



Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Tarım Bilimleri Dergisi
(YYU Journal of Agricultural Science)



<http://dergipark.gov.tr/yyutbd>

Araştırma Makalesi (Research Article)

Maya Hücreleri (*Saccharomyces cerevisiae*) ile Enkapsüle Edilen Karvakrolün Yapısal, Konformasyonel ve Antiradikal Özelliklerinin Belirlenmesi

Kevser KARAMAN*¹

¹Erciyes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, 38280, Kayseri, Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0003-0729-6185>

*Sorumlu yazar e-posta: kevserkaraman@erciyes.edu.tr

Makale Bilgileri

Geliş: 29.11.2019

Kabul: 19.02.2020

Online Yayınlanma 31.03.2020

DOI: 10.29133/yyutbd.666928

Anahtar kelimeler

Antiradikal,
Karvakrol,
Maya hücresi,
Plazmoliz,
S. cerevisiae

Öz: Karvakrol, kekik bitkisinin uçucu bileşenlerinden en çok çalışılan fenolik yapı bir maddedir. Çevresel faktörlere bağlı olarak stabilitesi azalan karvakrolü daha stabil bir ürün haline dönüştürmek için enkapsülasyon tekniğinden faydalanılabilmektedir. Bu çalışmada gıda, ziraat ve ilaç endüstrisinde kullanımı olan karvakrolün maya hücreleri ile biyo-enkapsüle edilmesi ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Maya hücrelerine ön işlem olarak plazmoliz işlemi uygulanmış ve hem plazmoliz olmuş hem de olmamış hücreler ile karvakrol enkapsüle edilmiştir. Plazmolize olmuş ve olmamış maya hücrelerinde tutulan karvakrol oranları plazmolize olmuş maya hücresinde %80.79, plazmolize olmamış maya hücresinde ise %90.43 olarak tespit edilmiştir. Enkapsüllerin toplam fenolik madde miktarları plazmolize olmuş ve olmamış hücre enkapsülleri için sırasıyla 138.1 ve 146.8 mg GAE/g olarak belirlenmiş ve maya enkapsülleri içerisinde plazmoliz olmamış enkapsül (POE), plazmolize enkapsüle (PE) kıyasla daha yüksek antiradikal aktivite sergilemiştir. Ayrıca gerçekleştirilen FTIR tekniği ile karvakrolün maya hücreleri tarafından enkapsülasyonu doğrulanmış ve taramalı elektron mikroskobu ile yapısal özellikleri belirlenmiştir.

Determination of Structural, Conformational and Antiradical Properties of Carvacrol Encapsulated with Yeast Cells (*Saccharomyces cerevisiae*)

Article Info

Received: 29.11.2019

Accepted: 29.02.2020

Online Published 31.03.2020

DOI: 10.29133/yyutbd.666928

Keywords

Antiradical,
Carvacrol,
Yeast cell,
Plasmolysis,
S. cerevisiae

Abstract: Carvacrol is the most studied phenolic substance, one of the essential components of thyme. The encapsulation technique can be used to make more stable carvacrol, which has decreased stability due to environmental factors. In this study, it was aimed to encapsulate and characterize carvacrol, which is used in the food, agriculture and pharmaceutical industry, with yeast cells. Yeast cells were pretreated with plasmolysis and carvacrol was encapsulated with both plasmolysed and non-plasmolysed cells. Carvacrol retained was 80.79% in the plasmolysed yeast cells and it was 90.43% in the non-plasmolysed yeast cell. The total amount of phenolic substances in the capsules was determined as to be 138.1 and 146.8 mg GAE/g for plasmolysed and non-plasmolysed yeast cells capsules respectively and the non-plasmolysed yeast capsules exhibited higher antiradical activity compared to the plasmolysed encapsules (PE). In addition, the encapsulation of carvacrol by yeast cells was proved by FTIR technique and structural properties were determined by scanning electron microscope.

1. Giriş

Uçucu yağlar, hidrodistilasyon, buhar distilasyon, kuru distilasyon veya uygun bir mekanik işlemle (Sangwan ve ark., 2001; Hüsnü ve ark., 2007) bitki ham maddesinden elde edilen uçucu ve yarı uçucu bileşiklerin kompleks karışımlarıdır (Zuzarte ve Salgueiro, 2015; Hüsnü ve ark., 2007). Lamiaceae familyası uçucu bileşikler ihtiva eden çok çeşitli aromatik otlar ile çalılardan oluşan ve başlıca esansiyel yağları taşıyan bitki ailelerinden biridir (Nieto, 2017; Mamadalieva ve ark., 2017). Lamiaceae familyasının en önemli bitkilerinden olan kekik bitkisine ait Türkiye’de *Thymus*, *Origanum*, *Satureja*, *Tymbra* ve *Coridothymus* isimli beş cins bulunmaktadır (Başer ve ark., 1994; Davis, 1982). Bu cinslere ait bitkilerden elde edilen kekik esansiyel yağları, timol ile bir monoterpenik fenol izomeri olan karvakrol bakımından oldukça zengindir (Başer, 2008).

Karvakrol monoterpenoid karakterde sıvı bir fenolik maddedir. Karvakrol, lipofilik özelliklere ve oda sıcaklığında (25 °C) 0.976 g/ml yoğunluğa sahip olup etanol, aseton ve dietil eterde yüksek oranda çözünmektedir. Birçok çalışmada belirtildiği üzere bu bileşik, antibakteriyel ve antifungal (Chavan ve Tupe, 2014; Du ve ark., 2008), antiviral (Gilling ve ark., 2014; Sánchez ve ark., 2015), antioksidan (Aristatle ve ark., 2011; Guimarães ve ark., 2010; Milos ve Makota, 2012) ve antikanserijen (Arunasree, 2010; Ozkan ve Erdoğan, 2012) özelliklere sahiptir. Aroması ve antimikrobiyal aktiviteleri nedeniyle, özellikle gıda endüstrisi için doğal bir gıda koruyucusu olarak birçok çalışmada önerilmiştir (Solórzano-Santos ve Miranda-Novales, 2012; Karaman ve Sağdıç, 2019).

