerçekleştirilmiştir. Enkapsülasyon işleminde *S. cerevisiae* maya hücrelerinin plazmolize edilmiş (P), plazmolize edilmemiş (n-P) ve canlı (C) formları hazırlanmıştır, ruşeym yağı:maya hücresinin farklı kütle oranları (0.25, 0.5, 1 ve 2) su ve etanol üretim ortamları kullanılmıştır. Formülasyonlar arasında en yüksek enkapsülasyon etkinliği kabuk materyal olarak P'nin kullanıldığı, 0.25 kütle oranında ve üretim ortamı olarak suyun kullanıldığı formülasyonda belirlenmiştir. Yağ yüklü enkapsüllerin morfolojik yapıları taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiş ve P kabuk materyalinin kullanıldığı enkapsüllerde küresel yapının elde edildiği gözlemlenmiştir. İnsan sindirim sisteminin (ağız, yemek borusu-mide, oniki parmak bağırsağı ve ince bağırsak) taklit edildiği ortamlardaki *in vitro* salınım profilinde, P enkapsüllerinin ruşeym yağını gastrointestinal sistem boyunca bağırsaklara taşımak için uygun duvar materyali olarak kullanılabilmesi saptanmıştır. Ayrıca yapılan Fourier dönüşüm-kızılötesi (FT-IR) analizinde ruşeym yağının başarılı bir şekilde kapsüllendiği ve kapsüllerin içerisinde yağın hapsedildiği tespit edilmiştir.

Elde edilen örneklerin enkapsülasyon öncesi ve sonrası oksidatif stabiliteleri Ransimat tekniği (100°C sıcaklık ve 10 L/sa hava akış hızı) ve 60°C'de 24 gün süresince gerçekleştirilen hızlandırılmış fırın testi ile ölçülmüştür. Ruşeym yağının P kabuk materyalinde enkapsülasyonu ile oksidasyona karşı daha dirençli bir nitelik kazandığı hem ransimat (en yüksek indüksiyon periyoduna 3.39 saat) hem fırın testi ile (en düşük peroksit sayısı:  $9.19 \pm 1.41$  meq  $O_2$ /kg yağ ve en düşük *p*-anisidin değeri:  $34.42 \pm 1.55$ ) belirlenmiştir.

Sonuç olarak ruşeym yağının oksidatif stabilitesinin artırılmasında maya hücrelerinin kullanımı yeni bir yaklaşım olarak araştırılmaktadır. Elde edilen çalışma sonuçları plazmolize edilen maya hücrelerinin olumsuz koşullarda ruşeym yağını oksidasyona karşı koruduğunu ifade etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** ruşeym yağı, maya hücresi, enkapsülasyon, oksidasyon

# ABSTRACT

Master Thesis

## BIOCAPSULATION OF WHEAT GERM OIL WITH *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CELL AND CHARACTERIZATION OF BIOCAPSULES

NİLGÜN ÇETİNKAYA

Inonu University  
Graduate School of Nature and Applied Sciences  
Department of Food Engineering

77+ix sayfa

2021

Supervisor: Assistant Professor Tuğça BİLENLER KOÇ

Wheat germ, which is a by-product of the flour milling process, contains up to 11% oil. In addition to being a very rich source of valuable phytochemicals such as phytosterols, policosanols, thiamine, riboflavin and niacin, germ oil has the highest  $\alpha$ -tocopherol content among known vegetable oils. It is also a good source of valuable ingredients such as oleic and linoleic acid, which show strong bioactivity, which are unstable to environmental conditions and can be easily oxidized. Due to its low stability, it is difficult to control in food production processes and storage processes and consequently its use is very limited. For this reason, it cannot be used sufficiently in human nutrition. The aim of this study is to solve the oxidation problem by encapsulating germ oil using *Saccharomyces cerevisiae* cells and to achieve controlled release. Within the scope of the study, after determining the fatty acid composition and nutritional properties of germ oil used as the core material, encapsulation was produced. Plasmolized (P), non-plasmolized (n-P) and living (C) forms of *S. cerevisiae* yeast cells were used in the encapsulation process. Germ oil: different mass ratios of yeast cell (0.25, 0.5, 1 and 2) water and ethanol production media were used. Among the formulations, the highest encapsulation efficiency was determined in the formulation using P as the shell material, at a mass ratio of 0.25, and using water as the production medium. The morphological structures of the oil-loaded capsules were examined by scanning electron microscopy (SEM) and it was observed that the spherical structure was obtained in the capsules using P shell material. In the in vitro release profile in environments mimicking the human digestive system (mouth, esophagus-stomach, duodenum and small intestine), it was determined that P capsules could be used as suitable wall material to transport germ oil through the gastrointestinal tract to the intestines. In addition, in the Fourier transform-infrared (FT-IR) analysis, it was determined that the germ oil was successfully encapsulated and the oil was imprisoned in the capsules.

The oxidative stability of the samples obtained before and after encapsulation was measured by the Ransimat technique (100°C temperature and 10 L/h air flow rate) and the accelerated oven test performed at 60°C for 24 days. By encapsulation of germ oil in P shell material, it becomes more resistant to oxidation, both by ransimate (3.39 hours to the highest induction period) and oven test (lowest peroxide number: 9.19±1.41 meq O<sub>2</sub>/kg oil and the lowest p-anisidine value: 34.42±1.55) was determined.

As a result, the use of yeast cells in increasing the oxidative stability of germ oil is being investigated as a new approach. The obtained study results indicate that plasmolized yeast cells protect germ oil against oxidation under adverse conditions.

**Keywords:** germ oil, yeast cell, encapsulation, oxidation

# 1. GİRİŞ

Fırıncılık endüstrisinde yaygın olarak kullanılan un, insan beslenmesinde yer alan temel besin maddelerinden biridir. Buğday tanesinin yaklaşık %2-3'lük kısmını oluşturan ruşeym, sahip olduğu yüksek yağ miktarı sebebi ile unun depolanması sürecinde başta oksidasyon olmak üzere, ransit tat ve aroma oluşumu, renk değişimi ve besin değerinde azalma gibi bir takım reaksiyonlara yatkınlık göstermesi sebebi ile unun depolanmasında kritik önem arz etmektedir (Yanishlieva-Maslarova, 2001).

Yaklaşık %11 oranında yağ içeren ve değerli biyoaktif bileşenlerce zengin olan ruşeymden farklı teknikler kullanılarak yenilebilir yağ üretimine yönelik yapılan çalışmalar son yıllarda büyük ilgi uyandırmaktadır. Ruşeym yağı, kullanılan buğday türüne bağlı olarak özellikle çoklu doymamış yağ asitleri ve tokoferoller (vitamin E) olmak üzere yağda çözünebilir biyoaktif bileşikler için mükemmel bir kaynaktır (Arslan ve Çağlar, 2019).

Ruşeym yağında yer alan biyoaktif bileşiklerin yüksek konsantrasyonda tüketimi insan sağlığı üzerine birçok olumlu etkiler göstermiştir. Son zamanlarda ise ruşeym yağı antioksidan özellikleri sayesinde doğurganlık ajanı olarak kullanılmış ve aynı zamanda fonksiyonel bir gıda bileşeni olarak da popülerlik kazanmıştır. Ruşeym yağı, kozmetik ve ilaç sanayiinde de  $\alpha$ -tokoferol kaynağı olarak kullanılmaktadır (Karadeniz ve diğ., 2018). Çeşitli yöntemler kullanılarak elde edilen ruşeym yağının sahip olduğu biyoaktif bileşenlerin başta oksidasyon olmak üzere, gıda prosesine dahil edilmesi halinde ise birçok bozulma ve nitelik kaybı oluşacağı kaçınılmazdır.

Benzer nitelik kayıplarını azaltmak için kimyasal koruma yöntemlerine alternatif olarak kapsülleme gibi gıda matrisindeki fitoaktif bileşiklerin korunması için bazı teknolojik işlemler bulunmaktadır. Kapsülleme, farklı parçacık boyutlarında olabilen, bir duvar malzemesi içinde bir başka bileşiğin hapsedilmesi işlemidir ve bu sayede merkez materyalin ortamdan ayrışması sağlanmaktadır. Kapsüllenmiş malzemeler; moleküler ağırlık, yapı, polarite, yük, fiziksel durum, yoğunluk ve reoloji gibi farklı özelliklere ve antimikrobiyal, aroma, renk, nutrasötik, enzim ve probiyotikler gibi çeşitli işlevlere atfedilen katı parçacıklar, sıvı damlacıklar veya gazlar olabilmektedirler. Malzemeleri kaplamak için oluşturulan matriks, homojen veya heterojen bir durumda proteinler,

polisakkaritler, lipitler, su, yüzey aktif maddeler ve minerallerden oluşabilen bir dağıtım sistemi görevi görmektedir (Garti ve McClements, 2012).

Kapsüllenmiş malzeme, Risch ve Reineccius (1995) tarafından tanımlandığı gibi “aktif, çekirdek malzeme, dolgu, faydalı yük veya iç faz” olarak adlandırılmakta ve “malzemeyi hapseden kapsülleyici, duvar malzemesi, taşıyıcı, zar, kabuk veya kaplama” olarak isimlendirilmektedir. Kapsülleme işleminde etkinlik gösteren; sprey kurutma, emülsiyon, akışkan yataklı kaplama, koaservasyon ve lipozom yakalama gibi yaygın olarak kullanılan birçok kapsülleme yöntemi bulunmaktadır (Pham-Hoang, ve diğ, 2013).

Oldukça kompleks yapıya sahip olan canlı hücrelerin kapsül oluşturucu olarak kullanımı 40 yıl öncesine uzanmaktadır. Mikrobiyal enkapsülasyon (biyokapsülasyon) işlemi olarak bilinen kapsülasyon işlemi, birçok alanda kullanılmıştır (Bishop ve diğ, 1998). Son zamanlarda ise gıda ve bileşenlerinin kapsülasyonunda, en popüler kapsülasyon yöntemlerinden biri olan biyokapsülasyon işlemi; hem çok katmanlı bir hücre duvarı hem de çeşitli iç bölmeler ve antioksidan mekanizmalar içeren, maya hücresinin kabuk materyal olarak kullanıldığı bir yöntemdir. Buna göre maya hücresi zarı, bir kaplama malzemesi olarak düşünülebilir. Maya hücresi, ozmotik basıncı ve hücrenin çevresi ile alışverişini kontrol eden koruyucu bir kapsül gibi davranmaktadır (Pham-Hoang, ve diğ, 2013).

Mayanın hücre duvarı, kapsülleme sürecinde önemli bir role sahiptir çünkü mekanik bir destek sağlar ve moleküllerin hücreye yayılmasına izin verir. Aslında, maya hücreleri, yağda çözünen malzemeler için iyi bir kapsülleme ortamıdır. Hücre duvarı özellikleri kapsüllenecek maddenin hücre içine alınmasında önemli bir rol oynar çünkü ilk temas hücre ve molekül arasında gerçekleşir. Bu nedenle, hidrofobik bir hücre duvarı, yağlar gibi hidrofobik moleküllerin kapsüllemesi için çok uygundur (Shi ve diğ, 2008). Maya kapsüllemesinin ana mekanizması; aktif materyalin elektrostatik özellikler açısından hücre duvarına yapışması ve daha sonra hücre gözenekliliği özelliği açısından pasif difüzyon yoluyla aktif materyalin nüfuz etmesidir (Ciamponi ve diğ, 2012).

Enkapsülasyon teknolojisi ile birçok biyoaktif değere sahip gıda veya gıda bileşenleri kapsüllenmiştir. Örnek olarak; berberin (Salari ve diğ, 2013; Salari ve diğ, 2015), klorojenik asit (Shi ve diğ, 2007), probiyotik bakteri (Mokhtari ve diğ, 2017), zerdeçal (Paramera ve diğ, 2011b), enzim (Chow ve Palecek 2004; Shi ve diğ, 2014), karoten (Pham-Hong ve diğ, 2018), kurkumin (Paramera ve diğ, 2011a), aroma maddeleri (Pham-Hoang ve diğ, 2016; Normand ve diğ, 2005; Dardelle ve diğ, 2007; Sultana ve diğ,

2017), karvakrol (Silva Lima ve diğ, 2017), balık yağı (Czerniak ve diğ, 2015), semiz otu çekirdeği yağı (Kavosi ve diğ, 2017), hibiskus ekstraktı (Nguyen ve diğ, 2018) ve çörekotu yağı (Kahraman, 2020) verilebilir. Farklı maya türleri örneğin, *Saccharomyces cerevisiae* başta olmak üzere, *Candida utilis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Torulopsis lipofera* ve *Endomyces vernalis* enkapsülasyon teknolojisinde kabuk materyal olarak kullanılmaktadır (Ciamponi ve diğ, 2012).

Bu çalışma ile, endüstriyel üretimde yan ürün olarak ortaya çıkan, fakat sahip olduğu majör ve minor bileşenler sayesinde yüksek besin değerine ve biyoaktif özelliklere sahip ruşeym yağının başta oksidasyon olmak üzere pek çok bozulma reaksiyonuna karşı gösterdiği hassasiyet problemini kapsülasyon işlemi ile çözmek hedeflenmiştir.

Bu bağlamda maya hücrelerinin bir kısmı plazmoliz işlemine tabi tutulmuş, plazmoliz edilen ve edilmeyen kabuk materyalleri hazırlanmış, ruşeym yağı farklı maya hücreleri ile kapsüle edilmiştir. Elde edilen kapsüllerin karakterizasyon testleri yapılmış ve en yüksek etkinlik değerinin olduğu formülasyon belirlenmiştir. Maya enkapsüllerin oksidasyondan koruma başarısını belirlemek amacı ile çeşitli oksidasyon testleri (ransimat ve fırın testi) yapılmış ve çalışma kapsamında ruşeym yağındaki oksidatif stabilite gelişimi takip edilmiştir.

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE UYGULAMALAR

### 2.1 Ruşeym Yağı

Graminae familyası, *Triticum* cinsine ait olan buğday insan beslenmesinin temel besin maddelerinden birisidir. Sadece insan diyetinde değil aynı zamanda hayvan yemlerinde de kullanımı ve ayrıca kepek, nişasta ve protein gibi yan ürün eldesine kaynak oluşturacak potansiyele sahip olması nedeniyle gıda sektörü için stratejik bir üründür (Aydoğan ve Soylu, 2017). Buğday genellikle un ve diğer ürünlerin üretimi için farklı teknikler kullanılarak öğütülmektedir. Unun depolanması süresince oksidasyon ve acılaşıma problemini en aza indirmek amacıyla tanenin %2.5-3.8'ini oluşturan ruşeym kısmı yan ürün olarak öğütme esnasında undan ayrılmaktadır (Ghafoor ve diğ, 2017; Zou ve diğ, 2018).

Ruşeym yaklaşık %8-14 arasında yağ içermektedir. Ruşeymin yağ içeriği ekstraksiyon metoduna, ruşeymin saflığına, buğday türüne ve buğdayın yetiştirilme koşullarına göre değişmektedir. Laboratuvar şartlarında ayrılan saf ruşeymlerin yağ içerikleri ticari değirmenlerde elde edilen ruşeymlere göre daha yüksektir. Bu durumun sebebi ticari işlemler sırasındaki bir miktar yağın un bünyesine geçmesi ve böylece meydana gelen yağ kayıplarıdır (Aydoğan ve Soylu, 2017).

#### 2.1.1 Ruşeym yağı üretim yöntemleri

Ruşeym yağı mekanik presleme, organik çözücü ekstraksiyonu, süper kritik sıvı ekstraksiyonu ve basınçlı solvent ekstraksiyonu ile elde edilebilir. Organik çözücü ekstraksiyon yönteminde yağın %99'u geri kazanılabilmektedir. Ruşeym yağı eldesinde hekzanın yanı sıra, daha nadir olmakla birlikte, etanol ve 1,2-dikloroetan kullanılmaktadır (Barnes, 1983). Süper kritik CO<sub>2</sub> destekli ekstraksiyon ve mekanik presleme gibi teknikler yüksek sıcaklık uygulamasından kaçınarak ruşeym yağındaki beslenme açısından önemli ve ısıya duyarlı bileşenlerin bozulmasını en aza indirmektedir (Özcan ve diğ, 2013).

Mekanik prosedürler çözücsüz yağ verebilmektedir, ancak hekzan ekstraksiyonundan daha düşük verim elde edilebilmektedir (Brandolini ve Hidalgo, 2012). Bu nedenlerle ruşeym yağının kalitesi ve sanayileşmesi için, çeşitli ekstraksiyon yöntemlerinin etkileri ve ilgili ekstraksiyon değişkenlerinin dikkate alınması oldukça önem teşkil etmektedir (Ghafoor ve diğ, 2017).

### 2.1.2 Ruşeym yağının besin değeri

Birçok farklı teknikle ruşeymden elde edilen yağ, oldukça yüksek besin değerine sahip çok özel bir gıda bileşenidir (Ghafoor ve diğ, 2017; Eisenmenger ve Dunford 2008; Kan, 2012). Buğday türüne ve üretim prosesine bağlı olarak ruşeym yağının sahip olduğu bileşenler değişmekle birlikte, genel olarak yüksek miktarda tokoferol ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$ ), fitosterol (sterol, 4-metil sterol ve triterpenoller), vitamin, fenolik madde ve esansiyel yağ asitleri (%42-59 linoleik asit, %2-28 oleik asit, %11-19 palmitik asit, %2-11 alfa-linolenik asit) içeriğine sahip olduğu yapılan birçok çalışmada belirtilmiştir (Karabacak ve diğ, 2011).

Ruşeym yağının yağ asidi bileşimi, buğday çeşidine, tohum özelliklerine (olgunluk, ekşime, kalite vb.), ayırma yöntemine, depolama ve ekstraksiyon koşullarına bağlı olarak %5 ile %25 arasında değişebilmektedir (Tokuşoğlu ve Hall, 2011). Ruşeym yağı, trigliseritlerin %80'ini oluşturan çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengindir. Trigliseridlerin %42-59'unu oluşturan linoleik asit (18:2) ruşeym yağında bulunan majör yağ asididir. Ardından palmitik (16:0) ve oleik asit (18:1) gelmektedir. Doymuş bir yağ asidi olan stearik asit genellikle %2'den az oranda bulunmaktadır. Genel olarak palmitik (%13–20), stearik (%2), oleik (%14–23), linoleik (%51–60) ve linolenik (%4–12) asit bulunmaktadır (Brandolini ve Hidalgo, 2012; Barnes, 1983; Zou, 2018). Yüksek miktarda linolenik asit (18:3) yağı oksidatif acılaşmaya karşı hassas hale getirir, ancak ruşeym yağındaki yüksek düzeyde çoklu doymamış yağ asitleri insan sağlığı için önemlidir ve amaç gıda ürünlerindeki doymuş yağ miktarını azaltmak olduğundan, gıda ürünlerinde kullanım için değerli bir özellik olarak kabul edilmektedir (Barnes, 1983; Ghafoor ve diğ, 2017).

Buğday ruşeyminin lipit içeriği unun ekstraksiyon indeksine bağlıdır. Bu lipitler, farklı oranlarda polar olmayan lipitler, glikolipitler ve fosfolipitleri içermektedir. Buğdaydaki lipit bileşimi için rapor edilen verilerin çoğu, polar çözücülerle ekstrakte edilen yağlarla ilgilidir. Neredeyse tamamen polar olmayan lipitlerden oluşan beş ticari yağın toplam polar lipit içeriği %0.2-1.8 ve Soxhlet hekzan ekstraksiyonu ile elde edilen yağın polar lipit içeriği ise %3.6-10.1 aralığında değişmektedir (Ghafoor ve diğ, 2017).

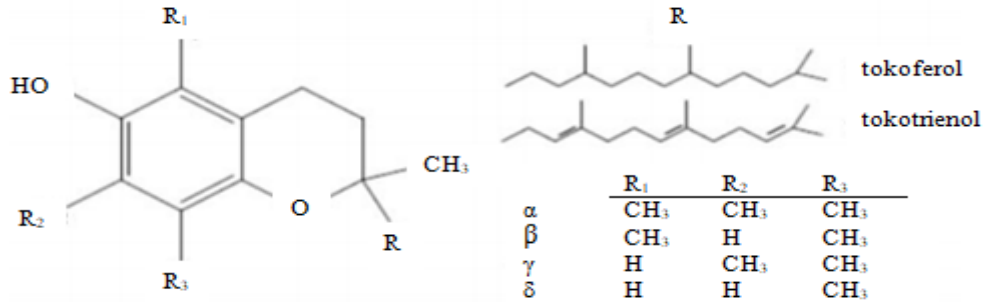
Polar olmayan sınıf lipitler %4-6 steril esterleri, %82-89 trigliseridleri, %6 serbest yağ asitlerini, %4-11 digliseridleri ve %1 monogliseridleri içermektedir. Trigliseridler, tüm yağ örneklerinde majör bileşenlerdir. Hidrolitik acılaşma seviyesindeki farklılıklar, serbest



yağ asidi oranındaki değişiklikten kaynaklanmaktadır (Barnes, 1983). Serbest yağ asitleri gıda maddelerinde acılaşmaya sebep olduğundan dolayı istenmemektedir (Brandolini ve Hidalgo, 2012). Serbest yağ asitliği, ruşeym yağında genellikle %6'dan azdır fakat yağ ekstraksiyonu öncesi ruşeyme yapılan ön işlemler ve ekstraksiyon işleminin değişken koşullarına göre bu değer %25'lere yükselebilmektedir. Mekanik presleme ile elde edilen ruşeym yağındaki serbest yağ asitinin, solvent ekstraksiyonuna göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Serbest yağ asitlerinin gıda ürünlerinde sabunsu ve acı bir tat bırakmaları istenmeyen ve kaliteyi düşüren bir durum oluşturmaktadır (Firestone, 1999).

Ruşeym yağı %4.16 oranında sabunlaşmayan madde içermekte ve sabunlaşmayan madde miktarı diğer yağlara göre oldukça yüksektir (Kan, 2012; Ghafoor ve diğ., 2017). Ruşeym yağının kütle spektrum analizi ile incelenmesi sonucunda sabunlaşmayan beş farklı madde belirlemiştir, bunlar;  $\beta$ -sterol (%64.64), skualen, kolesterol, kampesterol, ve fukosteroldür (Niu ve diğ., 2013), tokoller ve n-alkanoller ise sabunlaşmayan fraksiyonun minör bileşenleri olmalarına rağmen, ticari olarak önemlidir (Barnes, 1983).

Şekil 2.1'de kimyasal yapısı gösterilen ve yenilebilir tahıl tohumu yağlarında bulunan tokoller, fotosentetik organizmalar tarafından üretilen, tokoferoller (doymuş fitil grubu) veya tokotrienoller (üç doymamış fitil grubu) olarak sınıflandırılan ve yağda çözünebilen antioksidanlardır.



**Şekil 2.1 :** Tokoferol ve tokotrienollerin kimyasal yapısı (Özer ve Sarıçoban, 2010).

Tokoller, hidroksil grubunun hidrojenini lipid peroksil radikaline vererek antioksidatif aktivite göstermektedirler ve bu sayede ruşeym yağında bulunan diğer oksidasyona duyarlı bileşenlerin oksidasyonunu önlemektedirler. Ruşeym yağının, diğer yenilebilir bitkisel yağlar arasında en yüksek tokoferol içeriğine sahip olduğu bilinmektedir ve tokoferol ruşeym yağında toplam sabunlaşmayan madde içeriğinin %18'ini oluşturmaktadır (Eisenmenger ve Dunford, 2007). Bütün tokoferoller ve

tokotrienoller esterleşmedikçe antioksidan aktivitelerini sürdürebilmektedirler. Genel olarak yağların tat kalitesinin düşmesinde önemli etkisi olan hidroperoksi ve onların serbest radikallerini tokoller stabilize ederek yağın oksidasyonunu engelleyici yönde etkileri de bulunmaktadır. Ruşeym yağının oksidatif kararlılığı ile tokol içeriği arasında güçlü bir ilişki olduğu bilinmektedir (Arslan ve Kara, 2016).

Tokoferoller kromanol çekirdeğindeki metil gruplarının sayısına ve konumuna bağlı olarak farklı formlara ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$ ) sahiptir. Bu tokoferollerin antioksidan aktivitesi  $\alpha$ 'dan  $\delta$ 'ye yükselirken, vitamin aktivitesi ve peroksit radikalleri ile reaksiyon insidansı azalmaktadır (Ghafoor ve diğ, 2017). Bir kilogram ruşeym yağında bulunan  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$ -tokoferol miktarları sırasıyla yaklaşık 1179, 398, 493 ve 118 mg düzeyinde olduğu bilinmektedir (Megahad ve El Kinawy, 2002). Ruşeym yağında tespit edilen tokoferol ve tokotrienol miktarları Çizelge 2.1'de verilmiştir. Ruşeym yağı ayrıca  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$ -tokoferollere ek olarak daha küçük miktarlarda 5,8-dimetil tokoferol, 7-metil tokotrienol, ve 5,7-dimetil tokotrienol içermektedir. Toplam tokokromanol içeriği 2000–3000 mg/kg aralığında değişmektedir (Chakrabarty, 2003).

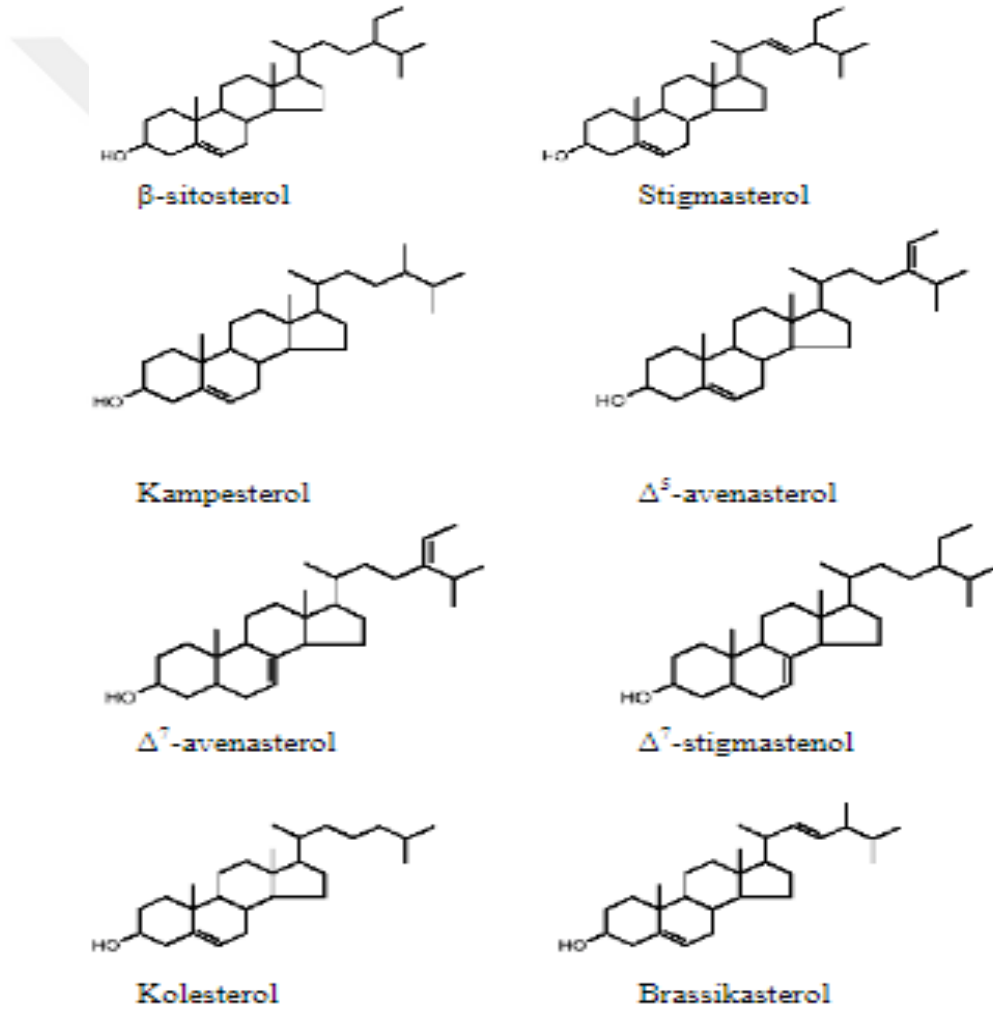
**Çizelge 2.1** : Ruşeym yağının tokoferol ve tokotrienol içeriği (Ghafoor ve diğ, 2017).

Tokoferol ve tokotrienol	Miktar (mg/100g)
$\alpha$ -tokoferol	133.0-256.0
$\alpha$ -tokotrienol	300–700
$\beta$ -tokoferol	60–680
$\beta$ -tokotrienol	250–360
$\gamma$ -tokoferol	6–700
$\gamma$ -tokotrienol	–
$\delta$ -tokoferol	27.1
$\delta$ -tokotrienol	–

Steroller, serbest ya da yağ asitleri ile esterleşmiş olarak bulunabilen ve steran halkası içeren polisiklik alkollerdir. Esansiyel minör bileşenlerden olan sterol molekülü; siklopentano penantren halkasına yani steroid çekirdeğine sahip hidroksillenmiş polisiklik izopentanoitten meydana gelen, 30 karbon atomu içeren yapılardır (Konuşkan ve Alta, 2008).

Ruşeym yağında mevcut fitosterollerin başlıca türleri Şekil 2.2'de kimyasal formülleri gösterilen;  $\beta$ -sitosterol, kampesterol,  $\Delta^5$ -avenasterol,  $\Delta^7$ -avenasterol,  $\Delta^7$ -

stigmasterol, stigmasterol, brassikasterol ve kolesterol molekülüdür. Bu bileşiklerin en baskın olanı %60-70 aralığında bulunan  $\beta$ -sitosterol ve %20-30 aralığında yer alan kampesteroldür (Barnes, 1983; Ghafoor ve diğ, 2017; Eisenmenger ve Dunford, 2008). Birçok biyolojik aktiviteye sahip oldukları bilinen fitosteroller, ruşeym yağına karakteristik özellik kazandırmaktadır. Bu nedenle de ruşeym yağının tanımlanması ve taşımasının tespitinde fitosterol analizi gerçekleştirilmektedir (Ghafoor ve diğ, 2017; Konuşkan ve Alta, 2008). Sterollerin ısı işlem esnasında polimerleşmeye karşı reaktif gibi davranış göstererek yağın okside olmasına engel olduğu ve böylece yağın bozulmasını önlediği bildirilmiştir. Sterollerin etkinliği sıcaklıkla doğru orantılı olarak artmaktadır (Konuşkan ve Alta, 2008).



