

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**FARKLI SINIF ÇAYLARDA KIVIRMA PROSESLERİNİN VE DEĞİŞİK
HASAT DÖNEMLERİNİN ÇAYIN FENOLİK MADDE VE ALKALOİD
BİLEŞİMİNE ETKİSİ**

Nihal TÜRKMEN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2007**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

FARKLI SINIF ÇAYLARDA KIVIRMA PROSESLERİNİN VE DEĞİŞİK HASAT DÖNEMLERİNİN ÇAYIN FENOLİK MADDE VE ALKALOİD BİLEŞİMİNE ETKİSİ

Nihal TÜRKMEN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sedat VELİOĞLU

Farklı hasat döneminde (Mayıs, Temmuz ve Eylül) toplanmış ve farklı kıvrırma yöntemine (Yöntem I ve II) göre işlenmiş 7 (1-7.sınıf) sınıf çayın fenolik madde ve alkaloid bileşikleri tarafımızdan geliştirilen bir HPLC yöntemi ile belirlenmiş ve incelenen parametrelerin bu bileşiklerin miktar ve dağılımı üzerine etkisi ortaya konulmuştur. Fenolik madde ve alkaloid bileşiklerin analizi için, öncelikle bu bileşiklerin çaydan ekstrakte edilmesi amacıyla en uygun ekstraksiyon yöntemi belirlenmiştir. Ayrıca, spektrofotometrik olarak çaylarda toplam fenolik madde analizi gerçekleştirilmiştir.

İncelenen örneklerde, alkaloid olarak kafein (17.51-26.26 mg/g) ve teobromin (0.14-0.21 mg/g) ve fenolik bileşik olarak iki kateşin: EGCG (0.25-3.16 mg/g) ve ECG (0.16-2.54 mg/g); üç flavonol glikozid: Q3RG (0.87-2.01 mg/g), Q3G (0.37-0.55 mg/g) ve K3RG (0.89-1.10 mg/g) ve dört TF bileşiği: TF-f (1.21-4.34 mg/g), TF-3-G (2.49-6.10 mg/g), TF-3'-G (1.56-3.64 mg/g) ve TF-3,3'-DG (4.19-6.12 mg/g) saptanmıştır. Sonuçlar kuru ağırlık üzerinden verilmiştir.

Çayların fenolik madde ve alkaloid içerikleri kıvrırma yöntemi, hasat dönemi ve çay sınıfından önemli ölçüde etkilenmiştir. Hasat dönemi ve işleme yöntemi açısından genellikle en yüksek fenolik madde ve alkaloid bileşik içeriği Yöntem II'ye göre üretilmiş Mayıs dönemi çaylarında belirlenmiştir, bunu sırasıyla Temmuz ve Eylül dönemi çayları izlemiştir. Sınıf farklılıklarının çayların fenolik madde ve alkaloid içerikleri üzerine etkisi ise bileşik cinsine ve yöntemine göre değişiklik göstermiştir. Genellikle, 1. 2. ve 7. sınıf çayların alkaloid, Q3G ve TF bileşiklerinin miktarı ve 4., 5. veya 6. sınıf çayların flavan-3-ol miktarı diğer çaylardan daha fazla bulunmuştur. Sınıf farklılıkları çayların Q3RG ve K3RG içeriğini etkilememiştir. İncelenen parametreler açısından benzer eğilimler çayların toplam fenolik madde miktarı (47.05-83.40 mg GAE/g ka) için de gözlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, siyah çay üretiminde kıvrırma prosesi, hasat dönemi ve çay sınıfının çayın fenolik madde ve alkaloid miktarını, dolayısıyla kalitesini belirlemede çok önemli faktörler olduğunu göstermiştir.

2007, 131 sayfa

Anahtar Kelimeler: Siyah çay, alkaloid, fenolik madde, TF, HPLC, kıvrırma, hasat, sınıf

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

THE EFFECTS OF ROLLING PROCESSES AND DIFFERENT SHOOTING PERIODS IN DIFFERENT GRADE TEAS ON PHENOLIC COMPOUND AND ALKALOID COMPOSITION OF TEA

Nihal TÜRKMEN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Sedat VELİOĞLU

Phenolic compounds and alkaloids of seven grades (1-7.) black tea which was harvested in different shooting periods (May, July and September) and processed according to different rolling methods (Method I and II) were determined using a HPLC method developed by ourselves and the effect of the parameters investigated on the amount and distribution of these compounds was shown. For the analysis of phenolics and alkaloids, first the most suitable extraction method was determined to extract these components from tea. Total phenolic analysis in teas was also performed spectrophotometrically.