Son zamanlarda, araştırmacılar yapısı ve besinsel yararları nedeniyle kapsülleme alanında yeni taşıyıcı materyal olarak maya hücrelerinin kullanımı ile ilgilenmektedir. Bu araştırmacılar enkapsülasyon amacıyla maya hücrelerinin kullanılmasının farklı avantajlarını vurgulamışlardır. Resveratrol (Shi ve ark., 2008), uçucu yağlar (Bishop ve ark., 1998), klorojenik asit (Shi ve ark., 2007), kurkumin (Paramera ve ark., 2011) ve doğal mikro veziküller olarak enzimler (Chow ve Palecet, 2004) gibi hem suda çözünen hem de çözünmeyen moleküller için çeşitli gıda bileşenlerinin kapsüllemesinde maya hücreleri kullanılmıştır. Yine benzer olarak Czerniak ve ark. (2015), maya hücrelerini biyokapsül olarak kullanarak ringa balık yağının oksidatif stabilitesini başarıyla geliştirmiştir. Diğer tekniklere kıyasla, maya hücrelerinde kapsülleme nispeten basit prosedür gerektirir ve işleme sırasında maya, su ve sıvı çekirdek bileşenlerinden başka hiçbir ilave materyale gerek duyulmaz (Bishop ve ark., 1998). Ticari maya mikrokapsülleri, nanometre kalınlığındaki güçlü ve elastik hücre duvarlarına sahip mikrometre boyutunda elipsoidlerdir. Kapsüllemiş aktif maddenin salınım mekanizması, su aktivitesi ve sıcaklık ile kontrol edilmektedir (Normand ve ark., 2005). Bugüne kadar, kapsülleme öncesinde bazı çalışmalarda maya hücresi ön muamelesi için sodyum klorür kullanılarak plazmoliz işlemi denenmiştir (Paramera ve ark., 2011, Shi ve ark., 2007, Shi ve ark., 2008). Plazmoliz işlemi ile hücre içi materyal boşaltılarak maya hücresi tam bir enkapsül gibi kullanılabilir.

Bu çalışmada uçuculuğu sebebiyle ilave edildiği ortamda stabilitesi düşük olan karvakrol, hem plazmolize edilmiş hem de plazmoliz olmamış maya hücreleri ile enkapsüle edilmiş ve elde edilen enkapsüllerin konformasyonel ve yapısal özellikleri ile antiradikal aktiviteleri karakterize edilmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyal

Çalışmada materyal olarak kullanılan maya hücresi ekmek mayası olarak satılan *Saccharomyces cerevisiae* olup yerel piyasadan yaş maya şeklinde satın alınmıştır. Enkapsüle edilen karvakrol ise Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, ABD)’den temin edilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Maya hücrelerinin ön işlemi

Enkapsülasyon işlemi öncesi, 170 g maya hücresi fosfat tamponu (pH 6.8) ile yıkanmış ve daha sonra santrifüjleme ile (10 dakika boyunca 3984 x g) toplanmıştır. Ardından distile su ile yıkama prosedürü beş kez tekrarlanmış ve daha sonra yıkanmış hücreler dondurularak kurutulmuştur (plazmolize olmayan hücreler). Aynı prosedür, hücrelerin %10 sodyum klorür (NaCl) çözeltisi içeren

şişelerde süspans edildiği plazmolize hücrelerin hazırlanması için de takip edilmiştir. Şişeler, çalkalayıcıda 55 °C ve 180 rpm'de 48 saat süreyle çalkalanmıştır. Plazmolize hücreler, santrifüjleme (10 dakika boyunca 3984 x g) ile elde edilmiş, daha sonra hücre kalıntılarını ve NaCl'ü elemine etmek için beş kez deiyonize su ile yıkanmış ve dondurularak kurutulmuştur.

2.2.2. Karvakrolün maya hücresi ile enkapsülasyonu

Plazmolize olmuş ve olmamış maya hücrelerine (3 g), karvakrol (3 g) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, ABD) ve 4 ml saf su ilave edilmiş ve karışım, 45 ± 1 °C'de 4 saat karıştırılmıştır. Kapsüllenmiş örnekler saf su ile yıkanmış ve kapsüllenmemiş karvakrolü uzaklaştırmak için 10 dakika boyunca 3000 rpm'de santrifüj işlemi uygulanmıştır. Bu şekilde plazmolize enkapsül (PE) ve plazmoliz olmamış enkapsül (POE) şeklinde örnekler üretilmiştir. Kapsüllenmiş maya hücreleri -20 °C'de dondurulmuş ve daha sonra liyofilizatörde (Christ Freeze-Dryers, Osteode, Almanya) kurutulmuştur. Üretilen kapsüller -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.3. Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC-MS) ile uçucu bileşen analizi

Örneklerde uçucu bileşen analizi için, HP-5 MS kapiler kolon (30 m x 0.25 µm) ve HP 5973 kütle selektif dedektöre sahip Shimadzu QP2010 Ultra GC-MS (Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi, Japonya) cihazı kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak helyumdan yararlanılmış, akış oranı 1 mL/dk ve enjektör sıcaklığı 220 °C, MS transfer sıcaklığı ise 290 °C'ye ayarlanmıştır. Kolon sıcaklığı ilk 3 dk için 50 °C'ye, ardından 3 °C/dk'lık artışlarla 150 °C'ye yükseltilmiş ve bu sıcaklıkta 10 dk tutulduktan sonra 250 °C'ye yükseltilmiştir. Splitless yöntemde 1.0 µl seyreltilmiş örnekler (1/100 metanol, v/v) otomatik olarak enjekte edilmiştir. Bileşenlerin karakterizasyonu elektronik kütüphaneler (Flavor2.L, Wiley7n.l ve NIST98.L) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.4. Örneklerin toplam fenolik madde ve antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi

2.2.4.1. Maya hücresi ve enkapsüllerin ekstraksiyonu

Örneklerin toplam fenolik madde ve antiradikal aktivitelerini belirleyebilmek amacıyla, karvakrol yüklenmiş (PE ve POE) örnekler ile karvakrol yüklenmemiş maya hücreleri (Plazmoliz maya (PM) ve plazmoliz olmamış maya (POM)) ilk olarak ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Bu amaçla yaklaşık 0.5 g örnek hassas bir şekilde tartılmış ve sonrasında 5 ml metanol (Merck, Almanya) ilave edilen örnekler 1 dk süreyle vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında çalkalamalı su banyosu ile 30 dk süreyle ekstraksiyona tabi tutulan örneklere 9000 g'de +4 °C sıcaklıkta 5 dk süreyle santrifüj işlemi uygulanmıştır. Ardından süpernatant 0.45 µm şırınga filtre yardımıyla süzölmüş ve süzölen kısım toplam fenolik madde ve antiradikal aktivite testlerinde kullanılmıştır.

2.2.4.2. Toplam fenolik madde

Örneklerin toplam fenolik madde miktarları Singleton ve Rossi (1965) tarafından önerilen yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir. Bu amaçla 200 µl örnek, 1800 µl su ile karıştırılmış ve ardından örneklere 1 ml Folin Ciocalteu reaktifi (1/10 oranında seyreltilmiş) eklenmiştir. Son olarak 2 ml sodyum karbonat (%2, w/v) ilavesi yapılmış ve sonrasında örnekler ağızları sıkıca kapatılarak oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 2 saat süreyle inkübe edilmiştir. Süre sonunda örneklerin absorbans değerleri 765 nm'de UV-Vis spektrofotometre (Shimadzu, Japonya) ile okunmuş ve sonuçlar gallik asit standardı kullanılarak oluşturulmuş olan kalibrasyon eğrisi ile mg GAE/g örnek olarak hesaplanmıştır. Ölçümler dört paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.2.4.3. DPPH radikali süpürme aktivitesi

