

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**YAŞ ÇAY VE SİYAH ÇAY ATIKLARINDAN BAZI EKSTRAKSİYON
YÖNTEMLERİYLE KAFEİN VE KATEŞİNLERİN AYRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Ezgi DEMİR

OCAK 2015

TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YAŞ ÇAY VE SİYAH ÇAY ATIKLARINDAN BAZI EKSTRAKSİYON
YÖNTEMLERİYLE KAFEİN VE KATEŞİNLERİN AYRILMASI

Ezgi DEMİR

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nce
“DOKTOR (KİMYA)”
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 12.01.2015
Tezin Savunma Tarihi : 30.01.2015

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Münevver SÖKMEN

Trabzon 2015

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalında

Ezgi DEMİR Tarafından Hazırlanan

**YAŞ ÇAY VE SİYAH ÇAY ATIKLARINDAN BAZI EKSTRAKSİYON
YÖNTEMLERİYLE KAFEİN VE KATEŞİNLERİN AYRILMASI**

**başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 13/01/2015 gün ve 1585 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınav sonunda**

DOKTORA TEZİ

olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Hasan Basri ŞENTÜRK

Üye : Prof. Dr. Münevver SÖKMEN

Üye : Prof. Dr. Nuri İhsan KALYONCU

Üye : Prof. Dr. Durişehvar ÜNAL

Üye : Prof. Dr. Ümmühan OCAK

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Yaş Çay ve Siyah Çay Atıklarından Bazı Ekstraksiyon Yöntemleriyle Kafein ve Kateşinlerin Ayrılması” adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Anabilim Dalı’nda “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Doktora boyunca burslu olarak çalıştığım 00932.STZ.2011-1 SAN-TEZ projesine ve çay fabrikası ortakları Rize Ticaret Borsası Başkanı Sn. Mehmet ERDOĞAN (ORÇAY), Sn. Ali BAYRAMOĞLU (FİLİZ ÇAY), Sürmene Belediye Başkanı Sn. Rahmi ÜSTÜN (ŞÖLEN ÇAY) ve SÜRÇAYSAN Genel Müdür Yard. Sn. Murat ÜSTÜN’e (ŞÖLEN ÇAY) teşekkürü bir borç bilirim. Projenin fikir babası ÇAYKUR Eski Genel Müdürü Merhum Tuncer ERGÜVEN’e saygılarımı sunarım. Proje işlerinde yardımlarını esirgemeyen Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı uzman yardımcısı Sn. Haydar Ali BAŞ’a teşekkürlerimi sunarım.

Danışman hocam, manevi annem, dostum, sırdaşım, birlikte güldüğüm, ağladığım, birlikte ölümlerden döndüğüm, elimi hiç bırakmayan, sonsuz güvendiğim yegâne insan Prof Dr. Münevver SÖKMEN’e sonsuz saygı ve sevgimi sunuyorum. Manevi kardeşlerim Serhat BAYRAK, Cansu ALBAY, Gönül SERDAR, Melek KOÇ, İlknur ALTIN, Hafez LAGHARI, Abdurrahman ATALAY, Ecem İMAMOĞLU sizi iyi ki tanıdım.

Çek Cumhuriyeti, University of South Bohemia in Ceske Budejovice’de danışmanım olan Prof. Dr. Frantisek Vacha’ya sıkılmadan verdiği sonsuz bilgisi ve tüm yardımları için teşekkür ederim. Tezim boyunca hem maddi hem manevi hiçbir şeyimi eksik etmeyen Temel Tıp Bilimleri Farmakoloji Bölümü ailesi başta Prof. Dr. Nuri İhsan KALYONCU olmak üzere Prof. Dr. Ersin YARIŞ, Doç. Dr. Mine DUMAN, Uzman Dr. İlknur ERKÖSEOĞLU, Arş. Gör. Duygun ALTINTAŞ, Gamze KAPUCU ve Temel ŞAHİN’e şükranlarımı sunarım.

Canım annem Nuran DEMİR ve canım babam Şener DEMİR. Size ne desem varlığınızın yanında az kalır. İyi ki sizin kızınızım. Cankardeşim Seda DEMİR bana ablalığı yaşatan, hayatımdaki en önemli varlığım, seni seviyorum.

Ezgi DEMİR
Trabzon 2015

TEZ BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Yaş ay ve Siyah ay Atıklarından Bazı Ekstraksiyon Yöntemleriyle Kafein ve Kateşinlerin Ayrılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Münevver SÖKMEN’in sorumluluğunda tamamladığımı, örnekleri kendim topladığımı, deneyleri ve analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.
09/01/2015

Ezgi DEMİR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	IX
SUMMARY	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XV
KISALTMALAR DİZİNİ	XVI
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. GİRİŞ	1
1.1.1. Fenolik Bileşikler.....	1
1.1.2. Fenolik Bileşiklerin Kimyasal Yapıları ve Sınıflandırılması.....	2
1.1.3. Falavan-3-ollar.....	4
1.2. Çay ve Çay Çeşitleri	5
1.2.1. Çayın Tarihçesi	5
1.2.2. Çay Bitkisi	6
1.2.3. Çay Çeşitleri.....	8
1.2.3.1. Yeşil Çay.....	8
1.2.3.2. Oolong Çay	9
1.2.3.3. Siyah Çay	10
1.3. Çayın İşlenmesi.....	11
1.3.1. Soldurma	11
1.3.2. Kıvrırma	12
1.3.3. Fermentasyon	12
1.3.4. Kurutma	13
1.4. İşlem Görmüş Çaydan Geriye Kalan Değerler: Çay Atığı ve Kafein Tozu	13
1.5. Dünya ve Türkiye’de Çay Üretimi	15
1.6. Çayın Bileşimi ve İçerdiği Kimyasallar.....	16
1.6.1. Çayın Bileşenleri.....	16

1.6.2.	Yaş Çay Yaprağının Fenolik Madde Bileşimini Etkileyen Faktörler	23
1.6.2.1.	Hasat Sonrası İşlem.....	24
1.6.2.2.	Bölgesel Farklılık.....	24
1.6.2.3.	Mevsimsel Farklılık	24
1.6.2.4.	Hasat Yöntemi	25
1.6.2.5.	Hasat Sezonu.....	25
1.7.	Çay Kimyasallarının Etkileri ve Kullanım Alanları	25
1.7.1.	Sağlık Üzerine Etkileri.....	25
1.7.2.	Gıdalarda Kullanımı.....	27
1.7.3.	Dünyadaki Pazarı	28
1.8.	Çay Fenolik Bileşiklerinin Ekstraksiyonunda Kullanılan Yöntemler	30
1.8.1.	Çözücü Ekstraksiyonu	30
1.8.2.	Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu	31
1.8.2.1.	Süperkritik Akışkanların Tanımı	32
1.8.2.2.	Süperkritik Akışkanların Uygulama Alanları	35
1.9.	Çay Fenoliklerinin Analizinde Kullanılan Yöntemler	36
1.9.1.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	37
1.9.2.	İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)	38
1.9.3.	Kolon Kromatografisi	39
1.10.	Çalışmanın Amacı ve Literatür Özeti	40
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	45
2.1.	Kullanılan Kimyasallar	45
2.2.	Kullanılan Cihazlar	45
2.3.	Deneysel Çalışmalar	46
2.3.1.	Örneklerin Toplanması ve Analize Hazırlanması	46
2.3.2.	Kullanılan Ekstraksiyon Yöntemleri.....	48
2.3.2.1.	Sıcak Su Ekstraksiyonu.....	48
2.3.2.2.	İki Basamaklı Sıcak Su Ekstraksiyonu	49
2.3.2.3.	Yüksek Sıcaklık Ön İşlem Sıcak Su Ekstraksiyonu	49
2.3.2.4.	Sitrik Asit Ekstraksiyonu	49
2.3.2.5.	Etanol Ekstraksiyonu	50
2.3.3.	Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SFE).....	50
2.3.4.	İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) Çalışmaları.....	51

2.3.5.	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HP-TLC) Çalışmaları	52
2.3.6.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Çalışmaları	53
2.3.7.	Kolon Kromatografisi	54
3.	BULGULAR.....	55
3.1.	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon Yönteminin Seçilmesi.....	55
3.2.	HPLC Analizleri İçin Yöntem Optimizasyonu.....	56
3.3.	2012 Yılı Örneklemesi Bulguları.....	58
3.3.1.	Yaş Çay Örneklerinin Kateşin ve Kafein Verimleri	58
3.3.2.	Siyah Çay Atığının (SÇA) Kateşin ve Kafein Verimleri.....	60
3.3.3.	Kafein Tozunun (SÇK) Kateşin ve Kafein Verimleri.....	61
3.3.4.	TLC ve HP-TLC Analizleri	62
3.3.5.	HPLC Analizleri	64
3.3.6.	Çay Örneklerinin Kateşin İçerikleri.....	69
3.3.7.	2012 Yılı Örneklemesi Genel Değerlendirme	72
3.4.	2013 Yılı Örneklemesi Bulguları.....	75
3.4.1.	Yaş Çay Örneklerinin Kateşin ve Kafein Verimleri	75
3.4.2.	Siyah Çay Atığının (SÇA) Kateşin ve Kafein Verimleri.....	77
3.4.3.	Kafein Tozunun (SÇK) Kateşin ve Kafein Verimleri.....	78
3.4.4.	Çay Örneklerinin HPLC Analizleri ve Kateşin İçerikleri.....	79
3.4.5.	2013 Yılı Örneklemesi Genel Değerlendirme.	81
3.5.	2014 Yılı Örneklemesi Bulguları.....	83
3.5.1.	Yaş Çay Örneklerinin (YÇK) Kateşin ve Kafein Verimleri	83
3.5.2.	Siyah Çay Atığının (SÇA) Kateşin ve Kafein Verimleri.....	84
3.5.3.	Kafein Tozunun (SÇK) Kateşin ve Kafein Verimleri.....	85
3.5.4.	Çay Örneklerinin HPLC Analizleri ve Kateşin İçerikleri.....	86
3.5.5.	2014 Yılı Örneklemesi Genel Değerlendirme	88
3.6.	SFE Yönteminin Optimizasyonu	90
3.6.1.	Modifiyersiz Yöntem Bulguları	90
3.6.2.	Modifiyerli Yöntem Bulguları	93
3.7.	2013 Yılı Çay Örneklerinin SFE Analizleri.....	95
3.7.1.	Yaş Çay Örneklerinin (YÇK) Kateşin ve Kafein Verimleri	96
3.7.2.	Siyah Çay Atığının (SÇA) Kateşin ve Kafein Verimleri.....	97
3.7.3.	Kafein Tozunun (SÇK) Kateşin ve Kafein Verimleri.....	98

3.7.4.	Çay Örneklerinin HPLC Analizleri ve Kateşin İçerikleri.....	98
3.7.5.	2013 Yılı SFE Genel Değerlendirme	101
3.8.	2014 Yılı Çay Örneklerinin SFE Analizleri.....	103
3.8.1.	Yaş Çay Örneklerinin (YÇK) Kateşin ve Kafein Verimleri	103
3.8.2.	Siyah Çay Atığının (SÇA) Kateşin ve Kafein Verimleri.....	104
3.8.3.	Kafein Tozunun (SÇK) Kateşin ve Kafein Verimleri.....	105
3.8.4.	Çay Örneklerinin HPLC Analizleri ve Kateşin İçerikleri.....	106
3.8.5.	2014 Yılı SFE Genel Değerlendirme	108
3.9.	Kateşinlerin İzolasyon Bulguları	110
4.	TARTIŞMA	113
5.	SONUÇLAR	125
6.	KAYNAKLAR	127

ÖZGEÇMİŞ

Doktora Tezi

ÖZET

YAŞ ÇAY VE SİYAH ÇAY ATIKLARINDAN BAZI EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİYLE
KAFEİN VE KATEŞİNLERİN AYRILMASI

Ezgi DEMİR

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Münevver SÖKMEN

2015, 141 Sayfa

Bu çalışma kapsamında 2012-2014 yıllarında farklı çay örneklerinin (yaş çay, siyah çay atığı ve kafein tozu), farklı hasat dönemlerinde (I., II. ve III. sürüm) içerdikleri kafein ve kateşin miktarları, ekstraksiyon ve analiz yöntemleri incelendi. Yaş çay örnekleri yaş, kuru ve dondurulmuş olarak işlenerek örnek doğasının etkileri de araştırıldı. Literatürde varolan farklı sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemleri 2012 yılı örneklerine uygulanarak çay örneklerinden kafein ve kateşinlerin ekstraksiyonu için en verimli yöntemin sıcak su ekstraksiyonu (80 °C'de 40 dk.) olduğu belirlendi. 2012-2014 yıllarında yapılan örneklemelerde standart bir kateşin ve kafein içeriğinin olmadığı, yıllara ve yaşanan mevsim şartlarına göre önemli farklılıklar gösterdiği belirlendi. Yaş çay örnekleri literatürle uyumlu olarak atıklardan daha yüksek miktarda kateşin içermektedir. Ancak siyah çay atığı ve kafein tozunun da azımsanmayacak miktarlarda kateşin içerdiği bulundu. Siyah çay atığı ve kafein tozunun kafein içeriği yeşil çaydan ve literatür verilerinden yaklaşık üç kat fazladır. Yaş çay örneklerinde 2012 yılında yaş işlenen örneklerden yüksek kateşin verimleri elde edilirken 2013 ve 2014 yıllarında kuru örneklerden yüksek kateşin verimi elde edildi. HPLC analizleri göstermiştir ki bazı durumlarda daha düşük ekstrakt verimi elde edilmesine karşın ekstraktın kateşin içeriği çok daha yüksek olabilmektedir. Kurutulmuş yaş çay ve çay atıklarından kafein ve kateşinlerin ardışık olarak ekstraksiyonu için yeni bir süperkritik ekstraksiyon (SFE) yöntemi geliştirildi. Herhangi bir organik çözücü kullanılmaksızın çay örneklerinden 250 bar, 60 °C ve 3 saatlik CO₂-SFE ile kafeinin tamamı ekstre edildi. Aynı şartlar altında modifiyer olarak 0,5 mL/dk etanolün kullanılmasıyla örnekten kateşinler de başarılı bir şekilde ayrıldı.

Anahtar Kelimeler: Yaş Çay, Çay Atığı, Kateşin, Kafein, SFE

PhD. Thesis

SUMMARY

ISOLATION OF CAFFEINE AND CATECHINS FROM FRESH TEA AND BLACK TEA
WASTE WITH DIFFERENT EXTRACTION METHODS

Ezgi DEMİR

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Programme
Supervisor: Prof. Dr. Münevver SÖKMEN
2015, 141 Pages

In this study, caffeine and catechin amounts of different tea samples (fresh tea, black tea waste and caffeine dust) in three different harvesting periods (I., II. and III. collection) and their extraction and analysis methods in 2012-2014 years have been investigated. The nature of samples were studied processing the green tea samples as fresh, dry or frozen. Different liquid-liquid extraction methods given literature were employed for 2012 samples for selecting the most efficient extraction method to isolate caffeine and catechins. The hot water extraction (at 80 °C for 40 min.) method providing the highest extract yields was used for all samples during experiments. The amount of caffeine and catechins showed variations related to collection time and climate. Additionally, there was no clear tendency between the collection periods. In accordance with the literature, green tea samples contained more catechin than waste samples. But black tea waste and caffeine dust have considerable amount of catechin. Caffeine amount of black tea waste and caffeine dust were nearly three times higher than green tea samples and literature data. In 2012 sampling, freshly processed fresh tea samples provided higher catechin yields but dry processed fresh tea samples gave higher extract yields in 2013 and 2014 sampling. In the some cases, HPLC analyses showed that catechin content of an extract might be higher although its yield were found lower. A new supercritical fluid extraction (SFE) method was developed for sequential extraction of caffeine and catechins from dried fresh tea and tea wastes. All caffeine was extracted from tea samples at 250 bar, 60 °C and 3 hours with organic solvent free CO₂-SFE. Catechins were also successfully separated from the sample using 0.5 mL/min. ethanol as modifier under the same conditions.

Key Words: Fresh Tea, Tea Waste, Catechin, Caffeine, SFE

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Flavonoid türleri için temsili bileşikler.....	3
Şekil 1.2. Kateşinlerin yapısı	5
Şekil 1.3. Yeşil çay üretimi.....	9
Şekil 1.4. Oolong çay üretimi	9
Şekil 1.5. Çay atığı görüntüleri	13
Şekil 1.6. Kateşinlerin bitkilerdeki biyosentez yolu	17
Şekil 1.7. Çay teaflavinlerinin kimyasal yapıları.....	21
Şekil 1.8. Ezilmiş çiğ etin biberiye ve yeşil çay ekstraktı ilavesinden sonra kontrol grubuyla karşılaştırılması.....	28
Şekil 1.9. CO ₂ için basınç-sıcaklık diyagramı	33
Şekil 1.10. İki faz bölgesindeki CO ₂ 'in artan basınç ve sıcaklıkla süperkritik hale geçişi	33
Şekil 1.11. SFE akış diyagramı.....	36
Şekil 1.12. HPLC cihazının genel görüntüsü.....	37
Şekil 2.1. HP-TLC cihazı.....	52
Şekil 2.2. HP-TLC tarayıcı sistemi	53
Şekil 3.1. Farklı ekstraksiyon metodlarına göre kafein ve kateşin ekstrakt verimleri	55
Şekil 3.2. Kafein ve kateşin ekstraktlarının HPLC-B yöntemiyle elde edilen kromatogramı.....	56
Şekil 3.3. GA, Kafein, EGC, C, EC ve EGCG standartlarının DAD spektrumları	57
Şekil 3.4. 2012 Yılı I., II. ve III. sürüm yaş, kurutulmuş, dondurulmuş yaş çay örneklerinin kateşin verimleri.....	58
Şekil 3.5. 2012 Yılı I., II. ve III. sürüm yaş, kurutulmuş, dondurulmuş yaş çay örneklerinin kafein verimleri	59
Şekil 3.6. 2012 Yılı I., II. ve III. sürüm siyah çay atığının kateşin ve kafein verimleri ...	60
Şekil 3.7. 2012 Yılı I., II. ve III. sürüm kafein tozunun kateşin ve kafein verimleri.....	61
Şekil 3.8. Yaş çay (YÇY, YÇK, YÇD), çay atığı ve kafein tozu kateşinlerinin TLC görüntüleri.....	62
Şekil 3.9. Standartların (Kafein, C, EC, EGC, EGCG) densitometrik tarama kromatogramları	63
Şekil 3.10. 2012 Yılı yaş çay örneklerinin densitometrik tarama kromatogramları	64

Şekil 3.11. 2012 Yılı I. sürüm yaş, kurutulmuş, dondurulmuş yaş çay örneklerinin kateşin ekstraktlarının HPLC-A yöntemi ile elde edilen kromatogramları	65
Şekil 3.12. 2012 Yılı II. sürüm yaş, kurutulmuş, dondurulmuş yaş çay örneklerinin kateşin ekstraktlarının HPLC-A yöntemi ile elde edilen kromatogramları	66
Şekil 3.13. 2012 Yılı III. sürüm yaş, kurutulmuş, dondurulmuş yaş çay örneklerinin kateşin ekstraktlarının HPLC-A yöntemi ile elde edilen kromatogramları	67
Şekil 3.14. 2012 Yılı I.,II. ve III. sürüm siyah çay atığının kateşin ekstraktlarının HPLC-B yöntemi ile elde edilen kromatogramları	68
Şekil 3.15. 2012 Yılı I.,II. ve III. sürüm kafein tozunun kateşin ekstraktlarının HPLC-B yöntemi ile elde edilen kromatogramları	69
Şekil 3.16. 2012 Yılı I., II. ve III. sürüm yaş çay örneklerinin kateşin içerikleri	70
Şekil 3.17. 2012 Yılı I., II. ve III. sürüm siyah çay atığının kateşin içerikleri	71
Şekil 3.18. 2012 Yılı I., II. ve III. sürüm kafein tozunun kateşin içerikleri.....	72
Şekil 3.19. 2013 Yılı I., II. ve III. sürüm yaş, kuru, dondurulmuş yaş çay örneklerinin kateşin verimleri	75
Şekil 3.20. 2013 Yılı I., II. ve III. sürüm yaş, kuru, dondurulmuş yaş çay örneklerinin kafein verimleri.....	76
Şekil 3.21. 2013 Yılı I., II. ve III. sürüm siyah çay atığının kateşin ve kafein verimleri ...	77
Şekil 3.22. 2013 Yılı I., II. ve III. sürüm kafein tozunun kateşin ve kafein verimleri.....	78
Şekil 3.23. 2013 Yılı I., II. ve III. sürüm yaş çay örneklerinin kateşin içerikleri.....	80
Şekil 3.24. 2013 Yılı I., II. ve III. sürüm siyah çay atığının kateşin içerikleri	81
Şekil 3.25. 2013 Yılı I., II. ve III. sürüm kafein tozunun kateşin içerikleri	81
Şekil 3.26. 2014 Yılı I., II. ve III. sürüm yaş, kuru, dondurulmuş yaş çay örneklerinin kateşin ve kafein verimleri.....	84
Şekil 3.27. 2014 Yılı I., II. ve III. sürüm siyah çay atığının kateşin ve kafein verimleri....	85
Şekil 3.28. 2014 Yılı I., II. ve III. sürüm kafein tozunun kateşin ve kafein verimleri	86
Şekil 3.29. 2014 Yılı I., II. ve III. sürüm kurutulmuş yaş çay örneklerinin kateşin içerikleri.....	87
Şekil 3.30. 2014 Yılı I., II. ve III. sürüm siyah çay atığının kateşin içerikleri	87
Şekil 3.31. 2014 Yılı I., II. ve III. sürüm kafein tozunun kateşin içerikleri	88
Şekil 3.32. 100 Bar basınçta, farklı sıcaklıklarda ve sürelerde elde edilen kafein yüzdeleri	91
Şekil 3.33. 200 Bar basınçta, farklı sıcaklıklarda ve sürelerde elde edilen kafein yüzdeleri	91
Şekil 3.34. 250 Bar basınçta, farklı sıcaklıklarda ve sürelerde elde edilen kafein yüzdeleri	92

Şekil 3.35. 300 Bar basınçta, farklı sıcaklıklarda ve sürelerde elde edilen kafein yüzdeleri	92
Şekil 3.36. 100 Bar basınçta farklı sıcaklık ve modifiyer oranlarında kateşin yüzdeleri	93
Şekil 3.37. 200 Bar basınçta farklı sıcaklık ve modifiyer oranlarında kateşin yüzdeleri	94
Şekil 3.38. 250 Bar basınçta farklı sıcaklık ve modifiyer oranlarında kateşin yüzdeleri	94
Şekil 3.39. 300 Bar basınçta farklı sıcaklık ve modifiyer oranlarında kateşin yüzdeleri	95
Şekil 3.40. 2013 Yılı yaş çay örneklerinin SFE ile elde edilen kateşin ve kafein verimleri.....	96
Şekil 3.41. 2013 Yılı siyah çay atığının SFE ile elde edilen kateşin ve kafein verimleri.....	97
Şekil 3.42. 2013 Yılı kafein tozunun SFE ile elde edilen kateşin ve kafein verimleri.....	98
Şekil 3.43. 2013 Yılı I., II. ve III. sürüm kurutulmuş yaş çay örneklerinin SFE ile elde edilen ekstraktlarının HPLC-B metodu ile elde edilen kromatogramları	99
Şekil 3.44. 2013 Yılı I., II. ve III. sürüm çay örneklerinin SFE ekstraktlarının kateşin içerikleri.....	100
Şekil 3.45. 2014 Yılı yaş çay örneklerinin SFE ile elde edilen kateşin ve kafein verimleri.....	103
Şekil 3.46. 2014 Yılı siyah çay atığının SFE ile elde edilen kateşin ve kafein verimleri.....	104
Şekil 3.47. 2014 Yılı kafein tozunun SFE ile elde edilen kateşin ve kafein verimleri.....	105
Şekil 3.48. 2014 Yılı I., II. ve III. sürüm yaş çay örneklerinin SFE ile elde edilen ekstraktlarının HPLC-B metodu ile elde edilen kromatogramları.....	106
Şekil 3.49. 2014 Yılı I., II. ve III. sürüm çay örneklerinin SFE ile elde edilen ekstraktlarının HPLC içerikleri.....	107
Şekil 3.50. Artan etanol yüzdelerinde ayrılan EGCG izolasyonu HPLC kromatogramları	111
Şekil 4.1. 2012 Yılı çay örneklerinin kateşin verimlerinin karşılaştırılması	114
Şekil 4.2. 2012 Yılı çay örneklerinin kafein verimlerinin karşılaştırılması.....	115
Şekil 4.3. 2013 Yılı çay örneklerinin kateşin verimlerinin karşılaştırılması	116
Şekil 4.4. 2013 Yılı çay örneklerinin kafein verimlerinin karşılaştırılması.....	117
Şekil 4.5. 2014 Yılı çay örneklerinin kateşin verimlerinin karşılaştırılması	118
Şekil 4.6. 2014 Yılı çay örneklerinin kafein verimlerinin karşılaştırılması.....	118

Şekil 4.7.	2013 Yılı çay örneklerinin SFE ile elde edilen kateşin verimlerinin karşılaştırılması.....	121
Şekil 4.8.	2013 Yılı çay örneklerinin SFE ile elde edilen kafein verimlerinin karşılaştırılması.....	121
Şekil 4.9.	2014 Yılı çay örneklerinin SFE ile elde edilen kateşin verimlerinin karşılaştırılması.....	122
Şekil 4.10.	2014 Yılı çay örneklerinin SFE ile elde edilen kafein verimlerinin karşılaştırılması.....	123
Şekil 4.11.	2013 Yılı YÇK örnekleri için SFE ve sıcak su ekstraksiyonu verimlerinin karşılaştırılması.....	123
Şekil 4.12.	2014 Yılı YÇK örnekleri için SFE ve sıcak su ekstraksiyonu verimlerinin karşılaştırılması.....	124

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1.1. Bazı fenolik asitlerin yapısal tipleri	2
Tablo 1.2. Çay atıklarının kimyasal ve elementel analiz sonuçları	14
Tablo 1.3. 2014 Yılı ülkelerin çaylık alanları ve üretim miktarları	15
Tablo 1.4. Siyah çayda bulunan kimyasallar	19
Tablo 1.5. Çayın aromasından sorumlu bileşikler	20
Tablo 1.6. Bazı ticari ürünler ve fiyatları.....	29
Tablo 1.7. Süperkritik akışkan özellik gösteren maddeler.....	32
Tablo 1.8. Yoğunluk, viskozite ve difüzyon değerlerinin değişimi.....	34
Tablo 2.1. Kullanılan kimyasallar, kullanım amaçları ve markaları.....	45
Tablo 2.2. Kullanılan cihazlar ve markaları.....	46
Tablo 3.1. Optimize edilen HPLC yönteminin parametreleri.....	57
Tablo 3.2. 2012 Yılı yaş çay örneklerinin ekstrakt miktarına göre kateşin yüzdeleri	73
Tablo 3.3. 2012 Yılı siyah çay atığının ekstrakt miktarına göre kateşin yüzdeleri.....	74
Tablo 3.4. 2012 Yılı kafein tozunun ekstrakt miktarına göre kateşin yüzdeleri.....	74
Tablo 3.5. 2013 Yılı yaş çay örneklerinin ekstrakt miktarına göre kateşin yüzdeleri	82
Tablo 3.6. 2013 Yılı siyah çay atığının ekstrakt miktarına göre kateşin yüzdeleri.....	82
Tablo 3.7. 2013 Yılı kafein tozunun ekstrakt miktarına göre kateşin yüzdeleri.....	83
Tablo 3.8. 2014 Yılı yaş çay örneklerinin ekstrakt miktarına göre kateşin yüzdeleri	88
Tablo 3.9. 2014 Yılı siyah çay atığının ekstrakt miktarına göre kateşin yüzdeleri.....	89
Tablo 3.10. 2014 Yılı kafein tozunun ekstrakt miktarına göre kateşin yüzdeleri.....	89
Tablo 3.11. 2013 Yılı kurutulmuş yaş çay örneklerinin SFE ile elde edilen kateşin yüzdeleri	101
Tablo 3.12. 2013 Yılı siyah çay atığının SFE ile elde edilen kateşin yüzdeleri	102
Tablo 3.13. 2013 Yılı kafein tozunun SFE ile elde edilen kateşin yüzdeleri.....	102
Tablo 3.14. 2014 Yılı kurutulmuş yaş çay örneklerinin SFE ile elde edilen kateşin yüzdeleri	108
Tablo 3.15. 2014 Yılı siyah çay atığının SFE ile elde edilen kateşin yüzdeleri	109
Tablo 3.16. 2014 Yılı kafein tozunun SFE ile elde edilen kateşin yüzdeleri.....	109
Tablo 3.17. Kolon izolasyon işlemi verileri.....	112

KISALTMALAR DİZİNİ

BHA	: Butillenmiş Hidroksianizol
BHT	: Butillenmiş Hidroksitoluen
BS	: Belirlenebilme sınırı (LOD)
BSS	: Bağlı standart sapma
C	: Kateşin
C18	: Oktadesil
CG	: Kateşin Gallat
CO ₂	: Karbondioksit
CoA	: Koenzim-A
CTC	: Cut-Tear-Curl
DAD	: Diyot Serili Dedektör
DMF	: N,N-Dimetilformamid
DPPH	: 2,2-difenil 1, pikrilhidrazil
EC	: Epikateşin
ECG	: Epikateşin gallat
EGC	: Epigallo kateşin
EGCG	: Epigallo kateşin gallat
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	: Amerika Gıda ve İlaç İdaresi
GA	: Gallik Asit
GC	: Gallo kateşin
GRAS	: Güvenli Kabul Edilen Maddeler
GTE	: Yeşil Çay Ekstraktı
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HP-TLC	: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
KİK	: Kamu İhale Kanunu
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
MPa	: Mega Paskal
MRSA	: Bakteri
ÖS	: Ölçülebilme sınırı (LOQ)

PA	: Poliamid
POD	: Peroksidaz
PPO	: Polifenol oksidaz
RP-LC	: Ters Faz Sıvı Kromatografisi
SAN-TEZ	: Sanayi Bakanlığı Projesi
SÇA	: Siyah Çay Atığı
SÇK	: Siyah Çay Kafein Tozu
SFE	: Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu
TBHQ	: Tersiyerbutilhidrokinon
TF	: Teaflavin
TF-3,3'-DG	: Teaflavin-3,3'-Digallat
TF-3'-G	: Teaflavin-3'-Gallat
TF-3-G	: Teaflavin-3-Gallat
TF-f	: Basit Teaflavin
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
TR	: Tearubigin
UV	: Ultraviyole
YÇD	: Yaş Çay Dondurulmuş
YÇK	: Yaş Çay Kuru
YÇY	: Yaş Çay Yaş

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Doğal bileşiklerin bir kısmı bitkiler tarafından ikincil metabolizma ürünleri olarak sentezlenen moleküller olup, sinyaleci olarak veya mikroorganizma, insektisit, herbisit ve serbest radikallere karşı koruyucu olarak rol oynarlar. Bu nedenle karbohidratlar, proteinler ve yağların sentezinden sonra bunlar "ikincil bitki ürünleri" veya "fitokimyasallar" diye adlandırılırlar. Bitkiler sınırsız aromatik ve alifatik madde sentezleyebilme kabiliyetine sahip olup bunların çoğu fenolik bileşikler veya bunların oksijen ile substitüye olmuş halleridir (Cordell vd., 2007).

1.1.1. Fenolik Bileşikler

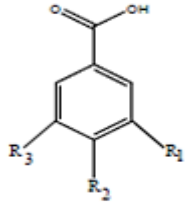
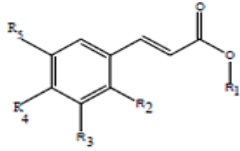
Fenolik bileşikler altı üyeli aromatik halkaya (benzen) direkt bağlı hidroksil grubu (-OH) içeren aromatik bileşiklerdir. Fenoller pek çok bakımdan karbon zincirine bağlı hidroksil grubu içeren alifatik yapıların alkollerine benzerler ancak aromatik halkanın varlığından da etkilenirler. Aromatik halkaya bağlı fenolik hidroksillerin hidrojeninin kararsız olması ve bu yüzden hidroksil grubundan bir hidrojen kaybetmeye meyilli olmalarından dolayı zayıf asidiktirler. Fenolik yapıdan hidrojenin kopmasıyla oluşan fenolat anyonunun ($C_6H_5O^-$) sudaki çözünürlüğü hayli yüksektir (Vermerris ve Nicholson, 2006). Fenolik bileşikler bitkilerin temel bileşenlerindedir; bitkilerin ve onlardan türetilen ürünlerinin besinsel ve organoleptik özelliklerinde önemli rol oynarlar (Fabre vd., 2001; Borbalán vd., 2003; Fang vd., 2007). Bu bileşiklerin bazıları terpenoidler gibi bitkiye koku ve tat verirken bazıları kinonlar ve tanenler gibi bitki pigmentlerini oluştururlar. Pek çok bileşik, bitkinin tadından sorumlu olup bunlardan bazıları gıda ve bazıları ise tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır.

1.1.2. Fenolik Bileşiklerin Kimyasal Yapıları ve Sınıflandırılması

Fenolik bileşikler veya polifenoller bitkilerde en fazla bulunan yapılardan olup bitki aleminde 6000'den daha fazla fenolik yapının varlığı bilinmektedir (Bravo, 1998). Polifenoller, bitkilerde çeşitli meyve, sebze, kuruyemiş, tohum, çiçek, kök ve gövde kısımlarında doğal olarak sentezlenen maddelerdir (Wollgast ve Anklam, 2000). Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki grupta toplanabilir.

Fenolik asitler yaygın olarak bitki taç kısmında bulunur ve antioksidan karaktere sahiptir. Fenolik asitler Tablo 1.1' de gösterildiği gibi benzoik asit ya da sinamik asidin hidroksillenmiş türevleridirler. Özellikle kafeik asit ile onun esteri olan klorojenik asit ve ferulik asit gibi sinamik asit türevleri çok yaygındır. Klorojenik asit pek çok meyve, sebze ve kahvede bulunmaktadır (Spacil vd., 2008).

Tablo 1.1. Bazı fenolik asitlerin yapısal tipleri

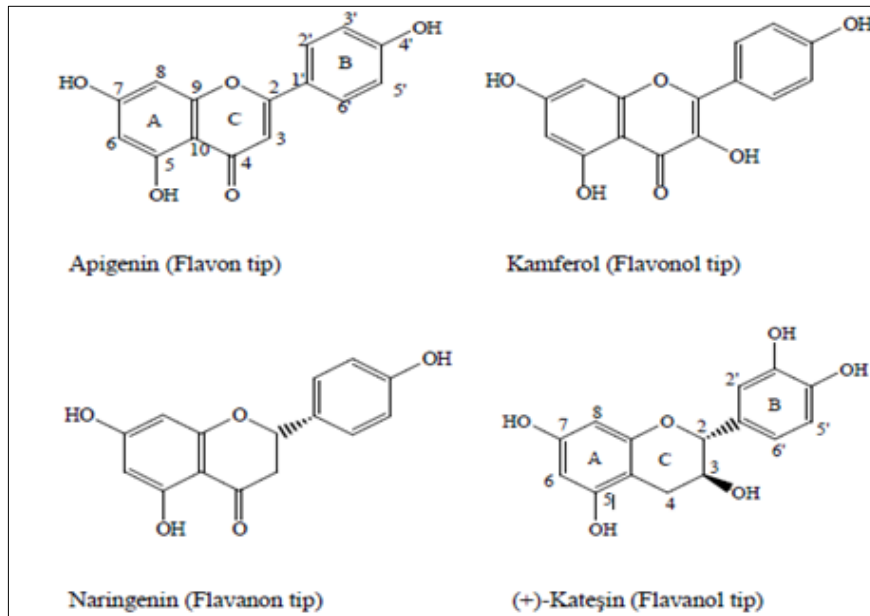
Fenolik Bileşik Tipleri	Genel Yapıları	Adları	R ₁	R ₂	R ₃		
Benzoik Tip		Gallik Asit	OH	OH	OH		
		Protokatekuik Asit	OH	OH	H		
		p-OH Benzoik Asit	H	OH	H		
		Vanilik Asit	OCH ₃	OH	H		
		Şiringik Asit	OCH ₃	OH	OCH ₃		
Sinamik Tip		Adları	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
	Sinamik Asit	H	H	H	H	H	
	p-Kumarik Asit	H	H	H	OH	H	
	o-Kumarik Asit	H	OH	H	H	H	
	Klorojenik Asit	Kuinik Asit	H	OH	OH	H	
	Kafeik Asit	H	H	OH	OH	H	
	Ferulik Asit	H	H	OCH ₃	OH	H	
	Sinapik Asit	H	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	

Flavonoidler çeşitli besin ve tıbbi bitkilerde bulunan ikincil metabolitlerin en yaygın grupları arasında olan fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler renk, tat ve koku gibi organoleptik

özelliklerden sorumlu oldukları için, ürünlerin kalitesiyle yakından ilgilidirler ve analizleri büyük önem taşımaktadır (Fabre vd., 2001; Borbalán vd., 2003).

Son yıllarda pek çok araştırma polifenoller bakımından zengin besinlerin tüketimiyle kardiovasküler hastalıklar, belli kanser tipleri ve yaşlanmayla ilgili diğer hastalıklardan korunmayı ilişkilendirmektedir (Rise-Evans ve Packer, 1998; Fabre vd., 2001; Chang ve Kinghorn, 2001; Borbalán vd., 2003). Bu ilişki genellikle antioksidan özelliklerle açıklanmaktadır. Flavonoidlerin antioksidan olarak davranma kapasiteleri genellikle molekül yapılarına bağlıdır. Hidroksil gruplarının pozisyonu ve sayısı kadar flavonoidlerin kimyasal yapılarındaki diğer özellikler de antioksidan ve serbest radikal temizleme aktiviteleri için önemlidir (Suschetet vd., 1998). Örneğin kuersetin diyetlerde en bol bulunan flavonoid olup serbest radikal temizleme aktivitesi açısından tüm temel yapısal özelliklere sahip olduğu için potansiyel bir antioksidandır (Pietta, 2000; Erkoç v.d., 2003). Flavonoidler insan vücudu tarafından üretilemezler ve bundan dolayı da günlük diyetler ile dışarıdan alınmalıdırlar.

Flavonoidler büyük düzlemsel moleküllerdir ve yapılarının çeşitliliği hidroksilasyon, metoksilasyon veya glikozilasyon gibi süstitüsyon modellerinden kaynaklanır. Flavonoid aglikonlar C-4 de bir karbonil grubu, C-3 de bir hidroksil grubu ve C-2 ve C-3 arasında doymuş bir tekli bağın bulunduğu ve bulunmadığı hallerinin kombinasyonlarına bağlı olarak flavon, flavonol, flavanon ve flavanol tipleri içinde alt gruplara ayrılırlar (Şekil 1.1).



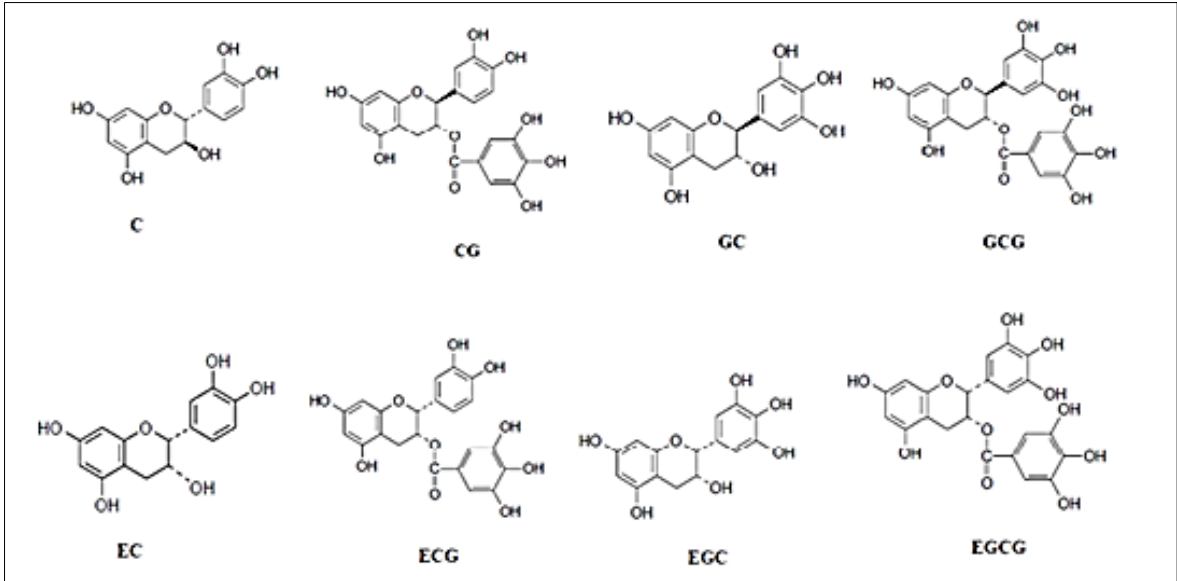
Şekil 1.1. Flavonoid türleri için temsili bileşikler

1.1.3. Flavan-3-ollar

Flavonoid grubun bir üyesi olan flavan-3-ollar (kateşinler), fenolik ve piron halkalarını içeren benzo- γ -piron türevleridir (Heim vd., 2002). Kateşinler, C3 atomunda bir OH grubu içerdiğinden sistematik olarak flavan-3-ol olarak adlandırılırlar. Kateşinlerin yapılarında iki asimetrik karbon atomu bulunduğu için dört izomerleri bulunmaktadır. C2 ve C3 atomlarına bağlı hidrojen (-)kateşin ve (-)gallokateşin moleküllerinde trans, (-) epikateşin ve (-)epigallokateşin moleküllerinde ise cis konfigürasyonundadır. Genellikle A ve B halkalarındaki çeşitli OH grupları ile karakterize edilirler. Örneğin; epikateşin B halkasındaki 3' ve 4' karbonlarında orto-hidroksil gruba ve C halkasında 3 numaralı karbondaki hidroksil gruba sahiptir. Epigallokateşin B halkasındaki 3',4',5' numaralı karbonlardaki trihidroksil gruplarıyla epikateşinden farklıdır (Senanayake, 2013). Renksiz ve suda çözünen bileşiklerdir (Wang vd., 2000).

Genel olarak epi- yapılı kateşinler ve epi- yapılı olmayan kateşinler olarak iki gruptan oluşur. Epi- ön eki moleküllerin sadece uzaydaki yönelmelerinin farklı olduğunu belirtmek için kullanılır. Epi- yapılı kateşinler epigallokateşin gallat, epigallokateşin, epikateşingallat ve epikateşin olup; epi- yapılı olmayan kateşinler ise gallokateşingallat, gallokateşin, kateşingallat ve kateşindir.

Şekil 1.2'de açık yapıları verilen kateşin türevleri pek çok doğal materyalde, özellikle çayda, meyvede, sebzede, fındık ve ceviz gibi sert kabuklu yemişlerde, tohumlarda, bitkilerin sap kısmında ve çiçeklerinde, şarapta ve balda yaygın şekilde bulunmaktadır.



Şekil 1.2. Kateşinlerin yapısı (Goto vd., 1996).

Bu tez çalışması çaydan flavan-3-ol grubu kateşin bileşiklerinin izolasyonu üzerine odaklandığından ilerleyen kısımlarda çay konusunda daha detaylı bilgiler verilmiştir.

1.2. Çay ve Çay Çeşitleri

1.2.1. Çayın Tarihçesi

Bazı araştırmacılar çayın ilk defa Hindistan'ın Assam bölgesi ormanlarında bulunduğunu, bazıları ise Çin'in Fukien bölgesindeki Boheon dağlarında bulunduğunu belirtmektedirler. Çin'de yabani olarak yetişen çay hakkında yapılan derin araştırmalar Hindistan'ın kuzeydoğu bölgesindeki vadilerde yabani olarak yetiştiğini göstermektedir. Çay bitki tohumlarının nehirler aracılığıyla sürüklenerek Hindistan'a taşındığı, bunun için de anavatanın Çin ile Hindistan arasında kalan bu bölge olduğu kabul edilmektedir. MÖ. 3.yy.'a kadar yaş çay yaprakları kaynatılarak çay yapılırken, bu tarihten sonra çay kurutulmuş olarak işlenmiştir. Kurutma işlemi, yılın her döneminde yapılması imkânını getirdiğinden günlük bir içecek olmasına da olanak vermiştir. Budist rahiplerin uykuya karşı koymak, böylece tanrısal birtakım güçlere sahip oldukları hissini yaratarak saygınlık kazanmak için içmeye başladıkları çayın Japonya'ya ulaşması da Budizmle olmuştur (Usta, 2005).

Çay, körpe yaprakları ile tomurcuğunun değişik yöntemler sonucunda işlenmesiyle elde edilen ve dünyada sudan sonra en çok tüketilen bir gıda ve içecek maddesidir. Yaprğını dökmeyen çay bitkisi doğada büyümeye bırakıldığında ağaç görünümüne sahip olmakta, yeterli düzeyde sıcaklık ve nemin bulunduğu yerlerde yıl boyunca sürgün oluşumunu sürdürmektedir. Morfolojik bakımından Çin çayı, Assam çayı, Kamboçya çayı olmak üzere üç çeşide sahip olup, bu çeşitler arasında çok sayıda melez oluşmuştur. Çin çayı 1-3 m boyunda büyük çalı şeklinde olup soğuğa, hastalıklara ve kuraklığa karşı dayanıklıdır. Assam çayının birçok alt çeşidi olup yaprak verimi Çin çayına göre fazladır. Düzenli bir budama ile ekonomik ömrü 60 yıl sürmektedir. Kamboçya çayı, 6-8 m boyunda olup tarımı yapılamamakta ve diğer çeşitlerle doğal çaprazları oluşturulmaktadır.

Çayların sınıflandırılması dünya çapında standardize edilmemiş olup sınıflar kökenine göre farklılık gösterebilmektedir. Ükelere göre çayın tadı ve kalitesi değişiklik göstermektedir. Dünyada işleme biçimine göre siyah çay (fermente), oolong (yarı-fermente) ve yeşil çay (fermente edilmemiş) çay olmak üzere başlıca üç çeşit olarak tüketilir. Siyah çaydan buruk bir tadı olan kahverengi-siyah renkli, yeşil çaydan hafif acı ve açık yeşil-sarı renkli, yarı fermente çaydan ise hafif acı ve açık kahverengi–yeşil renkli içecekler elde edilmektedir (Usta, 2005).

1.2.2. Çay Bitkisi

Dünyada en yaygın olarak tüketilen içeceklerden birisi olan ve ayrıca tıbbi özelliklerinin olduğu bilinen (Mello vd., 2005; Vyas ve Kumar, 2005; Zhu vd., 2006) çay bitkisi, dünyada 40 kadar ülkede yetiştirilmektedir (Demir, 2002). Ancak üretimin önemli bölümü Çin, Sri Lanka, Endonezya, Japonya, Hindistan, Tayvan ve merkez Afrika ülkelerinde yapılmaktadır (Lin vd., 2003; Kuo vd., 2005). Türkiyede ise Doğu Karadeniz Bölgesi'nde, Gürcistan hududundan başlayan ve batıda Fatsa'ya kadar uzanan alan içerisinde yetiştirilmektedir. Sahilden yer yer 30 km içerilere kadar giren, ortalama 8 km derinliğinde olan Araklı-Karadere sınırına kadar uzanan alan, birinci sınıf çay bölgesi olarak kabul edilmektedir (Kaçar, 1992). Çay bitkisi Theaceae familyasının *Camellia* cinsine (*Camellia sinensis*, (L) O. Kuntze) ait her mevsim yeşil olan, çok yıllık bir bitkidir (Caffin vd., 2004). *Camellia sinensis*'in 2 varyetesi olup bunlar, büyük ölçüde Çin, Japonya ve Tayvan'da yetiştirilen *Camellia sinensis* varyete *sinensis* (Çin çayı) ile Güney

ve Güneydoğu Asya'da yaygın olan *Camellia sinensis* varyete *assamica* (Assam çayı)'dır (Chan vd., 2007). Türkiye'de yetiştirilen çay Çin varyetesidir (Kaçar, 1987).

Normal koşulda çay bitkisinin yüksekliği, yılda 15-20 cm artmaktadır. Ancak bu durum, çay hasatının zorlaşması nedeniyle verimliliğin düşmesine neden olmaktadır. Bu nedenle belirli aralıklarla bitkide budama yapılması gerekmektedir (Ravichandran, 2004). Çay bitkisi yüksek düzeyde yıllık yağış ve neme ihtiyaç duyar. Bitki gelişimi ve yüksek verim için uygun hava sıcaklığı 18-30 °C, uygun toprak sıcaklığı ise 20-25 °C olmalıdır. pH'sı 4,5-6 olan hafif asitli topraklarda iyi gelişim gösterir (Mehra ve Baker, 2007). Çay genellikle yüksek bölgelerde yetiştirilir. Hindistan, Sri Lanka ve Kenya'da 2000 m yüksekliklere kadar çay tarımının yapıldığı bilinmektedir (Chan vd., 2007). Çay üretimi için, çay bitkisinin sürgün ucundan iki yaprak ve bir tomurcuğun (buna 2,5 yaprak adı verilir) kullanılması istenir. Bunun nedeni, kalite açısından önem taşıyan çeşitli maddelerin genç yapraklarda ve tomurcukta yoğun olarak bulunuyor olmasıdır (Kaçar, 1987). Çay yaprakları ve tomurcuk, bitkinin gelişme oranına bağlı olarak tropik bölgelerde 1 veya 2 haftalık aralıklarla toplanmaktadır (Vyas ve Kumar, 2005). Ülkemizde ise bu süre 5-7 haftadır. Toplamının elle yapılması kaliteli çay üretilmesini sağlarken, işçilik maliyetlerinin yüksekliği bazı ülkelerde mekanik hasatı ekonomik bir zorunluluk haline getirmiştir (Ravichandran ve Parthiban, 1998b; Chan vd., 2007). Ekvatora yakın bölgelerde yıl boyunca sürgün oluşumunun devam etmesine karşın ekvatorun 16° kuzey ve güneyi dışında kalan bölgede kışın sürgün oluşumu azalır ve çay bitkisi kış dinlenmesi olarak bilinen dinlenme sürecine girer. Bu süre içerisinde bitkinin düşük sıcaklığa maruz kalmasının, bitkide reaktif oksijen türlerinin artmasına dolayısıyla oksidatif strese neden olduğu ve bunun sonucu olarak da bitkide hücresel hasarın meydana geldiği belirtilmektedir (Vyas ve Kumar, 2005). Dünyada çay üretimi yapılan bölge ve iklimlerle karşılaştırıldığında Doğu Karadeniz Bölgesi enteresan özelliklere sahiptir. Tüm ılıman iklim şartları sağlanmasına rağmen kış aylarında üzerine kar yağın ve hiçbir tarım ilacı kullanımı olmayan tek çay türü ülkemizedir. Bu özelliği nedeniyle diğer çay türlerinden farklı özellikler taşımaktadır.

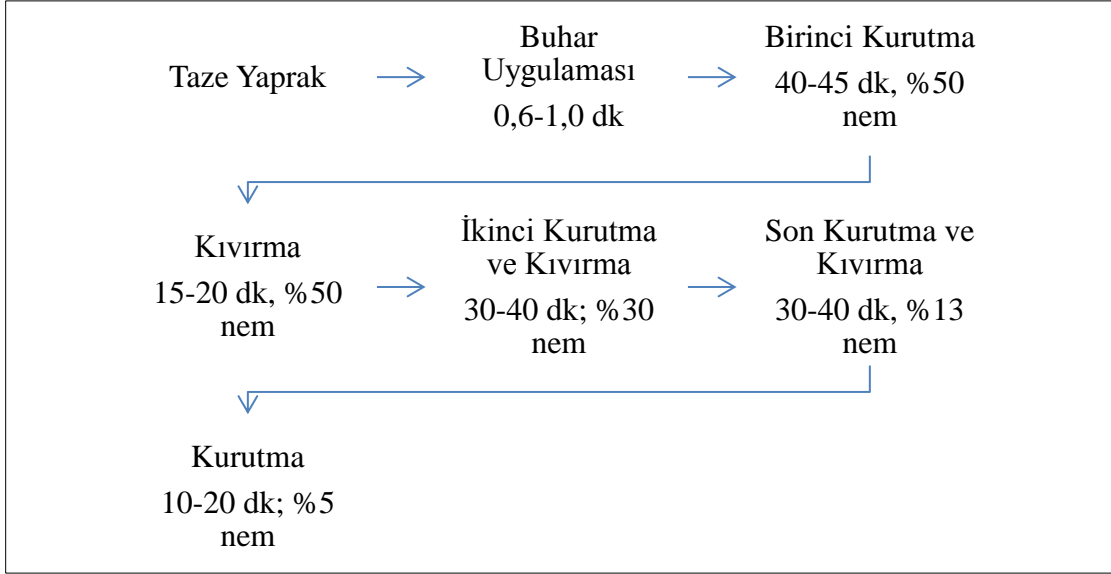
1.2.3. Çay Çeşitleri

Ticari çaylar, üretim yöntemine göre genellikle fermente olmayan yeşil çay, kısmen ya da yarı fermente oolong çay ve tamamen fermente siyah çay olmak üzere 3 ana gruba ayrılmaktadır (Fernández vd., 2003; Wheeler ve Wheeler, 2004).

Ayrıca bu üç çay tipinin dışında dünyada Asya dışında neredeyse bilinmeyen, nadir olarak bulunan ve diğer çay tiplerine göre yüksek fiyatlı olarak bulunan beyaz çay ise, erken ilkbaharda yılda yalnızca 1 kez hasat edilen çok genç çay yapraklarından ya da küçük gümüşümsü tüylü tomurcuklarından elde edilir (Rusak vd., 2007).

1.2.3.1. Yeşil Çay

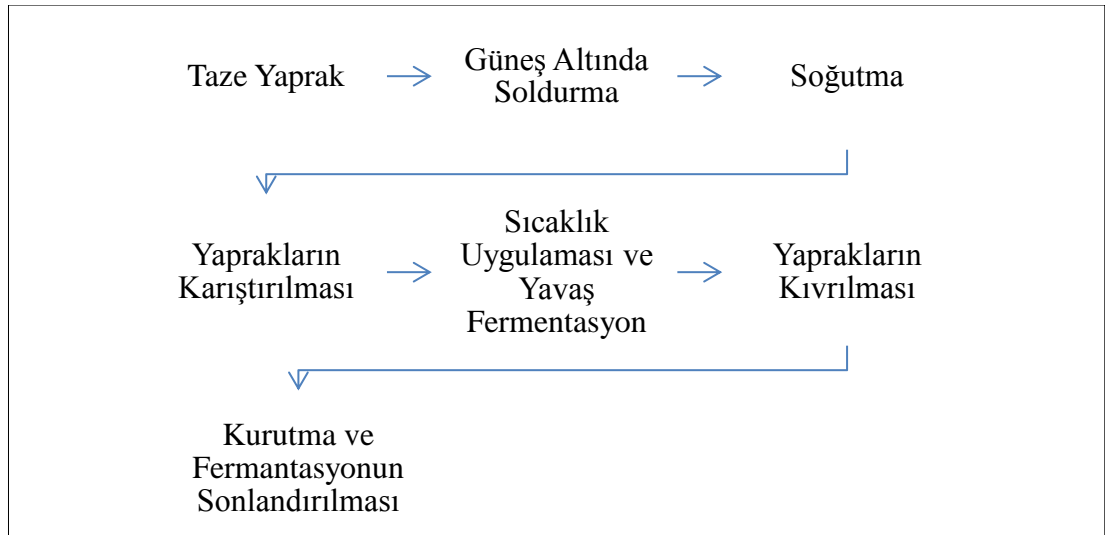
Yeşil çay, geleneksel alkolsüz bir içecek olarak Çin ve Japonya'da yaygın olarak tüketilmektedir (Yoshida vd., 1999). Yeşil çay, taze çay yapraklarının fermentasyona uğratılmadan, diğer bir deyişle yeşil çayın başlıca fenolik bileşiklerini oluşturan kateşinlerin enzimatik oksidasyonuna izin verilmeden üretilen bir çay çeşididir. Yeşil çayın üretim aşamaları Şekil 1.3'de görülmektedir. Yeşil çay üretiminde ilk ve en önemli aşama ısı uygulaması olup yapraktaki enzim aktivitesini durdurmaaktır. Bu amaçla uygulanan sıcaklık ve süre, çayın yaprak pozisyonu, toplama mevsimi gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Örneğin, körpe yapraklarda polifenol oksidaz (PPO) aktivitesi olgun yapraklara göre daha fazla olduğu için bunlara daha yüksek sıcaklıkta ve daha uzun sürede ısı işlem uygulanmaktadır (Zhen, 2002). Yeşil çay üretiminde, Assam hibritlerine göre daha az kateşin, kafein ve daha fazla aminoasit içeren Çin hibritleri kullanılmaktadır (Gulati vd., 2003). Yeşil çayın rengi kateşinlerin oksidasyona uğramaması nedeniyle oolong ve siyah çaydan farklı olarak tamamen yeşildir. Yeşil çayın antioksidatif ve antikarsinogenik özelliklerinin kateşinlerden kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Wang ve Helliwell, 2000).



Şekil 1.3. Yeşil çay üretimi (Mizukami vd., 2006).