In the samples investigated, caffeine (17.51-26.26 mg/ g) and theobromine (0.14-0.21 mg /g) as alkaloids and two catechins: EGCG (0.25-3.16mg/g) and ECG (0.16-2.54mg/ g); three flavanol glycosides: Q3RG (0.87-2.01 mg/g), Q3G (0.37-0.55 mg/g) and K3RG (0.89-1.10 mg/g) and four TF compounds: TF-f (1.21-4.34 mg/g), TF-3-G (2.49-6.10 mg/g), TF-3'-G (1.56-3.64 mg/g) and TF-3,3'-DG (4.19-6.12 mg/g) as phenolic compounds were detected. The results were given as dry weight.

The content of phenolics and alkaloids of teas was affected significantly by the rolling methods, shooting periods and tea grades. With respect to the shooting periods and processing methods, the highest level of phenolics and alkaloids was generally found in the teas processed by Method II in harvesting period of May followed by July and September, respectively. However, the effect of grade variations on the content of phenolics and alkaloids of teas varied depending on the compound type and the method. In general, the content of alkaloid, Q3G and TF compounds of 1st, 2nd and 7th grade teas and the content of flavan-3-ols of 4th, 5th and 6th grade teas were found more than the other teas. Grade differences did not affect the content of Q3RG and K3RG of teas. Similar trends with respect to parameters investigated were also observed for the total phenolic content of teas (47.05-83.40 mg GAE/g dw).

The results obtained from this study have showed that in manufacturing of black tea, rolling processes, harvesting periods and tea grades were very important factors determining the content of phenolics and alkaloids of tea, so its quality.

2007, 131 pages

Key Words: Black tea, alkaloid, phenolic compound, TF, HPLC, rolling, shooting, grade

TEŞEKKÜR

Bu tez konusunun belirlenmesinde ve çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Sedat VELİOĞLU'na, araştırma süresince yaptıkları değerli öneri ve katkılarından dolayı Tez İzleme Komitesi üyeleri hocalarım Prof. Dr. Nevzat ARTIK (Ankara Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü) ve Prof. Dr. Sebahattin NAS'a (Pamukkale Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü), değerli yardımlarından dolayı Doç. Dr. Ender Sinan Poyrazoğlu'na, proje kapsamında birlikte çalıştığım sevgili arkadaşım Araş. Gör. Ferda SARI'ya, çay örneklerini sağlayan başta müdür Sn. Ayhan Haznedar olmak üzere Çay Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü çalışanlarına ve desteklerinden dolayı aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından 2002-07-11-061 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

Nihal TÜRKMEN

Ankara, Mart 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1 Çay Bitkisi	3
2.2 Türkiye’de ve Dünyada Çay Üretimi ve Tüketimi.....	4
2.3 Çay Tipleri.....	5
2.3.1 Yeşil çay.....	6
2.3.2 Oolong çay.....	7
2.3.3 Siyah çay.....	9
2.3.3.1 Soldurma.....	9
2.3.3.2 Kıvrırma.....	10
2.3.3.3 Fermentasyon.....	12
2.3.3.4 Kurutma/Derecelendirme.....	13
2.4 Çayın Bileşimi.....	15
2.4.1 Çayın genel bileşimi.....	15
2.4.2 Çayın fenolik madde bileşimi.....	15
2.4.2.1 Taze çay yaprağının fenolik madde bileşimi.....	15
2.4.2.1.1 Flavan-3-ollar.....	16
2.4.2.1.2 Flavonol bileşikler.....	18
2.4.2.2 Taze çay yaprağının fenolik madde bileşimini etkileyen faktörler.....	20
2.4.2.2.1 Hasat sonrası işlem.....	20
2.4.2.2.2 Bölgesel farklılık	20
2.4.2.2.3 Mevsimsel farklılık.....	21
2.4.2.2.4 Hasat yöntemi.....	22
2.4.2.2.5 Çeşit.....	23