Örneklerin DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) radikali süpürme aktivitesi Moreno ve ark. (1998) ile Brand-Williams ve ark. (1995) tarafından önerilen metot yardımıyla tespit edilmiş ve örnekleri birbiriyle kıyaslayabilmek amacıyla da EC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Bu bağlamda belli

oranlarda seyreltilen örneklerden 100 µl alınmış ve 3900 µl DPPH solüsyonu (0.1 mM) ile karıştırılmıştır. Ağzuları sıkıca kapatılan örnekler 30 dk süreyle karanlık ortamda ve oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 517 nm dalga boyunda UV-Vis spektrofotometre (Shimadzu, Japonya) ile absorbans değerleri okunmuş ve aşağıdaki eşitlik kullanılarak (Denklem 1) her bir seyreltme oranına ait % inhibisyon değeri tespit edilmiştir.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(\text{Abs}_{\text{Kontrol}} - \text{Abs}_{\text{Ekstrakt}})}{\text{Abs}_{\text{Kontrol}}} \quad (1)$$

Her bir seyreltme oranına karşılık gelen % inhibisyon değerleri belirlendikten sonra her bir örnek için ortamda süpürülmemiş DPPH miktarları da tespit edilmiş ve bu amaçla aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır (Denklem 2).

$$\text{DPPH}_{\text{Kalan}}(\text{mg/ml}) = [37.92 \times \text{Abs}_{517} + 0.27] \times 1000 \quad (R^2 = 0.997) \quad (2)$$

% Kalan DPPH oranı ise reaksiyon sonunda kalan DPPH miktarının başlangıçtaki oranına bölünmesiyle hesaplanmıştır (Denklem 3).

$$\% \text{ DPPH}_{\text{Kalan}} = \frac{[\text{DPPH}]_t}{[\text{DPPH}]_{t=0}} \quad (3)$$

EC₅₀ değeri başlangıçta mevcut DPPH radikal miktarının %50'sini süpürmek amacıyla gerekli olan enkapsül ya da karvakrolden alınan toplam fenolik madde miktarını ifade etmekte olup, süpürülmeden kalan DPPH radikal miktarı ile örnekten elde edilen toplam fenolik madde miktarı kullanılarak hazırlanan lineer regresyon eğrisi vasıtasıyla hesaplanmıştır. Tüm ölçümler dört paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

2.2.4.4. ABTS⁺ radikali süpürme aktivitesi

ABTS⁺ (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonik asit) radikali süpürme aktivitesi Wettasinghe ve ark. (2002)'nin uyguladığı yönteme göre belirlenmiştir. Bu amaçla, ABTS⁺ radikali oluşturmak maksadıyla 7 mmol ABTS⁺, bir miktar suda çözülmüş ve 2.45 mmol potasyum persülfat ile ilgili hacme tamamlanmıştır. Karışım daha sonra oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda 16 saat süreyle koyu mavi renk oluşana kadar bekletilmiştir. Koyu mavi renkli bu çözelti, fosfat tamponu ile (pH 7.4) absorbans değeri 734 nm'de 0.700±0.10 olana kadar seyreltilmiştir. Daha sonra seyreltilmiş bu çözeltiden 2 ml (ABTS⁺ çözeltisi) alınarak 75 µl uygun oranlarda seyreltilmiş örnek ile karıştırılmış ve 6 dk süreyle oda şartlarında ve karanlık ortamda inkübasyona bırakılan örneklerin absorbans değerleri UV-Vis spektrofotometre (Shimadzu, Japonya) ile 734 nm'de belirlenmiştir. Örneklerin süpürme gücü sonucunda ABTS⁺ radikal kationundaki azalma yüzde olarak hesaplanmış (Denklem 4) ve sonuçlar Trolox ile oluşturulmuş olan kalibrasyon eğrisi kullanılarak µg Trolox/g örnek olarak verilmiştir. Yapılan tüm ölçümler dört tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(\text{Abs}_{\text{Kontrol}} - \text{Abs}_{\text{Ekstrakt}})}{\text{Abs}_{\text{Kontrol}}} \quad (4)$$

2.2.5. Örneklerin konformasyonel ve yapısal özelliklerinin belirlenmesi

2.2.5.1. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) ile konformasyonel karakterizasyon

IR spektrumu ve yapıdaki bağların durumu, hem boş hem de yüklü maya hücresi yapılarının bağlanma yerleri Perkin Elmer 400 FT-IR Spektrometre Spotlight 400 Görüntüleme Sistemi (Fransa) kullanılarak izlenmiş ve spektrumlar karşılaştırılmıştır.

2.2.5.2. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ile kapsüllerin yapısal karakterizasyonu

Hem dondurularak kurutulmuş mikrokapsüllerin hem de boş maya hücrelerinin yüzey ve mikroyapısını izlemek için Taramalı Elektron Mikroskop sistemi (LEO 440 Bilgisayar Kontrollü Dijital Taramalı Elektron Mikroskobu, Zeiss, Oberkochen, Almanya) kullanılmıştır. Numuneler püskürtme

cihazı kullanılarak iletken bir tabaka (Au-Pd) ile kaplanmış ve bu aşamada vakum altına alınarak kurutulduktan sonra görüntüleme işlemi başlatılmıştır. Örnekler, 50X, 100X, 1000X ve 3000X gibi farklı büyütme oranlarıyla 5 kV'luk bir hızlanma geriliminde çalışılırken analiz edilmiştir.

2.2.6. İstatistiksel analizler

Çalışma kapsamında elde edilen verilerin birbiri ile kıyaslanması amacıyla SAS istatistiksel paket programı kullanılmıştır. Tek faktör varyans analiz yöntemi ile varyans analizine tabi tutulan veriler arasındaki farklılık Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiş ve bu bağlamda manidarlık düzeyi olarak $\alpha=0.05$ hata değeri dikkate alınmıştır.

3. Bulgular

3.1. Örneklerin aromatik bileşen kompozisyonu

Plazmoliz olmuş ve karvakrol yüklenmiş maya hücreleri ile yükleme yapılmamış boş hücrelerin majör aromatik bileşen kompozisyonları GC-MS ile belirlenmiş ve Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Mikrokapsüllerin ve maya hücrelerinin majör uçucu bileşen miktarları