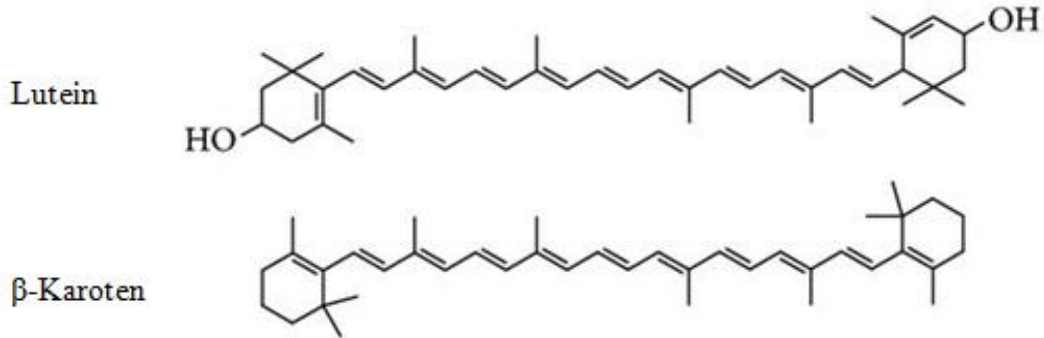
**Şekil 2.2** : Sterollerin kimyasal yapısı (Ateş ve Veliöğlü, 2005).

Karotenoidler, çoğu fotosentetik organizma tarafından üretilen yağda çözünen antioksidanlardır ve birçok çiçek ve meyvedeki sarı, turuncu ve kırmızı renklerden sorumludur. Bilinen iki karotenoid sınıfı vardır: tetraterpenoid hidrokarbonlar olan

karotenler ve molekülde bulunan bir veya daha fazla oksijenli fonksiyona sahip karotenoidler olan ksantofillerdir (Ghafoor ve diğ, 2017). Karotenler, bitkilerde kloroplastlarda hem ışık toplayıcı hem de ışığa duyarlılaşmaya karşı koruyucu olarak işlev görürken, hayvanlar karotenoidleri sentezleyemez ve bu nedenle onları gıdalardan elde etmelidirler (Brandolini ve Hidalgo, 2012).

İlk literatür verilerinde ruşeym yağının renginden sorumlu olan pigmentin ksantofil ile ilgili olduğu ve ksantofilin yağdaki konsantrasyonu 60 mg/kg düzeyinde olduğu bilgisi yer almaktadır. Daha sonra ise ruşeym yağında lutein ve kriptoksantin bileşenleri de belirlenmiştir. Ruşeym yağındaki karotenoidlerin %71-88 ksantofil, %2-17 ksantofil esterler ve %10-12 karoten içerdiği tespit edilmiştir (Ghafoor ve diğ, 2017).

Ticari yağların karotenoid içeriğinin düşük olması, presleme veya rafine etme sırasında meydana gelen oksidasyon ile açıklanmış ve sadece karotenoidler değil aynı zamanda flavonoid glikozitlerin de ruşeym yağının sarı rengine katkıda bulunduğu tespit edilmiştir (Barnes, 1982-1983). Çeşitli buğday türlerinde farklı tür ve miktarlarda karotenoidler belirlenmiş, bunlar arasında lutein, zeaksantin,  $\beta$ -kriptoksantin ve  $\beta$ -karotenin yer aldığı bildirilmiştir. Yapılan araştırmalar miktarının tarımsal koşullara bağlı olarak farklı buğday çeşitleri için değişkenlik gösterdiğini belirtmektedir (Tokuşoğlu ve Hall, 2011). Lutein ve  $\beta$ -karoten'in kimyasal yapısı Şekil 2.3'te verilmiştir.



**Şekil 2.3 :** Lutein ve  $\beta$ -karoten'in kimyasal yapısı (Türkcan ve Ökmen, 2012).

### 2.1.3 Ruşeym yağının fonksiyonel aktivitesi ve sağlıkla ilişkisi

Ruşeym yağı sahip olduğu biyoaktif bileşenlerin bir fonksiyonu olarak çeşitli biyolojik aktiviteler ve sağlık üzerinde pek çok olumlu etkiler sergilemektedir. Bahsi geçen olumlu etkiler arasında, ruşeym yağının plazma ve karaciğer kolesterol seviyelerini düşürmesi ve yaşlanma etkilerini azaltmaya yardımcı olması (Kahlon, 1989), ruşeym yağında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri prostaglandin olarak adlandırılan, anti-

inflatuar ve kas kasılmasında önemli rol oynayan bir grup hormonun sentezinde görev alması verilebilir. (Ghafoor ve diğ, 2017; Megahad ve El Kinawy, 2002).

Ruşeym yağı tıpta, kozmetik endüstrisinde ve vitamin üretiminde kullanılmasının yanı sıra gıdalarda, yemlerde, biyolojik olarak haşere kontrolünde, dolaşım, kalp rahatsızlıkları ve zayıflıklarının tedavisinde de kullanılmaktadır (Brandolini ve Hidalgo, 2012). Ruşeym yağı lesitin, balık yağı ve şampuan formülasyonları ile karışım halinde kapsül ve şişe formlarında halihazırda kullanılmaktadır. Ayrıca çiftlik hayvanları, yarış atları ve evcil hayvanlar için gıda takviyesi amacıyla da kullanımı söz konusudur. Tokollerin E vitamini aktivitesi yüksektir ve E vitamini insan sağlığı için gerekli besin maddesi olarak kabul edilmektedir.  $\alpha$ -tokoferol açısından zengin ve kolaylıkla temin edilebilir olması sebebiyle ruşeym yağı tercih sebebi olmaktadır (Barnes, 1983).

Ruşeym yağının kozmetik alanındaki kullanımı, cilt yaşlanmasını önleyen veya yavaşlatan seramidler içermesinden kaynaklanmaktadır. Seramid üretimi için gerekli enzim sfingomiyelinazdır ve aktivitesinin azalması cilt yaşlanması ile ilişkilidir. Seramidlerin cildi koruma ve nemlendirme etkisinin yanı sıra cilt üzerinde nemlendirici ve yatıştırıcı etkilere sahip E vitamini yönünden zengin ruşeym yağı ile birlikte nemlendirme aktivitesini artırılabilir (Ghafoor ve diğ, 2017). Yüksek tokoferol (1300-2700 mg/kg) ve karotenoid (56 mg/kg) içeriği nedeniyle iyi bir antioksidandır ve ayrıca pek çok hastalığa karşı korunmada ve hücre membranının stabilizasyonunda önemli roller üstlenmiştir (Megahad ve El Kinawy, 2002; Brandolini ve Hidalgo, 2012). Tokoferoller düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunu inhibe ederek arter mikrosirkülasyonda iyileşme sağlamakta ve kalp-damar hastalıklarına yakalanma riskini azaltmaktadır (Megahad ve El Kinawy, 2002). Antioksidanlar, UV radyasyonuna maruz kalan ciltte hücre değişikliklerine, ışıkla indüklenen immünosupresyona ve lipid peroksidasyon artışına neden olan serbest radikalleri önemli ölçüde azaltmaktadır. Farklı E vitamini türevlerinin serbest radikal üretimine karşı aktiviteye sahip olduğu ve serbest radikal üretimini azalttığı gösterilmiştir. Yüksek E vitamini içeriği nedeniyle ruşeym yağı, venius ve arteryel mikro dolaşımı hızlandırıcı etki etmekte, damarlardaki kan akışına yardımcı olmakta ve dekonjesyonu kolaylaştırmaktadır (Ghafoor ve diğ, 2017).

Ruşeym yağı kolesterol düşürücü etkilere neden olan iki grup alkol içermektedir, bunlar: polikozanoller ve fitosterollerdir. Polikozanoller; dokozanol (C22), tetrakozanol (C24), hekzakozanol (C26), oktakozanol (C28) ve triakontanol (C30) 'dür. Ruşeym yağında bulunan majör fitosterollerin sitosterol (%60-70), kampesterol (%20-30)'den

oluştugu ve diğ er ticari yağ larla kıyaslandığında ruşeym yağ ının daha fazla fitosterol iç erdiği bilinmektedir. Sabunlaşmayan maddenin büyük bir bölümünü oluşturan steroller, ruşeym yağ ındaki önemli biyoaktif bileş enlerden biridir ve kan kolesterolünü düşürme ve kardiyovasküler hastalık prevalansını azaltma üzerinde etkisi vardır (Jha ve diğ, 2013).

Oktakozanol, özellikle egzersiz performansı, trombosit agregasyonu ve plazma kolesterol seviyeleri gibi insan sağ lığı ile ilgili birçok alanda birçok yararlı etkiye sahiptir. (Ghafoor ve diğ, 2017). Bazı patojenik bakterilere karşı ruşeym yağ ının antibakteriyel aktivitesi test edilmiş ve *Listeria monositogenler* ve *Staphylococcus aureus* 'un en duyarlı suş lar olduğu, ardından *Escherichia coli* ve *Salmonella enterica* 'nın olduğu gözlenmiştir (Mahmoud ve Mohdal, 2015). Çizelge 2.2 ruşeym yağ ı bileş enleri ve biyoaktif özellikleri göstermektedir.

**Çizelge 2.2 :** Ruşeym yağ ı bileş enleri ve fonksiyonel özellikleri (Ghafoor ve diğ, 2017).

Bileş en	Fonksiyonel kullanımlar/biyolojik özellikler
Tokoferoller/E vitamini ve türevleri	Lipit peroksidasyonu, cildi nemlendirme, serbest radikal süpürme, bazı cilt hastalıklarına karşı aktivite, dolaşım sistemi mikrosirkülasyonunda iyileş me
Oktakozanol	Fiziksel performansı iyileştirme
Karotenoidler	Serbest radikalleri süpürme
Vitaminler (A, B1, B2, B3, B5, B6)	Beslenme ve sağ lık yararı
Mineraller (demir, çinko, potasyum, magnezyum)	Beslenme ve sağ lık yararı
Seramidler	Cilt yaş lanmasını geciktirme, serbest radikalleri süpürme, antienflamatuar aktivite
Linoleik asit ve çoklu doymamış yağ asitleri	Cilt yatış tırma ve nemlendirme
Dihidro-γ-sitosterol ile esterleştirilmiş ferulik asit	Serbest radikalleri süpürme
Ruşeym yağ ı veya ruşeym yağ ının iş lenmemiş ekstraktları	Antibakteriyel aktivite, hücre değı ş ikliklerini önleme, ış ınla indüklenen cilt hastalıkları ve lipit peroksidasyonunu önleme, saç dökülmesinin önleme, fonksiyonel gıda geliştirmede kullanım, radyo dalgalarına karşı koruma ve yara iyileştirme
Polikozanol, oktakozanol ve fitosteroller	Kolesterol düşürücü etkiler, trombosit agregasyonunu önleme, fiziksel performansı iyileştirme

İnsanlarda karotenoidler çeşitli işlevlerde rol oynarlar. Özellikle önemli olan, A vitamini biyosentezinde  $\alpha$ - ve  $\beta$ -karotenlerin rolü, hücrel üreme, normal embriyo ve fetüs gelişimi, görsel fonksiyonlar vb. için önemli bir faktördür (Zile, 1998). İnsan sağlığıyla ilgili karotenoidlerin diğeri bir işlevi, hücreleri ve dokuları serbest radikallerden ve tekli oksijenden koruyan antioksidan aktivitelidir. Özellikle lutein ve zeaksantin, retinanın makula bölgesinin korunmasında ve kataraktların önlenmesinde temel bir role sahiptir; diğeri yararlı eylemler arasında bağışıklık tepkisinin güçlendirilmesi, güneş radyasyonuna karşı koruma, bazı kanser çeşitlerinin engellenmesi ve dejeneratif ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi yer almaktadır. Aynı zamanda karotenoidler gibi bitki pigmentleri, tekli moleküler oksijen ve peroksil radikallerini ortadan kaldırabilen etkili antioksidanlardır. Diğeri antioksidanlarla sinerjik ilişki kurduklarından insan vücudundaki antioksidan savunma sisteminde önemli bir rol oynamaktadırlar (Stahl ve Sies, 2003).

#### **2.1.4 Ruşeym yağının kullanımı**

Yüksek miktarlarda çoklu doymamış yağ asidi, mineral ve element içeriklerinin varlığı nedeniyle ruşeym yağı diyetetik olarak değerlidir. Besin açısından önemli makro ve mikro elementler, yağ bileşiminin önemli bir bölümünü oluşturur (Kan, 2012). Ruşeym yağı yüksek miktarda tokoferol içermesi nedeniyle yüksek miktarda doymamış yağ asidi içeren yağlara göre daha kararlıdır. Bu bileşenlerden bazıları, kaliteli gıda ürünü olarak ruşeym yağı kullanımının tesis edilmesinde veya tıbbi önemi olan nutrasötiklerin geliştirilmesinde önemlidir (Ghafoor ve diğ, 2017). Biyoaktif bileşen içeriği ve buna bağlı olarak fonksiyonallitesi yüksek olan ruşeym yağının, üretim tekniklerinin ve özelliklerinin incelenmesi, aynı zamanda tüketime dahil edilme yolları son zamanlarda büyük ilgi uyandırmaktadır. Fonksiyonel özelliklerinden dolayı ruşeym yağının diyetlerde daha fazla yer alması gerektiği önerilmektedir (Karabacak ve diğ, 2011; Yazıcıoğlu ve diğ, 2015).

Ruşeym yağı, tokoferollerin varlığı ile sadece lipit peroksidasyonunun önlenmesi için faydalı olmakla kalmaz, aynı zamanda serbest radikallere karşı hücrel savunmayı geliştirdiği için nutrasötiklerin gelişiminde iyi bir kaynak olabilir (Chakrabarty, 2003). Antioksidan etkisi daha önce tespit edilmiş olan tokoferollerin yanı sıra steroller ve karotenoidler gibi diğeri bileşenlerin de lipit peroksidasyonunu önleyebileceği bildirilmiştir. Karotenoidlerin ve tokollerin doğal antioksidan aktivitesi, gıda ürünlerinin tazeliğini ve raf ömrünü korumada pozitif fonksiyonel özelliklerini tamamlayabilir, bu nedenle sentetik antioksidanlara doğal bir alternatif olmaktadır (Zhu ve diğ, 2011).

Ruşeym taneden ayrılır ayrılmaz gerçekleşen hidrolitik ve oksidatif reaksiyonlar sonucu elde edilen yağ acılaşmaya başlar ve raf ömrü kısalır. Oksijen, sıcaklık ve ambalajın geçirgenlik durumu gibi etmenler de oksidatif reaksiyonları hızlandırmaktadır (Ceylan ve diğ, 2020). Başlıca lipaz enziminin aktivitesi sonucu açığa çıkan serbest yağ asitleri içeriği başlangıçta %6'dan azdır ancak ruşeymin ayrılması, depolanması ve yağ ekstraksiyonunun kontrolsüz yapılması halinde bu değer %25'lere yükselebilmektedir. Megahed (2011), periyodik saklama sırasında ruşeym yağının lipaz aktivitesi ile ilgili bir çalışma yapmış ve yağın asit değerinin başlangıç değerine (14.88 mg/g) kıyasla kademeli olarak artarak maksimum 23.46 (mg/g) 'a ulaştığını gözlemlemiştir. Ancak 70°C'de 15, 30 ve 60 dakika lipaz inhibisyonu sırasında asit değeri 60 dakikadan sonra 14.88'den 12.02 mg/g'a düşmüştür. Bu çalışmada, enzim aktivitesinin 70°C'de ve 30. dakikadan sonra asit değerinin uygun bir değere ulaştığı belirlenmiştir. Yapısında bulunan ve antioksidan özellik taşıyan tokoferol ve karotenoidlerin ısı stabilitesinin düşük olması sebebiyle 20 dk kızartma işlemi sonucunda toplam tokoferol içeriği %8.8, karotenoid içeriği ise %65,76 oranında azaldığı bildirilmiştir (Zou ve diğ, 2018). Ayrıca çoklu doymamış yağ asitlerinin varlığı nedeni ile oksidasyona oldukça meyilli bir yapıya sahip olması hem diyetlerde doğrudan kullanımını, hem de üretim hattına dahil edilmesini zora sokmaktadır (Yazıcıoğlu ve diğ, 2015). Gerçekleşen bu reaksiyonlar sonucu görülen duyuşal ve besinsel kayıplar nedeniyle ruşeym kısa sürede tüketilemeyecek hale gelmektedir. Bu kayıpları önlemek amacıyla uygulanan birçok yöntemdeki yüksek sıcaklık uygulamaları, ruşeymin besinsel öğelerine zarar vermekte hatta Maillard reaksiyonunu tetikleyerek ruşeymin besinsel kalitesini ve fonksiyonlitesini düşürmektedir (Kahveci ve Özkaya, 1990).

Antioksidan kullanımı ile ruşeym yağının oksidasyon problemi aşılımaya çalışılırsa bile kullanılan antioksidanın gıdanın tadı, rengi, aromasına uyum gösterememesi ve ayrıca üretim hattındaki olumsuz koşullara (ısıl işlem, oksijen ve ışık) hassasiyet taşıması nedeni ile farklı çözümler aranmaktadır. Aynı zamanda kızıl ötesi, epoksi bileşikleri, nem azaltma ve mikrodalga gibi yaklaşımlar ile ruşeym yağının raf ömrünü iyileştirmeye dair birçok çalışma yapılmıştır (Al-Obaidi ve diğ, 2013). Ancak bu çalışmalar ruşeym ürünlerinin besleyici değerini olumsuz etkileyebildiğinden, enzim inaktivasyonu ve ruşeym stabilizasyonu için uygun bir yöntemin seçilmesi ruşeym yağı ve ruşeym içeren ürünlerin ticarileştirilmesi için önemlidir. Ruşeym yağının sahip olduğı besin içeriğinin stabilitesini sağlamak, sürdürmek ve korumak amacıyla enkapsülasyon yöntemleri kullanılmıştır (Karadeniz ve diğ, 2018; Yazıcıoğlu ve diğ, 2015; Feltre ve diğ, 2020).



## 2.2 Enkapsülasyon

Pek çok gıda biyoaktif bileşeni, işleme ve çevresel koşullara duyarlıdır ve bu nedenle hem biyoaktif bileşenin hem de kullanıldığı gıda ürünlerinin raf ömrünü artırmak için kararlılıklarını geliştirmek gerekmektedir.

Enkapsülasyon, aktif bileşenin (örneğin, bir nutrasötik), matriks, kaplayıcı madde, zar/membran, kabuk, kapsül, taşıyıcı materyal, duvar materyali, dış faz, matriks veya enkapsülen olarak adlandırılabilen ikincil bir malzeme içinde tutuklanması işlemidir. Enkapsüle edilen aktif bileşene; öz madde, çekirdek, merkez, aktif ajan, dolgu maddesi, iç faz veya taşınan yük fazı da denilmektedir. Enkapsüller tek duvara sahip olabildiği gibi kalınlığı değişkenlik gösteren çoklu tabakalar (kabuk) dan da oluşabilmektedir (Fang ve Bhandari 2010). Bu işlem sonucunda birkaç nanometreden birkaç mikrometreye kadar değişen çaplara sahip enkapsüller üretilmektedir (Pham ve diğ., 2013). Katı, sıvı ve gaz formlarda bulunan saf ya da karışım haldeki merkez materyalin enkapsülasyonu ile kontrollü salınım yapılabilmektedir. Böylelikle enkapsülasyonun hassas bileşenin korunması ve stabilizasyonunda anahtar rol oynayabileceği söylenebilmektedir. Gıdalarda enkapsülasyon işlemi başlıca ürünün raf ömrünün geliştirilmesi ve merkez maddenin kontrollü salınımının sağlanması gibi hedeflere hizmet etmektedir (Troise ve Fogliano 2013).

Enkapsüle edilmiş aktif bileşen, istenen yerde ve zamanda bir tetikleyici tarafından salınana kadar dış ortamdan korunmaktadır. İstenilen yapı ve işlevselliğe sahip kapsüllenmiş bir bileşen tasarlarırken dikkate alınması gereken temel hususlar aşağıda sıralanmıştır (Augustin ve Sanguansri 2012):

- Aktif materyal, duvar materyali ve bileşenlerinin fizikokimyasal özellikleri,
- Aktif materyal ve duvar materyalinin çeşitli ortamlardaki stabilitesi,
- Aktif materyal ve duvar materyali arasındaki etkileşimler,
- Kapsüllenmiş bileşeni hazırlamak için kullanılan teknoloji.

Bu hususlar, kapsüllenmiş bileşenin korunması gereken tüm süreç boyunca maruz kalacağı koşullar göz önünde bulundurularak, kapsülleme işleminin iyileştirilmiş tasarımını amaçlamaktadır. Enkapsülasyon işlemi ile nutrasötiklerin gıda üretimi prosesinde girdi halindeyken, gıda üretimi sırasında, son ürünün depolanması sırasında veya bir tetikleyicinin (Örneğin: pH, enzim aktivitesi, osmotik basınç, sıcaklık vb.) onları

gastrointestinal sistem boyunca salma zamanına kadar korumaktadır (Augustin ve Sanguansri 2012-2014; McClements, 2012).

Gıda uygulamalarında amaçlanan gıda biyoaktifleri, nutrasötikler veya sentetik bileşikler için dağıtım sistemleri tasarlarken, yalnızca güvenli olarak kabul edilen bileşenler kullanılabilir. Bu bakımdan gıda sınıfı olmayan sentetik polimerlerin kullanılabilirdiği farmasötik endüstrisinden farklı olarak gıda endüstrisinde daha kısa bir enkapsülasyon malzemeler listesi bulunmaktadır (Augustin ve Sanguansri, 2014). Enkapsülasyon ile gıda biyoaktif bileşenleri için başta fonksiyonelliğin ve stabilitenin geliştirilmesinin yanı sıra gıdaların işlenmesi, depolanması ve taşınması sırasında ışık, nem, oksijen ve ısı gibi çevresel faktörlerden korunmasına olanak sağlamaktadır. Bunun yanı sıra sağladığı diğer yararları şunlardır (Zuidam ve Heinrich, 2010; Ghorani ve Tucker, 2015; Fathi ve diğ, 2014; Echegoyen ve diğ, 2017);

- İşlemede kullanım kolaylığını arttırmak (sıvı maddenin toz haline dönüştürülmesi),
- Son ürünlerdeki stabilitenin artırılmasına bağlı olarak işleme sırasında aktif materyalin daha az miktarda kullanımına olanak tanımak,
- Fizikokimyasal özelliklerini düzenleyebilmek ve koruyabilmek (partikül boyutu, yapı, yağ ya da suda çözünme),
- Aktif bileşiğin fiziksel özelliklerinin korunması ve bu sayede taşınmasını kolaylaştırmak,
- Kaplama materyali sayesinde aktif bileşiğin tat ve kokusunu maskeleyerek,
- Diğer bileşiklerle reaksiyona girme eğilimini engellemeye bağlı olarak stabiliteyi korumak,
- Aktif bileşiğin nerede ve ne zaman çalışmasını mümkün olacağını bilmek gibi avantajlar sağlamaktadır.

Kontrollü salınım, enkapsülasyon yönteminin sağladığı en önemli fonksiyonel özelliktir. Aktif bileşiğin salınımına başlayacağı hedef ortamın koşullarına göre bir kabuk materyal tasarımı-kullanımı ile aktif bileşiğin etkinliği artmakta ve başlangıçta kullanılması gereken doz hesaplanabilmektedir. Sonuç olarak gıda endüstrisinde kullanılacak ürünün maliyeti iyileştirilebilmektedir (Anu ve Anandharamakrishnan, 2014).

Gıda uygulamalarına yönelik seçilmiş nutrasötiklerin kapsüllenmesiyle elde edilebilecek potansiyel faydalardan bazıları ise Çizelge 2.3'te verilmiştir.

**Çizelge 2.3 :** Enkapsülasyon uygulamaları ve faydaları (Augustin ve Sanguansri, 2014).

Nutrasötik	Enkapsülasyonun potansiyel faydaları
Omega-3 yağ asitleri	Oksidasyona karşı koruma, toz biçimi (kolaylık), tat maskeleyme, kontrollü salım, su bazlı yiyecek ve içeceklere dahil etme
Probiyotikler	Depolama sırasında geliştirilmiş canlılık, gıda ürünlerinde koruma, mide asitleri ve safradan koruma
Fenolik bileşikler ve polifenoller	Tat maskeleyme, geliştirilmiş çözünürlük, gıda ürünlerine kolaylaştırılmış katılım, geliştirilmiş biyoyararlanım
Lipofilik fitokimyasallar (örneğin, karotenoidler, tokoferoller)	Oksidasyona karşı koruma, toz biçimi (kolaylık), kontrollü salım, su bazlı yiyecek ve içeceklere dahil etme
Biyoaktif peptitler	Acılık ve burukluk maskeleyme, asidik ortamlardan koruma, kontrollü teslimat
Mineraller (Fe, Zn, K, Mg)	Tat maskeleyme, istenmeyen etkileşimlerden kaçınma (örneğin, Fe-katalizli yağ oksidasyonu, Ca kaynaklı protein çökmesi)
Vitaminler	Bozulmaya karşı koruma, tat maskeleyme, kontrollü salım, yağda çözünen vitaminlerin sulu bazlı yiyecek ve içeceklere dahil etme

Enkapsülasyon işleminin başarısında kaplanacak merkez ve kabuk materyallerinin fizikokimyasal özellikleri büyük önem taşımaktadır. Enkapsüle edilen aktif materyal, gıda üretiminin hangi aşamasında kullanılacak ise o aşamadaki gıdanın asitliği, su aktivitesi, rengi, işleme koşulları ve depolama sıcaklığı gibi parametrelerin bilinmesi gerekmektedir. Çünkü gıda üretimi veya paketlenmesi sırasındaki fizikokimyasal şartlar değişkenlik gösterebilmekte ve aktif bileşiğin salınımı pH değişimine, mekaniksel kuvvet uygulanmasına, sıcaklığa, zamana, enzim aktivitesine veya osmotik basınca bağlı olarak değişmektedir. Yeni enkapsülasyon teknolojilerinin bulunması ile birlikte çok yüksek fonksiyonel özelliği olan gıdalar üretilmektedir (Desai ve Park, 2005).

### 2.2.1 Enkapsülasyon yöntemleri

Gıda endüstrisi tarafından moleküllerin dağıtımını kontrol etmek ve oksidasyondan korumak için alternatif çözümler sunan birçok farklı enkapsülasyon tekniği mevcuttur (Yazicioglu ve diğ., 2015). Yapı, kompozisyon ve fizikokimyasal özelliklerinin değiştirilmesine izin veren çeşitli enkapsül hazırlama yöntemleri mevcuttur. Hazırlama

yönteminin seçimi kullanılan kabuk materyalin yapısına ve merkez materyalin çözünürlük özelliğine göre belirlenmektedir. Ayrıca merkez ve kabuk materyalin yanı sıra üretilen enkapsülün dahil edileceği gıda grubu ve prosesi de seçilecek enkapsülasyon yöntemini etkilemektedir (Desai ve Park, 2005).

Enkapsül üretiminde 3 temel basamak bulunur. Bunlar:

- i. kapsüllenecek materyalin etrafındaki duvar oluşumunu sağlamak,
- ii. merkezden istenmeyen sızıntıları önlemek,
- iii. istenmeyen materyallerin tutunmasını önlemek (Yazıcıoğlu ve diğ, 2015).

Enkapsül üretiminde kullanılan teknikler arasında emülsiyon, koaservasyon, sprey kurutma, sprey soğutma, dondurarak kurutma, akışkan yatak kaplama, ekstrüzyon, santrifüjlü ekstrüzyon, lipozom hapsedme, elektro-eğirme ve elektropüskürtme yer almaktadır (García-Moreno ve diğ, 2016). Gıda endüstrisinde kullanılan farklı enkapsülasyon yöntemleri, kullanım alanları ve ürün formları Çizelge 2.4'de verilmiştir.

**Çizelge 2.4 :** Enkapsülasyon yöntemlerinin gıda endüstrisindeki kullanım alanları (Madene ve diğ, 2006).

Yöntem	Enkapsülasyon yöntemi	Elde edilen ürünün formu	Uygulama alanları
Fiziksel	Püskürtmeli kurutma	Toz	Şekerlemeler, süt tozu, hızlı çözünebilir tatlılar, gıda aromaları, hızlı çözünür içecekler
	Dondurarak kurutma	Toz	Gıda aromaları, hızlı çözünür içecekler
	Püskürterek soğutma	Toz	Hazır yemekler, dondurma
	Akışkan yatakta kurutma	Toz/granül	Hazır yemekler, şekerlemeler
	Ekstrüzyon	Toz/granül	Hızlı çözünür içecekler, çaylar, şekerlemeler
	Aljinat kürecikleri	Granül	Pastacılık ürünleri, içecekler, probiyotik ürünler
Kimyasal	Koaservasyon	Macun/toz/kapsül	Sakız, diş macunu, unlu mamüller
	Lipozom tutuklama	Toz/kapsül	Şekerleme, süt tozu, hazır tatlılar, gıda aromaları, hızlı çözünür içecekler

### 2.2.2 Kabuk materyal grupları

Merkez materyalleri hapsetmek, kaplamak veya kapsüllemek için kullanılabilen çok sayıda kabuk materyal veya kabuk oluşturuçular bilinmektedir. Ancak, gıda uygulamalarında kullanılacak kabuk materyallerin gıda katkı maddeleri için gerekli güvenlik düzenlemelerine sahip olması gerekmektedir. Ayrıca bu katkıların Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) veya Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından ‘Genel Olarak Güvenli Kabul Edilir’ (GRAS) sertifikasına sahip olması gerekmektedir. Sonuç olarak, ilaç kapsülleme için yaygın olarak kabul edilen bazı bileşikler, gıda endüstrisinde kullanım için onaylanmamıştır. Dahası, farklı kıtalar, ekonomiler veya ülkeler için farklı düzenlemeler söz konusu olabilir ve bu, ürünlerini ihraç etmek isteyen veya pazarlarını genişletmek isteyen gıda üreticilerinin ele alması gereken bir sorundur (Wandrey ve diğ, 2009).

Gıda endüstrisinde kabuk materyalin kullanılabilirliği gıda güvenliği ve insan sağlığının dışında teknoloji açasından da önemli olan birtakım özelliklere sahip olmalıdır. Kabuk materyalin sahip olması gereken özellikler aşağıda sıralanmıştır.

- Merkez materyali stabilize etmeli,
- Merkez materyal ile reaksiyona girmemeli,
- Uygulanacağı proses özellikleri ile uyumlu olmalı,
- Kapsülasyon işleminde merkez materyal ile kapsül oluşturabilmeli,
- Uygulanacağı proseste stabil kalmalı,
- Hedeflenen koşullarda çözünebilmeli,
- Ekonomik olmalıdır (Gouin, 2004).