1.2.3.2. Oolong Çay

Oolong çay, esas olarak Çin ve Tayvan'da yaygın olarak tüketilen bir çay çeşididir (Sato vd., 2005). Oolong çayın üretiminde kompleks bir yarı fermentasyon işlemi uygulanmakta olup, işlem basamakları Şekil 1.4'te gösterilmiştir (Matsui, 2004).



Şekil 1.4. Oolong çay üretimi

Karakteristik özellikleri açısından oolong çay, siyah çay ile yeşil çay arasında yer almaktadır (Wang vd., 2000). Ancak işleme farklılıkları nedeniyle siyah çay ile yeşil çayın karışımından oolong çayın içim özelliğinde bir çayın oluşturulması olanaksızdır (Kaçar, 1987). Özel bir üretim tekniği ile üretilmesi ve kullanılan çay bitkisinin özel koşullarda yetiştirilmesi nedeniyle oolong çay yoğun bir aromaya ve doğal çiçek kokusuna sahiptir (Zhan ve Xu, 2004). Oolong çayın aroma bileşiklerinden olan glikozidlerin solar soldurma sırasında artmaya başladığı ve bu artışın siyah çaydan farklı olarak üretim sonuna kadar devam ettiği belirtilmektedir (Wang vd., 2001).

1.2.3.3. Siyah Çay

Siyah çay, özellikle Batı Avrupa, Amerika, Avustralya ve bazı Asya ülkelerinde tüketilmektedir (Wheeler ve Wheeler, 2004). Siyah çay üretimi için çoğunlukla polifenol içerikleri daha fazla olan Assam çeşitleri kullanılmaktadır (Astill vd., 2001). Üretim aşağıda detaylı olarak belirtildiği üzere soldurma, kıvrırma, fermentasyon ve kurutma/derecelendirme olarak 4 farklı aşama sonucunda gerçekleştirilmektedir (Tomlins ve Mashingaidze, 1997; Łuczaj ve Skrzydlewska, 2005; Borah ve Bhuyan, 2005; Muthumani ve Senthil-Kumar, 2007a).

Günümüzde çay ürününün değişik yöntemlerle işlenmesi ile siyah çay elde edilmektedir. Dünya çay üretim teknolojisinde Ortodoks, CTC (cut-tear-curl) ve bunların kombinasyonları kullanılmaktadır.

Dünyada en fazla tercih edilen çay Ortodoks yöntemi ile elde edilen çaydır (Çalıkoğlu ve Bayrak, 2009). Ortodoks yöntemi, çay bitkisinin genç ve körpe yaprakları ile tomurcuğunun; soldurma, kıvrırma, fermentasyon ve kurutma işlemlerine tabi tutulması ile gerçekleştirilmektedir. CTC metodu verimliliği ve uygunluğu yüzünden popüler olmuştur. CTC ile işlenmiş çaylar elle toplanmış veya mekanik olarak hasat edilmiş olabilir. Makine ile hasat edildiğinde, CTC prosesi geleneksel üst iki yaprak ve tomurcukla beraber diğer yaprakları da işleyebilmektedir. CTC makineleri ile kesme, ezme, parçalama, yırtma ve dökme işlemi aynı anda yapılmaktadır. Fermentasyon ve kurutma işlemi Ortodoks yöntemindeki gibidir (Usta, 2005). CTC yöntemiyle işlenen çaylar, Ortodoks yöntemiyle işlenenlere göre daha düşük aroma yoğunluğuna sahiptir. Bunun nedeni, CTC makinelerinde yapılan üretimde oksidasyon hızı Ortodoks yöntemine göre daha hızlıdır.

Ülkemizde herhangi bir standart yöntem uygulanmamaktadır. Yaş çay yaprağı uygun standartta toplanmadığı için üretim aşamasında, kart yaprağı kıracak makine ilavelerine ihtiyaç duyulmuştur. Bu da çayın kalite standardını bozmuştur. Her fabrika adı ve belli bir standardı olmayan kendine özgü üretimler yapmaktadır. CTC yönteminde kıvrırma aşamasında parçalama, yırtma ve bükme hareketleri yapan makinalara karşın ülkemizde kıvrırma aşamasında genellikle rotorvan kullanılmaktadır. Rotorvan yönteminde standartlara göre toplanmamış kart, kaba ve iri çaylar et kıyırma makinesine benzer bir makine ile işlenir.

Siyah çay, ülkemizde ortodoks, CTC, Çay-Kur, rotorvan ve bunların değişik kombinasyonlarından oluşturulan farklı yöntemlerle işlenmekle birlikte, Çay-Kur yöntemi olarak adlandırılan, pressiz ortodoks + rotorvan + konik Ortodoks kombinasyonundan oluşan yöntem uygulamada yaygınlık kazanmıştır (Kaçar, 1987; Özdemir vd., 1993).

1.3. Çayın İşlenmesi

1.3.1. Soldurma

Soldurma, taze çay yapraklarının kısmi olarak kurutulmasıdır. Soldurma işlemi ile yaprakların bir sonraki aşama olan kıvrırma işlemine, fiziksel olarak hazırlanması amaçlanmaktadır (Ghodake vd., 2006). Taze çay yaprakları yaklaşık %75-83 nem içerirken, soldurulmuş çay yaprağında %58-67 oranında su bulunur (Kaçar, 1987). Soldurma işlemi geleneksel olarak, yapraklarda istenilen nem düzeyine ulaşılan kadar ortam havasının veya ısıtılmış havanın yaprakların arasından geçirilmesi ile gerçekleştirilir (Tomlins ve Mashingaidze, 1997). Bu işlem, taze yaprağın nem içeriğine ve uygulama koşullarına (kullanılan havanın sıcaklığı, hızı, yaprak serme kalınlığı gibi) bağlı olarak 1,5-6 saat sürmektedir (Kaçar, 1987). Soldurulmuş çay yaprağında meydana gelen başlıca fiziksel değişim, yapraktaki hücre duvarlarının geçirgenliğinin artmasıdır (Kaçar, 1987; Zhen, 2002). Bu durum yapraktaki su kaybına bağlıdır ve yaprak hücresinde ayrı bölümlerde yer alan polifenoller ile polifenol oksidaz (PPO) enziminin, kıvrırma aşamasında birbiriyle karışmasını sağlar (Muthumani ve Senthil- Kumar, 2007a). Soldurma sırasında yaprakta fiziksel değişikliklerin yanı sıra kimyasal değişiklikler de meydana gelmektedir (Ghodake vd., 2006). Soldurma sırasında meydana gelen biyokimyasal değişiklikler aşağıda belirtilmiştir (Tomlins ve Mashingaidze, 1997).

- Amino asitler, basit şekerler ve kafein miktarlarında artma
- Karotenoid, klorofil ve lipid içeriklerinde azalma
- Kateşin miktarı ve PPO aktivitesinde azalma

1.3.2. Kıvrırma

Kıvrırma aşamasında çay yaprakları parçalanır ve hücre yapıları da bozulduğu için çeşitli enzimler substratları (polifenoller) ile etkileşime girer (Caffin vd., 2004). Kıvrırma işlemi yukarıda tanımlanan Ortodoks yöntemi veya CTC yöntemi ile gerçekleştirilir (Peterson vd., 2004). Ortodoks kıvrırma yönteminde soldurulmuş çay yaprakları presli ve pressiz kıvrırma makinalarında işlenir. Sürekli bir sistem olan CTC yönteminde ise soldurulmuş yapraklar, birbirinin tersi yönünde dönen iki yatay valsten oluşan CTC makinasında işlenirler. Stoplazmik flavonoidlerin, kloroplast PPO'ı ve hücre duvarı peroksidaz (POD)'ı ile temas etmesi sonucunda çay yapraklarının rengi sarıkırmızı kahverengi renk kazanmaktadır (Baruah, 2003). CTC yöntemiyle üretilen çayların flavonoid özellikle de teaflavin (TF) ve tearubigin (TR) içerikleri ortodoks çaylarından daha fazladır (Peterson vd., 2004). Bu farklılığın, CTC yönteminde yaprakların ortodoks yöntemine göre daha fazla parçalanmasından kaynaklandığı belirtilmektedir (Astill vd., 2001).

1.3.3. Fermentasyon

Kıvrırma sırasında başlamış olan kateşinlerin oksidasyonunun optimum koşullarda devam etmesi için yapraklar en uygun sıcaklık ve nemin sağlandığı ortamda fermentasyona bırakılır (Caffin vd., 2004). Fermentasyon, siyah çayın kalitesinin belirlenmesinde önemli rol oynayan kritik bir aşamadır. Bu işlem sırasında çay yapraklarının rengi yeşilden bakır kırmızısı veya siyah renge dönüşür. Ayrıca kompleks biyokimyasal reaksiyonlar zinciri sonucunda oluşan bir çok uçucu koku bileşikleri nedeniyle yaprakların yağimsi kokusu çiçeğimsi kokuya dönüşür (Bhattacharyya vd., 2007 a, b).

Fermentasyon sırasında istenilen ürün özelliklerinin oluşumundan sorumlu en önemli faktörler süre, sıcaklık, pH, nisbi nem ve oksijendir (Muthumani ve Senthil-Kumar, 2007b). Örneğin fermentasyonun başında yetersiz havalandırma uygulanması TF ve TR

oluşumunu azaltır. Benzer şekilde yüksek sıcaklık uygulaması TF oluşumunda önemli ölçüde azalmaya neden olur (Bhattacharyya vd., 2007a). Birçok çay fabrikasında fermentasyon odasında çay yapraklarının sıcaklığını belli düzeyde tutabilmek ve yeterli oksijen sağlayabilmek için basınçla hava verilmektedir.

1.3.4. Kurutma

Kurutmanın amacı, çay yaprağında bulunan nem içeriğinin belli bir düzeye çekilerek oksidasyonu durdurmak, kazanılan özelliklerin ve oluşan aroma bileşenlerinin kaybolmasına engel olmaktır. Bu işlem siyah çayın depolanabilir, paketlenabilir ve taşınabilir durumuna sokulmasında önemli bir görevi yerine getirmektedir. Fermentasyon tamamlandığında çay yaprağındaki %45-50 oranındaki nem oranı kurutma işlemi ile %3 düzeyine indirilmektedir. Kurutma işlemi tabla üzerinde hareket eden fermentasyona uğramış çay yaprağına sıcak hava üflenmesiyle gerçekleştirilmektedir. Fırına giren sıcak hava 87-99 °C ve çıkan havanın 50-55 °C arasında olmasına dikkat edilirken, kurutma işlemi genellikle 24-27 dakika arasında tamamlanmaktadır (Usta, 2005).

1.4. İşlem Görmüş Çaydan Geriye Kalan Değerler: Çay Atığı ve Kafein Tozu

Kuru çay üretiminde, üretim işlemi sırasında elektrostatik ayırıcılarla ayrılan çay lifi ile farklı tane büyüklüğündeki eleklerden ayrılan ve çoğunlukla yaprak sapından kaynaklanan çay çözü, işlenen yapraktaki çaya dönüşemeyen kalın damar, sert yaprak, vb. meydana gelen çay tozu karışımına çay atığı denilmektedir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Çay atığı görüntüleri

Bu atık miktarı, yaş yaprak ağırlığına oranla %3-5 arasında iken, Doğu Karadeniz Bölgesinde yaş çayın standart dışı toplanmasından dolayı %17-18 gibi büyük boyutlara çıkmaktadır (Kaçar, 1987). Yaş çay satın alımı yönetmeliğine göre, en fazla %10 oranında standart dışı çay alımına izin verilirken, uygulamada bu oran %25-30'a kadar çıkmaktadır.

Çaykur'a ait bir fabrikada 2014 yılı için 28.500 kg yaş çay yaprağı satın alınmış, üretim sırasında açığa çıkan çay atıkları başka bir fabrikaya gönderileceği için tartılmış ve 1500 kg'da kuru çay atığı olduğu belirlenmiştir. Açığa çıkan kuru çay atığının yaş çaya oranı %5,3 civarındadır. Sadece Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğü'nün 2014 yılında alım yaptığı 590.000 ton yaş yapraktan 31.270 ton siyah çay atığı beklenmektedir. Özel sektörün satın aldığı yaş çay miktarı, 713.000 ton olup, 37.789 ton siyah çay atığı çıkacaktır.

Yüz yüze yapılan görüşmelerden alınan bilgiler ışığında, özel sektör çay atıklarının bir kısmını üretim hattında tekrar değerlendirdiği için, atık miktarı yaş çayın %3'üne düşmektedir (21.350 ton). Bu sonuçlara göre, kamu ve özel sektörün çay atığı toplamı 2014 yılı için 52.660 ton gibi çok yüksek bir miktara ulaşmaktadır. Çay atıklarının kimyasal ve elementel analizi Tablo 1.2.'de verilmiştir (Demirbaş, 1999).

Tablo 1.2. Çay atıklarının kimyasal ve elementel analiz sonuçları

Yapısal Bileşenler	%	Elementel Analiz	%
Lignin	37,8	Karbon	49,6
Selüloz	28,8	Hidrojen	5,1
Hemiselüloz	18,9	Oksijen	42,6
Aseton Ekstraktifleri	4,6	Azot	2,7
Nem	6,5	Kül	3,4

Çay atığı kompost hammaddesi olarak kullanılabilir. Hindistan'da çay atığının kompost üretimi uygulamaları bunun en güzel örneğidir. Ancak çay atığını doğrudan kompost hammaddesi olarak kullanmak mümkün değildir. Çünkü kompostlama için gerekli olan nem, pH, fosfor ve mikroorganizma bakımından uygun değildir. Kuru çay atığının öncelikle nem bakımından uygun forma getirilmesi gerekmektedir. Bunun için yaklaşık 2,6 kat klorsuz su ile nemlendirilir. Çay atığından üretilen kompost bölgedeki çay bahçelerinde gübre yerine kullanılmaktadır. Çay kompostlarının çay bahçelerinde

kullanılmasıyla kimyasal gübre kullanımı azalmakta ve toprağın pH'ını da ayarlamaktadır (URL-1, 2014).

Türkiye'de çay atıkları genellikle çay fabrikalarında buhar kazanlarında yakacak olarak kullanılmaktadır. Yakacak, kompozit veya gübre olarak kullanımı dışında içerdiği değerli kimyasallar yönünden de değerli bir atıktır. Katma değeri yüksek ürünlerin elde edilmesine yönelik ciddi araştırmalar yapılmaktadır. Bu yönüyle tezin ilerleyen kısımlarında tekrar tartışılacaktır.

1.5. Dünya ve Türkiye'de Çay Üretimi

Dünya'da çay ithalatı, hem çay üreticisi olan ülkeler, hem de çay üreticisi olmayan ülkeler tarafından yapılmaktadır. FAO'nun (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü) 2014 yılı verilerine göre, toplam çay ithalatı yıllık 1.582.222 ton'dur. İthalatta en büyük paya sahip ülkeler arasında sırasıyla Avrupa Birliği Ülkeleri, Rusya, Pakistan, ABD, Japonya, Mısır ve Kanada yer almaktadır (FAO Raporu, 2010).

Dünya'da toplam ihracat miktarı ise 2014 yılı verilerine göre, yıllık 1.854.318 ton'dur. İhracatta en büyük paya sahip ülkeler arasında Kenya, Sri Lanka, Çin, Hindistan, Vietnam, Avrupa Birliği Ülkeleri, Endonezya ve Arjantin gibi ülkeler ilk sıraları almaktadır (FAO Raporu, 2010). Çay üreten ülkelerdeki çaylık alanlar ve üretim miktarları Tablo 1.3'de verilmiştir.

Tablo 1.3. 2014 Yılı ülkelerin çaylık alanları ve üretim miktarları

Ülkeler	Çaylık Alan (Bin Hektar)	Ülkeler	Miktar (Bin Ton)
Çin	1.628	Çin	1.712
Hindistan	523	Hindistan	1.026
Sri Lanka	218	Kenya	311
Kenya	189	Sri Lanka	290
Endonezya	120	Türkiye	240
Vietnam	175	Vietnam	200
Türkiye	80	İran	170
Diğer Ülkeler Toplamı	975	Diğer Ülkeler Toplamı	80

Tekrar ihraç (Re-export) yapan ülkeler arasında en önemli tüketici ülke olan İngiltere yer almaktadır (Özden, 2009). Tekrar ihraç, dünya çaycılığında özellikle üretici ülkelerin birbirlerinin çaylarını harmanlamak suretiyle ya da tüketici ülkelerin ithal ettikleri çayı yeniden harmanlayıp ihraç etme işlemidir.

Türkiye, çay tarım alanlarının genişliği bakımından, dünyada üretici ülkeler arasında 7. sırada, kuru çay üretimi yönünden 5. sırada ve yıllık kişi başına tüketim bakımından ise 4. sırada yer almaktadır (Özden, 2009).

1984 Yılına kadar devlet tekeli altında sürdürülen çay işletmeciliği 1988 Aralık ayında 3092 sayılı “ Çay Kanunu” ile serbest bırakılmıştır. 1994 yılında Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğü, çıkarılan 4046 sayılı kanun ile KİK kapsamından çıkarılarak İktisadi Devlet Teşekküller arasına alınmış, 2002 yılında ise Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'nın kuruluşu olmuştur. Bugün sektörde Çay-Kur'un 47 adet yaş çay işleme fabrikası, 3 adet paketleme fabrikası özel sektörün ise biri kooperatif olmak üzere yaklaşık 229 adet yaş çay işleme fabrikası bulunmaktadır (Çaykur, Çay Sektörü Raporu, 2009).

1.6. Çayın Bileşimi ve İçerdiği Kimyasallar

1.6.1. Çayın Bileşenleri

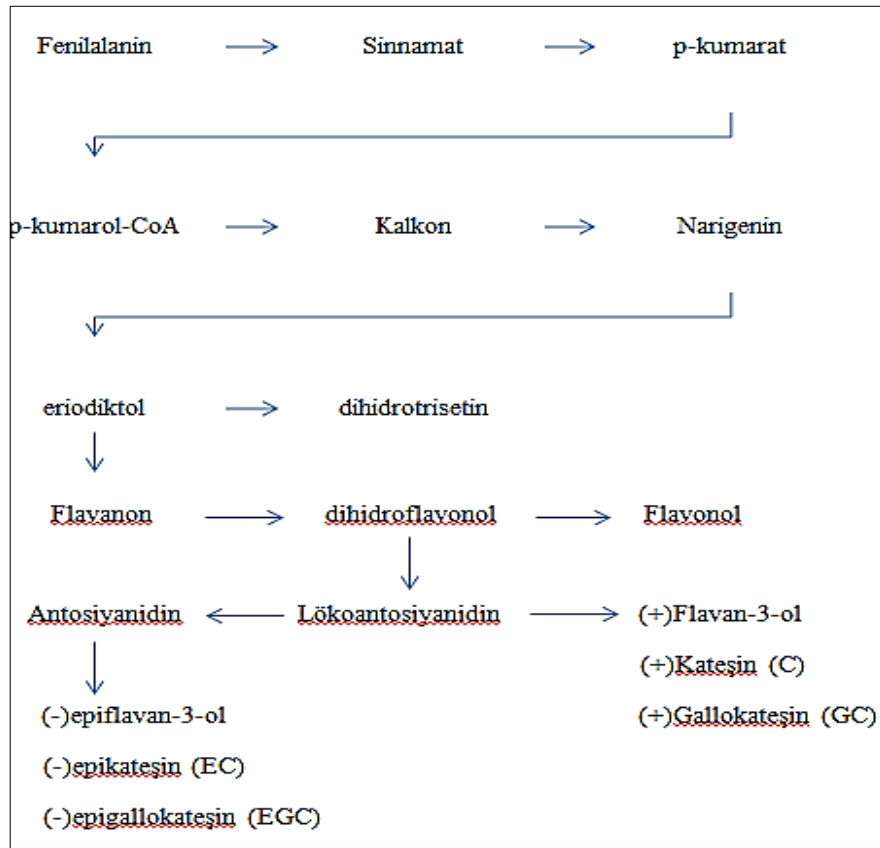
- Yaş Çay

İşlem görmemiş çay yaprağının kimyasal bileşimi varyete farklılıkları, çevresel etkiler, toplama standardı ve üretim yöntemleri gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Kuroda ve Hora, 1999). Ancak genel olarak taze çay yaprağının yaklaşık %70'i sudur. Çayın bileşenleri arasında en büyük öneme sahip olanlar fenolik maddeler ve aralarında kafeinin de yer aldığı alkaloidlerdir. Ayrıca, çayda 26 çeşit aminoasit bulunmaktadır ve en fazla bulunan aminoasit, sadece çay bitkisine özgü olan ve toplam aminoasitlerin %50'sini oluşturan teanindir (Yao vd., 2006a). Yeşil çay kalitesi ile en yüksek korelasyonu gösteren ve aynı zamanda önemli biyolojik etkiye sahip bir aminoasittir (Wang vd., 2006). Örneğin, beyindeki norepinefrin ve serotonin miktarlarını düşürdüğü, kan basıncını azalttığı ve kanser üzerine etkili olduğu belirtilmektedir (Juneja vd., 1999; Wang vd., 2006). Teanin yeşil çay demine buruk tat ve koku vermektedir (Juneja vd., 1999).

Çay filizi enzimler, biyokimyasal ara ürünler, karbohidratlar, proteinler ve yağları içerir. İlaveten çay filizi polifenoller ve metil ksantinleri (kafein, teobromin ve teofilin gibi diğer pürinleri) önemli oradan içerir. Çayın eşsiz tadından sorumlu bu iki grup bileşendir.

Flavanoller, flavonol glikozitleri, fenolik asitler toplam polifenollerini oluştururlar ve bunlar çay filizindeki kuru ağırlığın yaklaşık %30'una karşılık gelir.

Çayda bulunan kateşinlerin ve yukarıda bahsedilen bileşiklerin biyosentez aşamaları Şekil 1.6'da görülmektedir.



Şekil 1.6. Kateşinlerin bitkilerdeki biyosentez yolu

Çay yaprağında hakim olan fenolik bileşikler kateşinlerdir. Flavan-3-ollardan (-) epigallo kateşin (EGC) ya da (-)epigallo kateşin gallat (EGCG)'ın çay sürümlerinde en fazla bulunan kateşinler olduğu belirtilmektedir (Obanda ve Owuor, 1997). Afrika çaylarında yapılan bir araştırmaya göre, 40 farklı çay sürümü içinde en fazla, gallatlanmış kateşinlerden EGCG tespit edilmiş bunu gallatlanmamış kateşinlerden EGC izlemiştir. Diğer kateşinler (-)kateşin (C), (-)epikateşin (EC) ve (-)epikateşin gallat (ECG) olup daha az miktarlarda bulunmaktadır (Wright vd., 2000).

Benzer şekilde, Avustralya taze çay yapraklarında en fazla EGCG (ort. 109 mg/g) bulunurken bunu EGC (ort. 46,11 mg/g) ve ECG (ort. 36,6 mg/g) izlemiştir (Yao vd., 2004). Tayvan taze yeşil çay sürümlerinde, kateşinlerin miktar açısından sıralaması şu şekilde bulunmuştur; EGCG>EGC>ECG>EC>C (Lin vd., 1996). Aynı sıralama, Aucamp vd., (2000) tarafından da tespit edilmiştir. Taze yaprakta başta EGCG olmak üzere ECG ve EGC'in yüksek seviyelerde bulunması, siyah çay üretimi açısından iyi kalitenin belirteci olarak ele alınmaktadır.

Fermentasyon işlemi kateşin miktarında önemli oranda azalmaya neden olduğu için yeşil çay, oolong ve siyah çaylardan daha fazla kateşin içermektedir (Cabrera vd., 2003). Yeşil çayda kateşinlerden en fazla EGCG bulunmaktadır. Bunu sırasıyla EGC, ECG, EC, CG, GC ve C izlemektedir (Goto vd., 1996; Lin vd., 1996; Zuo vd., 2002; Nishitani ve Sagesaka, 2004; Perva-Uzunalić vd., 2006). Bu sıralamanın EGCG>EGC>EC>ECG>GC (Wang vd., 2000; Chang vd., 2000) ve EGCG>EGC>GC>ECG>C>EC (Wang vd., 2006) şeklinde olduğu da belirtilmektedir. Yeşil çayda bireysel kateşinlerin miktarı hammaddenin çeşidine, özellikle varyete, iklim ve yetiştirilme koşullarına göre değişmektedir (Bonoli vd., 2003). Örneğin, Japon geleneksel Matcha çayının kateşin içeriğinin diğer bir Japon çayı olan Sencha çayına göre daha düşük olmasının, Matcha çayı üretiminde kullanılan çay yapraklarının gölgede yetiştirilmesi nedeniyle bunlardaki kateşin biyosentezinin düşük olmasından ileri geldiği belirtilmektedir (Goto vd., 1996; Nishitani ve Sagesaka, 2004).

Kateşinler sitoplazmik vakuollerde bulunurlar ve fermentasyon sırasında önemli rol oynarlar. Kloroplastta bulunan polifenol oksidaz enzimi çay fermentasyonunda kilit rol oynar. Polifenol oksidaz çay kateşinlerinin orto-dihidroksi fonksiyonel grubu için dikkate değer özgünlüğe sahiptir. Zarar görmemiş bir bitkide enzimler substratlarla ve flavonoller ile etkileşime girmez. Fermentasyonun temelinde membranın kırılmasıyla oksijenin varlığında substrat ve enzimi biraraya getirerek polifenollerin sitoplazmaya yayılabilmesini sağlamak yatar. Fermentasyonda ilk basamak olarak kateşinler polifenol oksidaz ile çok reaktif ortokinonlara yükseltgenirler. Bir gallokateşinden ve basit kateşinden türeyen kinonlar çay içeceğinin rengine, parlaklığına, canlılığına, burukluğuna önemli katkı yapan turuncu-kırmızı bileşen olan teaflavinleri üretmek için dimerleşirler. Teaflavinlerin (TF) oluşumunda rol oynayan ve dolayısıyla siyah çay kalitesini etkileyen kateşinler EC, EGC, ECG ve EGCG'dir. Epi yapılmayan kateşinler TF oluşum reaksiyonlarına katılmazlar (Wright vd., 2000; Owuor vd., 2006).

- Oolong Çay

Oolong çayın yapısında bulunan kateşinlerin polimerizasyonu sonucunda oluşan polifenol bileşikleri, yeşil ve siyah çaydan farklılıklar gösterir (Matsui, 2004) ve kateşin, teafavin ve tearubiginlerin karışımından oluşmaktadır (Wheeler ve Wheeler, 2004). EGCG ve toplam kateşin miktarları açısından yeşil çaydan sonra ikinci sırada yer alır (Lin vd., 2003). Benzer şekilde, en fazla kateşin miktarı yeşil çaydan sonra oolong çayındadır (Chan vd., 2007). Çayların indirgeme gücü ve 2-2-difenil,1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal yöntemleri kullanılarak belirlenmiş antioksidan aktivite açısından da yeşil çaydan sonra gelir (Satoh vd., 2005). Diğer taraftan, oolong çayın bileşiminde bulunan proantosiyanidin, oolonghomobisflavan, teasinensin ve teafavin gibi polimerize polifenollerin pankreastan salgılanan lipaz enziminin aktivitesini engellemede yeşil çayın başlıca polifenollerinden olan EGCG'dan daha etkili olduğu da belirtilmektedir. Bu nedenle oolong çayın insan vücudunda yağ absorpsiyonunu azaltarak obeziteyi önleyeceği düşünülmektedir (Nakai vd., 2005).

- Siyah Çay

Siyah çayın içerdiği kimyasallar Tablo 1.4'de verilmiştir (Alaşalvar, 2013).

Tablo 1.4. Siyah çayda bulunan kimyasallar

Bileşenler	Birim	Bileşenler	Birim
Teaflavinler (%)	0,78	Demir (mg/100g)	17,4
Tearubiginler (%)	8,02	Sodyum (mg/100g)	3,0
Polimerize maddeler (%)	11,19	Potasyum (mg/100g)	2000
Kafein (%)	3,51	A vitamini (U/100g)	900
Toplam Polifenol (%)	20,0	B1 vitamini (mg/100g)	0,10
Aminoasitler (%)	1,0	B2 vitamini (mg/100g)	0,80
Protein (%)	20,6	Nikotinik Asit (mg/100g)	10
Lys R	2,5	Gallik Asit (%)	0,15
Karbohidratlar (%)	32,1	EGC (%)	0,57
Nem (%)	6,0	C (%)	0,18
Kalsiyum (mg/100g)	470	EC (%)	1,51
Fosfor (mg/100g)	320	EGCG (%)	2,86

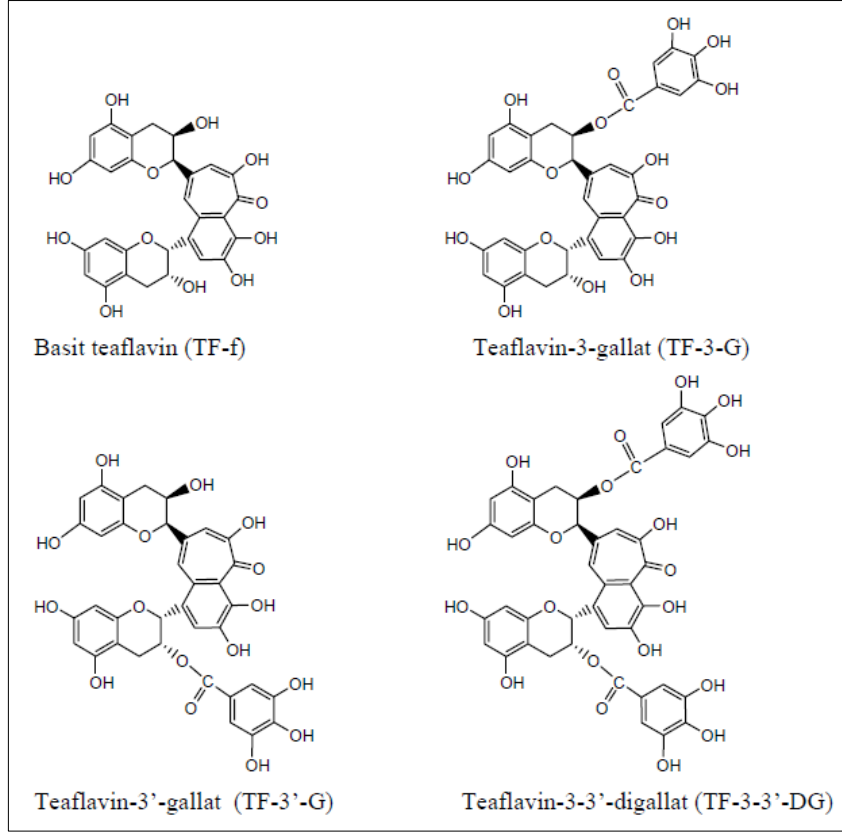
Bunların dışında siyah çaya kokusunu veren kimyasallar da mevcuttur. Terpenoidler ve aminoasitler çayın hoş aromasına katkı yapan linaool, fenil asetaldehid, fenil etanol ve

metil salisilat üretmek için indirgenirler. Çayın aromasından sorumlu bileşenler Tablo 1.5’de verilmiştir (URL-2, 2014).

Tablo 1.5. Çayın aromasından sorumlu bileşenler

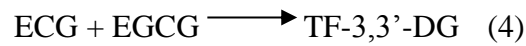
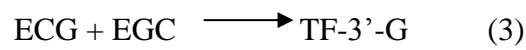
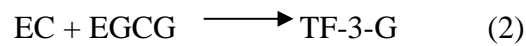
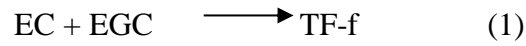
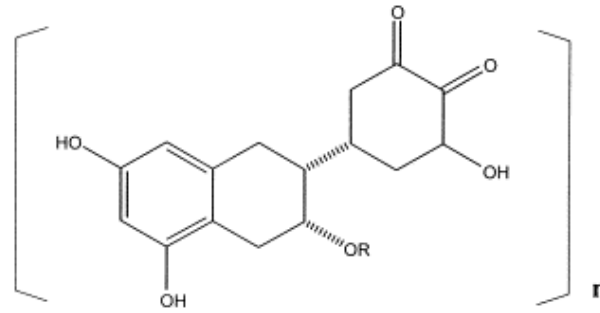
Bileşik	Bileşik
α - pinen	Nerol
Linalool oksit	Geraniol
Sitronellal	α - ionon
Benzaldehit	Benzil alkol
Linalool	Fenil etanol
Fenil Asetaldehit	cis-neronidol
Geranil Asetat	Metil jasmonat

Siyah çayın en önemli fenolik bileşikleri ve aynı zamanda pigmentleri dimerik teaflavin (TF) ve polimerik tearubigindir (TR). TF parlak ve portakal kırmızı renkte iken TR kimyasal olarak daha heterojen olup kahverengi-kırmızımsı renktedir ve bu bileşikler flavonol glikozidlerle birlikte siyah çayın tat ve renginden önemli ölçüde sorumludur (Obanda vd., 2001). Siyah çayda toplam konsantrasyonu %2’yi geçmeyen, genellikle %0,3 gibi düşük düzeyde olabilen, TF’in sentezi ve moleküler yapısı çok iyi bilinirken, daha heterojen yapıdaki, kuru çay ağırlığının %10-15’ini oluşturan, TR’in kimyasal yapısı ve oluşum mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Wright vd., 2002; Bonnely vd., 2003; Haslam, 2003; Obanda vd., 2004; Sang vd., 2004; Owuor ve Obanda, 2007). Teaflavinlerin kimyasal yapıları Şekil 1.7’de verilmiştir.



Şekil 1.7. Çay teaflavinlerinin kimyasal yapıları (Kuroda ve Hora, 1999).

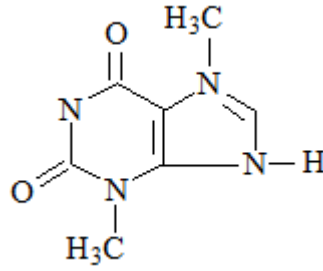
TR için önerilen genel yapı ve TF oluşum yolları aşağıda verilmektedir (Kuroda ve Hora, 1999; Wang vd., 2000).



Alaşalvar vd., (2013) düşük ve yüksek kalitedeki Türk siyah çaylarının toplam fenolik içerikleri, vitamin içerikleri, teaflavin ve tearubigin miktarları, karotenoidler ve alkaloidler açısından incelemiştir. Düşük ve yüksek kalite aralığındaki yedi siyah çay örneklerinin teaflavin içeriğini 56-124 mg/100g ve tearubigin içeriğini 10,2-12,7g/100g olarak rapor etmişlerdir (Alaşalvar vd., 2013).

- Kafein

Çayın içeriğinde yukarıda bahsedilen bileşenler dışında önemli oranda kafein bulunur. Kafein kimyasal yapısı aşağıda verilmiş olup alkaloid yapısındadır.



Kafein iki nedenden ötürü birçok araştırmaya konu olmuştur. Bunlar kafeinin doğada yaygın olarak bulunması ve kullanımının çok eskilere dayanmasıdır. Araştırmacılar bugüne kadar kafein içeren 60'dan fazla bitki bulmuşlardır ve tarih kafeinin bir şekilde paleolitik çağlardan bu yana tüketildiğini göstermektedir. Neden bu kadar çok bitki çeşidinin kafein ürettiği ise merak konusudur. Birçok uzman, bitkide kafeinin ikincil bileşen olarak bulunduğunu, yani bitkinin hayatta kalması için elzem olmadığını, sadece doğal bir pestisit olduğunu düşünmektedirler (Raven vd., 1999; Lee ve Balick, 2006). Kafeinin çay, kahve ve diğer bazı bitkilerde yüksek derişimde bulunmasına dair iki hipotez bulunmaktadır. 'Kimyasal savunma teorisi'ne göre bitkilerde kafein; küçük yapraklar, meyve ve çiçek tomurcuklarındaki yumuşak dokuları böcek larvaları (Harborne, 1993) ve böcekler (Hewavitharanage vd., 1999) gibi yağmacılardan korumak için bulunmaktadır. Kafein herbivorlar, böcekler ve bitkiler için toksiktir. 'Alleopatik teori'ye göre ise kafein tohum zarfından toprağa salınır ve böylece diğer tohumların çimlenerek gelişmesini engeller (Waller, 1989). Bugün dünya çapındaki kafein tüketiminin (bütün kaynaklardan) yıllık olarak 120,000 ton olduğu tahmin edilmektedir (URL-3, 2014). Son yıllarda kafeine verilen önem giderek artmaktadır. Amerika Gıda ve İlaç İdaresi (FDA); kafeinin 1960'ların

sonlarında başlatılan, genel olarak güvenli kabul edilen (GRAS) maddeler listesinin bir parçası olarak düzenleyici özelliği üzerine odaklanmıştır (Barone ve Roberts, 1996).

Kafein; teobromin (3,7-dimetilksantin), paraksantan (1,7-dimetilksantin) ve metilurik asitleride içeren diğer metil ksantanlarla beraber pürin alkaloid olarak bilinen bir grubun üyesidir. İlaç olarak kullanımı ile ilgili en eski yazılı kaynak, Abu Ali al- Husain İbn Abdullah İbn-i Sina tarafından yazılan “The Canon of Medicine” (980- 1037)’dir. Ancak ilk kez 1820 yılında çay (*Camellia sinensis*) ve kahvede (*Coffea arabica*) keşfedilmiştir (Ashihara ve Crozier, 2001).

Kafein (1,3,7-trimetilksantin) çay, kahve, meşrubat gibi birçok içecekte bulunması nedeniyle halk tarafından iyi bilinen birkaç bitkisel maddeden biridir. Kafein tüketiminin insan sağlığı üzerine olumsuz olumlu veya olumsuz etkileri tartışmalıdır (Mazzafera vd., 1991). Kafein tüketimi ile birlikte kısa vadede ortaya çıkan etkiler kalp çarpıntısı, gastrointestinal rahatsızlıklar, anksiyete, titreme, yüksek kan basıncı ve uykusuzluktur (Chou ve Benowitz, 1994; Nurminen vd., 1999). Bununla beraber kafein tüketiminin insan sağlığı üzerine uzun vadedeki etkilerine dair çok sayıda yayın bulunmasına rağmen; kafeinin, insan sağlığını koruyucu veya zararlı önemli bir etkisi olduğuna dair bir işaret bulunamamıştır (Eskenzai, 1999). *Camellia* ve *Coffea* türlerinde, en yüksek kafein derişimini *sinensis* varyetelerindeki genç yaprakların ilk filizlerinde (kuru ağırlıkta %2,8 kadar) bulunmuştur (Ashihara ve Crozier, 2001).

1.6.2. Yaş Çay Yapağının Fenolik Madde Bileşimini Etkileyen Faktörler

Çayın kimyasal içeriğini değıştiren en önemli etken işleme yöntemidir. Yukarıda detayları verilen kimyasalların çoğu çayın işlenmesi sırasında oluşur. Ancak çayın işlenmesi öncesindeki bazı etkenler içeriğini önemi derecede etkilemektedir. Taze çay yapağının polifenol içeriği aşağıda belirtilen çeşitli faktörlere bağılı olarak değışiklik göstermektedir.

1.6.2.1. Hasat Sonrası İşlem

Kateşinlerin miktarı yaprakların hasat edilmesinden işlenmesine kadar geçen sürede maruz kaldığı koşullara göre değişime uğrayabilmektedir. Bu nedenle hasat sonrası sıcaklık 35°C'yi geçmemeli ve ortamda yeterli miktarda oksijen bulunmalıdır.

1.6.2.2. Bölgesel Farklılık

Çay üretimi amacıyla 2,5 yaprak olarak (2 tam yaprak ve 1 tomurcuk şeklinde) hasat edilen çay bitkisinde, kateşinlerin dağılımı yaprakların yaşına bağlı olarak değişmektedir (Robertson, 1983). Toplam kateşin en fazla genç yapraklarda daha sonra olgun yapraklarda ve en az gövdede bulunmaktadır. Siyah çay üretimi açısından değerlendirildiğinde, 2,5 yaprak kullanıldığında TF içeriği en yüksek seviyeye ulaşır (Caffin vd., 2004).

1.6.2.3. Mevsimsel Farklılık

Yapraklardaki polifenol miktarı ve dağılımı hasat edilen sürgün dönemlerine göre de farklılık göstermektedir. Bu durum farklı mevsimlerde bitkinin gelişme oranının farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Caffin vd., (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, Avustralya taze çay yapraklarında soğuk mevsimde veya yavaş gelişme koşullarında galletlanmış kateşinlerin miktarında sıcak aylara göre önemli oranda ($p < 0.05$) azalma saptanırken, esterleşmemiş kateşinlerin miktarı soğuk mevsimlerde daha fazla bulunmuştur. Aynı araştırmacılar siyah çay üretimi açısından sıcak aylarda hasat edilen yapraklardan en iyi kalitede siyah çay üretilebileceği belirtilmektedir. Lin vd., (1996) yaz döneminde toplanan çayların toplam kateşin miktarının (ort. %5,25) bahar döneminde toplananlardan (ort. %3,77) daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Chou vd., (1999) tarafından yapılan bir başka çalışmada Tayvan çay yapraklarındaki kateşin miktarının mevsime göre değiştiği ve yaz, ilkbahar, sonbahar ve kışın ortalama kateşin miktarlarının sırasıyla %22, %20,1, %19,4 ve %19,2 olduğu belirtilmektedir. Diğer taraftan, yukarıda sözü edilen araştırma sonuçlarının tersine düşük sıcaklık, daha az gün ışığı veya kuraklık nedeniyle yavaş gelişme koşulları altındaki çay bitkisi ile yüksek kaliteli çay üretilebileceği de belirtilmektedir (Robertson, 1983).

1.6.2.4. Hasat Yöntemi

Çay yaprakları bahçeden elle, makas kullanarak kısmi mekanizasyon yoluyla veya tam mekanizasyon tekniği ile hasat edilmektedir. Ancak, elle veya makine ile hasat durumuna göre yaprakların polifenol miktarları değişmektedir. İşçilik maliyetlerini azaltmak amacıyla (Ravichandran ve Parthiban, 1998b) makine ile hasat yapıldığı durumda daha yaşlı, kaba, kalın ve zarar görmüş yapraklar toplandığından kateşin miktarları daha düşüktür (Caffin vd., 2004).

1.6.2.5. Hasat Sezonu

Yaş çay yaprağında en önemli grubu oluşturan kateşinlerin miktarı çay sürümlerine göre değişebilmektedir (Lopez vd., 2005; Saravanan vd., 2005). Farklı çay sürümleri arasında polifenollerin dağılım profili büyük farklılık gösterirken, aynı sürüm içinde aşağı yukarı profilin aynı olduğu ve ayrıca polifenol miktarlarında belirgin değişimler olmasına rağmen polifenollerin nispi oranları arasında farklılıklar görülmediği belirtilmektedir (Caffin vd., 2004; Owuor ve Obanda, 2007).

1.7. Çay Kimyasallarının Etkileri ve Kullanım Alanları

1.7.1. Sağlık Üzerine Etkileri

Son yıllarda çay kateşinlerine biyolojik aktivitelerinden dolayı çok fazla ilgi gösterilmektedir (Chen vd., 2001). Çayın yararlı özelliklerinin antioksidan (Zandi ve Gordon, 1999; Mello vd., 2005; Navas vd., 2006), antimitojenik (Halder vd., 2005), antikarsinogenik (Han, 1997) ve antibakteriyel (An vd., 2004) etkilerinden kaynaklandığı belirtilmektedir. Bansal vd., (2012) yeşil çay polifenollerinin farmakolojik profilini geniş açıdan incelediği yeni bir derleme yayınlamıştır.

Yeşil çay polifenollerinin sağlık üzerine etkilerini araştırmak amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda polifenollerin yara iyileşmesi (Vergote vd., 2002; Chen vd., 1998; Hsu vd., 2003), virüsler (Song vd., 2005), ateroskleroz (Vinson, 2000), otoimmün hastalıklar (Varilek vd., 2001), kardiyak aritmi (Kelemen vd., 2004), HIV

(Nance ve Shearer, 2003), saç dökülmesi (Esfandiari ve Kelley, 2005), cilt hücreleri (Hsu vd., 2003), diyabet (McKay ve Blumberg, 2002; Anderson ve Polansky, 2002; Koyama, 2004), karaciğer rahatsızlıkları (Kuo ve Lin, 2003), kilo kaybı (Dulloo vd., 1999) üzerine etkileri incelenmiş ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Çay kateşinleri, bir H atomu vericisi olarak serbest radikalleri indirgeme, zincir oksidasyon reaksiyonlarını engelleme veya metallerle şelat yapma yeteneğine sahip olduğundan antioksidan olarak davranırlar (Gramza vd., 2006). Bireysel kateşinlerin antioksidan aktivitesi fenolik hidroksil grupların sayısı ve konumuna bağlı olarak farklılık göstermektedir. Nanjo vd., (1996)'nın kateşinlerin DPPH radikalini bağlama etkisini inceledikleri çalışmada, gallatlanmış kateşinlerin, gallatlanmamış türevlerine göre daha güçlü antioksidan aktivite gösterdiği belirtilmektedir. Gallat grubunun ve B halkasındaki orto-trihidroksil grubun serbest radikal bağlama açısından çok önemli olduğu da belirtilmiştir. Bu sonuçla uyumlu olarak, Leung vd., (2001) tarafından, EGCG'nin düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunu engelleme açısından en fazla etkiyi gösterdiği ve bunu sırasıyla ECG, EC ve EGC'in izlediği saptanmıştır. EGCG'nin en yüksek antioksidan potansiyele sahip olduğu Stewart vd., (2005) tarafından da gösterilmiştir. Aynı araştırmada, EGCG'ı sırasıyla ECG, EGC, EC ve GC izlemiştir. Diğer taraftan, Liu vd., (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, çay polifenollerinin peroksil radikalının neden olduğu lipid peroksidasyonunu engellediği saptanmış ve en yüksek antioksidan aktiviteye sahip polifenolün, EC olduğu ve bunu sırasıyla EGCG, ECG ve EGC'in izlediği belirtilmiştir.

Kateşinlerin genel olarak Gram (+) bakterilere, Gram (-) bakterilerden (*E. coli* ve *S. enteridis* gibi) daha etkili olduğu da bilinmektedir (Dufresne ve Farnworth, 2001; Proestos vd., 2006). Çay kateşinleri, antibiyotiğe dirençli bakterilerden biri olan *S. aureus* (MRSA) taşıyıcısı birçok hastada kontrol gruba göre bakteri sayısında ve hastanede kalma süresinde önemli oranda azalmaya neden olmuştur (Yamada vd., 2003).

Günde 5 fincan yeşil çay tüketerek, günlük riboflavin, niasin, folik asit ve pantotenik asit gereksiniminin %5 ila %10'u kazanılmış olur. Yaklaşık olarak, günlük magnezyum ihtiyacının %5'i, potasyum ihtiyacının %25'i, manganez ihtiyacının %45'i karşılanır.

Epidemiyolojik laboratuvar çalışmaları göstermektedir ki çay tüketimiyle belli kanser türleri arasında ters orantı vardır (Artali vd., 2009; Mann vd., 2009; Kuo vd., 2009). 1966 yılında yayınlanmış olan ilk epidemiyolojik rapor, insanlarda çay bileşeni ve kanser arasındaki ilişkiyi göstermektedir (Higginson, 1966). Çay polifenollerini selektif olarak

güçlü bir şekilde apoptotik hücre ölümlerine neden olur, tümörlü hücrelerin döngüsünü durdurur ve çeşitli biyolojik yolları etkiler. Cilt, akciğer, karaciğer, mide, meme bezi ve kolon gibi farklı organ dokularındaki tümör oluşumunu engellediği veya bu tümörlerin miktarını azalttığını gösteren in-vivo çalışmalar mevcuttur. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda farklı hayvan modelleri kullanılarak hastalıklar görülmeden önce çayın kanseri önleme üzerine etkisi araştırılmıştır (Lambert vd., 2005; Yang vd., 2007; Ju vd., 2007). Yeşil çayın kanseri önlemesi üzerine insan kaynaklı çalışmalar da yapılmıştır. Örneğin, düzenli olarak yeşil çay tüketilen Japonya gibi ülkelerde kanser oranları düşme eğilimindedir. Yeşil çayın gerçekten insanlarda kanseri önleyip önlemediğini belirlemek insan temelli çalışmalar yapılmaksızın pek mümkün değildir. Ancak hayvan çalışmaları ve klinik çalışmalar EGCG'nin kanserinin önlenmesinde önemli bir rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır.

1.7.2. Gıdalarda Kullanımı

Fenolik bileşikler, gıda kalitesi üzerinde burukluk, acılık (bitterness), ekşilik, tatlılık gibi tat özelliklerinin yanı sıra; tat, aroma ve renk oluşumunda da etkilidir. Kateşinler gıdalarda mikrobiyal oksidatif ve ısıl kararlılık sağlamaktadır (Aron ve Kennedy, 2008). Yapay antioksidanlar olan butillenmiş hidroksianizol (BHA), butillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve tersiyerbutilhidrokinon (TBHQ) gıda katkı maddeleri olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ancak kullanım güvenliği konusundaki endişeler doğal antioksidanlara olan ilginin artmasına neden olmaktadır (Wanasundara ve Shahidi, 1998).

Çay flavanoidlerinin et, tavuk ürünleri, balık ve sebze yağları gibi gıda sistemlerinde özellikle antioksidan katkı maddeleri olarak kullanıldığı bilinmektedir (Yılmaz, 2006). Örneğin yağlarda ve yağlı gıdalarda kateşinlerin kullanılması ile lipid oksidasyonunun engellenmesi sonucunda bu gıdaların oksidatif stabilitesi artırılmaktadır (Gramza ve Korczak, 2005).

Farklı çeşit etler değişik miktarlarda yağ asiti içerdiklerinden dolayı lipid oksidasyonuna duyarlılıkları farklıdır (Weisburger and Chung, 2002). Örneğin dana eti lipid oksidasyonuna duyarlılığı en az olandır ve ördek, devekuşu, domuz ve tavuk onu izler (Tang vd., 2001). Yeşil çay kateşinleri lipid oksidasyonunu önlemek için et ve et ürünlerine uygulanmıştır (Vuong vd., 2011). Biberiye ekstraktı ve yeşil çay ekstraktı

uygulanmış etlerde yapılan bir çalışmanın bulguları Şekil 1.8’de verilmiştir (Senanayake, 2013). Yeşil çay kateşin ekstraktının oldukça etkin bir koruma sağladığı açıktır.



Şekil 1.8. Ezilmiş çiğ etin biberiye ve yeşil çay ekstraktı ilavesinden sonra kontrol grubuyla karşılaştırılması

Ayrıca çay ekstraktının geniş bir aralıktaki patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği, fermentasyon öncesinde katılması ile son ürünü patojen ya da istenmeyen bakterilere karşı koruyabileceği de bildirilmektedir (Jaziri vd., 2009). Çayın yoğurt üretimi sırasında yaratacağı değişiklikleri belirlemek amacı ile yürütülen bir çalışmada, çay flavanoidlerinin laktik asit bakterilerine olumsuz bir etkisinin bulunmadığı, fermentasyonu ve altı hafta boyunca canlı bakteri sayısını olumsuz etkilemediği belirtilmiştir (Jaziri vd., 2009). Literatürde yoğurda yeşil çay, limon, çilek özü ilavesi gibi çalışmalar da mevcuttur (Jimenez vd., 2008). Fenolik bileşiklerin, et ürünlerine antioksidan, β -Lg köpüğüne stabilizer, süte antifungal ve gıdalara esmerleşme ürünlerini engellemek amacı ile katıldıklarına dair bilimsel çalışmalar mevcuttur (O’Connell ve Fox, 1999).

1.7.3. Dünyadaki Pazarı

Çay ve çay atıklarından izole edilebilecek kimyasalların miktarı azımsanmayacak kadar önemlidir. Yeşil çayın %7-8 kateşin içeriği üzerinden düşünüldüğünde önemli

miktarda kateşin elde edilebilir. Dünya pazarında yeşil çay kökenli kateşinlerin payı ve kateşin içerikli ürünlerin satış fiyatları araştırıldığında oldukça çarpıcı veriler elde edilmiştir. Pek çok farklı marka içinde belli oranlarda kateşin içeren ürünleri içerik miktarına göre değişen fiyatlarla piyasaya sunmaktadır. Ancak pazarın büyük bir bölümü Çin'in egemenliği altındadır. Tablo 1.6'da bazı ticari ürünler ve fiyatları bulunmaktadır (URL-4, 2011).

Tablo 1.6. Bazı ticari ürünler ve fiyatları

Super Green Tea, 90 softjel, 12\$
Shogun Imperial Green Tea, 335 mg, 150 tablets, 19\$
Applied Nutrition Green Tea Fat Burner with EGCG - 200 Softgels, 25\$
Mega-T Green Tea 30 Caplet with Hoodia, 8\$
Maximum Intenational Hoodia 500 with Green Tea, Veggie Caps, 120-Count Bottle, 36\$
AOR EGCG MAX 700mg epigallocatechin gallate - 90 vcaps, 46 \$
Xian Ruiren Biologic Products Co., Ltd. (Ruiren), 10-120\$ kg
Sigma Aldrich 5g'lık 1 kutu sentetik kafein 21 Euro

Bu pazar göz önüne alındığında Türkiye gibi çay üreticisi olan bir ülkede çay yan ürünlerinin değerlendirilmesi hem Türk çayının tanıtılması hem de çay dışı ürünler pazarında yerini alması için önemli bir başlangıç olacaktır. Yeşil çay kateşinlerinin dünya pazarındaki yeri ve yıllık potansiyeli hakkında en önemli veriler European Green Tea Extracts (GTE) Markets başlıklı bir raporla Research and Markets tarafından yayınlanmıştır (URL-5, 2011). Ticari olarak kateşin türevlerini satan firmalar istenen miktara ve kaliteye göre fiyat seçenekleri sunmaktadır. Özellikle bu pazarda kateşin türevleri farklı formülasyonlarla birlikte yağ yakıcı tabletler olarak tanıtılmakta ve sağlık ürünleri ve günlük yaşam destekleri içinde gösterilmektedir.

Diğer bir endüstriyel ürün olan kafeinin en yaygın kullanım alanı gıda sektörüdür. Kolalı içecekler için giderek artan kafein ihtiyacı, günümüzde genellikle sentetik yöntemlerle karşılanmakta ise de, tarıma dayalı ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de çay ve çay atıklarından üretimi, giderek önem kazanmaktadır. Bunun dışında özellikle kozmetik sanayinde ve ilaç sektöründe de tercih edilen bir ürün haline gelmiştir. Kafein ilaç endüstrisinde saf halde ya da karışım olarak kullanılır. En çok kafein-sodyum benzoat, kafein-sodyum salisilat ve kafein sitrat şeklinde kullanılmaktadır. Ayrıca piyasada 30 mg

kafein içeren aspirin ve kafein tabletleri (350 mg salisilik asit+30 mg kafein) bulunmaktadır.

Özellikle enerji içeceklerinin üretiminde giderek artan bir potansiyele sahiptir. Enerji içecekleri ABD'nin meşrubatlarda düzenlediği değerleri aşan (200 ppm veya yaklaşık 6 mg/ons) yeni bir içecek kategorisi özelliği göstermektedir. Örneğin Red Bull 80 mg/250 mL kafein içermektedir. Bu yönüyle önemli bir endüstriyel hammadde adayıdır. Sadece ülkemizde kullanılmak amacıyla her yıl yaklaşık 50 ton kafein ithal edilmektedir.

1.8. Çay Fenolik Bileşiklerinin Ekstraksiyonunda Kullanılan Yöntemler

Fenolik bileşiklerin izolasyonunda ayrılmak istenen gruplara bağlı olarak pek çok farklı yöntem uygulanmaktadır. Bitkilerden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu, matriks etkisinin yanısıra bitkinin kimyasal yapısı, partikül boyutu, saklanma koşulu/süresi ve ekstraksiyon yönteminden etkilenir. Bu tez kapsamında uygulanan ekstraksiyon yöntemleri ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

1.8.1. Çözücü Ekstraksiyonu

Fenolik bileşiklerin çözünürlüğü kullanılan çözücünün polaritesine bağlıdır. Genellikle %60-80 (v/v) oranında sulandırılmış aseton, etanol, etil asetat veya metanol çözeltileri veya çözelti karışımları kullanılır. Uygun bir ekstraksiyon sistemi ile birlikte kullanıldığında bu çözelti sistemleri bitki hücre duvarını parçalar. Sulu metanol çözeltileri özellikle fenolik asitler ve flavonoidlerin meyve ve sebzelerden ekstraksiyonu için kullanılmaktadır. Çünkü bu bileşikler metanol çözeltileri içinde oldukça kararlardır. Örneğin, flavon ve flavonollerin metanol içinde +4 °C' de üç aydan daha fazla kararlı kalabildiği rapor edilmiştir (Hertog vd., 1992; Häkkinen, 2000).

Organik veya inorganik çözücülerin kullanıldığı demleme (maserasyon) veya sokslet ekstraksiyon yöntemleri geleneksel yöntemlerdir.

Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda ilave edilebilecek diğer önemli bir aşama da seçimli ekstraksiyondur. Seçimli ekstraksiyon fenolik bileşiklerin alıkonabilecekleri aktif gruplar içeren katı faz kartuşları kullanılarak yapılabileceği gibi fenolik bileşikleri farklı bir faza kuvvetli şekilde çekebilecek çözücü sistemleri ile de yapılabilmektedir. Fenolik

bileşiklerin bitki matrisinden ekstraksiyonunda en yaygın olarak etil asetat ve dietil eter kullanılır (Kader vd., 1996; Endale vd., 2005; Kim vd., 2006). Dietil eter ve etil asetatın ekstraksiyonu da bileşiklerin türüne göre değişmektedir. Bu organik çözücülerin ardışık olarak birlikte kullanımı sayesinde fenolik asitler ve flavonoidlerin birlikte ekstraksiyonu mümkündür. Sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniğinin avantajı; daha az enerji tüketimi ve geniş kapasitesidir. Fakat etil asetat, propil asetat, kloroform ve diklorometan gibi fazla miktarlarda organik çözücünün ekstraksiyonda kullanılması, son üründe belirlenemeyecek eser miktarlarda çözücünün kalmasına ve gıda sağlığında tehditlere yol açar.