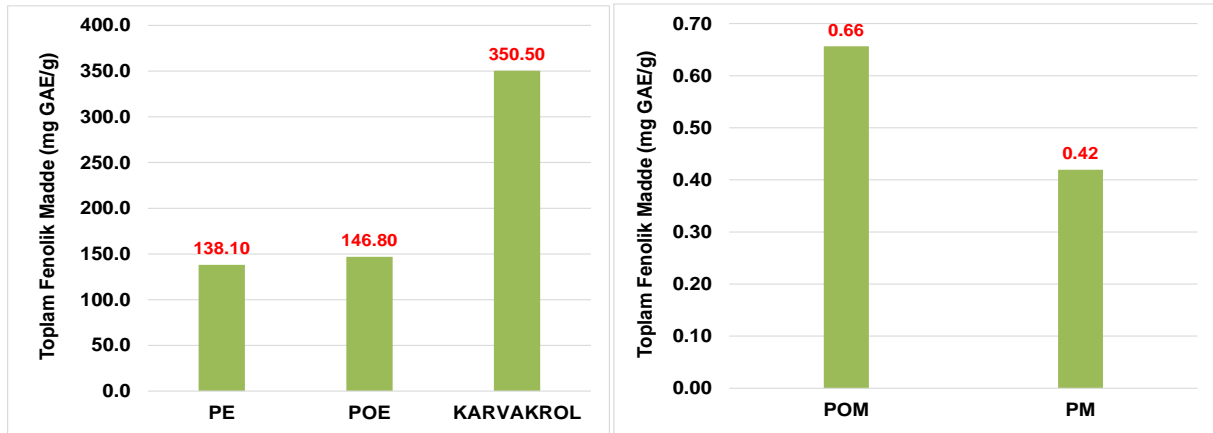
Örnek tipi	Bileşen ismi	Alıkonma zamanı (dk)	Oran (%)
Karvakrol	Karvakrol (Phenol,5-methyl-2-(1-methylethyl)	9.23	96.96
	Karvakrol (Phenol,5-methyl-2-(1-methylethyl)	9.03	80.79
Plazmoliz olmuş maya enkapsülleri	Cis-9-Hekzadekanoik asit	23.41	9.38
	9-Oktadekanoik asit	23.65	4.72
	Oktadekanoik asit 2,3 dhidroksipropil ester	29.03	1.09
	Karvakrol (Phenol,5-methyl-2-(1-methylethyl)	9.02	90.43
Plazmoliz olmamış maya enkapsülleri	Cis-9-Hekzadekanoik asit	22.97	1.04
	11- Oktadekanoik asit metil ester	25.99	1.04
	9-Octadekanoik asit	26.21	0.06
	Heptadekan-8-karbonik asit	26.97	3.82
Plazmoliz olmuş maya hücreleri	2-Pirolidinon	3.68	2.35
	Dekanoik asit	9.98	1.69
	L-Prolin metil ester	10.37	1.58
	9-Hekzadekanoik asit metil ester	22.24	14.98
	Hekzadekanoik asit metil ester	22.66	6.64
	Cis-9-Hekzadekanoik asit	23.10	14.33
	n-Hekzadekanoik asit	23.46	8.22
	9-Oktadekanoik asit	26.10	20.05
	10-Oktadekanoik asit	26.21	2.00
	Metil stearat	26.57	3.09
	Heptadekan-8-karbonik asit	26.88	11.78
	Oktadekanoik asit	27.28	3.02
	Fumarik asit	29.06	5.85
	Oktanoik asit	29.41	1.48
Plazmoliz olmamış maya hücreleri	Cis-9-Hekzadekanoik asit	23.55	29.09
	Etil-9-Hekzadekanoat	23.65	3.32
	n-Hekzadekanoik asit	23.86	11.35
	Hekzadekanoik asit etil ester	24.05	1.59
	Metil stearat	26.44	1.22
Plazmoliz olmamış maya hücreleri	9-Oktadekanoik asit	27.24	25.71
	Oktadekanoik asit	27.51	9.73
	Palmitaldehit	28.38	2.00

Standart madde olarak kullanılan karvakrolün %96.96 oranında saf Phenol,5-methyl-2-(1-methylethyl) yapısında olduğu görülmüş ve maya hücresi içerisinde kapsüllenen karvakrolün yüksek

safılıkta olduğu gözlenmiştir. Plazmolize olmuş ve olmamış maya hücreleri farklı oranda karvakrol tutmuş ve tutulan karvakrol oranları plazmolize olmuş maya hücresinde %80.79, plazmolize olmamış maya hücresinde ise %90.43 olarak tespit edilmiştir. Maya hücresinin spesifik yağ asitlerinden biri olan cis-9-hekzadekanoik asit (Blagović ve ark., 2005) plazmoliz olmamış ve karvakrol yüklü maya hücresinde %9.38 oranında belirlenmişken, bu değer plazmoliz işlemi sonrasında elde edilen karvakrol yüklü maya hücresinde stoplazmik içeriğin boşaltılmış olması sebebiyle %1.04 olarak tespit edilmiştir. Karvakrol yüklemesi yapılmamış maya hücrelerinde ise bu yağ asidi değeri plazmoliz maya için %14.33, plazmoliz olmamış maya hücresi için ise %29.09 olarak tespit edilmiştir. Aynı şekilde 9-oktadekanoik asit maya hücrelerinde yer alan diğer bir major yağ asidi olup, bütün maya hücrelerinde tespit edilmiştir. Karvakrol yüklemesi yapılmamış maya hücrelerinde daha yüksek oranda belirlenmiş olup, enkapsül oluşturan maya hücrelerinde miktarı düşmüş, plazmoliz işlemi ile ilgili yağ asidinin konsantrasyonunda azalma meydana gelmiştir.

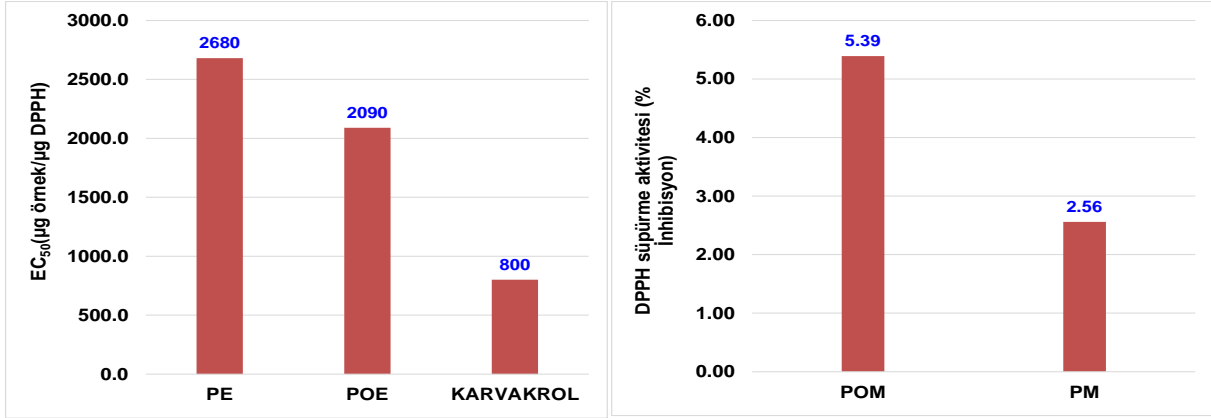
3.2. Örneklerin toplam fenolik madde içeriği ve antiradikal aktivitesi

Maya hücresi ile enkapsüle edilmiş karvakrolün özellikle antiradikal aktivitesinin ne derece taşıdığı ve kapsül formun kontrol grubu karvakrol bileşiğine nazaran ne kadar etkin bir biyoaktivite sergilediğini tespit edebilmek amacıyla örneklerde toplam fenolik madde miktarı ile antiradikal kapasite analizleri yapılmıştır. Örneklerin toplam fenolik madde miktarları Şekil 1’de gösterilmiştir. Maya hücresi ile hazırlanmış enkapsüllerin toplam fenolik madde miktarları plazmolize olmuş ve olmamış hücre enkapsülleri için sırasıyla 138.1 ve 146.8 mg GAE/g örnek olarak belirlenmiştir. Karvakrol için ise toplam fenolik madde miktarı 350.5 mg GAE/g olarak hesaplanmıştır. Karvakrol yüklenmemiş boş maya hücreleri için de toplam fenolik madde miktarı belirlenmiş ve bu değerler de plazmoliz maya hücresi (PM) ve plazmoliz olmamış maya hücresi (POM) için sırasıyla 0.42 ve 0.66 mg GAE/g örnek olarak tespit edilmiştir.