Kabuk materyal grupları genel olarak doğal ve sentetik polimerlerden oluşmaktadır. Sentetik polimerler, önceden sentezlenmiş polimerler (polianhidrit, polikaprolakton, polilaktik asit, polilaktik-ko-glikolik asit) ve enkapsüllerin hazırlanması esnasında sentezlenen polimerler (polisiyano-akrilat, polibütülsiyano-akrilat) şeklinde sınıflandırılabilir (Şengel-Türk ve diğ, 2007). Çizelge 2.5’te karbonhidrat, protein ve yağ temelli olan; bitkisel, hayvansal/mikrobiyel ve deniz grupları listelenmiştir.

**Çizelge 2.5 :** Gıda endüstrisinde kullanılan doğal kaynaklı duvar malzemeleri (Wandrey ve diğ, 2009).

Kaynak	Karbonhidrat Polimer	Protein	Lipit
Bitkisel	Nişasta ve türevleri Selüloz ve türevleri Bitki exüdatları -Gum arabik -Gum karaya -Mesquite gum Bitki ekstraktları -Galaktomannanlar -Çözünür soya Polisakkarit	Gluten (mısır) İzolatlar (soya)	Yağ asitleri/Alkolleri Gliseritler Vakslar  Fosfolipitler
Hayvansal/Mikrobiyel	Ksantan Gellan Dekstran Kitosan	Kazeinler Süt proteinleri Jelatin	Yağ asitleri/Alkolleri Gliseritler Vakslar Fosfolipitler
Deniz	Karrageenan Aljinat		

Yağların enkapsülasyonunda Bölüm 2.2.1’de bahsedilen enkapsülasyon yöntemlerinin tamamı kullanılabilir. Biyoaktif yağların enkapsülasyonuna dair literatür araştırması yapıldığında, aynı üretim yöntemi kullanılsa dahi kabuk materyaline bağlı olarak enkapsülasyon etkinliği ve morfolojisi farklılıklar gösterebilmektedir (Çapar, 2020).

Enkapsülasyon teknolojisinde evrensel olarak kabul edilen bir üretim yöntemi bulunmamaktadır ve aynı zamanda kullanılan kabuk materyallerinin farklı avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Kullanılan enkapsülasyon teknikleri ve kabuk materyaller ile yüksek enkapsülasyon etkinliği (EE) (kapsüllenmiş merkez materyalin başlangıç miktarına oranının yüzdesi) ve yüksek enkapsül yüklenme kapasitesi (EY) (kapsül içindeki aktif madde kütesinin kapsülün kuru kütesine oranı) değerine ulaşılabilir. Ancak kullanılan toksik çözeltilerin kalıntıları enkapsüllerde kalmaktadır. Her tekniğin ve her kabuk malzemesinin kendine özgü avantaj, dezavantaj ve düzenleme kısıtlamaları (örneğin bazı ülkelerde kullanım kısıtlamalarının bulunduğu siklodekstrin gibi) mevcuttur. Sonuçta hala sıcaklık, oksidasyon ve ışık koşullarına daha fazla direnç gösteren, üretiminde organik solvent kullanılan ve üretim yöntemi merkez materyal için tehdit oluşturmayan spesifik kapsüllere ihtiyaç duyulmaktadır (Pham-Hoang ve diğ, 2013; Czerniak ve diğ, 2015).

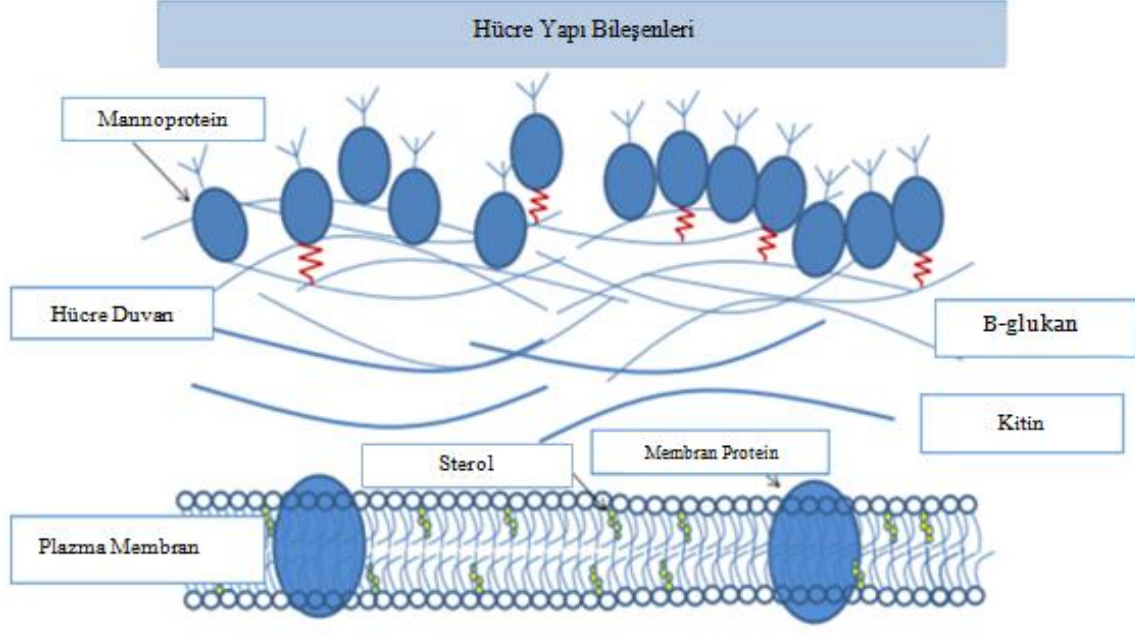
Bugüne kadar yapılan çok sayıda araştırma, bu sorunu iyileştirmek veya doğaya yakın yeni bir kapsülleme sürecini araştırmak için yoğunlaşmıştır. Doğadaki hassas bileşenlerin hücre içinde korunmasından ilham alarak yapısal özellikleri bilinen mikrobiyal hücreyi kabuk materyal olarak değerlendirmiştir. Doğada hassas bileşikler, bir tür doğal enkapsül olan hücrelerde korunmaktadır. Örneğin mikrobiyal hücrelerin etrafı paketleme malzemesine yakın bir karbonhidrat polimeri ve bir lipit membranı gibi çeper bileşenleri ile çevrelenmiştir (Pham-Hoang ve diğ, 2013).

Maya hücreleri, hücre ve çevresi ile alışverişi düzenleyen ve ozmotik basıncı kontrol eden koruyucu bir kapsül gibi düşünülmüş ve enkapsülasyon teknolojilerine bir model oluşturmuştur (Pham-Hoang ve diğ, 2013). Söz konusu modelin zamanla geliştirilmesi ile maya hücrelerinin enkapsülasyon teknolojisinde kullanımı oldukça popüler bir uygulama alanı bulmuş ve elde edilen yüklü enkapsüller biyokapsül olarak nitelendirilmiştir (Pham-Hoang ve diğ, 2013; Pham-Hoang ve diğ, 2018).

### **2.3 Enkapsülasyonda Kabuk Materyal Olarak *Saccharomyces cerevisiae***

Maya hücresi, hücre duvarı ve plazma membranı olmak üzere iki tabaka ile çevrelenmiş tek hücreli ökaryotlardır (Osumi, 1998). Hücrenin şeklini belirlemek, ozmotik basınca ve fiziksel tehditlere karşı hücreyi korumakla yükümlü olan hücre duvarı elastik bir yapıya sahiptir (Klis ve diğ, 2002). Hücre duvarı 100-200 nm kalınlığındadır ve hücre kuru ağırlığının %15-25'ini oluşturmaktadır. Hücre duvarının majör yapısal bileşeni polisakkaritlerdir (%80-90). Yüksek miktarda glukanlar, mannanlar, az miktarda da kitinden oluşan karbonhidrat ağına proteinler gömülmüş durumdadır. Bu proteinlerin varlığına rağmen yapı esas olarak hidrofilik olduğundan; hidrofobik bileşiklerin hücreye difüzyonunda sınırlayıcı bir rol oynamaktadır (Osumi, 1998; Ciamponi ve diğ, 2012; Pham-Hoang ve diğ, 2013; Klis ve diğ, 2002; Lipke ve Ovalle, 1998).

Hücre duvarının ardından hücre içeriğini çevreleyen tabaka; sitoplazma ya da plazma membranı olarak adlandırılmaktadır. Bu tabaka, fosfolipitler, nötral lipitler ve sterollerden oluşan çift tabakalı bir yapıdır (Pham-Hoang ve diğ, 2013). Maya hücresinin yapısı ve bileşenleri Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4 : Maya hücresi yapı bileşenleri.

### 2.3.1 Maya hücresinin kullanım alanları

Mayalar, şarap ve ekmek gibi fermente ürünlerin üretiminde insanlık tarihinin eski zamanlarından beri varlıklarını sürdürmekte ve aynı zamanda fermantasyon teknolojisinin temelini oluşturmaktadır. Bazı maya suşları probiyotik özelliklerinden dolayı doğal gastrointestinal florayı korumak ve eski haline getirebilmek için kullanılmaktadır. Maya hücrelerinin bir kısmı ile aynı zamanda gıda bileşenlerinin üretimi, aşı üretimi ve biyoteknolojik olarak protein üretimi gerçekleştirilmektedir (Pham-Hoang ve diğ, 2013; Czerucka ve diğ, 2007).

Maya hücrelerinin insan sağlığına olumlu etkileri kanıtlandıkça hücrelerin farklı alanlarda da kullanımı araştırılmış ve biyoyararlanımı yüksek yenilikçi yaklaşımlara konu edilmiştir (Pham-Hoang ve diğ, 2013).

### 2.3.2 Maya hücrelerinin enkapsülasyonda kullanımı

Mikroorganizmaların enkapsülasyon için uygun kabuk materyal oldukları fikri ilk kez, 1973 yılında, bir plazmolizör ile ön işlemden geçirildiğinde maya hücrelerinin (*Saccharomyces cerevisiae*) suda çözünür tat bileşiklerini emebildiğini ve tutabildiğini gözlemleyen Serozym isimli laboratuvar tarafından kabul edilmiştir (Bishop ve diğ, 1998). 1977 yılında Shrank yağ içeriği %40'dan daha fazla olan maya hücrelerinin yağda çözünür maddelerin enkapsülasyonunda kullanım tekniğinin patentini almıştır (Pham-Hoang ve diğ, 2013). 1982 yılında ise Dunlop Ltd. tarafından ksilen ve triasetin gibi taşıyıcı (lipit



genişletici) maddeler kullanılarak, maya hücrelerinin lipit tabakasında çözünmeyen maddelerin hücre merkezine taşınması ve enkapsüle edilmesi işleminin patenti alınmıştır. Aynı yıl AD2 Ltd. tarafından, maya hücreleri; merkez materyalin (örneğin aromalar, ilaçlar ve böcek öldürücüler) hücre duvarından pasif olarak geçebilen ve hücre içerisinde tutuklanabilen çözeltileri ya da dispersiyon formları içerisinde inkübe edilerek enkapsülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İşlem boyunca maya içinde enkapsülasyonun normal lipit içeriğine sahip hücrelerle (<5%) ve lipit genişletici madde(ler) kullanılmadan veya bir plazmolizator ile ön işlem yapılmadan mümkün olduğuna dair bir patent almıştır. Bu patent ayrıca, önceki patentlere kıyasla daha yüksek yükleme kapasitesi (%50-75 ağırlık/ağırlık) sunmuştur. Üretilen mikrokapsüllerin bir süspansiyon olarak kullanılabilmesine veya havayla, dondurarak veya püskürtmeyle kurutma ile kurutulmasına imkan vermektedir. Bu gelişme, parfümlü kumaş yumuşatıcı bileşimlerin (Quest 1990a), parfümlü ağartıcı ve deterjan bileşimlerinin (Quest 1990b) ve amino asitler ve yağların (BTTG 1990, 1994) kapsüllenmesini içerecek şekilde genişletmiştir. Ayrıca Proctor ve Gamble tarafından 1993 yılında, mayanın kokusunun giderilmesi için bir proses geliştirilmiştir (Bishop ve diğ, 1998).

Son yıllarda da araştırmacılar, yapısı ve besleyici faydaları nedeniyle maya hücrelerini enkapsülasyonda yeni taşıyıcı malzeme olarak kullanmakla ilgilenmektedirler (Sultana ve diğ, 2017; Bishop ve diğ, 1998).

Maya hücreleri ile enkapsülasyon prosesi mayanın merkez materyal etrafında kılıf oluşturması sonucunda (Mokhtari ve diğ, 2017) veya hücre içerisine merkez materyalin girmesi ile gerçekleşebilmektedir (Shi ve diğ, 2007; Paramera ve diğ, 2011a; Chow ve Palecek, 2004; Silva Lima ve diğ, 2017).

Tek başına hücrenin kabuk olarak kullanıldığı yöntem ile gerçekleştirilen enkapsül üretiminde merkez materyal hücre duvarını ve plazma membranını aşarak hücre içine girmekte ve burada tutunmaktadır. Merkez materyalin hareketi konsantrasyon gradientinden oluşan farkla, pasif difüzyon ilkesi ile gerçekleşmektedir ve dolayısı ile herhangi bir hücresel ya da kimyasal enerji gerekmemektedir (Bishop ve diğ, 1998, Czerniak ve diğ, 2015).

Merkez materyalin hücre içerisine girmesi ile yapılan enkapsülasyon prosesi adhezyon, permeasyon ve hücre içinde tutunma olmak üzere üç aşamada gerçekleşmektedir (Pham-Hoang ve diğ, 2013).

Hücre duvarının ağ yapısını oluşturan polisakkaritlerin hidrofilik moleküllere (Ciamponi ve diğ, 2012), mannoproteinlerin ve hücre duvarı elektrostatik özelliğinin ise hidrofobik moleküllere karşı (Pham-Hoang ve diğ, 2013; Huong ve diğ, 2006) bir afinite oluşturduğu bilinmektedir. Ancak plazma membranı yapısındaki fosfolipitlerin lipozom gibi davranması nedeni ile enkapsüle edilecek materyalin hidrofobik ya da hidrofilik karakterde olmasının adhezyon aşaması için enkapsülasyon başarısı açısından ihmal edilebilecek etkide olduğu bildirilmiştir (Mokhtari ve diğ, 2017; Paramera ve diğ, 2011a; Pham-Hoang ve diğ, 2013; Salari ve diğ, 2013).

Enkapsülasyonda bir sonraki aşama olan permeasyonun pasif difüzyon ile gerçekleştiği, merkez materyalin hücre duvarından geçmesinin öncelikli olarak molekül büyüklüğüne bağlı olduğu; molekül büyüklüğü 400 000 Da kadar olan moleküllerin hücre duvarından ve plazma membranından difüze olabildiği bildirilmektedir (Bishop ve diğ, 1998; Sultana ve diğ, 2017; Shi ve diğ, 2007; Pham-Hoang ve diğ, 2016). Hücre duvarının porozitesi permeasyon hızını öncelikli olarak etkileyen bir diğer faktördür. Hücrenin büyüme dönemlerinde porozitenin değişiklik gösterdiği ve hücrenin logaritmik (eksponensial) dönemde durağan döneme kıyasla daha yüksek poroziteye sahip olduğu bildirilmiştir (Pham-Hoang ve diğ, 2013).

Hücre duvarının ardından merkez materyal, plazma membranı ile karşılaşmaktadır. Plazma membranı bariyerinde; lipit çözünürlüğü, molekül büyüklüğü ve ortam sıcaklığı geçişi etkileyen üç temel faktördür. Lipofilik karakterdeki maddeler membranın lipit kısmında çözünerek hücre içine difüze olmaktadır. Yağda çözünebilen merkez materyaller ise pasif difüzyon ilkesi ile geçiş yapmaktadır (Bishop ve diğ, 1998; Ciamponi ve diğ, 2012). Küçük moleküller ise büyük moleküllere göre çok daha kolay geçiş sağlamaktadır (Nelson ve diğ, 2006). Plazma membranından geçişini etkileyen bir diğer faktör ise ortam sıcaklığıdır. Membranın temel yapı taşı olan fosfolipitlerin camsı geçiş sıcaklığı olan 40-60°C aralığında çalışılması ile fosfolipit tabakada daha akışkan karakter kazandırmakta ve böylece merkez materyalin geçişi daha rahat gerçekleşmektedir (Bishop ve diğ, 1998).

Enkapsülasyon işlemindeki hücre içinde tutunma aşaması merkez materyalin hücrenin farklı kısımlarında farklı bağ yapıları ile gerçekleştiğinden merkez materyalin kimyasal yapısına bağlıdır. Merkez materyal, hücre duvar bileşenlerine hidrojen bağı yaparak plazma membranının fosfolipit tabakasındaki hidrokarbon zincirleri arasında tutunabilmektedir (Normand ve diğ, 2005; Czerniak ve diğ, 2015). Hücre içinde ise, lipit

damlaları ve vakuoller olmak üzere iki farklı organelde tutunabilmektedir (Pham-Hoang ve diğ, 2013).

Merkez materyalin yapısal özellikleri enkapsülleme başarısında öncelikli etken olmasına rağmen, maya hücrelerine yapılacak bir takım manipülasyonların da enkapsülleme başarısı üzerine olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir. En yaygın kullanılan teknikler; plazmoliz, ajan ve enzim muamelesi ve spesifik besiyeri (lipofilik bileşen içeren) kullanımındır (Czerniak ve diğ, 2015; Pham-Hoang ve diğ, 2016; Tae-Hyun ve diğ, 2000).

Plazmoliz, ozmoliz ile su kaybına bağlı olarak sitoplazmik materyal kaybı olgusudur (Pham-Hoang ve diğ, 2013). Ozmoliz işlemi; değişik konsantrasyonlarda NaCl (Paramera ve diğ, 2011a), membranı yıkıcı ajan (triton 100, sodyum dodesil sülfat, setil trimetil amonyum bromid) (Czerucka ve diğ, 2007; Shi ve diğ, 2010) ve solvent muamelesi (etanol, aseton, etil asetat) (Czerniak ve diğ, 2015) ile gerçekleştirilebilmektedir. Plazmolizasyon sonunda hücre zarının lipid bileşimi değişeceğinden, faz geçiş sıcaklığı da değişmektedir (Salari ve diğ, 2013). Aynı zamanda içeriği boşalan hücre daha fazla miktarda merkez materyal tutabilmekte ve enkapsülasyon etkinliği yaklaşık iki kat yükselmektedir (Shi ve diğ, 2007).

Yüklü enkapsüllerde salınım için su aktivitesi ( $a_w$ ) ve sıcaklık iki temel faktördür. Kuru formdaki enkapsüllerin hava ve yağ ortamında salınım gerçekleştirmediği, 0.7'nin üzerinde  $a_w$  değeri olan bir gıdada ya da doğrudan suda salınımın gerçekleştiği, ıslak formda olan enkapsüllerin ise merkez materyali tutamadığı belirtilmiştir (Czerniak ve diğ, 2015; Dardelle ve diğ, 2007; Sultana ve diğ, 2017) Salınım için sıcaklık faktörünün test edildiği araştırmalarda 250°C'ye kadar olan sıcaklıklarda stabilitenin korunduğu, ancak 260°C'nin üzerinde enkapsüllerin yapılarında deformasyon olduğu ve salınımın başladığı bildirilmiştir (Normand ve diğ, 2005; Paramera ve diğ, 2011b).

Literatürde farklı merkez materyallerin maya hücreleri ile enkapsülasyonu sonucunda elde edilen enkapsüllerin karakteristik özelliklerinin incelendiği ve enkapsüle / serbest merkez materyalin stabilitesinin karşılaştırıldığı çalışmalar yer almaktadır.

Czerniak ve diğ. (2015), menhaden balık yağını *Saccharomyces cerevisiae* ile enkapsüle etmişlerdir. Enkapsülasyon öncesi maya hücresine uygulanan en etkin ön işlemin %1.5 etil asetat ve Glucanex R200 kullanılarak desteklenen 55°C'deki otoliz olduğu ve bu sayede enkapsülasyon etkinliğini %45.3-82.7 arasına ulaştığını tespit etmişlerdir. Aynı zamanda ürettikleri enkapsüllerin hidroksipropil metilselüloz ile

kaplanması ile %70'in altındaki bağıl nemde 30 gün süreyle saklandığında oksidasyona karşı stabil kalabildiği bulgusuna ulaşmışlardır.

Shi ve diğ. (2007), klorojenik asiti *Saccharomyces cerevisiae* ile enkapsüle ettikleri çalışmalarında maya hücreleri ile enkapsülasyon etkinliğini %6.2 bulmuşken plazmolize hücrelerle %12.6'ya ulaştığını tespit etmişlerdir. Sıcaklığın 25°C olduğu, %90 bağıl nem koşullarında ve 10 gün süreyle stabilitesini koruduğunu saptamışlardır. Taklit edilen sindirim ortamındaki salınım; merkez materyalin ve salınım ortamının asit – baz olması hücre duvarına ve plazma membranına zarar vereceğinden salınımı hızlandırabileceği sonucuna varmışlardır.

Pham-Hoang ve diğ. (2018), hidrofobik olan  $\beta$ -karoteni biyokapsüle etmek için *Yarrowia lipolytica* hücrelerini kullanmışlardır. Çalışmalarında etanol, aseton, hekzan ve kloform ve ultrasound kullanarak  $\beta$ -karoteni çözdürmüş ardından mikrobiyal enkapsülasyon işlemini gerçekleştirmişlerdir. Çözdürme işlemlerinin enkapsülasyon üzerinde değerlendirilmiş ve ultrasound ile yapılan solventsiz uygulamada kloroform ile elde edilen verilerden 4 kat daha olumlu sonuç elde etmişlerdir.

Chow ve Palecek, (2004) çalışmalarında  $\beta$ -galaktosidaz ve pirüvat kinaz enzimlerini *Saccharomyces cerevisiae* hücresinde enkapsüle etmişlerdir. Enkapsüle edilen  $\beta$ -galaktosidaz ve pirüvat kinaz enzimlerinin aktivitesini serbest formdakine kıyasla azaldığını saptamış, ancak enkapsüle enzimin korunmasına bağlı olarak pek çok reaksiyona rahatlıkla katıldığını ve aktivite kaybının önemli olmadığını tespit etmişlerdir.

Yapılan bir başka çalışmada ise, boyut olarak maya hücresinden daha büyük olan *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum* bakteri çoklu tabaka olarak enkapsüle edilmiştir. Sodyum aljinatın farklı oranları ile üretilen tek katlı ve çift katlı enkapsüllerin ardından çift katlı enkapsül parçalanmış *S. cerevisiae* ile kapsüllenip tekrar sodyum aljinat ile kapsüllenecek 3 katlı enkapsül oluşturulmuştur. Enkapsülasyon etkinliği %88.33 olarak bulunmuştur. Her iki probiyotik bakteri enkapsüllerinin simüle edilmiş mide pH'ı ve safra tuzlarına karşı toleransı ölçülmüştür. Gastrointestinal koşullarda, *S. cerevisiae* hücre duvarı bileşiği tabakası uygulandığında *L. acidophilus*'un direncinde önemli bir artış saptanmıştır. *S. cerevisiae*'nin hücre duvarı bileşiğinin probiyotikler için uygun bir koruyucu kaplama olduğu ve gıda ürünlerinde probiyotiklerin hayatta kalmasını artırabileceği sonucuna varılmıştır (Mokhtari ve diğ, 2017).

Salari ve diğ. (2013) yaptıkları çalışmada berberini, plazmolize edilen (%10, %20, %30 oranlarındaki NaCl solüsyonları kullanarak) ve plazmolize edilmeyen *S. cerevisiae* hücreleri ile enkapsüle etmişlerdir. Plazmoliz işleminde farklı tuz konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark olmadığı, ancak plazmoliz ile maya hücresinin lipit membran kompozisyonunun değiştiği ve buna bağlı olarak faz geçiş sıcaklığının da değiştiğini saptamışlardır. Aynı zamanda plazmoliz işleminin uygulandığı enkapsülasyon uygulamasında en yüksek etkinlik değeri (%40.2) tespit edilmiş ve bu durum plazmoliz işleminin hücre içi boşluğunda artışa neden olması ile açıklanmıştır.

Farklı oranlarda (%10, 20, 30 ve 40) NaCl içeren solüsyonlar ile plazmolize edilip dondurarak kurutulan ve plazmolize edilmeden dondurarak kurutulan *S. cerevisiae* hücreleri ile kurkumin enkapsülasyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada %50 (v/v) su ile hazırlanan enkapsüllerin yükleme kapasiteleri etanol ile hazırlanan enkapsüllere kıyasla 2 kat daha büyük bulunmuştur. Aynı etki enkapsülasyon etkinliği için de tespit edilmiştir. Plazmolize edilen hücreler ile edilmeyenler kıyaslandığında ise, aralarında fark olmadığı tespit edilmiştir. Yapılan kurkumin enkapsülasyonu ile %35.8 etkinlik değerine ulaşılmıştır (Paramera ve diğ, 2011b).

Kavosi ve diğ. (2017) yaptıkları araştırmada semizotu tohumu yağını; plazmolize etmeyerek, plazmolize ederek ve plazmolize edilip karboksi metil selüloz (KMS) ile kapladıkları *S. cerevisiae* hücrelerinde enkapsüle etmişlerdir. Yapılan çalışmadaki enkapsülasyon etkinliği %53-65 aralığında, yükleme kapasitesi ise 186-231 g/kg aralığında saptanmıştır. Enkapsüllerin peroksit değerleri incelendiğinde; en küçük peroksit değeri KMS kaplı enkapsüllerde tespit edilmiş ve en büyük peroksit değeri ise enkapsüle edilmeyen semizotu tohumu yağında tespit edilmiştir. Sonuç olarak, maya hücreleri ile birlikte ilave kaplama materyali (KMS) kullanımı sonucunda enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesinin yanı sıra oksidatif stabilitede de belirgin bir artışa sebep olmuştur.

Bu çalışmada, yan ürün olarak açığa çıkan ve biyoaktif besin maddelerince zengin olmasına bağlı olarak biyoyararlılığı yüksek olan ve yağ asidi profiline bağlı olarak çevresel koşullara karşı stabilitesi düşük ve tüketimi sınırlı olan ruşeym yağının *S. cerevisiae* hücreleri ile enkapsüle edilmesi ile; oksidasyon stabilitesini arttırmak amaçlanmıştır.

## 3. MATERYAL VE YÖNTEM

### 3.1 Materyal

#### 3.1.1 Ruşeym yağı ve ticari ekmek mayası

Bu çalışmada buğdaydan (*Triticum sativum*) soğuk pres yöntemi ile elde edilen ruşeym yağı ticari olarak Balen, (Arı Mühendislik Tarımsal ve Hayvansal Ürünler Üretim Kozmetik Pazarlama Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti., Ankara) firmasından, ticari fırıncılık mayası lokal marketten temin edilmiş, kullanılmaya kadar sırası ile -18°C ve 4°C'de muhafaza edilmiştir.

#### 3.1.2 Besiyeri ve kimyasallar

Kabuk materyal olarak kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin logaritmik faza geçişinde kullanılan Sabouraud Dextrose Broth (SDB) Merck firmasından (Darmstadt, Germany) temin edilmiştir.

Asetik asit, kloroform, dietil eter, etanol, hekzan, izooktan, sodyum hidroksit (NaOH), hidroklorik asit (HCl), sodyumtiyosülfat, potasyum iyodür, nişasta, *p*-anisidin reaktifi Merck (Darmstadt, Germany) firmasından, 37 yağ asit metil esterleri (FAMES) karışımı, Tween 80, sodyum bikarbonat,  $\alpha$ -amilaz (insan sindirim sisteminden A1031), pepsin (domuz gastrik mukozasından P7125), safra tuzu (B3883), metanol, tert bütül hidrokuinon (TBHQ),  $\alpha$ -tokoferol standardı,  $\beta$ -tokoferol standardı,  $\gamma$ -tokoferol standardı,  $\delta$ -tokoferol standardı, beta-fitosterol standardı, stigma-fitosterol standardı, kampa-fitosterol standardı,  $\beta$ -karoten standardı, lutein standardı Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), pankreatin (A0585) AppliChem (Darmstadt, Germany) firmasından temin edilmiştir ve kullanılan diğer tüm reaktifler analitik saflıktadır.

### 3.2 Yöntem

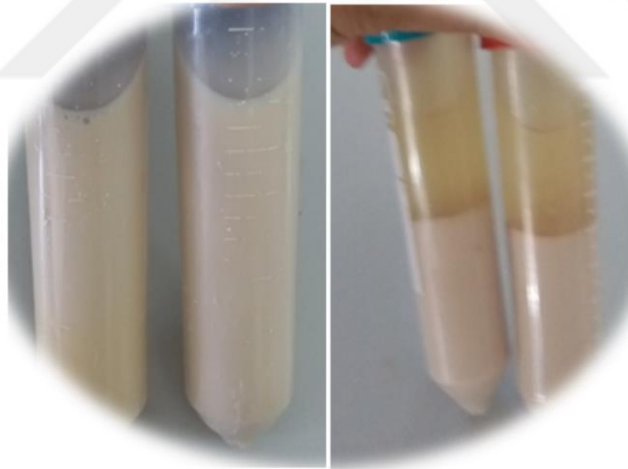
Bu çalışma iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak ruşeym yağının karakterizasyonu gerçekleştirilmiş, ikinci aşamada ise farklı işlemlerden geçirilen maya hücreleri kabuk materyal olarak kullanılarak ruşeym yağı enkapsüle edilmiş ve elde edilen enkapsüllerin karakterizasyon testleri yapılarak oksidatif stabilitesi değerlendirilmiştir.

### 3.2.1 Maya hücrelerinin geliştirilmesi

Enkapsülasyon işleminden önce besiyeri ortamı için Şekil 3.1’de gösterilen sıkıştırılmış ticari ekmek mayası (500 g) fosfat tamponu (500 mL, pH 6.8) ile yıkanmış, santrifüj (6000 rpm, 10 dk) edilmiş ve maya olmayan kısımlar uzaklaştırılmıştır. Elde edilen maya hücreleri steril saf su kullanılarak 3 kez yıkanmış ve Şekil 3.2’deki gibi toplanmıştır. İşlem sonrasında *S.cerevisiae* hücreleri SDB içerisinde orbital çalkalayıcı inkübatörde (170 rpm/dk) 48 saat, 29°C’de inkübe edilmiştir.



Şekil 3.1 : Sıkıştırılmış ticari ekmek mayası.