Bitkilerden elde edilen fenolik ekstraktlar çözücü sistemde çözünebilen farklı fenolik bileşiklerin bir karışımıdır. Bu nedenle istenmeyen fenoliklerin, vaks, yağlar ve terpenler gibi fenolik olmayan grupların uzaklaştırılması için ekstraksiyonda ilave aşamalar gereklidir (Naczek ve Shahidi, 2004). Pek çok fenolik bileşik doğal olarak glikozitleri veya esterleri şeklinde bulduklarından numune hazırlama kısmında alkali, asidik veya enzimatik hidroliz işlemi serbest fenoliklerin izole edilebilmesi için gereklidir.

1.8.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

Sıvı-sıvı ekstraksiyonunda oluşan tehditleri azaltmak amacıyla son yıllarda yeşil/temiz ekstraksiyon (green extraction) tekniklerinin kullanımı artmıştır. Bu tekniklerden biri olan süperkritik akışkan yöntemi hem organik çözücü olmaksızın yapıldığı hem de yüksek basınç kullanarak ekstraksiyon süresini kısalttığı için tercih edilen yöntemlerin başında gelir.

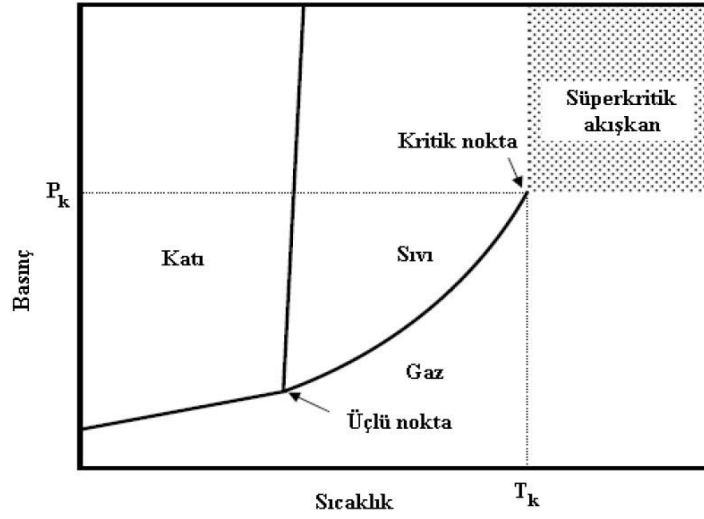
Baron Charles Cagniard de la Tour 170 yıl önce kritik sıcaklığın üzerinde bir maddenin akışkan olarak bulunduğunu deneylerle göstermiştir (Clifford, 1999). Son 20 yılda süperkritik akışkan teknolojisinin uygulamaları ekstraksiyon ve kromatografi alanlarında olmuştur (Sun, 2002). Ayrıca birçok bilimsel araştırmada bileşiklerin doğal kaynaklardan izolasyonunda süperkritik koşullardan yararlanılmıştır. Geleneksel ekstraksiyon tekniklerine göre daha fazla avantajı olan süperkritik akışkan ekstraksiyonu ayarlanabilen akış gücü ile doğru orantılı olarak daha kolay bir yöntemdir. Ekstreden çözücünün uzaklaştırılması gibi oldukça uzun ve yorucu problemler de ortadan kalkmış olur (Reverchon, 2006).

1.8.2.1. Süperkritik Akışkanların Tanımı

Bir maddenin, basınç-sıcaklık faz diyagramında gaz-sıvı denge eğrisi üzerinde ileriye doğru hareket edilecek olursa, sıcaklık ve basıncı artar. Isıl genleşmeler nedeniyle, sıvının yoğunluğu azalırken basıncın artmasından dolayı gazın yoğunluğu artmaya başlar. Giderek iki fazın yoğunlukları birbirine yaklaşır, gaz ve sıvı arasındaki fark kaybolur ve eğri bir kritik noktaya gelir. Bu noktada madde artık “akışkan” olarak adlandırılır. Kritik sıcaklık artan basınçla gazın sıvıya dönüştüğü en yüksek sıcaklık, kritik basınç ise sıvının sıcaklığının artırılmasıyla sıvının gaza dönüştüğü en yüksek basınçtır. Maddenin sıcaklığı kritik sıcaklığının (T_k), basıncı ise kritik basıncının (P_k) üzerine çıkıldığında katı, sıvı ve gaz fazlarından daha farklı, yeni bir bölge ortaya çıkar ve bu bölgedeki akışkan “süperkritik akışkan” olarak tanımlanır. Süperkritik akışkanların kullanılmasıyla değerli bileşenlerin ekstraksiyonu veya maddelerin uzaklaştırılmasına süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SFE) denir (Taylor, 1996; Arai, 2002; Çalimli, 2003). Süperkritik akışkan farklı gaz türlerinden elde edilebilir. Bu gazlar ve süperkritik akışkan özellikleri Tablo 1.7.’de CO₂’in basınç-sıcaklık diyagramı ise Şekil 1.9’da görülmektedir.

Tablo 1.7. Süperkritik akışkan özellik gösteren maddeler

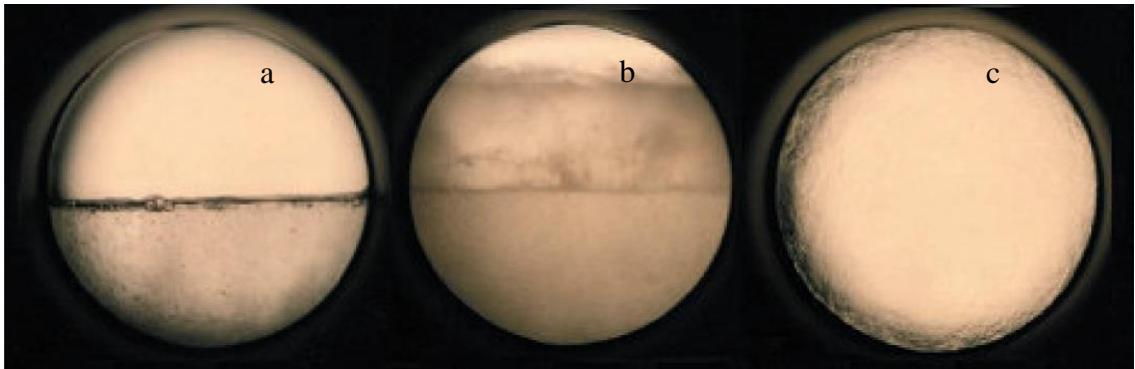
Çözücü	T_k (K)	P_k (MPa)	ρ_k (kg/m ³)
Etilen	282,5	5,0	220
Karbondiyoksit	304,1	7,4	470
Etan	305,4	4,9	200
Propan	369,9	4,3	220
Amonyak	405,4	11,3	240
n-pentan	469,6	3,4	240
Metanol	512,7	8,1	270
Toluen	591,8	4,1	290
Su	647,7	22,1	320



Şekil 1.9. CO₂ için basınç-sıcaklık diyagramı

Akışkanın yoğunluk, difüzyon, dielektrik sabiti ve viskozite gibi fizikokimyasal özellikleri faz sınırlarını geçmeden sıcaklık ve basınçtaki değişimlerle rahatlıkla kontrol edilebilir (Sihvonen, 1999; Noon, 2007). Kritik nokta yakınında sıcaklık veya basınçtaki küçük değişiklikler yoğunluğu, buna bağlı olarak da akışkanın çözme gücünün büyük oranda değiştirilebilmesi ile daha etkin çözünürlük sağlamaktadır.

Sıvı ve gaz fazları arasındaki ayrımın kritik noktaya ulaşıldığında ortadan kalkması Şekil 1.10'da verilmiştir. Sıvı-gaz sistemindeki ayrım Şekil 1.10-a'da açıkça ayırt edilebilirken sistemin sıcaklık ve basıncının artırılmasıyla daha az fark edilir (b). Bu durum iki fazın yoğunlukları arasındaki farkın azalmasından kaynaklanır. Süperkritik akışkan oluştuğunda ayrım tamamen ortadan kalkar ve sistem homojen hal alır (c) (Oakes, 2001).



Şekil 1.10. İki faz bölgesindeki CO₂'in artan basınç ve sıcaklıkla süperkritik hale geçişi

Süperkritik akışkanın fizikokimyasal özellikleri Tablo 1.8.'de verilmiştir (Brunner, 2005).

Tablo 1.8. Yoğunluk, viskozite ve difüzyon değerlerinin değişimi

Özellik	Sıvı	Süperkritik Akışkan	Gaz
Yoğunluk (g/cm ³)	0,6-1,6	0,2-0,5	(0,6-2,0)x10 ⁻³
Viskozite (g/cms)	(0,2-3,0)x10 ⁻²	(1,0-3,0)x10 ⁻⁴	(0,6-2,0)x10 ⁻⁴
Difüzyon (cm ² /s)	(0,2-2,0)x10 ⁻⁵	0,7x10 ⁻³	0,1-0,4

Süperkritik akışkan yoğunluk bakımından sıvılara, viskozite ve difüzyon özellikleri bakımından da gazlara benzer (Mukhopadhyay, 2000). Yoğunluğun artması ile süperkritik akışkanların çözme gücü artmakta ve gazlara göre daha fazla madde çözebilmektedir. Süperkritik akışkanların difüzyonunun artması ve viskozitenin azalması gibi özellikleri sayesinde katı yapıdaki gözeneklerde gazlar gibi kolayca difüze olmakta ve çözme güçleri artmaktadır (Şanal, 2004). Ayrıca akışkanın sahip olduğu düşük viskozite pompalama sırasında daha az enerji gerektirirken kısa süre içinde gerçekleşen ekstraksiyonda çözünenin geri kazanımı da çok yüksektir.

Karbondioksitin kritik sıcaklığının ($T_k=304,1$ K) ve kritik basıncının ($P_k=7,4$ MPa) düşük olması, yanıcı ve zehirli olmaması, diğer organik çözücülere göre çevreye zarar vermemesi özelliklerinden dolayı bu tür çalışmalarda tercih edilen bir çözücüdür. Ayrıca karbondioksitin ekstraksiyon sonunda sistemden kolaylıkla ayrılması ve geride atık bırakmaması da önemli bir kolaylıktır (Çalımlı, 2003). Karbondioksit geleneksel organik çözücülerle kıyaslandığında yüzey gerilimi oldukça düşük, yayınlığı büyük ve viskozitesi düşüktür. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu için gerekli ticari CO₂, gübre endüstrisi ve fermantasyon proseslerinden yan ürün olarak temin edilir. Bu yüzden çözücü olarak kullanımı atmosferde bulunan CO₂ miktarında hiçbir artışa neden olmadığından süperkritik çözücü olarak kullanımı fazladan bir “sera gazı etkisi” yaratmaz (Mukhopadhyay, 2000).

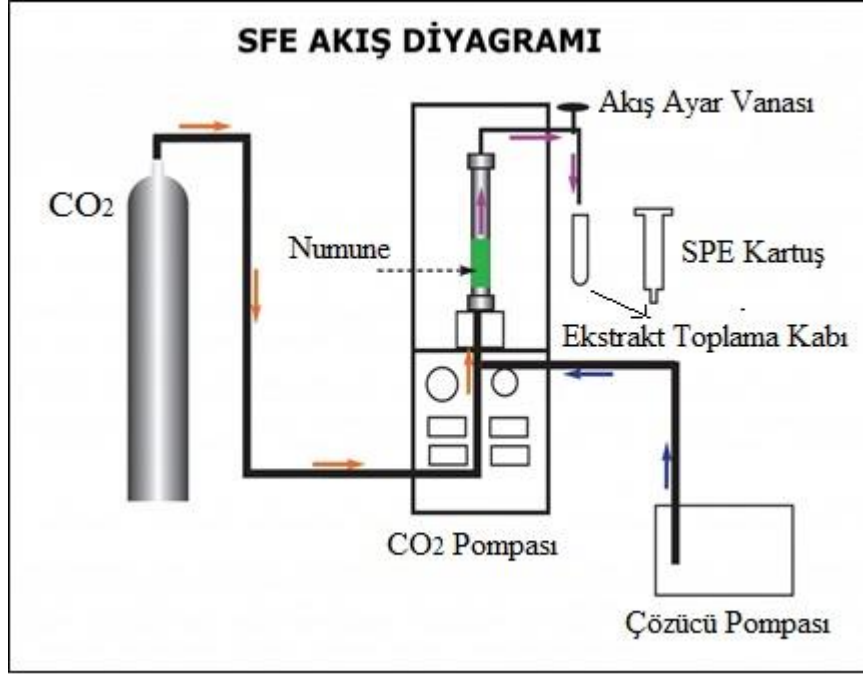
CO₂' in çözme gücünü etkileyen diğer bir parametre de polaritesidir. CO₂ zayıf polaritedeki çözücülere benzemektedir ve bu nedenle apolar çözücüler grubunda yer alır. Ancak moleküler yapısı nedeniyle alkol, ester, aldehit gibi organik polar maddeleri sınırlı oranda çözebilmektedir. CO₂' in düşük dielektrik sabitinin neden olduğu zayıf polariteyi arttırmak için polaritesi yüksek maddeler eklenebilir. Bu tür maddeler yardımcı çözücü

(modifiyer) olarak adlandırılır (Şanal, 2004). Genellikle bileşenlerin CO₂ ile ekstre edilebilirliği bileşikte bulunan fonksiyonel grupların varlığına, molekül ağırlıklarına ve polaritelerine bağlıdır (Mukhopadhyay, 2000). Çözünenin uçuculuğu ne kadar yüksek olursa o kadar kolay ayrılır ve molekül kütlesi arttıkça çözünürlük azalır (Özkal, 2004).

1.8.2.2. Süperkritik Akışkanların Uygulama Alanları

Süperkritik akışkan süreçleri, bilimsel ve teknolojik açıdan hızla gelişen bir alan haline gelmiştir (McHugh ve Krukonis, 1986). Son yıllarda, Almanya başta olmak üzere ABD ve Japonya'da bu konuyla ilgili çalışmalar yoğun bir şekilde yürütülmektedir. Çözünürlüğünün ayarlanabilir olmasından dolayı, süperkritik akışkanlar (başta süperkritik karbondioksit olmak üzere) ayırma ve saflaştırma, kromatografi, polimerizasyon ve fraksiyonlama, tanecik tasarımı, biyoteknoloji, yağların modifikasyonu, suların arıtılması gibi çok değişik uygulamalarda geniş bir kullanım alanına sahiptir. Özellikle, doğal ürünlerin süperkritik akışkan kullanılarak ekstrakte edilmesine, fraksiyonlanmasına veya saflaştırılmasına dayalı olarak son 20 yıl içerisinde gerçekleştirilmiş araştırmalardan ve süreç geliştirme çalışmalarından elde edilen ümit verici sonuçlar araştırmacıları ekstraktif olmayan uygulama alanlarında da yoğun araştırmalara yöneltmiştir (Dinçer vd., 1998). Süperkritik akışkan uygulamaları endüstride daha çok doğal maddelerin ekstraksiyonu, kahveden kafeinin giderilmesi, bitki tohumlarından yağ ekstraksiyonu, kömür ve petrolden kimyasal maddelerin ekstraksiyonu gibi süreçlere yoğunlaşmıştır (Sunol ve Beyer, 1990; Aktaş ve Olcay, 1996; Lepilleur vd., 1997; Cansel vd., 2003).

SFE sisteminin şematik gösterimi Şekil 1.11.'de verilmiştir.



Şekil 1.11. SFE akış diyagramı (URL-6, 2014).

Yukarıda anlatılan özelliklerinden dolayı endüstriyel uygulamalarda kullanıma yönelik önemli çalışmalar mevcuttur (Huang vd., 2007; Kim vd., 2007; Park vd., 2007).

1.9. Çay Fenoliklerinin Analizinde Kullanılan Yöntemler

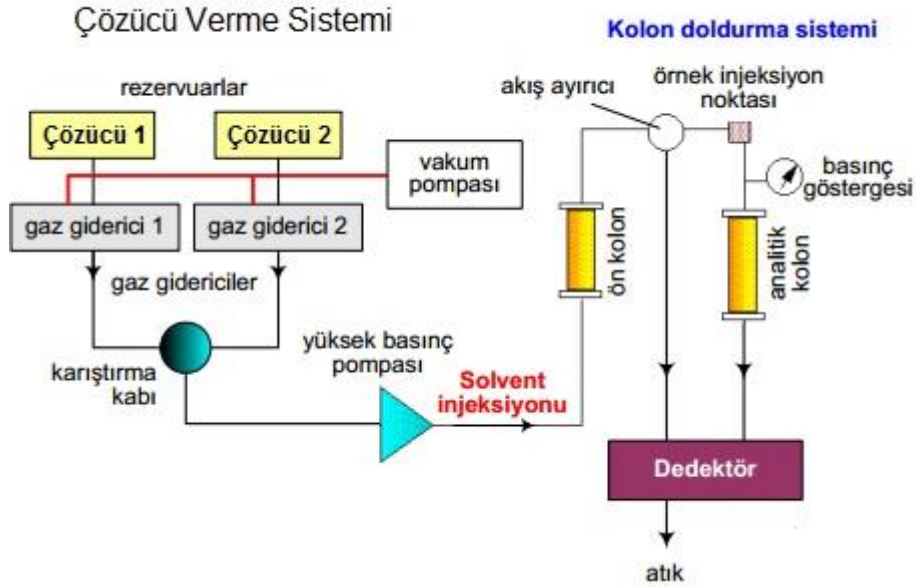
Kromatografi bir karışımda diğer yöntemlerle ayrılmaları zor olan benzer özellikli bileşenlerin ayrılması, tanımlanması veya nicel ölçümlerinin yapılmasına olanak sağlayan yöntemler topluluğudur. Tüm kromatografik ayırmalarda numune bir gaz, sıvı ya da süperkritik akışkan olabilen hareketli bir fazda çözülür. Ardından bu hareketli faz uygun bir sabit faz boyunca geçirilir. Bu iki faz öyle seçilir ki numunenin bileşenleri hareketli faz ve sabit faz arasında kendiliklerinden farklı derecelerde dağılırlar. Sabit faz tarafından güçlü bir şekilde tutulan bileşikler hareketli fazın akışıyla yavaşça hareket ederken sabit faz tarafından zayıfça tutulan bileşikler hızlıca hareket ederler. Hareketlilikteki bu farklılıkların bir sonucu olarak numunenin bileşenleri birbirinden ayrılarak kalitatif ve/veya kantitatif olarak analiz edilebilir (Skoog vd., 1998). Kromatografi hareketli fazın özelliklerine, hareketli fazla sabit fazın temas şekline veya bileşenlerin birbirinden ayrılma mekanizmasına göre sınıflandırılır.

Bitkilerin uçucu bileşenleri genellikle gaz kromatografisiyle analizlenirken daha büyük moleküler yapıları fenolik bileşikler genellikle sıvı kromatografisiyle (HPLC) analizlenir. Çay ekstraksiyonu ürünleri genellikle suda çözünen orta polar karakterli bileşikler sınıfında olduğu için analizleri genellikle yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile gerçekleştirilir.

1.9.1. Yüksek-Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek-performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) özellikle biyolojik, farmakolojik, besinsel, çevresel ve endüstriyel v.b. numunelerde organik ve anorganik bileşiklerin ayrılma ve belirlenmesi için uygulanan analitik bir tekniktir. Numunelerdeki bileşikler sıvı hareketli faz ve sabit faz arasında dağılım davranışlarındaki farklılıklardan dolayı kolon boyunca farklı hızlarda göçerler.

HPLC cihazları bir hareketli faz deposu, bir pompa, bir enjektör, bir ayırma kolonu (seçimli ön-kolon), bir kolon ısıtıcısı, bir dedektör ve bir integratör veya bilgisayarlı dijital sinyal alıcısı içerirler. HPLC cihazının genel bir görüntüsü Şekil 1.12’de verilmiştir.



Şekil 1.12. HPLC cihazının genel görüntüsü (URL-7, 2014).

Ultraviyole dedeksiyonu ile birlikte RP-LC (ters faz-sıvı kromatografisi) bitki ekstraktlarının fenolik bileşimleri için seçilen bir yöntemdir. Fenollerin ayrılması genellikle metanol (MeOH) veya asetonitril (CH_3CN , ACN) ve modifiye edici olarak az miktarda asit içeren su hareketli fazlarıyla çalışan C18 kolonlarında gerçekleştirilir. Mobil fazda fenolik asitlerin protonlaşmalarını önlemek için formik asit (HCOOH), asetik asit (AcOH), trifloroasetik asit (TFA) ve fosforik asit (H_3PO_4) gibi asitler modifiye edici olarak kullanılırlar ve böylece pik şekli ve çözünürlüğün iyileştirilmesi sağlanır (Wu vd., 2004).

On-line UV spektrum bileşiklerin tanımlanmasını kolaylaştırırken, diyot serili dedektörler (DAD) seçicilik ve duyarlılığı optimize etmek için farklı dalga boylarının eş zamanlı olarak görüntülenmesi için kullanılırlar. RP-LC-DAD (ters faz-sıvı kromatografisi-diyot serili dedektör), pek çok fenolik bileşik için güçlü bir analiz yöntemi olarak gösterilmiştir. Fakat yine de UV dedeksiyonu belli uygulamalar için yeterince duyarlı ve spesifik değildir.

Çay fenoliklerinin HPLC ile analizleri konusunda yüzlerce çalışma mevcuttur. Çay kökenli flavonoidlerin analizinde yegâne teknik olarak tanımlanabilir.

1.9.2. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

İnce tabaka kromatografisi, bir katı-sıvı adsorpsiyon kromatografisidir. Bu yöntemde sabit faz, çeşitli materyallerden yapılmış cam plakalar üstüne (cam, alüminyum, polimer) ince bir tabaka halinde kaplanmış katı adsorban maddedir. Adsorban madde olarak kolon kromatografisinde de kullanılan tüm sabit fazlar (poliamid, alümina, silika jel, selüloz vb.) kullanılabilir.

Maddelerin kolay, hızlı ve kesin taranması ve ucuz olması sebebiyle geleneksel TLC, gıda, çevre, ilaç, bitki ve metabolizma gibi pek çok alanda yaygın olarak kullanılan bir tarama tekniğidir. Ancak geleneksel yöntem çoğunlukla sınırlı analiz gücüne sahip ve çoğunlukla nitel analiz için kullanılır. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HP-TLC), geleneksel TLC'yi model olarak geliştirilmiş ve nicel analiz yapabilen modern bir analitik cihaz haline almıştır. Günümüzde plaka ve cihaz alanında meydana gelen teknolojik gelişmeler, sistemin ayırım sağlamadaki performansını arttırmış ve 1980 sonrası densitometre ünitesinin sisteme kazandırılmasıyla oldukça yüksek hassasiyette, kesin ve hızlı miktar analizi yapabilen bir teknik olarak, son zamanlarda analitik uygulamalarda yerini almıştır. Oldukça basit olan bu kromatografi tekniğinin standardize edilmesi ile

kullanım alanları daha da artmıştır. Özellikle bitkisel araştırmalarda, çevre analizlerinde, gıda güvenliğinde, klinik uygulamalarda, metabolizma çalışmalarında, farmasötik uygulamalarda kullanılmaktadır.

Tekniğin uygulandığı ve yarı otomatize olan bu sistem, tek bir yazılım ile bilgisayar tarafından kontrol edilen ve farklı işlemlere sahip cihazlardan oluşur. Bu cihazlardan ilki plakaya en az 36, en çok 72 numune tatbik edebilen, robotik bir şırınga sistemine sahip örnekleyicidir. Uygun şekilde yerleştirilen vialler içindeki numunelerin, belirlenen miktarda ve bilgisayar kontrolü ile plakaya x-y düzleminde, uygun mesafelerde azot gazı altında bant veya nokta şeklinde uygulanmasını sağlar. Örnekler bu yolla plaka yüzeyine uygulandıktan sonra plaka yürütme tankına ayırım işleminin gerçekleşmesi için bırakılır. Daha sonra plaka, ayırımı gerçekleştiren lekelerin densitometrik olarak değerlendirilmesi için üçüncü cihaz olan tarayıcı ünitesine (TLC Scanner3) uygun şekilde yerleştirilir. Densitometri, plaka üzerindeki her bir lekeye gönderilen ışığın şiddetinden, yansıyan ışığın şiddeti çıkartılarak elde edilen spektrumdan bileşenin derişimine, ilişkin bilgi sağlar.

HP-TLC ile çay ekstraktlarının analizi konusunda sınırlı sayıda çalışma rapor edilmiştir. Bunlardan en önemlisi Wang vd., (2009) tarafından kateşinlerin analizi için yapılan optimizasyon yöntemidir.

1.9.3. Kolon Kromatografisi

Kolon kromatografisi bileşenlerin birbirinden ayrılmasında ve saflaştırılmasında uygulanan bir yöntemdir. Bu kromatografide sabit faz olarak poliamid, silikajel, selüloz, alümina, zeolit, kalsiyumkarbonat v.b. gibi aktif yüzeyli maddeler, hareketli faz olarak da organik çözücüler kullanılır.

Çaydan ekstre edilen fenolik bileşikler özellikle de kateşinlerin saflaştırılması ile ilgili önemli çalışmalar literatürde mevcuttur (Amarowicz vd., 2003; Lai vd., 2008; Ye vd., 2011). Özellikle poliamid sabit fazlar üzerinden etanol-su karışımlarının farklı oranları kullanılarak kateşinlerin izolasyonu üzerine patentli bir yöntem mevcuttur (Bailey, 1999).

1.10. Çalışmanın Amacı ve Literatür Özeti

Çaydan içimlik ürünler dışında katma değeri olan kimyasallarda elde edilmekte ve dünya piyasalarında bu kimyasallara artan bir talep vardır. Kateşin ve kafein gibi çay ekstraktları özellikle yiyecek-içecek endüstrisinde katkı maddesi olarak birçok alanda geniş kullanıma sahiptir. Çaydan fenoliklerin izolasyonları ve çeşitli yapı aydınlatma yöntemleriyle analizleri üzerine pek çok çalışma literatüre kazandırılmıştır. Bu çalışmalar bitkinin biyolojik aktiviteye sahip ikincil bileşenlerinin tayin edilmesi amacıyla yapıldığı gibi kemosistemik açıdan bitkinin incelenmesi için de önem arz etmektedir. Bugüne kadar yapılmış çalışmaların çoğu Çin ve Hindistan türleriyle ilgilidir. Türk çayı ile ilgili sadece birkaç çalışma mevcuttur. Bu çalışmaların çoğu; çeşitli kalitede siyah çay türlerinin antioksidan aktivite, toplam fenol içeriği, vitaminler, mineraller, elementel içerikleri, teafavin ve teanin içeriklerini konu almaktadır. Türkiye çay üretiminde dünyada beşinci sıradadır ve 2013 yılı rakamlarına göre 1,5 milyon ton çay üretilmiştir. Üretilen çayın büyük bir kısmı geleneksel içecek olan siyah çay için kullanılmakta olup yalnızca çok küçük bir kısmı yeşil çay olarak üretilmektedir. Bölgede üretilen çayların kateşin ve kafein içerikleri ile bunların etkin ekstraksiyonu için uzun vadeli izleme ve analizlerine dair bilimsel veriler mevcut değildir.

Bu tez çalışması SAN-TEZ projeleri kapsamında Doğu Karadeniz Bölgesinde yetiştirilen çaylardan önemli kimyasalların izolasyonuna odaklanmıştır. SAN-TEZ projelerinin temel unsuru bölge ekonomisine katkıda bulunabilecek bilimsel çalışmaları desteklemektir. Bu amaçla %75'i Sanayi Bakanlığı %25'i ise yararlanıcı firma tarafından oluşturulan bütçe doğrultusunda ekonomiye katkı sağlayacak yöntem veya üretim sistemleri oluşturulur. Bu projeler yeni yöntemlerin geliştirilmesine yönelik olabildiği gibi mevcut durumun belirlenmesi ve yeni stratejilerin oluşturulmasına yönelik de olabilir. Bu hedeften yola çıkarak bölgedeki özel çay fabrikalarının desteği ile 2011-2014 yılları arasında "Yeşil Çaydan Kateşinlerle Diğer Ürünlerin Makro Boyutta İzolasyonu" başlıklı 00932.STZ.2011-1 proje hayata geçirilmiştir. Bu doğrultuda 2012-2014 yılları arasında üç toplama sezonunda yapılan örneklemeler ile hem toplama sezonları hem de birbirini izleyen üç yıllık süreçteki içerik değişimlerinin belirlenmesi hedeflenmektedir. İçerik tespitlerinin beraberinde kafein ve kateşin izolasyonu için etkili, kolay uygulanabilir ve ekonomik bir ekstraksiyon/izolasyon tekniğini de oluşturmaktır.

Öncelikli olarak literatürde mevcut olan ve optimize edilmiş metodlar kullanılarak Türk yaş çay ve çay atıklarından kafein ve kateşinin izolasyon şartları belirlenecektir. Toksik organik çözücü kullanılmaksızın süperkritik akışkan ekstraksiyon ile ardışık olarak kafein ve kateşinlerin ekstraksiyonu için yeni bir yöntem geliştirilerek geleneksel yöntemlerle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışma sonucu elde edilen yöntemle yaş çay ve çay atıklarından kafein ve kateşin karışımlarının ayırımını ve bu ekstraktların kantitatif analizlerini de içerir. Tüm çalışmalarda yaş çay, işlenmiş siyah çay atığı ve üretim sırasında açığa çıkan diğer bir atık olan kafein tozu örneklerinin kafein ve kateşin içeriklerinin belirlenmesi ana hedeftir. Ülkemizde yaş çay üç sürümde toplandığından tüm örneklemeler aynı sürümlerde yapılmalıdır. Yaş çay örnekleri toplandıktan sonra üç farklı şekilde işleme tabi tutularak izolasyon çalışmaları yapılacaktır. Bu amaçla yaş çay örnekleri yaş (taze, YÇY), dondurulmuş (YÇD), ve kurutulmuş (YÇK) olarak ekstraksiyona tabi tutulacaktır. Böylece örneğin doğasından kaynaklanan değişimlerin etkin olup olmadığına dair veriler de elde edilebilir. Ekstraksiyon verimlerinden ziyade örnekten alınabilen kateşinlerin miktarları ayırmanın etkinliğini daha net gösterir. Bu nedenle yıllar arası, sürümler arası ve örnek tipine bağlı değişimleri değerlendirmek amacıyla kromatografik analizler yapılarak değerlendirme yapılacaktır.

Bütün bu yönleriyle değerlendirildiğinde Türkiye’de yapılan ilk çalışma olacaktır. Amacı ve çalışma hedefleri yukarıda açıklanan tez kapsamında kullanılan ekstraksiyon yöntemlerinin temel alındığı literatür verileri aşağıda özetlenmiştir. Literatür özeti öncelikli olarak çözücü ekstraksiyon tekniklerini daha sonra süperkritik ekstraksiyon tekniklerini ve son olarak da kromatografik analiz ve izolasyon çalışmalarını vermektedir.

Vuong vd., (2010) çaydan kateşinlerin ekstraksiyonu ve izolasyonu için kullanılan yöntemleri içeren önemli bir derleme yayınlamışlardır. Literatürde mevcut ekstraksiyon yöntemlerinin detaylarıyla tartışıldığı bu derlemede su ekstraksiyonu, organik çözücü ekstraksiyonu, mikrodalga ekstraksiyonu ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu gibi yöntemlerin yanı sıra kolon kromatografisi, katı-faz ekstraksiyonu, reçine adsorbsiyonu, membran ayırması gibi oldukça yeni yöntemler de açıklanmıştır.

Bronner ve Beecher (1998) tarafından yapılan bir başka çalışmada kateşinleri, siyah poşet çayı 237 mL kaynayan suya 3 dakika süreyle daldırarak, 0,25 gram Yasemin ve yeşil çay yaprakları ise 80 mL kaynayan suda 3 dakika karıştırarak ve 17 dakika karıştırmadan bekletilerek ekstre edilmiştir. HPLC kolonu C18 ters faz olarak seçilmiş olup, dedektör

olarak DAD kullanmıştır. Siyah çayda kateşin derişiminin EGCG>ECG>EGC>EC, yeşil çayda EGCG>ECG>EGC>EC ve Yasemin çayında EGCG>EGC>ECG>EC değiştii belirtilmektedir.

Dong vd., (2011) 10 g yeşil çay üzerine 300 mL saf su ilave ederek 80 °C de 40 dakika boyunca demlemişlerdir. Ekstrakt 110 mm süzgeç kağıdından süzüp üstte kalan çözeltiyi 200 mL etil asetatla üçer kez ekstrakte etmişlerdir. Organik faz ayrılarak 200 mL sitrik asit çözeltisiyle (derişimi 10 mg/L) üç kez ekstre etmişlerdir. Etil asetat fazı evapore edilip kateşin miktarı HPLC ile kantitatif olarak belirlenmiştir.

Vovk vd., (2005) yaptığı bir çalışmada ise 10 g yeşil çay 150 mL kaynayan suda bekletildikten sonra filtreden geçirilmiş ve 100 mL su fazı 40 mL kloroform ile ayırma hunisinde klorofilin uzaklaşması için ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Su fazı 2 kez 50 mL etil asetatla ekstrakte edilmiş ve etil asetat fazları birleştirilerek susuz sodyum sülfatla kurutulmuştur. Selülozla kaplanmış 20x20 cm TLC ve 10x20 cm HP-TLC plakaları ayırma için kullanılmıştır. Organik modifiyer olarak aseton, asetik asit, tetrahidrofur, asetonitril, etil asetat, metanol, etanol, 1-propanol, ve 1-bütanol kullanılmıştır. Plakalar 2 dakika boyunca ılık hava ile kurutulmuş ve 1 s süreyle vanilin-H₃PO₄'e daldırılmıştır. Farklı renkli bantlar, ayrılmış olan farklı bileşenleri temsil etmektedir. Selüloz absorbanın optikçe aktifliği kateşinlerin ayrılması için çok önemlidir.

Row ve Jin, (2006) organik çözücü ekstraksiyonunu Kore çayında kullanmışlardır. 3 g yeşil çay yaprağını 60 mL saf su ile 50, 80, 100 derecelerde 4 saat, 40 dakika ve 15 dakika 300 rpm'de karıştırılmasıyla ekstraksiyonları sağlanmışır. Sonra süzgeç kağıdından süzülerek, çay kalıntısı ayrılmış ve sulu faz su/kloroform (1:1 v/v) ile ekstre edilerek kafein kloroform fazına taşınmıştır. Su fazları su/etil asetat (1:1 v/v) ile yeniden ekstre edilerek kateşin bileşikleri etil asetat fazına taşınmıştır. MgSO₄ kullanılarak etil asetat fazı kurutulduktan sonra evapore edilmiştir. HPLC ile kantitatif analiz sonucu en yüksek verim 80°C'de 40 dakikada yapılan ekstraksiyonla elde edilmiştir. Analizde bir C18 HPLC kolonu kullanılarak (3,9x300mm, Waters Co., USA) izokratik ayırmada hareketli faz olarak %0,1 asetik asit su/asetonitril/etil asetat kullanılmıştır. Akış hızı 1 mL/dk, dedektör olarak 280 nm'de ölçüm yapılan UV kullanılmıştır. Bu çalışma, elde edilen kateşin ekstraktının bileşimini belirleme üzerinde yoğunlaşmıştır.

Bazinet vd., (2007) 10 g yeşil çay başlangıçta 300 mL saf suda demlemişlerdir. Demlemenin ilk basamağı termostatlı banyoda 50 °C'de 10 dakika boyunca yapılmıştır. Daha sonra çay yaprakları ortamdand alınıp yeni bir demleme için 80 °C'de 10 dakika daha

demlemeye maruz bırakılmıştır ve su fazları birleştirilmiştir. İki basamaklı ekstraksiyon prosedürü üç defa tekrarlanmıştır. Süzülen sulu ekstrakt kafeini uzaklaştırmak için önce kloroform ile daha sonrada kateşinleri ayırmak için etil asetatla ekstre edilmiştir. İçerik analizleri HPLC ile yapılmıştır.

Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi'nde Karadeniz ve Koca (2009) tarafından yapılan çalışmada ekstraksiyon için bir sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. 1 g siyah çay örneği 5 dakika 100 mL kaynayan saf suda bekletilmiş (sıcak su ekstraksiyonu) ve daha sonra HPLC ile analizleri yapılmıştır. Kolon 4.6mmx250mm Luna 5u C18 olarak seçilmiştir. Hareketli faz olarak %0,1 asetik asit içeren %30'luk metanol 1 mL/dk akış hızıyla kullanılmış ve 270 nm'de ölçüm yapılan UV dedektörü kullanılmıştır. Kromatografik pikler saf standartların alıkonma zamanlarıyla ve alanlarıyla karşılaştırılarak kateşinler kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmişlerdir. Çalışma siyah çayda toplam fenolik bileşen miktarı ve antioksidan madde miktarının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Bir başka çalışmada Wang vd., (2009) yeşil çay, siyah çay, oolong çayı ve pu-erh çayı örneklerinin 10'ar gramlık kısımlarını alarak 150 mL kaynayan suda bekleterek ekstre etmişlerdir. Filtrasyondan sonra 100 mL'lik su fazı 200 mL'lik etil asetatla ekstre edilmiş organik faz susuz sodyum sülfatla kurutulduktan sonra evapore edilmiştir. Bu çalışmada kateşin belirleme yöntemi olarak HP-TLC tercih edilmiş adsorban olarak poliamid ile kaplanmış 10cmx10cm TLC plakaları kullanılmıştır. Kateşin türlerinin (EC, C, EGC, ECG, EGCG) ayrımı en iyi n-bütanol-aseton-su 5:5:3 (v/v) hareketli fazı ile elde edilmiştir.

Goodarznia ve Govar (2009) yeşil çay yapraklarının "superheated water extraction" ile ekstraksiyonunu ve modellendirilmesini çalışmışlardır. (3×10^6 Pa) basınçta, 200 °C ve 2,5 dk'da en yüksek kateşin verimini elde etmişlerdir.

Huang vd., (2007) çeşitli basınçlarda ve sıcaklıklarda çay miktarını da değiştirerek ortama farklı modifiyerler ekleyerek yapraktan uzaklaştırılan kafein ve yaprakta kalan kateşin miktarına yönelik süperkritik akışkan ekstraksiyon metodu oluşturmuşlardır. 8 g çay örneği kullanarak 640 g CO₂'e, 6 g suyu modifiyer olarak ilave edip %73.9 kafeini ve kateşinlerin %66.8'ini ortamdan uzaklaştırmışlardır.

Kim vd., (2007) Kore yeşil çayından süperkritik akışkan ekstraksiyon yöntemiyle 40 MPa basınçta, 323 K sıcaklıkta ve %20,8 suyu modifiyer olarak kullandıkları bir sistemde kg çay başına 28,08 kg CO₂ geçirerek kafeinin %66'sını uzaklaştırmışlardır.

Park vd., (2007) süperkritik akışkan sisteminde modifiyer kullanarak 300 bar basınçta, 70 °C'de 2 saat boyunca %95 etanol ile kullanılan yeşil çaydaki kafeinin başlangıç içeriğini %2,6'sına kadar azaltmış ancak bu esnada %37,8 EGCG de ortamdan uzaklaştırmışlardır .

Süperkritik akışkan ekstraksiyon yöntemiyle yeşil çaydan kafeini ayırmak için Sun vd., (2010) bir yöntem önermiştir. 10 g yeşil çay 15 mL etanolü modifiyer (ortamın polaritesini artırmak için kullanılan yardımcı çözelti) olarak kullanan sistemde 80 °C'de, 2 saat boyunca, 1,5 L/dk CO₂'i, 300 bar basınç altında geçirerek ekstraksiyon yapmışlardır.

İçen ve Gürü (2010) çay atıklarından ve çay tozundan kafeinin izolasyonu için süperkritik akışkan sisteminde etanolün modifiyer olarak etkisini incelemişlerdir. 5,23 g etanol/100g CO₂ 3 saat boyunca 250 bar basınç altında dakikada 10 g CO₂ geçirerek ekstraksiyon yapmışlardır. Ortamdan %70,2 kafeini ve %6,2 kateşini uzaklaştırmışlardır.

Park vd., (2011) çay yapraklarından kafeinin uzaklaştırılması ve klorofil ve kafeinin ekstraksiyon davranışlarına yönelik süperkritik akışkan ekstraksiyon sistemini kullanarak 63 °C'de 23 MPa basınçta modifiyer olarak %95'lik etanolü 3 g/100 g CO₂ hızıyla kullanarak 2 saat boyunca ekstraksiyon yapmışlardır. Kafeinin %96,6'sını, kateşinlerin %40,61'ini ve toplam klorofil miktarının %43,09'unu izole etmişlerdir.

Amarowicz vd., (2003) yeşil çaydan kateşinlerin izolasyonları için silika jel kolon ve çözücü sistemi olarak (kloroform:metanol:su 65:35:10) kullanarak ikinci fraksiyonda EC, üçüncü fraksiyonda EC ve EGC, dördüncü fraksiyonda yalnızca EGC, beşinci fraksiyonda EGC, ECG ve EGCG ve son olarak altıncı fraksiyonda da EGCG'yi izole etmişlerdir. İkinci, üçüncü ve dördüncü fraksiyonlardaki EC ve EGC'yi preparatif C18 HPLC kolonu ve (su:dimetilformamid:metanol:asetik asit 157:40:2:1) çözücü sistemini kullanarak ayırmışlardır. Beşinci ve altıncı fraksiyonlardan EGC, ECG ve EGCG'yi ayırmak için (su:asetonitril:metanol:asetik asit 159:36:4:1) çözücü sistemini kullanmışlardır.

Lai vd., (2008) polar adsorban Amberlite XAD-7HP sabit fazıyla %20-50 arasında değişen oranlarda etanol-su kullanarak yeşil çaydan kateşinleri izole etmişlerdir. Kolondan hareketli faz geçirildikten sonra biriktirilip birleştirilen örnekler, uçurulduktan sonra toplam kateşinlerin %49'unu ve %28 EGCG'yi saf olarak izole etmişlerdir.

Ye vd., (2011) poliamid kolon dolgu maddesi kullanarak yeşil çaydan kateşinlerin izolasyonunu su ve %80'lik etanol kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Toplam kateşinlerin 670,808 mg/g'ını ve 1,828 mg/g kafeini içeren bir karışımı izole etmişlerdir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasallar

Laboratuvar çalışmaları boyunca kullanılan tüm kimyasal malzemeler analitik saflıkta olup kullanım amaçları ve markaları Tablo 2.1’de verilmiştir. Çalışmalarda çift distile saf su, teknik ve kromatografik saflıktaki çözücüler kullanılmıştır.

Tablo 2.1. Kullanılan kimyasallar, kullanım amaçları ve markaları

Kimyasal Adı	Kullanım Amacı	Marka
Etil asetat	Ekstraksiyon	Merck
Kloroform	Ekstraksiyon	Merck
Sitrik Asit	Ekstraksiyon	Sigma Aldrich
Metanol	HPLC hareketli fazı	Merck
N,N Dimetilformamid	HPLC hareketli fazı	Merck
Asetik asit	HPLC hareketli fazı	Sigma Aldrich
MgSO ₄	Kurutucu	Sigma Aldrich
Poliamid	Kolon Dolgu Maddesi	Macherey Nagel
Etil Alkol	Kolon Hareketli Fazı	Sigma Aldrich
CO ₂	SFE Hareketli Fazı	Habaş
FeCl ₃	TLC Renklendirme	Ak-kim
Aseton	TLC Hareketli Fazı	Sigma Aldrich
n-Bütanol	TLC Hareketli Fazı	Sigma Aldrich
Poliamid Tabaka	TLC Sabit Fazı	Tzshsl,Taizhou,China
(-)Epigallokateşin (EGC)	HPLC Standardı	Sigma Aldrich
(-)Epigallokateşin gallat (EGCG)	HPLC Standardı	Sigma Aldrich
(-)Epikateşin (EC)	HPLC Standardı	Sigma Aldrich
(-)Kateşin	HPLC Standardı	Sigma Aldrich
(-)Kafein	HPLC Standardı	Sigma Aldrich
Gallik Asit	HPLC Standardı	Sigma Aldrich
(-)Epikateşin gallat	HPLC Standardı	Sigma Aldrich

2.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmalar sırasında kullanılan cihazlar ve markaları Tablo 2.2’de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Kullanılan cihazların ve malzemelerin markaları

Cihaz Adı	Marka
Hassas terazi	Ohaus PA 214C
Ultrasonic banyo	Elma D-78224
Evaporatör	Heidolph
Vakum Pompası	ILMVAC
0,40 µm filtre	Gelman Scienses
HPLC	Hitachi Elite
HPLC kolonu	Agilent C18, 150mm (4,6x5 µm)
HPLC enjektörü	Hitachi L-2200
HPLC pompası	Hitachi L-2130
HPLC kolon fırını	Hitachi L-2300
HPLC DAD dedektör	Hitachi L-2455
Vakum filtresi	0,2 milipore
HPLC	LC-2010AHT, Shimadzu
HPLC kolonu	VP-ODS C18, 150mm (4.6x5µm)
Süperkritik akışkan ekstraktör	Applied Seperation
Süperkritik modifiyer pompa	Applied Seperation Series 1500
Süperkritik basınç pompası	Atlas Copco GX-4FF
Süperkritik Soğutucu	Applied Seperation Polyscience
HP-TLC	CAMAG (Muttenez, Switzerland) Linomat V
Tabaka Tarayıcısı	WinCATS software (CAMAG)
Parçalayıcı	Waring Commercial Blender
Süzgeç Kağıdı	110 mm Sartorius Stedim

2.3. Deneysel Çalışmalar

2.3.1. Örneklerin Toplanması ve Analize Hazırlanması

Deneysel süresince (2012-2013-2014 yılları) kullanılan yaş çay örnekleri, siyah çay atıkları ve kafein tozları Trabzon'un Sürmene ilçesinde bulunan SÜRÇAYSAN Anonim şirketi tarafından sağlandı. İklim, toprak, pestisit, sıcaklık, sulama gibi ikincil etkileri sabit tutmak amacıyla bütün örnekler aynı çay bahçesinden toplandı. Birinci sürüm Mayıs, ikinci sürüm Haziran ve üçüncü sürüm Temmuz ayında olmak üzere 2012, 2013 ve 2014 yıllarında sürüm döneminde örnekleme yapıldı. Yaş çay çalışmalarında üreticinin çay üretmek için toplama yaptığı toplama sistemi uygulandı. Çay bitkisinin üst kısmından 2,5 yaprak içeren uç bölgeden örnekler alındı. Örnekleme sonrasında temiz kuru bir torbaya alınan örnekler enzimatik bozunmadan kaçınmak için mümkün olduğunca hızlı bir şekilde

laboratuvara getirildi. Bu tip örneklemelemlerde canlılığı korumak için sıvı azot tankında veya soğutma yapılarak örnekleri taşımak uygundur. Ancak bu çalışma bir SAN-TEZ projesi kapsamında yürütüldüğü ve gerçek şartlarla uyumlu olmasına dikkat edildiği için özel koruma önlemleri alınmadı. Çay üreticisinin çayını toplayıp işlenmek üzere fabrikaya getirmesi süreci çok kısa olmadığından kısmi enzimatik bozunma her zaman mevcuttur. Örnekleme sonrası yaş çay yaprakları üç farklı yolla analize hazırlanmıştır.

1. Yaş çay yaprağından belli küttelede tartım alınıp blenderdan geçirildi ve hızlı bir şekilde ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Bu örnekler YÇY olarak tanımlandı.
2. Yaş çay yaprağından belirli bir küttelede tartım alınıp -20 °C'de saklandı. Dondurarak saklamanın ekstraksiyon verimleri açısından önemli olup olmadığını test etmek amacıyla bu işlem uygulandı. Dondurulmuş örnek blenderdan geçirildi ve hızlı bir şekilde ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Bu örnekler YÇD olarak tanımlandı.
3. Kurutarak saklamanın ve kurutmanın ekstraksiyon verimine etkisini belirlemek amacıyla toplanan çay örnekleri havadar bir ortamda ve gölgede kurumaya bırakıldı. Kurutma sonrası belli küttelede örnek tartıldı ve ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Bu örnekler YÇK olarak tanımlandı.

Yaş çay yaprakları dışında fabrikada siyah çay üretimi sırasında açığa çıkan bazı atık materyaller de çalışmalarda kullanıldı. Bu atık materyaller aşağıda tanımlanmaktadır.

1. Siyah çay atığı çayın işlenmesi sırasında eleklerden ayrılan ve hiçbir ekonomik değeri olmayan kalıntıdır. Çoğunlukla çay bahçelerine atılmakta veya çay fabrikalarında ısıtma için yakılmaktadır. Bu atık materyal özel bir işlem uygulanmadan ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu ve SÇA olarak tanımlandı.
2. Kafein tozu çay fabrikalarında siyah çay üretimi sırasında oluşan küçük çay tozlarıdır. Bölge halkı tarafından “kafein tozu” olarak adlandırılır. Fabrikada hiçbir şekilde değerlendirilmeyen bu atığın başka bir kullanım alanı da bulunmamaktadır. Tez kapsamında 2012-2013-2014 yıllarında tüm toplama sezonlarında kafein tozu örnekleme de yapıldı ve ekstraksiyona tabi tutuldu. Bu örnekler SÇK olarak tanımlandı.

2.3.2. Kullanılan Ekstraksiyon Yöntemleri

Yaş çay ve çay atıklarından kafein ve kateşin ekstraksiyonu farklı yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Dünya literatüründe pek çok yöntem tanımlanmış olup farklı ülkelerin çay türleri için yöntem optimizasyonları yapılmıştır (Row ve Jin, 2006; Liang vd., 2007). Kafein ve kateşini çay örneklerinden ayırmada genellikle su içinde demleme uygulanmaktadır. Zira her iki kimyasalda suda oldukça yüksek oranda çözünmektedir. Demleme yoluyla belli periyotlarda su ile muamele edilen materyal ısı etkisiyle sahip olduğu bileşikleri suya aktarmaktadır. Mevcut yöntemlerin tamamının örnekleme yapılan Türk çay türlerine uygulanmasına dair bir çalışma mevcut değildir. Yapılan geniş kapsamlı literatür çalışmasında daha çok antioksidan aktivite, toplam fenolik içerik, vitaminler, mineraller, element içerikleri, teanin ve teaflavinler açısından genellikle Türk siyah çaylarında çalışmalar yapılmıştır (Bahar vd., 2013; Alaşalvar vd., 2013). Gürü ve İçen, (2003) Türk siyah çay atıklarında sadece kafein ekstraksiyonuna yönelik bir çalışma yapmışlardır.

Bu nedenle öncelikli olarak ilk örnekleme dönemi olan 2012 yılında en yüksek kafein ve kateşin ekstrakt kütlelerini sağlayan ekstraksiyon yönteminin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu düşünceden hareketle literatürde en yüksek verimlerin elde edilmesinde önerilen bir seri ekstraksiyon yöntemi uygulandı. 80 °C de 40 dakikalık bir demleme sürecini öneren Row ve Jin, (2006) çalışması temel alınarak yine literatürde önerilen modifikasyonlar kurutulmuş yaş çay örneklerine uygulandı. Aynı kütleli örnekler ilgili çalışmalarda önerilen şartlar altında ekstre edilerek kloroform ekstraksiyonu ile kafein ayrıldı ve organik çözücü uçuruldu ekstraktın kütlesi belirlendi. Benzer bir yaklaşımla kafeini ayrılan sulu ekstrakt etil asetatla tekrar ekstre edilerek organik çözücü uçuruldu ve ekstraktın kütlesi belirlendi. Ekstrakt kütleleri kullanılarak çay örneğinden elde edilen ekstrakt verimleri aşağıdaki eşitliklerden hesaplandı ve sonuçlar bu şekilde ifade edildi.

$$\% \text{ Kafein verimi (a/a)} = \frac{\text{Kloroform ekstrakt kütlesi}}{\text{örnek kütlesi}} \times 100$$

$$\% \text{ Kateşin verimi (a/a)} = \frac{\text{Etil asetat ekstrakt kütlesi}}{\text{örnek kütlesi}} \times 100$$

Uygulanan yöntemlerin detayları aşağıda verilmektedir. Tüm ekstraksiyon yöntemleri üç kez tekrarlandı ve ortalama değerler (\pm standart sapma) grafikler üzerine hata çubukları olarak verildi.

2.3.2.1. Sıcak Su Ekstraksiyonu

10 g çay örneği 300 mL saf su içinde 80 °C'de 40 dakika boyunca demlemeye bırakıldı. Bu süre sonunda katı kalıntı 110 mm süzgeç kağıdından süzülerek ayrıldı. Kafeinin ayrılması için su fazı 100 mL'lik hacimlerdeki kloroform ile 3 kez ekstre edilerek ayrılan kloroform fazları birleştirildi (Row ve Jin, 2006). Ardından kateşinleri ayırmak için sulu faz 100 mL'lik hacimlerdeki etil asetatla 3 kez ekstre edilerek etil asetat fazları birleştirildi. Ekstraktlar MgSO₄ ile kurutulduktan sonra evaporatörde 50 °C'de kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Kafein ve kateşin ekstraktlarının kütlesi belirlenerek ekstrakt verimleri hesaplandı. Aynı işlem tüm örnekler için üç kez tekrar edildi.

2.3.2.2. İki Basamaklı Sıcak Su Ekstraksiyonu

Bu yöntem Bazinet vd., (2007) tarafından önerilmektedir. 10 g çay örneği başlangıçta 300 mL saf suda demlendi. Demlemenin ilk basamağı termostatlı banyoda 50 °C'de 10 dakika boyunca yapıldı. Daha sonra katı materyal ortamdan alınıp yeni bir demleme için 80 °C'de 10 dakika daha demlemeye maruz bırakıldı ve su fazları birleştirildi. Süzülen sulu fazlar yukarıda belirtildiği gibi kafeini uzaklaştırmak için önce kloroform ile ekstrakte edildi. Su fazı sonra etil asetat ile kateşinleri elde etmek için ekstrakte edildi. Aynı işlem tüm örnekler için üç kez tekrar edildi.

2.3.2.3. Yüksek Sıcaklık Ön İşlem Sıcak Su Ekstraksiyonu

10 g çay örneği 100 °C sıcaklıkta kaynayan 300 mL'lik suya ilave edildi. Çay örneği su içinde 3 dk. bekletilerek demlenmeye bırakıldı. Bu işlemin amacı çaydan öncelikli olarak kafeini ayırmaktır (Liang vd., 2007). Bu süre sonunda çay sudan süzülerek ayrıldı ve hemen 200 mL'lik 80 °C'deki suya ilave edilerek 40 dakika boyunca demlendi. İlk uygulamada ayrılan 300 mL'lik sıcak su soğumaya bırakıldı ve kloroform ile kafein ekstraksiyonu yapıldı (3x100 mL). İkinci işlemde elde edilen sulu ekstrakt süzülerek çaydan ayrıldı ve içerdiği kafein kloroformla (3x100 mL) ayrıldı. Kloroform ekstraktları birleştirilerek kuruluğa kadar buharlaştırıldı ve kafein verimi hesaplandı. Kateşinleri ayırmak

için sulu çözelti bu kez etil asetatla ekstre edildi (3x100 mL) ve organik faz kuruluğa kadar buharlaştırılarak kateşin ekstrakt verimi hesaplandı. Aynı işlem tüm örnekler için üç kez tekrar edildi.

2.3.2.4. Sitrik Asit Ekstraksiyonu

Bu yöntem kateşinlerin sulu fazdan ayrılmasında sitrik asit kullanımını öneren bir yöntemdir (Dong vd., 2011). Kafein ekstraksiyonu için kullanılan geleneksel yöntemde kullanılan kloroformun toksik etkisini ortadan kaldırması yönüyle bu yöntem iyi bir alternatiftir. 10 g çay örneği üzerine 300 mL saf su ilave edilerek 80 °C'de 40 dakika boyunca demlendi. Sulu ekstrakt 110 mm süzgeç kağıdından süzüldü ve 200 mL etil asetatla üç kez ekstrakte edildi. Birleştirilen etil asetat fazları yeniden 200 mL sitrik asit çözeltisiyle üç kez ekstre edildi. Etil asetat fazı evapore edilerek kateşin ekstrakt verimi hesaplandı. Sitrik asit fazı evapore edilerek kafein verimi hesaplandı. Aynı işlem tüm örnekler için üç kez tekrar edildi.

2.3.2.5. Etanol Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon ortamından organik türlerin sulu faza alınmasını kolaylaştıracak etanol gibi çözücülerin bulunması önerilmektedir (Hu vd., 2009). Bu amaçla önerilen yöntem bu çalışmaya dahil edildi. Çay/çözücü oranı 1:60 w/v olacak şekilde 10 g çay örneği %75'lik 600 mL etanol içinde termostatlı bir banyo kullanılarak 10 dakika boyunca demlendi. Çay kalıntısı süzülerek ayrıldı ve etanol evaporatörde 55±2 °C'de uzaklaştırıldı. Kalıntı suda çözülerek diğer yöntemlerde olduğu gibi kafein ve kateşin ekstraktları ayrıldı. Ekstrakt verimleri hesaplandı. Aynı işlem tüm örnekler için üç kez tekrar edildi.