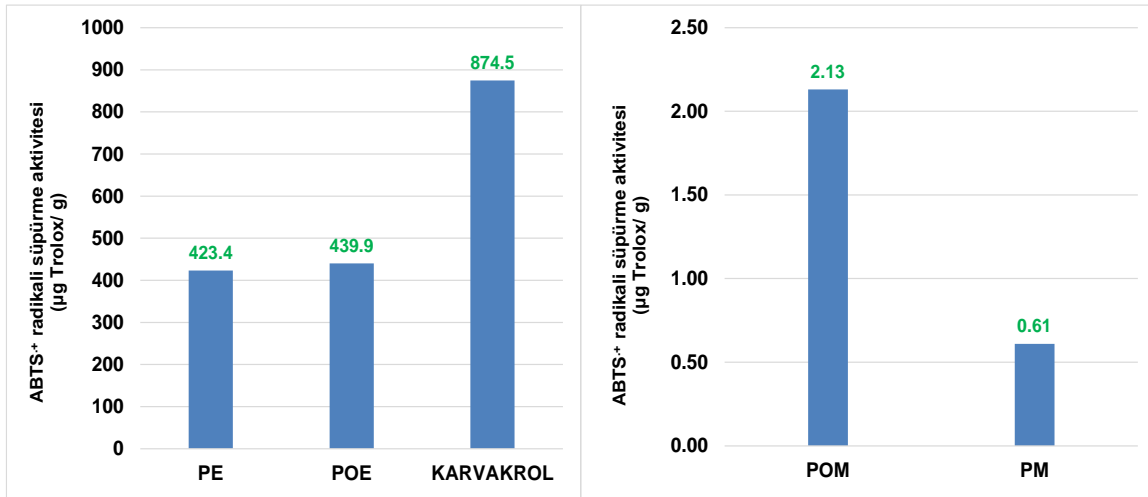
Şekil 1. Karvakrol yüklenmiş enkapsüllerin ve yükleme yapılmamış maya hücrelerinin toplam fenolik madde içerikleri. PE: Plazmoliz enkapsül, POE: Plazmoliz olmamış enkapsül, PM: Plazmoliz maya, POM: Plazmoliz olmamış maya.

Görüldüğü üzere boş maya hücreleri ile kıyaslandığında önemli miktarda karvakrol maya hücreleri ile enkapsüle edilmiştir. Plazmoliz işlemi örneklerin karvakrol tutma etkinliği üzerinde de etkili olmuş ve her iki maya hücresi arasındaki toplam fenolik madde miktarlarındaki farklılık istatistiksel olarak da önemli bulunmuş ve plazmolize olmamış maya hücresinin toplam fenolik madde miktarı bakımından daha zengin olduğu gözlenmiştir ($p < 0.05$).



Şekil 2. Karvakrol yüklenmiş enkapsüllerin EC₅₀ değerleri ile yükleme yapılmamış maya hücrelerinin DPPH radikali % inhibisyon oranları. PE: Plazmoliz enkapsül, POE: Plazmoliz olmamış enkapsül, PM: Plazmoliz maya, POM: Plazmoliz olmamış maya.

Maya hücrelerinin ve karvakrolün biyoaktif performansı DPPH ve ABTS⁺ radikali süpürme aktivitesi testleri ile belirlenmiştir. Örneklerin DPPH radikali süpürme aktiviteleri kapsül örnekleri için EC₅₀ değeri olarak, boş maya hücresi örnekleri için ise % inhibisyon olarak belirlenmiş ve Şekil 2’de gösterilmiştir. Karvakrol yüklenmiş maya hücreleri hapsettikleri karvakrol bileşiği sayesinde önemli düzeyde radikal yakalama aktivitesi göstermiştir. Bu aktivite, hem maya hücrelerinin plazmolize olup olmamasına hem de maya hücrelerinin yüklenmiş olup olmamalarına göre önemli farklılıklar sergilemiş olup bu farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Plazmolize olmuş karvakrol yüklü maya hücresi EC₅₀ değeri 2680 µg örnek/g DPPH, plazmolize olmamış hücre için ise 2090 µg örnek/g DPPH olarak hesaplanmıştır. Bu değer karvakrol bileşiği için ise 800 µg örnek/g DPPH olarak tespit edilmiştir. Karvakrol yüklemesi yapılmamış maya hücrelerinin DPPH süpürme aktiviteleri arasında da plazmoliz işlemi önemli bir etki göstermiş ($p < 0.05$) ve plazmoliz olmuş hücreler daha düşük % inhibisyon değeri sergilemiştir. Karvakrol ile yüklenmiş maya hücrelerinin EC₅₀ değerleri ile ilgili maya hücrelerinin sahip olduğu karvakrol miktarları arasında negatif ve önemli bir korelasyon olduğu gözlenmiştir ($r = -0.949$, $p < 0.05$); karvakrol miktarı arttıkça örneklerin EC₅₀ değerlerinde düşüş gözlenmiştir.



Şekil 3. Karvakrol yüklenmiş enkapsüllerin ABTS⁺ radikal süpürme aktiviteleri. PE: Plazmoliz enkapsül, POE: Plazmoliz olmamış enkapsül, PM: Plazmoliz maya, POM: Plazmoliz olmamış maya.