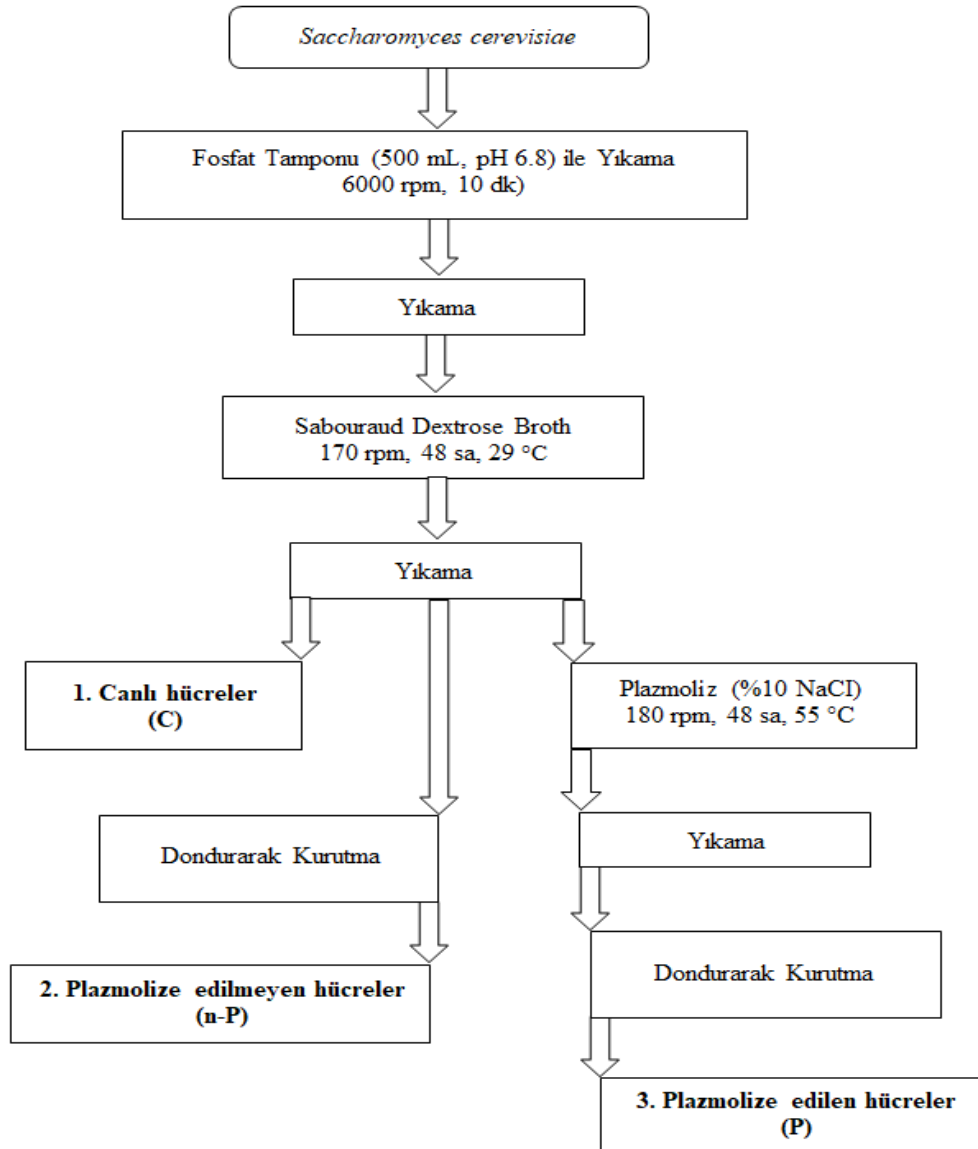


Şekil 3.2 : Maya hücrelerinin yıkaması.

İnkübasyon sonunda maya hücreleri steril saf su kullanılarak üç kez yıkanmış ve üç kısma ayrılmıştır. Birinci kısım enkapsül üretiminde ıslak formda direkt üretimde kullanılan hücreler; canlı hücre olarak adlandırılmıştır (C), ikinci kısım, dondurarak kurutulmuş hücreler; plazmolize edilmeyen hücreler olarak adlandırılmış (n-P) ve üçüncü kısım sodyum klorür solüsyonunda plazmolize edilen ve dondurarak kurutulmuş hücrelerdir; plazmolize hücreler olarak adlandırılmıştır (P).

### 3.2.2 Manipülasyon (Plazmoliz)

Plazmoliz işlemi için ağırlıkça %10 tuz (NaCl) içeren solüsyonla maya hücreleri (ağırlıkça %10) süspansiyon edilerek 180 rpm, 55°C’de, 48 saat çalkalamalı inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda santrifüj (6000 rpm, 10 dk) işleminin ardından tuz ve stoplazmik materyali uzaklaştırmak amacıyla 3 kez steril saf su ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Yıkanmış hücreler dondurularak kurutulmuş ve enkapsülasyonda kullanılmaya kadar steril kaplarda +4°C’de saklanmıştır (Paramera ve diğ., 2011b; Kavosi ve diğ., 2017). Kabuk materyal hazırlığının akış şeması Şekil 3.3’te verilmiştir. Kabuk materyal üretimi sonrası plazmolize edilmiş ve edilmemiş *S. cerevisiae* hücrelerinin dondurularak kurutma sonrası görselleri Şekil 3.4’te verilmiştir.



Şekil 3.3 : Kabuk materyal hazırlığı.





**Şekil 3.4** : Dondurarak kurutulmuş kabuk materyaller: (a) Plazmolize edilmeyen hücre.  
(b) Plazmolize edilmiş hücre.

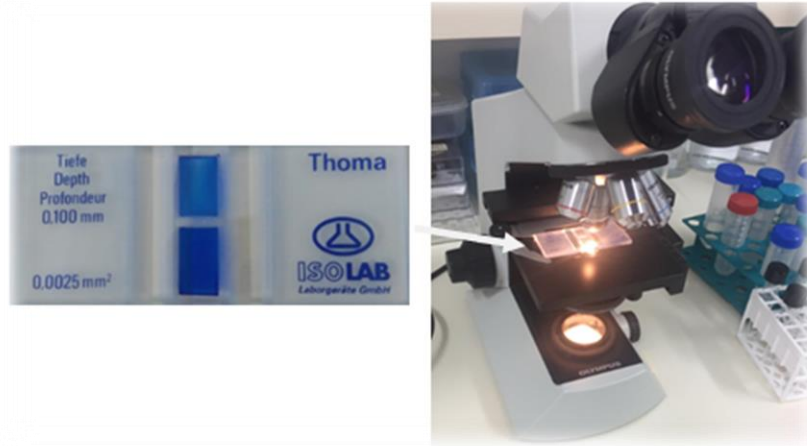
### 3.2.3 Enkapsül üretimi

Ruşeym yağının biyokapsülasyonu Pamera ve diğ. (2011b) ve Czerniak ve diğ. (2015) tarafından önerilen yöntemlerde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca, farklı konsantrasyonlarda (2.5, 5, 10 ve 20 g) ruşeym yağı %3 tween 80 içeren 50 mL saf su üzerine eklenmiş, olası bir oksidasyonu önlemek amacı ile merkez materyalin bulunduğu kap buzlu suya daldırılarak 10.000 rpm de 5 dk ultra turax (Ika, Staufen, Germany) kullanılarak Şekil 3.5'te gösterildiği gibi homojenize edilmiştir. Hazırlanan emülsiyonlar üzerine plazmolize edilen ( $13 \times 10^9$  kob/10g maya hücresi), plazmolize edilmeyen ( $30 \times 10^9$  kob/10g maya hücresi) ve canlı hücre ( $38 \times 10^2$  kob/10g maya hücresi); (miktarlar kuru ağırlık üzerinden hesaplanmıştır), yavaş yavaş ilave edilmiştir. Maya hücre sayıları Pamera ve diğ. (2011b) önerdiği yöntemle ilgili olarak, mikroskopik olarak (Şekil 3.6) belirlenmiştir. Böylece sabit 10 g kabuk materyalin kullanıldığı üretim periyodunda merkez materyal miktarı 2.5 g'dan 20 g'a çeşitlilik göstermiştir. Hazırlanan enkapsül karışımı ağız vıda kapaklı kaplara alınmış, tepe boşluğundan azot gazı verildikten sonra kapakları kapatılmış ve 180 rpm, 55°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.7). İnkübasyon sonunda örnekler dondurulmuş (-18°C) ve sonra dondurarak kurutulmuştur. Benzer şekilde; farklı konsantrasyonlarda ruşeym yağı ve maya hücreleri ile yapılan enkapsül üretim protokolü %10 etanol içerecek şekilde tekrar edilmiştir. Toz formdaki biyokapsüller kullanılmaya kadar -18°C hava geçirmez kaplarda saklanmıştır. Üretimde su kullanarak hazırlanan örnekler; PS: plazmoliz su, n-PS: plazmoliz edilmeyen su, CS: canlı su şeklinde; üretimde etanol kullanılarak hazırlanan örnekler; PE: plazmoliz etanol, n-PE: plazmoliz edilmeyen etanol, CE: canlı etanol şeklinde ve merkez materyal kullanılmadan su kullanılarak üretilen kontrol (boş enkapsüller) B-PS: plazmoliz boş, B-n-

PS: plazmoliz edilmeyen boş, B-CS canlı boş şeklinde kısaltılmıştır. Şekil 3.7'de enkapsüllerin üretimi gösterilmiştir.



Şekil 3.5 : Ultraturax cihazı ve merkez materyallerin homojenizasyonu.



Şekil 3.6 : Thoma lamında hücre sayımı.



**Şekil 3.7 :** Enkapsül üretimi.

### 3.3 Analizler

#### 3.3.1 Ruşeym yağının kromatografik analizleri

##### 3.3.1.1 GC-FID ile yağ asit kompozisyonu analizi

Ruşeym yağının yağ asit profili Karabulut (2007) uyguladığı yonteme bağlı kalınarak belirlenmiştir.

Yağ asidi metil esterlerinin oluşturulmasında; AOCS (American Oil Chemists' Society) Ce 2-66 (AOCS, 1989) metodu kullanılmıştır. Cam tüplere tartılan yaklaşık 100 mg yağ örneği 2 mL heksanda çözülmüş ve üzerine metanolde hazırlanmış 2 N KOH çözeltilisinden 0.2 mL eklenmiştir. Tüpler 30 sn vortekslelendikten sonra 3000 rpm' de 5 dk sanrifüjlenmiştir. Üst kısımdaki heksan fazı analiz edilmek üzere GC viallerine alınmıştır.

Elde edilen yağ asidi metil esterleri gaz kromatografisi cihazına (Agilent, 7890A) oto-enjektör (Agilent, 7683B) kullanılarak enjekte edilmiştir. Cihaza ait çalışma koşulları aşağıda verilmiştir.

Taşıyıcı gaz: Helyum (Toplam akış 30 mL/dk)

Enjeksiyon (inlet) sıcaklığı: 270°C

Dedektör (FID) sıcaklığı: 280°C

Fırın sıcaklık programı: 210°C' de 30 dk (izotermal)

Split oranı: 50:1

Kolon: DB-23 (60 m X 0.250 mm, 0.25 µm film kalınlığı) (J&W Scientific, ABD)

Yağ asitlerinin tanımlanmasında yağ asidi metil esteri standartları karışımı (37 FAMES mixture, Steinheim, Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılmıştır. Elde edilen kromatogramlarda her bir yağ asidinin pik alanı düzeltme yapılmadan toplam pik alanı içindeki oranı şeklinde belirlenmiştir. Sonuçlar 3 ölçümün ortalaması olarak ifade edilmiştir.

### **3.3.1.2 HPLC ile bileşim analizi**

Analizlerde, LC-20AR model gradient pompa, SIL-20A HT model autosampler, DGU2A 5R model degassing ünitesi, CTO-10AS VP model kolon fırını ve SPD- M20A model DAD (Diode Array Dedector) dedektörden oluşan Shimadzu HPLC sistemi kullanılmıştır.

### **Tokoferol ve fitosterol miktarlarının belirlenmesi**

Ruşeym yağının tokoferol ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ), fitosterol (beta, stigma ve kampa) miktarı Yuan ve diğ. (2017) uyguladığı metoda bağlı kalınarak belirlenmiştir. Kısaca, öncelikle yağ sabunlaştırma reaksiyonuna alınmıştır, bu amaçla test tüpüne 0.5 g yağ örneği (%1 tert bütül hidrokinon (TBHQ) içeren) tartılmış, NaOH (0.15 mol/L) içeren 2 mL etanol (%95) ilave edilerek karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım 40 dk, 70°C'de su banyosuna daldırılmış ve her 5 dk'da bir karıştırılmıştır. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra 2 mL su, 3 mL hekzan ile karıştırılıp ayırma hunisine aktarılmış, test tüpü 3 kez hekzan ile yıkanıp ayırma hunisine ilave edilmiştir. Oluşan faz ayrımında üst faz alınmış, 10 mL hekzan ilave edilmiş ve 0.45  $\mu$ m naylon filtreden geçirildikten sonra HPLC vialine alınmıştır (Yuan ve diğ, 2017). Kromatografik ayırmda Zorbax Eclipse plus C18 (5 $\mu$ m, 4.6 x 250 mm; Agilent) kolonu kullanılmıştır. Mobil faz metanol-su (98:2) (A) ve izopropanol (B) kullanılmış, 1 mL/dk akış hızı 30°C kolon sıcaklığında gerçekleştirilen analizde %90 A, %10 B ile başlayan analiz 37 dk'da tamamlanmış, ölçümler 210 ve 295 nm dalga boyunda çalışan DAD dedektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Yuan ve diğ, 2017; Zou ve diğ, 2018). Tüm tokoferol ve fitosteroller authentic standartlar kullanılarak tanımlanmıştır. Miktar hesaplamalarında standartların farklı konsantrasyonlarında hazırlanan 7 noktalı kalibrasyon eğrisi kullanılmış tokoferol sonuçları mg standart/kg yağ olarak, fitosterol sonuçları ise mg/g yağ olarak ifade edilmiştir.

## **Karotenoid (lutein ve β-karoten) miktarının belirlenmesi**

Ruşeym yağında bulunan lutein ve β-karoten miktarı Suresh Kumar ve Krishna (2013) tanımladığı yöntem ile belirlenmiştir. Kısaca, asetonda bilinen miktarda çözünen yağ 0.45 µm'lik politetrafloroetilen (Lubitech, Songijang, China) filtreden geçirilmiş ve 20µL HPLC kolonuna enjekte edilmiştir. Ayrım İnertsil ODS-2 kolonunda (250x 4.6 mm, 5µm;GL Sciences INC., Tokyo, Japan), 1 mL/dk akış hızında, %0.1 amonyum asetat içeren asetonitril/metanol/diklormetan (6:2:2 v/v) mobil fazı kullanılarak, izokratik elüsyon ile gerçekleştirilmiş; belirleme ise 450 nm de çalışan Photodiode-Array Detection (PDA) ile yapılmıştır. Tanımlama ve miktar belirleme 0.02- 0.63 µg/mL aralığında değişen konsantrasyonlarda β-karoten ve lutein standardı ile hazırlanan 5 noktalı kalibrasyon eğrisi kullanılarak gerçekleştirilmiş, sonuçlar mg karotenoid/100 g yağ olarak verilmiştir.

### **3.3.2 Enkapsüllerin karakterizasyon testleri**

#### **3.3.2.1 Enkapsülasyon etkinliği ve enkapsül yükleme kapasitesi**

Enkapsülasyon işleminin başarısı enkapsülasyon etkinliği (EE) ve enkapsülün yükleme kapasitesi (EY) ile belirlenmiştir. Enkapsülasyon etkinliği, toplam yağ miktarından yüzey yağ miktarı çıkarıldıktan sonra, toplam yağ miktarına oranı ile belirlenmiş yüzde olarak ifade edilmiş, formül 3.1'de verilmiştir. Yükleme kapasitesi ise; toplam yağ miktarından yüzey yağ miktarı çıkarıldıktan sonra elde edilen değer in enkapsülün kuru ağırlığına oranı ile belirlenmiş ve g/kg olarak ifade edilmiş, formül 3.2'de verilmiştir (Kavosi ve diğ, 2017).

$$EE (\%) = \frac{\text{Toplam Yağ Miktarı (g)} - \text{Yüzey Yağ Miktarı (g)}}{\text{Toplam Yağ Miktarı (kg)}} * 100 \quad (3.1)$$

$$EY \left( \frac{\text{g}}{\text{kg}} \right) = \frac{\text{Toplam Yağ Miktarı (g)} - \text{Yüzey Yağ Miktarı (g)}}{\text{Enkapsüllerin Kuru Ağırlığı (kg)}} \quad (3.2)$$

#### **Toplam yağ miktarı**

Dolu enkapsüllerin toplam yağ miktarı Kavosi ve diğ, (2017) belirttiği yöntemle göre belirlenmiştir. Kısaca 5 g enkapsül örneğinde bulunan ruşeym yağı çözücü olarak petrol eteri (250 mL) kullanılarak 2 saat soxhlet ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuş,

önceden ağırlığı alınan balonda toplanan ekstraktan (yağ ve çözücü) çözücü rotary evaporatör yardımı ile uzaklaştırılmış ve 105°C’ de sabit tartıma gelene kadar bekletilmiştir. Kabuk materyalinden kaynaklanan bileşen farkını minimize etmek için aynı işlemler boş kapsüllere de uygulanmış ve fark dolu kapsüllerden çıkarılarak sonuçlar verilmiştir.

### **Yüzey yağ miktarı**

Dolu enkapsüllerin yüzey yağı oda sıcaklığında gravimetrik olarak belirlenmiştir. Kısaca 2 g alınan enkapsüller 20 mL hekzan ile 2 dk çalkalanmış ardından filtre kağıdından süzölmüştür. Süzöntü önceden ağırlığı bilinen bir balona alınmış, geriye kalan enkapsüller 2 kez daha aynı şekilde yıkanmıştır. Toplanan ekstraktan rotary evaporatör yardımı ile hekzan uzaklaştırılmış ve yüzey yağ miktarı gravimetrik olarak belirlenmiştir (Kavosi ve diğ, 2017).

### **3.3.2.2 Morfolojik yapı**

Boş (merkez materyal kullanılmadan üretilen) ve dolu (ruşeym yağı içeren) enkapsüllerin dış morfolojik yapıları Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, Leo EVO-40 VPX Carl ZeissSMT, Cambridge, UK) kullanılarak incelenmiştir (Luan ve diğ, 2006). Örnekleri altın-paladyum ile kaplanmış ve farklı büyütme oranlarında SEM görüntüleri alınmıştır.

### **3.3.2.3. FT-IR spektrumu**

Enkapsüller toz forma KBr ile karıştırılmış ve sıkıştırılarak pellet forma getirilmiştir. Spektrumlar 450-4000 cm<sup>-1</sup> dalga sayısı aralığındaki Perkin Elmer Spectrum One FT-IR spectrometer kullanılarak alınmıştır (Shi ve diğ, 2007).

### **3.3.2.4 Salınım testi**

Enkapsüllerden ruşeym yağının salınımında sindirim enzimlerinin ve pH değerindeki farklılığın etkisini belirlemek amacı ile insan sindirim sisteminin (ağız, mide, on iki parmak bağırsağı ve ince bağırsak) ardışık olarak taklit edildiği ortamda zamana bağlı olarak belirlenmiştir.

*In vitro* olarak gastrointestinal koşulların taklit edildiği ortam koşulları Pinto ve diğ. (2015) önerdiği yöntemle bağlı kalarak hazırlanmıştır. Ağız, mide, on iki parmak bağırsağı ve ince bağırsakta hakim olan tipik koşullar ardışık olarak taklit edilmiştir. Her bir

aşamadaki parametreler (enzim solüsyonları, pH değeri, zaman periyodu ve insan sindirim sisteminin her bir kısmındaki çalkalamanın hızı) kontrol altında tutulmuştur. Deneyde kullanılan enzim solüsyonları taze hazırlanmış, 0.22 µm membran fitreden geçirilerek (MF-Millipore, Billerica MA, USA) steril edilmiş ve kullanılıncaya kadar buz kabında tutulmuştur. İnsan sindirim sisteminin her bir kısmındaki peristaltik hareketlerin hızı ve sıcaklığı taklit etmek amacıyla 37±1°C'ye sabitlenen su banyosu kullanılarak; sindirim sisteminin her bir aşamasındakine benzer hızda mekaniksel çalkalama uygulanmıştır.

On gram enkapsül 50 mL steril su içeren steril otoklav şişesine konulmuştur. Çiğneme (ağız) ortamının koşullarını taklit etmek amacıyla; ortam pH'ı 1 mol/L NaHCO<sub>3</sub> ile 6.9'a ayarlanmış, 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>'de 100 U/mL α-amilaz ile hazırlanan tükürük solüsyonu, 24 µL/dk hızla, toplam 2 dk boyunca örnek üzerine yavaş yavaş ilave edilmiştir ve 80 rpm hızla karıştırılmıştır. Mide aşaması için; 1 mol/L HCl kullanarak pH 2 ye düşürülmüştür. Ardından, tüm gastrik faz süresince eşit damlalarda olmak koşulu ile 50 µL pepsin solüsyonu (0.1 mol/L HCl' de 25 mg/mL) ilave edilmiş ve 130 rpm karıştırma hızında toplamda 90 dk içinde faz tamamlanmıştır. On iki parmak bağırsağını taklit etmek amacı ile ortam asitliği 1 mol/L NaHCO<sub>3</sub> kullanarak pH 5'e yükseltilmiş, bu aşamanın başında 250 µL pankreatin-sığır safra tuzu solüsyonu (0.1 mol/L NaHCO<sub>3</sub>' de 12 g/L sığır safra tuzu ve 2 g/L pankreatin) eklenmiştir. Bu aşama 45 rpm, 20 dk karıştırma işleminin ardından tamamlanmıştır. Son olarak 45 rpm, 90 dk karıştırma işleminin uygulanan ince bağırsak son kısmı için, 1 mol/L NaHCO<sub>3</sub> kullanarak pH 6.5'e yükseltilmiştir.

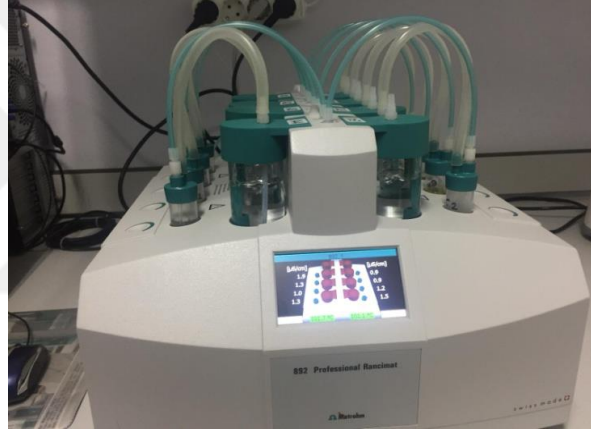
Salınım ortamında enkapsül yapısından salınan ruşeym yağı miktarı, ruşeym yağının yapısında yer alan bileşenlerden biri olan β-karoten miktarı üzerinden belirlenmiştir. Salınım periyodunun 0, 2, 30, 60, 90, 110, 120, 150, 180 ve 202. dakikalarında salınım ortamından alınan örneklerdeki (1 mL) β-karoten miktarları spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Salınım ortamında son konsantrasyonu değiştirmemek amacı ile alınan ortam sıvısı ile uyumlu sıvı (1 mL), eklenmiştir.

Salınım periyodu boyunca toplanan örneklerden β-karoten ekstrakte etmek amacı ile; örnek üzerine petrol eteri (1mL) ilave edilmiş ve 30 saniye vortekslenmiş ve 1200 rpm de 15 dk santrifüjün ardından, organik faza geçen β-karoten 450 nm'de UV-1700 Spektrofotometre (Shimadzu, Kyoto, Japan) ile belirlenmiştir. β-karoten miktarı β-karoten standardının 5 farklı konsantrasyonu ile hazırlanan (0.5-10 µg/mL) kalibrasyon eğrisi kullanarak hesaplanmış ve konsantrasyon µg β-karoten /g ruşeym yağı olarak verilmiştir.

### 3.3.2.5 Oksidatif stabilite testleri

#### Ransimat testi

Biyokapsüllerin ransimat analizleri Bilenler ve diğ. (2015)'nin uyguladığı metoda bazı modifikasyonlar uygulayarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca, 3 g ruşeym yağı ve aynı miktar yağ içeren toz formda enkapsül test tüplerine tartılmış ve Şekil 3.8'de verilen Ransimat 892 (Metrohm LTD, Herisau, CH 9101, Switzerland) cihazı kullanılarak, 100°C'de ve 10 L/sa hava akımı koşullarında indüksiyon periyodu tespit edilmiştir. Ayrıca boş enkapsül ve standart olarak bütillenmiş hidroksi tolüen (BHT) (100 ppm) aynı koşullarda test edilmiştir. Koruma Faktörü (KF) antioksidanlı indüksiyon periyodunun antioksidansız indüksiyon periyoduna bölünmesi ile hesaplanmıştır. Koruma Faktörünün 1'den yüksek olması lipid oksidasyon inhibisyonunun yüksek olduğunu ifade etmektedir.



Şekil 3.8 : Ransimat 892 cihazı.

#### Fırın testi

Hızlandırılmış koşullarda oksidasyon testi için 3 g ruşeym yağı ve 3 g yağ içeren enkapsül miktarı etkinlik değeri yardımı ile hesaplanmış Şekil 3.9'da verildiği gibi 80 mL hacimli cam şişelere (34x100 mm) konulmuş, sıcaklığı 60°C ye ayarlanan etüv kullanılarak 24 gün okside edilmiştir. Sekizer günlük süre dilimlerinde (0, 8, 16 ve 24. günlerde) örnekler alınarak enkapsül içindeki yağ 50 mL kloroform:metanol (2:1) ile ekstrakte edilmiştir (Karabulut, 2007). Böylece serbest ruşeym yağının 0, 8, 16 ve 24. gün örnekleri ile canlı, plazmolize ve plazmoliz edilmeyen maya hücre enkapsüllerinin 0, 8, 16 ve 24. günlerinden ekstrakte edilen yağ örnekleri test tüplerine alınmış ve peroksit ve *p*-anisidin testlerinde kullanılıncaya kadar -18°C'de saklanmıştır. (Her bir örnek için 2 ayrı şişe kullanılmıştır.)





**Şekil 3.9 :** Fırın testi.

### ***Peroksit sayısı***

Periyodik (0, 8, 16 ve 24) olarak hızlandırılmış oksidasyona tabi tutulan enkapsül numunelerinden elde edilen yağ örneklerinin peroksit sayısı tayini için AOCS de belirtilen AOCS Cd-8-53 yöntemine göre analiz yapılmıştır (AOCS, 1989). Bu analiz; yağdaki peroksitlerin iyot ile doyurulması ve serbest iyotun nişasta indikatörlüğünde sodyumtiyosülfatla titrasyonu prensibine dayanmaktadır.

Buna göre erlene 1 g ruşeym yağı numunesi tartılmış, üzerine ise yağın çözünmesi için 10 mL kloroform ilave edilmiştir. Daha sonra 15 mL asetik asit ve 1 mL doygun potasyum iyodür (KI) çözeltisi eklenmiş ve ağzı kapatılarak 1 dk boyunca çalkalanmıştır. Çalkalama sonunda erlen 10 dk karanlık ortamda bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 75 mL saf su eklenerek %1'lik nişasta indikatörü eşliğinde kloroform fazındaki mavi renk kayboluncaya kadar 0.01 N sodyum tiyosülfat ile titre edilmiştir ve formül 3.3'e göre hesaplanmıştır. Şahit deney için de aynı işlemler örnek yerine saf su koyularak yapılmıştır. Sonuçlar meq O<sub>2</sub>/kg yağ olarak verilmiştir.

$$\text{Peroksit Sayısı} = \frac{(V1 - V2) * N}{m} * 1000$$

(3.3)

Bu denklemde;

V1: Ana denemede harcanan 0.01 N tiyosülfat çözeltisinin hacmi (ml)

V2: Tanık deneme için harcanan 0.01 N tiyosülfat çözeltisinin hacmi (ml)

m: Numune miktarı (g)

N: Ayarlı tiyosülfat çözeltisinin normalitesi (0.01 N)

### ***p*-Anisidin sayısı**

*p*-Anisidin sayısı; AOCS Cd-18-90'da verilen yöntemle göre yapılmıştır (AOCS, 1989). Bu yöntem, yağların oksidasyonunda aldehit yapısındaki yüksek moleküllü karbonil bileşikler olan ikincil oksidasyon ürünlerinin belirlenmesinde kullanılan bir analizdir. Oksidasyonun ikincil ürünlerinden olan aldehitlerin *p*-anisidin reaktifiyle tepkimeye girerek oluşturduğu renkli çözeltinin spektrofotometrede 350 nm dalga boyunda okunarak konsantrasyonunun belirlenmesi prensibine dayanan bir yöntemdir. Bir gram örnek alınarak, 25 mL hacmine izooktan ile tamamlanmıştır. Tamamlanan 25 mL'den 5 mL alınmıştır. Bu aşamada 350 nm dalga boyunda kör olarak izooktan kullanılarak bir okuma yapılmış ve AB değeri olarak not edilmiştir. Daha sonra üzerine 1 mL *p*-anisidin (2,5 g *p*-anisidin alınıp 1 lt'ye glasiyel asetik asit ile tamamlanarak hazırlanan *p*-anisidin kullanılmıştır) ilave edilerek çalkalanmıştır. On dakika karanlıkta ağzı kapalı bir şekilde bekletilmiş ve 10 dk ardından 350 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır. Her bir örnek için okunan değerler As olarak adlandırılmıştır. Bu okumada kör; 5 mL izooktan, + 1 mL *p*-anisidin, çalkalama, 10 dk karanlıkta bekletme sonucunda hazırlanmıştır ve okuma yapılmıştır.

$$p - \text{Anisidin Sayısı} = \frac{10 * 1,2 * (As - AB)}{m} \quad (3.4)$$

Bu denklemde;

As: Trigliserit çözeltisinin *p*-anisidin eklendikten sonraki absorbans değeri

AB: Trigliserit çözeltisinin absorbans değeri

m: Örnek miktarı

### **3.3.3 İstatistiksel analiz**

Farklı oranlarda ruşeym yağı:maya hücresi denemeleri, üretim ortamında farklı çözücülerin (su ve etanol) kullanımı ve plazmoliz işleminin biyokapsülasyon işleminin başarısı üzerine etkisinin incelenmesi ve ayrıca ruşeym yağının oksidatif stabilitesi üzerine biyokapsülasyon işleminin etkisinin belirlenmesi amacı ile elde edilen analiz sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi amacıyla SPSS paket programı (versiyon 16.0) kullanılmıştır.

Örnekler arası farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine göre  $P < 0.05$  önem düzeyinde test edilmiştir.