2.3.3. Süper Kritik Akışkan Ekstraksiyonu (SFE)

Çay örneklerinden SFE ile ekstraksiyonu konusunda yapılan literatür araştırmaları sonucunda yaş çaydan kafeinin uzaklaştırılması için (kafeinsiz çay üretmek amaçlı) birçok çalışma (İçen ve Gürü, 2010; Sun vd., 2010; Park vd., 2011; Huang vd., 2007; Kim vd., 2007) bulunmasına rağmen yalnızca kateşin eldesi için herhangi bir çalışma

bulunmamaktadır. Literatür verilerinden yola çıkarak çay örneklerinden öncelikli olarak kafeinin uzaklaştırıldığı daha sonra ise aynı örnekten modifiyerli CO₂ süperkritik akışkan ile kateşinlerin ekstraksiyonunu hedef alan yeni bir yöntemin optimizasyonu hedeflendi. Kafeinin etkin bir şekilde ayrılması için kurutulmuş yaş çay örnekleri farklı basınç (100, 200, 250, 300 bar) , farklı sıcaklık (30, 40, 50, 60 °C) ve farklı ekstraksiyon sürelerinde (1, 2, 3, 5 saat) CO₂-SFE'na tabi tutuldu. CO₂ akış hızı literatürde önerildiği gibi 10 g/dk olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra örnek kabından çay örnekleri çıkartılmadan kateşin izolasyonu için ortama polariteyi artırmak amacıyla çözücü (modifiyer) olarak etanolün (Park vd., 2007) ilave edildiği bir ekstraksiyon işlemi uygulandı. Kafein ekstraksiyonuna benzer şekilde CO₂ süperkritik akışkanının basıncı 100, 200, 250, 300 bar, ekstraksiyon sıcaklıkları 30, 40, 50, 60 °C ve ekstraksiyon süresi de 3 saat olarak uygulandı. Ancak her bir uygulamada modifiyer pompası yardımıyla CO₂ gazı içine 0,2; 0,3; 0,4 ve 0,5 mL/dk akış hızlarında etanol ilave edildi. Modifiyer içeren CO₂ yukarıda verilen basınç, sıcaklık ve sürelerde 10 g/dk olacak şekilde çay örneklerinin ekstraksiyonunda kullanıldı. Her bir ekstraksiyon işlemi sonrasında elde edilen kafein ve kateşin ekstraktlarının kütlelerinden ekstrakt verimleri hesaplandı. Daha doğru bir değerlendirme yapmak amacıyla her bir ekstraktın içerikleri HPLC ile analiz edildi. Optimize edilen yöntem ile 2013 ve 2014 yılı örneklerinin analizleri gerçekleştirildi. Aynı işlemler tüm örnekler için üç kez tekrar edildi.

2.3.4. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) Çalışmaları

İnce tabaka kromatografisi kateşinlerin analizinde önemli bir yöntemdir. Sadece nitel analiz yapma olanağı sağlayan bu yöntemde polar karakterlerinden dolayı polar sabit fazlar kullanılmalıdır. Bu amaçla silikajel, selüloz veya poliamid tabakalar kullanılır. Bu nedenle Wang vd., (2009) tarafından önerilen ve optimize edilen yöntem kullanıldı. 10x10 cm boyutlu Nylon taban üzerine kaplanmış olan poliamid sabit faz kateşinlerin ayrımı için mükemmel sonuçlar vermektedir. Analizi yapılacak olan örnek ve kateşin standartların 2,5 mg/L derişimli örnekleri metanolde hazırlandı ve 10 µL'lik kısımları tabakaya uygulandı.

Yürütücü olarak n-bütanol:aseton:asetik asit 5:5:3 (v/v) karışımı kullanıldı. Ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstraktlar standartlar ile birlikte poliamid tabakaya uygulandı. Yürütücü tankın çözücü buharı ile doygun hale gelmesi beklendi ve hareketli fazda yürütme yapıldı. Yürütme yapıldıktan sonra tabakanın kurumması beklendi. Tabakada ayrılan bileşenler UV lambası altında gözlenmesine rağmen boyama yaparak görünür hale

getirilebilir. Bu amaçla etanol içindeki %5 (a/h)'lik FeCl_3 çözeltisi boyama reaktifi olarak kullanıldı. Bir sprey şişesi yardımıyla yaklaşık 1-2 mL çözelti poliamid tabakaların üzerine püskürtüldü. Bir süre kurumaması beklendi ve mor-siyah renkli bileşenler belirlendi.

2.3.5. Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HP-TLC) Çalışmaları

İnce tabaka yürütmeleri poliamid kaplı 10cmx10cm Nylon tabakalarda yapılan örneklerin nicel analizleri densitometrik yöntemle yapıldı. Çay ekstraktları ve standart çözeltiler (2,5 mg/mL) tabakanın altından 10 mm, sol taraftan 20 mm mesafe olacak şekilde WinCATS yazılımını kullanan CAMAG Linomat V (Şekil 2.1) cihazı kullanılarak 8 mm bantlar şeklinde tabakalara uygulandı. Uygulama hızı 150 nL/s, ekstraktların ve standartların hacmi sırasıyla 2 ve 6 μL 'dir.



Şekil 2.1. HP-TLC cihazı

Bu sistem içinde mobil faz olarak n-bütanol:aseton:asetik asit (5:5:3) kullanıldı. Tabakalar cihaza yerleştirildi ve WinCATS yazılımını kullanan TLC Scanner III kullanılarak 20 mm/s tarama hızı ile tarandı. TLC kromatogramlarını görüntülemek ve arşivlemek için ReproStar III ve VideoStore II yazılımları kullanıldı. Bu analizler Hunan Ziraat Üniversitesi Çay Araştırma Enstitüsünde (Çin) gerçekleştirilmiş olup sadece 2012 yılı örneklerine uygulandı. HP-TLC cihazının tarayıcı sistemine tabakanın yerleştirilmesi ve tarama sistemi Şekil 2.2'de görülmektedir.



Şekil 2.2. HP-TLC tarayıcı sistemi

HP-TLC ile yapılan analizler sonrasında yapılan kantitatif hesaplamaların sonuçları HPLC sonrası yapılan hesaplamalar ile uyumlu olmadığından HP-TLC analizleri yalnızca kalitatif hesaplama için kullanılmıştır. HP-TLC analizlerinin yapılmasının asıl nedeni TLC ile yapılan analizlerde ayırımlar gözle belirlendiğinden yanlışlık olmaması adına kateşin türevlerini daha belirgin tanımlayabilmektir.

2.3.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Çalışmaları

Ekstraktların kalitatif ve kantitatif analizleri için iki farklı ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) sistemi kullanıldı. Sistemlerin detayları aşağıda verildiği gibidir.

HPLC-A: Çalışmaların bir kısmı Hunan Ziraat Üniversitesi (Changsha, Çin Halk Cumhuriyeti) Çay Araştırma Enstitüsü'nde gerçekleştirildi. Analizler için LC2010AHT (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) model Shim-pack VP-ODS C18 (5 mm, 4.6 x 150 104 mm, 35 °C) kolonu içeren bir HPLC cihazı kullanıldı. Çözücü A (su) çözücü B (N,N dimetilformamid: metanol: asetik asit 20:1:0,5) sistemlerinin hareketli faz olarak kullanıldığı gradiyent ayırma uygulandı. B çözücüsü 13 dakikada %14'ten %23'e sonraki 12 dakika boyunca da %23'ten %36'ya artırıldı ve 3 dakikada bu yüzdede kolondan geçirildi. Son olarak tekrar %14'e düşürüldü. Akış hızı analiz boyunca 1 mL/dk'dır (Wang vd., 2011).

Kateşin standartları şu şekilde oluşturuldu. Her standarttan 1 mg/mL'lik stok çözeltiler HPLC saflıktaki metanol içinde hazırlandı ve kullanılacak derişim için yine HPLC saflıktaki metanol ile seyreltmeler yapıldı. Analiz edilecek kateşin ve kafein

ekstraktları 1 mg/mL'lik stok çözeltiler HPLC saflıktaki metanol içinde hazırlandı. Standartlar ve örnekler 0,45 µL'lik membran filtrelerden süzülerek 500 µL'lik kısımlar viallere alındı. Otomatik örnekleme sistemi kullanılarak 20 µL'lik hacimlerde kolona verildi. Kateşin ve kafein derişimleri standartların pik alanlarıyla karşılaştırılarak hesaplandı.

HPLC-B: Ekstraktların analizleri için Hitachi Elit marka (Japonya) Kromasil C18 (15,0x4 mm; 5 µm) kolonlu ikinci bir HPLC cihazı aynı gradiyent sistem ile kullanıldı. Yapılan diğer işlemler yukarıdaki gibidir. Bu cihazın diğerinden farklı olarak diyot serili bir dedektörü (DAD) bulunduğundan standartların UV spektrumlarını örnekteki bileşenlerle karşılaştırma olanağı da vardır. Bazı analizlerde bu ölçümler de alındı. Kateşin ve kafein derişimleri standartların pik alanlarıyla karşılaştırılarak hesaplandı.

2.3.7. Kolon Kromatografisi

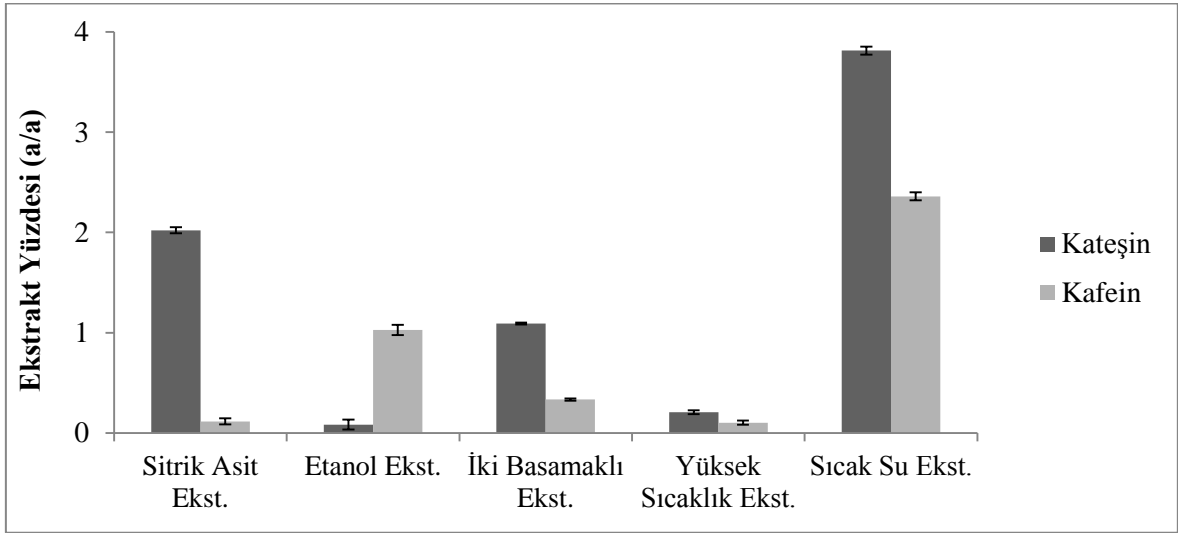
Tez çalışması kapsamında sadece ekstraksiyon yöntemleri değil kateşin türlerinin izolasyonu konusunda da çalışmalar yapıldı. İzolasyon için silikajel, selüloz, ve poliamid kolon dolgu maddeleri kullanıldı. Bu sabit fazlardan sadece poliamid ile başarılı bir izolasyon gerçekleştirildiğinden sadece bu yöntemin detayları verildi. Poliamid kolonla izolasyon yeni bir izolasyon yöntemi olmayıp Bailey (1999) tarafından patentlendirilmiştir.

İzolasyon için poliamid CC6 (0,10-0,30 mm, Macherey Nagel) kolon dolgu maddesi ve 50 cm boyunda 3 cm çapında cam kolon kullanıldı. Dolgu maddeleri 15-20 cm olacak ve içinde hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde kolona dolduruldu. Daha sonra örnek yine aynı kolon dolgu maddesine emdirilip kurutularak kolona yüklendi. Başlangıçta %100 saf su kolondan geçirildikten sonra istenilen bileşenlerin ayrılmalarını sağlamak için polariteyi azaltmak amacıyla etanol konsantrasyonunun %10'dan başlanılarak %100'e çıkarılana kadar lineer artışı sağlandı (Ye vd., 2010). Kolon esnasında izolasyon aşamaları TLC ve HPLC ile izlendi. Özellikle kateşin çeşitleri arasında en büyük öneme sahip olduğu bilinen EGCG'nin olabildiğince saf olarak izole edilmesine yoğunlaşıldı.

3. BULGULAR

3.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon Yönteminin Seçilmesi

Yaş çay ve siyah çay atıklarından kafein ve kateşin ekstraksiyonu için Bölüm 2.3.2’de ayrıntıları ve gerekçeleri verilen beş farklı ekstraksiyon yöntemi 2012 yılı birinci sürüm (Mayıs) çaylarına uygulandı. Kuru olarak çalışılan çayların ekstrakt kütlelerinden elde edilen kafein ve kateşin yüzdeleri (a/a) Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1. Farklı ekstraksiyon metodlarına göre kafein ve kateşin ekstrakt verimleri

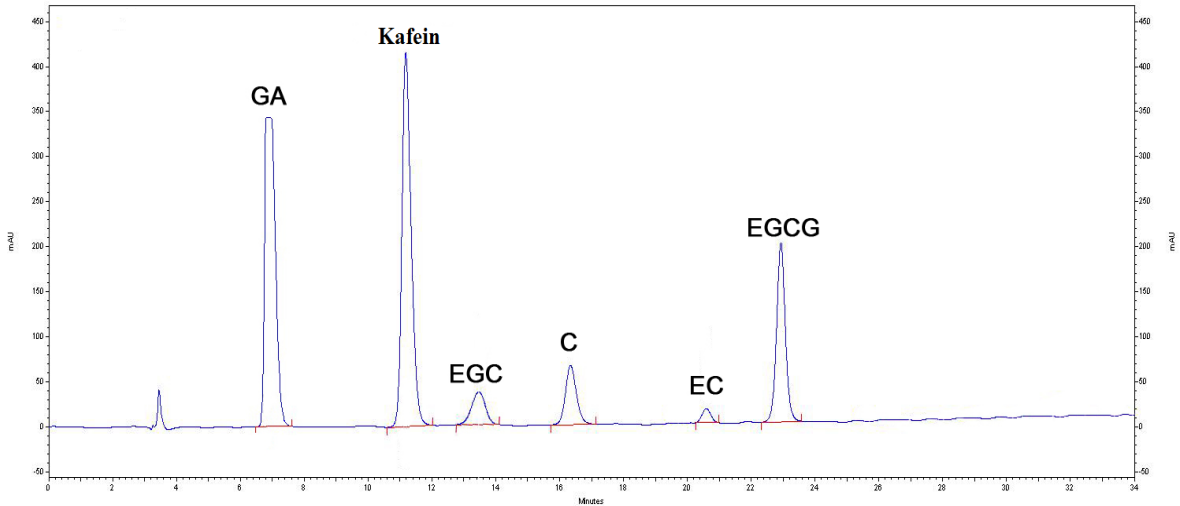
Çay ekstraksiyonundan elde edilen kaba ekstraktların HPLC analizleri ile elde edilmiş literatür verilerinde yeşil çayın %2 civarında kafein ve %7-8 civarında kateşinleri içerdiği belirtilmektedir (Gürü ve İçen, 2010). Ancak kaba ekstraktan kafein ve kateşinlerin sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile ayrılmasından daha düşük ekstrakt verimlerinin elde edilebileceği açıklanmıştır (Şekil 3.1). Sitrik asit ve sıcak su ekstraksiyonunun kateşinleri seçimli olarak ekstre ettiği söylenebilir. Ancak kafein ekstraksiyonunda oldukça başarısız yöntemlerdir.

Elde edilen sonuçlara göre sıcak su ekstraksiyonu %4 kateşin ve %2,36 kafein verimiyle en verimli yöntemdir. Bu nedenle bundan sonraki çalışmalarda 80 °C’de 40

dk'lık ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. 2012-2014 yıllarında örnekleme ve izleme çalışmaları yapıldığından her yıla ait çalışmalar ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

3.2. HPLC Analizleri İçin Yöntem Optimizasyonu

HPLC analizlerine geçmeden önce kafein ve kateşin standartları kullanılarak kromatografik analiz yöntemi, analitik parametreler yönünden optimize edildi. Mevcut kateşin standartlarının (C, EC, EGC, EGCG) yanı sıra kafein ve çayda bol miktarlarda bulunan ve kateşinlerin öncülü olan gallik asit (GA) standardını da içeren bir standart karışımı hazırlandı. Standart karışımının HPLC-B yöntemine göre ayrımını gösteren kromatogram Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Kafein ve kateşin ve standartlarının HPLC-B yöntemiyle elde edilen kromatogramı (Bütün standartların derişimleri 166,66 mg/L'dir.)

Alıkonma zamanı ve pik alanlarının tekrarlanabilirliği için hazırlanan standart karışımı 7 kez analiz edildi. Ayrıca analitin kullanılan yöntemle belirlenebilen düşük derişim olan belirleme sınırı (BS) ve belirlenebilen en düşük nicel sınır değerleri olan (ÖS) değerleri de belirlendi (Tablo 3.1).

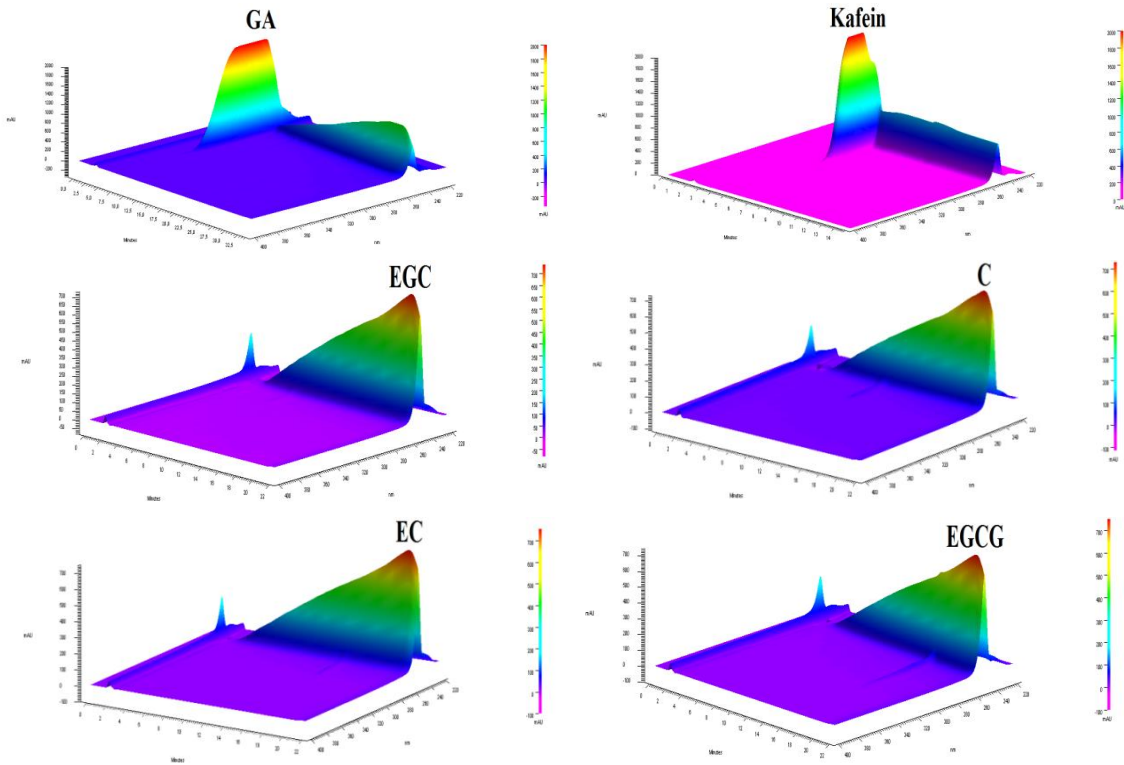
Tablo 3.1. Optimize edilen HPLC yönteminin parametreleri

No	Alıkonma Zamanı (t_R)	Standart	R^2	%BSS (t_R)	%BSS (Alan)	BS*	ÖS*
1	7,12	Gallik Asit	0,99	0,32	2,37	0,04	0,12
2	11,33	Kafein	0,99	0,09	1,92	0,03	0,11
3	13,56	EGC	0,99	0,08	2,47	0,04	0,13
4	16,27	C	0,99	0,11	2,12	0,02	0,08
5	20,89	EC	0,99	0,07	5,22	0,03	0,10
6	23,10	EGCG	0,99	0,07	1,68	0,03	0,10

*mg/L

Tablo 3.1’de analit derişimine karşı pik alanlarından elde edilen kalibrasyon grafiğinin regresyon katsayısı R^2 olarak verilmiştir. Yüzde bağıl standart sapmalar (%BSS) alıkonma zamanları ve pik alanları için ayrı ayrı hesaplandı. Belirleme sınırı BS ve nicel belirleme sınırı ÖS değerleri mg/L cinsinden verilmiştir.

Her bir standardın diyet serili dedektör (DAD) ile alınan spektrumları örnek içindeki türlerin nitel analizlerinde karşılaştırma amaçlı kullanıldı. Standartların DAD spektrumları Şekil 3.3’de verilmiştir.

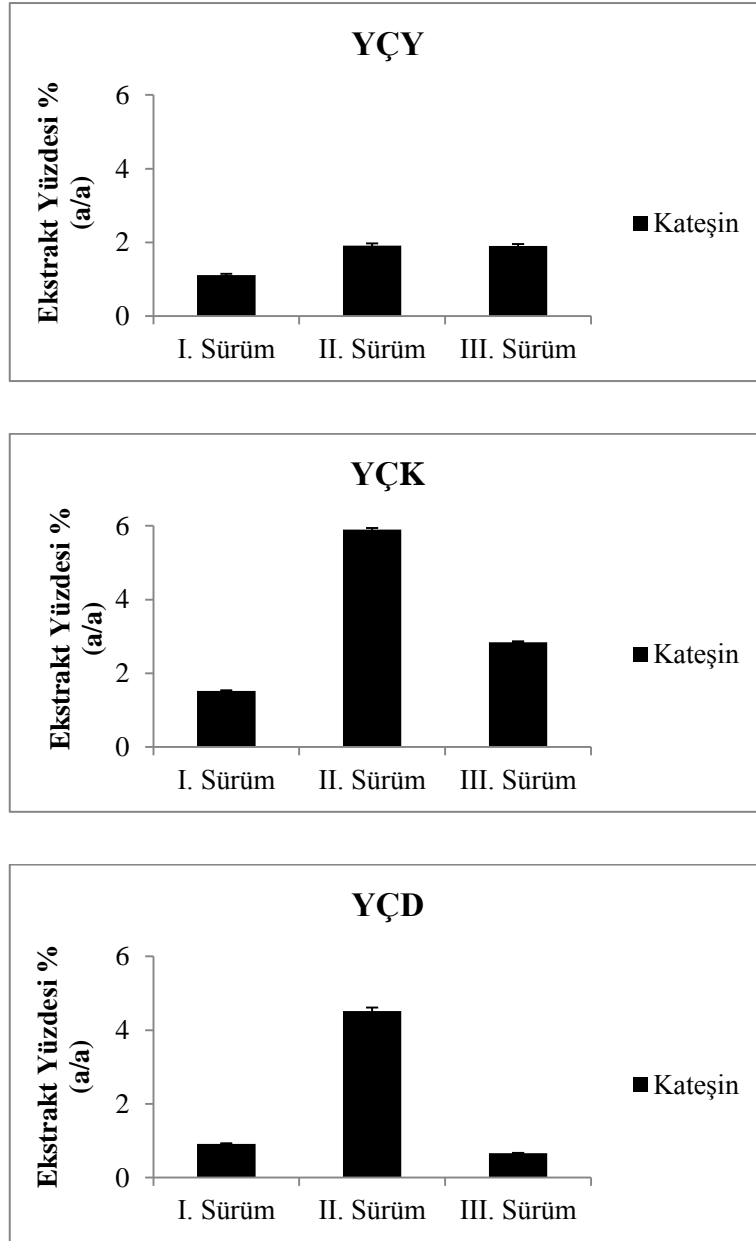


Şekil 3.3. GA, Kafein, EGC, C, EC ve EGCG standartlarının DAD spektrumları

3.3. 2012 Yılı Örnekleme Bulguları

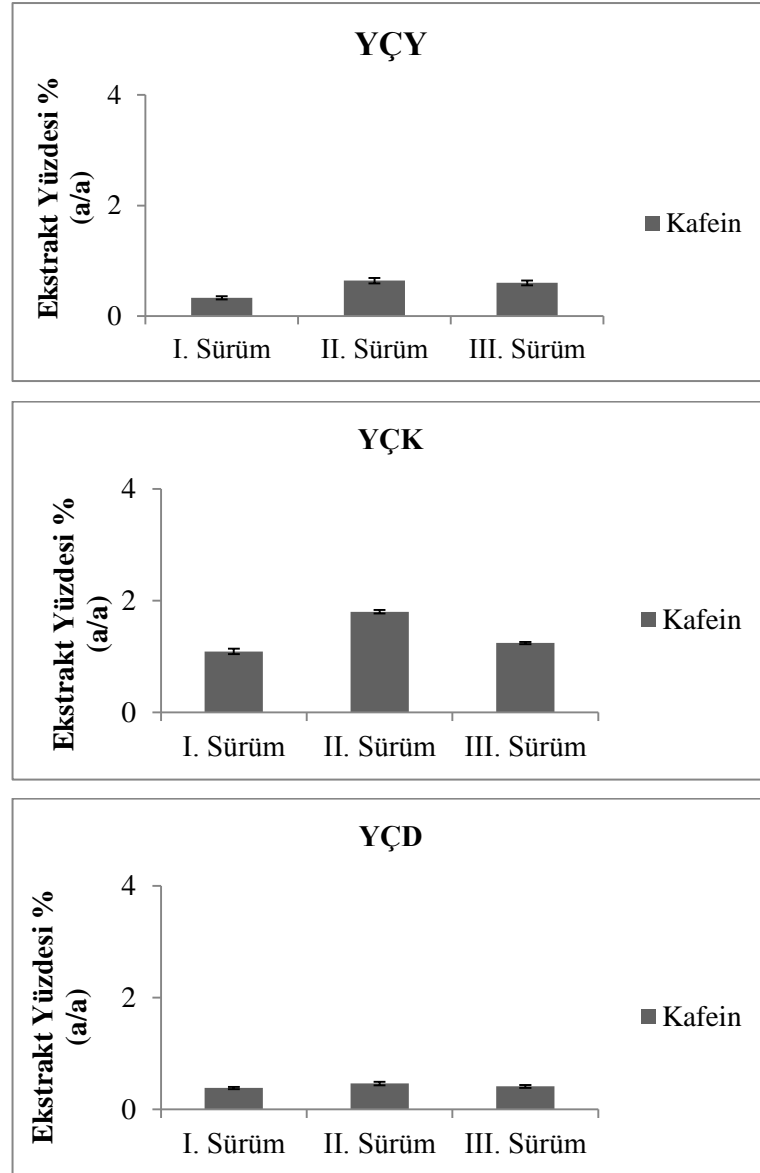
3.3.1. Yaş Çay Örneklerinin Kateşin ve Kafein Verimleri

2012 Yılı üç sürüm döneminde aynı çay bahçesinden alınan yaş çay örneklerinin yaş, kuru ve dondurulmuş olarak ekstraksiyonundan elde edilen kateşin verimi Şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3.4. 2012 Yılı I, II. ve III. sürüm yaş, kuru, dondurulmuş yaş çay örneklerinin kateşin verimleri

Sıcak su ekstraksiyonu sonucu elde edilen 2012 yılı yaş çay örneklerinin kateşin verimleri en düşük %0,66 III. sürüm YÇD ve en yüksek %5,90 ile II. sürüm YÇK'dır. Genel olarak sürümler arasında karşılaştırma yapıldığında kuru olarak çalışılan örneklerden daha yüksek verimle kateşin izole edilmesi beklenir. Yaş çay örnekleri kurutulduğunda %70 oranında kütle kaybına uğramaktadır. Genel olarak değerlendirildiğinde ikinci sürümde daha yüksek kateşin verimleri elde edilmiştir. Aynı örneklerden izole edilen kafein ekstrakt verimleri Şekil 3.5'de verilmiştir.



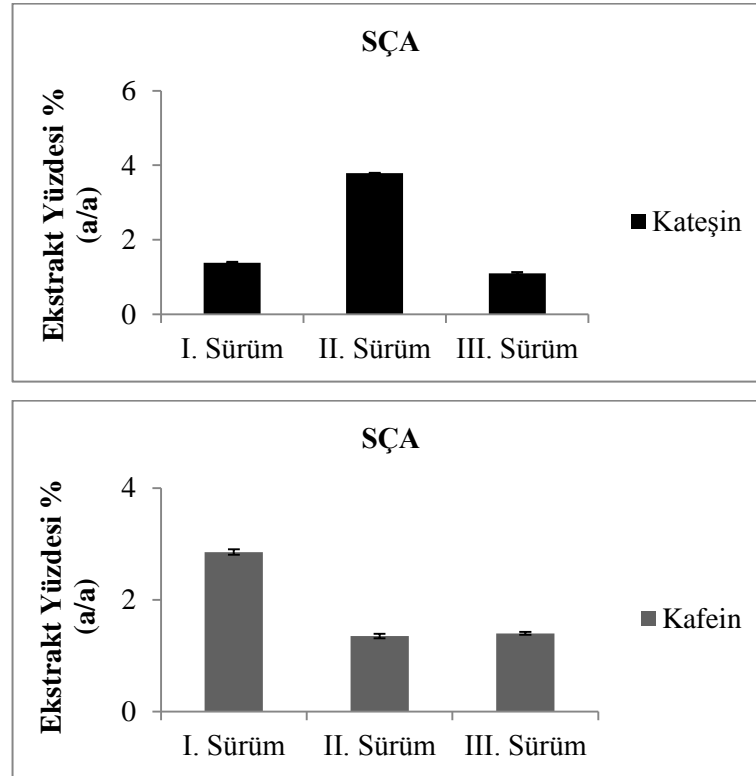
Şekil 3.5. 2012 Yılı I., II. ve III. sürüm yaş, kuru, dondurulmuş yaş çay örneklerinin kafein verimleri

Sıcak su ekstraksiyonu ile elde edilen 2012 yılı yaş çay örneklerinin kafein verimleri en düşük %0,33 ile I. sürüm yaş (YÇY) ve en yüksek %1,80 ile II. sürüm kurutulmuş (YÇK) örneklerinden elde edildi. Sürümler arası karşılaştırma yapıldığında en yüksek verimlerin kuru olarak çalışılan yaş çay örneklerinden elde edildiği görüldü. Yaş ve dondurulmuş olarak çalışılan örneklerde ise sonuçlar birbirine yakın olmasına rağmen yaş örneklerin biraz daha yüksek verimde olduğu belirlendi.

3.3.2. Siyah Çay Atığının (SÇA) Kateşin ve Kafein Verimleri

Siyah çay atığı yaş çay fabrikada işlenirken geriye kalan kısımlardan oluştuğu için yaş ve dondurulmuş olarak çalışılmaları mümkün olmadığından tez boyunca çalışılan tüm siyah çay atığı örnekleri kuru olarak çalışıldı.

Çay atığının içerdiği kateşin ve kafein ekstrakt verimleri Şekil 3.6'da görülmektedir.

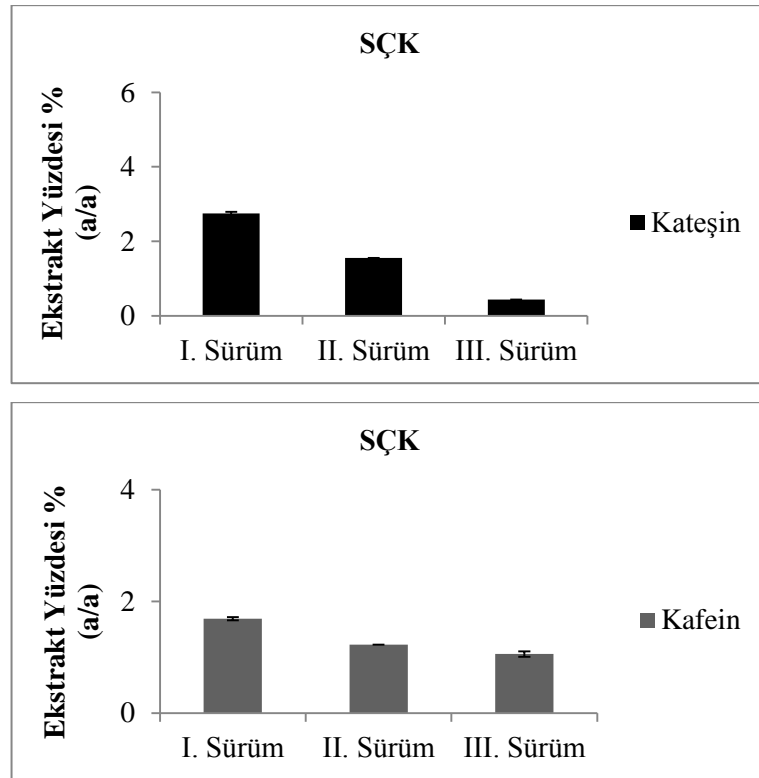


Şekil 3.6. 2012 Yılı I, II. ve III. sürüm siyah çay atığının kateşin ve kafein verimleri

Siyah çay atığında kateşin verimi için sürümler arası karşılaştırma yapıldığında %3,78 ile II. sürümün en yüksek verime sahip olduğu ve bunu sırasıyla I. sürüm ve III. sürümün izlediği görülmektedir. Siyah çay atığının önemli oranda kateşin içerdiği belirlendi. Kafein verimi için sürümler arası karşılaştırma yapıldığında I. sürümün en yüksek verimi sağladığı (%2,83) diğer sürümlerin birbirine yakın kafein içerdiği belirlendi.

3.3.3. Kafein Tozunun (SÇK) Kateşin ve Kafein Verimleri

Kafein tozu da çay atığına benzer özellikler taşıdığından kuru örnekler olarak işlem görmektedir. Kafein tozunun kateşin verimi I. sürümde en yüksek iken II. ve III. sürümlerde çok daha düşük bulundu (Şekil 3.7).



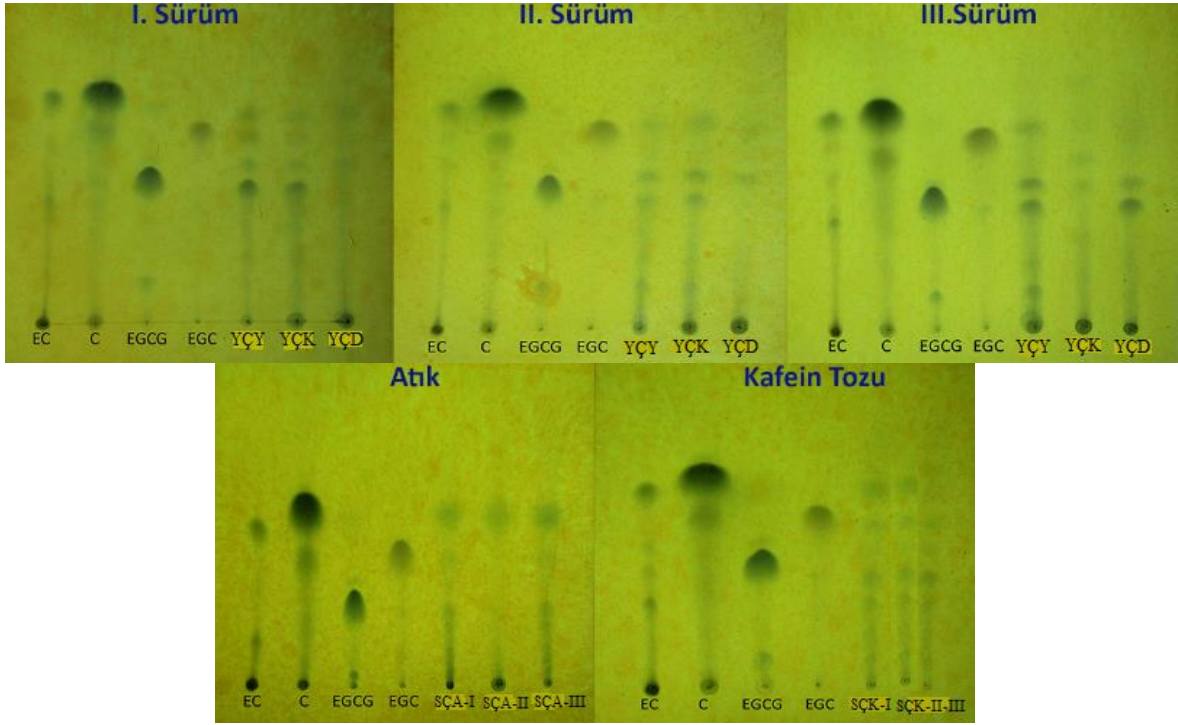
Şekil 3.7. 2012 Yılı I., II. ve III. sürüm kafein tozunun kateşin ve kafein verimleri

Sıcak su ekstraksiyonu sonucu elde edilen 2012 yılı kafein tozu örneklerinin kateşin verimleri için sürümler arası karşılaştırma yapıldığında en yüksek verimi %2,74 ile I. sürüm örneğinin verdiği onu sırasıyla %1,55 ve 0,43 ile II. ve III. sürümlerin takip ettiği

belirlendi. Kafein verimleri karşılaştırıldığında ise %1,68 ile I. sürümün en yüksek verimi verdiği bunu sırasıyla %1,22 ve 1,05 ile II. ve III. sürümün takip ettiği görüldü. Kafein tozunun azımsanamayacak oranda kateşin ve kafein içerdiği açıktır.

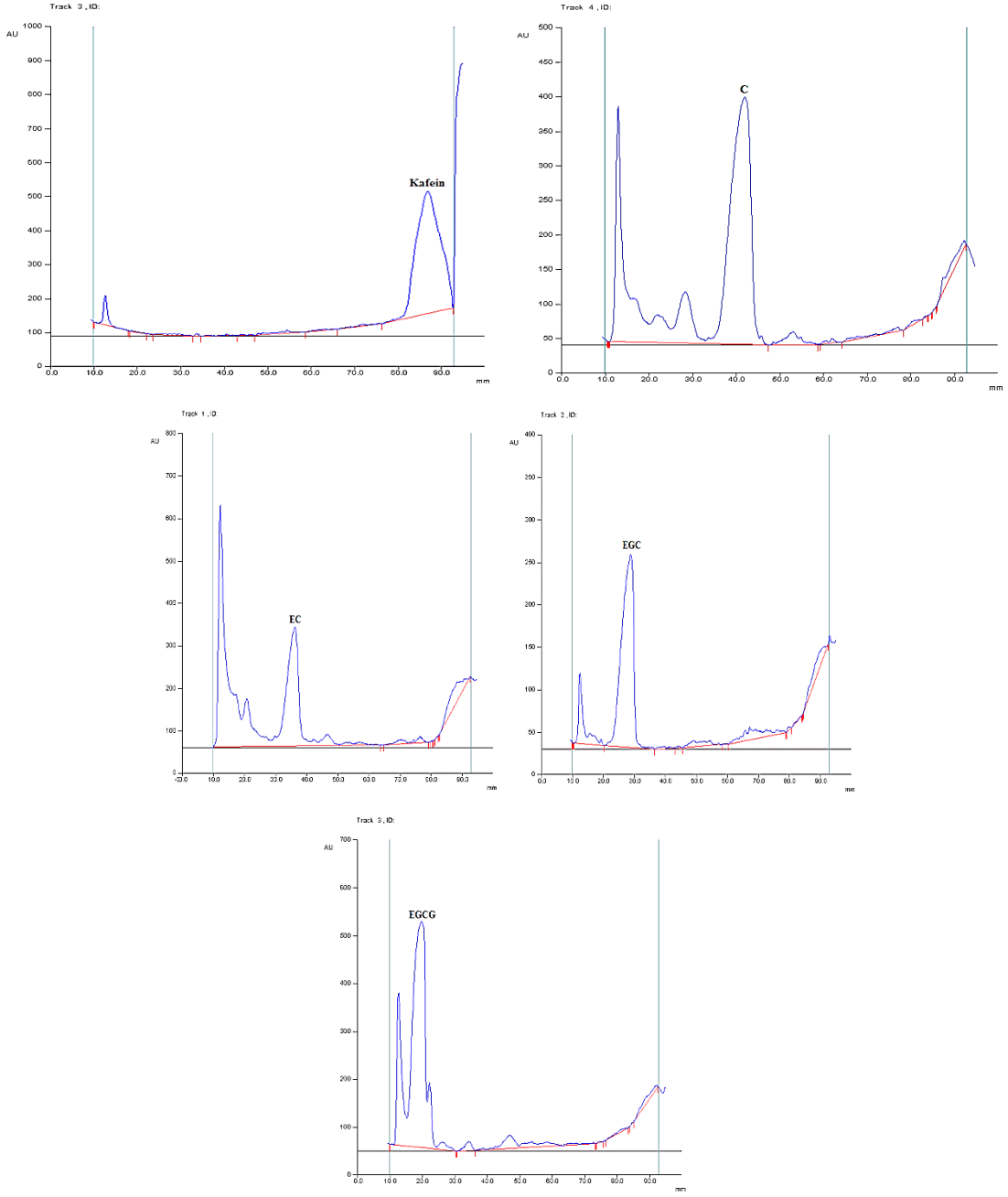
3.3.4. TLC ve HP-TLC Analizleri

2012 Örneklerinden elde edilen kateşin ekstraktlarının Bölüm 2.3.3'de detayları verilen yöntemlerle analizinde elde edilen TLC tabakasının görünümü Şekil 3.8'de verilmiştir.

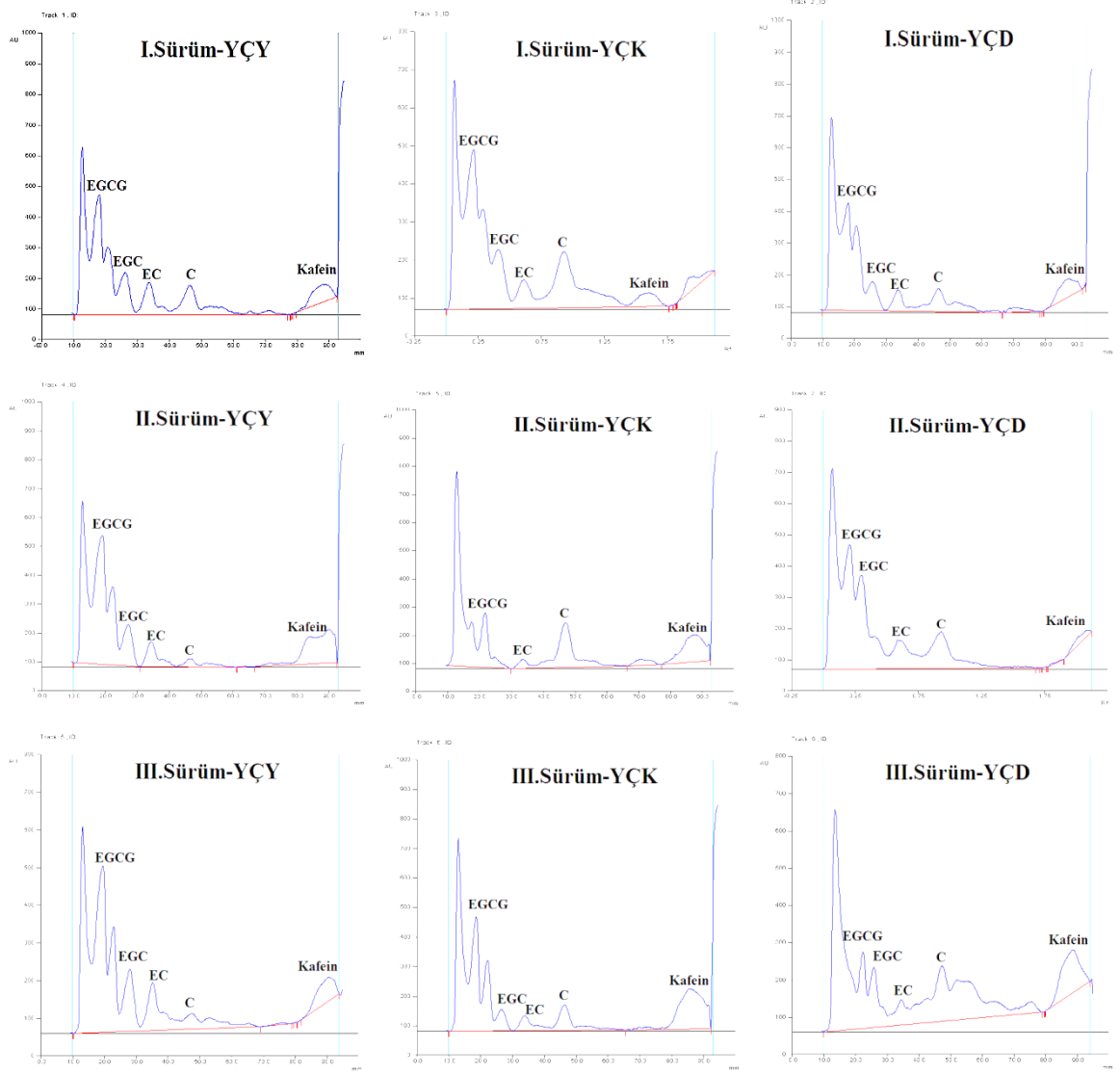


Şekil 3.8. Yaş çay (YÇY, YÇK, YÇD), çay atığı ve kafein tozu kateşinlerinin TLC görüntüleri

Bölüm 2.3.4'te anlatılan şartlarda gerçekleştirilen HP-TLC analiz sonuçlarına göre standartların ve 2012 yılı yaş çay örneklerinin kromatogramları aşağıda verilmiştir. Standartların densitometrik taramalarından elde edilen kromatogramlar Şekil 3.9'da kateşin ekstraktlarının kromatogramları ise Şekil 3.10'da verilmiştir.



Şekil 3.9. Standartların (Kafein,C, EC, EGC, EGCG) densitometrik tarama kromatogramları



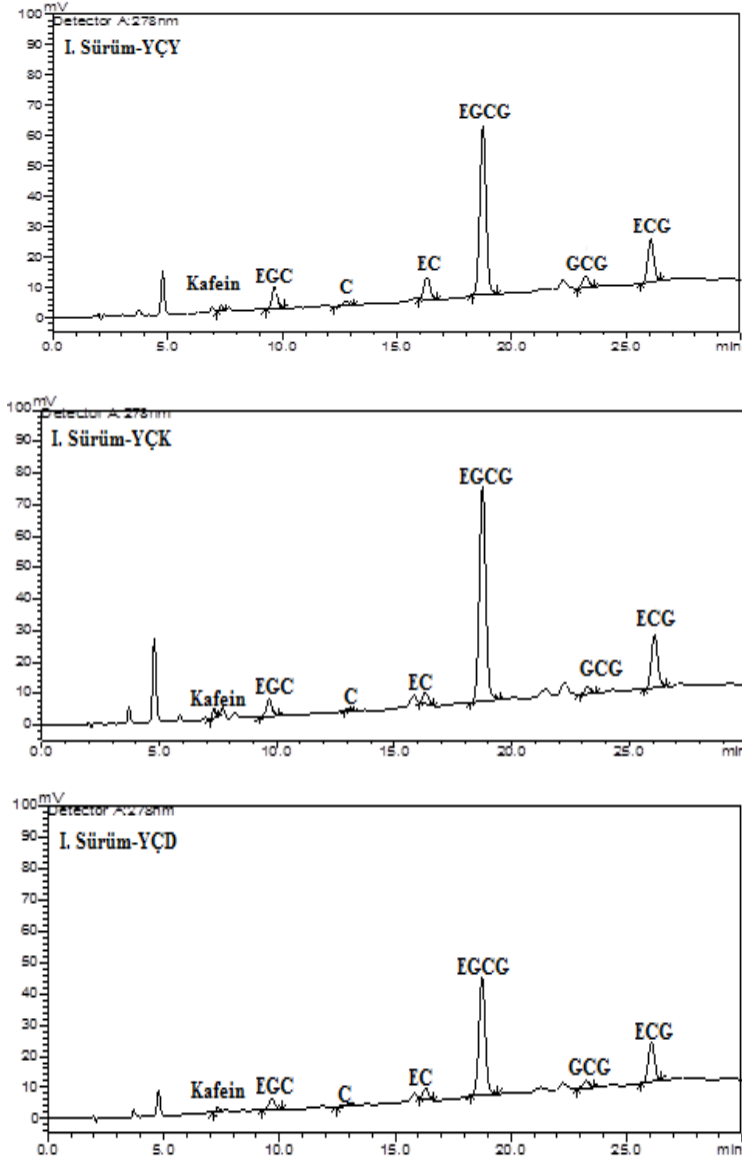
Şekil 3.10. 2012 Yılı yaş çay örneklerinin densitometrik tarama kromatogramları

2012 Yılı örneklerinde sadece yaş çay örneklerinin HP-TLC analizleri yapılabilmektedir. Buradan elde edilen veriler HPLC analizleri ile karşılaştırılmıştır.

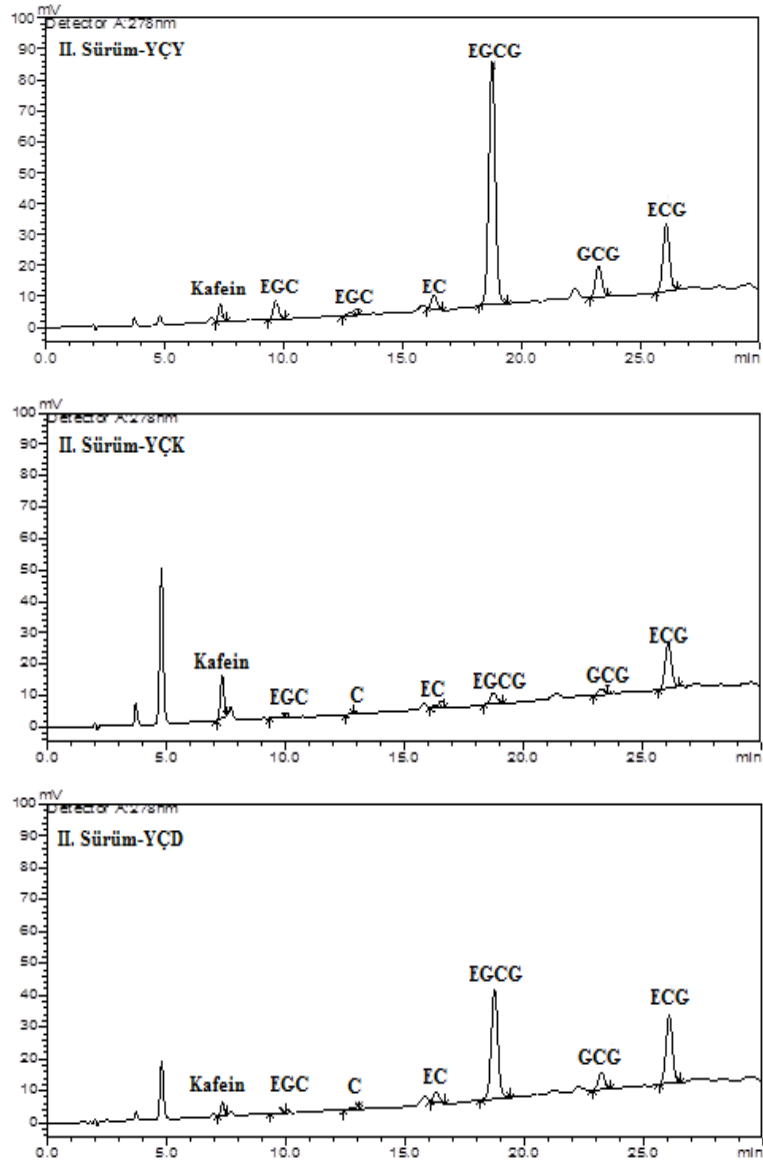
3.3.5. HPLC Analizleri

2012 Yılı örneklerinden elde edilen kateşin ekstraktlarının aynı hareketli faz kullanılarak HPLC-A ve HPLC-B yöntemleriyle gerçekleştirildi. Analiz boyunca değerlendirilen standartlar kafein, EGC, C, EC, EGCG, GCG ve ECG'dir. I., II. ve III. sürüm yaş çay örneklerinin yaş, kuru, dondurulmuş olarak sıcak su ekstraksiyonuna tabi

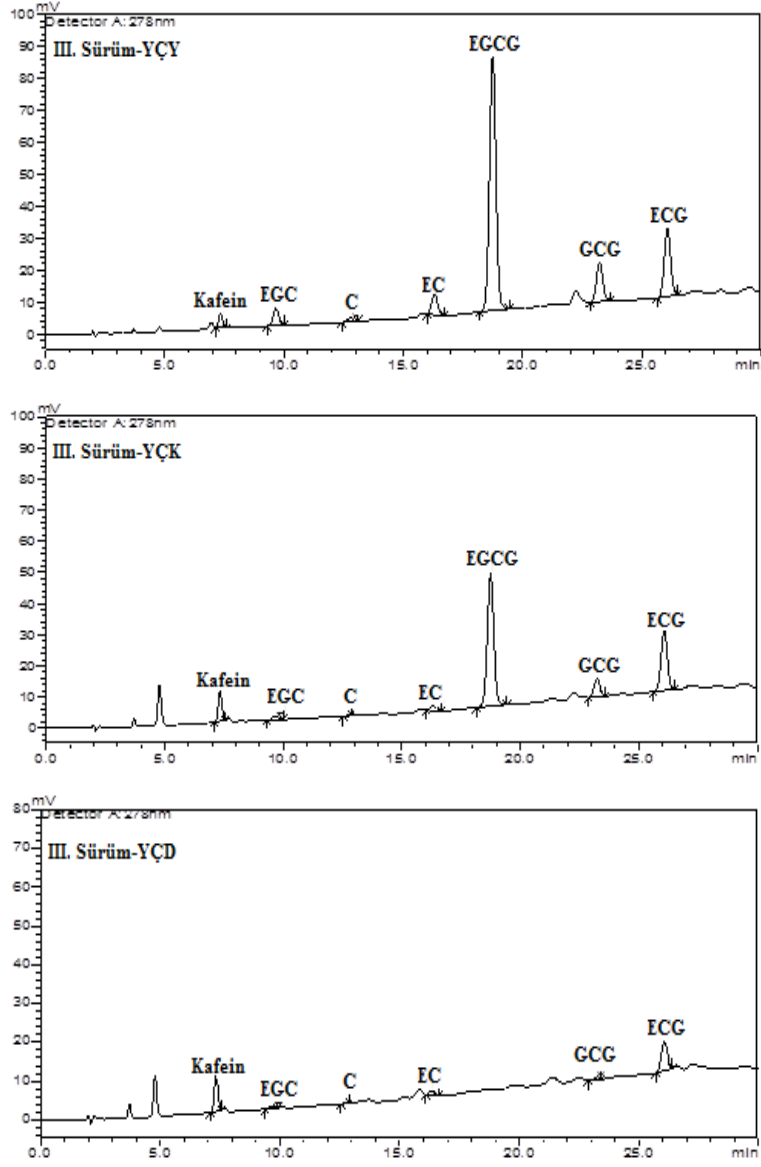
tutulduktan sonra elde edilen ekstraktların kromatogramları Şekil 3.11-3.13’de verilmiştir. Burada verilen kromatogramlar her bir HPLC analizini temsilen verilmiş olup tüm HPLC analizleri 3 kez tekrar edilmiştir.