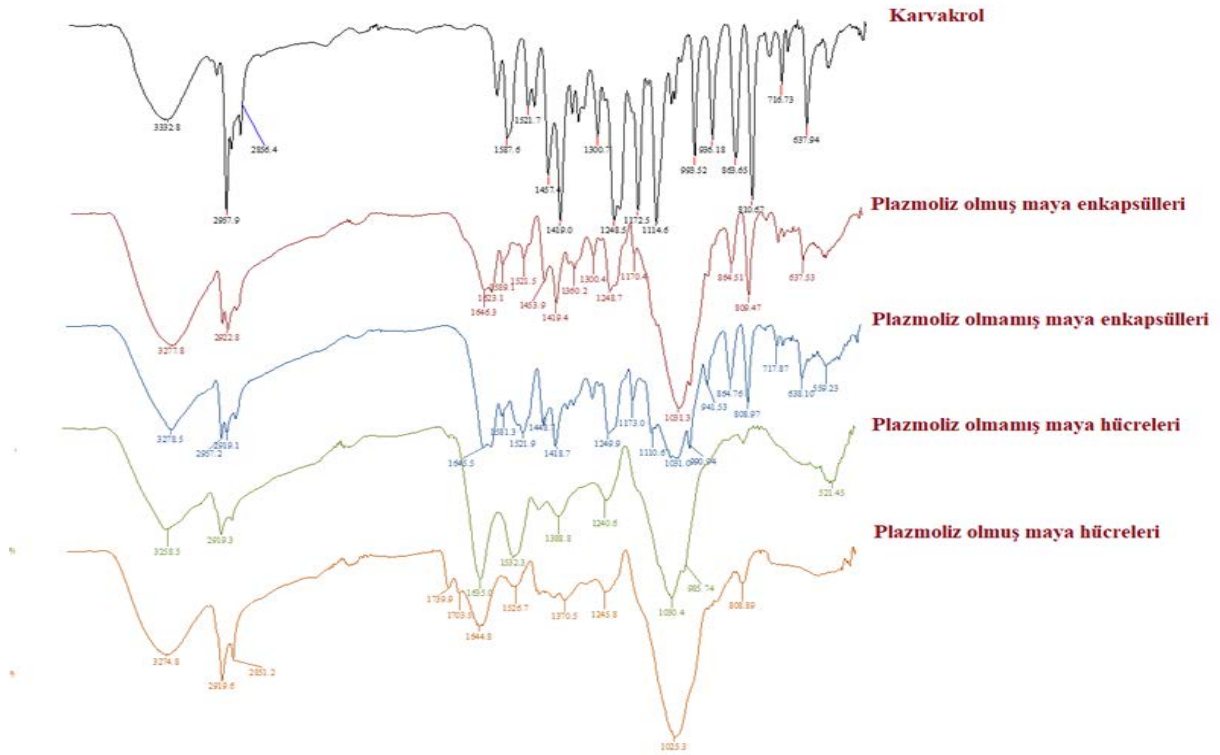
Örneklerin ABTS⁺ radikali süpürme aktivitesi ise Şekil 3’te gösterilmiştir. DPPH radikali süpürme aktivitesi değerlerine benzer şekilde, en yüksek ABTS⁺ radikali süpürme aktivitesi karvakrol

bileşiminde belirlenirken (874.5 µg Trolox/g), maya enkapsülleri içerisinde plazmoliz olmamış enkapsül (POE), plazmolize enkapsüle (PE) kıyasla daha yüksek antiradikal aktivite sergilemiştir. Boş maya hücreleri de aynı şekilde karvakrol yüklü hücelere nazaran çok düşük bir antiradikal aktivite sergilemiş olup, plazmolize olmamış maya (POM), plazmolize maya hüresine nazaran daha yüksek bir antiradikal aktivite göstermiştir ($p<0.05$). Örneklerin ABTS⁺ ve DPPH radikali süpürme aktiviteleri (EC₅₀) arasında negatif ve önemli bir korelasyon belirlenmişken ($r=-0.961$, $p<0.05$), toplam fenolik madde miktarı ile antiradikal aktivite değerleri arasında da pozitif ve önemli bir korelasyon varlığı tespit edilmiştir ($r=0.996$, $p<0.05$). Yine aynı şekilde örneklerin ABTS⁺ radikali süpürme aktivitesi ile enkapsüllerin taşıdıkları karvakrol miktarları arasında pozitif ve önemli bir korelasyon ($r=0.824$, $p<0.05$) olduğu gözlenmiştir.

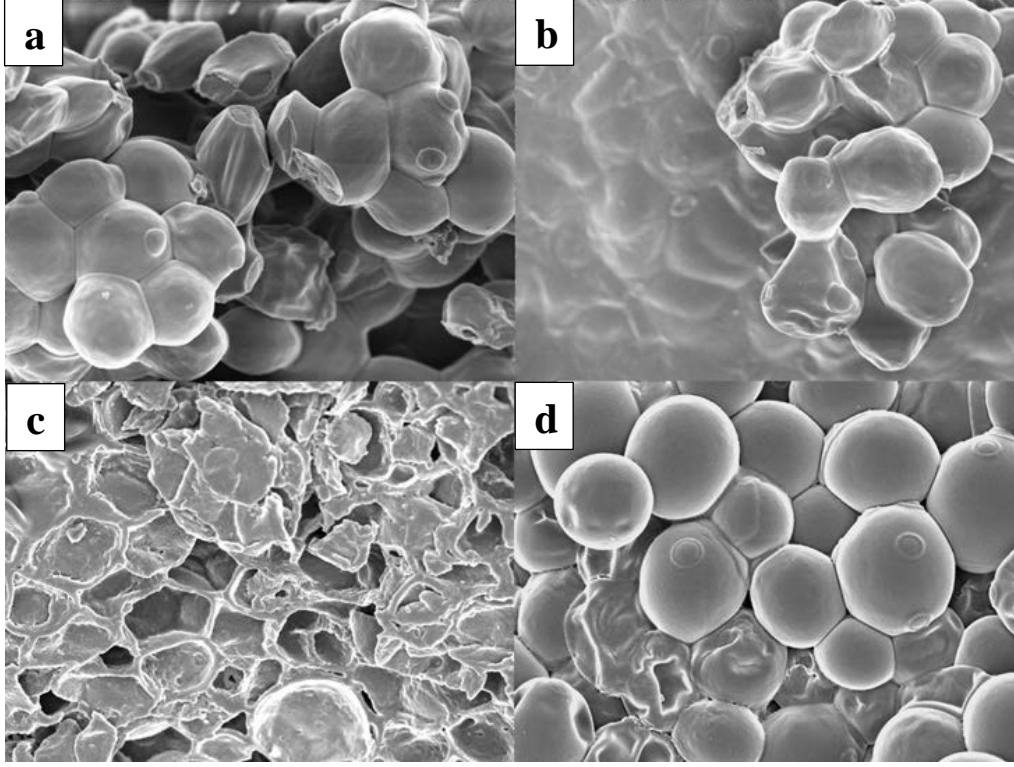
3.3 Örneklerin konformasyonel ve yapısal özellikleri

Şekil 4'te hem karvakrole hem de enkapsül ve boş maya hücrelerine ait FTIR spektrumları gösterilmiştir. Spektrum profili, karvakrolün maya hücreleri tarafından kapsüllenmesini doğrulamaktadır. 1300-1000 cm⁻¹'deki pikler fenol grubuna karşılık gelen C-O titreşimlerine atfedilmektedir (Pavia ve ark., 2008). Enkapsüllerde görülen bu piklerde yoğunluk, karvakrolün kapsüllenmesi sebebiyle oluşmuştur. 860 cm⁻¹'den daha düşük gerilim titreşimleri benzene (aromatik halka) karşılık gelmektedir ve boş maya hücrelerinde bu piklerin görülmemesi yine karvakrolün enkapsülasyonunu doğrulamaktadır (Pavia ve ark., 2008).