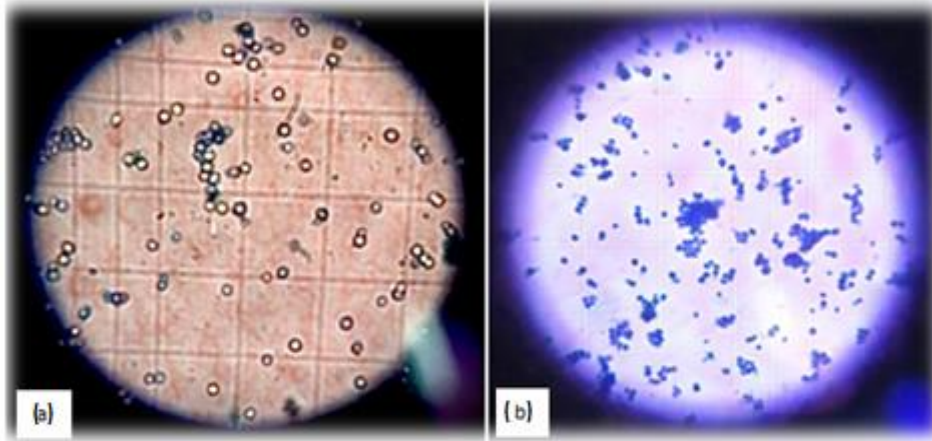
## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Tez çalışmasında öncelikle merkez materyal olarak kullanılan ruşeym yağının bileşim özellikleri incelenmiş, bu bağlamda yağ asit kompozisyonu, tokoferol ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  ve toplam tokoferol), fitosterol ( $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, kampesterol ve toplam fitosterol) ve karoten ( $\beta$ -karoten ve lutein) miktarları belirlenmiştir.

Tez çalışmasının bir sonraki aşamasında ise, yapılan literatür taraması ışığında seçilen 3 farklı formdaki kabuk materyal (plazmolize edilen, edilmeyen ve aktifleştirilen canlı *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin) üretimi tamamlanmıştır. Ruşeym yağı, su ve %10 etanolün üretim ortamı olarak kullanıldığı enkapsülasyon prosesinde maya hücreleri ile kapsüllemiş ve dondurarak kurutulmuştur. Elde edilen enkapsüllerin etkinlik sonuçları karşılaştırmalı olarak incelenmiş, etkinlik değeri bakımından öne çıkan örnekler belirlenmiş ve bu örneklerin SEM görüntüleri, FT-IR spektrumları ve salınım özellikleri incelenmiştir. Maya hücreleri ile enkapsülasyon işleminin ruşeym yağının oksidasyon stabilitesi üzerine etkisi Ransimat ve fırın testi ile araştırılmıştır.

### 4.1 Maya Hücrelerinin Sayımı

Enkapsül üretiminde kullanılacak üç farklı kabuk materyalinin, kuru ağırlık üzerinden 10 g maya miktarına karşılık gelen miktarlarını belirlemek amacıyla örnekteki canlı ve ölü hücre sayıları Şekil 4.1'deki gibi tespit edilmiştir.



**Şekil 4.1 :** Thoma lamında sayım: (a)Plazmolize edilmeyen hücre sayımı. (b)Plazmolize edilmiş hücre sayımı.

Enkapsülasyon işlemi öncesinde üretimde kullanılacak kabuk materyalindeki canlı ve ölü hücre sayıları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1 : Thoma lamı sayım sonuçları.**

Örnekler	Canlı hücre miktarı		Ölü hücre miktarı	
	%	log kob/g	%	log kob/g
Plazmolize edilen hücre	7.97	13x10 <sup>8</sup>	92.02	15x10 <sup>9</sup>
Plazmolize edilmeyen hücre	2.98	3x10 <sup>9</sup>	97.02	12x10 <sup>9</sup>
Canlı hücre	87.72	8.1x10 <sup>8</sup>	14.28	1.3x10 <sup>8</sup>

Çizelge 4.1’de yer alan canlı maya örneğindeki canlı hücre sayısının plazmolize edilen ve edilmeyenlere kıyasla canlı hücre miktarı yüzdesinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Plazmolize edilmeyen hücre (n-P) örneğindeki ve canlı hücre (C) örneğindeki canlı hücre miktarı yüzdeleri kıyaslandığında, n-P örneğinin dondurarak kurutma aşaması öncesinde ve dondurarak kurutma esnasında maruz kaldığı dondurma işlemleri sebebiyle canlı hücre miktarının büyük oranda düştüğü tespit edilmiştir.

## 4.2 Ruşeym Yağının Karakterizasyonu

### 4.2.1 Yağ asit kompozisyonu

Çalışmada kullanılan soğuk sıkım yöntemiyle üretilmiş ruşeym yağına ait yağ asit kompozisyonu standartlara kıyasla alıkonma sürelerine göre tanımlanıp, pik alanın yüzdesi olarak Çizelge 4.2’de verilmiştir.

**Çizelge 4.2 : Ruşeym yağı yağ asit kompozisyonu (% toplam yağ asidi).**

Yağ asidi	Ruşeym yağı
C16:0	17.29±0.02
C16:1	0.19±0.00
C18:0	0.83±0.01
C18:1	17.88±0.06
C18:2	55.14±0.04
C18:3	7.03±0.00
C20:0	1.50±0.01
C22:1	0.14±0.01

Bilindiği gibi yağ asidi bileşiminde doymamış yağ asidi oranının artması yağın oksidatif stabilitesini düşürmektedir. Analizin kantitatif değerlendirilmesinde her bir yağ asitinin yağın bileşiminde hangi konsantrasyonda olduğu değil, her bir yağ asidinin toplam yağ asitlerine oransal miktarı esas alınmaktadır. Termik oksidasyonda doymuş yağ asitlerinde değişim gerçekleşse dahi majör değişim doymamış yağ asitlerinde gerçekleşmektedir (Normand, 2005).

Ruşeym yağında linoleik asit en fazla (%55.14) bulunan yağ asidi iken, oleik (%17.88), palmitik (%17.29) asitler bunu takip etmektedir. Bu bileşimsel özellik önceki çalışmalarda (Brandolini ve Hidalgo, 2012; Barnes, 1983; Zou, 2018; Ghafoor ve diğ., 2017; Kan, 2012; Kumar ve Krishna, 2013; Özcan ve diğ., 2013; Zarroug ve diğ., 2015; Feltre, 2020) bildirilen miktar yüzdeleri ile uyumlu bulunmuştur. Oldukça hızlı okside olabilen linoleik ve oleik asitlerin yağda miktarlarının yüksek olması, yağdaki oksidatif stabilitenin düşük olmasına sebep olmaktadır (Güven ve Kara, 2016). Böylece, ruşeym yağının yağ asit profili göz önünde alındığında oksidasyon reaksiyonlarına karşı hassasiyetinin oldukça yüksek olduğu ifade edilebilir.

#### 4.2.2 Tokoferol, fitosterol ve karoten miktarları

Ruşeym yağı, antioksidan etkileriyle bilinen ve hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynayan tokoferol, fitosterol ve karoten bakımından oldukça zengindir. Çalışmada kullandığımız ruşeym yağına ait tokoferol (mg/kg), fitosterol (mg/g) ve karoten (mg/100g) miktarları Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.3 :** Ruşeym yağının tokoferol, fitosterol ve karoten miktarları.

Bileşen	
Tokoferol (mg/kg)	
$\alpha$ -tokoferol	1809.1±2.12
$\beta$ ve $\gamma$ tokoferol	754.6±17.25
$\delta$ -tokoferol	381.3±7.78
Toplam tokoferol	2945±7.78
Fitosteroller (mg/g)	
$\beta$ -sitosterol	6.81±0.87
Stigmasterol ve kampesterol	11.40±0.45
Toplam fitosterol	18.22±0.42
Karoten miktarı (mg/100g)	
$\beta$ -karoten - HPLC	11.15±0.28
$\beta$ -karoten - Spektrofotometre	17.80±0.00
Lutein	3.28±0.04

Çalışmamızda Yuan ve diğ. (2017)'nin önerdiği yöntem kullanılarak tokoferol ve fitosteroller aynı çalışma koşullarında belirlenmiş ve araştırmacıların da tespit ettiği gibi  $\beta$  ve  $\gamma$  tokoferol miktarı birlikte verilmiştir. Yenilebilir yağların oksidasyona karşı direnci, onların sahip olduğu yağ asitleri kadar sabunlaşmayan maddelerin içeriği ve miktarına da

bağlıdır (Kan, 2012). Çizelge 4.3 incelendiğinde, toplam tokoferol (2945 mg/kg) içindeki en büyük payın  $\alpha$ -tokoferole (1809 mg/kg) ait olduğu görülmektedir. Kilogram ruşeym yağındaki  $\beta$  ve  $\gamma$  tokoferol miktarı 754,6 mg olarak,  $\delta$ -tokoferol 381,3 mg olarak bulunmuştur.

Ruşeym yağına ait  $\alpha$ -tokoferol içeriğinin belirlendiği çalışmalar incelendiğinde ruşeym yağının  $\alpha$ -tokoferol içeriğini; Wang ve Johnson (2001) 1300-2700 mg/kg, Arshad ve diğ. (2008) 1660 mg/kg olarak bulmuşlardır. Beş farklı yöntem ile üretilmiş ruşeym yağlarının  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  tokoferol miktarlarının araştırıldığı bir başka çalışmada da en yüksek tokoferol miktarının  $\alpha$  tokoferol olduğu rapor edilmiştir (Eisenmenger ve Dunford, 2008). Megahad ve El Kinawy (2002) yaptıkları çalışmada  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$  tokoferol miktarlarını sırasıyla 1179, 398, 493 ve 118 mg olarak bulmuşlardır. Zou ve diğ. (2018) çalışmalarında,  $\gamma$  tokoferol miktarını 2306 mg, toplam tokoferol miktarını ise 3310 mg olarak bulmuşlardır. Barnes (1982) ruşeym yağındaki toplam tokoferol miktarının 1790-3200 mg/kg aralığında değiştiğini bildirmiştir.

Literatürde yer alan veriler ile çalışmamızda saptanan bulgular (toplam tokoferol miktarı: 2945 mg/kg ve toplam tokoferol içindeki en yüksek miktarda bulunan  $\alpha$ -tokoferol miktarı: 1809 mg/kg) paralellik göstermektedir.

Panfili ve diğ. (2003) ise; solvent ekstraksiyonu ve farklı sürelerde uygulanan süper kritik CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile elde ettikleri ruşeym yağlarının  $\alpha$ ,  $\beta$  ve toplam tokoferol miktarlarını HPLC yöntemi kullanarak belirlemişlerdir. Solvent ekstraksiyonu ile elde edilmiş ruşeym yağının  $\alpha$ ,  $\beta$  ve toplam tokoferol miktarlarını sırasıyla 1630, 543 ve 2173 mg/kg; süper kritik CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile elde edilen ruşeym yağının ise sırasıyla 2123, 709 ve 2832 mg/kg olarak bulmuşlardır. Sonuç olarak, solvent ekstraksiyonu ile süper kritik CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu kıyaslandığında  $\alpha$ ,  $\beta$  ve toplam tokoferol miktarlarının solvent ekstraksiyonu ile azaldığını belirlemişlerdir. Bulgular değerlendirildiğinde, çalışmamızda kullandığımız yağın üretim yönteminin soğuk sıkım yöntemi olması farklılıkların temel sebebi olarak düşünülebilir.

Literatürde yer alan bulgular tokoferol miktarları arasında geniş bir dağılım olduğunu vurgulamıştır. Bu durumun muhtemel sebepleri arasında tedarik edilen yağın üretim prosesi, depolama koşulları ve yağın elde edildiği buğdayın türü, yetiştirme koşulları ve depolama şartları gibi etkenlerin sebep olduğu düşünülmektedir.

Ruşeym yağının sabunlaşmayan diğer bileşenlerinden olan fitosteroller de tokoferoller gibi diğer bitkisel yağlara kıyasla ruşeym yağında daha yüksek miktarlarda bulunmaktadır. Fitosterollere ait bulgular incelendiğinde  $\beta$ -sitosterol miktarı 6.81 mg/g

stigmasterol ve kampesterol miktarları birlikte tespit edilerek toplam miktar 11.40 mg/g ve toplam fitosterol miktarı 18.22 mg/g olarak tespit edilmiştir.

Eisenmenger ve Dunford (2008) yaptıkları çalışma sonucunda hekzan ve süperkritik akışkan ekstraksiyonları ile elde ettikleri ruşeym yağlarındaki toplam fitosterol miktarlarını yaklaşık 3,7 mg/g olarak bulmuşlardır. Ham ruşeym yağında ise toplam fitosterol miktarını 3,05 mg/g olarak, kampesterol stigmasterol ve  $\beta$ -sitosterol miktarlarını ise sırasıyla 0,63, 0,21 ve 2,59 mg/g olarak tespit etmişlerdir. Gaz kromatografisi ile ruşeym yağının fitosterol profilinde  $\beta$ -sitosterol (%60-67.1), kampesterol (%22-22.2) ve stigmasterolün (%0-2.0) bulunduğu bildirilmiştir (Malecka, 2002; Brandolini ve Hidalgo, 2012; Ghafour ve diğ, 2017).

Literatür verileri ile elde ettiğimiz sonuç kıyaslandığında fitosterol miktarlarındaki farklılığın yağın elde edildiği buğdayın türü, depolama koşulları ve işleme koşullarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı zamanda bütün bulgulara bakıldığında fitosteroller arasında miktar bakımından en baskın olanın  $\beta$ -sitosterol olduğu bulgusu literatürle örtüşmektedir.

Sağlık üzerine oldukça faydalı etkileri olan biyoaktif ve fonksiyonel bir bileşen olan karotenoidler, bitkisel gıdalarda yer alan bir çeşit pigmenttirler. Bitkilerde karotenoidlerin en yaygın üyeleri arasında  $\beta$ -karoten ve lutein yer almaktadır (Zou ve diğ, 2018). Yağda çözünebilir ve ruşeym yağındaki sabunlaşmayan maddeler arasında yer alan karotenler A vitamini öncülü olmanın yanı sıra serbest radikalleri vücuttan bertaraf etmek gibi bir fonksiyona sahip antioksidandır.

Çalışmamızda ruşeym yağının  $\beta$ -karoten miktarı HPLC ve spektrofotometre teknikleri kullanarak sırası ile 11.15 mg/100g ve 17.8 mg/100g olarak; lutein miktarı ise HPLC ile 3.28 mg/100g olarak belirlenmiştir.

Çalışma verilerimiz ile uyumlu olarak ruşeym yağının  $\beta$ -karoten konsantrasyonu HPLC yöntemi ile 2.42-11.89 mg/100 g aralığında (Kumar ve Krishna, 2013; Zou ve diğ, 2018) değiştiği rapor edilmiştir. Spektrofotometrik yöntem ile ruşeym yağının  $\beta$ -karoten miktarı ise 12.5mg/100g olarak bildirilmiştir (Zou ve diğ, 2018). Ayrıca, Tunusta yetiştirilen *Triticum durum* L. ve *Triticum aestivum* L. buğdaylarının ruşeym yağlarında bulunan  $\beta$ -karoten miktarlarını sırasıyla; 15.96 ve 17.12 mg/g olarak bulmuşlardır (Zarroug ve diğ, 2015). Kumar ve Krishna (2013) tarafından yapılan çalışmada ise ruşeym yağının HPLC analizi  $\beta$ -karoten miktarı 2.42 mg/100g olarak, solvent ekstraksiyonu ve süper kritik CO<sub>2</sub> ekstraksiyonu ile elde edilen ruşeym yağının  $\beta$ -karoten miktarı sırası ile 8.3mg/kg, 11.0 mg/kg olarak bildirmişlerdir. Ruşeym yağının lutein içeriğini inceleyen çalışmalarda

miktar aralığının 0.47-2.95 mg/100g olduğu bildirilmiştir (Kumar ve Krishna, 2013; Panfili ve diğ., 2003).

Yapılan çalışmaların koşulları incelendiğinde ruşeym yağının karotenoidleri üzerinde yağın elde edildiği buğday türünün, buğdayın yetiştirme ve depolama koşullarının, ruşeym yağı elde etme yönteminin, örnekten karotenoid ekstraksiyon yöntemi ve solvent çeşitliliğinin, analiz tekniği ve koşullarının etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

### 4.3 Enkapsüllerin Karakterizasyonu

#### 4.3.1 Enkapsüllerin etkinlik değerleri

Farklı kütle oranları (ruşeym yağı; 2.5, 5, 10 ve 20 g ve maya hücresi 10 g), ve iki farklı üretim ortamı (solvent olarak %100 su ve %10 etanol) ve 3 çeşit kabuk materyali (plazmolize edilen, plazmolize edilmeyen ve canlı maya hücreleri), kullanılarak üretilen enkapsüllerin etkinlik değerleri karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve etkinlik test sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir. Etkinlik sonuçlarına göre farklı formülasyonlarda hazırlanan enkapsüllerin etkinlik değerleri üzerinde merkez: kabuk materyal kütle oranının, üretim ortamının ve kabuk materyal çeşidinin etkili olduğu ( $P<0.05$ ) ifade edilebilir.

Çizelge 4.4 : Enkapsülasyon etkinliği (%).

Örnekler	Kütle oranı (ruşeym yağı:maya hücresi)			
	0.25	0.50	1	2
PS	43.10±0.08aA	31.84±5.01aB	29.22±2.51aB	11.35±1.33aC
n-PS	35.96±2.14bA	25.67±0.41bB	13.36±1.75bcC	6.24±1.78bD
CS	18.80±2.42cA	17.90±0.57cA	6.37±0.28dB	3.13±1.36cdC
PE	20.22±1.98cA	14.13±0.81dB	14.57±0.39bB	10.29±2.27aC
n-PE	14.17±0.03dA	13.77±0.01dA	11.79±0.46cB	4.49±0.58bcC
CE	8.38±0.01eAB	8.86±2.14eA	6.92±0.30dB	2.40±0.44dC

\*Ortalama±standart sapma. Sonuçlar iki tekrür ortalamasıdır (n=2). Aynı sütunda farklı küçük harflerle (a-e) gösterilen ortalamalar aynı kütle oranında örneklerin birbirinden  $P<0.05$  düzeyinde farklı olduğunu göstermektedir. Aynı satır farklı büyük harflerle (A-D) gösterilen ortalamalar aynı örneğin farklı kütle oranlarında birbirinden  $P<0.05$  düzeyinde farklı olduğunu göstermektedir. PS: plazmoliz su; n-PS: plazmoliz edilmeyen su; CS: canlı su; PE: plazmoliz etanol; n-PE: plazmoliz edilmeyen etanol; CE: canlı etanol

Tüm kabuk materyal formülasyonları ve enkapsül ortamları için kütle oranının 0.25'den 2'ye artması ile enkapsül etkinliğinin (PS örneği için, %43.10±0.08'den %11.35±1.33'e; PE örneği için, %20.22±1.98'den %10.29±2.27'ye; n-PS örneği için, %35.96±2.14'den 6.24±1.7'e; n-PE örneği için, %14.17±0.03'ten %4.49±0.58'e; CS



örneği için,  $18.80 \pm 2.42$ 'den  $3.13 \pm 1.36$ 'ya ve CE örneği için,  $8.38 \pm 0.01$ 'den  $2.40 \pm 0.44$ 'e önemli derecede ( $P < 0.05$ ) azalma eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Kütle oranı ile elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumlu olarak Paramera ve diğ. (2011a) kurkumini maya hücreleri ile enkapsül etmiş ve kütle oranının 1'den 10' kadar artışı ile etkinlik değerinin düşme eğiliminde olduğunu ve bu durumu her bir hücrenin sınırlı yükleme kapasitesine sahip olduğu, belirli bir merkez:kabuk materyal oranının üstüne çıkıldığında daha ileri miktarda yükleme yapılamayacağı için etkinliğin düşme eğiliminde olacağı ifadesi ile açıklamıştır (Paramera ve diğ, 2011a).

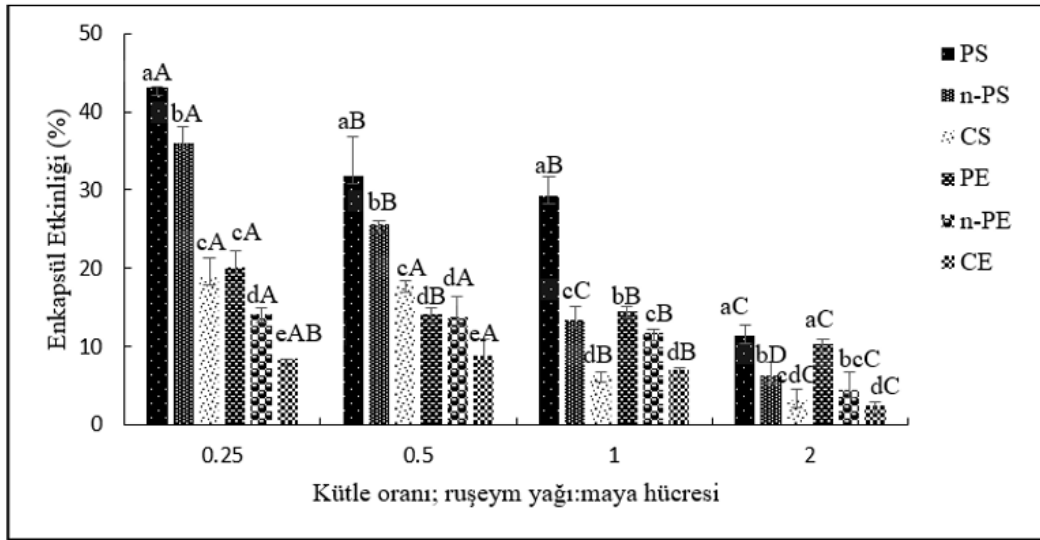
Enkapsül üretiminde organik çözücülerin hücre membranının permeabilitesini arttırdığı bilinmektedir (Czerniak ve diğ, 2015). Ancak test edilen tüm kütle oranlarında, enkapsülasyon ortamı olarak suyun kullanıldığı üretimlerde %10 etanol formülasyonuna kıyasla enkapsül etkinliği önemli ölçüde ( $P < 0.005$ ) daha yüksektir. Su ve etanol üretim ortamlarında 0.25 kütle oranında etkinlik değerleri plazmoliz edilen örnekler için sırası ile  $43.100 \pm 0.08$ ,  $20.22 \pm 1.98$ , plazmoliz edilmeyen örnekler için sırası ile  $35.96 \pm 2.14$ ,  $14.17 \pm 0.03$  ve canlı hücre örnekleri için  $18.80 \pm 2.42$ ,  $8.38 \pm 0.01$  olarak belirlenmiştir. Balık yağının maya hücreleri ile kapsüllendiği çalışmada %6.5 oranında kullanılan etil asetatın etkinliği azalttığı (Czerniak ve diğ, 2015), benzer şekilde kurkuminin enkapsülasyonunda %50 etanolün etkinlikte azalmaya sebep olduğu (Paramera ve diğ, 2011a), ancak %10 etanol kullanımı ile antosiyanin ekstraktının enkapsülasyonunda etkinlik artışı sağlandığı (Nguyen ve diğ, 2018) bildirilmiştir. Enkapsülasyon işleminde kullanılan organik çözücünün etkinliği artırma ya da düşürme üzerine etkisi başta organik çözücü konsantrasyonuna (belirli bir noktaya kadar membran lipit-lipit etkileşimine zarar vererek akıcılığı ve permeabiliteyi artırarak, etkinliği arttırabileceği, ancak belli düzeyin üstünde hücre lizisine sebep olarak etkinliği azaltabileceği), merkez materyalin organik çözücüde çözünme özelliğine (apolar karakterde bir merkez materyalin afinitesi organik çözücüye daha yüksek olacağı için organik çözücüde kalmayı tercih edecek ve etkinliği düşürebilecektir ya da tam tersi durumda merkez materyal polar karakter ise etkinlik artacaktır), pH, sıcaklık (benz alkol ya da etil alkolün üretim sıcaklığında ( $55^{\circ}\text{C}$ ) buharlaşarak yapıdan uzaklaşması sebebi ile etki göstermemesi) ve hücre yoğunluğuna bağlı olarak değişebilmektedir (Czerniak ve diğ, 2015; Paramera ve diğ, 2011a; Nguyen ve diğ, 2018).

Enkapsülasyon işleminde merkez materyal iki şekilde üretim sürecini tamamlamaktadır. İlk yolda hücre içerisine girmekte ve uygun boşluklarda (lipit damlaları

ve vakuoller) tutunmakta, ikinci yolda ise hücre duvar bileşenleri ile hidrojen bağları kurmakta ya da plazma membranı fosfolipit tabakasındaki hidrokarbon zincirleri arasında tutunmaktadır (Nomand ve diğ, 2005; Czerniak ve diğ, 2015). İlk üretim süreci için Bishop ve diğ. 1998 maya hücresine yağ yükleme işleminin iki aşamalı işlemle gerçekleştiğini, ilk aşamada hücre bileşenlerinin dışarı çıkışının ikinci aşamada ise kendiliğinden yağın hücre içine alındığını vurgulamıştır. Plazmoliz işleminde hücrenin suda çözünebilir stoplazmik içeriğinin (protein, polisakkarit, enzim, amino asit ve nükleik asit gibi) boşalması sonucunda hücre içi boşluklar artacağını, bu durumdaki hücre boş bir çuval gibi merkez materyal ile doldurulabileceği belirtilmiştir. Böylece merkez materyal hücre içerisine girme yolu ile biyokapsüle edildiyse plazmolize edilmiş hücrelerde enkapsülasyon etkinliğinin artması beklenmektedir (Paramera ve diğ, 2011a). Test edilen tüm kütle oranlarında ve hem su hem de etanol üretimlerinde etkinlik değerinin plazmoliz işlemi ile arttığı ( $P < 0.05$ ) belirlenmiştir. Bu veri ışığında ruşeym yağının maya hücreleri içerisinde tutuklandığı söylenebilir. Enkapsülasyon taşıyıcısı olarak plazmolize edilen ve edilmeyen hücrelerin etkinlik değerlerini inceleyen çalışmalarda; klorojenik asidin plazmolize edilen hücrelerde plazmolize edilmeyenlere kıyasla etkinlik değerinin iki kat arttığı, bu artışın polar yapıdan kaynaklandığı bildirilmiştir (Shi ve diğ, 2007). Kurkuminin maya hücrelerinde enkapsülasyonunun incelendiği çalışmada; plazmoliz işlemi ile etkinlikte önemli bir değişiklik olmadığı, enkapsülasyonun kurkuminin hücre duvarı bileşenleri sonucunda hidrojen bağları oluşturarak ya da stoplazmik membranı üzerine adhezyonla (yapışma) gerçekleştiği teorileri ile açıklanmıştır (Paramera ve diğ, 2011a). Bir başka çalışmada; balık yağının enkapsülasyonunda plazmoliz işleminin etkinliği %32.6'dan %45.53'e yükselttiği belirlenmiş, çalışmada alınan Transmission Electron Microscope (TEM) görüntüleri ile manipülasyon işleminin hücre içinde boşluklar oluştuğu ve balık yağının bu boşluklarda bir ya da daha fazla lipit damlaları oluşturarak stoplazma içinde kaldığı bildirilmiştir (Czerniak ve diğ, 2015). Kavosi ve diğ. (2017) semiz otu tohum yağının maya hücresi ile enkapsülasyonunda etkinliğinin plazmoliz işlemi ile %52.96'dan %60.27'ye çıktığını rapor etmişlerdir.

Aynı üretim ortamı ve aynı kütle oranında üretilen enkapsüller incelendiğinde en yüksek etkinliğe plazmolize edilen hücreler ile ulaşılmışken, en düşük etkinlik ise canlı hücrenin kullanıldığı üretimde belirlenmiştir. Böylece farklı kabuk materyallerin etkinlik başarısı sıralanınca en başarılı üretimin plazmoliz hücrelerinde, sonra plazmoliz edilmeyen hücrelerde olduğu, son sırada ise canlı hücrelerin yer aldığı belirlenmiştir ( $P > n-P > C$ ).

Enkapsülasyonda merkez materyalin hücre içine girişi konsantrasyon gradientinden oluşan farkla, pasif difüzyon ilkesi ile gerçekleşmektedir. Bu hareketlilikte herhangi bir hücrenel ya da kimyasal enerji gerekmemektedir. Bu durumda hücrenin canlılığı enkapsül etkinliğini etkileyen bir parametre olmamaktadır (Paramera, ve diğ, 2011a; Rathore ve diğ, 2013). Şekil 4.2’de gösterildiği gibi farklı kütle oranı, farklı üretim ortamı ve farklı kabuk materyal kullanımı sonucunda üretilen enkapsüllerin etkinlik değerleri incelendiğinde en yüksek etkinliğin 0.25 kütle oranında, su üretim ortamında ve plazmolize edilen hücre kullanımı ile elde edilen kapsülde (PS,%43.10±0.08) olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.2 : Enkapsül örneklerinin etkinlik oranları.

#### 4.3.2 Enkapsüllerin yükleme kapasiteleri

Farklı kütle oranları (ruşeym yağı; 2.5, 5, 10 ve 20 g ve maya hücresi 10 g), ve iki farklı üretim ortamı (solvent olarak %100 su ve %10 etanol) ve 3 çeşit kabuk materyali (plazmolize edilen, edilmeyen ve canlı maya hücreleri) kullanılarak üretilen enkapsüllerin yükleme kapasiteleri karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve etkinlik test sonuçları Çizelge 4.5’te verilmiştir. Yükleme kapasitesi enkapsül toplam ruşeym yağı miktarından kapsül yüzeyindeki yağ miktarı çıkarıldıktan sonra elde edilen değerinkapsülün kuru ağırlığına oranı ile hesaplanmıştır.

En yüksek etkinlik ve yükleme kapasitesi değerini sağlayan kabuk materyal çeşidi, solvent türü ve oranının saptanması amacıyla yapılan enkapsülasyon denemelerinde, kapsüldeki ruşeym yağı miktarında en düşük azalmanın elde edildiği kabuk çeşidi, miktarı ve üretimdeki solvent cinsi tez çalışmasının devam eden kısımlarında ruşeym yağının enkapsülasyonunda tercih edilen oranlar olarak kabul edilmiştir. Enkapsülasyon etkinliği

ve enkapsül yükleme kapasitesi bağımlı değişkenlerinin en yüksek değerlerine göre düzenlenen optimizasyon çalışmasında elde edilen veriler değerlendirilmiştir.