2.4.2.3 Taze çay yaprağında bulunan fenolik maddelerin sağlık üzerine etkileri.....	24
2.4.2.3.1 Flavan-3-ol bileşiklerin etkileri.....	24
2.4.2.3.2 Flavonol bileşiklerin etkileri.....	26
2.4.2.4 Siyah çayın fenolik madde bileşimi.....	27
2.4.2.4.1 Flavan-3-ol bileşikleri.....	27
2.4.2.4.2 Flavonol bileşikler.....	28
2.4.2.4.3 Teaflavin ve tearubijin bileşikleri.....	29
2.4.2.5 Siyah çayın fenolik madde bileşimini etkileyen faktörler.....	35
2.4.2.5.1 Soldurmanın etkisi	35
2.4.2.5.2 Kıvırma / parçalamanın etkisi.....	36
2.4.2.5.3 Fermentasyonun etkisi.....	36
2.4.2.5.4 Kurutma.....	37
2.4.2.6 Siyah çayda bulunan fenolik maddelerin sağlık üzerine etkileri	38
2.4.3 Çayda bulunan alkaloid bileşikler.....	40
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	43
3.1 Materyal.....	43
3.1.1 Araştırma materyali.....	43
3.1.2 Ekipman, kimyasal madde ve diğer malzeme.....	43
3.2 Yöntem.....	45
3.2.1 Çay örneklerinin hazırlanması.....	45
3.2.2 Fenolik maddelerin ekstraksiyonu.....	45
3.2.3 Fenolik madde ve alkaloid bileşiklerin HPLC ile analizi.....	46
3.2.4 Toplam fenolik madde tayini.....	49
3.2.4.1 Toplam fenolik madde analizi için gerekli çözeltilerin hazırlanması..	49
3.2.4.2 Kalibrasyon eğrisinin elde edilmesi.....	49
3.2.4.3 Siyah çay örneğinde toplam fenolik madde tayini.....	50
3.2.5 Çayın su ekstraktı tayini.....	50
3.2.6 İstatistik analiz.....	50
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	51
4.1 Uygun HPLC Yönteminin Saptanması.....	51
4.1.1 HPLC yönteminin geçerliliği.....	52

4.2 Siyah Çayda Fenolik Madde ve Alkaloid Bileşiklerin Tanımlanması.....	54
4.2.1 Alkaloidler.....	54
4.2.2 Flavan-3-ollar.....	55
4.2.3 Flavonol glikozidler.....	58
4.2.4 Teaflavinler.....	59
4.3 Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu.....	60
4.3.1 Ekstraksiyon tipinin belirlenmesi.....	60
4.3.2 Ekstraksiyon solventinin belirlenmesi.....	61
4.3.3 Ekstraksiyon aşama sayısının belirlenmesi.....	63
4.3.4 S:M oranının belirlenmesi.....	65
4.4 Ekstraksiyon Yönteminin Tekrarlanabilirliği.....	66
4.5 Ekstrakt Solvent Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	67
4.6 Farklı Sınıf Çayların Fenolik Madde ve Alkaloid Bileşiklerinin Kıvrırma Yöntemi ve Hasat Dönemine Göre Değişimi.....	68
4.6.1 Alkaloid bileşikler.....	68
4.6.2 Fenolik bileşikler.....	73
4.6.2.1 Flavan-3-ol bileşikleri.....	73
4.6.2.2 Flavonol glikozidler.....	80
4.6.2.3 Teaflavinler.....	85
4.7 Farklı Sınıf Çayların Toplam Fenolik Madde İçerikleri ve Bunların Kıvrırma Yöntemi ve Hasat Dönemine Göre Değişimi.....	95
5. SONUÇ.....	99
5.1 Yöntem Geliştirmeye İlişkin Sonuçlar.....	99
5.2 Örneklerin Karşılaştırılmasına İlişkin Sonuçlar.....	100
KAYNAKLAR.....	103
EKLER.....	119
EK 1 Yöntem I ve II'ye göre işlemiş Mayıs, Temmuz ve Eylül dönemine ait çay örneklerinin su ekstraktı miktarları (g/100 g KM).....	120
EK 2 Farklı yöntemle işlenmiş Mayıs dönemi 7. sınıf çaylara ait kromatogramlar.....	121
EK 3 Farklı dönemlerde Yöntem II ile işlenmiş 2. sınıf çaylara ait kromatogramlar.....	122
EK 4 Farklı dönemlerde Yöntem II ile işlenmiş 3. sınıf çaylara ait	123

	kromatogramlar.....	
EK 5	Farklı dönemlerde Yöntem II ile işlenmiş 4. sınıf çaylara ait kromatogramlar.....	124
EK 6	Farklı dönemlerde Yöntem II ile işlenmiş 5. sınıf çaylara ait kromatogramlar.....	125
EK 7	Farklı dönemlerde Yöntem II ile işlenmiş 6. sınıf çaylara ait kromatogramlar.....	126
EK 8	Farklı dönemlerde Yöntem I ile işlenmiş 2. sınıf çaylara ait kromatogramlar.....	127
EK 9	Farklı dönemlerde Yöntem I ile işlenmiş 3. sınıf çaylara ait kromatogramlar.....	128
EK10	Farklı dönemlerde Yöntem I ile işlenmiş 4. sınıf çaylara ait kromatogramlar.....	129
	ÖZGEÇMİŞ.....	130