Galichet ve ark. (2001) ve Burattini ve ark. (2008) yaklaşık 1026 cm⁻¹'deki bileşen bantlarının esas olarak β-glukanlarla (β (1 → 4)) ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada söz konusu bantların karvakrol hariç diğer örneklerin spektrumlarında elde edildiği görülmektedir ve β-glukanın maya hücre duvarında bulunan majör bileşen olması bu durumun ortaya çıkmasını sağlamıştır. Şekil 5, hem boş maya hücrelerinin (plazmoliz olmuş ve olmamış) hem de üretilen enkapsüllerin taramalı elektron mikroskop görüntülerini göstermektedir. Şekil 5c'de plazmolizin maya hücreleri üzerinde meydana getirdiği deformasyon görünmekte, Şekil 5d'de düzgün yüzeyli maya hücreleri gözlenmektedir. Bununla birlikte Şekil 5a'da plazmolize rağmen enkapsül üretimine bağlı olarak maya hücrelerinin elips formunu koruduğu söylenebilmektedir.



Şekil 4. Mikrokapsüllerin ve maya hücrelerinin FTIR spektrumları.



Şekil 5. Mikrokapsüllerin ve maya hücrelerinin SEM görüntüleri (a: plazmoliz olmuş maya enkapsülleri, b: plazmoliz olmamış maya enkapsülleri, c: plazmoliz olmuş maya hücreleri d: plazmoliz olmamış maya hücreleri).

4. Tartışma ve Sonuç

Enkapsülasyon, aktif bileşiklerin çevresel faktörler karşısında stabilitesini muhafaza etmek amacıyla fazlaca başvurulan önemli bir kaplama tekniğidir. Maya hücreleri sahip oldukları hücresel özellikler sebebiyle aktif bileşiklerin kapsüllemesinde etkili bir şekilde kullanılabilmekte ve çok farklı biyoaktif bileşikler maya hücresi içerisine hapsedilerek muhafaza edilebilmektedir. Ciamponi ve ark. (2012) maya hücrelerinin, çeşitli aktif maddelerin mikrokapsülasyonu için biyouyumlu ve biyolojik olarak bozunabilir materyaller olduğunu belirtmişlerdir. Nelson ve ark. (2006), maya ile kapsüllemenin, bilinen tüm mikrokapsülleme teknolojilerine karşı daha uygun maliyetli olduğunu savunmuşlardır.

Karaman (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, çörek otu yağı maya hücresi ile enkapsüle edilmiş ve maya hücresi için uygulanan plazmoliz işleminin son ürün biyoaktivitesi üzerinde etkili olduğu ve plazmolize olmuş maya hücresi ile üretilen enkapsüllerin daha yüksek timokinon içerdiği ifade edilmiştir. Ancak, plazmolize edilerek kapsülleme yapılan maya hücreleri, plazmoliz olmamış olanlara nazaran daha düşük antiradikal aktivite sergilemiştir. Plazmoliz işlemi maya hücresinin osmoz sebebiyle hücre içi sitoplazmik materyalin atılmasına yol açması sebebiyle, plazmolize hücre daha fazla materyal kapsülleyebilmekte; ancak bu durumda hücre içi materyalin sahip olduğu biyoaktif etki kaybolmaktadır. Hassan (2011) yaş ekmek mayasının oldukça kuvvetli antioksidan ve antiradikal etki gösterdiğini bildirmiş, bu durumun da hücre içi glutasyon miktarı, bazı Maillard reaksiyon ürünleri ve sülfür içeren aminoasitlerden kaynaklandığı ifade edilmiştir (Soomer ve Jamieson, 1996). Kavosi ve ark. (2018) semizotu çekirdeği yağını maya hücresi ile enkapsüle ettikleri bir çalışmada, maya hücresinin plazmoliz işlemi ile hücre içi materyalinin boşaltılması neticesinde daha fazla yağ enkapsüle edilebildiğini, bu bağlamda plazmoliz hücrenin enkapsülasyon etkinliğinin %60.27, plazmoliz olmamış hücrenin ise %52.96 olarak hesaplandığını ifade etmişlerdir. Diğer taraftan Salari ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada plazmoliz işleminin maya hücresi yapısında ve özelliklerinde değişikliklere neden olmasına rağmen, hücrelerde berberin etken maddesinin yükünü arttırmadığını tespit etmişlerdir.

Mevcut çalışmada da kuvvetli bir antioksidan bileşik olan karvakrol, uçucu olması ve bu sebeple çevresel koşullardan hızlıca etkilenmesi sebebiyle maya hücresi içerisinde kapsüllemiş ve üretilen

kapsüllerin biyoaktif, konformasyonel ve yapısal karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Maya hücrelerinde plazmoliz işleminin etkisi de araştırılmış ve karvakrol plazmolize olmuş ve olmamış maya hücreleri ile ayrı ayrı enkapsüle edilmiştir. Plazmolize olmuş maya hücreleri karvakrolü oldukça iyi bir şekilde hapsetmiş olsa da plazmolize olmayan maya hücreleri daha fazla oranda karvakrol tutmuş ve bu sebeple daha yüksek antiradikal aktive sergilemiştir. Plazmoliz birçok çalışmada mayanın ön işlenmesinde kullanılmış ve bu yolla enkapsülasyonda verimlilik artırılmaya çalışılmıştır. Pham-Hoang ve ark. (2013) plazmoliz işleminin enkapsülasyon verimliliği üzerine etkisinin çeşitli olduğunu ancak enkapsülasyon etkinliğinin asıl olarak kapsüllenmiş molekülün hidrofobikliğine bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Shi ve ark. (2007) polar klorojenik asit için iki kat daha yüksek bir enkapsülasyon etkinliği gözlemlerken, Paramera ve ark. (2011), plazmolize hücreler için daha hidrofobik olan kurkumin'in kapsüllenmesinde bir gelişme gözlemlenmemişlerdir.

Kavetsou ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada maya hücreleri içerisinde *Mentha pulegium* esansiyel yağını kapsüllemişler ve böcek zararlısı *Myzus persicae*'ye karşı bir pestisit olarak değerlendirilmesi için yeşil bir yaklaşım sunmuşlardır. Kapsüllemenin uçucu yağın böcek öldürücü aktivitesini 3 gün uzattığını ve ekmek mayasının insan sağlığı üzerinde olumsuz etkisi bulunmadığından biyopestisit formülasyonlarında kullanımının yasal kısıtlamalara uyumlu olacağını bildirmişlerdir. Plavcova ve ark. (2019) maya glukoz partikülleri ile kurkumin aktif bileşiğinin biyolojik etkisinin artırılması üzerine çalışmalar yapmışlar ve elde ettikleri sonuçlar ile kurkumin kompozitlerinin nihayetinde inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılabilirliğini öne sürmüşlerdir. Tüm bu araştırmalar gıda, ziraat ve farmasötik uygulamalarında maya hücreleri ile yapılan düşük stabiliteli hem uçucu yağ hem de fenolik bileşik gibi maddelerin enkapsüllerinin biyoyararlanımını artırmak için kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır. Mevcut çalışma ile de karvakrolün maya hücreleri ile enkapsülasyonu sayesinde gıda, ziraat, ilaç ve tekstil endüstrisi gibi alanlarda yer alan bazı formülasyonlarda kullanılabilir, biyoaktivitesi korunmuş ve diğer enkapsülasyon tekniklerine nazaran daha düşük maliyetli enkapsül üretimi ortaya konmuştur.