**Çizelge 4.5 :** Enkapsül yükleme kapasiteleri (g/kg).

Örnekler	Kütle oranı (ruşeym yağı:maya hücresi)			
	0.25	0.50	1	2
PS	216.52±6.09aA	177.24±9.62aB	166.78±8.86aC	79.17±0.81aD
n-PS	185.79±11.9bA	140.88±2.00bB	65.48±8.46cC	22.45±0.28bcD
CS	116.13±1.60dA	116.45±1.25cA	27.43±0.48dB	17.09±7.42cdC
PE	139.02±9.5cA	77.23±1.68dB	79.48±0.93bB	76.31±7.14aB
n-PE	66.03±9.16eA	62.62±5.26eA	62.12±2.61cA	25.74±6.00bB
CE	31.03±4.81fA	35.19±4.87fA	24.88±4.88dB	15.46±0.80dC

\*Ortalama±standart sapma. Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır (n=2). Aynı sütunda farklı küçük harflerle (a-e) gösterilen ortalamalar aynı kütle oranında örneklerin birbirinden P<0.05 düzeyinde farklı olduğunu göstermektedir. Aynı satır farklı büyük harflerle (A-D) gösterilen ortalamalar aynı örneğin farklı kütle oranlarında birbirinden P<0.05 düzeyinde farklı olduğunu göstermektedir. PS: plazmoliz su; n-PS: plazmoliz edilmeyen su; CS: canlı su; PE: plazmoliz etanol; n-PE: plazmoliz edilmeyen etanol; CE: canlı etanol

Tüm kabuk materyal formülasyonları ve enkapsül ortamları için kütle oranının 0.25'den 2'ye artması ile enkapsüllerin yükleme kapasitelerinin (PS örneği için, 216.52±6.09'dan 79.17±0.81'e; PE örneği için, 139.02±9.5'ten 76.31±7.14'e; n-PS örneği için, 185.79±11.9'dan 22.45±0.28'e; n-PE örneği için, 66.03±9.16'dan 25.74±6.00'ya; CS örneği için, 116.13±1.60'tan 17.09±7.42'ye ve CE örneği için de 31.03±4.81'den 15.46±0.80'e) önemli derecede (P<0.05) azalma eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Kütle oranına bağlı elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumlu olarak; Bölüm 4.3.1'de de ifade edildiği gibi Paramera ve diğ, (2011a) tarafından saptanan bulgular ile açıklanabilir. Ancak aktif bileşiklerin çözünürlüklerindeki farklılık ve bundan kaynaklanan tutma mekanizmalarındaki farklılık nedeniyle birebir karşılaştırma yapmak mümkün değildir. Ayrıca suda çözünür kimyasalların taşıma mekanizması ve hücrelere dönüşümü henüz tam olarak açıklanmamıştır (Shi ve diğ, 2007).

Üretilen enkapsüllerde, enkapsülasyon ortamı olarak suyun kullanımı %10 etanolün kullanımına kıyasla enkapsüllerin yükleme kapasitelerinde önemli ölçüde (P<0.005) farklılık göstermiştir. Ancak enkapsül üretiminde organik çözücülerin hücre membranının permeabilitesini arttırdığı bilinmektedir (Czerniak ve diğ, 2015). Su ve etanol üretim ortamlarında 0.25 kütle oranında yükleme kapasitesi değerleri plazmoliz edilen örnekler için sırası ile 216.52±6.09, 139.02±9.5, plazmoliz edilmeyen örnekler için sırası ile 185.79±11.9, 66.03±9.16 ve canlı hücre örnekleri için 116.13±1.60, 31.03±4.81olarak

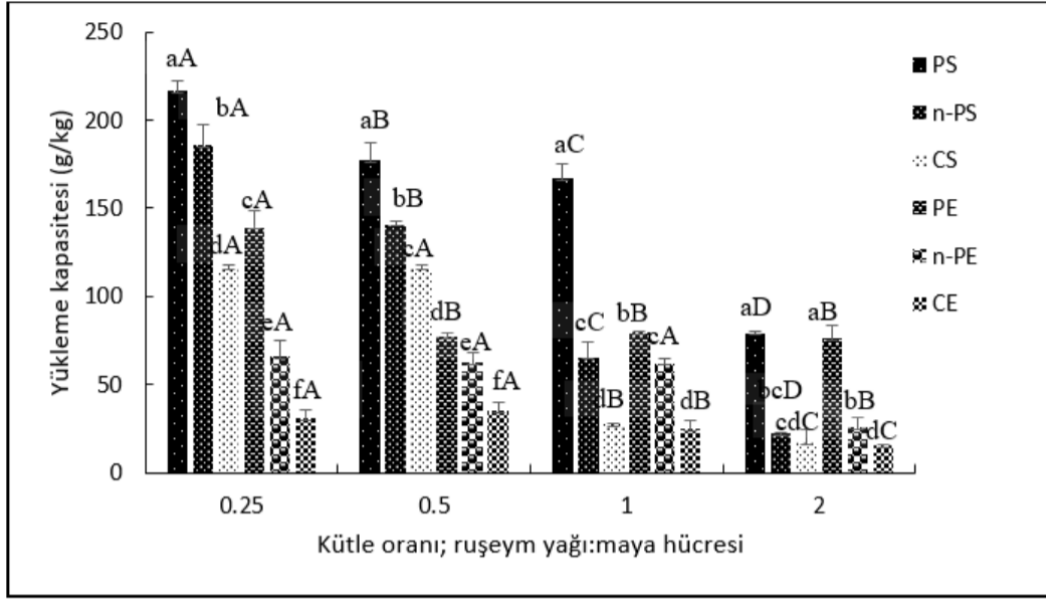
belirlenmiştir. Kurkuminin enkapsülasyonunda %50 etanolün yükleme kapasitesinde azalmaya sebep olduğu (Paramera, ve diğ, 2011a), ancak %10 etanol kullanımı ile antosiyanin ekstraktının enkapsülasyonunda yükleme kapasitesinde artış sağlandığı (Nguyen ve diğ, 2018) bildirilmiştir. Enkapsülasyon işleminde kullanılan organik çözücünün enkapsülasyon etkinliğine benzer bir etkiyi enkapsül yükleme kapasitesinde de göstermesi beklenmektedir (Bölüm 4.3.1). Enkapsüllerin yükleme kapasitesi bu beklentiyi karşılamaktadır.

Plazmoliz işleminde sitoplazmik materyallerin kaybının bir sonucu olarak hücre içi boşlukların artmasına bağlı daha fazla miktarda merkez materyal ile doldurulabileceği ve böylece merkez materyalin hücre içerisine girme yolu ile enkapsüle edilmiş ise plazmolize edilmiş hücrelerde yükleme kapasitesinin artması beklenmektedir (Paramera, ve diğ, 2011a). Test edilen tüm kütle oranlarında ve hem su hem de etanol üretimlerinde yükleme kapasitesi değerinin plazmoliz işlemi ile arttığı ( $P<0.05$ ) belirlenmiştir. Bulgular değerlendirildiğinde ruşeym yağının maya hücreleri içerisinde tutuklandığı söylenebilir. Enkapsülasyon taşıyıcısı olarak plazmolize edilen ve edilmeyen hücrelerin yükleme kapasitelerini inceleyen çalışmalarda; kurkuminin maya hücrelerinde biyokapsülasyonunda plazmoliz işlemi ile yükleme kapasitesinde önemli bir değişiklik olmadığı tespit edilmiş ve bu durum biyokapsülasyonun üretim sürecindeki biyokapsül üretim yolunun hücre içine girmek değil de yüzeye tutunması ile açıklanmıştır (Paramera, ve diğ, 2011a). Balık yağının biyokapsülasyonunda plazmoliz işlemi ile yükleme kapasitesinin 163.0'dan 226.2'ye yükselttiği belirlenmiş, çalışmada alınan TEM görüntüleri ile balık yağının manipülasyon sonucunda oluşan hücre içi boşluklara bir ya da daha fazla lipid damlaları oluşturarak stoplazma içinde kaldığı bildirilmiş (Czerniak ve diğ, 2015), semiz otu tohum yağı enkapsülasyonunda da benzer etki gösteren plazmoliz işleminin, yükleme kapasitesini 186.87 g/kg'dan 211.68 g/kg'a çıkardığı rapor edilmiştir (Kavosi ve diğ, 2017). Çörekotu tohumu yağının biyokapsül araştırmasında, plazmolize edilmeyen maya hücresinin yükleme kapasitesini 172.20 g/kg bulmuşken plazmoliz işleminin ardından yapılan biyokapsülasyon işlemi ile 260.34 g/kg ve yükleme kapasitesini artırdığı rapor edilmiştir (Karaman, 2020).

Enkapsülasyon etkinliğine benzer şekilde aynı üretim ortamı ve aynı kütle oranında üretilen enkapsüller incelendiğinde en yüksek yükleme kapasitesine plazmolize edilen hücreler ile ulaşılmışken en düşük yükleme kapasitesi, canlı hücreler ile üretilen enkapsüllerde belirlenmiştir. Böylece farklı kabuk materyallerin yükleme kapasitesi

başarısı sıralanınca en başarılı üretimin plazmoliz hücrelerinde, sonra plazmoliz edilmeyen hücrelerde olduğu, son sırada ise canlı hücrelerin yer aldığı belirlenmiştir ( $P > n-P > C$ ).

Yükleme kapasiteleri arasındaki farklılığı belirginleştirmek amacıyla Şekil 4.3.'te de gösterildiği gibi ruşeym yağı:maya hücresi miktarları 0.25, 0.5, 1 ve 2 oranlarında plazmolize edilen maya hücreleri kullanılarak su varlığında gerçekleştirilen biyokapsül örneklerinin yükleme kapasiteleri diğerlerine kıyasla daha yüksektir.



**Şekil 4.3 :** Enkapsül örneklerinin yükleme kapasiteleri.

Enkapsülasyon üretim süreci süresince merkez materyalin mümkün olan en yüksek miktarda kabuk materyaline tutunması enkapsülasyon prosesleri için oldukça önemlidir. Bu çalışmada plazmoliz işleminin enkapsüllerin EE ve EY üzerindeki etkisi araştırılmıştır ve çalışmada ruşeym yağı için, plazmolize edilmiş maya hücresinin, su ile ve 0.25 ruşeymyağı:maya hücresi kullanımının en yüksek etkinlik değerine ulaştığı belirlenmiştir (%43). Söz konusu koşullar optimum üretim koşulları olarak belirlenmiştir. Ruşeym yağının biyokapsülasyon sürecinde belirtilen nitelikteki kabuk materyalin belirlenen orandaki kullanımı ile biyokapsülün kilogramı başına yaklaşık 216 gram ruşeym yağını hapsettiği belirlenmiş ve bu değer yükleme kapasitesi olarak tespit edilmiştir. Optimum koşulların deneysel ve tahmini verileri 0.95 kabul edilebilirlik düzeyine sahip olmuştur. Optimum koşullarda üretilen biyokapsüllerin SEM görüntüleri incelenerek morfolojileri araştırılmış ve salınım, FT-IR ve oksidatif stabilite testlerinde kullanılmıştır.

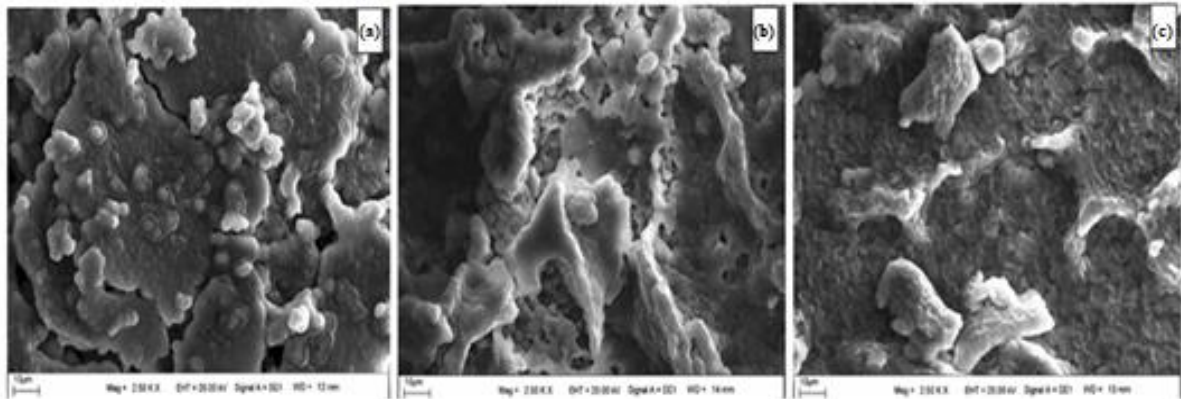
Elde ettiğimiz veriler değerlendirildiğinde biyokapsülasyon işleminde daha yüksek yükleme kapasitesi ve enkapsülasyon etkinliği elde etmek için sitoplazmik maddeleri

uzaklaştırmak gerektiği sonucu çıkarılabilmektedir. Literatürde yer alan birçok çalışmadaki (Kavosi ve diğ, 2017; Shi ve diğ, 2007; Czerniak ve diğ, 2015; Karaman, 2020) bulgular ile uyumluluk gösteriyorken merkez materyalin enkapsülasyonda izlediği yolun farklı olması sebebi ile Paremera ve diğ. (2011a)'nin ulaştığı bulgularla uyum göstermemektedir.

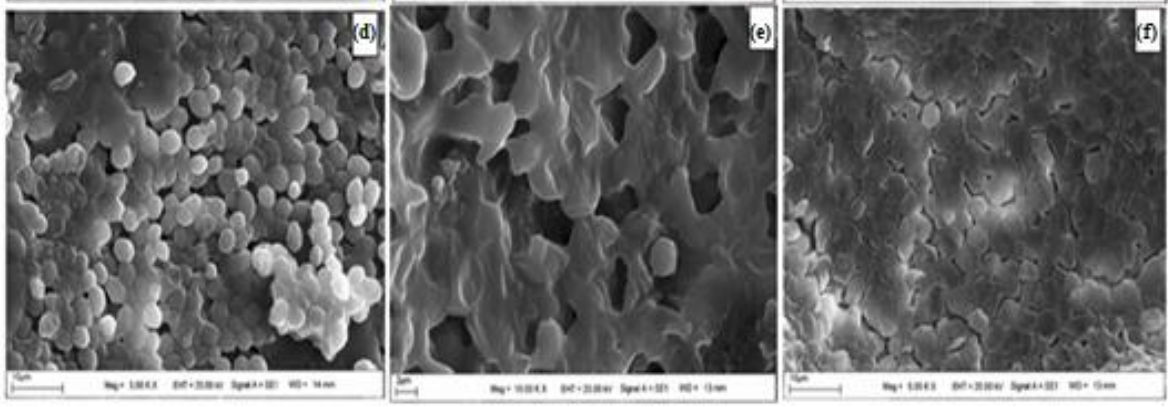
#### 4.3.3 Morfolojik yapı analizi (SEM analizi)

Ruşeym yağının *Saccharomyces cerevisiae* ile enkapsülasyonu işlemi için en uygun koşullar (merkez:kabuk materyal kütle oranı olarak 0.25, üretim ortamı olarak su) belirlendikten sonra üç farklı kabuk materyal ile enkapsülasyon prosesi gerçekleştirilmiştir. Plazmoliz su (PS), plazmoliz edilmeyen su (n-PS) ve canlı su (CS) dolu ve boş enkapsüllerinin SEM görüntüleri ile morfolojik yapıları incelenmiştir. Kontrol grubu olarak ruşeym yağı kullanılmadan üretilen boş enkapsüller (a; B-PS, b; B-n-PS, c; B-CS) ve dolu enkapsüllerin (d; PS, e; n-PS, f; CS) görüntüleri sırası ile Şekil 4.4 ve 4.5'te verilmiştir.

Hazırlanan boş ve dolu enkapsüllerin SEM görüntülerinde morfolojik yapının oldukça farklılaştığı görülmektedir. Boş enkapsüllerin SEM görüntülerinin birbirlerinden farksız olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 4.4). Merkezinde ruşeym yağı bulunan enkapsüllerin SEM görüntüleri (Şekil 4.5) incelendiğinde ise birbirinden farklı morfolojik yapı gösterdikleri tespit edilmiştir.



**Şekil 4.4 :** Kontrol grubu, boş enkapsüllerin SEM görüntüleri (a)Boş plazmoliz su. (b)Boş plazmoliz edilmeyen su. (c)Boş canlı su.



**Şekil 4.5 :** Dolu enkapsüllerin SEM görüntüleri: (d)Plazmoliz su. (e)Plazmoliz edilmeyen su. (f)Canlı su.

Ruşeym yağının plazmolize edilen hücrelerin merkezine yerleşimi ile plazmolize edilmeyen ve canlı hücrelerin merkezine yerleşiminin küresel yapı bakımından farklılık gösterdiği kaydedilmiştir. Bu durum literatürde plazmoliz işleminin hücredeki suda çözünür bileşenlerin ve proteinlerin hücreden ekstraksiyonuna neden olması neticesinde hücre içi boşluğun artması ve buna bağlı olarak hücre içindeki yağ damlacıklarının kademeli olarak genişleyen ve sonunda hücre içi boşluğa nüfuz etmiş stabilize yağ damlacığı oluşturmasına olanak vermesi ile açıklanmıştır (Bishop ve diğ, 1998; Cizerniak ve diğ, 2015). Bu yağ damlasının hücre içindeki yerleşimi, plazma membranındaki fosfolipit tabakanın hidrofobik kutupları sayesinde çevrelendiği düşünülmektedir.

Aynı zamanda merkez materyal olarak ruşeym yağı kullanımının, enkapsüllerde topaklanma davranışına destek verdiği görülmektedir. Bu durum literatürde, hücre duvarında yer alan  $\beta$ -glukanların bağlanma özelliklerine bağlı olarak (H bağı kurması) ruşeym yağı sıkışması ve hücre duvarında kalınlaşma şeklinde agregasyon oluşturması ile açıklanmıştır (Sultana ve diğ, (2017); Paramera ve diğ, (2011a); Karaman, (2020)).

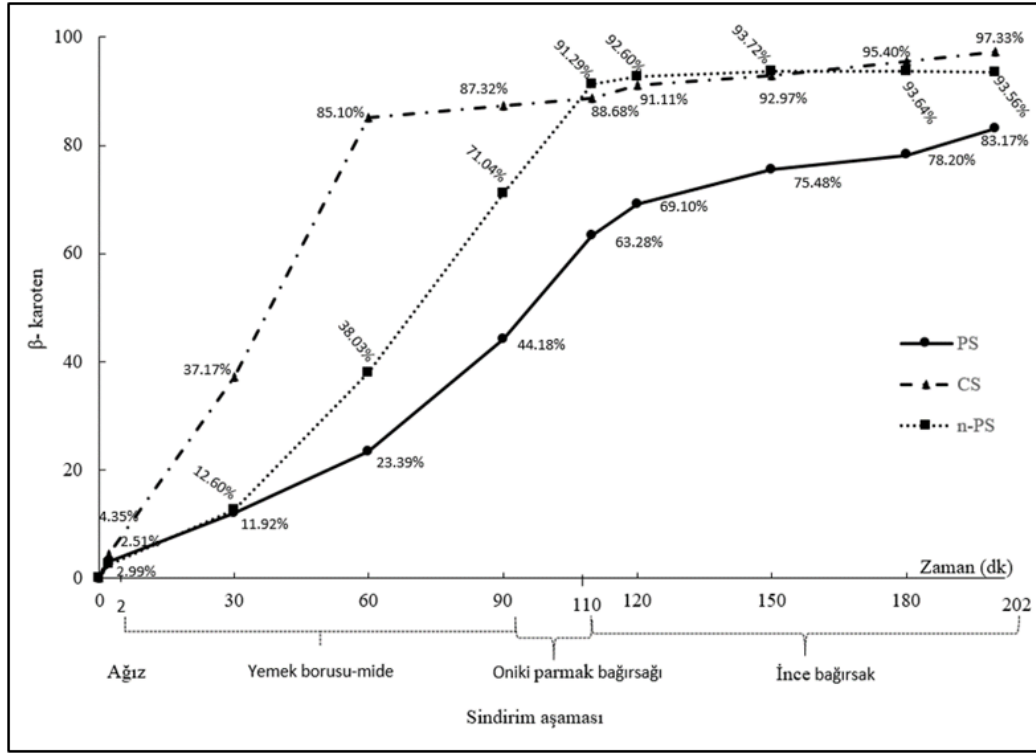
Ulaşılan sonuçların aksine, Kavosi ve diğ. (2017) semiz otu yağı ile yaptıkları çalışmada plazmolizin maya hücrelerinin yüzey morfolojisi üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını ve birbirleri ile benzer küresel yapılar gösterdiklerini tespit etmişlerdir. Çörek otu yağını enkapsüle eden Karaman (2020) ise plazmolize edilmemiş *S. cerevisiae*'nin düzgün ve pürüzsüz yüzeyler gösterdiğini ve plazmoliz işleminin hücrelerde küçük deformasyona neden olduğu sonucuna varmıştır.



#### 4.3.4 Salınım testi

Optimum şartlara göre oluşturulmuş enkapsüller (PS, n-PS, CS) ile Bölüm 3.3.2.4'te tanımlanan salınım testi gerçekleştirilmiştir. Salınım testinde, sindirim ortamında belirlenen  $\beta$ -karoten, salınan ruşeym yağının indikatörü olarak değerlendirilmiştir. Böylece enkapsüllerdeki ruşeym yağı ne kadar çok salınırsa o oranda yüksek  $\beta$ -karoten miktarı görülmektedir. Her bir enkapsül eşit miktarlarda (10 g) kullanılmıştır ancak enkapsülasyon etkinliğinin (%) farklı olması sebebi ile salınan  $\beta$ -karoten miktarları da farklılık göstermiştir (Şekil 4.6). Maya hücrelerine uygulanan işlemler, sindirim koşulları ve bunların etkileşimlerinin  $\beta$ -karoten salınımını önemli derecede ( $P<0.05$ ) etkilediği belirlenmiştir. Ağız ortamında salınan  $\beta$ -karoten miktarının oldukça düşük olduğu gözlemlenmiştir. Yemek borusu-mide aşamasında ağız koşullarına ve hatta salınımın devam ettiği oniki parmak ve ince bağırsak koşullarına kıyasla çok yüksek miktarda  $\beta$ -karoten salındığı dikkat çekmektedir. Yemek borusu-mide aşamasında PS, n-PS ve CS örneklerinden salınan  $\beta$ -karoten miktarları sırası ile %44.18, %71.18 ve %87.32'dir. Bu koşullarda uzun kalış süresi (90 dk), düşük pH değeri (yaklaşık 2) ve pepsin enzimi ile etkileşimin kombine etkisinin bu yüksek salınım değerlerinde etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu aşamaya kadar en yüksek  $\beta$ -karoten salınım oranı canlı hücre kaspülünde belirlenmiştir. Maya hücrelerinin en dış  $\beta$ -glukan ağı ( $\beta$ -glukan 1,3 ve  $\beta$ -glukan 1,6), kitin ve proteinlerden oluşan tabaka ve hücrenin seçici geçirgenlik özelliğini karakterize eden plazma membran hücre bütünlüğünü sağlamaktadır (Salari ve diğ., 2015; Shi ve diğ., 2008). Canlı hücre enkapsüllerinde belirtilen bu yapı bileşenlerinin salınım ortamında daha kolay deforme olması ya da mide ortamının asitliğinde yapısal yıkıma uğraması yüksek salınım eğilimini açıklamaktadır. Elde ettiğimiz bu bulgu maya hücrelerinde enkapsüle edilen resveratrolün insan sindirim sisteminin taklit edildiği koşullarda ilk 90 dk içinde %90'ının salındığını bildiren çalışma ile uyumludur (Shi ve diğ., 2008). Ayrıca Salaria ve diğ. (2015) maya hücrelerinde enkapsüle ettikleri berberinin düşük pH derecelerinde salınım hızının arttığını belirtmiştir. Plazmolize edilen hücre enkapsüllerin yemek borusu-mide aşamasındaki nispeten düşük salınım hızı sebebi olarak plazmoliz işlemi sırasında hücre duvar bileşenlerinin organizasyon bozulmasının yanı sıra düşük pH ve gastrik enzimlere maruz kalma sonrasında emülsiyon damlalarının koalesans/flokülasyonu ile açıklanabilir. Düşük pH derecelerinde (2) protein yüzeyi pozitif yüklü olarak kalır ve peptik hidroliz damla yüzeyinin pozitif yük kaybına neden olmaktadır

bu durum da proteinleri yeterli elektrostatik itme sağlayamaz hale getirir ve bu durumun sonucunda damlalarda koalesans/flokülasyon gerçekleşir (Goyal ve diğ, 2016).



**Şekil 4.6 :** Enkapsüllerin insan sindirim sisteminin taklit edildiği koşullarda belirlenen salınım profilleri.

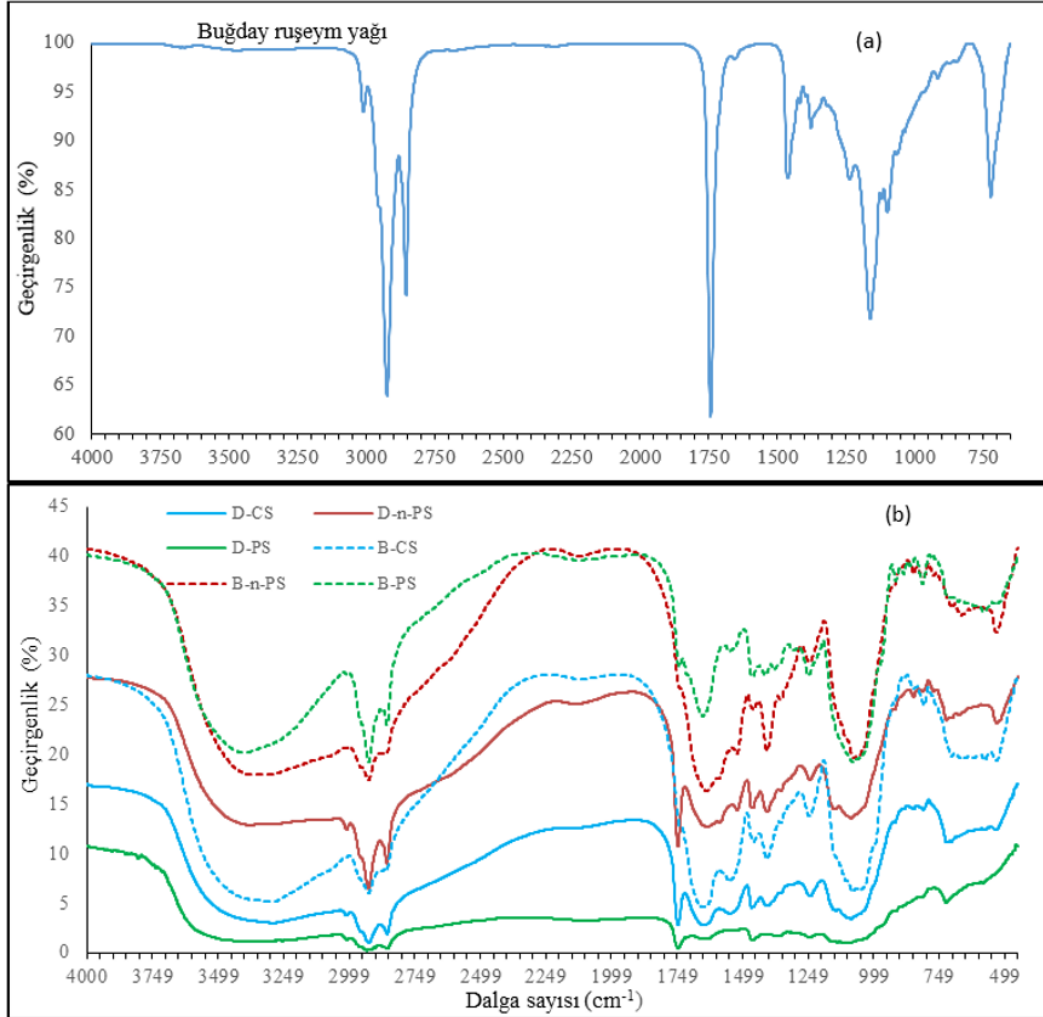
(PS: Plazmolize su, n-PS: Plazmolize edilmeyen su, CS: Canlı su.)

Salınımın devam eden aşamaları olan oniki parmak bağırsağı (20dk) ve ince bağırsak da (90dk) salınım hızının yavaşladığı gözlemlenmiş ve PS, n-PS ve CS kapsüllerinden %38.99, %22.72 ve %10.01 β-karoten daha salındığı belirlenmiştir. Böylece plazmolize maya hücrelerinde enkapsüle edilen ruşeym yağının en yüksek sindirim alanının ince bağırsak olduğu söylenebilir. Bu veri ile uyumlu olarak, Fu ve diğ. (2021) tarafından yapılan çalışmada maya hücresi ile enkapsüle edilen antarktık kril yağının bağırsak ortamının taklit edildiği koşullarda daha yüksek salınım hızı sergilediği belirtilmiştir.

İnsan sindirim sisteminin taklit edildiği koşullarda PS, n-PS ve CS den salınan toplam β-karoten miktarları sırası ile %83.17, %93.56 ve %97.33 olarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler ışığında plazmolize maya hücrelerinin, buğday ruşeym yağını gastrointestinal sistem boyunca hedeflenen yere taşımak için uygun duvar materyali olarak kullanılabileceği ifade edilebilir.

### 4.3.5 FT-IR analizi

Optimum şartlara göre oluşturulmuş dolu, boş enkapsüllerin ve ruşeym yağının bağ yapıları FT-IR analizi ile, 450-4000  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında incelenmiş seçilen dalga sayısı bölgeleri Şekil 4.7 de verilmiştir.



Şekil 4.7 : FT-IR spektrumu.

(D-CS: dolu canlı su; D-PS: dolu plazmoliz su; D-n-PS: dolu plazmolize edilmeyen su; B-CS: boş canlı su; B-PS: boş plazmoliz su; B-n-PS: boş plazmolize edilmeyen su.)

Bir organik bileşiğin FT-IR analizi, o bileşiğin optik izomerleri hariç kendine has pikleri göstermektedir. Molekül ya da molekül içindeki fonksiyonel grupların değişmesiyle bunların titreşim frekansları da değişmektedir. Titreşim frekansları farklı olan molekül ya da fonksiyonel gruplar içinden infrared ışın geçiriliyorken yapılar kendi frekanslarına uygun monokromatik ışınları soğurmaktadırlar. Böylece infrared bölgede çeşitli dalga sayısındaki ışınların örnek içerisinden geçirilmesi sonucunda, molekül veya fonksiyonel grupların yapılarına göre farklı frekanslarda absorpsiyon pikleri gösteren özel spektrumlar

elde edilmektedir. Gönderilen infrared veri absorbanstan ziyade yüzde geçirgenlik (transmittans) olarak ordinata işlenerek gösterilmektedir. Spektrumda, 3600–1200  $\text{cm}^{-1}$  aralığına fonksiyonel gruplar bölgesi denir. Parmak izi bölgesi olarak tanımlanan 1200–700  $\text{cm}^{-1}$  bölgesinde; moleküldeki yapısal ve bileşim olarak küçük değişiklikler incelenebilmektedir (Hışıl, 2010).

Literatürde mikroorganizmalara özgü karakteristik infrared soğurma frekansları ve bunların biyomoleküler özellikleri Çizelge 4.6’da verilmiştir (Bozza de Almenida ve diğ, 2015).