SİMGELER DİZİNİ

C	(+)-Kateşin
EC	(-)-Epikateşin
GC	(-)-Gallokateşin
EGC	(-)-Epigallokateşin
EGCG	(-)-Epigallokateşin gallat
ECG	(-)-Epikateşin gallat
CG	(-)- Kateşin gallat
GCG	(-)-Gallokateşin gallat
GA	Gallik asit
Q3G	Kuersetin-3-glukozid
Q3RG	Kuersetin-3-ramnoglukozid (rutin)
K3RG	Kamferol-3-ramnoglukozid
TFDG	Teaflavin digallat
TFDGE	Teaflavin digallat eşdeğeri
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
H ₃ PO ₄	Fosforik asit
CH ₃ NH	Asetonitril
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
Ka	Kuru ağırlık
KM	Kuru madde
SD	Standart sapma
VK	Varyasyon katsayısı
S:M	Solvent:Materyal
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
PDA	Photodiode array
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Yeşil çay üretimi.....	6
Şekil 2.2	Kateşinlerin yapısı.....	17
Şekil 2.3	Flavonolların yapısı.....	19
Şekil 2.4	Flavonol glikozidlerin yapısı.....	19
Şekil 2.5	Teaflavinlerin yapısı.....	30
Şekil 2.6	Tearubijinlerin genel yapısı.....	30
Şekil 2.7	Teaflavinlerin oluşumu.....	33
Şekil 2.8	Alkaloidlerin kimyasal yapısı.....	41
Şekil 3.1	Farklı kıvrırma yöntemlerine göre siyah çay üretimi.....	44
Şekil 4.1	Literatürde belirtilen HPLC koşullarında elde edilen bir çay ekstraktı kromatogramı.....	51
Şekil 4.2	Yöntem II'ye göre işlenmiş Mayıs dönemi 5. sınıf siyah çay örneğine ait tipik bir HPLC kromatogramı.....	54
Şekil 4.3	Teobromin ve kafeinin PDA spektrumu.....	55
Şekil 4.4	EGCG ve ECG'ın PDA spektrumu.....	56
Şekil 4.5	Taze çay filizine (Muradiye) ait HPLC kromatogramı.....	57
Şekil 4.6	Q3RG, Q3G ve K3RG'in PDA spektrumu.....	59
Şekil 4.7	TF'lerin PDA spektrumu.....	60
Şekil 4.8	Yöntem II'ye göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda kafein içeriğinin hasat dönemine göre değişimi.....	72
Şekil 4.9	Yöntem I'e göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda teobromin içeriğinin hasat dönemine göre değişimi.....	72
Şekil 4.10	Yöntem II'ye göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda EGCG içeriğinin hasat dönemine göre değişimi.....	76
Şekil 4.11	Yöntem II'ye göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda ECG içeriğinin hasat dönemine göre değişimi.....	80
Şekil 4.12	Yöntem II'ye göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda Q3RG içeriğinin hasat dönemine göre değişimi.....	84
Şekil 4.13	Yöntem II'ye göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda Q3G içeriğinin hasat dönemine göre değişimi.....	84
Şekil 4.14	Yöntem II'ye göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda K3RG içeriğinin hasat dönemine göre değişimi.....	84
Şekil 4.15	Yöntem I'e göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda TF-f içeriğinin hasat dönemine göre değişimi.....	91