Şekil 3.11. 2012 Yılı I. sürüm yaş, kuru, dondurulmuş yaş çay örneklerinin kateşin ekstraktlarının HPLC-A yöntemiyle elde edilen kromatogramları

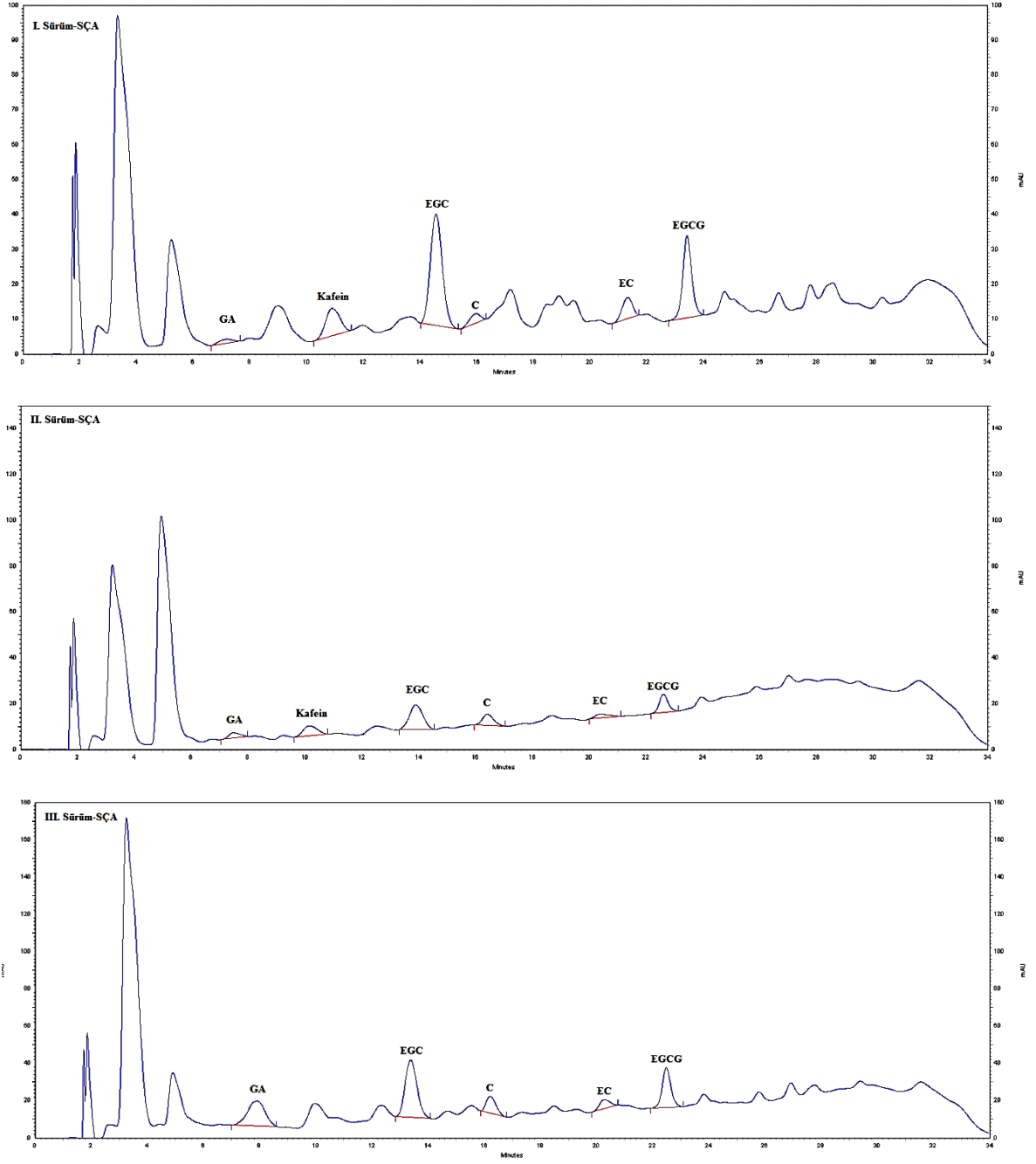


Şekil 3.12. 2012 Yılı II. sürüm yaş, kuru, dondurulmuş yaş çay örneklerinin kateşin ekstraktlarının HPLC-A yöntemi ile elde edilen kromatogramları

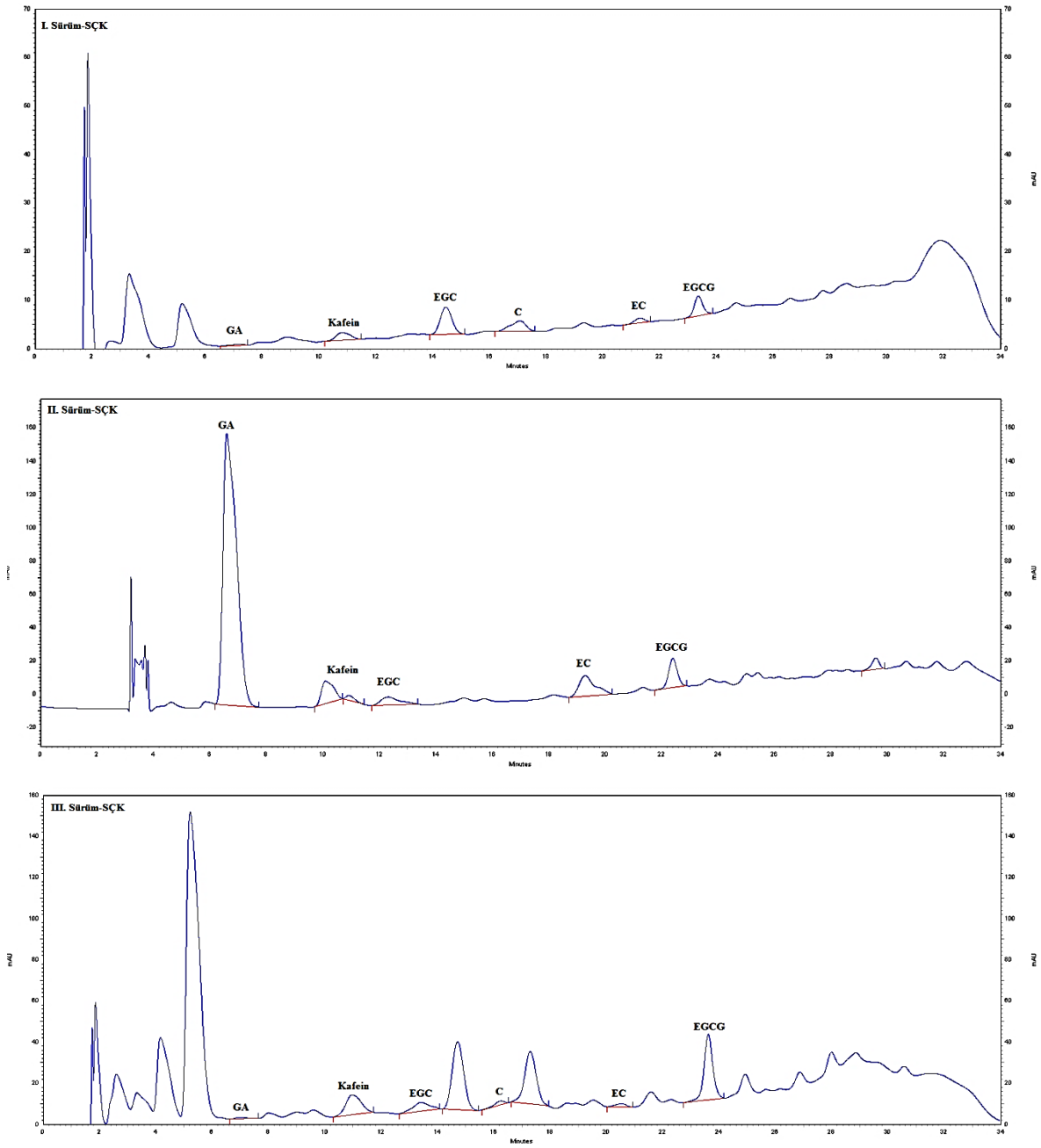


Şekil 3.13. 2012 Yılı III. sürüm yaş, kuru, dondurulmuş yaş çay örneklerinin kateşin ekstraktlarının HPLC-A yöntemi ile elde edilen kromatogramları

2012 Yılı çay atığı ve kafein tozu örneklerinin HPLC kromatogramları sırasıyla Şekil 3.14 ve 3.15’de verilmiştir.



Şekil 3.14. 2012 Yılı I., II. ve III. sürüm siyah çay atığının kateşin ekstraktlarının HPLC-B yöntemi ile elde edilen kromatogramları



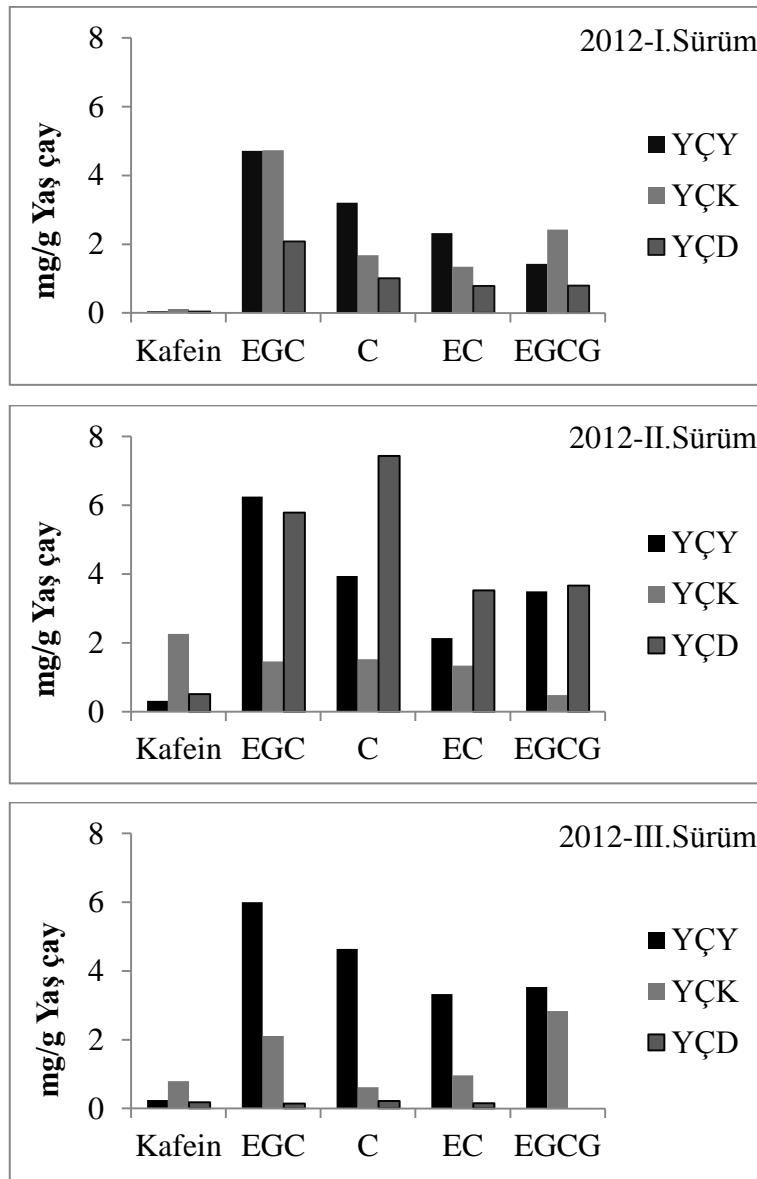
Şekil 3.15. 2012 Yılı I., II. ve III. sürüm kafein tozunun kateşin ekstraktlarının HPLC-B yöntemi ile elde edilen kromatogramları

3.3.6. Çay Örneklerinin Kateşin İçerikleri

Şekil 3.11-3.15’de verilen kromatogramlardan ekstrakt içindeki herbir kateşin türevinin miktarı ve 1 g örnekten izole edilebilen miktarları hesaplandı. Bu hesaplamalar doğrultusunda önemli bir değerlendirme yapılabilir. Çay örneklerinden elde edilen ve Bölüm 3.3.1-3.3.3’de sunulan veriler etil asetat ile ekstre edilebilen toplam ekstrakt

kütlelerini temsil etmektedir. Örneğin, Şekil 3.4'te II. sürüm kurutulmuş yaş çay (YÇK) örneğinden %5,90 (a/a) ekstrakt verimi elde edilmiştir. Bu ekstraktın HPLC analizi ile içerdiği kateşinlerin nicel analizi ekstraksiyonun ne oranda başarılı olduğunu gösterecektir. Zira etil asetat ile yapılan sıvı-sıvı ekstraksiyonu tam seçimli bir ekstraksiyon olmadığından kateşinlerin yanısıra diğer kimyasallar da ekstre edilmiş olabilir. Endüstriyel anlamda değerli bir ürün olması için içerdiği kateşin miktarının yüksek olması gerekir.

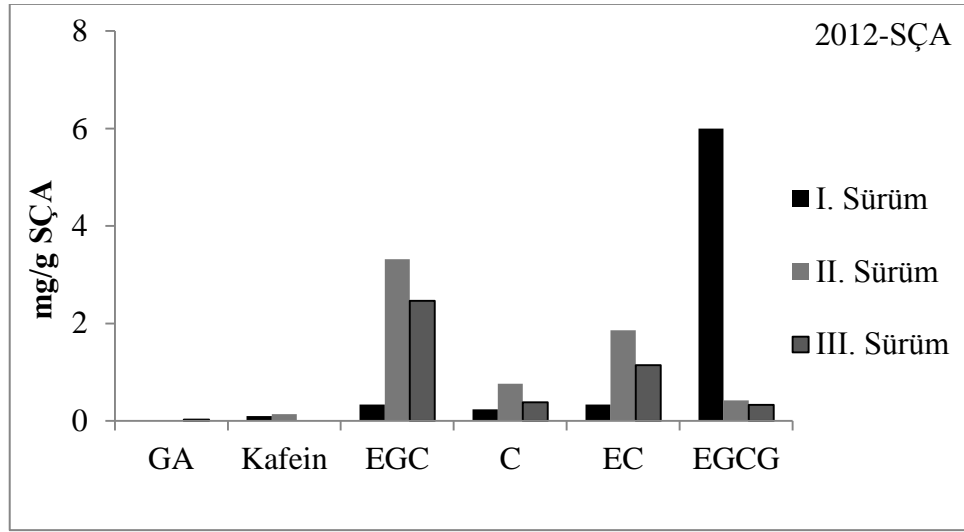
Yaş çay örneklerinin içerdiği kateşin miktarları (mg/g çay) Şekil 3.16'da, çay atıklarının Şekil 3.17'de ve kafein tozu içeriği Şekil 3.18'de verilmiştir.



Şekil 3.16. 2012 Yılı I., II. ve III. sürüm yaş çay örneklerinin kateşin içerikleri

I. Sürüm örnekleri kendi arasında karşılaştırıldığında kuru çalışılan örneklerin içeriklerinin yaş ve dondurulmuş örneklere göre daha yüksek olduğu EGC'nin baskın tür olduğu bunu sırasıyla C, EC, EGCG'nin takip ettiği belirlendi. II. Sürüm örneklerde yaş ve dondurulmuş örneklerin yüksek ve birbirine yakın kateşin içerikleri verdiği kuru örneklerin ise I. sürüme göre daha düşük olduğu görüldü. Bu sürüm ekstraktlarında tüm kateşinler önemli oranda bulunmaktadır. Oysaki Şekil 3.4'de görüleceği üzere II. sürüm kurutulmuş yaş çay örnekleri %5,90 gibi en yüksek kateşin verimini sağlamıştır. Buda göstermektedir ki ekstrakt verimi doğru bir gösterge olmayıp önemli olan bu ekstraktın içerdiği kateşin türlerinin miktarıdır. III. Sürüm örneklerde ise yaş çalışılan örneklerin yüksek kateşin içeriği verdiği bunu kuru örneklerin izlediği dondurulmuş örneklerin ise çok düşük kateşin içeriğine sahip olduğu belirlendi. Genel içerik sıralaması EGC>C>EC>EGCG şeklindedir.

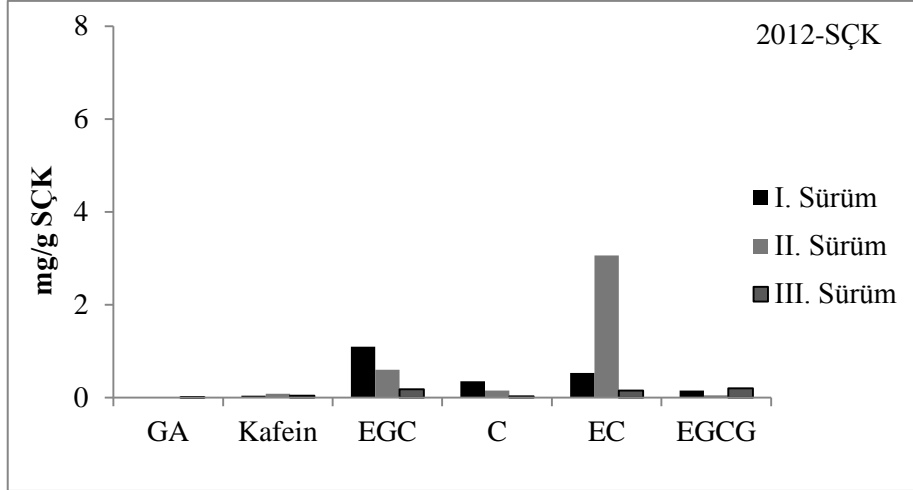
Çay atığından izole edilebilen kateşinler hiç de azımsanmayacak orandadır (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. 2012 Yılı I., II. ve III. sürüm siyah çay atığının kateşin içerikleri

Özellikle EGCG içeriği I. sürümde %5,99 mg'a ulaşmıştır. Bu türü sırasıyla II. sürümde EGC, EC ve C takip etmektedir.

Kafein tozu örneklerinde her üç sürümde düşük oranda kateşin içeren bir ekstraksiyon yapıldığı görülmüştür (Şekil 3.18).



Şekil 3.18. 2012 Yılı I., II. ve III. sürüm kafein tozunun kateşin içerikleri

Çöp olarak tanımlandığı göz önüne alındığında kafein tozunun katma değeri yüksek olan kimyasalları da içerdiği açıktır. Yüksek verimde kafein içermesinin yanısıra kateşin türleri bakımından da değerlendirilebilir. Yaklaşık 4 mg EC içeriği ile yüksek verim II. sürümde elde edilmiştir. I. sürümden elde edilen 1 mg EGC ve C takip eder. En önemli kateşin türü olan EGCG üç sürümde de az miktarda belirlendi.

3.3.7 2012 Yılı Örneklemesi Genel Değerlendirme

2012 Yılı çay örnekleri sıcak su ekstraksiyonuna tabi tutulduktan sonra etil asetatla sıvı-sıvı ekstraksiyonla kateşinlerin seçimli ekstraksiyonu yapılmış ve ekstrakt verimleri (%a/a) hesaplanmıştır. HPLC analizleri göstermektedir ki sıvı-sıvı ekstraksiyonuyla elde edilen ekstraktın tümü kateşin türlerine ait değildir. Ekstrakt içindeki kateşin türlerinin yüzde oranlarından yararlanılarak doğru bir değerlendirme yapmak mümkün olacaktır. Bu amaçla tüm örneklerin içerik yüzdeleri hesaplanarak Tablo 3.2, 3.3 ve 3.4'te verilmiştir. Yaş çay örnekleri için Tablo 3.2'ye bakıldığında çalışılan örnek türlerinin hepsinde en başarılı ekstraksiyonun yaş olarak çalışılan örneklerde olduğu net olarak söylenebilir.

Her üç sürümde de yaş olarak ekstre edilen örneklerden %1,11 (I. sürüm), %1,91 (II. sürüm) ve %1,90 (III.sürüm) ekstrakt verimleri elde edilirken bu ekstraktların kateşin içerikleri sırasıyla %100 (I. sürüm), %84,19 (II. sürüm) ve %93,15 (III. sürüm)'dir. Tablonun son satırında yer alan ve yaş çay örneklerinden ekstre edilebilen toplam kateşin yüzdeleri açısından da yaş örneklerin işlenmesi en yüksek verimleri sağlamaktadır.

Özellikle III. sürüm yaş çaydan %1,76'ya varan %93,15 saflıkta kateşin ekstraktı elde edilmiştir. Kuru ve dondurulmuş örneklerden elde edilen ekstraktların saflığı şaşırtıcı derecede düşük bulunmuştur. Tüm bu verilerden yola çıkarak çay örneklerinin toplandıktan hemen sonra ekstre edilmesi gerekir sonucuna ulaşılır.

Tablo 3.2. 2012 Yılı yaş çay örneklerinin ekstrakt miktarına göre kateşin yüzdeleri

2012 Yaş Çay Örnekleri									
İçerik (%)	I. Sürüm			II. Sürüm			III. Sürüm		
	YÇY	YÇK	YÇD	YÇY	YÇK	YÇD	YÇY	YÇK	YÇD
Kafein	-	0,01	-	0,03	0,22	0,05	0,02	0,07	0,01
EGC	0,47	0,47	0,20	0,62	0,14	0,57	0,60	0,21	0,01
C	0,32	0,16	0,10	0,39	0,15	0,74	0,46	0,06	0,02
EC	0,23	0,13	0,07	0,21	0,13	0,35	0,33	0,09	0,01
EGCG	0,14	0,24	0,07	0,34	0,04	0,36	0,35	0,28	-
Toplam Kateşin İçeriği	1,11	1,03	0,47	1,61	0,70	2,10	1,77	0,73	0,06
Kateşin Ekstraktı*	1,11	1,52	0,91	1,91	5,90	4,52	1,90	2,84	0,66
Ekstrakt İçindeki Toplam Kateşin**	100	67,76	51,64	84,29	11,86	46,46	93,15	25,70	9,09
Çaydan Ekstre Edilebilen Toplam Kateşin	1,01	1,02	0,40	1,60	0,60	2,09	1,76	0,72	0,06

*10g çay örneğinden elde edilen ekstrakt yüzdesi

**Kateşin ekstraktı içindeki içeriklerin toplam yüzdesi

Tablo 3.3'den görüleceği gibi çay atığından daha düşük oranlarda kateşin içeren ekstraktlar elde edilmiştir. I. Sürümde %1,38 ekstrakt elde edilmiş olup bunun %50'si kateşinlerdir. II. Sürümde %3,78 ekstrakt verimi elde edilmesine rağmen bunun sadece %17,19'u kateşinlerdir.

Tablo 3.3. 2012 Yılı siyah çay atığının ekstrakt miktarına göre kateşin yüzdeleri

2012 Siyah Çay Atığı (SÇA)			
İçerik(%)	I. Sürüm	II. Sürüm	III. Sürüm
GA	-	-	-
Kafein	-	0,01	-
EGC	0,03	0,33	0,24
C	0,02	0,07	0,03
EC	0,03	0,18	0,11
EGCG	0,60	0,04	0,03
Toplam Kateşin İçeriği	0,70	0,65	0,43
Kateşin Ekstraktı*	1,38	3,78	1,10
Ekstrakt İçindeki Toplam Kateşin**	50,72	17,19	39,09
Çay Atığından Ekstre Edilebilen Toplam Kateşin	0,69	0,06	0,42

*10g çay örneğinden elde edilen ekstrakt yüzdesi

**Kateşin ekstraktı içindeki içeriklerin toplam yüzdesi

Tablo 3.4'te görüldüğü üzere kafein tozu örneklerindeki toplam kateşin miktarı en fazla %0,38 ile II. sürümde ve en az %0,06 ile III. sürümdedir. Çay atığı örneklerinde olduğu gibi hiçbir amaçla kullanılmayan kafein tozu örneklerinde az miktarda dahi kateşin bulunması önemli bir sonuçtur.

Tablo 3.4. 2012 Yılı kafein tozunun ekstrakt miktarına göre kateşin yüzdeleri

2012 Kafein Tozu (SÇK)			
İçerik (%)	I. Sürüm	II. Sürüm	III. Sürüm
GA	-	-	-
Kafein	-	-	-
EGC	0,10	0,05	0,01
C	0,03	0,01	-
EC	0,05	0,30	0,01
EGCG	0,01	-	0,01
Toplam Kateşin İçeriği	0,21	0,39	0,06
Kateşin Ekstraktı*	2,74	1,55	0,43
Ekstrakt İçindeki Toplam Kateşin**	7,66	25,16	13,95
Çay Atığından Ekstre Edilebilen Toplam Kateşin	0,20	0,38	0,06

*10g çay örneğinden elde edilen ekstrakt yüzdesi

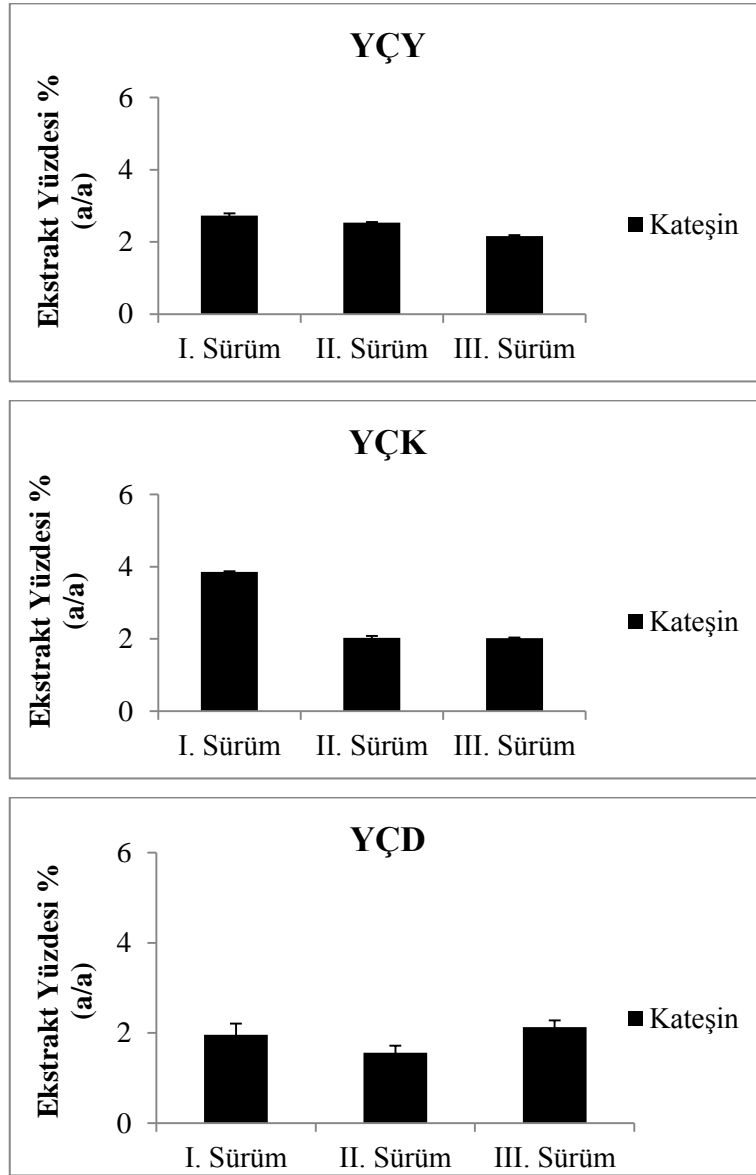
**Kateşin ekstraktı içindeki içeriklerin toplam yüzdesi

Amaçlar kısmında belirtilen gerekçeler doğrultusunda aynı örneklemeler 2013 yılı I, II ve III. sürümlerde tekrar edildi.

3.4. 2013 Yılı Örnekleme Bulguları

3.4.1. Yaş Çay Örneklerinin Kateşin ve Kafein Verimleri

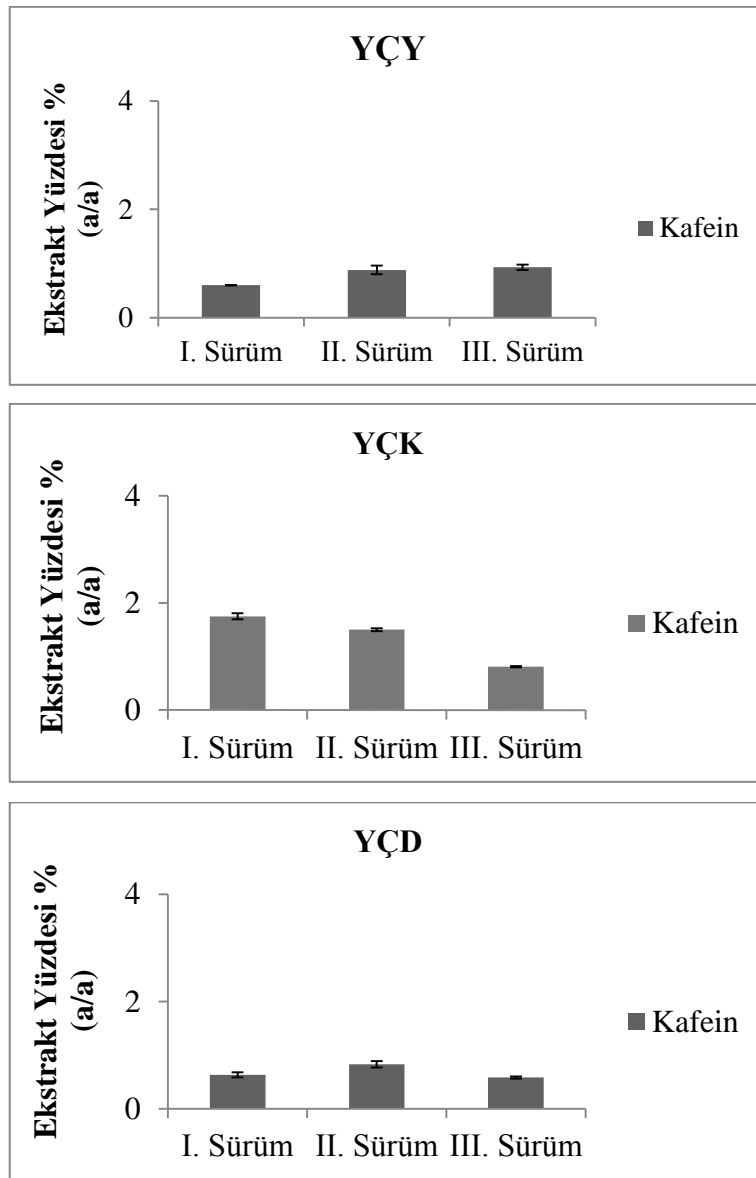
Kateşin ekstrakt verimleri Şekil 3.19’da, kafein verimleri ise Şekil 3.20’de verilmiştir.



Şekil 3.19. 2013 Yılı I., II. ve III. sürüm yaş, kuru, dondurulmuş yaş çay örneklerinin kateşin verimleri

2013 Yılı yaş çay örneklerinin kateşin verimlerinde 2012'den farklı veriler elde edilmiştir. En yüksek verim %3,85 ile I. sürüm kurutulmuş (YÇK) yaş çay örneklerinden elde edilmiştir. Genel olarak sürümler arasında karşılaştırma yapıldığında I. sürümün diğer sürümlerden daha yüksek ekstrakt verimi sağladığı açıktır.

2013 Yılı örneklerinin farklı sürüm ve çay tipine göre sıcak su ekstraksiyonuyla elde edilen kafein verimleri Şekil 3.20'de verilmiştir.

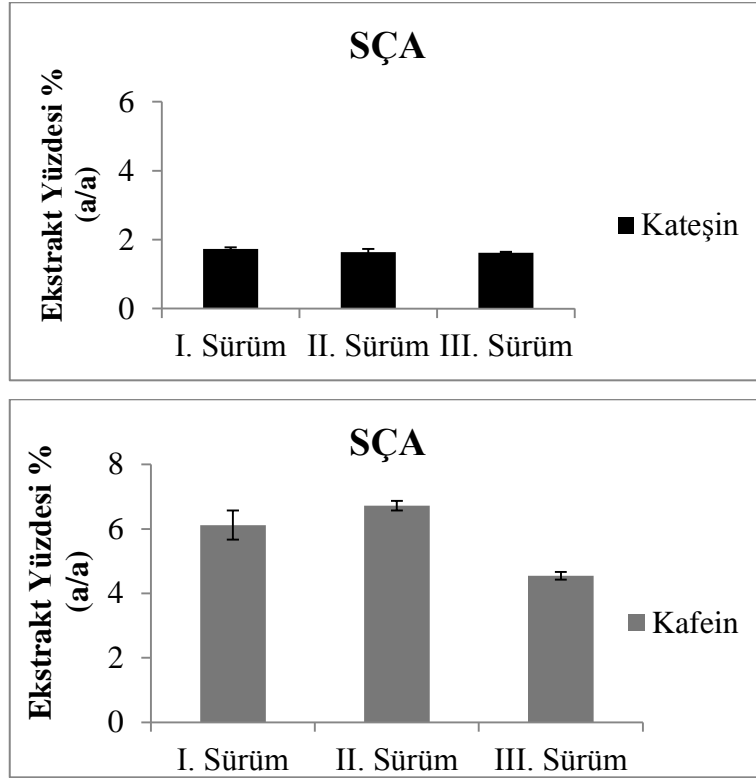


Şekil 3.20. 2013 Yılı I., II. ve III. sürüm yaş, kuru, dondurulmuş yaş çay örneklerinin kafein verimleri

Sıcak su ekstraksiyonu ile elde edilen 2013 yılı kafein verimlerinde 2012 verimlerine benzer eğilim gözlenmiştir. Sürümler arası karşılaştırma yapıldığında en yüksek verimlerin kuru olarak çalışılan yaş çay örneklerinden elde edildiği görüldü. Yaş ve dondurulmuş olarak çalışılan örneklerde ise sonuçlar birbirine yakın olmasına rağmen yaş örneklerin biraz daha yüksek verimde olduğu belirlendi.

3.4.2. Siyah Çay Atığının (SÇA) Kateşin ve Kafein Verimleri

Çay atığının içerdiği kateşin ve kafein ekstrakt verimleri Şekil 3.21’de görülmektedir. Kateşin ekstrakt verimlerinde her üç sürümde de benzer değerler elde edilmiştir. Bu veriler 2012 yılı I. ve III. sürüm verileriyle de uyumludur.



Şekil 3.21. 2013 Yılı I., II. ve III. sürüm siyah çay atığının kateşin ve kafein verimleri

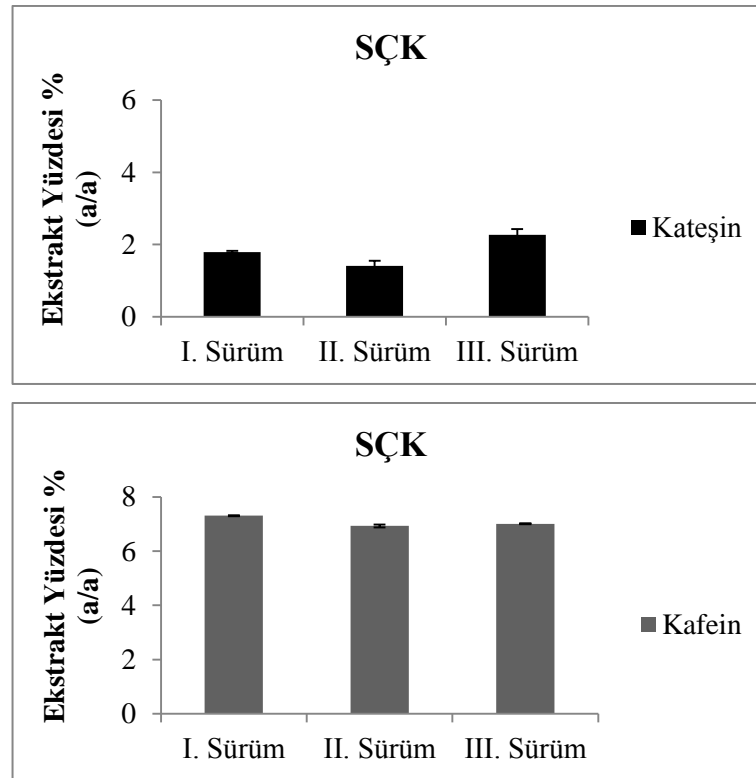
2013 Yılı tüm sürümlerinden elde edilen kafein ekstrakt verimleri normal değerlerin iki-üç katına çıkmıştır. Bu kadar yüksek kafein değerleri 2012 örneklemede gözlemlenmediği gibi literatürde de rapor edilmemiştir. Aynı sürümün yaş örneklerinden

%2'den daha düşük kafein izole edilmesine rağmen atıklarda bu oranın %6,72'ye (II. sürüm) çıkması şaşırtıcıdır. Bunun tamamen işleme teknolojisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu ekstraktların saf kafeinden oluştuğunu da belirtmek gerekir. Sürümler arası karşılaştırma yapıldığında en yüksek verim %6,72 ile II. sürümde olup bunu %6,12 ile I. sürüm ve %4,55 ile III. sürüm izlemektedir.

Kafein ihtiyacının tamamını ithalatla karşılayan bir ülke olarak sonuçların ne denli değerli olduğu tartışılmazdır.

3.4.3. Kafein Tozunun (SÇK) Kateşin ve Kafein Verimleri

Kafein tozu ekstrakt verim değerleri Şekil 3.22'de görülmektedir. 2012 verileriyle uyumlu olmayan kateşin ve kafein ekstrakt verimleri elde edilmiştir. Örneğin 2012 kafein tozu örneklerinde I. sürümden III. sürüme ciddi bir azalma eğilimi varken 2013 örneklerinde en yüksek kateşin verimi III. sürümde elde edilmiştir.



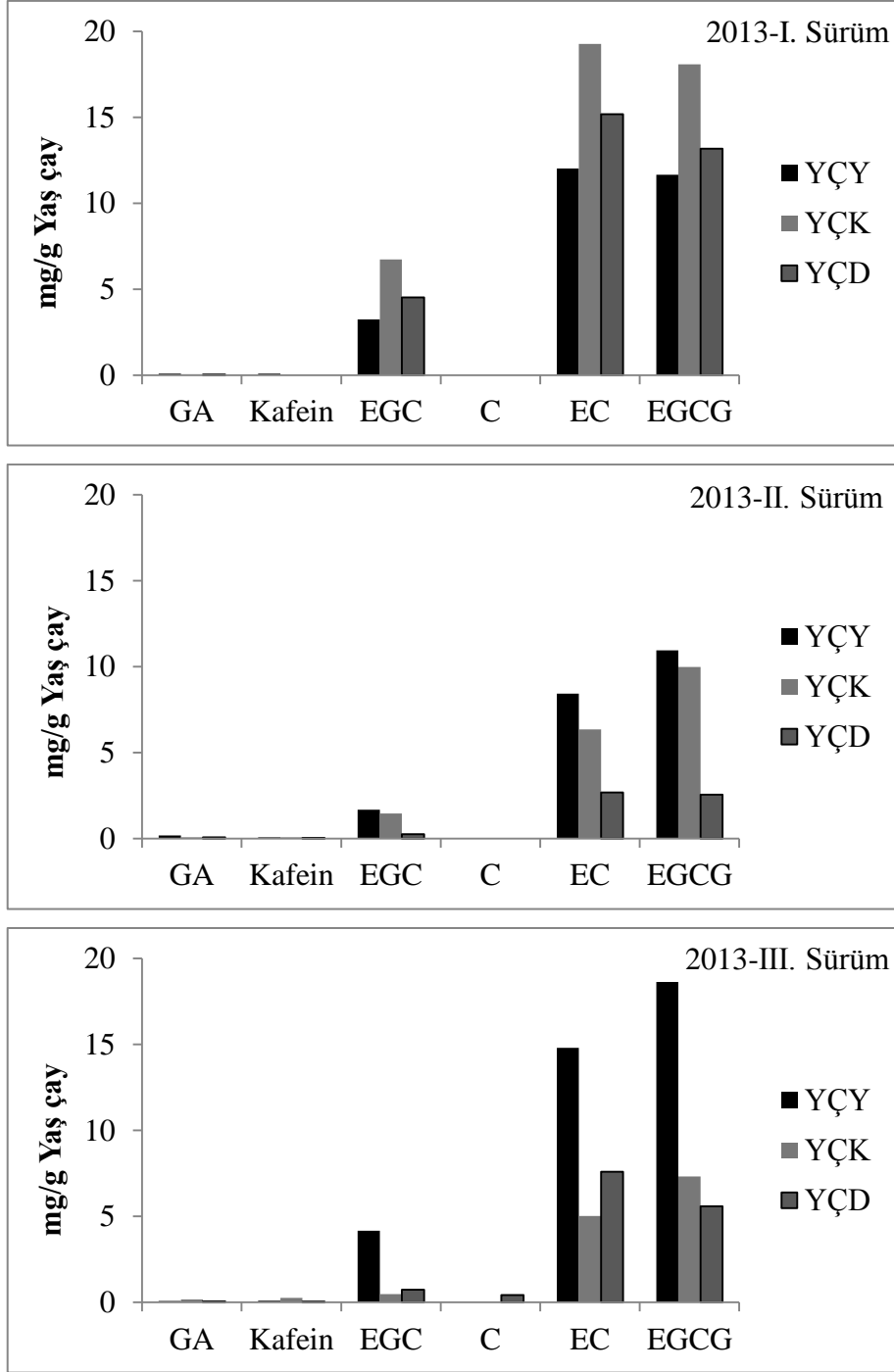
Şekil 3.22. 2013 Yılı I., II. ve III. sürüm kafein tozunun kateşin ve kafein verimleri

Kafein içerikleri açısından değerlendirildiğinde %7,31 ile I. sürümde, %7,01 ile III. sürümde ve %6,93 ile II. sürümde oldukça yüksek miktarlarda kafein elde edilmiştir. Çay atığına paralel olarak kafein tozları da yüksek oranda kafein içermektedir. Ülkemizde değerlendirilmeyen kafein tozu örneklerinin kateşin ve kafein izolasyonları ile katma değeri yüksek olan ürünlere dönüştürülerek değerlendirilmesi açısından önemli sonuçlar elde edilmiştir.

3.4.4. Çay Örneklerinin HPLC Analizleri ve Kateşin İçerikleri

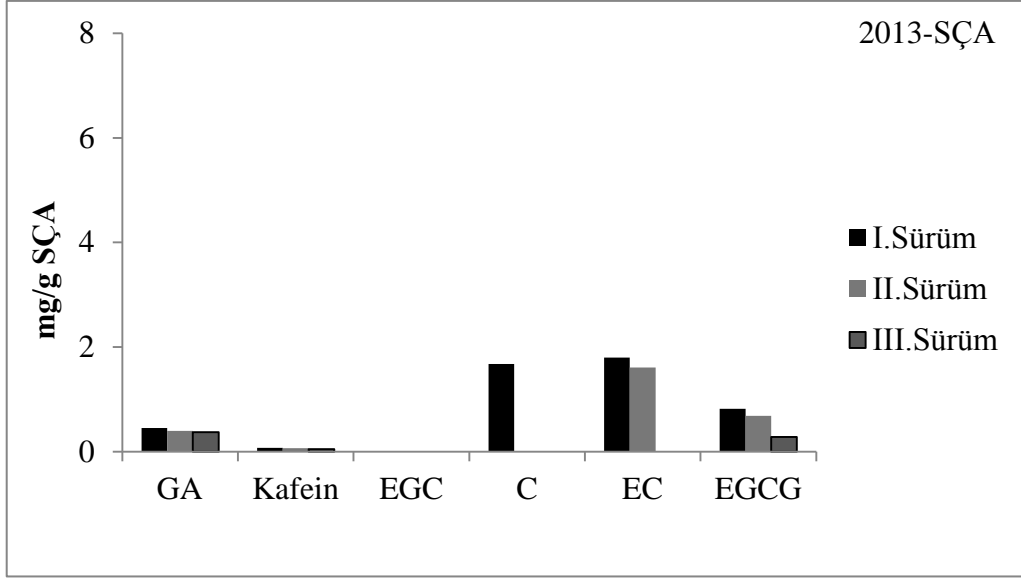
2012 Yılı örneklerine ait HPLC kromatogramları ve bu kromatogramlardan hesaplanan kateşin içerikleri Bölüm 3.3.5 ve 3.3.6'da ayrıntılı olarak verilmiştir. 2013 örnekleme için HPLC kromatogramları verilmeden hesaplanan kateşin içerikleri aşağıda verilmiştir. Yaş çay örneklerinin kateşin içerikleri Şekil 3.23'de verilmiştir.

Her üç sürümde de 2012 ekstraktlarından daha yüksek kateşin miktarları belirlenmiştir. Özellikle kuru ve yaş örnekler çok yüksek kateşin içeriklerine sahiptir. I. sürümde kuru olarak çalışılan örneklerin oldukça yüksek miktarda olduğu belirlendi. Çay kateşinlerinden en önemlisi olan EGCG miktarı kuru örnekte yaklaşık 20 mg'a ulaşmaktadır. EC içeriği YÇY, YÇK, YÇD örneklerinde de oldukça yüksektir. Ayrıca tüm örneklerde EGC belirlenmiştir.



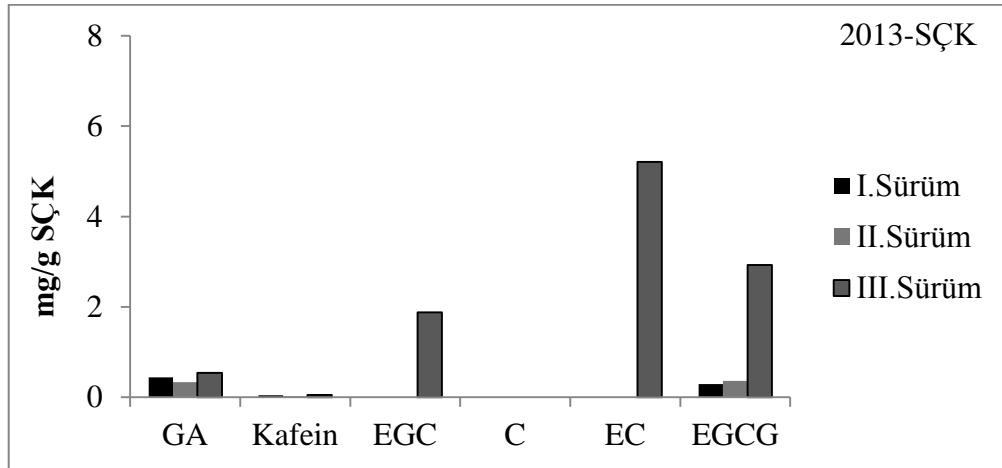
Şekil 3.23. 2013 Yılı I., II. ve III. sürüm yaş çay örneklerinin kateşin içerikleri

Çay atığının kateşin içerikleri Şekil 3.24'den de görüleceği gibi son derece düşüktür. Tüm türevlerin miktarı 2 mg'ın altındadır.



Şekil 3.24. 2013 Yılı I., II. ve III. sürüm siyah çay atığının kateşin içerikleri

I.ve II. Sürüm kafein tozu örnekleri 2012 örneklerinden çok daha düşükken III. sürümde önemli derecede EC, EGCG ve EGC belirlenmiştir (Şekil 3.25).



Şekil 3.25. 2013 Yılı I., II. ve III. sürüm kafein tozunun kateşin içerikleri

3.4.5. 2013 Yılı Örneklemesi Genel Değerlendirme

2013 Yılı örneklemelerinin içerik yüzdeleri Tablo 3.5, 3.6 ve 3.7’de verilmiştir.

Tablo 3.5. 2013 Yılı yaş çay örneklerinin ekstrakt miktarına göre kateşin yüzdeleri

2013 Yaş Çay Örnekleri									
İçerik(%)	I.Sürüm			II.Sürüm			III.Sürüm		
	YÇY	YÇK	YÇD	YÇY	YÇK	YÇD	YÇY	YÇK	YÇD
GA	-	-	-	0,01	-	-	-	0,01	-
Kafein	-	-	-	-	-	-	-	0,02	-
EGC	0,32	0,67	0,45	0,16	0,14	0,02	0,41	0,04	0,07
C	-	-	-	-	-	-	-	-	0,04
EC	1,20	1,92	1,21	0,84	0,63	0,26	1,07	0,50	0,75
EGCG	1,16	1,26	1,01	1,09	0,99	0,25	1,16	0,73	0,55
Toplam Kateşin İçeriği	2,71	3,85	1,98	2,12	1,80	0,56	2,17	1,32	1,45
Kateşin Ekstraktı*	2,77	3,85	1,98	2,52	2,05	1,56	2,17	2,02	2,13
Ekstrakt İçindeki Toplam Kateşin**	97,83	100	100	84,12	87,80	35,89	100	65,34	68,07
Çaydan Ekstre Edilebilen Toplam Kateşin	2,70	3,85	1,98	2,11	1,80	0,56	2,17	1,31	1,45

*10g çay örneğinden elde edilen ekstrakt yüzdesi

**Kateşin ekstraktı içindeki içeriklerin toplam yüzdesi

2012 Verileriyle uyumlu olarak yaş çay örneklerinin yaş olarak işlenmesi %97,83 (I. sürüm), %84,12 (II. sürüm) ve %100 (III. sürüm) kateşinden oluşan ekstraktlar vermektedir. Yaş çaydan elde edilen ekstrakt verimleri de oldukça iyidir (sırasıyla %2,77; %2,52 ve %2,17). I. sürümde kurutulmuş ve dondurulmuş örneklerde %100 kateşinden oluşan ekstraktlar elde edilmiştir. Beklendiği üzere çay atığından çok düşük oranda kateşin içeren ekstratlar elde edilmiştir.

Tablo 3.6. 2013 Yılı siyah çay atığının ekstrakt miktarına göre kateşin yüzdeleri

2013 Siyah Çay Atığı			
İçerik(%)	I.Sürüm	II.Sürüm	III.Sürüm
GA	0,04	0,04	0,03
Kafein	-	-	-
EGC	-	-	-
C	0,17	-	-
EC	0,18	0,16	-
EGCG	0,08	0,07	0,03
Toplam Kateşin İçeriği	0,48	0,27	0,07
Kateşin Ekstraktı*	1,73	1,65	1,62
Ekstrakt İçindeki Toplam Kateşin**	27,74	16,36	4,32
Çay Atığından Ekstre Edilebilen Toplam Kateşin	0,48	0,26	0,06

*10g çay örneğinden elde edilen ekstrakt yüzdesi

**Kateşin ekstraktı içindeki içeriklerin toplam yüzdesi

2013 Yılı kafein tozu örneklerinin kateşin içeriklerine göre (Tablo 3.6) sadece III. sürüm örneklerinde dikkate değer oranda kateşin bulunmaktadır. Ekstrakt veriminin %2,27 olduğu bu sürümde ekstraktın hemen hemen yarısı kateşinlerden özellikle de EC ve EGCG'dan oluşmaktadır.

Tablo 3.7. 2013 Yılı kafein tozunun ekstrakt miktarına göre kateşin yüzdeleri

2013 Kafein Tozu			
İçerik (%)	I.Sürüm	II.Sürüm	III.Sürüm
GA	0,04	0,03	0,05
Kafein	-	-	-
EGC	-	-	0,19
C	-	-	-
EC	-	-	0,52
EGCG	0,02	0,04	0,29
Toplam Kateşin İçeriği	0,08	0,07	1,06
Kateşin Ekstraktı*	1,80	1,44	2,27
Ekstrakt İçindeki Toplam Kateşin**	4,44	4,86	46,70
Çay Atığından Ekstre Edilebilen Toplam Kateşin	0,08	0,07	1,06

*10g çay örneğinden elde edilen ekstrakt yüzdesi

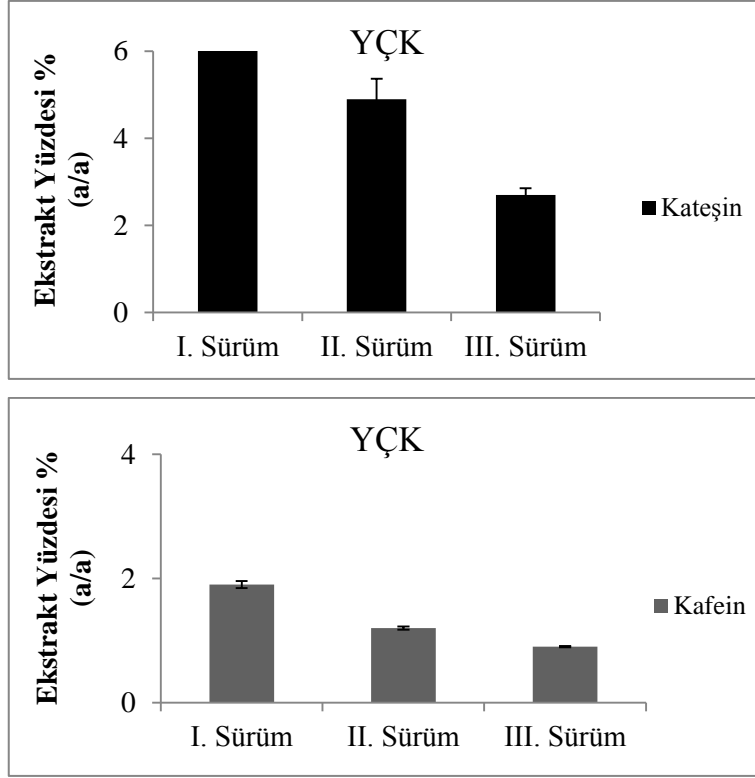
**Kateşin ekstraktı içindeki içeriklerin toplam yüzdesi

3.5. 2014 Yılı Örnekleme Bulguları

2012 ve 2013 Yılı örnekleme çalışmalarında yaş çay örneklerinin yaş veya kuru olarak sıcak su ekstraksiyonunda benzer veriler elde edilmektedir. Bu bulgudan hareketle 2014 yılında sadece kurutulmuş yaş çay örnekleri, atık çay ve kafein tozu örnekleriyle çalışıldı.

3.5.1. Yaş Çay Örneklerinin (YÇK) Kateşin ve Kafein Verimleri

Kurutulmuş yaş çay örneklerinde I., II. ve III. sürümde 2013 verilerine benzer veriler elde edilmiştir. Ancak 2014 kateşin ekstrakt verimleri çok daha yüksek olup I. sürümde %6,50'ye ulaşmıştır (Şekil 3.26). Bu üç yıllık izlemede elde edilen en yüksek kateşin ekstrakt verimidir.

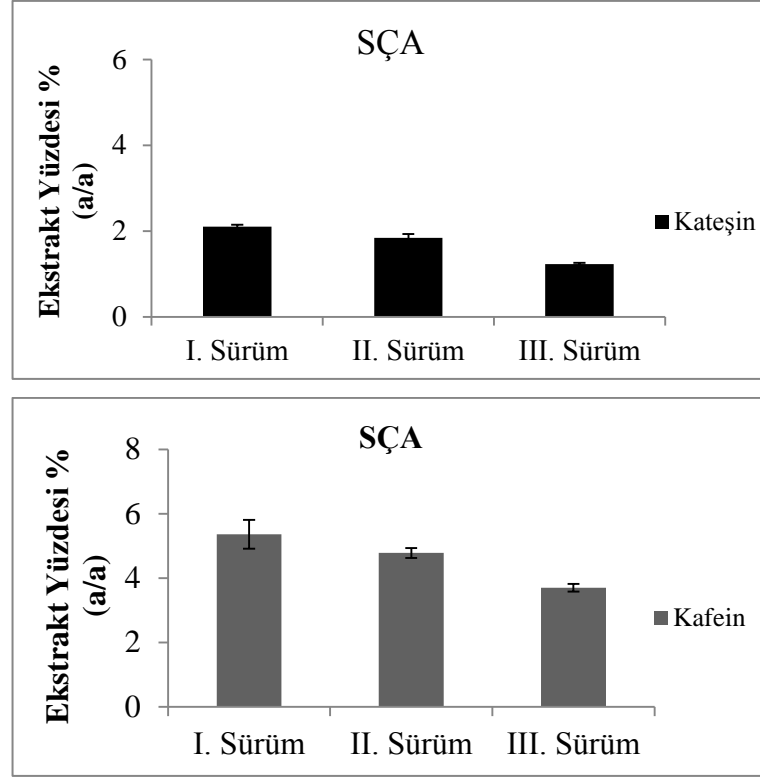


Şekil 3.26. 2014 Yılı I., II. ve III. sürüm kurutulmuş yaş çay örneklerinin kateşin ve kafein verimleri

Kafein verimleri beklenen aralıkta olup I. sürümde %1,90 değerindedir.

3.5.2. Siyah Çay Atığının (SÇA) Kateşin ve Kafein Verimleri

2014 Yılı siyah çay atığı örnekleri kateşin ekstraktı verimi açısından incelendiğinde en yüksek verimin I. sürümde (%2,10) ve en düşük verimin III. sürümde (%1,23) elde edildiği belirlendi (Şekil 3.27). Kateşin verimleri 2012 ve 2013 verileriyle uyum içindedir. Kafein verimleri 2012'den yüksek iken 2013 verimlerine benzer bulunmuştur (Şekil 3.27).

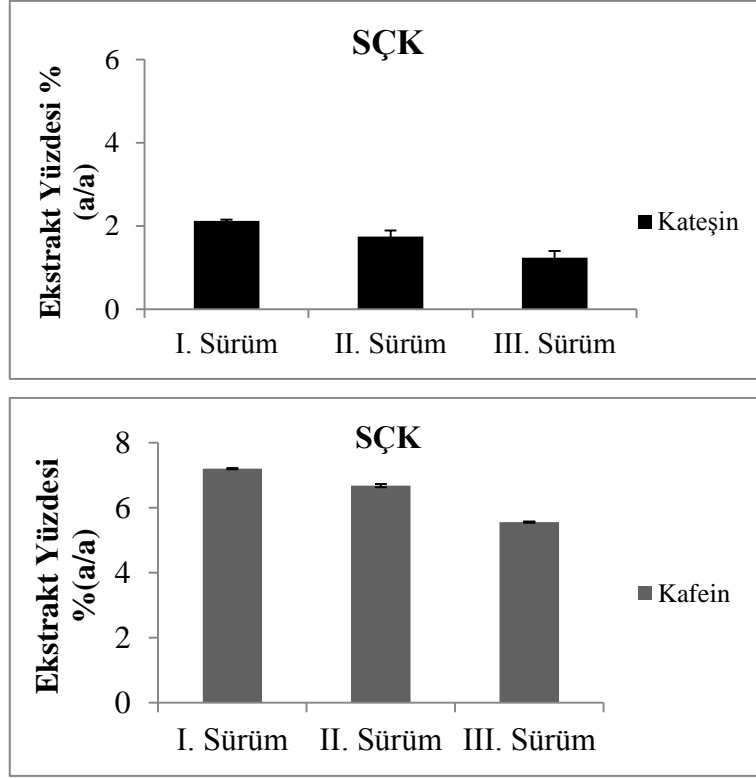


Şekil 3.27. 2014 Yılı I., II. ve III. sürüm siyah çay atığının kateşin ve kafein verimleri

I. Sürümden %5,36, II. sürümden %4,78 ve III. sürümden %3,70 ekstrakt verimleri elde edildi.

3.5.3. Kafein Tozunun (SÇK) Kateşin ve Kafein Verimleri

Kafein tozunun kateşin ve kafein ekstrakt verimleri Şekil 3.28' de verilmiştir.