**Çizelge 4.6 :** Mikroorganizmaların FT-IR frekansları ve biyomoleküler özellikleri (Bozza de Almenida ve diğ, 2015).

Frekanslar ( $\text{cm}^{-1}$ )	Moleküler bağ	Titreşimsel mod	Biyomolekül
3200–2800	CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub>	Simetrik ve asimetrik germe	Yağ asitleri, lipitler
	N-H	Simetrik germe	Proteinler
1780-1700	C=O	Simetrik germe	Yağ asitleri
1695-1625	C=O, C-N N-H	Simetrik germe Bükme	Proteinler (Amid I)
1560-1525	C-N N-H	Simetrik germe Bükme	Proteinler (Amid II)
1480-1400	CH <sub>3</sub> , CH <sub>2</sub> C=O	Bükme Asimetrik germe	Lipitler
1300-1200	P=O	Asimetrik germe	Nükleik asitler
1200-900	C-O-C, C-O, P=O, C-C/C-O	Simetrik germe	Riboz, glikojen, nükleik asitler
900-700	C-H	Bükme	Aromatik gruplar

Ruşeym yağına ait FT-IR frekansları ve biyomoleküler özellikleri literatürde; 3006  $\text{cm}^{-1}$  (C-H germe), 2953  $\text{cm}^{-1}$  (C–H (CH<sub>3</sub>) asimetrik germe), 2924  $\text{cm}^{-1}$  (C–H (CH<sub>2</sub>) asimetrik germe) ve 2854  $\text{cm}^{-1}$  (C–H (CH<sub>2</sub>) simetrik germe ) frekanslarının oldukça önemli olduğu yer almaktadır. Aynı zamanda 1746  $\text{cm}^{-1}$  (C=O germe titreşimi) trigliserid ester bağı ve serbest yağ asitlerinin karboksilik grubu ile ilişkili olduğu, 1465  $\text{cm}^{-1}$  (CH<sub>2</sub> makaslama) titreşimleri, 1377  $\text{cm}^{-1}$  (CH<sub>3</sub> simetrik bükülme) ve 1238  $\text{cm}^{-1}$  ’de (CH<sub>2</sub>

bükülme modu) önemli pikler bulunduğu bildirilmiştir. Parmak izi bölgesinde yer alan 723  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  sallanma modu) ve 1033, 1097, 1118 ve 1163  $\text{cm}^{-1}$  C-O germe titreşimi ve alifatik esterlerin göstergesi niteliğinde olduğu rapor edilmiştir (Arslan ve Çağlar, 2019; Gouvinhas ve diğ, 2015; Özülkü ve diğ, 2017; Wojcicki ve diğ, 2015).

Ruşeym yağı spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.7 (a)), 3009  $\text{cm}^{-1}$  (CH germe titreşimi), 2923 ve 2853  $\text{cm}^{-1}$ 'de ( $\text{CH}_2$  asimetrik ve simetrik germe titreşimi) karakteristik zirveler gösterdiği tespit edilmiştir. Parmak izi bölgesinde ise; 1745  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{COO}$  trigliseridlerin gerilme titreşimi), 1464 ve 1377  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  ve  $\text{CH}_3$  makaslama titreşimi), 1160 ve 1158  $\text{cm}^{-1}$  (ester gruplarının CO germe titreşimi) tespit edilmiştir. Benzer bir spektrum daha önce bildirilmiştir (Arslan ve Çağlar, 2019). Ayrıca aromatik grupların yer aldığı bölgede de 721  $\text{cm}^{-1}$  'de de absorpsiyon tespit edilmiştir.

Şekil 4.7 (b)'de yer alan plazmolize edilen, plazmolize edilmeyen ve canlı hücre enkapsüllerinin dolu ve boş örneklerinin FT-IR spektrumlarının birbirinden oldukça farklı olduğu görülmektedir. Şekil 4.7 (b) incelendiğinde, plazmoliz işleminin proteinler, karbonhidratlar, lipitler ve hatta nükleik asitler gibi hücre duvarı veya zarının yapısal bileşenleri üzerindeki etkileri temsil eden karakteristik değişiklikler görülebilmektedir.

Plazmolize edilmemiş maya hücrelerinin adsorpsiyon bantları incelendiğinde; 3360 $\text{cm}^{-1}$ 'de (maya polisakkaritlerinin OH titreşim bandı), 2925 $\text{cm}^{-1}$ 'de (lipitlerin  $\text{CH}_2$  asimetrik germe titreşimi), 1651 $\text{cm}^{-1}$ 'de (proteinlerdeki amid I titreşim bandı) absorpsiyon bantları görülmüştür. 1405  $\text{cm}^{-1}$ 'de (asimetrik germe titreşimi), 1243  $\text{cm}^{-1}$ 'de (asimetrik germe titreşimleri) ve 1075  $\text{cm}^{-1}$ 'de ( $\beta$ -1,3 glukan absorpsiyon bandı) pikleri tespit edilmiştir. Maya hücrelerindeki bu karakteristik pikler birçok çalışmada kanıtlanmıştır (Stroescu ve diğ, 2013; Paramera ve diğ, 2011a; Burattini ve diğ, 2008; Cavagna ve diğ, 2009; Kavosi ve diğ, 2017).

Polisakkaritlerin OH titreşimsel gerilmesine atfedilebilen plazmolize edilmemiş maya spektrumunda 3360  $\text{cm}^{-1}$  geniş absorpsiyon bandı (Şekil 4.7 (b)) plazmolize edilmiş maya spektrumlarında 3380  $\text{cm}^{-1}$ 'e kaymıştır. 2925  $\text{cm}^{-1}$ 'deki tepe, nükleik asitlerin, proteinlerin ve lipitlerin asimetrik  $\text{CH}_2$  gerilmesine bağlanabilir ve plazmoliz ile 2924  $\text{cm}^{-1}$ 'e kaymıştır. Plazmolize hücrelerde 2924  $\text{cm}^{-1}$  pik yoğunluğunun arttığı belirlenmiştir. Bu durum plazmoliz işlemi sonrasında moleküler hücre bileşenlerinin kaybı nedeni ile hücrede lipit konsantrasyonunun nispi artışı ile ilişkilendirilmiştir (Kavosi ve diğ, 2017).

1657 ve 1537  $\text{cm}^{-1}$ 'deki absorpsiyon bantları, maya hücreleri için karakteristik oldukları ve sırasıyla protein amid I ve II bantlarına atfedilebildikleri için büyük önem taşımaktadır (Shi ve diğ, 2008). Plazmolize edilmemiş mayada amid I bandı 1651  $\text{cm}^{-1}$ 'iken ve amid II bandı yokken; plazmoliz ile amid I bandı 1649  $\text{cm}^{-1}$ 'e kaymıştır (Şekil 4.7 (b)). Parmak izi bölgesi karmaşık olmakla birlikte; plazmolize edilmiş ve edilmemiş mayaların FT-IR spektrumları karşılaştırıldığında, plazmolizin gerçekten hücrenin kimyasal bileşimini değiştirdiği açıktır. Ayrıca canlı hücre ve plazmoliz edilmeyen hücre arasındaki tek fark plazmoliz edilememiş hücrelerin dondurarak kurutulmasıdır. Her iki hücrenin FT-IR spektrumları kıyaslandığında canlı hücrenin 1650-1250  $\text{cm}^{-1}$  aralığında daha yoğun band verdiği gözlemlenmiştir. Literatürde dondurma ve dehidrasyon işlemlerinin maya hücre yapısında ciddi değişime neden olduğu bildirilmiştir (Nguyen ve diğ, 2018).

Önceki çalışmalar incelendiğinde, bulgularımızın aksine; plazmoliz işleminin hücrede proteinlerin amid I ve amid II bölgelerinde değişikliklere sebep olduğu saptanmıştır (Shi ve diğ, 2008; Kavosi ve diğ, 2017).

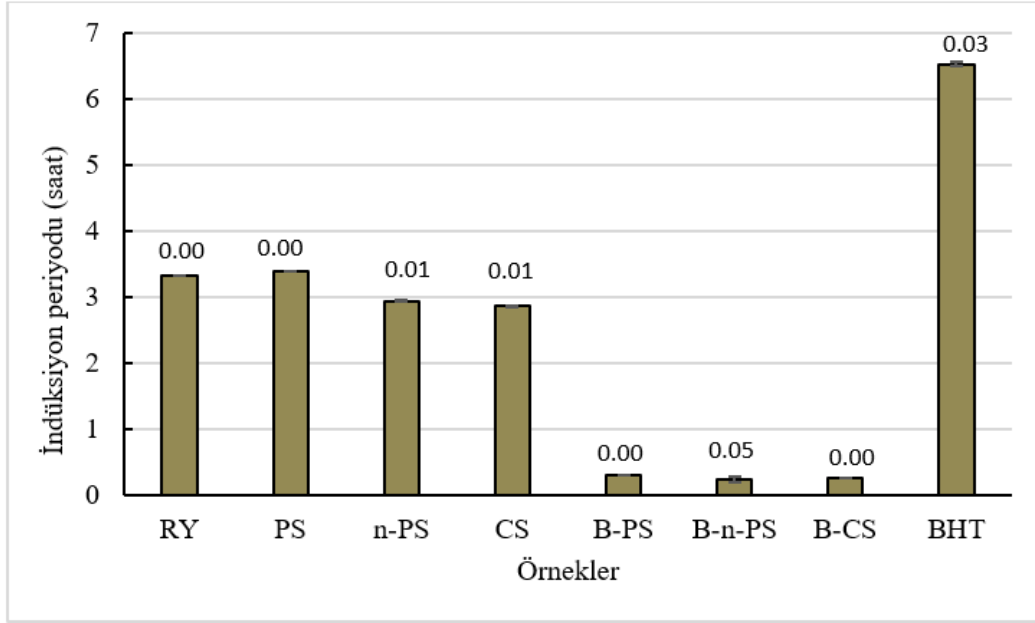
Enkapsüle buğday ruşeym yağının FT-IR spektrumları (Şekil 4.7 (b)) maya hücreleri ile benzerlik göstermekle birlikte enkapsülasyon ile gerçekleşen değişiklik bazı karakteristik piklerin kayması ya da kaybolmasına neden olmuştur. Dolu enkapsüllerin 1744  $\text{cm}^{-1}$ 'de pik verdikleri belirlenmiştir. Bu pik ruşeym yağı trigliseridlerinin karboksil gruplarından kaynaklanmaktadır. Bu sonuç maya hücresi enkapsüllerinde ruşeym yağının varlığını doğrulamaktadır. Literatürde benzer durum Antarctic krill yağının maya hücrelerinde enkapsüle edildiği çalışmada da bildirilmiştir (Fu ve diğ, 2021).

Sonuç olarak ruşeym yağının maya hücresindeki proteinler ve polisakkaritler ile olası etkileşimleri göz önünde bulundurulup ve aynı zamanda enkapsüllerin aralarındaki şekil ve yoğunluk farklılıkları ile ruşeym yağının emiliminin ortadan kalkması; ruşeym yağının maya hücrelerinde kapsüllendiğini göstermektedir (Arslan ve Çağlar, 2019).

### **4.3.6 Oksidatif stabilite analizleri**

#### **4.3.6.1 Ransimat testi**

Ruşeym yağı dolu ve boş (kontrol) enkapsüllerin oksidasyona karşı dayanıklılığı hakkında bilgi edinebilmek amacıyla, Bölüm 3.3.2.5'te yer alan "Ransimat testi" başlığı altındaki açıklamalar doğrultusunda teste tabi tutulmuştur. Ransimat testi 100°C ve 10 L/sa hava akışı koşullarında gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.8 verilmiştir.



**Şekil 4.8 : Ransimat test sonuçları.**

(RY: ruşeym yağı; PS: Plazmoliz su; n-PS: Plazmolize edilmeyen su; CS: Canlı su; BPS: Boş plazmoliz su; B-n-PS: Boş plazmolize edilmeyen su; B-CS: Boş canlı su; BHT: bütillenmiş hidroksi toluen (standart antioksidan.)

Serbest ruşeym yağı ile eşit miktarda yağ içeren enkapsül miktarları etkinlik testi temelinde hesaplanmış ve enkapsüllerin ruşeym yağını oksidasyondan koruma başarısı indüksiyon periyodu temelinde belirlenmiş serbest ruşeym yağı ve standart antioksidan (BHT) kıyaslanabilmiştir.

İndüksiyon periyodu oksidasyonun başlaması için gerekli olan süre (saat) olarak tanımlanmaktadır. Bir örneğin indüksiyon periyodu ne kadar uzun ise, örnek o ölçüde kararlıdır. İndüksiyon periyotları serbest ruşeym yağı, plazmoliz enkapsülü, plazmoliz edilmeyen hücre enkapsülü ve canlı hücre enkapsülü için sırası ile 3.32, 3.39, 2.94 ve 2.86 saat olarak belirlenmiştir. Çalışmada ayrıca boş enkapsüllerin (B-PS, B-n-PS ve B-CS) ve standart antioksidan olarak kullanılan BHT'nin indüksiyon periyotları da (boş kapsüller için sırası ile 0.31, 0.24, 0.25 saat, BHT için 6.53 saat) belirlenmiştir.

Enkapsül örnekleri arasında en yüksek stabilitenin PS örneğinde (3.39 saat) olduğu belirlenmiştir. Plazmoliz edilmeyen ve canlı hücre kapsüllerinde yeterli koruma sağlanamamıştır. Bu durumun muhtemel sebebi olarak, kapsüllerin yüzeyinde yüksek miktarda ruşeym yağı bulunması ve bu noktada bulunan yağın kolayca okside olması gösterilebilir. Literatürde plazmolize hücre enkapsüllerinin merkez materyali oksidasyona karşı koruma başarısını ransimat cihazı ile ölçen çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş ve bu durum plazmoliz işlemi ile hücrede daha sıkı ve kalın bir hücre duvarı

oluşmasına bağlı olarak açıklanmıştır (Bishop ve diğ, 1998; Karaman, 2020; Salari ve diğ, 2013).

#### 4.3.6.2 Fırın testi

Enkapsülasyonun amaçlarından bir tanesi de aktif bileşiklerin stabilitesini arttırmaktır. Ruşeym yağının sahip olduğu tekli ve çoklu doymamış yağ asitleri oranının yüksek olması sebebiyle kolayca okside olabilirler. Bu çalışmada serbest ve enkapsüle ruşeym yağının oksidatif stabilitesi hızlandırılmış test koşulları olarak 60°C’de 24 gün bekletilen örneklerin peroksit ve *p*- anisidin değerlerinin ölçülmesi ile değerlendirilmiştir.

#### Peroksit sayısı

Peroksit sayısı oksidasyonun başlangıç aşamalarındaki oksidatif durumu göstermesi bakımından önemli bir parametre olmakla beraber, hızlandırılmış koşullardaki geçen zamana karşı değişkenlik gösterdiğinden tek başına güvenilir bir parametre olarak kabul edilmemektedir (Atinafu ve Bodemo, 2011).

Belirli periyotlarda (0, 8, 16 ve 24. gün) etüvden alınan örneklerin peroksit sayısı değerleri Çizelge 4.7’de ve Şekil 4.9 da verilmiştir.

**Çizelge 4.7 :** Peroksit sayısı sonuçları (meq O<sub>2</sub>/kg yağ).

	0. gün	8. gün	16. gün	24. gün
Ruşeym yağı	4.69±0.16cC	29.52±0.79aB	43.94±1.94aA	28.12±16.86cB
PS	7.15±0.29bC	16.31±0.92cB	18.46±1.18dA	9.19±1.41aC
n-PS	7.38±0.20bD	17.30±1.58cB	22.28±0.02cA	10.47±1.46aC
CS	7.88±0.30aD	23.68±1.73bB	35.03±1.64bA	13.66±1.54bC

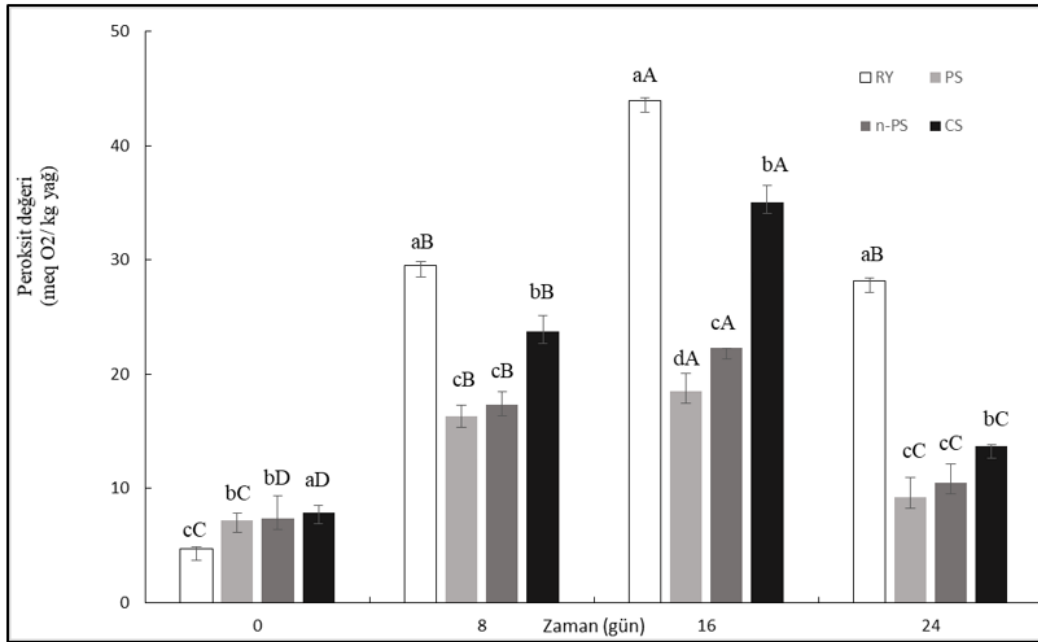
\*Aynı sütunda farklı küçük harflerle (a-d) gösterilen ortalamalar aynı depolama süresindeki örneklerin birbirinden P<0.05 düzeyinde farklı olduğunu göstermektedir. Aynı satırda farklı büyük harflerle (A-D) gösterilen ortalamalar farklı depolama süreleri sonunda birbirinden P<0.05 düzeyinde farklı olduğunu göstermektedir. PS: plazmoliz su; n-PS: plazmoliz edilmeyen su; CS: canlı su.

Çizelge 4.7 incelendiğinde enkapsül örneklerinin başlangıç peroksit sayısı 8 meq O<sub>2</sub>/kg yağ dan daha düşüktür (p>0.05). Bu durum enkapsülasyon prosesinin ruşeym yağını negatif etkilemediğini göstermektedir. İlerleyen oksidasyon sürecinde 16. güne kadar tüm örneklerin peroksit değerinin artma eğiliminde olduğu, en yüksek artışın serbest ruşeym yağında (43.94 meq O<sub>2</sub>/kg yağ), en düşük artışın ise plazmolize hücre enkapsülünde (PS) (18.46 meq O<sub>2</sub>/kg yağ) gerçekleştiği (P<0.05) gözlemlenmiştir. Ancak 16. günden sonra örneklerde peroksit değerinin azaldığı tespit edilmiştir. Isı ile oksidasyon süreçlerinde



oksidasyonun başlangıç dönemlerinde oluşan ve birincil oksidasyon ürünü olarak bilinen peroksitler stabil bileşikler değildir. Oksidatif koşulların devam etmesi durumunda, ikincil oksidasyon ürünleri olarak bilinen kısa zincirli hidrokarbon yapıları, karbonilli bileşikler, alkoller vb. ürünlere parçalanırlar. Bu nedenle devam eden ısı uygulaması ile oluşan peroksit değeri sürekli artış göstermemektedir (Nayak ve diğ, 2016). Birçok araştırmada da ısı uygulamasının devamında peroksit değerinin azaldığı gözlemlenmiştir (White, 1991; Vieira ve Regitano-D'arce, 1999; Zhang ve diğ, 2007).

Şekil 4.9'dan da takip edilebileceği gibi hem enkapsüllemiş hem de serbest ruşeym yağında ısının oksidasyon oluşmasına sebep olduğu saptanmıştır. Ayrıca enkapsüllerin 8, 16, ve 24. günlerdeki peroksit değerlerinin ruşeym yağına kıyasla daha düşük olduğu ve bu durumun enkapsülasyon işleminin koruyuculuğundan kaynaklandığı düşünülmektedir.



**Şekil 4.9 : Peroksit sayısı.**

(RY: Ruşeym yağı; PS: Plazmoliz su; n-PS: Plazmoliz edilmeyen su; CS: Canlı su.)

Depolamanın 16. günden sonra ruşeym yağı yüklü enkapsüller arasındaki peroksit değerleri kıyaslandığında en yüksek miktarın canlı hücre kapsülünde olduğu bunu plazmoliz edilmeyen hücre kapsülünün izlediği belirlenmiştir. Bir başka anlatımla depolama süresi sonunda kapsüllerin peroksit değerleri düşükten yükseğe doğru sıralanırsa; plazmolize su (PS) < plazmolize edilmeyen su (n-PS) < canlı su (CS) sonucu çıkmaktadır (P<0.05).

Czerniak ve diğ. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada *Saccharomyces cerevisiae*'nin menhaden balık yağı için kabuk materyal olarak kullanmış ve depolama sırasında numunelerin oksidatif stabilitesini araştırmışlardır. Maya hücresi ile kapsüllenen numunelerin peroksit değerinin, 30 günlük depolamadan sonra doğal yağinkinden önemli ölçüde daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada *Hibiscus sabdariffa* L.'nin antosiyanin stabilitesinin *S. cerevisiae* enkapsülasyonu ile başarılı bir şekilde korunabildiği bildirilmiştir (Nguyen ve diğ, 2018).

Shi ve diğ. (2008) resveratrolün enkapsülasyon ile stabilitesindeki değişimi incelemiş ve çeşitli bozunma faktörlerine karşı maya hücresindeki mannopteinin,  $\beta$ -1,3 glukanın ve iki katmanlı membranın; ışık ve neme karşı iyi bir bariyer sağlayarak bozunma etkisini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca Young ve Nitin (2019) yaptıkları çalışmada, kurkuminin termal stabilitesinin maya hücreleri ile enkapsüle edilerek önemli derecede arttığını tespit etmişlerdir. Semiz otu tohumu yağının maya hücreleri ile enkapsüle edildikten sonra oksidatif stabilitesini inceleyen bir başka çalışmada peroksit değeri ile yapılan kıyaslama sonucunda, oksidasyondan koruma başarı sıralamasının; plazmolize edilmiş ve (KMS) kaplı hücre kapsülü > plazmolize edilmiş hücre kapsülü > plazmolize edilmemiş hücre kapsülü olarak bildirilmiştir (Kavosi ve diğ, 2017).

Karaman (2020) çörekotu tohumu yağın plazmolize edilmiş ve plazmolize edilmemiş maya hücrelerinde enkapsüle ederek, uygun olmayan koşullardaki timokuinon ve biyoaktif bileşenlerinin stabilitesini araştırmıştır. Çalışmasının sonucunda plazmolize maya hücresinin daha yüksek koruyuculuğa sahip olduğuna ulaşmıştır.

Bishop ve diğ. (1998) ve Nelson'un (2002), maya hücresinin iki tabakalı zarı sayesinde merkez materyalin enkapsülasyonu sırasında bir lipozom görevi gördüğü ve böylece hücre içindeki yağ damlacıklarının stabilizasyonuna izin vererek oldukça kararlı bir enkapsül sağlayabileceğini bildirmiştir. Elde ettiğimiz çalışma sonuçlarımızın literatür bilgileri ve verileri ile uyumlu olduğu belirlenmiş ve plazmolize maya hücrelerinin daha yüksek termal stabilite sağlayarak depolama sırasında daha düşük düzeyde oksidasyona izin verdiğine ulaşılmıştır.

#### ***p*-Anisidin sayısı**

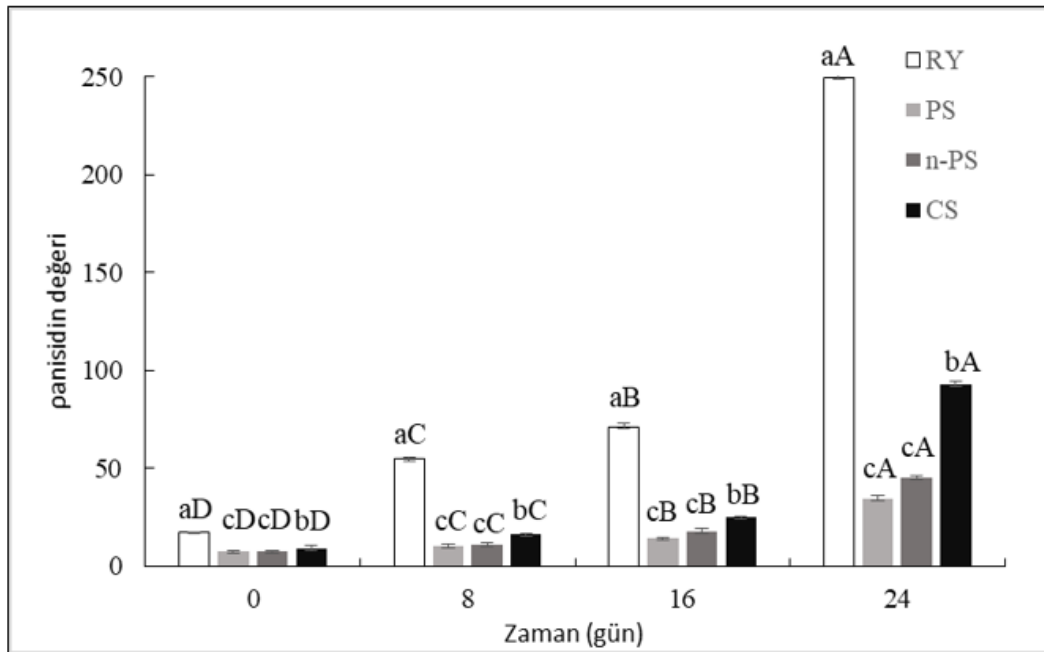
Ruşeym yağının kendisi ve üç farklı kabuk hücre ile enkapsüle edilmiş formunun 60°C sıcaklıkta yapılan hızlandırılmış oksidasyon testi sonucunda *p*-anisidin değerleri, Çizelge 4.8 ve Şekil 4.10'da verilmiştir.

**Çizelge 4.8 :** *p*-Anisidin sayısı sonuçları.

	0. gün	8. gün	16. gün	24. gün
Ruşeym yağı	32.53±1.92aD	54.66±0.74aC	71.15±1.61aB	249.78±16.86aA
PS	7.32±0.71cD	10.50±0.79cC	14.41±0.53cB	34.42±1.55cA
n-PS	7.26±0.61cD	11.15±0.83cC	17.37±2.02cB	45.44±0.86cA
CS	9.25±1.53bD	16.58±0.22bC	24.77±0.36bB	93.16±1.54bA

\*Aynı sütunda farklı küçük harflerle (a-c) gösterilen ortalamalar aynı depolama süresindeki örneklerin birbirinden  $P<0.05$  düzeyinde farklı olduğunu göstermektedir. Aynı satırda farklı büyük harflerle (A-D) gösterilen ortalamalar farklı depolama süreleri sonunda birbirinden  $P<0.05$  düzeyinde farklı olduğunu göstermektedir. PS: plazmoliz su; n-PS: plazmoliz edilmeyen su; CS: canlı su.

*p*- anisidin sayısı, yağların oksidasyonu sonucu yağ asitlerinden oluşan ve uçucu olmayan aldehitlerin miktarları hakkında bilgi veren ve dolayısıyla yağın oksidasyon düzeyi hakkında bilgi edinilen güvenilir bir parametredir (Al-Kahtani, 1991).



**Şekil 4.10 :** *p*-Anisidin sayısı.

(RY: Ruşeym yağı; PS: Plazmoliz su; n-PS: Plazmoliz edilmeyen su; CS: Canlı su.)

Farklı kabuk materyaller ile üretilen enkapsüllerin 0. gün sonunda *p*-anisidin değerleri yakın bulunmuşken 8, 16 ve 24. gün sonuçları aynı düzeyde artış göstermemiştir (özellikle canlı su ile üretilen enkapsüllerde (CS) artışın daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir) ( $P<0.05$ ). Tüm örneklerde depolamanın 16. gününden sonra *p*-anisidin değerinde keskin bir artış belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). İkincil oksidasyon ürünü olan *p*-anisidin peroksitlerin parçalanması sonucunda oluşmaktadır, çalışmamızda tespit edilen peroksit

değerleri ve *p*-anisidin değerleri bu bilgi ışığında değerlendirildiğinde, sonuçların oldukça anlamlı olduğu göze çarpmaktadır. Depolama süresi sonunda en yüksek *p*-anisidin değeri serbest ruşeym yağında (249.8) belirlenmiş, tüm enkapsül örneklerinde bu değer önemli derecede daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Enkapsül örnekleri arasında, *p*-anisidin değeri temelinde oksidasyondan koruma başarı sıralamasında ilk sırada plazmolize su enkapsülü (34.42) yer almakta, bunu plazmolize edilmeyen su enkapsülü (45.44) izlemektedir, canlı su enkapsülü (93.16) ise sıralamanın sonunda yer almaktadır.

Hem peroksit hem de *p*-anisidin değerinin en düşük miktarlarının plazmolize edilen hücre kapsülünde (PS) belirlenmesi, ruşeym yağının oksidatif kararlılığı üzerine maya hücreleri ile, özellikle plazmolize edilmiş maya hücreleri ile, enkapsüle etmenin serbest ruşeym yağına kıyasla oldukça yüksek fayda sağlayacağını kast etmektedir. Bu sonuç Menhaden balık yağının maya hücreleri ile enkapsülasyonu sonucunda oksidatif kararlılığının arttığını bildiren Czerniak ve diğ. (2015) sonuçları ile oldukça uyumludur. Benzer şekilde semiz otu tohum yağının plazmolize edilen, edilmeyen ve karboksimetil selüloz ile ilave kaplanan maya hücrelerinde enkapsülasyonu sonucunda oksidasyona karşı direncinin arttığı bildirilmiştir. Araştırmacı plazmolize edilen hücrenin doğal hücreye kıyasla daha iyi oksidasyon bariyeri oluşturacağını, plazmoliz işlemi ile artan hücre içi boşluğun daha fazla yağ tutabileceğini ve bunun sonucunda daha yüksek oksidasyon direncinin sağlanacağını vurgulamıştır (Kavosi ve diğ, 2017).

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hızla artan nüfusa karşılık gıdaya talebin artması endüstrideki atıkların ve yan ürünlerin de artmasına yol açmaktadır. Bu amaç dışı üretilen ürünlerin değerlendirilip geri kazanılması oldukça önem kazanmıştır. Mevcut çalışma kapsamında un fabrikası yan ürünü olan ruşeymden elde edilen yağın özellikleri araştırılmıştır. Kullanılan ruşeym yağı, yeşil teknolojiler olarak da anılan çevre dostu ekstraksiyon yöntemlerinden soğuk sıkım yöntemiyle elde edilmiş olarak seçilmiş ve karakterizasyonu adına birtakım kimyasal ve enstrümental analizlere tabi tutulmuştur.