Şekil 4.16	Yöntem II'ye göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda TF-3-G İçeriğinin hasat dönemine göre değişimi.....	91
Şekil 4.17	Yöntem II'ye göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda TF-3'-G içeriğinin hasat dönemine göre değişimi.....	91
Şekil 4.18	Yöntem I'e göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda TF-3,3'-DG içeriğinin hasat dönemine göre değişimi.....	92
Şekil 4.19	Yöntem II'ye göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda toplam fenolik madde içeriğinin hasat dönemine göre değişimi.....	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Dünyada siyah çay üretimi ve ihracatı (bin ton) ile kişi başına yıllık tüketim miktarı (kg).....	5
Çizelge 2.2	Çay-Kur tarafından işlenen siyah çayın sınıflandırılması.....	14
Çizelge 2.3	İşlenmemiş çay yaprağının kimyasal bileşimi.....	16
Çizelge 2.4	Taze çay klonlarında bireysel kateşin fraksiyonlarının dağılımı.....	18
Çizelge 2.5	Farklı tipte çayların kateşin ve kafein miktarları (mg /100ml dem)..	27
Çizelge 2.6	Farklı çay yapraklarının flavonol içeriği.....	28
Çizelge 2.7	Çay yapraklarının PPO aktivitesi değişimi.....	32
Çizelge 2.8	Farklı ülkelerde üretilmiş siyah çayların kateşin ve TF içerikleri.....	35
Çizelge 2.9	Üretim aşamalarında siyah çayın kafein içeriğindeki değişim.....	42
Çizelge 3.1	HPLC çalışma koşulu ve gradient elusyon programı.....	46
Çizelge 3.2	Kullanılan standart maddeler ve hazırlanması.....	47
Çizelge 3.3	Standart maddelere ilişkin regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı.....	48
Çizelge 4.1	Bileşik konsantrasyonları (ppm) ile pik alanları arasındaki ilişki.....	52
Çizelge 4.2	HPLC yönteminin kesinliği (Yöntem II'ye göre işlenmiş Mayıs dönemine ait 5. sınıf çay örneği).....	53
Çizelge 4.3	Taze çay filizi (Muradiye ve Fener) ve yeşil çayın fenolik madde ve alkaloid miktarları (mg/g ka).....	58
Çizelge 4.4	Farklı ekstraksiyon tiplerinin çayın fenolik madde ve alkaloid miktarları (mg/g ka) üzerine etkisi.....	61
Çizelge 4.5	Farklı solventlerin çayın fenolik madde ve alkaloid miktarları (mg/g ka) üzerine etkisi (Yöntem II'ye göre işlenmiş Mayıs dönemine ait 5. sınıf çay örneği, n=2).....	62
Çizelge 4.6	Beş aşamalı ve tek aşamalı ekstraksiyonunun çayın fenolik madde ve alkaloid miktarları (mg/g ka) üzerine etkisi (n=2).....	64
Çizelge 4.7	S:M oranının çayın fenolik madde ve alkaloid miktarları (mg/g ka) üzerine etkisi.....	65
Çizelge 4.8	Ekstraksiyon yönteminin kesinliği (n=5).....	66
Çizelge 4.9	Ekstrakt metanol konsantrasyonunun çayın fenolik madde ve alkaloid miktarları (mg/g ka) üzerine etkisi (n=2).....	68
Çizelge 4.10	Alkaloidlerin hasat dönemi, kıvırma yöntemi ve çay sınıfına göre değişimi (mg/g ka).....	69

Çizelge 4.11	Alkaloidlerin hasat dönemi, kavrırma yöntemi ve çay sınıfına göre değişimine ait varyans analizi sonuçları.....	71
Çizelge 4.12	EGCG ve ECG'in hasat dönemi, kavrırma yöntemi ve çay sınıfına göre değişimi (mg/g ka).....	74
Çizelge 4.13	EGCG ve ECG'in hasat dönemi, kavrırma yöntemi ve çay sınıfına göre değişimine ait varyans analizi sonuçları.....	76
Çizelge 4.14	Q3RG, Q3G ve K3RG'in hasat dönemi, kavrırma yöntemi ve çay sınıfına göre değişimi (mg/g ka).....	81
Çizelge 4.15	Q3RG, Q3G ve K3RG'in hasat dönemi, kavrırma yöntemi ve çay sınıfına göre değişimine ait varyans analizi sonuçları.....	83
Çizelge 4.16	Teaflavinlerin hasat dönemi, kavrırma yöntemi ve çay sınıfına göre değişimi (mg /g ka).....	86
Çizelge 4.17	Teaflavinlerin hasat dönemi, kavrırma yöntemi ve çay sınıfına göre değişimine ait varyans analizi sonuçları.....	90
Çizelge 4.18	Toplam fenolik maddelerin çay sınıfı, kavrırma yöntemi ve hasat dönemine göre değişimi (mg GAE/g ka).....	96
Çizelge 4.19	Toplam fenolik maddelerin hasat dönemi, kavrırma yöntemi ve çay sınıfına göre değişimine ait varyans analizi sonuçları.....	97

1. GİRİŞ

Siyah çayın fenolik maddeleri, çayın en önemli kalite parametreleri veya indikatörleri olup bunlardan özellikle teaflavin (TF)'ler çayın pazar değerini belirlemek için kullanılmaktadır (Yao *et al.* 2006b). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, fenolik maddelerin aynı zamanda sağlık üzerine bir çok olumlu etkisi olduğu ortaya konulmuştur (Manzocco *et al.* 1998). Fenolik maddelerin yanısıra çayın başlıca alkaloidleri olan kafein ve teobromin de siyah çayın kalitesini belirlemede kullanılan önemli faktörlerdendir (Sharma *et al.* 2005).