Şekil 3.28. 2014 Yılı I., II. ve III. sürüm kafein tozunun kateşin ve kafein verimleri

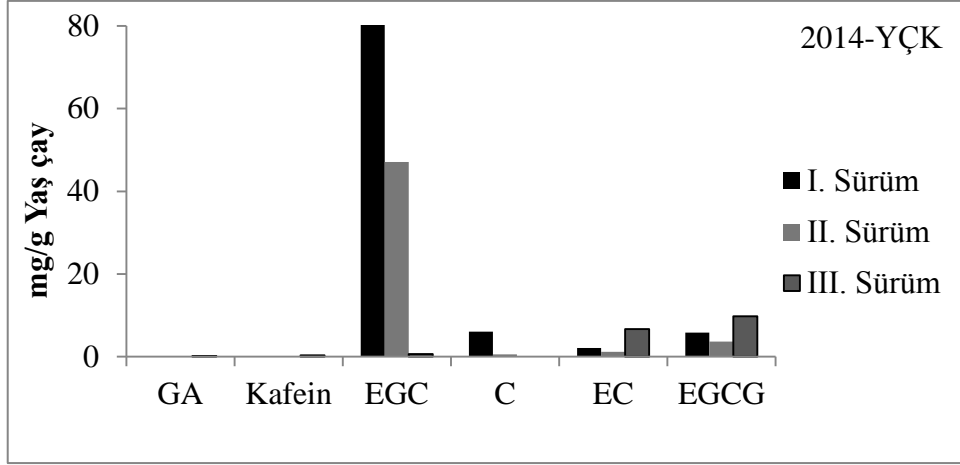
Sıcak su ekstraksiyonuyla elde edilen kateşin verimleri değerlendirildiğinde (I. sürümde %2,12, II. sürümde %1,75 ve III. sürümde %1,24) 2013 ile uyumlu olduğu söylenebilir.

Sıcak su ekstraksiyonuyla elde edilen kafein ekstraktı verimlerinin I. sürümde %7,20, II. sürümde %6,68 ve III. sürümde %5,56'dır. Siyah çay atığında olduğu gibi kafein tozu örneklerinde de kafein verimleri oldukça yüksektir. 2013 ve 2014 verileri göz önüne alındığında kafein içeriğinin oldukça yüksek olduğu ve bunun rastgele bir artış olmadığı açıktır.

3.5.4. Çay Örneklerinin HPLC Analizleri ve Kateşin İçerikleri

2014 Yılı örneklemeleri için HPLC kromatogramları verilmeden hesaplanan kateşin içerikleri Şekil 3.29, 3.30 ve 3.31'de verilmiştir.

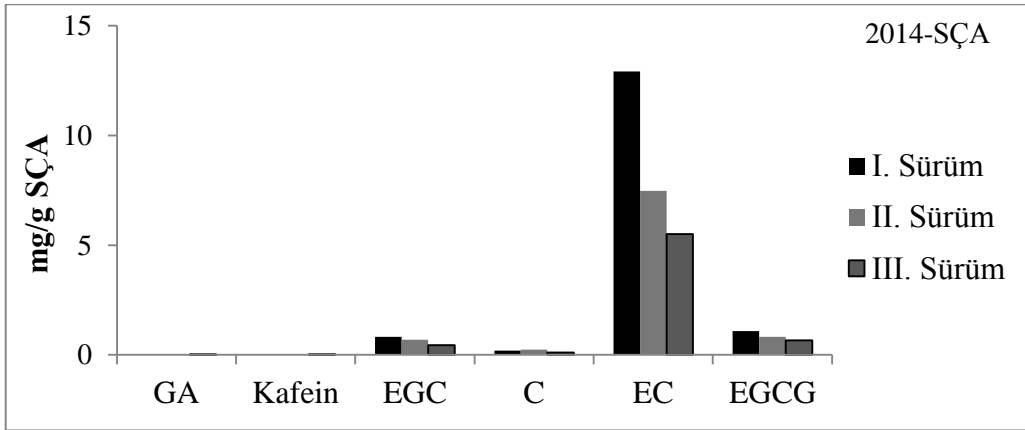
Şekil 3.29'dan da görüleceği gibi 2014 yılında kurutulmuş yaş çaydan elde edilen kateşin ekstraktları yüksek oranda EGC içermektedir.



Şekil 3.29. 2014 Yılı I., II. ve III. sürüm kurutulmuş yaş çay örneklerinin kateşin içerikleri

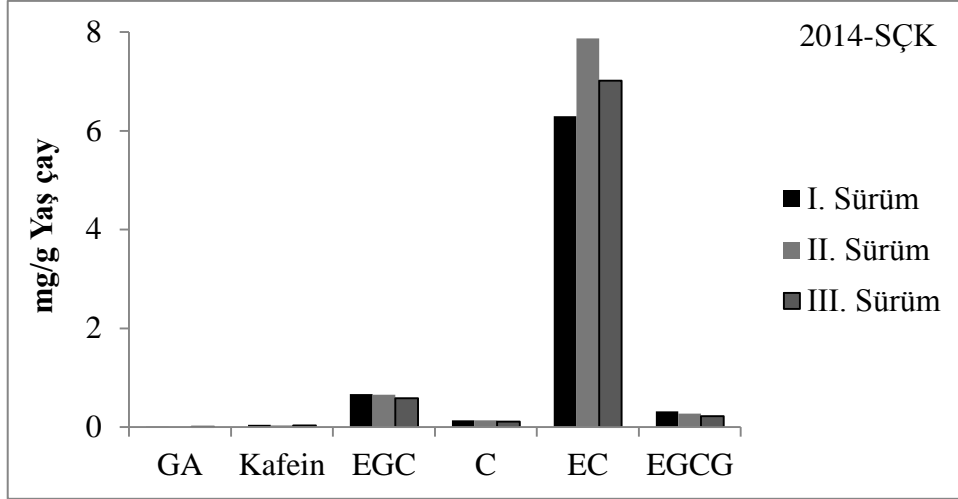
I. ve II. Sürümde çok yüksek oranda EGC tespit edilmiştir. I. Sürüm ekstraktında 80 mg, II. sürüm ekstraktında ise yaklaşık 50 mg mevcuttur. III. Sürümde yaklaşık 10 mg, I. sürümde 6 mg ve III. sürümde 4 mg EGCG bulunduğu belirlenmiştir. Diğer türler kadar yüksek olmasa da III. sürümde 7 mg, I. sürümde 2 mg ve II. sürümde 1 mg EC belirlenmiştir.

Çay atığının çoğunlukla EC içerdiği (Şekil 3.30) ekstrakt içindeki miktarının 2013'e göre çok daha yüksek olduğu açıktır.



Şekil 3.30. 2014 Yılı I., II. ve III. sürüm siyah çay atığının kateşin içerikleri

Kafein tozunun kateşin içeriği de 2014 yılında maksimum düzeye çıkmıştır (Şekil 3.31). Her üç sürümde de baskın tür EC'dir.



Şekil 3.31. 2014 Yılı I., II. ve III. sürüm kafein tozunun kateşin içerikleri

3.5.5. 2014 Yılı Örneklemesi Genel Değerlendirme

2014 Yılı örneklemelerinin içerik yüzdeleri Tablo 3.8, 3.9 ve 3.10'da verilmiştir.

Tablo 3.8. 2014 Yılı yaş çay örneklerinin ekstrakt miktarına göre kateşin yüzdeleri

2014 Yaş Çay			
İçerik (%)	I.Sürüm	II.Sürüm	III.Sürüm
GA	-	-	0,02
Kafein	-	-	0,03
EGC	6,16	4,70	0,06
C	0,60	0,05	-
EC	0,20	0,12	0,66
EGCG	0,58	0,36	0,97
Toplam Kateşin İçeriği	6,52	4,91	1,76
Kateşin Ekstraktı*	6,52	4,91	2,71
Ekstrakt İçindeki Toplam Kateşin**	100	100	64,94
Çaydan Ekstre Edilebilen Toplam Kateşin	6,52	4,91	1,76

*10g çay örneğinden elde edilen ekstrakt yüzdesi

**Kateşin ekstraktı içindeki içeriklerin toplam yüzdesi

Tablo 3.8'de görüleceği gibi kurutulmuş örneklerin I. ve II. sürüm ekstraktları tamamen kateşinlerden oluşmaktadır. %6,52 kateşin ekstraktının tamamı kateşinlerden oluştuğu için çok başarılı bir ekstraksiyonla ayırma yapıldığı söylenebilir.

Çay atığında daha düşük verimler olmasına karşın I. sürümden 2013 verilerinden çok daha saf (%95,54) ve yüksek verimli (%1,57) kateşin ekstraktı elde edilmiştir. Bu oranlar II. ve III. sürümde daha düşüktür.

Tablo 3.9. 2014 Yılı siyah çay atığının ekstrakt miktarına göre kateşin yüzdeleri

2014 Siyah Çay Atığı			
İçerik(%)	I. Sürüm	II. Sürüm	III. Sürüm
GA	-	-	-
Kafein	-	-	-
EGC	0,08	0,06	0,04
C	0,02	0,02	0,01
EC	1,29	0,74	0,54
EGCG	0,10	0,08	0,06
Toplam Kateşin İçeriği	1,50	0,92	0,67
Kateşin Ekstraktı*	1,57	1,20	1,00
Ekstrakt İçindeki Toplam Kateşin**	95,54	76,66	67,00
Çay Atığından Ekstre Edilebilen Toplam Kateşin	1,50	0,91	0,67

*10g çay örneğinden elde edilen ekstrakt yüzdesi

**Kateşin ekstraktı içindeki içeriklerin toplam yüzdesi

2014 Yılı kafein tozu örneklerinin kateşin yüzdeleri incelendiğinde diğer yıllara göre en yüksek değerine ulaşmıştır. II. Sürümde %0,88, III. sürümde %0,79 ve I. sürümde %0,73 oranında kateşin verimleri elde edilmiştir.

Tablo 3.10. 2014 Yılı kafein tozunun ekstrakt miktarına göre kateşin yüzdeleri

2014 Kafein Tozu			
İçerik(%)	I. Sürüm	II. Sürüm	III. Sürüm
GA	-	-	-
Kafein	-	-	-
EGC	0,06	0,06	0,05
C	0,01	0,01	0,01
EC	0,62	0,78	0,70
EGCG	0,03	0,02	0,02
Toplam Kateşin İçeriği	0,74	0,89	0,79
Kateşin Ekstraktı*	1,50	1,39	1,28
Ekstrakt İçindeki Toplam Kateşin**	49,33	64,02	61,71
Çay Atığından Ekstre Edilebilen Toplam Kateşin	0,73	0,88	0,79

*10g çay örneğinden elde edilen ekstrakt yüzdesi

**Kateşin ekstraktı içindeki içeriklerin toplam yüzdesi

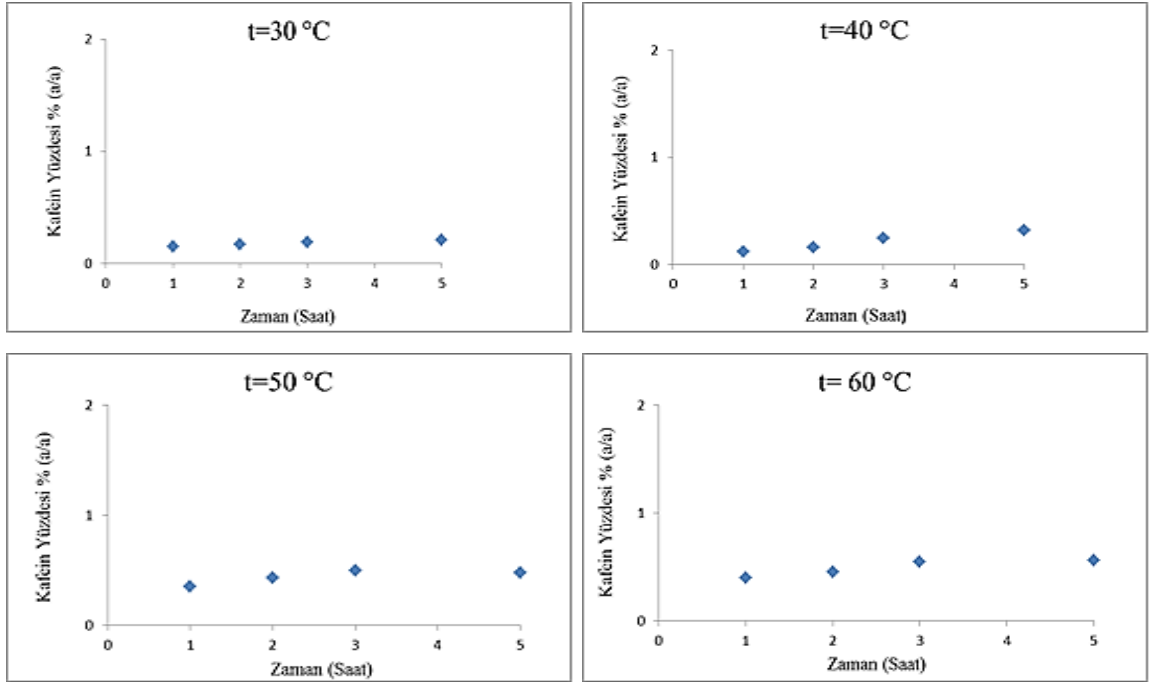
3.6. SFE Yönteminin Optimizasyonu

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu için hangi şartlarda ekstraksiyonun uygun olduğunu belirlemek amacıyla yöntem optimizasyonu yapıldı. SFE’de basınç, sıcaklık, zaman, modifiyer miktarı gibi parametreler değiştirilerek ekstrakt miktarının en yüksek verimle elde edildiği şartlar belirlendi. CO₂ süperkritik akışkanının basınç ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi parametreleri değiştirilerek örneklerden kafein ayırma optimizasyonu yapıldı. Basınçlar 100, 200, 250, 300 bar; ekstraksiyon sıcaklığı 30, 40, 50, 60 °C ve ekstraksiyon süresi de 1, 2, 3, 5 saat olarak bir seri çalışma yapıldı. Kateşinlerin SFE ile ekstraksiyonunda ortamda yalnızca süperkritik akışkan CO₂’in bulunması polarite yönünden yeterli olmadığı için ortama polariteyi artırıcı ilave çözücü (modifiyer) eklendi. Bu amaçla modifiyer olarak etanol kullanıldı ve CO₂ optimizasyonu şartlarında 0,2; 0,3; 0,4 ve 0,5 mL etanol modifiyerli sistemde kateşin ekstraksiyonu optimize edildi.

3.6.1. Modifiyersiz Yöntem Bulguları

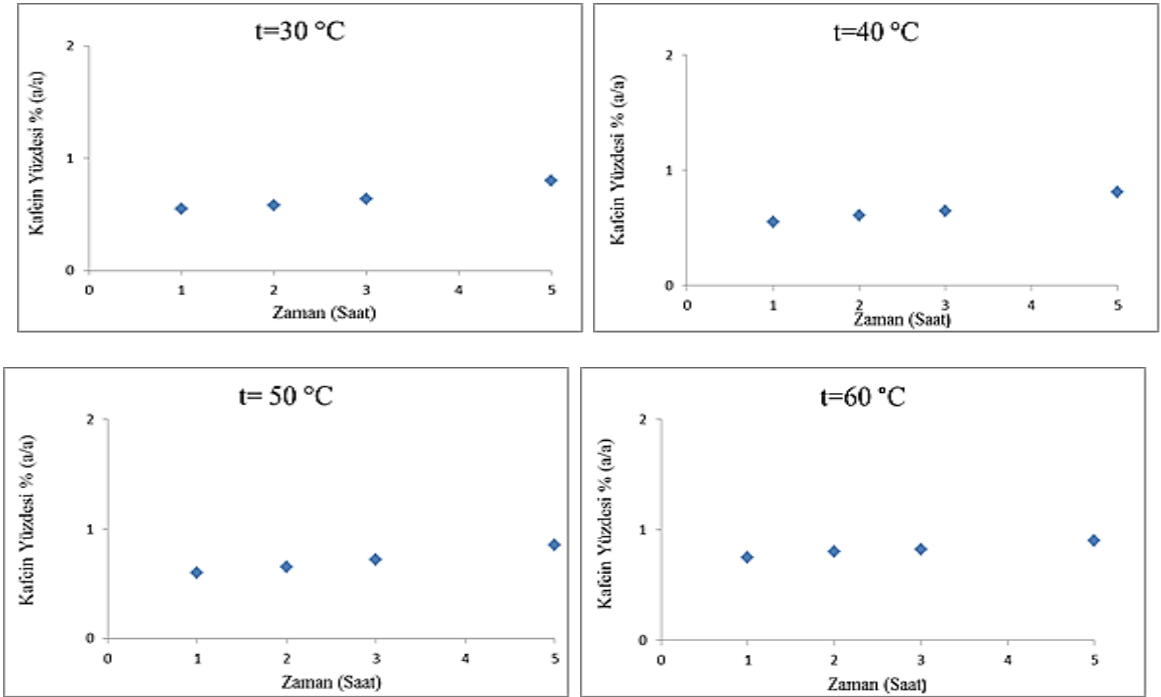
Çalışmanın bu kısmında önce basınç sabit tutulup ekstraksiyon sıcaklıkları değiştirildi. Farklı sıcaklıklarda 1, 2, 3, 5 saatlik ekstraksiyon sürelerinde elde edilen kafein verimleri (% a/a) hesaplandı. SFE süresince CO₂’in akış hızı 10 g/dk olarak sabit tutuldu ve 10 g ‘lık kuru örnekler ile çalışıldı. Elde edilen veriler herbir basınç için ayrı ayrı Şekil 3.32-3.35’te verilmiştir.

a) P=100 Bar



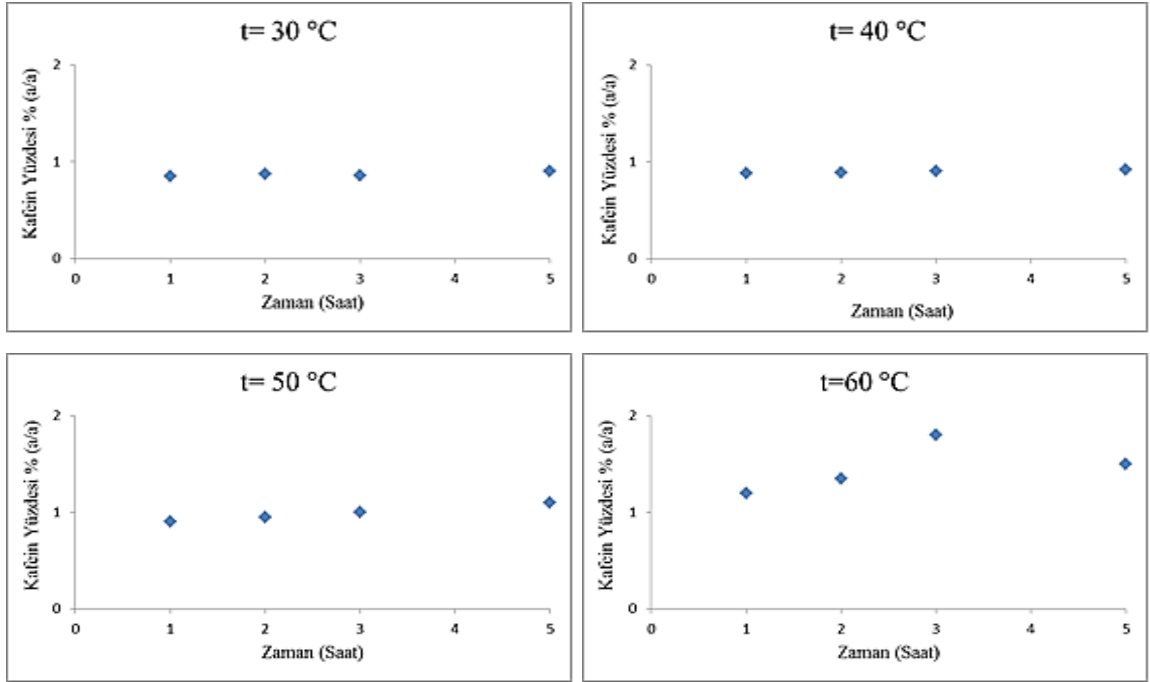
Şekil 3.32. 100 Bar basınçta, farklı sıcaklıklarda ve sürelerde elde edilen kafein yüzdeleri

b) P=200 Bar



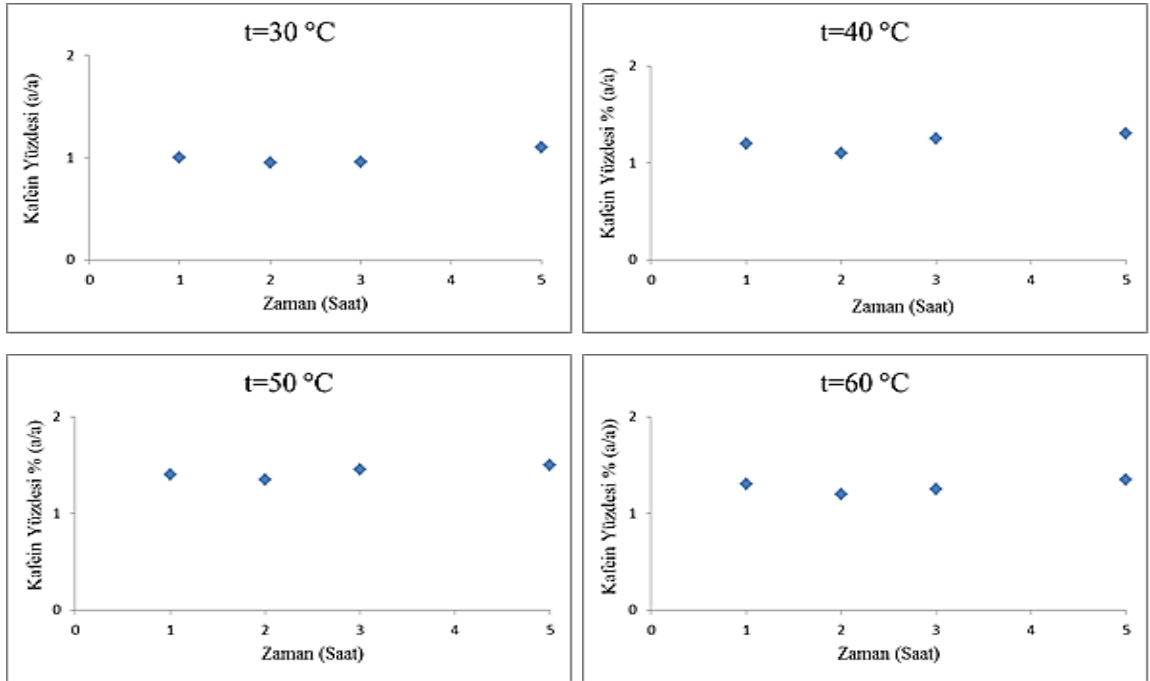
Şekil 3.33. 200 Bar basınçta, farklı sıcaklıklarda ve sürelerde elde edilen kafein yüzdeleri

c) P=250 Bar



Şekil 3.34. 250 Bar basınçta, farklı sıcaklıklarda ve sürelerde elde edilen kafein yüzdeleri

d) P=300Bar



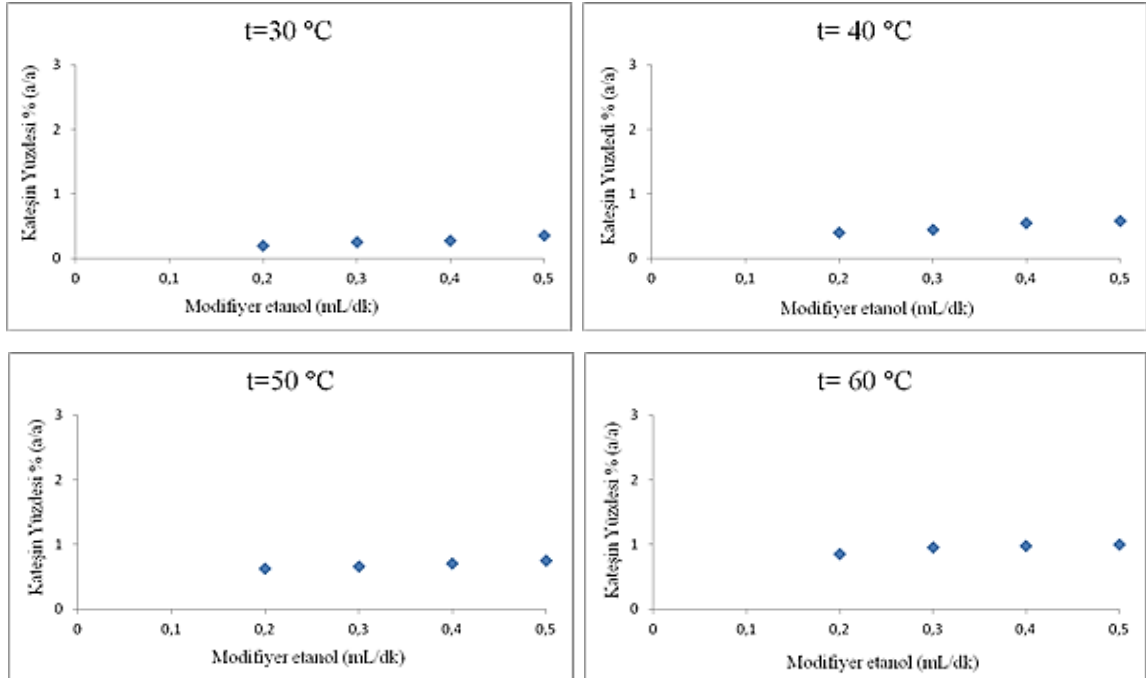
Şekil 3.35. 300 Bar basınçta, farklı sıcaklıklarda ve sürelerde elde edilen kafein yüzdeleri

Basıncın 100 Bar'dan 250 Bar'a çıkarılması ekstrakt veriminde artışa neden olmuştur. 300 Bar'da ise 250 Bar ile elde edilen verimlerden daha düşük verimler elde edildi. Grafik sonuçları değerlendirildiğinde 250 Bar, 60 °C ve 3 saat SFE çalışma şartlarında %1,80 kafein verimi en yüksek değer olarak elde edildi. Bu nedenle kafein ekstraksiyonu için bu şartlar optimum değerler olarak kabul edildi.

3.6.2. Modifiyerli Yöntem Bulguları

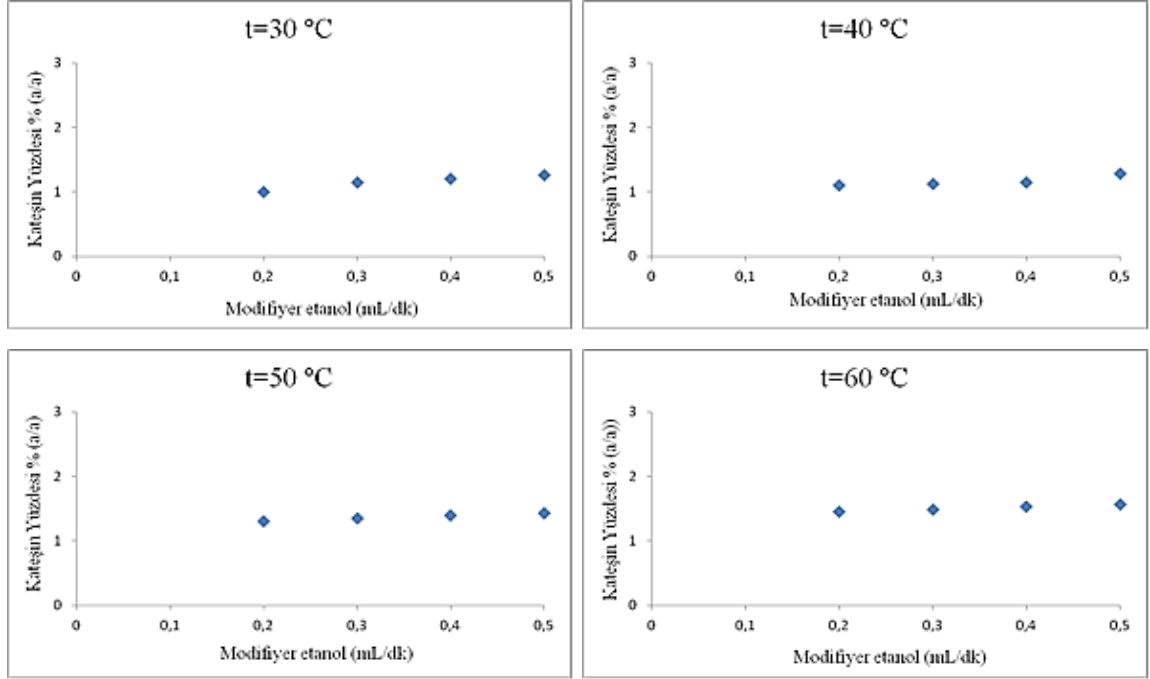
Modifiyerli sistemde değişken sayısı dört olduğundan (basınç, sıcaklık, süre, modifiyer, hacmi) her uygulamada süreyi sabit tutarak (3 saat) değişen basınç, sıcaklık ve akış hızının kateşin verimlerine etkisi belirlendi. Buradan modifiyersiz sistem ile kafeini uzaklaştırılan örneklerle devam edildi. CO₂ akış hızı 10 g/dk, modifiyer etanolün akış hızı ise 0,2-0,5 mL/dk aralığında tutuldu. Elde edilen kateşin verimleri Şekil 3.36-3.39'da verilmiştir.

a) P=100 Bar



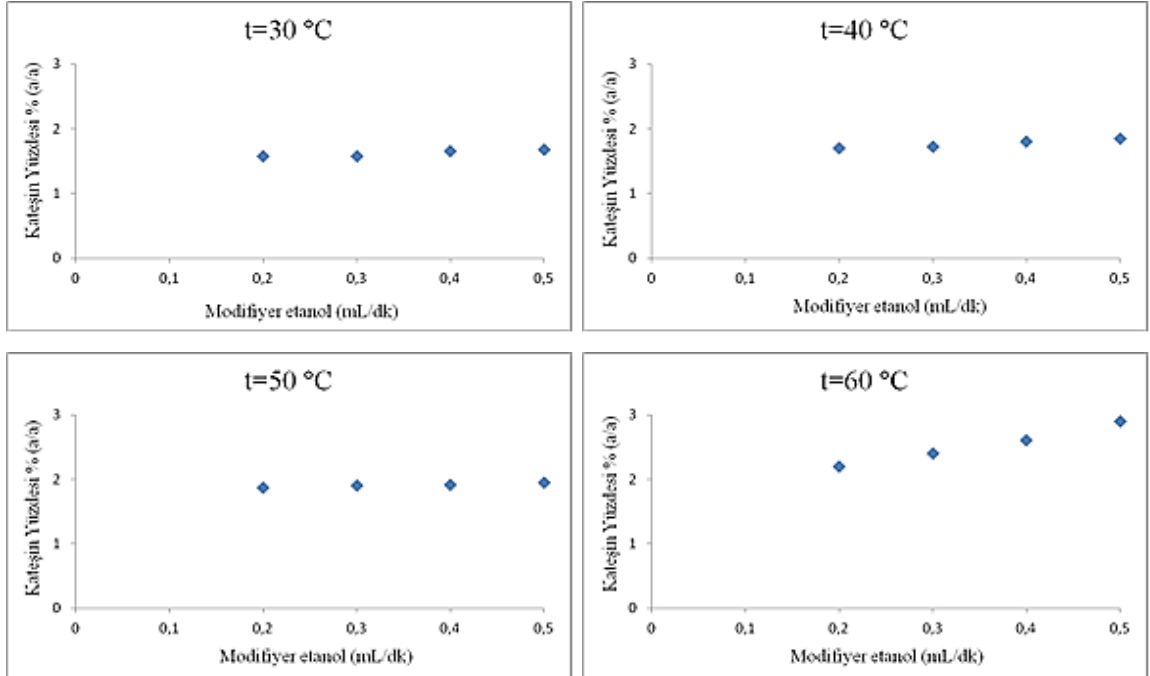
Şekil 3.36. 100 Bar basınçta farklı sıcaklık ve modifiyer oranlarında kateşin yüzdeleri

b) P=200 Bar



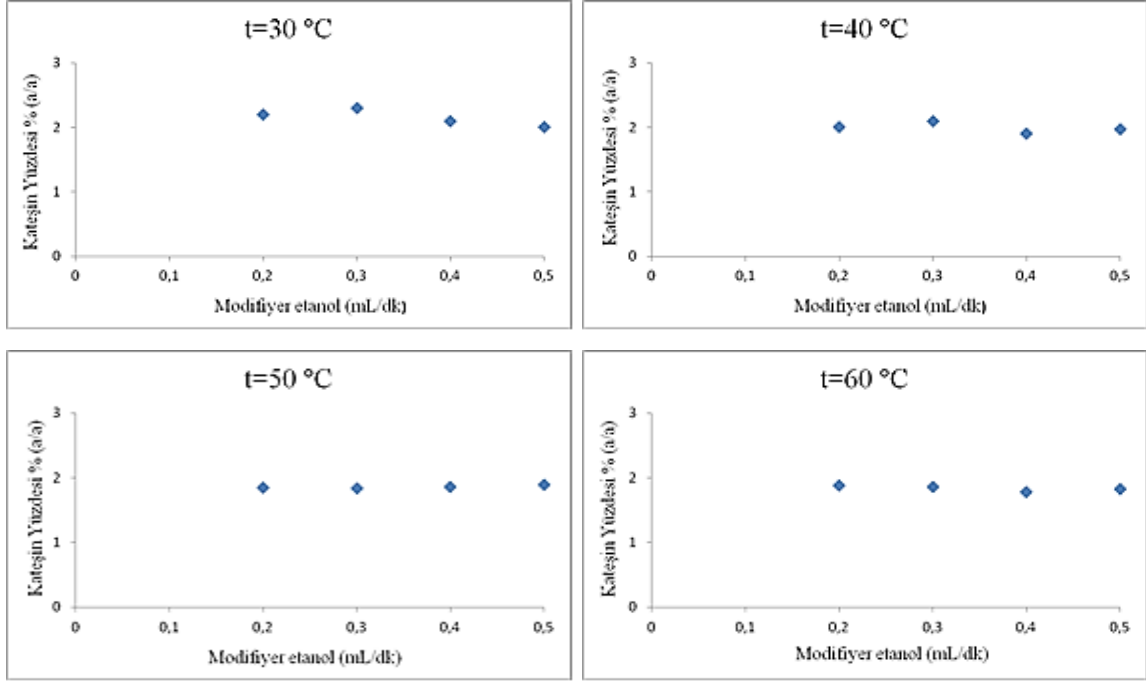
Şekil 3.37. 200 Bar basınçta farklı sıcaklık ve modifiyer oranlarında kateşin yüzdeleri

c) P=250 Bar



Şekil 3.38. 250 Bar basınçta farklı sıcaklık ve modifiyer oranlarında kateşin yüzdeleri

d)P= 300 Bar



Şekil 3.39. 300 Bar basınçta farklı sıcaklık ve modifiyer oranlarında kateşin yüzdeleri

Modifiyerli sistemde de basıncın ve sıcaklığın artırılması ekstrakt verimini artırdı. Modifiyer hacminin artırılması düşük basınç ve sıcaklıklarda önemli bir katkı yapmazken (Şekil 3.36 ve 3.37) 250 bar basınç ve 60 °C sıcaklıkta 0,5 mL/dk etanol ile maksimum kateşin verimi elde edildi. Kateşin ekstraksiyonu için optimum şartlar oluşturulmuş oldu.

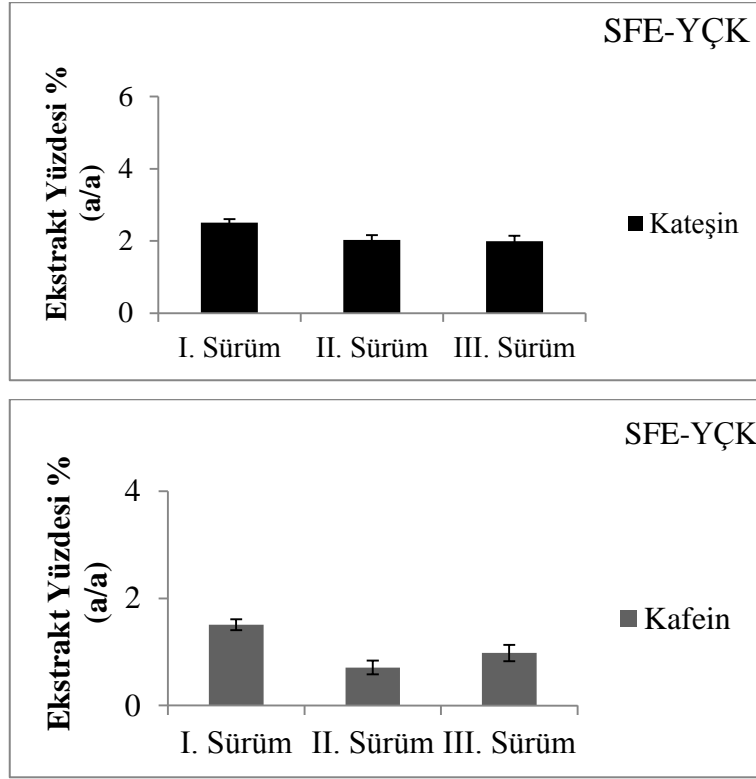
Elde edilen kafein ve kateşin verimleri aynı örneğin sıcak su ekstraksiyonuyla elde edilen verileri ile karşılaştırıldı. Ayrıca ekstraksiyon sonrası kalıntı çay örneklerinin sıcak su ekstraksiyonu yapılarak kalıntı kafein ve kateşin olup olmadığı da test edildi.

3.7. 2013 Yılı Çay Örneklerinin SFE Analizleri

Bölüm 3.6'da detayları verilen optimizasyon çalışmaları doğrultusunda geliştirilen yöntem kurutulmuş yaş çay, çay atığı ve kafein tozu örneklerine uygulandı. SFE cihazının alımı ve yöntemin optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra 2013 örneklerine uygulandı.

3.7.1. Yaş Çay Örneklerinin (YÇK) Kateşin ve Kafein Verimleri

Kurutulmuş yaş çay örneklerinin (YÇK) SFE ile ayrılan kateşin ve kafein ekstrakt verimleri Şekil 3.40'da görülmektedir.



Şekil 3.40. 2013 Yılı yaş çay örneklerinin SFE ile elde edilen kateşin ve kafein verimleri

2013 Yılı yaş çay örneklerinin SFE ile elde edilen kateşin verimleri değerlendirildiğinde en yüksek verimin %2,50 ile I. sürümden elde edildiği, II. ve III. sürümlerin kateşin ekstrakt verimlerinin birbirine çok yakın ve %2 olduğu belirlendi.

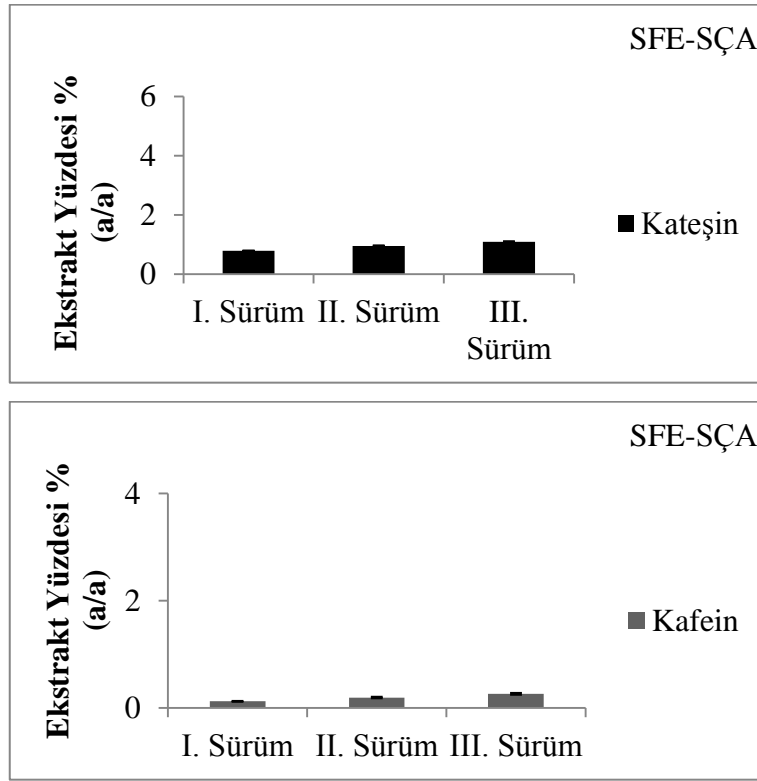
Aynı örneğin sıcak su ekstraksiyonu verimleri Şekil 3.19'da verilmiştir. SFE ve sıcak su ekstraksiyon verimleri uyum içindedir. Sadece I. sürümde SFE ile biraz daha düşük veriler elde edilmiştir.

SFE ile elde edilen kafein ekstrakt miktarları karşılaştırıldığında en yüksek verimin %1,50 ile I. sürümden, daha sonra sırasıyla III. sürüm ve II. sürümden yaklaşık %1'lerde verim elde edildiği bulundu. Kafein verimleri Şekil 3.20'de YÇK için verilen değerler ile

uyumludur. Bu da SFE ekstraksiyonunun başarılı olduğunun göstergesidir. Herhangi bir çözücü kullanılmaksızın SFE ile kafein ve kateşin ekstraktları elde edilebilmektedir.

3.7.2. Siyah Çay Atığının (SÇA) Kateşin ve Kafein Verimleri

Çay atığından 250 bar basınç 60 °C sıcaklık ve 3 saatlik modifiyersiz CO₂ SFE ile elde edilen kafein verimleri ve aynı şartlarda 0,5 mL/dk etanol modifiyeri ile elde edilen kateşin verimleri Şekil 3.41’de verilmiştir.

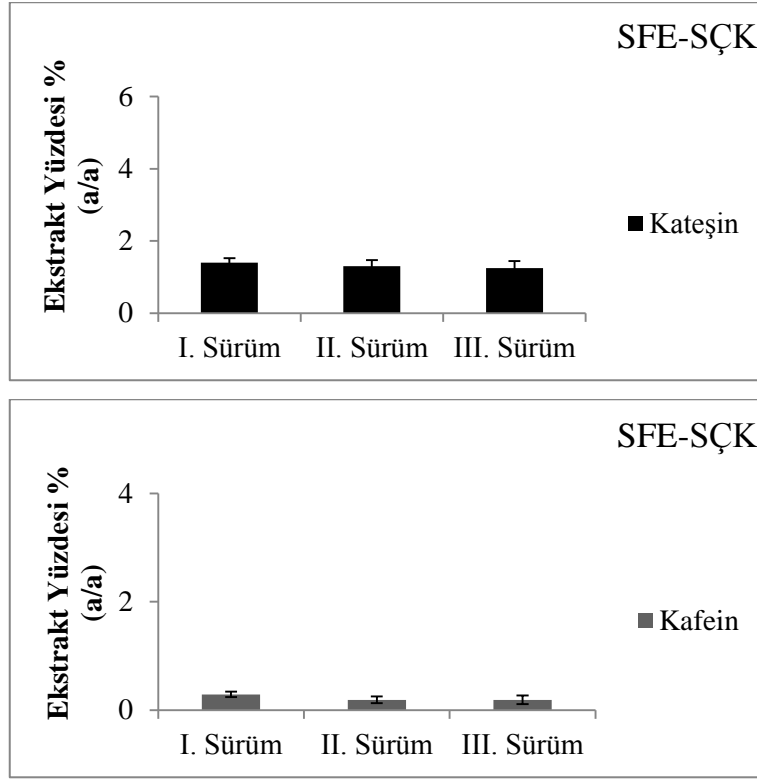


Şekil 3.41. 2013 Yılı siyah çay atığının SFE ile elde edilen kateşin ve kafein verimleri

Bütün sürümlerde kateşin ekstrakt verimleri %2'nin altındadır. Literatürle ve sıcak su ekstraksiyonu ile karşılaştırıldığında literatürden daha düşük fakat çözücü ekstraksiyonu ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Kafein açısından incelendiğinde ise verimler son derece düşüktür.

3.7.3. Kafein Tozunun (SÇK) Kateşin ve Kafein Verimleri

2013 Yılı kafein tozu örneklerinin SFE ile elde edilen kateşin ve kafein verimleri Şekil 3.42’de verilmiştir.



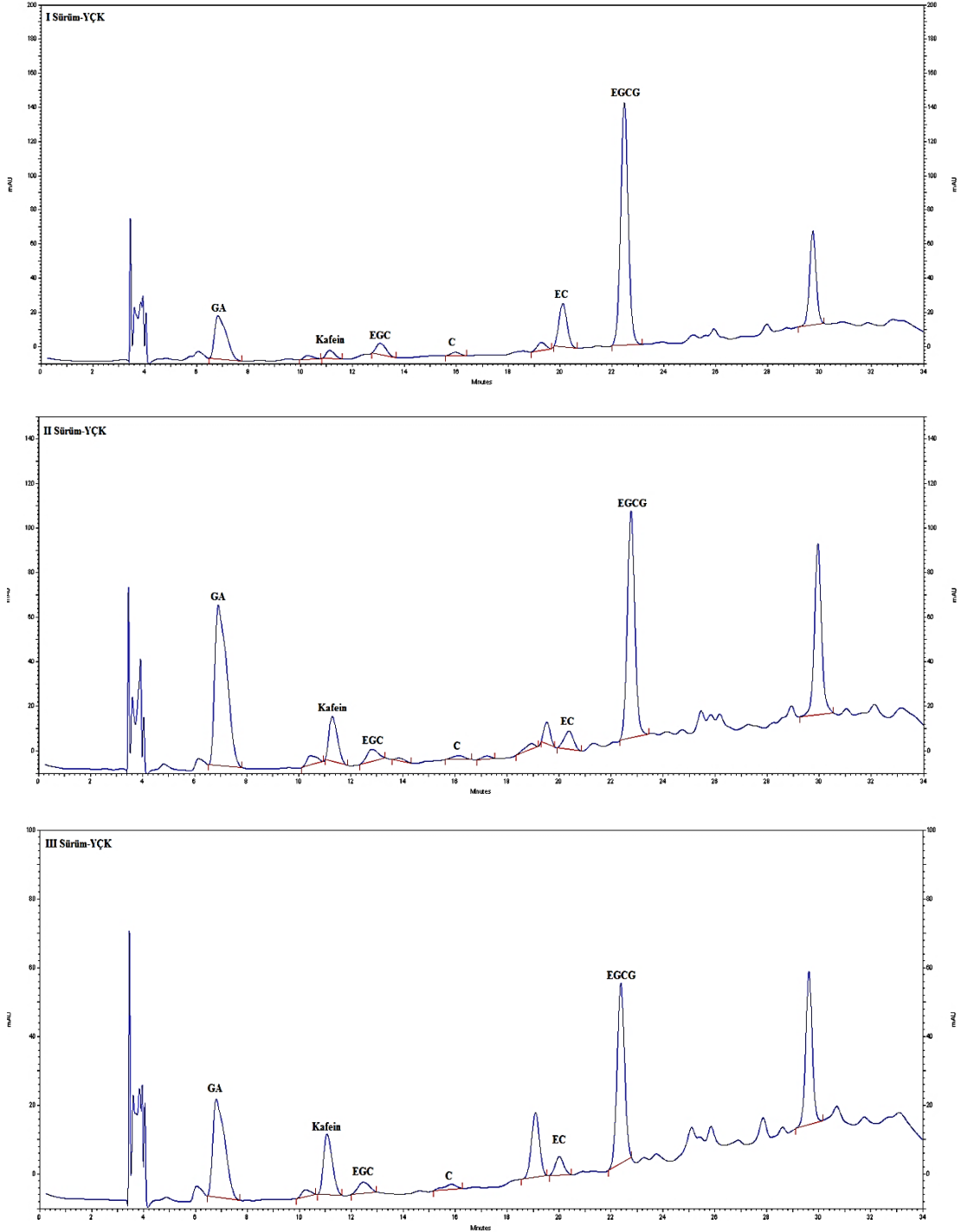
Şekil 3.42. 2013 Yılı kafein tozunun SFE ile elde edilen kateşin ve kafein verimleri

Kateşin verimleri %2'nin altındadır fakat sıcak su ekstraksiyonuyla karşılaştırıldığında SFE ekstraksiyonuyla uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Kafein açısından değerlendirildiğinde sıcak su ekstraksiyonu ve literatüre göre oldukça düşük verimler elde edilmiştir.

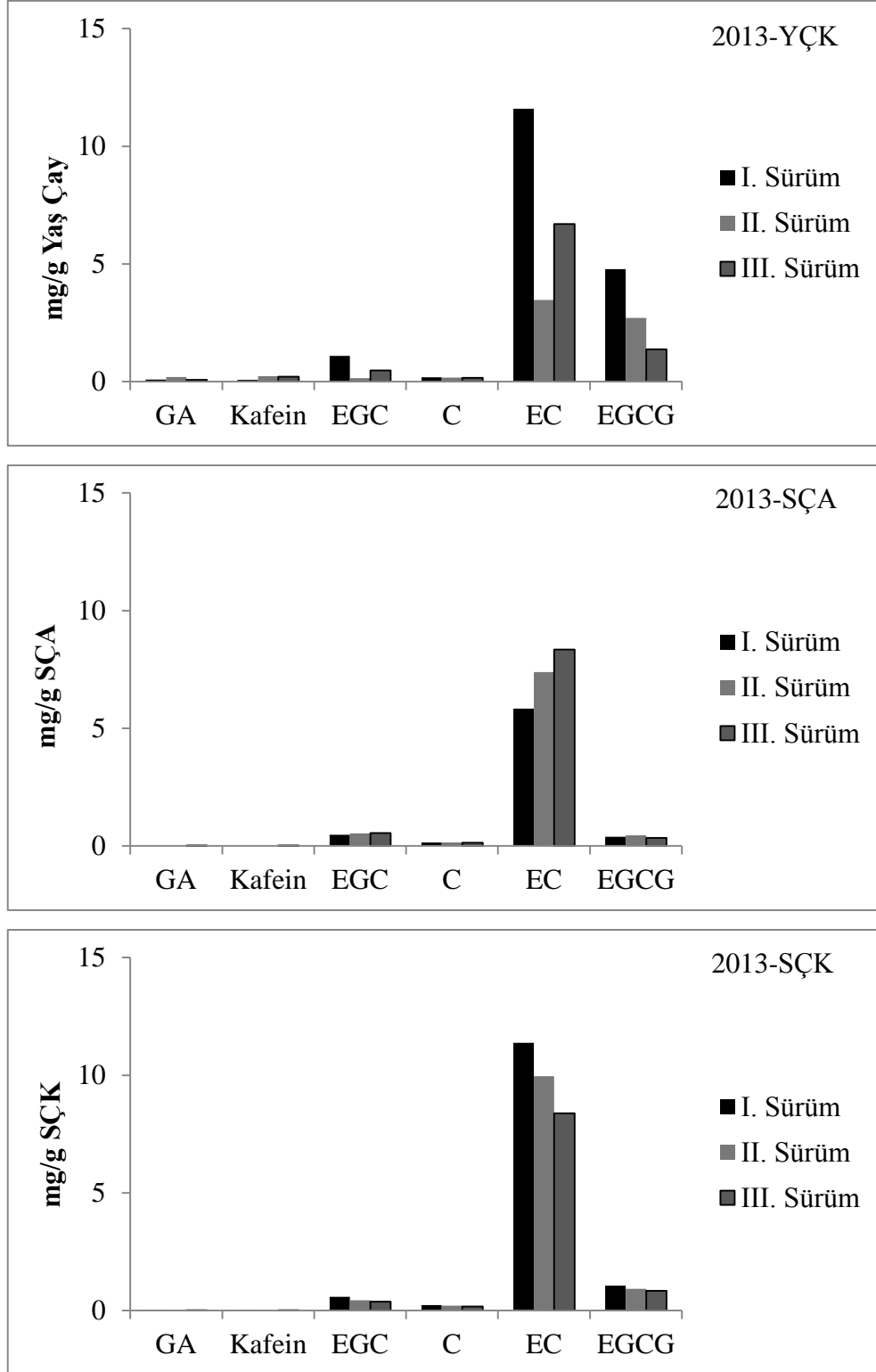
3.7.4. Çay Örneklerinin HPLC Analizleri ve Kateşin İçerikleri

SFE ile elde edilen ekstraktların HPLC analizleri yapılarak daha önceki bölümlerde olduğu gibi kateşinlerin miktarları belirlendi. YÇK için kromatogramlar Şekil 3.43'te, tüm örneklerin kateşin miktarları ise Şekil 3.44'de verilmiştir. Siyah çay atığı ve kafein tozu

örnekleri için elde edilen HPLC kromatogramları verilmeden sadece elde edilen kateşin ve kafein miktarları belirtilmiştir.



Şekil 3.43. 2013 Yılı I., II. ve III. sürüm kurutulmuş yaş çay örneklerinin SFE ile elde edilen ekstraktlarının HPLC-B metodu ile elde edilen kromatogramları



Şekil 3.44. 2013 Yılı I., II. ve III. sürüm çay örneklerinin SFE ekstraktlarının kateşin içerikleri

Yaş çay örneklerinde ağırlıklı olarak EC ve EGCG ekstrakte edilmiştir. YÇK örneklerinde I. sürümde 12 mg, III. sürümde 7 mg ve II. sürümde 3,50 mg EC mevcuttur. EC'den sonra yoğunluklu olarak belirlenen tür EGCG'tır. Düşük miktarlarda EGC ve C de belirlenmiştir.

2013 Yılı siyah çay atığı örneklerine yapılan SFE sonrası HPLC analizinde en yüksek içerik tüm sürümlerde EC olarak belirlendi. Bu değer III. Sürümde yaklaşık 10 mg ile en yüksek kateşin miktarıdır. Düşük miktarlarda EGC ve EGCG de belirlenmiştir.

Çalışılan kafein tozu örnekleri için SFE sonrası HPLC analizinde sırasıyla I. sürümde 11 mg, II. sürümde 10 mg ve III. sürümde 8 mg EC belirlenmiştir. Belirlenebilen diğer türler yaklaşık 1 mg ile EGC, EGCG, C'dir.

3.7.5. 2013 Yılı SFE Genel Değerlendirme

SFE ile ayrılan kateşin ekstraktlarının içerdiği toplam kateşin yüzdelerinin ve örnekten ekstre edilebilen kateşin yüzdelerini gösteren veriler Tablo 3.11-3.13'de verilmiştir.

Tablo 3.11. 2013 Yılı kurutulmuş yaş çay örneklerinin SFE ile elde edilen kateşin yüzdeleri

2013 SFE Yaş Çay			
İçerik (%)	I.Sürüm	II.Sürüm	III.Sürüm
GA	-	0,02	-
Kafein	-	0,02	0,02
EGC	0,10	0,01	0,05
C	0,01	0,01	0,01
EC	1,16	0,35	0,67
EGCG	0,48	0,27	0,14
Toplam Kateşin İçeriği	1,78	0,70	0,90
Kateşin Ekstraktı*	2,50	2,03	1,99
Ekstrakt İçindeki Toplam Kateşin**	71,20	34,48	45,22
Çaydan Ekstre Edilebilen Toplam Kateşin	1,78	0,70	0,90

*10g çay örneğinden elde edilen ekstrakt yüzdesi

**Kateşin ekstraktı içindeki içeriklerin toplam yüzdesi

Tablo 3.11'e göre I. sürümden %2,50 kateşin ekstraktı elde edilmiş ve bunu %71,28'sini kateşinler oluşturmaktadır. Bu oran diğer sürümlerde daha düşüktür.

Tablo 3.12. 2013 Yılı siyah çay atığının SFE ile elde edilen kateşin yüzdeleri

2013 SFE Siyah Çay Atığı			
İçerik (%)	I.Sürüm	II.Sürüm	III.Sürüm
GA	-	-	-
Kafein	-	-	-
EGC	0,04	0,05	0,05
C	0,01	0,01	0,01
EC	0,58	0,73	0,84
EGCG	0,03	0,04	0,03
Toplam Kateşin İçeriği	0,70	0,95	1,10
Kateşin Ekstraktı*	0,70	0,95	1,10
Ekstrakt İçindeki Toplam Kateşin**	100	100	100
Çay Atığından Ekstre Edilebilen Toplam Kateşin	0,70	0,95	1,10

*10g çay örneğinden elde edilen ekstrakt yüzdesi

**Kateşin ekstraktı içindeki içeriklerin toplam yüzdesi

Yine Tablo 3.12 verilerine göre %0,70 verimle çok düşük ekstrakt verimi elde edilmesine rağmen bu ekstrakt çoğunluğu EC'den oluşan oldukça saf bir ekstraktır.

Kafein tozu örneklerinin SFE ekstraksiyonunda I. sürümde %1,40 verimle elde edilen kateşin ekstraktının %94,28'i EC yönünden zengindir.