Literatür bilgilerine göre ruşeym yağında yer alan yüksek miktardaki çoklu doymamış yağ asitleri insan sağlığı için önemlidir ve tüketiminin artırılmasının birçok yarar sağlayacağı açıktır. Doymamış ve çoklu doymamış yağ asitlerinin yüksek miktarlardaki varlığı ruşeym yağının biyofonksiyonelitesini artırırken, oksidasyona karşı yüksek hassasiyet göstermesi, kullanımını sınırlandırmıştır. Ruşeym yağını oksidasyondan korumak amacıyla son zamanlarda enkapsülasyon teknolojisi kullanılmakta, bu amaçla birçok farklı kabuk materyal ve kombinasyonları dikkat çekmektedir. Doğadan etkilenecek kapsülasyon teknolojisinde son zamanlarda kabuk materyal olarak canlı hücrelerin kullanıldığı enkapsülasyonlar oldukça popüler hale gelmiştir.

Bu çalışmada ruşeym yağının kabuk materyal olarak *S. cerevisiae* ile enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Enkapsülasyon prosesinde, maya hücrelerinin kabuk materyal olarak kullanımında en başarılı formunu belirlemek amacı ile hücreler plazmolize edilerek, plazmolize edilmeden dondurarak kurutulmuş (kuru formda) ve doğal haliyle canlı (ıslak formda) hücreler farklı merkez:kabuk materyal oranlarında (0.25, 0.5, 1 ve 2) üretime dahil edilmiştir. Ayrıca proses başarısı üzerine üretim ortamının etkisini incelemek amacı ile su (%100) ve etanol (%10) 'den oluşan ortamlar da deneme planına dahil edilmiştir. Üretimi tamamlanan enkapsüller dondurarak kurutma işleminin ardından toz hale getirilmiş ve bir takım karakterizasyon testlerine (enkapsülasyon etkinliği, yükleme kapasitesi, morfolojik yapı, salınım profili) tabi tutulmuştur.

Enkapsülasyon etkinliği ve yağ yükleme kapasitesi bakımından değerlendirilen enkapsüllerin; 0.25 merkez:kabuk materyal oranında ve plazmolize edilen hücrelerde ve suyun üretim ortamı olarak kullanıldığı deneme deseninde en başarılı sonucun alındığı (enkapsüllerin etkinlik ve yağ yükleme kapasitesi değerleri sırasıyla %43.10, 216.52 g/kg) enkapsüller belirlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında 0.25 merkez:kabuk materyal oranı ve

suyun kullanıldığı üretim ortamında üç farklı kabuk materyal (plazmoliz su (PS), plazmolize edilmeyen su (n-PS) ve canlı su (CS)) kullanılarak enkapsüllerin üretimi gerçekleştirilmiş, elde edilen enkapsüllerin morfolojik yapıları ve insan sindirim sisteminin taklit edildiği koşullarda salınım profili incelenmiştir. Optimizasyon sonunda seçilen PS, n-PS ve CS enkapsüllerinin sindirim ortamlarındaki salınım hızları, ortamda bulunan  $\beta$ -karoten miktarı gösterge kabul edilerek ölçülmüştür. Enkapsüllerin sindirim koşullarından önemli derecede ( $P<0.05$ ) etkilendiği belirlenmiş ve en hızlı salınımın yemek borusu ve mide aşamalarında gerçekleştiği, enkapsüller arasındaki en hızlı salınımın ise CS enkapsülünde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Testteki salınım hızı en düşük enkapsülün PS olduğu tespit edilmiştir. Enkapsüllerin karakterizasyonlarının tespiti sonrasında, çalışmanın devamına konu olan, ruşeym yağının enkapsülasyon işlemi ile oksidatif stabilitesindeki değişim hem ransimat testi hem de hızlandırılmış fırın koşullarında oksidasyon takibi (peroksit ve *p*-anisidin değerleri ile) yapılmıştır.

Elde edilen toz biyokapsül örneklerinin ransimat cihazı ile indüksiyon periyodu belirlenmiş ve en yüksek indüksiyon periyodunun PS (3.36 saat) enkapsülünde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Hızlandırılmış oksidasyon testi için ise 60°C oksidasyon sıcaklığında 24 gün oksidasyona maruz bırakılmış belirli zaman periyotlarında (her 8 günde bir) örnekler alınıp peroksit ve *p*-anisidin sayıları belirlenmiştir. Depolama periyodu sonunda en yüksek oksidatif stabilite, 24. günün sonunda en düşük peroksit (9.19) ve *p*-anisidin (34.42) sayılarına ulaşan PS örneğinde belirlenmişken, en düşük stabilite ise daha yüksek peroksit (13.66) ve *p*-anisidin (93.16) sayılarına sahip olan CS örneğinde saptanmıştır. Sonuç olarak, enkapsülasyon uygulaması ile oksidasyon eğilimi yüksek olan ruşeym yağının oksidasyonu başarılı bir şekilde engellenmiştir.

Mevcut çalışmanın sonuçları, plazmolizin, maya hücresi için yağ tutma kapasitesini arttırmak ve kapsüllenmiş maddenin uygun olmayan koşullara karşı stabilitesini arttırmak için önemli bir ön işlem olduğunu göstermiştir. Maya hücresi enkapsülleri kullanılarak, ısı ve ışık gibi çevresel parametreler nedeniyle ruşeym yağının bozunması sınırlandırılabilir.

Serbest ve enkapsül formdaki ruşeym yağlarının salınım ve oksidatif stabilite gibi nitelikleri incelendiğinde, enkapsülasyon işleminin kontrollü salınım ve koruyucu özelliklerini daha fazla zenginleştirmek amacı ile farklı kaplama materyalleri kullanılarak araştırmalar geliştirilebilir. Aynı zamanda gıda proseslerindeki bozulma etkenlerine karşı enkapsül formundaki ruşeym yağının kullanımı ile endüstriyel düzeyde pratiğe geçirilmesi konusunda imkanlar araştırılmalıdır.

Ruşeym yağı, oksidatif stabilitesinin düşük olmasına bağlı olarak sınırlı kullanımı sonucu kısıtlı tüketim ile karşılaşmaktadır. Bu araştırmada, ruşeym yağı için söz konusu olumsuzluğun *S. cerevisiae* hücresinde enkapsüllenmesiyle önemli düzeyde azaltıldığı belirlenmiştir. Buna bağlı olarak ruşeym yağı kullanımında ürünün biyoaktif nitelikleri korunarak gıda ürünlerinde kullanılması için etkili bir yaklaşım olarak düşünülebilir. Çalışmanın bir sonraki adımında kapsüllenmiş tozun kek veya ekmek gibi gıdalara dahil edilmesi ile fonksiyonel gıdalar üretilebilir ve bu gıdaların termal stabilitesi ve biyolojik olarak kullanılabilirliği araştırılabilir.



## KAYNAKLAR

- Bozza de Almeida, A., Poitevin, C. G., C cco, L. C., Yamamoto, C. I., Dalzoto, P. R., Pimentel, I. C.** (2015). Application of fourier transform mid-infrared spectroscopy for identification of *Aspergillus* species isolated from coffee beans, *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 5(4), 995-1003.
- Al-Kahtani, H. A.** (1991). Survey of quality of used frying oils from restaurants, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68, 857–862.
- Al-Obaidi, L., Dunford, N. T., Goad, C.** (2013). Mechanical extraction of wheat germ oil, *Trans ASABE*, 56, 1871–1876.
- Anu, B. J. & Anandharamakrishnan, C.** (2014). Electrospinning and electrospraying techniques: Potential food based applications, *Trends in Food Science and Technology*, 38, 21–33.
- AOCS.** (1989). Official and Recommended Methods of the American Oil Chemists' Society. Method Cd 8-53, Cd 18-90 and Ce 2-66.
- Arslan, F. N. & Kara, H.** (2016). Fully automated Three-Dimensional Column-Switching SPE– FIA–HPLC system for the characterization of lipids by a single injection: Part I. instrumental design and chemometric approach to assess the effect of experimental settings on the response of ELSD, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93(1), 11-26.
- Arslan, F. N. &  ağlar, F.** (2019). Attenuated Total Reflectance–Fourier Transform Infrared (ATR–FTIR) spectroscopy combined with chemometrics for rapid determination of cold-pressed wheat germ oil adulteration, *Food Analytical Methods*, 12, 355–370.
- Ateş, J. & Velioglu, S.** (2005). *Türk fındıklarının fitosterol ierikleri* (Yüksek Lisans Tezi). Ankara niversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Augustin, M. A. & Sanguansri L.** (2012). Challenges in developing delivery systems for food additives, nutraceuticals and dietary supplements (pp: 19–48). In: N. Garti and D. J. McClements (Eds), *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceutical*. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK.
- Augustin, M. A. & Sanguansri, L.** (2014). Challenges and solutions to incorporation of nutraceuticals in foods, *Annual Review of Food Science and Technology*, 6, 463-477.
- Aydoğan, S. & Soylu, S.** (2017). Ekmeklik buğday eşitlerinin verim ve verim oğeleri ile bazı kalite özelliklerinin belirlenmesi, *Tarla Bitkileri Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 26(1), 24-30.
- Barnes, P. J.** (1982). Lipid composition of wheat germ and wheat germ oil, *Fett. Wiss. Technology*, 84(7), 256–269.
- Barnes, P. J.** (1983). Lipid in cereal technology, *Academic Press, New York*, 389 p. Buckinghamshire, UK.
- Bilenler, T., Gokbulut, I., Sislioglu, K., Karabulut, I.** (2015). Antioxidant and antimicrobial properties of thyme essential oil encapsulated in zein particles, *Flavour and Fragrance Journal*, 30, 392-398.



- Bishop, J. R. P., Nelson, G., Lamb, J.** (1998). Microencapsulation in yeast cells, *Journal of Microencapsulation*, 15(6), 761-773.
- Brandolini, A. & Hidalgo, A.** (2012). Wheat germ not only a by-product, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(1), 71-74.
- British Textile Technology Group, BTTG.** (1990). UK Patent Application. G.B. 2234901 assigned to Bestfoods.
- British Textile Technology Group, BTTG.** (1994). World Patent. WO 94/22572 assigned to Bestfoods.
- Burattini, E., Cavanga, M., Dell Anna, R., Malvezzi Campeggi, F., Monti, F., Rossi, F.** (2008). An FT-IR microspectroscopy study of autolysis in cells of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Vib. Spectrosc*, 47, 139–147.
- Cavagna, M., Dell’Anna, R., Monti, F., Rossi, F. ve Torriani, S.** (2009). Use of ATR-FTIR microspectroscopy to monitor autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* cells in a base wine, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 39–45.
- Ceylan, Z., Meral, R., Köse, Y. E. , & Cavidoğlu, İ.** (2020). Wheat germ oil nanoemulsion for oil stability of the cooked fish fillets stored at 4 degrees C, *Journal of Food Science And Technology-Mysore*, 57(5), 1798-1806.
- Chakrabarty, M. M.** (2003). *Chemistry and technology of oils and fats*. Allied publishers, New Delhi, India, 751 p.
- Chow, C. K. & Palecek, S. P.** (2004). Enzyme encapsulation in permeabilized *Saccharomyces cerevisiae* cells, *Biotechnology Progress*, 20(2), 449-456.
- Ciamponi, F., Duckham, C., Tirelli, N.** (2012). Yeast cells as microcapsules. analytical tools and process variables in the encapsulation of hydrophobes in *S. cerevisiae*, *Biotechnological Products and Process Engineering*, 95(6), 1445-1456.
- Czerniak, A., Kubiak, P., Bialas, W., Jankowski, T.** (2015). Improvement of oxidative stability of menhaden fish oil by microencapsulation within biocapsules formed of yeast cells, *Journal of Food Engineering*, 167, 2-11.
- Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P.** (2007). Yeast as probiotics-*Saccharomyces boulardii*, *Alimentary Pharmacology & Therapeutic*, 26, 767-778.
- Çapar, D. T.** (2020). *Lutein ve likopen enkapsülasyonunun optimizasyonu ve biyoyararlılığının artırılması* (Yüksek Lisans Tezi). Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Dardelle, G., Normand, V., Steenhoudt, M., Bouquerand, P. E., Chevalier, M., Baumgartner, P.** (2007). Flavor Encapsulation and Flavor release performances of a commercial yeast based delivery system, *Food Hydrocolloids*, 21, 953-960.
- Desai, K. G. H. & Park, H. J.** (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients, *Drying technology*, 23(7), 1361-1394.
- Echegoyen, Y., Fabra, M. J., Castro-Mayorga, J. L., Cherpinski, A., Lagaron, J. M.** (2017). High throughput electro-hydrodynamic processing in food encapsulation and food packaging applications: Viewpoint, *Trends in Food Science and Technology*, 60, 71–79.

- Eisenmenger, M. & Dunford, N. T.** (2007). Bioactive components of commercial and supercritical carbon dioxide processed wheat germ oil, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(1), 55–61.
- Fang, Z. & Bhandari, B.** (2010). Encapsulation of polyphenols, *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510- 523.
- Fathi, M., Martín, Á., McClements, D. J.** (2014). Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems, *Trends in Food Science and Technology*, 39, 18–39.
- Feltre, G., Sartori, T., Silva, K. F. C., Dacanal, G. C., Menegalli, F. C., Hubinger, M. D.** (2020). Encapsulation of wheat germ oil in alginate- gelatinized corn starch beads: Physicochemical properties and tocopherols' stability, *Journal of Food Science*, 85(7), 2124-2133.
- Firestone, D.** (1999). *Physical and chemical characteristics of oils, fats and waxes*. AOCS Press, Champaign, Illinois, 152p.
- Fu, J., Song, L., Guan, J., Sun, C., Zhou, D., Zhu, B.** (2021). Encapsulation of Antarctic krill oil in yeast cell microcarriers: Evaluation of oxidative stability and in vitro release, *Food Chemistry*, 338, 128089.
- García-Moreno, P. J., Stephansen, K., Kruijs, J., Guadix, A., Guadix, E. M., Chronakis, I. S., Jacobsen, C.** (2016). Encapsulation of fish oil in nanofibers by emulsion electrospinning: Physical characterization and oxidative stability, *Journal of Food Engineering*, 183, 39-49.
- Garti, N. & McClements, D. J.** (2012). *Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals*. Woodhead Publishing Limited, UK, 640p.
- Ghafoor, K., Özcan, M. M., Al-Juhaimi, F., E.Bekir, E., Sarker, Z. I., Mohamed Ahmed, I. A., Asif Ahmed, M.** (2017). Nutritional composition, extraction and utilisation of wheat germ oil: A Review, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(24), 119-128.
- Ghorani, B. & Tucker, N.**, (2015). Fundamentals of electrospinning as a novel delivery vehicle for bioactive compounds in food nanotechnology, *Food Hydrocolloids*, 51, 227–240.
- Gouin, S.** (2004). Microencapsulasyon industrial appraisal of existing technology and trends, *Trends in Food Science & Technology*, 15(7), 330–347.
- Gouvinhas, I., Almeida, J. M. M. M., Carvalho, T., Machado, N., Barros, A. I. R. N. A.** (2015). Discrimination and characterisation of extra virgin olive oils from three cultivars in different maturation stages using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics, *Food Chemistry*, 174, 226–232.
- Goyal, G., Lee, Y. B., Darvish, A., Ahn, C. W., Kim, M. J.** (2016). Hydrophilic and size-controlled graphene nanopores for protein detection, *Nanotechnology*, 27(49), 495301.
- Hışıl, Y.** (2010). *Enstrümental Gıda Analizleri*. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Kitapları, Yayın no: 30, 31, 41. İzmir, Türkiye, 515 p.
- Huong Ly, M., Naïtali-Bouchez, M., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M.N., Mai Le, T., Belin, J.M., Waché, Y.** (2006). Importance of bacterial surface properties to

control the stability of emulsions, *International Journal of Food Microbiology*, 112(1), 26-34.

- Jha, R. K., Kudachikar, V. B., Kumar, S.** (2013). Lipase inactivation in wheat germ by gamma irradiation, *Radiation Physics and Chemistry*, 86, 136–139.
- Kahveci, B. & Özkaya, H.** (1990). Soya ve buğday ruşeymi katkılı unların kalitesini düzeltme imkanları üzerine araştırmalar, *Gıda/The Journal of Food*, 15(6), 367377.
- Kan, A.** (2012). Chemical and elemental characterisation of wheat germ oil (*Triticum spp. L.*) cultivated in Turkey, *African Journal of Agricultural Research*, 7(35), 4979-4982.
- Karabacak, M., Kanbur, M., Eraslan, G., Sarıca, Z. S.** (2011). The antioxidant effect of wheat germ oil on subchronic coumaphos exposure in mice, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 2119-2125.
- Karabulut, I.** (2007). Fatty acid composition of frequently consumed foods in Turkey with special emphasis on trans fatty acids, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 58(8), 619-628.
- Karadeniz, M., Sahin, S., Sumnu, G.** (2018). Enhancement of storage stability of wheat germ oil by encapsulation, *Industrial Crop & Products*, 114(4), 14-18.
- Karaman, K.** (2020). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* based microcarriers for encapsulation of black cumin seed oil: Stability of thymoquinone and bioactive properties, *Food Chemistry*, 313, 126129.
- Kavosi, M., Mohammadi, A., Shojaee-Aliabadi, S., Khaksar, R., Hosseini, S. M.** (2017). Characterization and oxidative stability of purslane seed oil microencapsulated in yeast cells biocapsules, *Journal of Science Food Agriculture*, 98, 2490-2497.
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., Brul, S.** (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 239-256.
- Konuşkan, D. B. & Alta, A.** (2008). Zeytin ve zeytinyağında doğal olarak bulunan biyoaktif bileşikler ve fizyolojik etkileri, *Gıda*, 33(6), 297-302.
- Kumar, G. S. & Krishina, A. G. G.** (2013). Studies on the nutraceuticals composition of wheat derived oils wheat bran oil and wheat germ oil, *Journal of Food Science And Technology*, 52, 1145-1151.
- Lipke, P.N. & Ovalle, R.** (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges, *Journal of Bacteriology*, 180(15), 3735-3740.
- Luan, X., Skupin, M., Siepmann, J., Bodmeier, R.** (2006). Key parameters affecting the initial release (burst) and encapsulation efficiency of peptide-containing poly (lactide-co-glycolide) microparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 324(2), 168-175.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., Desobry, S.** (2006). Flavour encapsulation and controlled release, *International Journal of Food Science Technology*, 41, 1–21.
- Mahmoud, A. A., Mohdaly, A. A. A., Elneairy, N. A. A.** (2015). Wheat germ: an over view on nutritional value, antioxidant potential and antibacterial characteristics, *Food Nutrition Science*, 6, 265–277.

- Malecka, M.** (2002). Antioxidant properties of the unsaponifiable matter isolated from tomato seeds, oat grains and wheat germ oil, *Food Chemistry*, 79(3), 327-330.
- McClements, D. J.** (2012). Requirements for food ingredient and nutraceutical delivery systems (pp: 3–18). In: N, Garti, DJ, McClements (Eds), *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals*. Woodhead Publishing Series In Food Science, Technology and Nutrition, Cambridge, UK.
- Megahad, A. & El Kinawy, O. S.** (2002). Studies on the extraction of wheat germ oil by commercial hexane, *Grasasy Aceites*, 53(4), 414-418.
- Megahed, M. G.** (2011). Study on stability of wheat germ oil and lipase activity of wheat germ during periodical storage, *Agriculture and Biology Journal of North America*, 2(1), 163-168.
- Mokhtari, S., Mahdi Jafari, S., Khomeiri, M., Maghsoudlou, Y., Ghorbani, M.** (2017). The cell wall compound of *Saccharomyces cerevisiae* as a novel wall material for encapsulation of probiotics, *Food Research International*, 96, 19-26.
- Nelson, G.** (2002). Application of microencapsulation in textiles, *International Journal of Pharmaceutics*, 242(1), 55-62.
- Nelson, G., Duckham, S. C., Crothers, M. E. D.** (2006). Microencapsulation in yeast cells and applications in drug delivery (pp: 268-281). In: Severson, S. (Ed.), *Polymeric Drug Delivery I. American Chemical Society Symposium Series*. 923, 268–281.
- Niu, L., Jiang, S., Pan, L., Pang, M.** (2013). Characterization of wheat germ oil in terms of volatile compounds, lipid composition, thermal behavior, and structure, *International Journal of Food Properties*, 16, 1740–1749.
- Normand, V., Dardelle, G., Bouquerand, P.E., Nicolas, L., Johnston, D.J.** (2005). Flavor encapsulation in yeasts: limonene used as a model system for characterization of the release mechanism, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(19), 7532-7543.
- Nguyen, T. T., Phan-Thi, H., Pham-Hoang, B-N., Ho, P. T., Tran, T. T., Waché, T.** (2018). Encapsulation of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins as natural colors in yeast, *Food Research International*, 107, 275-280.
- Osumi, M.** (1998). The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation, *Micron*, 29(2-3), 207-233.
- Özcan, M. M., Rosa, A., Dessi, M. A., Marongiu, B., Piras, A., Al-Juhaimi, F. Y. I.** (2013). Quality of wheat germ oil obtained by cold pressing and supercritical carbon dioxide extraction, *Czech Journal of Food Science*, 31, 236–240.
- Özer, Ö. & Sariçoban, C.** (2010). The effects of butylated hydroxyanisole, ascorbic acid, and  $\alpha$ -tocopherol on some quality characteristics of mechanically deboned chicken patty during freeze storage, *Czech Journal of Food Science*, 28, 150-160.
- Özülkü, G., Yildirim, R. M., Toker, O. S., Karasu, S., Durak, M. Z.** (2017). Rapid detection of adulteration of cold pressed sesame oil adulterated with hazelnut, canola, and sunflower oils using ATR-FTIR spectroscopy combined with chemometric, *Food Control*, 82, 212–216.

- Panfili, G., Cinquanta, L., Fratianni, A., Cubadda, R.** (2003). Extraction of wheat germ oil by supercritical CO<sub>2</sub>: Oil and defatted cake characterization, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 80, 157–161.
- Paramera, E. I., Konteles, S. J., Karathanos, V. T.** (2011a). Microencapsulation of curcumin in cells of *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Chemistry*, 125(3), 892-902.
- Paramera, E. I., Konteles, S. J., Karathanos, V. T.** (2011b). Stability and release properties of curcumin encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae*,  $\beta$ -cyclodextrin and modified starch, *Food Chemistry*, 125(3), 913-922.
- Pham-Hoang, B.N., Romero- Guido, C., Phan-Thi, H., Waché, Y.** (2018). Strategies to improve carotene entry into cells of *Yarrowia lipolytica* in a goal of encapsulation, *Journal of Food Engineering*, 224, 88-94.
- Pham-Hoang, B.N., Romero-Guido, C., Phan-Thi, H., Waché, Y.** (2013). Encapsulation in a natural, performed, multi-component and complex capsule: yeast cells, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(15), 6635-6645.
- Pham-Hoang, B.N., Voilley, A., Waché, Y.** (2016). Molecule structure factors influencing the loading of flavoring compounds in a natural-performed capsule: yeast cells, *Colloids and Surfaces B: Bio interfaces*, 148, 220-228.
- Pinto, S. S., Verruck, S., Vieira, C. R. W., Prudêncio, E. S., Amante, E. R., Amboni, R. D. M. C.** (2015). Influence of microencapsulation with sweet whey and prebiotics on the survival of Bifidobacterium BB 12 under simulated gastrointestinal conditions and heat treatments, *Food Science and Technology*, 64(2), 1004-1009.
- Quest International B. V.** (1990a). Bleach compositions containing microorganism encapsulated perfumes. *European patent application*. 0414282.
- Quest International B. V.** (1990b). Fabric softening compositions containing microorganism encapsulated perfumes. *European patent application*. 0414283.
- Rathore, S., Desai, P. M., Liew, C. V., Chan, L. W., Heng, P. W. S.** (2013). Microencapsulation of microbial cells, *Journal of Food Engineering*, 116(2), 369-381.
- Risch, S. J. & Reineccius, G. A.** (1995). *Encapsulation and controlled release of food ingredient* (pp: 8-25). ACS Symposium Series, 590. Washington, ABD.
- Salari, R., Bazzaz, B. S. F., Rajabi, O., Khashyarmanesh, Z.** (2013). New aspects of *Saccharomyces cerevisiae* as a novel carrier for berberine, *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(1), 73-81.
- Salari, R., Rajabi, O., Khashyarmanesh, Z., Najafi, M. F., Bazzaz, B. S. F.** (2015). Characterization of encapsulated berberine in yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae*, *Iran Journal of Pharmaceutical Research*, 14(4),1247-1256.
- Shi, G., Rao, L., Xie, Q., Li, B., Xiong, X.** (2010). Characterization of yeast cells as a microencapsulation wall material by fourier transform infrared spectroscopy, *Vibrational Spectroscopy*, 53(2), 289-295.
- Shi, G., Rao, L., Yu, H., Xiang, H., Pen, G., Long, S., Yang, C.** (2007). Yeast-cell-based microencapsulation of chlorogenic acid as a water soluble antioxidant, *Journal of Food Engineering*, 80(4), 1060-1067.

- Shi, G., Rao, L., Yu, H., Xiang, H., Yang, H., Ji, R.** (2008). Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell, *International Journal of Pharmaceutics*, 349, 83-93.
- Shi, L., Li, Z., Tachikawa, H., Gao, X. D., Bakanishi, H. I.** (2014). Use of yeast spores for microencapsulation of enzymes, *Applied and Environmental Microbiology*, 80(15), 4502-4510.
- Silva Lima, A., Pereira Maciel, A., Silva Mendença, C., Costa Junior, L. M.** (2017). Use of encapsulated carvacrol with yeast cell walls to control resistant strains of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae), *Industrial Crop & Products*, 108(1), 190-194.
- Stahl, W. & Sies, H.** (2003). Antioxidant activity of carotenoids, *Molecular Aspects of Medicine*, 24, 345–351.
- Stroescu, M., Stoica-Guzun, A., Ghergu, S., Chira, N., Jipa I.** (2013). Optimization of fatty acids extraction from Portulacaoleracea seed using response surface methodology, *Industrial Crops and Products*, 43, 405–411.
- Sultana, A., Miyamoto, A., Lan Hy, Q., Tanaka, Y., Fushimi, Y., Yoshii, H.** (2017). Microencapsulation of flavors by spray drying using *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Food Engineering*, 199, 36-41.
- Şengel-Türk, T.C., Haşçıek, C., Gönül, N.** (2007). Nanoparticulate drug delivery systems for targeting the drugs to the brain, *Journal of Neurological Sciences*, 24, 254-263.
- Tae-Hyun, K., Oh, Y. S., Kim, S. J.** (2000). The possible involvement of the cell surface in aliphatic hydrocarbon utilization by an oil degrading yeast, *Yarrowia lipolytica* 180, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10(3), 333-337.
- Tokuşoğlu, Ö. & Hall, C.** (2011). *Fruit and cereal bioactives: sources, chemistry & applications*. CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, Florida, USA.
- Troise, A. D. & Fogliano, V.** (2013). Reactants encapsulation and maillard reaction, *Trends in Food Science & Technology*, 33(1), 63-74.
- Türkcan, O. & Ökmen, G.** (2012). Mikrobiyal karotenoidler, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5(1), 115-122.
- Vieira, T. M. F. S., Regitano-D'arce, M. A. B.** (1999). Ultraviolet spectrophotometric evaluation of corn oil oxidative stability during microwave heating and oven test, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2203–2206.
- Wandrey, C., Bartkowiak, A., Harding, S. E.** (2009). Materials for encapsulation (pp: 31-100). In: N. J. Zuidam and V. A. Nedović (Eds), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- White, P. J.** (1991). An overview of methods for measuring changes in deep fat frying oils, *Food Technology*, 45, 75–80.
- Wojcicki, K., Khmelinskii, I., Sikorski, M., Caponio, F., Paradiso, V. M., Summo, C., Pasqualone, A., Sikorska, E.** (2015). Spectroscopic techniques and chemometrics in analysis of blends of extra virgin with refined and mild deodorized olive oils, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117, 92–102.

- Yanishlieva-Maslarova, N. V.** (2001). Inhibiting oxidation (pp: 22-70). In: Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (Eds.), *Antioxidants in Food: Practical Applications*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge (UK).
- Yazicioglu, B., Sahin, S., Sumnu, G.** (2015). Microencapsulation of wheat germ oil, *Journal of Food Science and Technology*, 52(6), 3590-3597.
- Young, S. & Nitin, N.** (2019). Thermal and oxidative stability of curcumin encapsulated in yeast microcarriers, *Food Chemistry*, 275, 1-7.
- Yuan, C., Xie, Y., Jin, R., Ren, L., Zhou, L., Zhu, M., Ju, Y.** (2017). Simultaneous analysis of tocopherols, phytosterols and squalene in vegetable oils by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), *Food Analysis and Methods*, 10 (11), 3716-3722.
- Zhang, Y., Wu, W. Z., Wu, X. Q., Zhang, X. L., Zhang, Y.** (2007). Addition of antioxidant from bamboo leaves as an effective way to reduce the formation of acryl amide in fried chicken wings, *Food Additives and Contaminants*, 24, 242–251.
- Zhu, K. X., Lian, C. X., Guo, X. N., Peng, W., Zhou, H. M.** (2011). Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ, *Food Chemistry*, 126, 1122–1126.
- Zile, M. H.** (1998). Vitamin A and embryonic development: an overview, *Journal of Nutrition*, 128(2), 455-458.
- Zou, Y., Gao, Y., He, H., Yang, T.** (2018). Effect of roasting on physico-chemical properties, antioxidant capacity and oxidative stability of wheat germ oil, *Food Science and Technology*, 90, 246-253.
- Zuidam, N. J. & Heinrich, E.** (2010). Encapsulation of aroma (pp: 127-160). In: Zuidam, N. J., Nedovic, V. A. (Eds.), *Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. Springer Science+Business Media, London.

## ÖZGEÇMİŞ

**Lisans:** Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü 2008-2013

**Yüksek Lisans:** Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Tezli Yüksek Lisans, 2015-2018

**Mesleki Deneyim ve Ödüller:** Banvit A.Ş., Piliç Kesimhanesi, Koordinasyon Asistanı, 2014-2018

### Yayın Listesi:

#### Makale

- Çetinkaya, N., Incili, G. K., Arslan, A. (2020). Sanitation control of some equipments used in poultryslaughterhouse line. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 77(3), 301-310.

#### Bildiri

- Çetinkaya, N., Incili, G. K., Arslan, A. (2017). Kanatlı Kesim Hattında Kullanılan Bazı Alet ve Ekipmanlarda Sanitasyon İşleminin Kontrolü. 7. *Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi*, 135-136.