Çayda bulunan fenolik maddelerin miktarı yaprak cinsi, yetiştirilme koşulları, toplandığı mevsim ve işleme yöntemi gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Lin *et al.* 1998, Bonoli *et al.* 2003, Caffin *et al.* 2004). Ülkemizde üretilen siyah çayların, HPLC yöntemi kullanılarak TF'leri de içeren fenolik madde ve alkaloid içeriğinin belirlenmesine ilişkin bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu konuda yapılan çalışmalar daha çok siyah çayın mineral içeriği (Özdemir vd. 1999, Özdemir vd. 2000), spektrofotometrik olarak teaflavin ve polifenol içeriği (Nas ve Öksüz 1991, Poyrazoğlu ve Gürses 2004), kül içeriği (Nas vd. 1991, Poyrazoğlu ve Gürses 1991), kateşin, flavonol ve alkaloid içeriği (Tokuşoğlu 2001) ve çay tohumu yağının yağ asidi bileşimi (Özdemir vd. 2001) üzerinde yoğunlaşmıştır. Tarafımızdan yapılan bu araştırma ile ülkemiz çayının polifenol ve alkaloid profilinin HPLC yöntemi kullanılarak ortaya çıkarılması ve çay hasat döneminin, işleme yönteminin ve çay sınıfının (1-7. sınıflar) bu iki grup bileşiğin miktarı üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra araştırmanın yürütülmesi sırasında siyah çay fenoliklerinin ekstraksiyonu ve bu bileşiklerin analizi için uygun bir HPLC yöntemi konusunda literatür eksikliğinin bulunduğu gözlenmiş ve ilk aşamada bu eksikliğin giderilmesine yönelinmiştir. Bu amaçla geçerliliği doğrulanmış bir HPLC yöntemi geliştirilmiş ve elde edilen bulgular literatüre kazandırılmıştır (Turkmen and Velioglu 2007). Çay bileşenlerinin ekstraksiyonu için ekstraksiyon tipi, ekstraksiyon solventi, ekstraksiyon aşama sayısı, S:M oranı ve ekstrakt solvent konsantrasyonu gibi parametreler belirlenmiştir.

Ülkemizin önemli çay üreticisi olan ülkeler arasında yer almasına rağmen, Türk çayının bugüne kadar dünya piyasalarında yer alamamış olması ülkemizin ciddi bir çay politikasına sahip olmadığını ve konu üzerinde gerekli araştırmaların yeterince yapılmadığını göstermektedir. Gerçekleştirilen bu araştırma ile iç tüketime yönelik olarak üretilen çayımızın en önemli kalite parametrelerine ilişkin verilerin ortaya konulmasının, çayımızın kalitesinin yükseltilmesine ilişkin önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Çay Bitkisi

Dünyada en yaygın olarak tüketilen içeceklerden birisi olan ve ayrıca tıbbi özelliklerinin olduğu bilinen (Mello *et al.* 2005, Vyas and Kumar 2005, Zhu *et al.* 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 *et al.* 2003, Kuo *et al.* 2005). Ülkemizde 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 (Kacar 1992). Çay bitkisi *Theaceae* familyasının *Camellia* cinsine (*Camellia sinensis*, (L) O. Kuntze) ait her mevsim yeşil olan, çok yıllık bir bitkidir (Caffin *et al.* 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 *et al.* 2007). Türkiye'de yetiştirilen çay Çin varyetesidir. Ayrıca bu çayların hibritleri de bulunmaktadır (Tüfekci and Güner 1997).

Çay ağacı, doğada 20-30 m yüksekliğe kadar ulaşabilir (Caffin *et al.* 2004). Normal koşulda 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 en uygun hava sıcaklığı 18-30 °C, en uygun toprak sıcaklığı ise 20-25 °C olmalıdır. En iyi gelişmeyi pH'sı 5.0-5.6 olan hafif asitli topraklarda gösterir (Mehra and Baker 2007). Çay genellikle yüksek bölgelerde yetiştirilir. Hindistan, Sri Lanka ve Kenya'da 2000 m yüksekliklere kadar çay tarımı yapılmaktadır (Chan *et al.* 2007). Çay üretimi için, çay bitkisinin sürgün ucundan iki yaprak ve bir tomurcuğun (buna 2,5 yaprak adı verilir) kullanılması önerilir ve istenir. Bunun nedeni, kalite açısından önem taşıyan çeşitli maddelerin genç yapraklarda ve tomurcukta yoğun olarak toplanmış olmasıdır