Tablo 3.13. 2013 Yılı kafein tozunun SFE ile elde edilen kateşin yüzdeleri

2013 SFE Kafein Tozu			
İçerik (%)	I.Sürüm	II.Sürüm	III.Sürüm
GA	-	-	-
Kafein	-	-	-
EGC	0,05	0,04	0,04
C	0,02	0,02	0,01
EC	1,13	0,99	0,84
EGCG	0,10	0,09	0,08
Toplam Kateşin İçeriği	1,32	1,15	0,98
Kateşin Ekstraktı*	1,40	1,30	1,25
Ekstrakt İçindeki Toplam Kateşin**	94,28	88,46	78,40
Çaydan Atığından Ekstre Edilebilen Toplam Kateşin	1,31	1,14	0,98

*10g çay örneğinden elde edilen ekstrakt yüzdesi

**Kateşin ekstraktı içindeki içeriklerin toplam yüzdesi

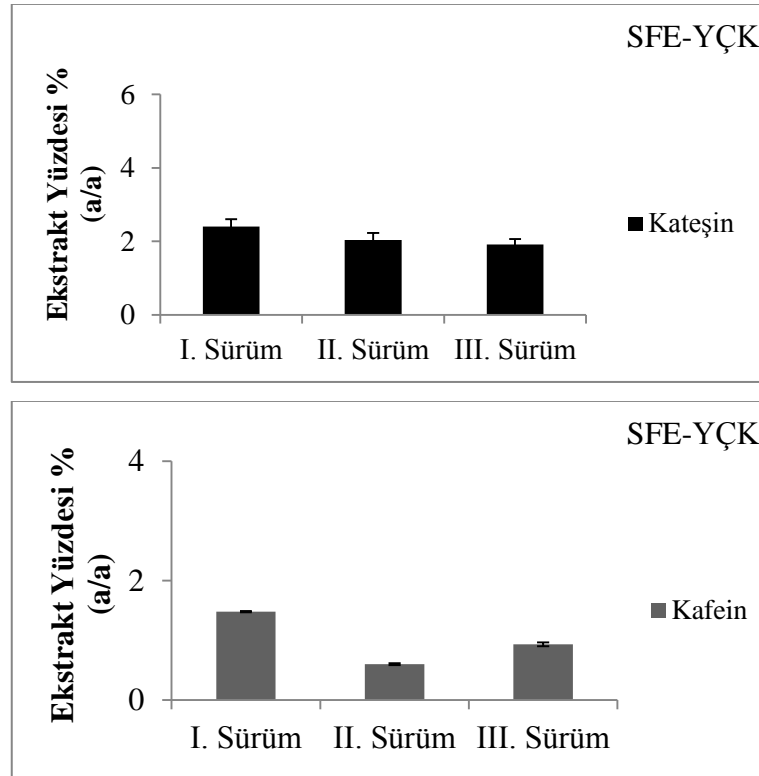
Atıklardan ayrılan kafein ekstraktlarının analizinde saf kafein içerdiği belirlenmiştir. Ancak sıcak su ekstraksiyonunda %6-7'e varan kafein izolasyonu bu yöntemde elde edilememiştir. SFE kateşinlerin izolasyonunda oldukça başarılı iken kafein izolasyonunda zayıf kalmıştır.

3.8. 2014 Yılı Çay Örneklerinin SFE Analizleri

Optimize edilen SFE yöntemi 2014 yılı örneklerine de uygulandı.

3.8.1. Yaş Çay Örneklerinin (YÇK) Kateşin ve Kafein Verimleri

Kurutulmuş yaş çay örneklerinin (YÇK) SFE ile ayrılan kateşin ve kafein ekstrakt verimleri Şekil 3.45'te görülmektedir.



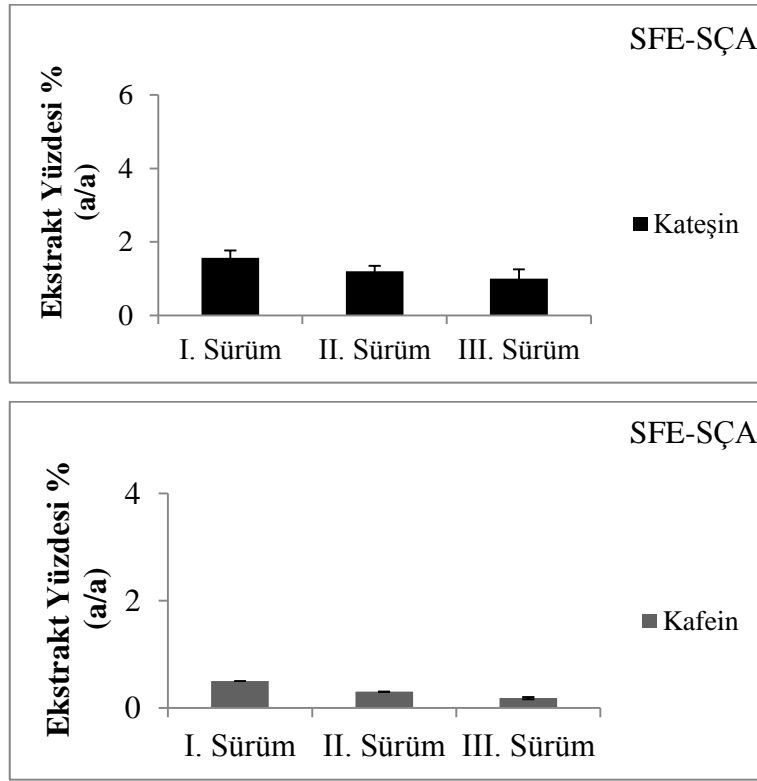
Şekil 3.45. 2014 Yılı yaş çay örneklerinin SFE ile elde edilen kateşin ve kafein verimleri

2014 Yılı yaş çay örneklerinin SFE ile analizi sonucu elde edilen kateşin miktarları I. sürümde %2'nin üstündedir. II. ve III. Sürüm ekstrakt verimleri birbirine yakın sonuçlar

vermiştir. Kafein ekstraktları açısından değerlendirildiğinde en yüksek verim I. sürümden alınmıştır. Sırasıyla III. ve II. sürümlerde de yaklaşık %1 kateşin elde edilmiştir. Bu veriler 2013 verileriyle tam uyum içindedir.

3.8.2. Siyah Çay Atığının (SÇA) Kateşin ve Kafein verimleri

2014 Yılı siyah çay atığı örneklerinin SFE ile elde edilen kateşin ve kafein verimleri Şekil 3.46'da verilmiştir.

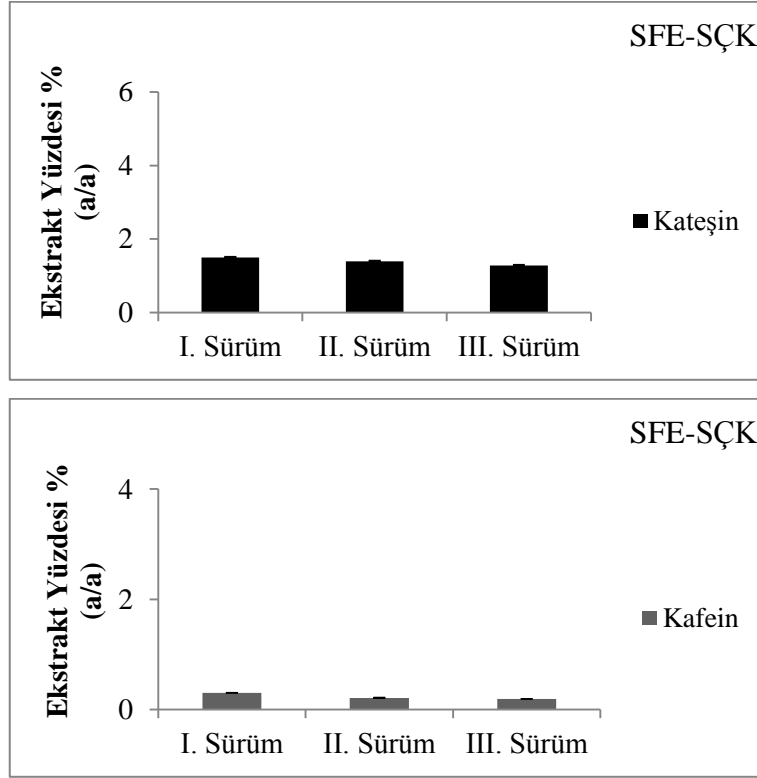


Şekil 3.46. 2014 Yılı siyah çay atığının SFE ile elde edilen kateşin ve kafein verimleri

Kateşin verimleri göz önüne alındığında bütün sürümlerde %2'nin altında iken, kafein verimleri ise %1'in altında bulunmuştur.

3.8.3. Kafein Tozunun (SÇK) Kateşin ve Kafein Verimleri

2014 Yılı kafein tozu örneklerinin SFE ile elde edilen kateşin ve kafein verimleri Şekil 3.47’de verilmiştir.

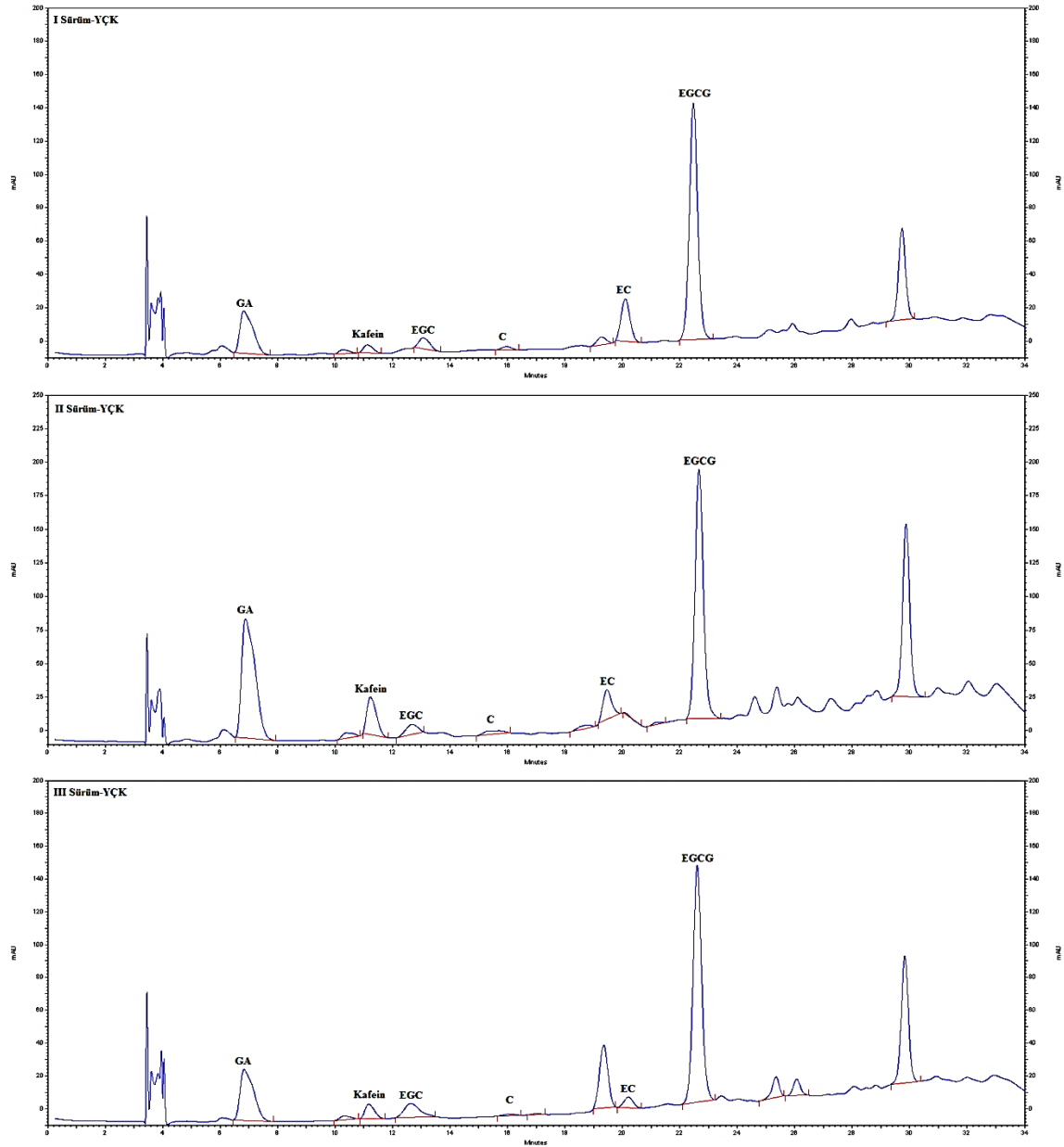


Şekil 3.47. 2014 Yılı kafein tozunun SFE ile elde edilen kateşin ve kafein verimleri

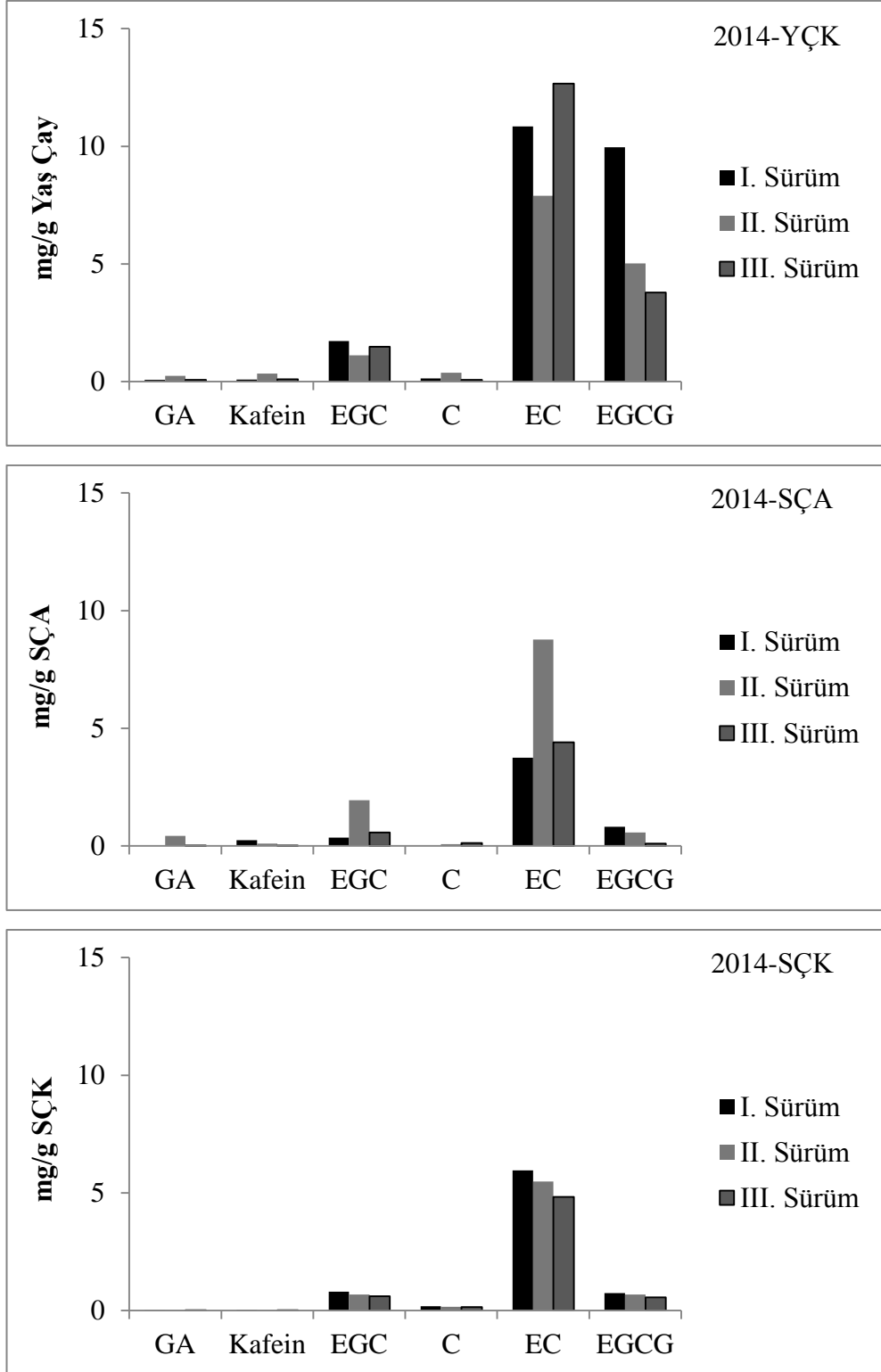
2014 Yılı kafein tozu örneklerinin SFE ile analizi sonucunda elde edilen kateşin ekstraktı miktarlarına bakıldığında bütün sürümlerden %2’ye ve birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir. Kafein tozundan SFE ile kateşin ekstraktı elde edebilmek hiç değerlendirilmeyen ürün olan kafein tozları için önemli bir sonuçtur. Kafein verimlerine bakıldığında sıcak su ekstraksiyonuyla karşılaştırıldığında oldukça düşük sonuçlar elde edilse de sürümler arasındaki sonuçlar birbirine yakındır.

3.8.4. Çay Örneklerinin HPLC Analizleri ve Kateşin İçerikleri

SFE ile elde edilen ekstraktların HPLC analizleri yapılarak daha önceki bölümlerde olduğu gibi kateşinlerin miktarları belirlendi. YÇK için kromatogramlar Şekil 3.48’de tüm örneklerin kateşin miktarları ise Şekil 3.49’da verilmiştir. Siyah çay atığı ve kafein tozu örneklerinin HPLC kromatogramları verilmeden sadece kafein ve kateşin verimleri belirtilmiştir.



Şekil 3.48. 2014 Yılı I, II. ve III. sürüm yaş çay örneklerinin SFE ile elde edilen ekstraktlarının HPLC-B metodu ile elde edilen kromatogramları



Şekil 3.49. 2014 Yılı I., II. ve III. sürüm çay örneklerinin SFE ile elde edilen ekstraktlarının HPLC içerikleri

Yaş çay örneklerinde ağırlıklı olarak EC ve EGCG ekstre edilmiştir. YÇK örneklerinde III. sürümde 12 mg, I. sürümde 10 mg ve II. sürümde 8 mg EC mevcuttur.

EC'den sonra yoğunluklu olarak EGCG türü bulunmaktadır. Düşük miktarlarda EGC ve C de belirlenmiştir.

2014 Yılı çay atığı örneklerine yapılan SFE sonrası HPLC analizinde en yüksek içerik tüm sürümlerde EC olarak belirlendi. II. sürümde 8 mg, III. sürümde 5 mg, I. sürümde 4 mg EC türevi belirlendi.

Kafein tozu örneklerinin SFE sonrası HPLC analizinde çalışılan diğer örneklerde olduğu gibi EC türü en yüksek miktarda belirlenen kateşin türü olmuştur.

3.8.5. 2014 Yılı SFE Genel Değerlendirme

SFE ile ayrılan kateşin ekstraktlarının içerdiği toplam kateşin yüzdelerini ve örnekten ekstre edilebilen kateşin yüzdelerini gösterir veriler Tablo 3.14-3.16'da verilmiştir.

Tablo 3.14. 2014 Yılı kurutulmuş yaş çay örneklerinin SFE ile elde edilen kateşin yüzdeleri

2014 SFE Yaş Çay			
İçerik(%)	I.Sürüm	II.Sürüm	III.Sürüm
GA	-	0,02	-
Kafein	-	0,03	0,01
EGC	0,17	0,11	0,14
C	0,01	0,03	-
EC	1,08	0,79	1,26
EGCG	0,99	0,50	0,37
Toplam Kateşin İçeriği	2,28	1,50	1,82
Kateşin Ekstraktı*	2,40	2,03	1,91
Ekstrakt İçindeki Toplam Kateşin**	95,00	73,90	95,30
Çaydan Ekstre Edilebilen Toplam Kateşin	2,28	1,50	1,82

*10g çay örneğinden elde edilen ekstrakt yüzdesi

**Kateşin ekstraktı içindeki içeriklerin toplam yüzdesi

Tablo 3.14'e göre %2,40 kateşin ekstraktı elde edilmiş ve bunun %95,00'ini kateşinler oluşturmaktadır.

Tablo 3.15. 2014 Yılı siyah çay atığının SFE ile elde edilen kateşin yüzdeleri

2014 SFE Siyah Çay Atığı			
İçerik (%)	I.Sürüm	II.Sürüm	III.Sürüm
GA	-	0,04	-
Kafein	0,02	0,01	
EGC	0,03	0,20	0,06
C	-	-	0,01
EC	0,38	0,88	0,44
EGCG	0,08	0,05	0,01
Toplam Kateşin İçeriği	0,53	1,20	0,53
Kateşin Ekstraktı*	1,57	1,20	1,00
Ekstrakt İçindeki Toplam Kateşin**	33,75	100	53,00
Çay Atığından Ekstre Edilebilen Toplam Kateşin	0,52	1,20	5,3

*10g çay örneğinden elde edilen ekstrakt yüzdesi

**Kateşin ekstraktı içindeki içeriklerin toplam yüzdesi

Tablo 3.15 verilerine göre %0,52 verimle çok düşük ekstrakt verimi elde edilmesine rağmen ekstrakt yoğunluğu EC'den oluşan oldukça saf bir ekstraktır.

Tablo 3.16. 2014 Yılı kafein tozunun SFE ile elde edilen kateşin yüzdeleri

2014 SFE Kafein Tozu			
İçerik(%)	I.Sürüm	II.Sürüm	III.Sürüm
GA	-	-	-
Kafein	-	-	-
EGC	0,08	0,06	0,06
C	0,01	0,01	0,01
EC	0,60	0,55	0,48
EGCG	0,07	0,06	0,05
Toplam Kateşin İçeriği	0,77	0,70	0,62
Kateşin Ekstraktı*	1,50	1,39	1,28
Ekstrakt İçindeki Toplam Kateşin**	51,33	50,35	48,43
Çay Atığından Ekstre Edilebilen Toplam Kateşin	0,77	0,70	0,61

*10g çay örneğinden elde edilen ekstrakt yüzdesi

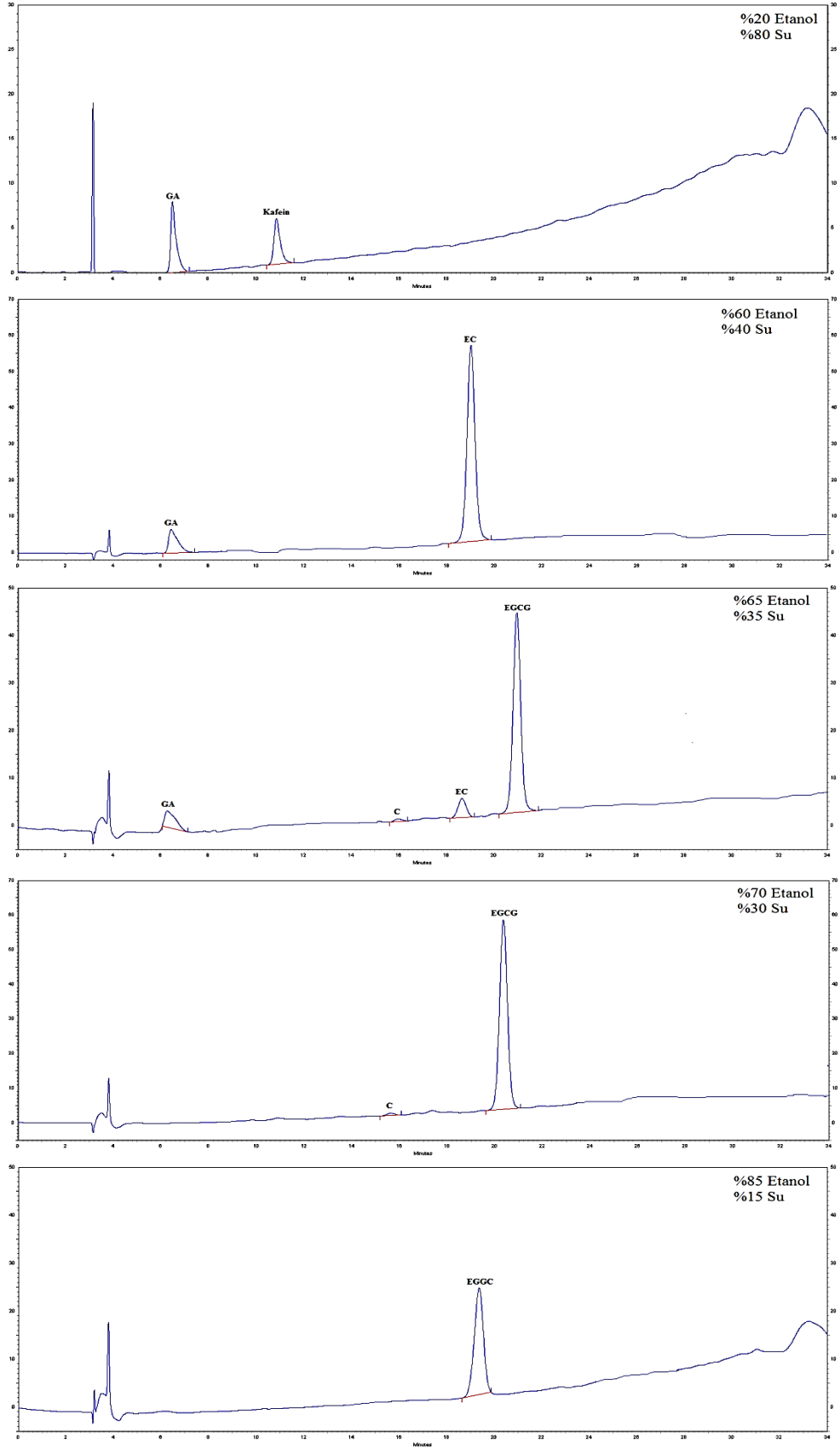
**Kateşin ekstraktı içindeki içeriklerin toplam yüzdesi

2014 Kafein tozu örneklerinin SFE analizi sonrası HPLC içerikleri incelendiğinde toplam kateşin yüzdesi bütün sürümlerde birbirine yakın değerlerde olup Tablo 3.16'da görüldüğü gibidir. Kafein tozu örneklerinin SFE ekstraksiyonunda I. sürümde %1,50 verimle elde edilen kateşin ekstraktı %51,33'ü EC yönünden zengin kateşin ekstraktını oluşturur.

3.9. Kateşinlerin İzolasyon Bulguları

Tüm ekstraksiyon ve izolasyon yöntemleri tamamlandıktan sonra ekstraktlardan kateşinlerin özellikle de EGCG'nin saflaştırılması için bir seri çalışma yapıldı. Ayrıntıları Bölüm 2.3.7'de verilen kolon yöntemi kullanılarak izolasyon işlemi gerçekleştirildi. İzolasyon için yaş çaydan elde edilen ekstraktlar kullanıldı. Kolon dolgu materyali olarak silikajel, selüloz ve poliamid ile ön testler yapıldı. En başarılı izolasyon materyali poliamid olarak belirlendi. Daha sonra giderek artan etanol derişimine sahip su-etanol hareketli fazı ile izolasyon yapıldı. Cam kolona (2.5 cmx 50 cm) 15 g poliamid doldurularak önce şartlandırma yapıldı. Kolondan saf su geçirilerek hava kabarcığı kalmadan poliamid ayırma işlemine hazırlandı.

Yaş çay kateşin ekstraktı (1 g) poliamid kolona yerleştirildikten sonra öncelikli olarak %100 saf su geçirilerek saflaştırma işlemine başlandı. Daha sonra hareketli faz %10 etanol-%90 su şeklinde değiştirildi. Her 50 mL'lik hacim sonrası etanol oranı %100'e çıkana kadar devam edildi. Her izolasyon aşamasında ayrılan türlerin saptanması için TLC ve HPLC analizleri yapıldı. Seyrelme nedeniyle TLC'de çok net gözlem yapılamadığından HPLC ile izolasyon aşamaları izlendi. Titiz bir izlemeyle yaklaşık 300 eluent elde edildi. Artan etanol hacimlerine karşı elde edilen bazı elementlerin HPLC kromatogramları Şekil 3.50' de verilmiştir.



Şekil 3.50. Artan etanol yüzdelerinde ayrılan EGCG izolasyonu HPLC kromatogramları

İzolasyon aşamaları ve elde edilen kateşinlerin saflıklarını gösteren veriler Tablo 3.17’de verilmiştir.

Tablo 3.17. Kolon izolasyon işlemi verileri

Etanol (%)	Su (%)	Saflaştırılan tür	Saflık Derecesi (%)
20	80	GA, Kafein	56 GA; 44 Kafein
60	40	GA, EC	12 GA; 88 EC
65	35	GA, C, EC, EGCG	22 GA; 2 C; 34 EC; 42 EGCG
70	30	C, EGCG	1,2 C; 98,8 EGCG
75	25	EGCG	100
80	20	EGCG	100
85	15	EGCG	100

İzolasyonda önce kafein ve gallik asit ayrılırken %60 Etanol-%40 Su karışımı ile EC ayrılmaya başladı. Etil alkol oranı %65’e ulaştıncaya kadar diğer kateşinler de kolondan ayrılmaya başladı. Etanol oranı %75’e ulaştığında EGCG ayrılmaya başladı ve saf olarak izole edildi. Yüksek saflıkta EGCG piyasada çok yüksek rakamlarla alıcı bulmaktadır. Bu anlamda önemli bir ticari ürünün izolasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

4. TARTIŞMA

- Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon Yönteminin Seçilmesi

Şekil 3.1'e bakıldığında yüksek sıcaklıkla ön işlem uygulanan çay örneklerinin kafein ve kateşin verimi açısından en düşük sonuçları verdiği görülmektedir. Liang vd., (2007) %83 kafeini ortamdan uzaklaştırdığını ve %95 kateşinin demleme yapılan yaprakta kaldığını savunmuşlardır. Fakat bu tez çalışmasında benzer sonuçlar elde edilememiştir. Hu vd., (2009) yeşil çay örneklerinden etanol ekstraksiyonu ile EGC ve EGCG'ca zengin ekstrakt elde edilebileceğini göstermişlerdir. Yaptıkları ekstraksiyon sonucunda elde ettikleri ekstrakt EGCG yönünden %100 artmış fakat EGC yönünden %40,38 azalmıştır. Buradan yola çıkılarak yapılan çalışmada kateşin miktarı açısından yüksek verimli bir ekstraksiyon beklenirken Şekil 3.1'de kafein ve kateşin verimlerine bakıldığında kafein verimi %1'in üstünde bir değerde olmasına rağmen bu ekstraksiyonun esas yapılma amacına uygunluk belirlenememiştir. Bazinet vd., (2007)'nin iki basamaklı ekstraksiyon yöntemi EGC yönünden %78,90 ve ikinci basamakta toplam EGCG yönünden %47,60 artış sağlamaktadır. Bu yöntemin uygulandığı ve sonuçları Şekil 3.1'de verilen ekstraksiyon işleminde kateşin verimi %1 seviyesinde kaldığından bu yöntemin kateşinlerin izolasyonu için uygun bir yöntem olmadığı sonucuna varılmıştır. Dong vd., (2011) sitrik asit ile yeşil çay yapraklarının kafeinsizleştirilmesi üzerine yaptıkları çalışmada %78,80 kafeinin yapraklardan uzaklaştırıldığını belirlemişlerdir. Kafeinin izolasyonu için kullanılan bu ekstraksiyon yöntemini değerlendirmek üzere Şekil 3.1'e bakıldığında kafeinin %0,5'in bile altında verimle elde edildiği düşünülürse literatüre göre oldukça düşüktür ve kafeinin izolasyonu için seçilebilecek uygun yöntem olmadığı açıktır. Row ve Jin, (2006) sıcak su ekstraksiyonu ile Kore çayından kateşinlerin izolasyonu üzerine yaptıkları çalışmada yöntem optimizasyonu yaparak 80 °C'de 40 dk 'da kateşinlerin yüksek verimle ortamdan izole edildiğini belirlemişlerdir. Şekil 3.1 değerlendirildiğinde bu yöntemin en yüksek kafein ve kateşin verimlerini sağladığı dolayısıyla sıcak su ekstraksiyonu çalışmalarda kullanılacak yöntem olarak seçilmiştir.

- HPLC Analizleri İçin Yöntem Optimizasyonu

Optimize edilen HPLC yöntemi kullanılarak 6 standart fenolik bileşiğin analizine dair kromatogram Şekil 3.2'de görülmektedir. Yöntem 34 dakika içinde tüm analitlerin uygun bir şekilde ayrılmasını sağlamaktadır. Düşük derişimlerde alıkonma zamanlarının ve

pik alanının tekrarlanabilirliği kabul edilebilir değerlerde bulundu (Tablo 3.1). Ayrıca 6 standardın kalibrasyonlarından doğrusal cevaplar ($R^2=0,99$) elde edildi. Tüm standartlar için BS değerleri 0,11 mg/L' nin ve ÖS değeri ise 0,31 mg/L' nin altında bulunmuştur ki bu değerler bitki materyallerinde fenolik bileşiklerin belirlenmesi için yeterlidir.

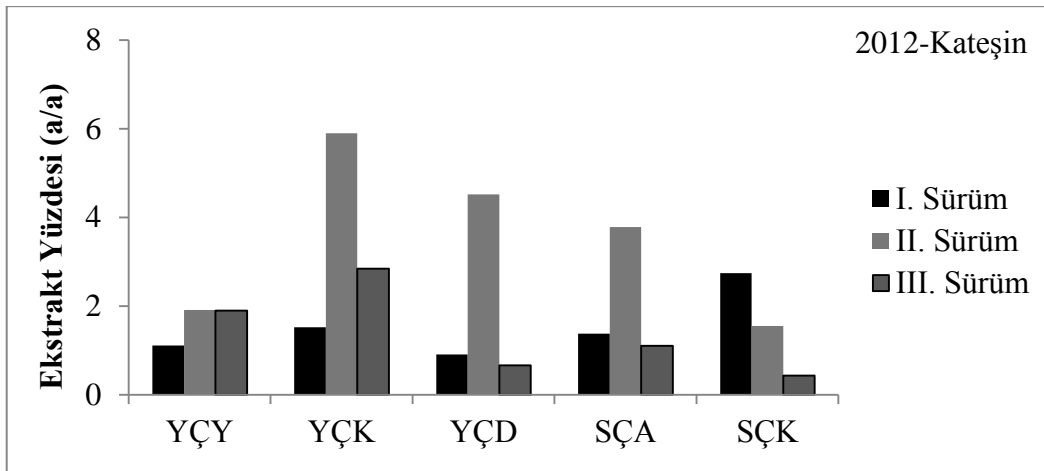
- Çay Örneklerinin Yıllara ve Sürümlere Göre Sıcak Su Ekstraksiyon Verilerinin Değerlendirilmesi

Bu tez çalışması Bölüm 1.11'de tanımlanan hedefleri yerine getirecek şekilde diyazn edilmiştir. Bir SAN-TEZ destekli proje olduğundan genel durumu ortaya koymak ve mevcut şartlarda en yüksek kateşin ve kafein verimlerini sağlamak amacı ön plandadır.

Bu nedenle 2012, 2013 ve 2014 yılları arasındaki içerik karşılaştırmaları yıllar arası değişimleri gösterecektir Bu karşılaştırmayı sağlayan veriler Bölüm 3.3, 3.4 ve 3.5'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

- 2012 Yılı

2012 Yılına ait tüm örneklerin kateşin verimleri (%) Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. 2012 Yılı çay örneklerinin kateşin verimlerinin karşılaştırılması

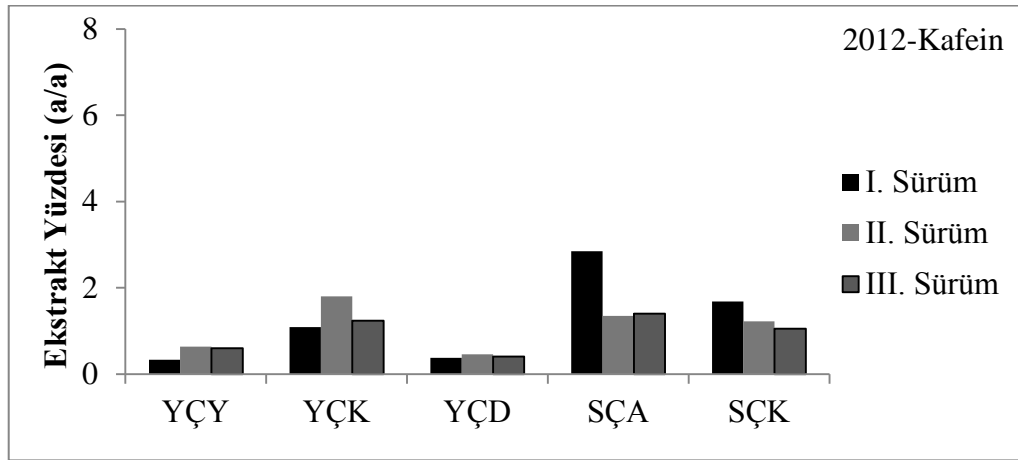
Yıl bazında değerlendirildiğinde en yüksek verimler II. sürümde olup tüm sürümlerde kateşin verimleri %0,43 ile %5,90 aralığında değişmektedir. Örnek bazında bakıldığında en yüksek kateşin verimi kurutulmuş yaş çaydan elde edilmiştir (%1,52-5,90). Yaş ve dondurulmuş yaş çay örneklerinden izole edilen kateşin miktarı kuruya göre daha düşüktür.

Oysaki Bölüm 3.3.6'da Şekil 3.16'da sunulan içerik verilerinde kurutulmuş yaş çaydan daha yüksek ekstrakt verimi alınmasına rağmen ekstrakt içindeki kateşin türlerinin miktarları daha düşüktür. Yaş olarak çalışılan yaş çay örneklerinden çok daha yüksek kateşin içeren ekstraktlar elde edilmiştir (Tablo 3.2).

2012 Yılı çay atıklarında SÇA'dan %1,1-3,78 aralığında SÇK'dan ise %0,43-2,74 aralığında kateşin verimleri elde edilmiştir. Yaş çayla karşılaştırıldığında hiç de azımsanmayacak oranda kateşin verimleri elde edilmiştir. Ancak atıklardan elde edilen ekstraktların kateşin içerikleri oldukça düşüktür (Tablo 3.3 ve 3.4).

2012 Yılı kafein verimleri yaş çay için %0,33-1,80 aralığında değişmektedir (Şekil 4.2). En yüksek verim yine II. sürüm kuru örneklerden elde edilmiştir. Kafein ekstraktlarının HPLC analizlerinde saf olarak kafeinin ayrıldığını gösterir veriler elde edilmiştir.

Atıklardan elde edilen kafein miktarı çok daha yüksektir (Şekil 3.6 ve 3.7). SÇA'da I. sürüm örneklerinde %2,85 gibi oldukça yüksek verim elde edilmiştir.



Şekil 4.2. 2012 Yılı çay örneklerinin kafein verimlerinin karşılaştırılması

- TLC ve HP-TLC Uygulaması

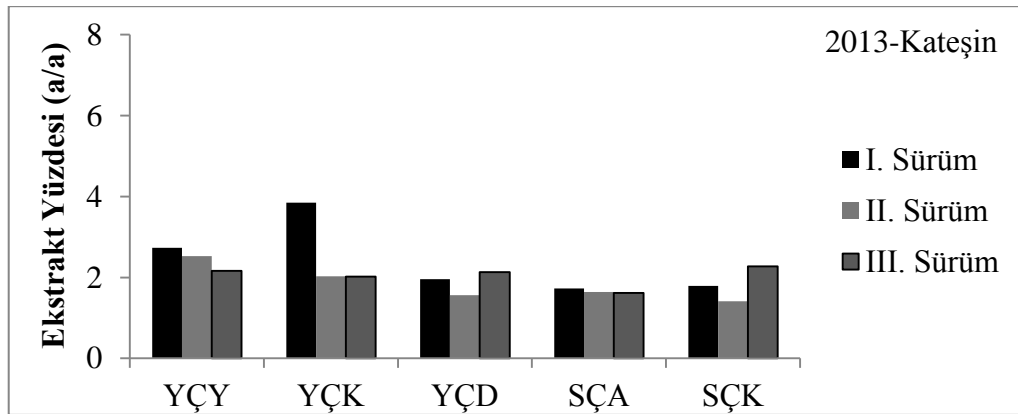
Yapılan ekstraksiyonlar sonucunda kateşin içeriklerini kontrol etmek amacıyla Bölüm 2.3.3'te anlatılan TLC ve Bölüm 2.3.4'te anlatılan HP-TLC analizleri yapılmıştır. Bu analizler yalnızca kalitatif olarak yöntemin doğrulanması için olduğundan sadece 2012 yılı örneklerine uygulanmıştır. Elde edilen kromatogramlar 3.8 ve 3.10'da verilmiştir.

HPLC'deki gibi sinyalle derişim arasında doğrusallık sağlanamadığından 2013 ve 2014 örneklerine uygulanmamıştır.

- 2013 Yılı

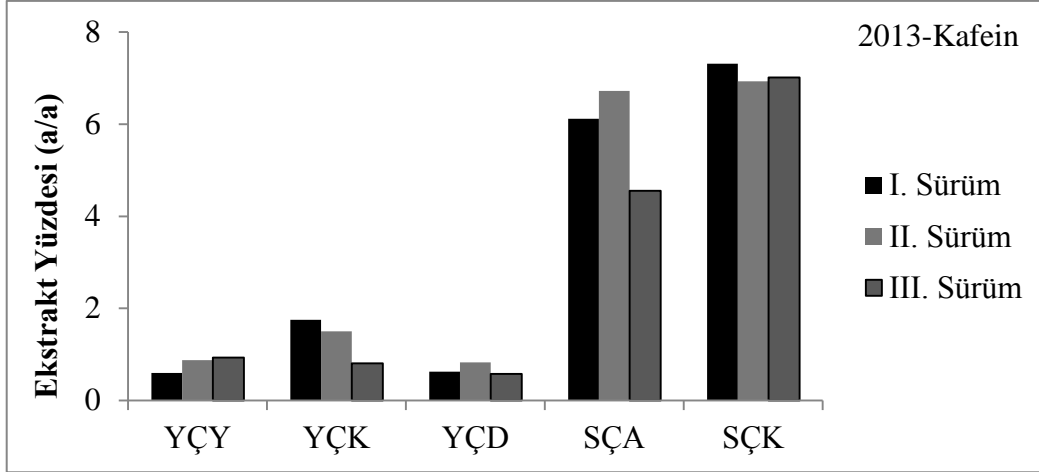
2013 Yılı kateşin ve kafein verimleri sırasıyla 4.3 ve 4.4'de verilmiştir. 2012 yılından farklı olarak I. sürüm örneklerinde (yaş çay ve atıklar) en yüksek kateşin ekstrakt verimleri elde edilmiştir. Benzer şekilde kurutulmuş yaş çay (YÇK) örneklerinden yaş ve dondurulmuş örneklere göre daha yüksek (%3,85, Şekil 3.19) ekstrakt verimleri elde edilmiştir.

Bu verim 2012'den daha düşük olmasına rağmen daha yüksek kateşin içeriğine sahiptir (Şekil 3.23). Ayrıca YÇY ve YÇD örneklerinden elde edilen ekstraktların verimi düşük olmasına rağmen içerikleri oldukça yüksektir (Tablo 3.5).



Şekil 4.3. 2013 Yılı çay örneklerinin kateşin verimlerinin karşılaştırılması

2013 Yılında SÇA ve SÇK'dan ekstre edilen kateşin verimleri atıkta düşerken kafein tozunda aynı kalmıştır (Şekil 3.21 ve 3.22). Ekstraktların kateşin içerikleri 2012 yılıyla benzerlik göstermektedir (Şekil 3.24 ve 3.25).

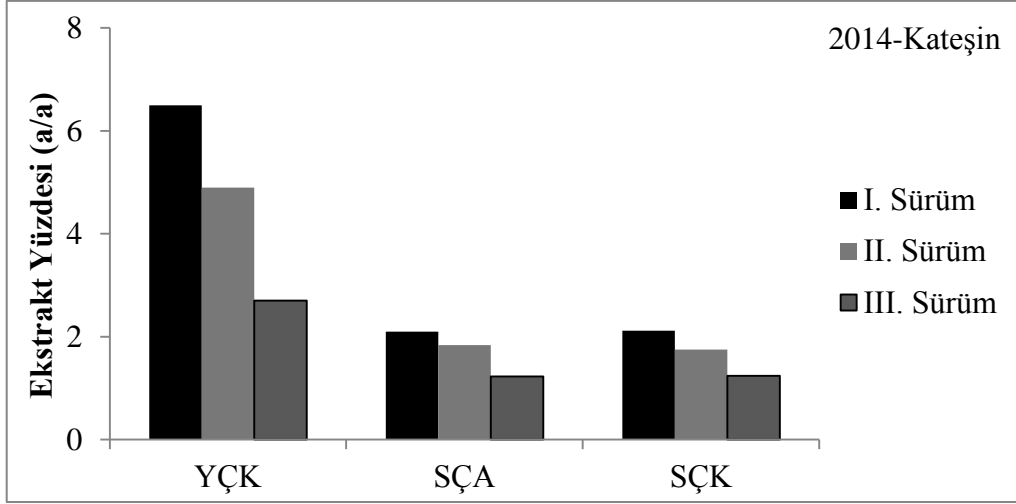


Şekil 4.4. 2013 Yılı çay örneklerinin kafein verimlerinin karşılaştırılması

2013 Yılında yaş çay örneklerinin kafein verimleri %0,58-1,75 aralığında değişmekte olup 2012 örnekleriyle benzer veriler bulunmuştur (Şekil 3.20). Oysaki SÇK ve SÇA örneklerinde beklenenin çok üzerinde %4,55-7,31 kafein verimleri elde edilmiştir (Şekil 3.21 ve 3.22). Bu düzeyde kafein miktarı literatürde mevcut değildir.

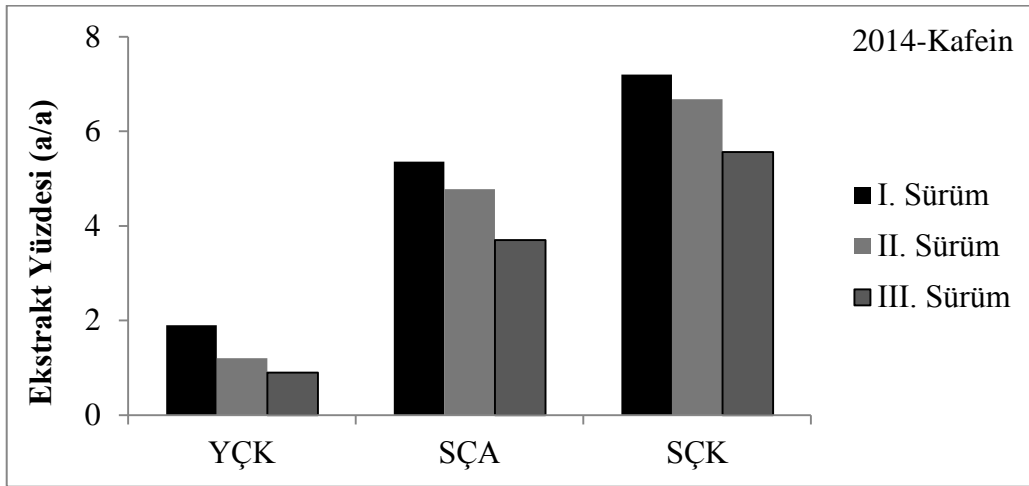
- 2014 Yılı

2014 Yılı verileri genel olarak 2013 ile paralellik göstermiştir (Şekil 4.5 ve 4.6). Yine I. sürüm örneklerinde en yüksek verimler gözlenmiştir. Kateşin ekstrakt verimi izlenen diğer yıllara göre maksimum değere ulaşmıştır (%6,50, Şekil 3.26). Tablo 3.8'den de görüleceği gibi I. ve II. sürüm YÇY'dan elde edilen ekstraktın tamamı kateşinlerden oluşmaktadır. Ayrıca belirtmek gerekir ki I. sürüm YÇK'da EGC miktarı 80 mg/g'lık bir değere ulaşmıştır (Şekil 3.29). Bu tüm tez çalışmasında elde edilen en başarılı kateşin ekstraksiyonudur.



Şekil 4.5. 2014 Yılı çay örneklerinin kateşin verimlerinin karşılaştırılması

Çay atığı ve kafein tozundan ekstre edilebilen kateşin verimleri Şekil 3.27 ve Şekil 3.28’de verilmiştir. SÇA’da I. sürümde %2,10 ile en yüksek ekstrakt verimi elde edilirken SÇK’da bu oran %2,12’dir. Bu değerler 2012 ve 2013’den daha yüksektir. Her iki atık materyalin kateşin içerikleri EC yönünden zengin olup ekstre edilebilen kateşin oranı sırasıyla %95,54 ve %64,02’dir (Tablo 3.9 ve 3.10). Bu da 2014 atıklarından oldukça saf kateşin ekstraktı elde edilebileceğini göstermektedir.



Şekil 4.6. 2014 Yılı çay örneklerinin kafein verimlerinin karşılaştırılması

Atıkların kafein verimleri %3,70-7,20 arasında değişmektedir (Şekil 3.27 ve 3.28). Kafein tozu 2013 yılı örnekleri gibi standartların üzerinde kafein verimi sağlamıştır.

- Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SFE) Yönteminin Optimizasyonu

Çaydan kafein ve kateşin gibi bileşenlerin ekstraksiyonu için aseton, metanol, asetonitril, kloroform, etil asetat gibi organik çözücüler kullanılmaktadır. Özellikle kafeinsiz çay elde etmek amacıyla sıvı-sıvı ekstraksiyonunda kullanılan kloroform oldukça toksik özellikte bir organik çözücüdür. Bu çözücülerin kalıntıları insan sağlığı açısından oldukça tehlikelidir ki Amerika Kanser Araştırmaları Enstitüsü bu çözücülerin ekstraksiyonlarda kullanımını yasaklamıştır (Park vd., 2007). Bilim adamları bu gerekçelerden yola çıkarak alternatif ve oldukça önemli bir ekstraksiyon yöntemi olan çözücü olarak CO₂'in kullanıldığı süperkritik akışkan ekstraksiyon yöntemini (SFE) önermektedir. Bu yöntemin birçok avantajı vardır. Çözücü olarak kullanılan CO₂ toksik ve yanıcı olmayan, ucuz, çevreye herhangi bir olumsuz etkisi olmayan, düşük kritik sıcaklık (304,4 K) ve basınç (73,9 Bar), yüksek difüzyon ve çözünürlük, düşük viskozite, ısıtma ve evaporasyon gerektirmeden ortamdaki kolay uzaklaşabilen gibi özelliklere sahiptir. Oldukça önemli özelliklerinin yanında tek dezavantajı oldukça apolar olması sebebiyle yalnızca hidrokarbonlar ve uçucu yağlar gibi bileşenleri ortamdaki uzaklaştırabilmesidir. Bu dezavantajı ortadan kaldırmak amacıyla ortama polariteyi artırıcı ilave çözücüler (su, etanol gibi) eklenerek polar karakterli diğer bileşenlerin de izolasyonları sağlanır (Huang vd., 2007; Park vd., 2007). Modifiyerli CO₂ ekstraksiyonu olarak adlandırılan bu sistemde ilave çözücüler bileşenler ile hidrojen bağı gibi güçlü bağlar kurarlar. Seçimli ekstraksiyon yapabilmek amacıyla izolasyonu istenen bileşenin yapısına uygun ilave çözücüler seçilmelidir. Örneğin, kateşinlerin SFE ile izolasyonu için ilave çözücü olarak etanolün kullanılması kateşinlerin hidroksil grubu ve etanolün hidrojeni arasında güçlü bir hidrojen bağı kurulmasıyla izolasyonlarını kolaylaştırır (Ghoreishi ve Heidari, 2012).

Chang vd., (2000) yeşil çaydan kafein ve kateşinin birlikte ekstraksiyonu için etanolü modifiyer olarak kullanmışlardır. %9,4 Etanolün modifiyer olarak kullanıldığı SFE sisteminde basınç 310 bar, sıcaklık 60 °C'dir. Kafein/EGCG seçicilik katsayısı 1,48 olarak belirtilmişse de ekstraksiyon verimleri hakkında bir bilgi verilmemiştir. Huang vd., (2007) %0,9 suyun modifiyer olarak kullanıldığı sistemde basınç 275 bar, sıcaklık 50 °C'de yine eş zamanlı kafein ve kateşinlerin ekstraksiyonunu yapmıştır. Kafein/EGCG seçicilik katsayısı 2,25 olarak belirtilmiş ve %73,9 kafein %33,20 kateşin izolasyon verimleri rapor edilmiştir. Bir başka çalışmada Kim vd., (2008) %7 suyun modifiyer olarak kullanıldığı sistemde 400 bar ve 40 °C sıcaklıkta ekstraksiyon sonucu %54 kafein ve %21 kateşin verimi elde etmişlerdir. Kafein/EGCG seçicilik katsayısı 0,88'dir. Etanolün modifiyer

olarak kullanıldığı sistemin ekstraksiyon verimlerini belirtmeden yalnızca seçicilik katsayısını 0,24 olarak verilmiştir. Seçicilik katsayısının daha yüksek olmasından dolayı modifiyer olarak suyu seçmişlerdir. Park vd., (2007) etanol ve su çözücülerıyla iki farklı sistemde 300 bar ve 70 °C sıcaklıkta yapılan ekstraksiyonlarda %8,8 su ve %7 etanol kullanmışlardır. Suyun kullanıldığı sistemde %75,6 kafein ve %68,8 kateşin verimleri elde edilmiştir. (Seçicilik katsayısı 1,1). %97,3 Kafein ve %62 kateşin verimiyle (seçicilik katsayısı 1,57) etanolün modifiyer olarak kullanılması önerilmiştir.

Yukarıdaki çalışmalardan anlaşılacağı üzere yalnızca kafeinin ve yalnızca kateşinlerin izolasyonunu sağlayan bir ekstraksiyon sistemi mevcut değildir. Anlatılan bütün sistemlerde kafein ve kateşin izolasyonları birarada yapılmıştır. Ekstraksiyon verimleri ise başlangıçta çayda mevcut olan kafein veya kateşinin SFE ile ekstre edilebilen yüzdelarını göstermektedir. Örneğin %2 kafein içeren bir çay örneğinden %75 verimle %1,5 kafeinin alınabileceği anlamına gelir. Bu çalışmada SFE ile önce kafeinin sonrasında aynı çay örneğinden kateşinlerin izolasyonlarını amaçlanmıştır. Bu nedenle yapılan bir seri çalışmada basınç, sıcaklık, zaman ve modifiyer miktarı gibi parametreler değiştirilerek en yüksek verimle elde edilen kafein ve kateşin ekstraktları bulunmuştur (Şekil 3.32-3.39). Yukarıda belirtilen sebeplerden dolayı kateşinlerin izolasyonları sırasında sistemde modifiyer olarak etanol kullanılmıştır.

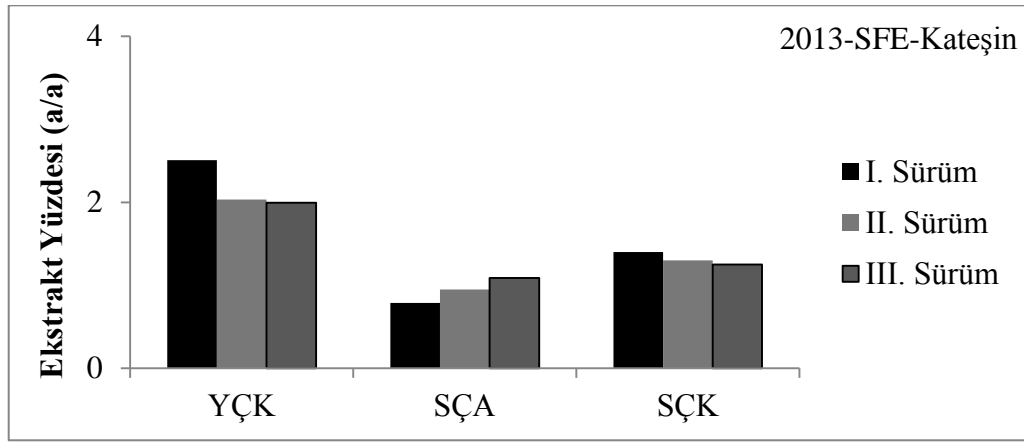
Yaş çaydan kafeinlerin izolasyonu için yapılan SFE optimizasyonunda en yüksek kafein veriminin elde edildiği 250 bar basınç, 60 °C sıcaklık ve 3 saat modifiyersiz SFE yöntemi olarak belirlenmiştir (Şekil 3.34). Elde edilen ekstrakt verimi %1,5 olup aynı örneğin sıcak su ekstraksiyonundan elde edilen %kafein verimiyle uyumludur. Bu da bu şartlarda yapılan CO₂-SFE ile örnekten tüm kafeinin alınabildiğinin yani yöntemin başarılı olduğunun göstergesidir. Kullanılan çay örneğinden kafein izolasyonunun tamamen yapılmadığı kontrol edilmiş ve yaprakta kalan kafeinin başlangıçta yaprakta bulunan toplam kafein miktarının %1'inin altında olduğu belirlenmiştir. Bu da kafein ekstraksiyon veriminin %99'un üstünde olduğunu göstermektedir. Bu değer Türk Gıda Kodeksi'ne göre kafeinsiz çay olarak kabul edilmektedir.