Kaynakça

- Aristatile, B., Al-Numair, K. S., Al-Assaf, A. H., & Pugalendi, K. V. (2011). Pharmacological effect of carvacrol on D-galactosamine-induced mitochondrial enzymes and DNA damage by single-cell gel electrophoresis. *Journal of Natural Medicines*, 65(3-4), 568-577.
- Arunasree, K. M. (2010). Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytotherapy Research*, 17(8-9), 581-588.
- Bishop, J. R. P., Nelson, G., & Lamb, J. (1998). Microencapsulation in yeast cells. *Journal of Microencapsulation*, 15(6), 761-773.
- Blagović, B., Mesarić, M., Marić, V., & Rupčić, J. (2005). Characterization of lipid components in the whole cells and plasma membranes of baker's yeast. *Croatica Chemica Acta*, 78(3), 479-484.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Burattini, E., Cavagna, M., Dell'Anna, R., Malvezzi Campeggi, F., Monti, F., & Rossi, F. A. (2008). FTIR microspectroscopy study of autolysis in cells of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Vibrational Spectroscopy*, 47, 139-147.
- Chavan, P. S., & Tupe, S. G. (2014). Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. *Food Control*, 46, 115-120.
- Chow, C., Palecet, P. (2004) Enzyme encapsulation in permeabilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnology Progress*, 20, 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*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95, 1445-1456
- Czerniak, A., Kubiak, P., Białas, 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.
- Galichet, A., Sockalingum, G.D., Belarbi, A., & Manfait M. (2001). FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. *FEMS Microbiological Letters*, 197(2), 179-186.

- Gilling, D. H., Kitajima, M., Torrey, J. R., & Bright, K. R. (2014). Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. *Journal of Applied Microbiology*, *116*(5), 1149-1163.
- Guimarães, A. G., Oliveira, G. F., Melo, M. S., Cavalcanti, S. C., Antonioli, A. R., Bonjardim, L. R., & Araújo, A. A. (2010). Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *107*(6), 949-957.
- Hassan, H.M. (2011). Antioxidant and immunostimulating activities of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) autolysates. *World Applied Science Journal*, *15*, 1110-1119.
- Husnu, K., Başer, C. & Demirci, F. (2007). *Chemistry of essential oils. In Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, ed. R. G. Berger. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- 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
- Karaman, K., & Sağdıç, O. (2019). Investigation of The effect of carvacrol addition on the change of some physicochemical and bioactive properties of apple juice contaminated with *Zygosaccharomyces bailii*. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, *7*(11), 1882-1893.
- Kavetsou, E., Koutsoukos, S., Daferera, D., Polissiou, M. G., Karagiannis, D., Perdakis, D. C., & Detsi, A. (2019). Encapsulation of *Mentha pulegium* essential oil in yeast cell microcarriers: an approach to environmentally friendly pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(17), 4746-4753.
- 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 the Science of Food and Agriculture*, *98*, 2490–2497.
- Mamadalieva, N. Z., D. K. Akramov, E. Ovidi, A. Tiezzi, L. Nahar, S. S. Azimova, & S. D. Sarker. (2017). Aromatic medicinal plants of the lamiaceae family from Uzbekistan: Ethnopharmacology, essential oils composition, and biological activities. *Medicines (Basel)* *4* (1), 8.
- Milos, M., & Makota, D. (2012). Investigation of antioxidant synergisms and antagonisms among thymol, carvacrol, thymoquinone and p-cymene in a model system using the Briggs–Rauscher oscillating reaction. *Food Chemistry*, *131*(1), 296-299.
- Moreno, C.S., Larrauri, J.A., & Calixto, F.S. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *76*, 270- 276.
- Nelson, G., Duckham, S.C., & Crothers, M.E.D. (2006). *Microencapsulation in Yeast Cells and Applications in Drug Delivery*. In: Sonkè S (ed) *Polymeric drug delivery I: particulate drug carriers*, vol 923. American Chemical Society, pp 268–281.
- Nieto, G. (2017). Biological activities of three essential oils of the lamiaceae family. *Medicines (Basel)* *4* (3), E63.
- 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 Agriculture and Food Chemistry*, *53*, 7532-7543.
- Ozkan, A., & Erdogan, A. (2012). A comparative study of the antioxidant/prooxidant effects of carvacrol and thymol at various concentrations on membrane and DNA of parental and drug resistant H1299 cells. *Natural Product Communications*, *7*(12),
- Paramera, E.I., Konteles, S.J., & Karathanos, V.T. (2011). Microencapsulation of curcumin in cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, *125*, 892–902.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. A. (2008). *Introduction to Spectroscopy*. Cengage Learning.
- Plavcová, Z., Šalamúnová, P., Saloň, I., Štěpánek, F., Hanuš, J., & Hošek, J. (2019). Curcumin encapsulation in yeast glucan particles promotes its anti-inflammatory potential in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*, *568*, 118532.
- Salari, R., Bazzaz, B. S. F., Rajabi, O., & Khashyarmansh, Z. (2013). New aspects of *Saccharomyces cerevisiae* as a novel carrier for berberine. *DARU Journal of Pharmaceutical Science*, *21*(1), 73.

- Sánchez, G., & Aznar, R. (2015). Evaluation of natural compounds of plant origin for inactivation of enteric viruses. *Food and Environmental Virology*, 7(2), 183-187.
- Sangwan, N. S., A. H. A. Farooqi, F. Shabih, & R.S. Sangwan. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation*, 34 (1), 3–21.
- 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, 1060–1067.
- Shi, G.R., Rao, L.Q., Yu, H.Z., Xiang, H., Yan, H., & Ji, R. (2008). Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. *International Journal of Pharmaceutics*, 349(1–2), 83–93.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Solórzano-Santos, F., & Miranda-Novales, M.G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 136-141.
- Soomer, R., & Jamieson, D.J. (1996). *Yeast autolysate*. The 9th International Symposium on Yeast, Sydney.
- Zuzarte, M., & Salgueiro, L. (2015). *Essential oils chemistry*. In *Bioactive essential oils and cancer*, ed. D. P. de Sousa. Cham: Springer International Publishing.
- Wettasinghe, M., Bolling, B., Pihak, L., Xiao, H., & Parkin, K. (2002). Phase II enzyme-inducing and antioxidant activities of beet root (*Beta vulgaris* L.) extracts from phenotypes of different pigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6704-6709.