(Kacar 1987). ay yaprakları ve tomurcuk, bitkinin gelişme oranına bağlı olarak tropik bölgelerde 1 veya 2 haftalık aralıklarla toplanmaktadır (Vyas and Kumar 2005). Ülkemizde ise bu süre 5-7 haftadır. Toplamının elle yapılması kaliteli çay üretimini sağlarken, işçilik maliyetlerinin yüksekliği bazı ülkelerde mekanik hasatı ekonomik bir zorunluluk haline getirmiştir (Ravichandran and Parthiban 1998b, Chan *et al.* 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 hücrel zararlanmaların meydana geldiği belirtilmektedir (Vyas and Kumar 2005).

2.2 Türkiye’de ve Dünyada ay Üretimi ve Tüketimi

Dünyada yıllık olarak 3.218 milyon ton kuru çay üretilmektedir (FAO 2005a) ve bunun % 20’si yeşil, % 2’si oolong ve geri kalanı siyah aydır (Rio *et al.* 2004). Çizelge 2.1’de görüldüğü üzere Türkiye, ay üretimi açısından dünyanın en önemli çay üreticisi ülkeleri arasında beşinci sırada yer almaktadır. Kişi başına yıllık çay tüketimi açısından ise ülkemiz, bu ülkeler arasında ilk sırada yer almaktadır (izelge 2.1). ay üreticisi olmayan ülkeler de dikkate alındığında kişi başına yıllık tüketim miktarı (kg/kişi/yıl) sırasıyla İngiltere (2.62), Kuveyt (2.55) ve Türkiye (2.30) şeklinde değişmektedir.

Ülkemiz oldukça yüksek üretim miktarlarına rağmen, dünya çay ihracatında yeterli payı alamamaktadır. Bunun nedeni, ülkemizde dünya çay ticaretinde iki temel faktör olan fiyat ve kalite konusunda problem yaşanmasıdır. ay ihracatı yapan üretici ülkelerin üretim maliyeti, ülkemiz kuru çay üretim maliyetinin altındadır. Hammadde kaynağı durumundaki çay bahçelerinin ıslahı, hasatta kalite standardı, tarımsal teknik yöntemlerin uygulanması ve üretim teknolojisi gibi konulardaki yetersizlik nedeniyle de ülkemizde ürün kalitesi düşüktür (Demir 2002).

Türkiye’de ilk yasal çay tarımının 1924 yılında Rize çevresinde başlatılması ve aynı yıl Çay Araştırma Enstitüsünün kurulmasının ardından 1947 yılında yeşil çay yaprağı işleyen ilk çay fabrikası Rize’de açılmıştır.

Çizelge 2.1 Dünyada siyah çay üretimi ve ihracatı (bin ton) ile kişi başına yıllık tüketim miktarı (kg)

Ülke	Üretim ^a (2005 yılı)	İhracat ^b (2004 yılı)	Tüketim ^c (2001 yılı)
Çin	940.50	282	vy
Hindistan	830.70	179	0.66
Sri Lanka	308.09	291	1.29
Kenya	295.00	293	0.46
Türkiye	202.00	vy	2.30 ?
Endonezya	171.41	98	vy
Japonya	100.00	1	1.08