Yaş çaydan kateşinlerin izolasyonu için yapılan SFE optimizasyonunda en yüksek kateşin veriminin elde edildiği 250 bar basınç, 60 °C sıcaklık, 0,5 mL etanol hacmi ve 3 saat modifiyerli SFE yöntemi olarak belirlenmiştir (Şekil 3.38). Elde edilen ekstrakt yalnızca kateşinlerden oluştuğu için herhangi bir seçicilik katsayısının hesaplanması söz konusu değildir. Kateşin ekstraktı verimi %2,50 olup literatürden ve sıcak su

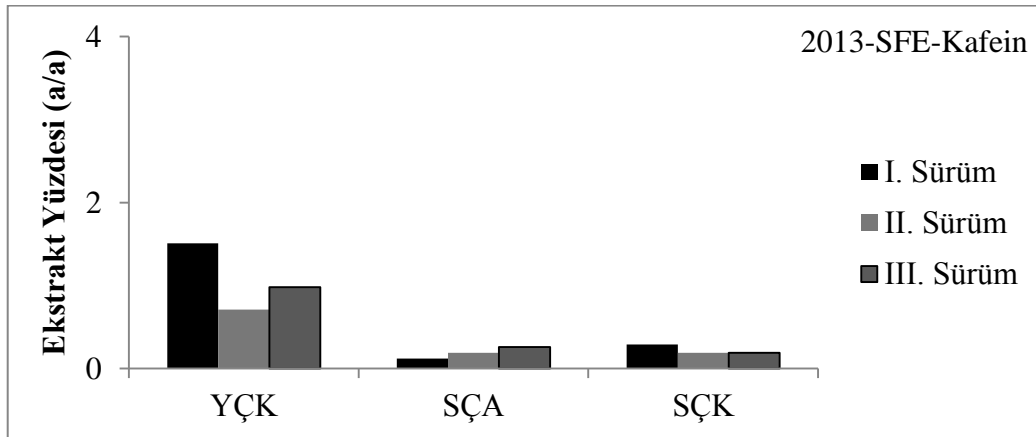
ekstraksiyonu ile elde edilen verim (%3,85) biraz düşüktür ve ekstraktın %71'i kateşinlerden oluşmaktadır.

- 2013 Yılı

2013 Yılı tüm örneklerinin kateşin ekstrakt yüzdeleri Şekil 4.7, kafein yüzdeleri ise Şekil 4.8'de verilmiştir. SFE ile elde edilen kateşin verimleri sıcak su ekstraksiyonu ile elde edilen aynı çay örnekleriyle karşılaştırıldığında sonuçlar düşük olsa da ekstraktlar saf kateşinden oluşmaktadır.



Şekil 4.7. 2013 Yılı çay örneklerinin SFE ile elde edilen kateşin verimlerinin karşılaştırılması



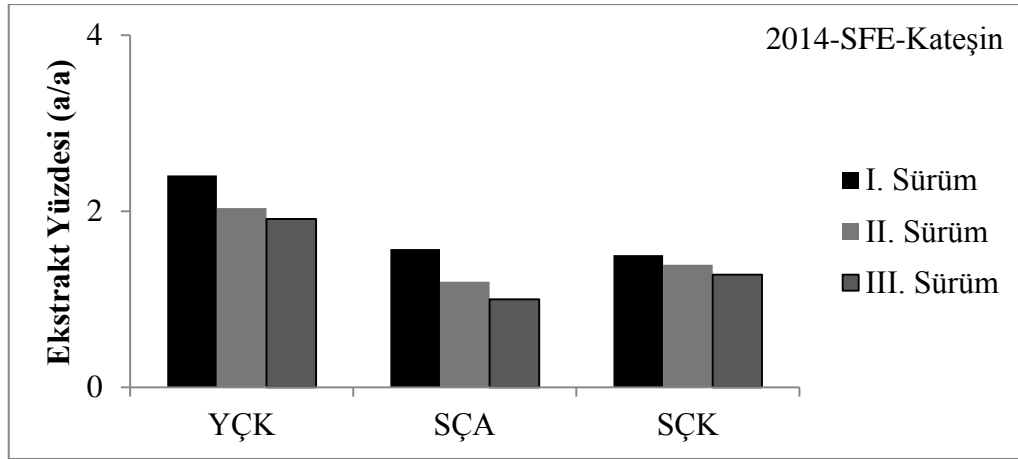
Şekil 4.8. 2013 Yılı çay örneklerinin SFE ile elde edilen kafein verimlerinin karşılaştırılması

Şekil 4.8'den de görüleceği gibi siyah çay atığı ve kafein tozu örneklerinden SFE ile oldukça düşük miktarlarda kafein izole edilebilmiştir. Oysaki aynı örneklerin sıcak su

ekstraksiyonunda %6-7'ye ulaşan verimler elde edilmiştir. Bu yönüyle optimize edilen SFE yöntemi zayıf kalmıştır. Yüksek oranda kafein içeren bu tür örnekler için zamanı uzun tutan yeni bir optimizasyon gerekmektedir.

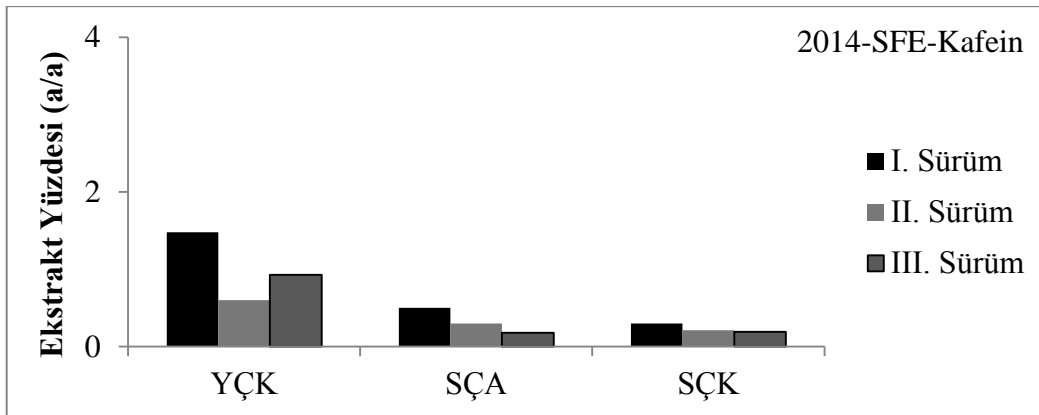
- 2014 Yılı

2014 Yılı tüm örneklerinin kateşin ekstrakt yüzdeleri Şekil 4.9, kafein yüzdeleri ise Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.9. 2014 Yılı çay örneklerinin SFE ile elde edilen kateşin verimlerinin karşılaştırılması

Elde edilen verimler sonucunda en iyi sonuçları YÇK örneklerinin verdiği, SÇA ve SÇK örneklerinin de yaş çay örneklerinden daha az ama birbirine yakın değerlerde olduğu görüldü. SFE sıcak su ekstraksiyonuyla karşılaştırıldığında verimler açısından tamamen uyumlu sonuçlar elde edildi.

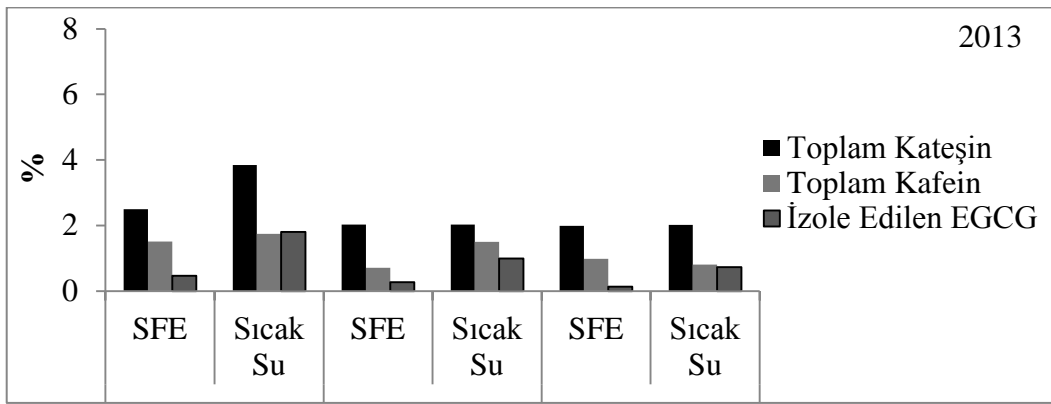


Şekil 4.10. 2014 Yılı çay örneklerinin SFE ile elde edilen kafein verimlerinin karşılaştırılması

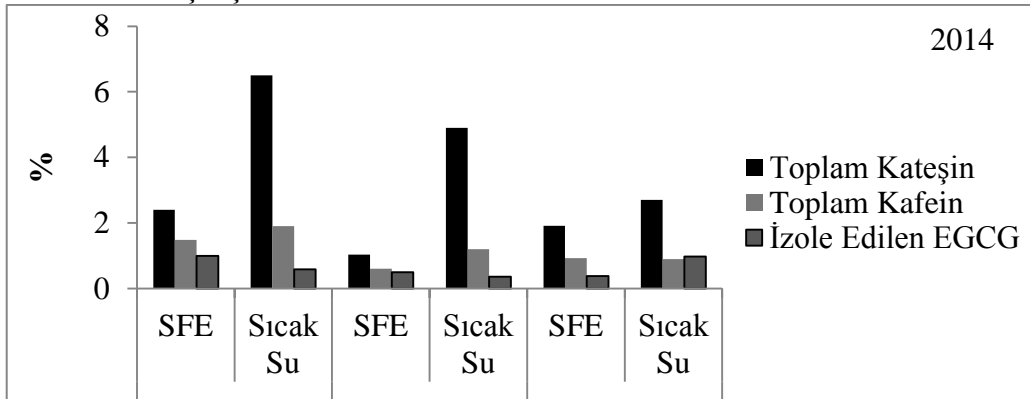
- SFE ile Sıcak Su Ekstraksiyon Yönteminin Karşılaştırılması

Kurutulmuş yaş çayın SFE ve sıcak su ekstraksiyonundan elde edilen kateşin verimlerini karşılaştırmak için Şekil 4.11 ve 4.12 verilmiştir. Ekstraksiyon sonrası HPLC analizi ile izole edilebilen EGCG miktarı şekillerde belirtilmiştir.

2013 ve 2014 yılları karşılaştırma sonuçlarından da görüleceği üzere sıcak su ekstraksiyonu ile elde edilen verimler SFE'den az miktarda yüksektir. Verimdeki bu farklılık organik çözücü kullanılmadan yapılan ekstraksiyonun üstünlüğünü etkileyemez. Zira bu şartlar da kateşinlerin ekstraksiyonu için SFE kullanmak daha akılcıdır.



Şekil 4.11. 2013 Yılı YÇK örnekleri için SFE ve sıcak su ekstraksiyonu verimlerinin karşılaştırılması



Şekil 4.12. 2014 Yılı YÇK örnekleri için SFE ve sıcak su ekstraksiyonu verimlerinin karşılaştırılması

Bütün bu verilerden yola çıkılarak bir temiz ekstraksiyon (green extraction) yöntemi olan SFE'nin yaş çaydan kafein ve kateşinlerin izolasyonları için tercih edilmesi gereken bir yöntem olduğu belirlenmiştir. Bu yöntem ardışık olarak yapılan (önce modifiyersiz,

sonra modifiyerli) süperkritik akışkan ekstraksiyonunun yaş çay örneklerine uygulandığı ilk yöntemdir.

- Kateşinlerin İzolasyonları

Bölüm 1.1’de detayları verilen literatürden yola çıkılarak gerçekleştirilen izolasyon aşamaları ve elde edilen veriler Bölüm 3.9’da açıklanmıştır. SAN-TEZ projesi hedefi olan saflaştırma işlemi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş olup %75 etanol %25 su oranındaki hareketli fazla EGCG saf bir şekilde elde edilmiştir. Bu bileşen yaş çay örneklerinde önemli oranda bulunurken atıklarda EC ve EGC yönünden zengindir. İzolasyon yöntemi (poliamid, etanol-su) bu kateşin türevleri için de kullanılabilir.

5. SONUÇLAR

Bu araştırmada 2012-2014 yıllarında farklı çay örneklerinin (yaş çay, siyah çay atığı ve kafein tozu), farklı hasat dönemlerinde (I., II. ve III. sürüm) içerdikleri kafein ve kateşin miktarları, ekstraksiyon ve analiz yöntemleri incelenmiştir. Yaş ay örnekleri yaş, kuru ve dondurulmuş olarak işlenerek örnek doğasının etkileri de araştırıldı. Araştırmadan elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

1. Literatürde varolan farklı sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemleri 2012 yılı örneklerine uygulanarak çay örneklerinden kafein ve kateşinlerin ekstraksiyonu için en verimli yöntemin sıcak su ekstraksiyonu olduğu belirlendi.
2. TLC ve HP-TLC yöntemleri ile kateşinlerin nitel analizi başarılı bir şekilde yapıldı.
3. 2012, 2013 ve 2014 yıllarında yapılan örneklemelerde standart bir kateşin ve kafein içeriğinin olmadığı yıllara ve yaşanan mevsim şartlarına göre önemli farklılıklar gösterdiği belirlendi.
4. Kafein ve kateşin içeriklerinin sürümler arasında net bir eğilimi gözlenmedi. Örneğin 2012 yılında II. sürümde yüksek verimler elde edilirken, 2013 ve 2014 yıllarında I. sürümde daha yüksek verimler elde edildi.
5. Farklı ay örnekleri (yaş çay, siyah çay atığı ve kafein tozu) kendi arasında içerdikleri kafein ve kateşin miktarları açısından değerlendirildiğinde yaş çay örneklerinin literatür ile uyumlu ve diğer türlerden daha yüksek miktarda kateşin içerdiği belirlendi. Ancak siyah çay atığı ve kafein tozunun da azımsanmayacak miktarlarda kateşin içerdiği bulundu. Kafein miktarlarına bakıldığında siyah çay atığından ve kafein tozu örneklerinden, yaş çaydan ve literatürdeki verilerden yaklaşık 3 kat fazla verim elde edildi.
6. Yaş ay örnekleri yaş, kuru ve dondurulmuş olarak çalışıldı. 2012 Yılında yaş örneklerden yüksek verim elde edilirken 2013 ve 2014 yıllarında kuru örneklerden yüksek verim sağlandı. Buradan yola çıkılarak yaş, kuru veya dondurulmuş yaş çay örneklerinin herhangi birisiyle çalışmanın daha iyi olduğuna dair net bir eğilim elde edilmedi. Ekstrakt veriminin yüksek olması kateşinlerin seçici olarak ekstre edildiği anlamını taşımamaktadır. Bazı durumlarda daha düşük ekstrakt verimi elde edilmesine karşın bu ekstraktın kateşin içeriği çok daha yüksek olabilmektedir. Endüstriyel uygulamalar göz

önüne alındığında hiçbir maliyet getirmeyen ve doğrudan yaş (taze) yaş çay örneklerinin işlenmesi daha ekonomiktir.

7. Hem kurutulmuş yaş çay hem de atıklar için ardışık olarak kafein ve kateşin ekstraksiyonları yapabilen bir SFE metodu geliştirildi. Bu yöntem 250 bar basınç, 60 °C sıcaklık, 3 saatlik ekstraksiyon şartlarında kafeini büyük oranda ekstre etmektedir. Aynı örnek üzerinden yine 250 bar basınç, 60 °C sıcaklık, 3 saat ve 0,5 mL/dk etanol modifiyeri ile kateşinler de başarılı bir şekilde ekstre edildi. Tez çalışması bu yönüyle yapılmış ilk çalışmadır.

6. KAYNAKLAR

- Aktas, Z., ve Olcay A., 1996. Supercritical Toluene Extraction of a Reduced Turkish Lignite, Fuel Processing Technology, 48, 61-72.
- Alasalvar, C., Pelvan, E., Özdemir, K., Kocadağlı, T., Mogol, B., Paslı, A., Özcan, N., Özçelik, B., ve Gökmen, V., 2013. Compositional, Nutritional, and Functional Characteristics of Instant Teas Produced from Low- and High-Quality Black Teas, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61, 7529–7536.
- Amarowicz, R., Shahidi, F., and Wiczkowski, W., 2003. Separation of Individual Catechins From Green Tea Using Silica Gel Column Chromatography and HPLC, Journal of Food Lipids, 10, 165-177.
- An, B., Kwak, J., Son, J., Park, J., Lee, Jo., C. and Byun, M., 2004. Biological and Antimicrobial Activity of Irradiated Green Tea Polyphenols, Food Chemistry, 88, 549- 555.
- Anderson, R., and Polansky, M. M., 2002. Tea Enhances Insulin Activity, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 7182-7186.
- Arai, Y., Sako, T., and Takebayashi, Y., 2002. Supercritical Fluids Molecular Interactions, Physical Properties and New Applications, Warlimont. H., Springer Series, 51-3141, Germany.
- Aron, P.M., and Kennedy, J.A., 2008. Flavan-3-ols: Nature, Occurrence and Biological Activity, Molecular Nutrition and Food Research, 52, 79-104.
- Artali, R., Beretta, G., Morazzoni, P., Bombardelli, E., and Meneghetti, F., 2009. Green Tea Catechins in Chemoprevention of Cancer: A Molecular Docking Investigation Into Their Interaction with Glutathione S-Transferase (GST P1-1). Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry, 24, 287-295.
- Ashihara, H., and Crozier, A., 2001. Caffeine: A Well Known But Little Mentioned Compound in Plant Science, Trends in Plant Science, 6, 407-413.
- Astill, C., Birch, M.R., Dacombe, C., Humphrey, P.G., and Martin, P.T., 2001. Factors Affecting The Caffeine and Polyphenol Contents of Black and Green Tea Infusions, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 5340-5347.
- Bahar, B., Pelvan, E., Hasbay, I., ve Alasalvar, C., 2013, Decaffeinated Black Tea: Process Optimization and Phenolic Profiles, The Journal of Supercritical Fluids, 82, 116–121.
- Bailey, D., 1999. Poliamid kolonda ayırma ve saflaştırma, Patent No: 09/226477.

- Bansal, S., Syan, N., Mathur, P., and Choudhary S., 2012. Pharmacological Profile of Green Tea and Its Polyphenols: A Review, Medicinal Chemistry Research, 21, 3347-3360.
- Barone, J.J., and Roberts, H.R., 1996. Caffeine Consumption, Food Chemistry and Toxicology, 34, 119-129.
- Baruah, A.M., 2003. Fermentation Characteristics of Some *Assamica* Clones and Process Optimization of Black Tea Manufacturing, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 6575-6588.
- Bazinet, L., Labbe, D., and Tremblay, A., 2007. Production of Green Tea EGC and EGCG-enriched Fractions by a Two Step Extraction Procedure, Separation Purification Technology, 56, 53-56.
- Bhattacharyya, N., Seth, S., Tudu, B., Tamuly, P., Jana, A., Ghosh, D., Bandyopadhyay, R., Bhuyan, M., and Sabhapandit, S., 2007a. Detection of Optimum Fermentation Time For Black Tea Manufacturing Using Electronic Nose, Sensors and Actuators B: Chemical, 122, 627-634.
- Bhattacharyya, N., Seth, S., Tudu, B., Tamuly, P., Jana, A., Ghosh, D., Bandyopadhyay, R., Bhuyan, M., and Sabhapandit, S., 2007b. Monitoring of Black Tea Fermentation Process Using Electronic Nose, Journal of Food Engineering, 80, 1146-1156.
- Bonnely, S., Davis, A.L., Lewis, J.R., and Astill, C., 2003. A Model Oxidation System To Study Oxidised Phenolic Compounds Present In Black Tea, Food Chemistry, 83, 485-492.
- Bonoli, M., Pelillo, M., Toschi, T.G., and Lercker, G., 2003. Analysis of Green Tea Catechins: Comparative Study Between HPLC and HPCE, Food Chemistry, 81, 631-638.
- Borah, S., and Bhuyan, M., 2005. A Computer Based System For Matching Colours During The Monitoring of Tea Fermentation, International Journal of Food Science and Technology, 40, 675-682.
- Borbalán, Á.M.A., Zorro, L., Guillén, D.A., and Barroso, C.G., 2003. Study of Polyphenol Content of Red and White Grape Varieties by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Its Relationship To Antioxidant Power, Journal of Chromatography A, 1012, 31-38.
- Bravo, L., 1998. Polyphenol Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance, Nutrition Reviews, 56, 317-333.
- Bronner, W.E., and Beecher, G.R., 1998. Method for Determining The Content of Catechins in Tea Infusions by High-Performance Liquid Chromatography, Journal of Chromatography A, 805, 137-142.
- Brunner, G., 2005. Supercritical Fluids: Technology and Application to Food Processing, Journal of Food Engineering, 67, 21-33.

- Cabrera, C., Gimenez, R., and Lopez, M.C., 2003. Determination of Tea Components with Antioxidant Activity, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 4427-4435.
- Caffin, N., D'Arcy, B., Yao, L., and Rintoul, G., 2004. Developing An Index of Quality For Australian Tea, RIRDC Publication No. 04/033, Project No. UQ-88A, Publication of Rural Industries Research and Development Corporation, 192 pp., Australia.
- Caffin, N., D'Arcy, B., Yao, L., and Rintoul, G., 2004. Developing An Index of Quality For Australian Tea, RIRDC Publication No. 04/033, Project No. UQ-88A, Publication of Rural Industries Research and Development Corporation, 192 pp., Australia.
- Cansel, F., Aymonier, C., and Loppinet-Serani, A., 2003. Review on Materials Science and Supercritical Fluids, Current Opinion in Solid State and Materials Science, 7, 331–340.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., and Chew, Y.L., 2007. Antioxidant Activity of *Camellia sinensis* Leaves and Tea From A Lowland Plantation In Malaysia, Food Chemistry, 102, 1214-1222.
- Chang, C.J., Chiu, K.L., and Chen, Y.L., 2000. Separation of Catechins From Green Tea Using Carbon Dioxide Extraction, Food Chemistry, 68, 109–113.
- Chang, L.C., Kinghorn, A.D., and Tringali, C., 2001. Bioactive Compounds from Natural Sources, Taylor & Francis, 159.
- Chen, Z. P., Schell, J. B., Ho, C. T., and Chen, K. Y., 1998. Green Tea Epigallocatechin Gallate Shows A Pronounced Growth Inhibitory Effect on Cancerous Cells But Not On Their Normal Counterparts, Cancer Letters, 129, 173–179.
- Chen, Z., Wang, S., Lee, K.M.S., Huang, Y., and Ho, W.K.K., 2001. Preparation of Flavanol-Rich Green Tea Extract by Precipitation With AlCl₃, Journal of the Science of Food and Agriculture, 81, 1034-1038.
- Chou, C., Lin, L., and Chung, K., 1999. Antimicrobial Activity of Tea as Affected by The Degree of Fermentation and Manufacturing Season, International Journal of Food Microbiology, 48, 125-130.
- Chou, T.M., and Benowitz, N.L., 1994. Caffeine and Coffee: Effects on Health and Cardiovascular Disease, Comparative Biochemistry and Physiology, 109, 173- 189.
- Clifford, T., 1999. Fundamentals of Supercritical Fluids, Oxford Science Publications, Chapter 5, NewYork.
- Cordell, G., Lemos, T. L. G., Monte, F. J. Q., and De Mattos, M. C., 2007. Vegetables as Chemical Reagents, Journal of Natural Products, 70, 478-492.
- Çalıkoğlu, E., ve Bayrak, A., 2009. Çay İşleme Sırasında Aroma Maddelerindeki Değişim, Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara

- Çalimli, A., 2003. Kayısı ve Vişne Suyu Üretimindeki Atıkların Değerlendirilmesi, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu, Ankara, 96.
- Çaykur Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğü, 2009. Çay Sektörü Raporu, Rize.
- Demir, A., 2002. Çay Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü -Bakış, 1, 1-4.
- Demirbaş A., 1999. Physical Properties of Briquettes from Waste Paper and Wheat Straw Mixtures, Energy Conversion and Management, 40, 437-445.
- Dinçer, S., Akgün, N., Akgün, M., ve Akgerman, A., 1998. An Overview of Supercritical Fluid Extraction, Proc., World Conference and Exhibition on 134 Oilseed and Edible Oils Processing: Emerging Technologies, Current Practices, Quality Control, Technology Transfer and Environmental Issues, 235-242.
- Dong, J., Yea, J., Lub, J., Zhenga, X., and Liang, Y.R., 2011. Isolation of Antioxidant Catechins From Green Tea and Its Decaffeination, Food and Bioproducts Processing, 89, 62-66.
- Dufresne, C.J., and Farnworth, E.R., 2001. A Review of Latest Research Findings on The Health Promotion Properties of Tea, Journal of Nutritional Biochemistry, 12, 404-421.
- Dulloo, A.G., Duret, C., Rohrer, D., and Girardier, L., 1999. Efficacy of A Green Tea Extract Rich In Catechin Polyphenols and Caffeine In Increasing 24-h Energy Expenditure and Fat Oxidation In Humans, American Journal of Clinical Nutrition, 70, 1040-1045.
- El-Shahawi, M.S., Hamza, A., Bahaffi, S.O., Al-Sibaai, A.A., and Abduljabbar, T.N., 2012. Analysis of Some Selected Catechins and Caffeine In Green Tea by High Performance Liquid Chromatography, Food Chemistry, 134, 2268-2275.
- Endale, A., Kammerer, B., Gebre-Mariam, T. and Schmidt, P. C., 2005. Quantitative Determination of the Group of Flavonoids and Saponins from the Extracts of the Seeds of *Glinus Lotoides* and Tablet Formulation There of by High-Performance Liquid Chromatography, Journal of Chromatography A, 1083, 32-41.
- Erkoç, Ş., Erkoç, F., ve Keskin, N., 2003. Theoretical Investigation of Quercetin and Its Radical Isomers, Journal of Molecular Structure, 631, 141-146.
- Esfandiari, A., and Kelley, P., 2005. The Effects of Tea Polyphenolic Compounds On Hair Loss Among Rodents, Journal of the National Medical Association, 97, 816-818.
- Eskenzai, B., 1999. Caffeine-Filtering The Facts, The New England Journal of Medicine, 341, 1688-1689.
- Fabre, N., Rustan, I., Hoffmann, D.E., and Quetin-Leclercq, J., 2001. Determination Of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry, Journal of American Society Mass Spectrometry, 12, 707-715.

- Fang, Z., Zhang, M., and Wang, L., 2007. HPLC-DAD-ESI-MS Analysis of Phenolic Compounds in Bayberries, Food Chemistry, 100, 845-852.
- FAO, The State Of Food and Agriculture, <http://www.fao.org7docrep/013/i2050e/i2050e.pdf>, 15.12.2014.
- Fernández, P.L., López, A., Pablos, F., González, A.G., and Martín, M.J., 2003. The Use of Catechins and Purine Alkaloids as Descriptors For The Differentiation Of Tea Beverages, Microchimica Acta, 142, 79-84.
- Ghodake, H.M., Goswami, T.K., and Chakraverty, A., 2006. Mathematical Modelling of Withering Characteristics of Tea Leaves, Drying Technology, 24, 159-164.
- Goodarznia, I., and Govar, A.A., 2009. Superheated Water Extraction of Catechins from Green Tea Leaves: Modeling and Simulation, Scientia Iranica, 16, 2, 99-107.
- Goto, T., Yoshida, Y., Kiso, M., and Nagashima, H. 1996. Simultaneous Analysis of Individual Catechins and Caffeine In Green Tea, Journal of Chromatography A, 749, 295-299.
- Gramza, A., and Korczak, J., 2005. Tea Constituents (*Camellia sinensis* L.) as Antioxidants In Lipid Systems, Trends in Food Science and Technology, 16, 351-358.
- Gramza, A., Khokhar, S., Yoko, S., Gliszczynska-Swiglo, A., Hes, M., and Korczak, J., 2006. Antioxidant Activity of Tea Extracts In Lipids and Correlation With Polyphenol Content, European Journal of Lipid Science and Technology, 108, 351-362.
- Gulati, A., Rawat, R., Singh, B., and Ravindranath, S.D., 2003. Application of Microwave Energy In The Manufacture of Enhanced-Quality Green Tea, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 4764-4768.
- Häkkinen, S., 2000. Flavonols and Phenolic Acids in Berries and Berry Products, Kuopio University Publications, D. Medical Sciences, 221, 90.
- Halder, B., Pramanick, S., Mukhopadhyoy, S., and Giri, A.K., 2005. Inhibition of benzo[*a*]pyrene induced Mutagenicity and Genotoxicity Multiple Test Systems, Food and Chemical Toxicology, 43, 591-597.
- Han, C., 1997. Screening of Anticarcinogenic Ingredients In Tea Polyphenols, Cancer Letters, 114, 153-158.
- Harborne, J.B., 1993. Introduction to Ecological Biochemistry (4th edn), Academic Press, 316.
- Haslam, E., 2003. Thoughts on Thearubigins, Phytochemistry, 64, 61-73.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., and Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships, Journal of Nutritional Biochemistry, 13, 572-584.

- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., and Katan, M. B., 1992. Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of Vegetables and Fruits Commonly Consumed in the Netherlands, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, 2379-2383.
- Hewavitharanage, H., Karunaratne, S., and Kumar, N. S., 1999. Effect of Caffeine on Shot-Hole Borer Beetle (*Xyleborus fornicatus*) of Tea (*Camellia sinensis*), Phytochemistry, 51(1), 35-41.
- Higginson, J., 1966. Etiological Factors In Gastrointestinal Cancer In Man, Journal of the National Cancer Institute, 37, 527-545.
- Hsu, S., Bollag, W. B., Lewis, J., Huang, Q., Singh, B., Sharawy, M., Yamamoto, and T., Schuster, G., 2003. Green Tea Polyphenols Induce Differentiation and Proliferation in Epidermal Keratinocytes, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 306, 29-34.
- Hu, J., Zhou, D., and Chen, Y., 2009. Preparation and Antioxidant Activity of Green Tea Extract Enriched in Epigallocatechin (EGC) and Epigallocatechin Gallate (EGCG), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 1349-1353.
- Huang, K., Wu, J., Chu, Y., Lai, Y., and Chang, C., 2007. Designed Polar Cosolvent-Modified Supercritical CO₂ Removing Caffeine from and Retaining Catechins in Green Tea Powder Using Response Surface Methodology, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 9014-9020.
- İçen, H. ve Gürü, M., 2010. Effect of Ethanol Content on Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Caffeine From Tea Stalk and Fiber Wastes, The Journal of Supercritical Fluids, 55,156-160.
- Jaziri, I., Slama, M.B., Mhadhbi, H., Urdaci, M., and Hamdi, M., 2009. Effect of Green and Black Teas (*Camellia sinensis* L.) on The Characteristic Microflora of Yoğurt During Fermentation and Refrigerated Storage, Food Chemistry, 112, 614-620.
- Jimenez, A.M., Murcia, M.A., Parras, P., and Martinez-Tome, M., 2008. On The Importance of Adequately Choosing The Ingredients of Yogurt and Enriched Milk For Their Antioxidant Activity, International Journal of Food Science and Technology, 43, 1464-1473.
- Ju, J., Lu, G., Lambert, J.D., and Yang, C.S., 2007. Inhibition of Carcinogenesis by Tea Constituents, Seminars in Cancer Biology, 17, 395-402.
- Juneja, L.R., Chu, D., Okubo, T., Nagato, Y., and Yokogoshi, H., 1999. L-theanine-a Unique Amino Acid of Green Tea and Its Relaxation Effect In Humans, Trends in Food Science and Technology, 10, 199-204.
- Kaçar, B., 1987. Çayın Biyokimyası ve İşleme Teknolojisi. Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğü, Çay-Kur Yayını, No:6, 329 s., Ankara.
- Kaçar, B., 1992. Yapraktan Bardağa, T.C. Ziraat Bankası Kültür Yayınları, No:23, 441 s., Ankara.

- Kader, F., Rove, B., Girardin, M. ve Metche, M., 1996. Fractionation and Identification of the Phenolic Compounds of Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum*, L.), Food Chemistry, 55, 1, 35-40.
- Karadeniz, B. ve Koca, İ., 2009. Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Turkish Black Tea Manufactured with Orthodox Method, Asian Journal Of Chemistry, 21, 6803-6810.
- Kelemen, K., Kiesecker, C., and Zitron, E., 2004. Green Tea Flavonoid Inhibits “Humanether- Gogo Related Gene” (HERG) Potassium Channels, Paper Presented At: Heart Rhythm Society’s 25th Annual Scientific Sessions, San Francisco, California.
- Kim, K.-H., Tsao, R., Yang, R. and Cui, S. W., 2006. Phenolic Acid Profiles and Antioxidant Activities of Wheat Bran Extracts and the Effect of Hydrolysis Conditions, Food Chemistry, 95, 466-473.
- Kim, W., Kim, J., and Oh, S., 2007. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Caffeine from Korean Green Tea, Separation Science and Technology, 42, 3229–3242.
- Koyama, Y., Abe, K., Sano, Y., Ishizaki, Y., Njelekela, M., Shoji, Y., Hara, Y., and Isemura, M., 2004. Effects of Green Tea on Gene Expression of Hepatic Gluconeogenic Enzymes In Vivo, Planta Medica, 70, 1100-1102.
- Kuo, K., Weng, M., Chiang, C., Tsaj, Y., Lin-Shiau, S., and Lin, J., 2005. Comparative Studies On The Hypolipidemic and Growth Suppressive Effects of Oolong, Black, Pu-erh, and Green Tea Leaves In Rats, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 480-489.
- Kuo, P.L., and Lin, C.C., 2003. Green Tea Constituent (-)-epigallocatechin-3-gallate Inhibits Hep G2 Cell Proliferation and Induces Apoptosis Through p53-dependent and Fas-mediated Pathways, Journal of Biomedical Science, 10, 219-227.
- Kuo, Y.C., Yu, C.L., Liu, C.Y., Wang, S.F., Pan, P.C., Wu, M.T., Ho, C.K., Lo, Y.S., Li, Y., and Christiani, D.C., 2009. A Population-Based, Case-Control Study of Green Tea Consumption and Leukemia Risk In Southwestern Taiwan, Cancer Causes Control, 20,1, 57–65.
- Kuroda, Y., and Hora, Y., 1999. Antimutagenic and Anticarcinogenic Activity Of Tea Polyphenols, Mutation Research, 436, 69-97.
- Lai, S., Lee, W., Chang, Y., and Liaw, W., 2008. Preparative Isolation of Catechins from Green Tea Powders Using Intermediate Polar Adsorbent, Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 32, 293-311.
- Lambert, J.D., Hong, J., Yang, G., Liao, J., and Yang, C.S., 2005. Inhibition of Carcinogenesis by Polyphenols: Evidence From Laboratory Investigations, American Journal of Clinical Nutrition, 81,1, 284-291.
- Lee, R.A., and Balick, M.J., 2006. RX: Caffeine, Ethnomedicine, 2, 55-59.

- Lepilleur, C., Beckman, E.J., Schonemann, H. and Krukonis, V.J., 1997. Effect of Molecular Architecture on the Phase Behavior of Fluoroether-Functional Graft Copolymers in Supercritical CO₂, Fluid Phase Equilibria, 134, 285- 305.
- Leung, L.K., Su, Y., Chen, R., Zhang, Z., Huang, Y., and Chen, Z., 2001. Theaflavins in Black Tea and Catechins in Green Tea are Equally Effective Antioxidants, Journal of Nutrition, 131, 2248-2251.
- Liang, H., Liang, Y., Dong, J., Lu, J., Xu, H., and Wang, H., 2007. Decaffeination of Fresh Green Tea Leaf (*Camellia Sinensis*) by Hot Water Treatment, Food Chemistry, 101, 1451-1456.
- Lin, Y.L., Juan, I.M., Chen, Y.L., Liang, Y.C., and Lin, J.K., 1996. Composition of Polyphenols In Fresh Tea Leaves and Associations Of Their Oxygen-Radicalabsorbing Capacity With Antiproliferative Actions In Fibroblast Cells, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 1387-1394.
- Lin, Y.S., Tsai, Y.J., Tsay, J.S., and Lin, J.K., 2003. Factors Affecting The Levels of Tea Polyphenols and Caffeine In Tea Leaves, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 1864–1873.
- Liu, Z., Ma, L., Zhou, B., Yang, L., and Liu, Z., 2000. Antioxidative Effects of Green Tea Polyphenols On Free Radical Initiated and Photosensitized Peroxidation of Human Low Density Lipoprotein, Chemistry and Physics of Lipids, 106, 53-63.
- Lopez, S.J., Thomas, J., Pius, P.K., Kumar, R.R., and Muraleedharan, N., 2005. A Reliable Technique to Identify Superior Quality Clones From Tea Germplasm, Food Chemistry, 91, 771-778.
- Łuczaj, W., and Skrzydlewska, E., 2005. Antioxidative Properties of Black Tea, Preventive Medicine, 40, 910-918.
- Mann, C.D., Neal, C.P., Garcea, G., Manson, M.M., Dennison, A.R., and Berry, D.P., 2009. Phytochemicals as Potential Chemopreventive and Chemotherapeutic Agents In Hepatocarcinogenesis, European Journal of Cancer Prevention, 18(1), 13-25.
- Matsui, Y., 2004. The Origin of Oolong Tea, International Conference on O-CHA(tea) Culture and Science, 669-672.
- Mazzafera, P., Croziera, A., and Magalhães, A.C., 1991. Caffeine Metabolism in *Coffea Arabica* and Other Species of Coffee, Phytochemistry, 30,12, 3913-3916.
- McHugh, M.A., and Krukonis, V.J., 1986. Supercritical Fluid Extraction, Butterworths, Boston/USA.
- McKay, D.L., and Blumberg, J.B., 2002. The Role of Tea In Human Health: An Update, Journal of the American College of Nutrition, 21, 1-13.
- Mehra, A., and Baker, C.L., 2007. Leaching and Bioavailability of Aluminium, Copper and Manganese From Tea (*Camellia sinensis*), Food Chemistry, 100, 1456-1463.

- Mello, L.D., Alves, A.A., Macedo, D.V., and Kubota, L.T., 2005. Peroxidase-Based Biosensor As A Tool For A Fast Evaluation Of Antioxidant Capacity Of Tea, Food Chemistry, 92, 515-519.
- Mizukami, Y., Sawai, Y., and Yamaguchi, Y., 2006. Moisture Content Measurement of Tea Leaves By Electrical Impedance and Capacitance, Biosystems Engineering, 93, 293-299.
- Mukhopadhyay, M., 2000. Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide, CRC Press.
- Muthumani, T., and Senthil-Kumar, R.S., 2007a. Studies on Freeze-Withering In Black Tea Manufacturing, Food Chemistry, 101, 103-106.
- Muthumani, T., and Senthil-Kumar, R.S., 2007b. Influence of Fermentation Time On The Development Of Compounds Responsible For Quality In Black Tea, Food Chemistry, 101, 98-102.
- Naczka, M., and Shahidi, F., 2004. Extraction and Analysis of Phenolics in Food, Journal of Chromatography A, 1054, 95-111.
- Nakai, M., Fukui, Y., Asami, S., Toyoda-Ono, Y., Iwashita, T., Shibata, H., Mitsunaga, T., Hashimoto, F., and Kiso, Y. 2005. Inhibitory Effects of Oolong Tea Polyphenols On Pancreatic Lipase In Vitro, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 4593-4598.
- Nance, C.L., and Shearer, W.T., 2003. Is Green Tea Good For HIV-1 Infection?, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 112, 851-853.
- Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, M., Sakai, M., and Hara, Y., 1996. Scavenging Effects of Tea Catechins and Their Derivatives On 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl Radical, Free Radical Biology and Medicine, 21, 895-902.
- Navas, P.B., Carrasquero-Durán, A., and Flores, I., 2006. Effects of Black Tea, Garlic and Onion On Corn Oil Stability and Fatty Acid Composition Under Accelerated Oxidation, International Journal of Food Science and Technology, 41, 243-247.
- Nishitani, E., and Sagesaka, Y.M., 2004. Simultaneous Determination of Catechins Caffeine and Other Phenolic Compounds In Tea Using New HPLC Method, Journal of Food Composition and Analysis, 17, 675-685.
- Noon, S. M., 2007. Mass Transfer Of Near Critical Carbon Dioxide In Poly (Methyl Methacrylate), The Ohio State University, 35.
- Nurminen, M.L., Niittynen, L., Korpela, R., and Vapaatalo, H., 1999. Coffee, Caffeine and Blood Pressure, European Journal of Clinical Nutrition, 53, 831-839.
- O'Connell, J.E., and Fox, P.F., 1999. Proposed Mechanism For The Effect of Polyphenols On The Heat Stability Of Milk, International Dairy Journal, 9, 523-536.

- Oakes, R.S., Clifford, A.A., and Rayner, C.M., 2001. The Use Of Supercritical Fluids In Synthetic Organic Chemistry, Journal of Chemical Society, 1, 917-941.
- Obanda, M., Owuor, P.O., and Mang'oka, R., 2001. Changes In The Chemical and Sensory Quality Parameters Of Black Tea Due to Variations Of Fermentation Time and Temperature, Food Chemistry, 75, 395-404.
- Obanda, M., Owuor, P.O., Mang'oka, R., and Kavoi, M.M., 2004. Changes In Thearubigin Fractions and Theaflavin Levels Due To Variations In Processing Conditions and Their Influence On Black Tea Liquor Brightness And Total Colour, Food Chemistry, 85, 163-173.
- Owuor, P.O., and Obanda, M., 2007. The Use Of Green Tea (*Camellia Sinensis*) Leaf Flavan-3-Ol Composition In Predicting Plain Black Tea Quality Potential, Food Chemistry, 100, 873-884.
- Owuor, P.O., Obanda, M., Nyirenda, H.E., Mphangwe, N.I.K., Wright, L.P., and Apostolides, Z., 2006. The Relationship Between Some Chemical Parameters And Sensory Evaluations For Plain Black Tea (*Camellia Sinensis*) Produced In Kenya And Comparison With Similar Teas From Malawi And South Africa, Food Chemistry, 97, 644-653.
- Özdemir, F., Nas, S. ve Gökalp, H.Y., 1993. Siyah Çay İmalatında Farklı Kıvrırma Metodlarının Üç Sürgün Dönemi Çayın İşlenmesi Üzerindeki Etkinliği Ve Üretilen Siyah Çayların Bazı Karakteristik Özellikleri, Ekonomik ve Teknik Dergi Standart, 376, 46-50.
- Özden, D., 2009. Türkiye Siyah Çay Sektör Raporu, Avrupa İşletmeleri Ağı.
- Özkal, S.G., Salgın, U., ve Yener, M.E., 2005. Supercritical Carbon Dioxide Extraction Of Hazelnut Oil, Journal of Food Engineering, 69, 217-223.
- Park, H., Lee, H., Shin, M., Lee, K., Lee, H., Kim, Y., Kim, K. and Kim, K., 2007. Effects Of Cosolvents On The Decaffeination Of Green Tea By Supercritical Carbon Dioxide, Food Chemistry, 105, 1011-1017.
- Park, H., Im, N., and Kim, K., 2011. Extraction Behaviors of Caffeine and Chlorophylls In Supercritical Decaffeination of Green Tea Leaves, Food Science and Technology, 45, 73-78.
- Perva-Uzunalić, A., Škerget, M., Knez, Ž., Weinreich, B., Otto, F., and Grüner, S., 2006. Extraction Of Active Ingredients From Green Tea (*Camellia Sinensis*): Extraction Efficiency Of Major Catechins And Caffeine, Food Chemistry, 96, 597-605.
- Peterson, J., Dwyer, J., Jacques, P., Prior, R., and Chui, K., 2004. Tea Variety And Brewing Techniques Influence Flavonoid Content Of Black Tea, Journal of Food Composition and Analysis, 17, 397-405.
- Pietta P.G., 2000. Flavonoids As Antioxidants, Journal of Natural Products, 63, 1035-1042.

- Proestos, C., Boziaris, I.S., Nychas, G.J.E., and Komaitis, M., 2006. Analysis Of Flavonoids And Phenolic Acids In Greek Aromatic Plants: Investigations Of Their Antioxidant Capacity And Antimicrobial Activity, Food Chemistry, 95, 664-671.
- Raven, P., Evert, R., and Eichorn, S., 1999. Biology of Plants (6th ed.). NY: W.H. Freeman and company, pp. 944, New York.
- Ravichandran, R., 2004. The Impact Of Pruning And Time From Pruning On Quality And Aroma Constituents Of Black Tea, Food Chemistry, 84, 7-11.
- Ravichandran, R., and Parthiban, R., 1998b. The Impact Of Mechanization Of Tea Harvesting On The Quality Of South Indian CTC Teas, Food Chemistry, 63, 61-64.
- Reverchon, E., and Marco, I.D., 2006. Supercritical Fluid Extraction And Fractionation Of Natural Matter, Journal of Supercritical Fluids, 38, 146-166.
- Rise-Evans, C., and Packer, L., 1998. Flavonoids in Health and Disease, Marcel-Dekker, New York.
- Robertson, A., 1983. Effects Of Catechin Concentration On The Formation Of Black Tea Polyphenols During *In Vitro* Oxidation, Phytochemistry, 22, 897-903.
- Row, K.H., and Jin, Y., 2006. Recovery of Catechin Compounds From Korean Tea by Solvent Extraction, Bioresource Technology, 97, 790-793.
- Rusak, G., Komes, D., Likic', S., Horz'ic', D., and Kovac', M., 2007. Phenolic Content and Antioxidative Capacity of Green and White Tea Extracts Depending on Extraction Conditions and The Solvent Used, Food Chemistry, 110, 852-858.
- Sanal, S., 2004. Süperkritik CO₂ ile Kayısı Posasından B-Karoten Ekstraksiyonu, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Sang, S., Yang, C.S., and Ho, C., 2004. Peroxidase-Mediated Oxidation Of Catechins, Phytochemistry Reviews, 3, 229-241.
- Saravanan, M., Maria John, K.M., Raj Kumar, R., Pius, P.K., and Sasikumar, R., 2005. Genetic Diversity Of UPASI Tea Clones (*Camellia Sinensis* (L.) O. Kuntze) On The Basis Of Total Catechins And Their Fractions, Phytochemistry, 66, 561-565.
- Satoh, E., Tohyama, N., and Nishimura, M., 2005. Comparison Of The Antioxidant Activity Of Roasted Tea With Green, Oolong, And Black Teas, International Journal of Food Sciences and Nutrition, 56, 551-559.
- Senanayake, N., 2013. Green Tea Extract: Chemistry, Antioxidant Properties And Food Applications – A Review, Journal of Functional Foods, 5, 1529-1541, USA.
- Sihvonen, M., Järvenpää, E., Hietaniemi, V., and Huopalahti, R., 1999. Advances In Supercritical Carbon Dioxide Technologies, Trends in Food Science & Technology, 10, 217-222.

- Skoog, D.A., James Holler, F., and Nieman, T.A., 1998. Principles of Instrumental Analysis, Fifth Edition, Kılıç, E., Köseoğlu, F., ve Yılmaz, H., Saunders College Publishing, USA, Bilim Yayıncılık, Ankara.
- Song, J.M., Lee, K.H., and Seong, B.L., 2005. Antiviral Effect Of Catechins İn Green Tea On İnfluenza Virus, Antiviral Research, 68, 66-74.
- Spacil, Z., Novakov, L., and Solich, P., 2008. Analysis of Phenolic Compounds by High Performance Liquid Chromatography and Ultra Performance Liquid Chromatography, Talanta, 76 189-199.
- Stewart, A.J., Mullen, W., and Crozier, A., 2005. On-Line High-Performance Liquid Chromatography Analysis Of The Antioxidant Activity Of Phenolic Compounds İn Green And Black Tea, Molecular Nutrition and Food Research, 49, 52-60.
- Sun, Y.P., 2002. Supercritical Fluid Technology in Materials Science and Engineering: Syntheses, Properties, and Applications, New York, USA.
- Sun, Q., Hua, S., Ye, J., Lu, J., Zheng, X., and Liang Y., 2010. Decaffeination of Green Tea by Supercritical Carbon Dioxide, Journal of Medicinal Plants Research, 4, 1161-1168.
- Sunol, A.K. and Beyer, G.H., 1990. Mechanism of Supercritical Extraction of Coal, Industrial & Engineering Chemistry Research, 29, 842-849
- Suschetet, M., Siess, M. H., Le Bon, A. M., and Canivenc Lavier, M. C., 1998. INRA Edition, Polyphenols, 166-204, Paris.
- Tang, Y. and Meydani, M., 2001. Green Tea Catechins and Vitamin E Inhibit Angiogenesis of Human Microvascular Endothelial Cells Through Suppression of IL-8 Production, Nutrition and Cancer, 41, 119-125.
- Taylor, L.T., 1996. Supercritical Fluid Extraction, A Wiley-Interscience Publication, New York.
- Tomlins, K.I., and Mashingaidze, A., 1997. Influence Of Withering, Including Leaf Handling, On The Manufacturing And Quality Of Black Teas-A Review, Food Chemistry, 60, 573-580.
- URL-1, <http://www.mnecevre.com/cay-atiklarinin-degerlendirilmesi-2>. 15 Şubat 2014
- URL-2, <http://www.upasiteareserach.org/chemistry-of-tea/>. 22 Ekim 2014
- URL-3, www.abc.net.au/quantum/poison/caffeine/about.htm. 9 Kasım 2014
- URL-4, <http://www.amazing-green-tea.com/catechins.html>. 15 Kasım 2011
- URL-5, <http://www.researchandmarkets.com/reports/596464/>. 4 Şubat 2011
- URL-6, http://www.boyutltd.com.tr/?page_id=639. 20 Aralık 2014

- URL-7, <http://www.tags-search.com/hplc-instrumentation/tag.html>. 30 Aralık 2014
- Usta, H., 2005. Çay Sektör Profil Araştırması, İstanbul Ticaret Odası, İstanbul.
- Varilek, G.W., Yang, F., Lee, E.Y., Villiers, W.J.S., Zhong, J., Oz, H.S., Westberry, K.F., and McClain, C.J., 2001. Green Tea Polyphenol Extract Attenuates İnflammation In Interleukin-2-Deficient Mice, A Model Of Autoimmunity, Journal of Nutrition, 131, 2034-2039.
- Vergote, D., Cren-Olive, C., Chopin, V., Toillon, R. A., Rolando, C., Hondermarck, H., and Bourhis, X. L., 2002. (-)-Epigallocatechin (EGC) Of Green Tea Induces Apoptosis Of Human Breast Cancer Cells But Not Of Their Normal Counterparts, Breast Cancer Research and Treatment, 76, 195–201.
- Vermerris, W., and Nicholson, R., 2006. Phenolic Compound Biochemistry, Springer, The Netherlands.
- Vinson, J.A., 2000. Black And Green Tea And Heart Disease: A Review, Biofactors, 13, 127- 132.
- Vovk, I., Simonovska, B. and Vuorela, H., 2005. Separation of Eight Selected Flavan-3-ols on Cellulose Thin-Layer Chromatographic Plates, Journal of Chromatography-A, 1077, 188-194.
- Vuong, Q., Golding, J., Nguyen, M. and Roach. P., 2010. Extraction and Isolation of Catechins From Tea, Journal of Separation Science and Technology, 33, 3415-3428.
- Vyas, D., and Kumar, S., 2005. Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) Clone With Lower Period Of Winter Dormancy Exhibits Lesser Cellular Damage In Response To Low Temperature, Plant Physiology and Biochemistry, 43, 383-388.
- Waller, G.R., 1989. Biochemical Frontiers Of Allelopathy, Biology of Plants, 31, 418-447.
- Wanasundara, U.N., and Shahidi, F., 1998. Antioxidant And Prooxidant Acitivity Of Green Tea Extracts In Marine Oils, Food Chemistry, 63, 335-342.
- Wang, D., Kubota, K., Kobayashi, A., and Juan, I.M., 2001. Analysis Of Glycosidically Bound Aroma Precursors In Tea Leaves. 3. Change In The Glycoside Content Of Tea Leaves During The Oolong Tea Manufacturing Process, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 5391-5396.
- Wang, H., and Helliwell, K., 2000. Epimerisation Of Catechins In Green Tea İnfusions, Food Chemistry, 70, 337-344.
- Wang, H., Provan, G.J., and Helliwell, K., 2000. Tea Flavonoids: Their Functions, Utilisation and Analysis, Trends in Food Science and Technology, 11, 152-160.
- Wang, H.F., Tsai, Y.S., Lin, M.L., and Ou, A.S., 2006. Comparison of Bioactive Components in GABA Tea and Green Tea Produced in Taiwan, Food Chemistry, 96, 648-653.

- Wang, K., Liu, Z., Huang, J., Fu, D., Liu, F., Gong, Y., and Wu, X., 2009. TLC Separation of Catechins and Theaflavins on Polyamide Plates, Journal of Planar Chromatography, 2, 97-100.
- Wang, K., Liu, F., Liu, Z., Huang, J., Xu, Z., Li, Y., Chen, J., Gong, Y. and Yang, X., 2011. Comparison of Catechins and Volatile Compounds Among Different Types of Tea Using High Performance Liquid Chromatograph and Gas Chromatograph Mass Spectrometer, International Journal of Food Science & Technology, 46, 1406-1412.
- Weisburger, J.H., and Chung, F.L., 2002. Mechanisms Of Chronic Disease Causation By Nutritional Factors And Tobacco Products And Their Prevention By Tea Polyphenols, Food Chemical Toxicology, 40, 1145-1154.
- Wheeler, D.S., and Wheeler, W.J., 2004. The Medicinal Chemistry Of Tea, Drug Development Research, 61, 45-65.
- Wollgast, J., and Anklam, E., 2000. Review On Polyphenols In Theobroma Cacao: Changes In Composition During The Manufacture Of Chocolate And Methodology For Identification And Quantification, Food Research International, 33, 423-347.
- Wright, L.P., Mphangwe, N.I., Nyirenda, H.E., and Apostolides, Z., 2000. Analysis Of Caffeine And Flavan-3-Ol Composition In The Fresh Leaf Of *Camellia Sinensis* For Predicting The Quality Of The Black Tea Produced In Central And Southern Africa, Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, 1823-1830.
- Wright, L.P., Mphangwe, N.I.K., Nyirenda, H.E., and Apostolides, Z., 2002. Analysis Of The Theaflavin Composition In Black Tea (*Camellia Sinensis*) For Predicting The Quality Of Tea Produced In Central And Southern Africa, Journal of the Science of Food and Agriculture, 82, 517-525.
- Wu, Q., Wang, M., and Simon, J.E., 2004. Analytical Methods to Determine Phytoestrogenic Compounds, Journal of Chromatography B, 812, 325-355.
- Yamada, H., Okashi, K., Atsumi, T., Okabet, H., Shimizu, T., Nishio, S., Li, X.D., Kosuge, K., Watanabe, H., and Hara, Y., 2003. Effects Of Tea Catechin Inhalation On Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* In Elderly Patients In A Hospital Ward. Journal of Hospital Infection, 53, 229-231.
- Yang, C.S., Lambert, J.D., Ju, J., Lu, G., and Sang, S., 2007. Tea An Cancer Prevention: Molecular Mechanisms And Human Relevance, Toxicology and Applied Pharmacology, 224, 265-273.
- Yao, L., Jiang, Y., Datta, N., Singanusong, R., Liu, X., Duan, J., Raymont, K., Lisle, A., and Xu, Y., 2004. HPLC Analyses Of Flavanols And Phenolic Acids In The Fresh Young Shoots Of Tea (*Camellia Sinensis*) Grown In Australia, Food Chemistry, 84, 253-263.
- Yao, L., Jiang, Y., Datta, N., Singanusong, R., Liu, X., Duan, J., Raymont, K., Lisle, A., and Xu, Y., 2004. HPLC Analyses Of Flavanols And Phenolic Acids In The Fresh Young Shoots Of Tea (*Camellia Sinensis*) Grown In Australia, Food Chemistry, 84, 253-263.

- Yao, L., Liu, X., Jiang, Y., Caffin, N., D'Arcy, B., Singanusong, R., Datta, N., and Xu, Y., 2006a. Compositional Analysis Of Teas From Australian Supermarkets, Food Chemistry, 94, 115-122.
- Ye, J., Wang, L., Chen, H., Dong, J., Lu, J., Zheng, X., Wu, M., and Liang, Y., 2011. Preparation of Tea Catechins Using Polyamide, Journal of Bioscience and Bioengineering, 111, 2, 232-236.
- Yilmaz, Y., 2006. Novel Uses Of Catechins In Foods, Trends in Food Science and Technology, 17, 64-71.
- Yoshida, Y., Kiso, M., and Goto, T., 1999. Efficiency Of The Extraction Of Catechins From Green Tea, Food Chemistry, 67, 429-433.
- Zandi, P., and Gordon, M.H., 1999. Antioxidant Activity Of Extracts From Old Tea Leaves, Food Chemistry, 64, 285-288.
- Zhan, Z., and Xu, B., 2004. The Origin Of Oolong Tea, International Conference on OCHA (Tea) Culture And Science, 673-675, Shizuoka, Japan.
- Zhen, Y., 2002. Tea: Bioactivity And Therapeutic Potential, Taylor and Francis, London.
- Zhu, Y., Huang, H., and Tu, Y., 2006. A Review Of Recent Studies In China On The Possible Beneficial Effects Of Tea, International Journal of Food Science and Technology, 41, 333-340.
- Zuo, Y., Chen, H., and Deng, Y., 2002. Simultaneous Determination Of Catechins, Caffeine And Gallic Acids In Green, Oolong, Black And Pu-Erh Teas Using HPLC With A Photodiode Array Detector, Talanta, 57, 307-316.

ÖZGEÇMİŞ

1985 Yılında Afyonkarahisar'da doğdu. 2003 Yılında Tevfik Serdar Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 2005 Yılında birincilikle kazandığı Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü'nden üçüncülükle mezun olarak Kimyager ünvanını aldı. 2010 Yılında yüksek lisans yapmadan doğrudan doktora programına başladı. 2011-2012 Öğrenim yılında Erasmus öğrenci değişim programıyla Çek Cumhuriyeti'nin Ceske Budejovice şehrindeki Güney Bohemia Üniversitesi'nde doktora tezinin bir kısmını yürüttü ve HPLC kullanım sertifikasını aldı. 2012 Yılında Çin Halk Cumhuriyeti'nin Changsha şehrindeki Hunan Ziraat Üniversitesinde doktora tezinin bazı çalışmalarını yürüttü. Doktora yaptığı 2010-2015 yılları süresince SAN-TEZ projesinde bursiyer olarak çalıştı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.