^aFAO (2005b), ^bFAO (2005a), ^cHudaykuliyeve (2003), ^{vy}veri yok

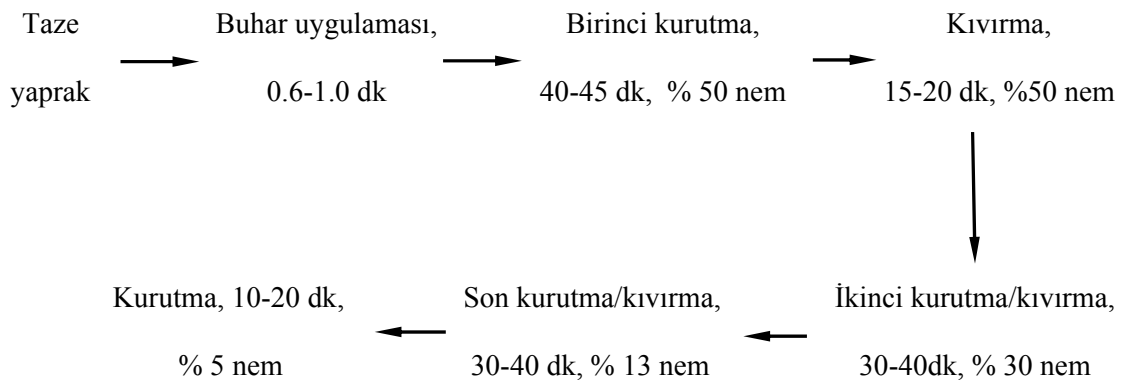
Sektördeki gelişmeye paralel olarak daha iyi hizmet vermek amacıyla 1971 yılında bir devlet kuruluşu olan ÇAY-KUR kurulmuş ve çay endüstrisi ve tarımı bu organizasyon aracılığıyla sürdürülmüştür. 1984 yılında ise çay sektöründeki devlet tekeli kaldırılarak, çay tarımı, işlenmesi ve pazarlaması serbest bırakılmıştır (Anonymous 2004).

2.3 Çay Tipleri

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 *et al.* 2003, Wheeler and Wheeler 2004). Bunların dışında ticari ölçekte olmayan başka çaylar da bulunmaktadır.

2.3.1 Yeşil çay

Yeşil çay, geleneksel alkolsüz bir içecek olarak Çin ve Japonya’da yaygın olarak tüketilmektedir (Yoshida *et al.* 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 2.1’de gösterilmektedir. Şekilde görüldüğü üzere, yeşil çay üretiminde ilk ve en önemli aşama ısı uygulaması ile yapraktaki enzim aktivitesini durdurma işlemidir. Bu amaçla uygulanan sıcaklık ve süre yaprak pozisyonu, mevsim ve çeşit 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). Çoğunlukla yeşil çay üretiminde, Assam hibritlerine göre daha az kateşin ve kafein ve daha fazla amino asit içeren Çin hibritleri kullanılmaktadır (Gulati *et al.* 2003). Yeşil çayın rengi kateşinlerin oksidasyona uğramaması nedeniyle oolong ve siyah çaydan farklı olarak tamamen yeşildir. Yeşil çayın antioksidatif ve antikarsinojenik özelliklere sahip bileşikleri arasında yer alan ve yeşil çayın ağırlıkça % 20’sini oluşturan kateşinlerin, oldukça önemli olduğu düşünülmektedir (Wang and Helliwell 2000). Yeşil çayın toplam antioksidan potansiyelinin % 68’inin kateşinlerden, % 30’unun ise tek başına EGCG’dan kaynaklandığı belirtilmektedir (Stewart *et al.* 2005).



Şekil 2.1 Yeşil çay üretimi (Mizukami *et al.* 2006)

Özellikle son yıllarda yeşil çay kateşinlerinin sağlık etkisi üzerine çok fazla araştırma yapılmaktadır. Kateşinler, bu etkilerinden dolayı çeşitli gıdalara antioksidan ve

antimikrobiyel katkı maddesi olarak ve fonksiyonel özellik kazandırmak amacıyla ilave edilmektedir (Yılmaz 2006). Örneğin yağlarda ve yağlı gıdalarda kateşinlerin kullanılması ile lipid oksidasyonunun engellenmesi sonucunda bu gıdaların oksidatif stabilitesi artırılmaktadır (Gramza and Korczak 2005).

Fermentasyon işlemi kateşin miktarında önemli oranda azalmaya neden olduğu için yeşil çay, oolong ve siyah çaylardan daha fazla kateşin içermektedir (Cabrera *et al.* 2003). Yeşil çayda kateşinlerden en fazla EGCG bulunmaktadır. Bunu sırasıyla EGC, ECG, EC, CG, GC ve C izlemektedir (Goto *et al.* 1996, Lin *et al.* 1996, Zuo *et al.* 2002, Nishitani and Sagesaka 2004, Perva-Uzunalić *et al.* 2006). Bu sıralamanın EGCG>EGC>EC>ECG>GC (Wang *et al.* 2000, Chang *et al.* 2000) ve EGCG>EGC>GC>ECG>C>EC (Wang *et al.* 2006) şeklinde olduğu da görülmektedir. Yeşil çayda bireysel kateşinlerin miktarı hammaddenin çeşidine, özellikle varyete, iklim ve yetiştirilme koşullarına göre değişmektedir (Bonoli *et al.* 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 *et al.* 1996, Nishitani and Sagesaka 2004).

2.3.2 Oolong çay

Oolong çay, esas olarak Çin ve Tayvan'da yaygın olarak tüketilen bir çay çeşididir (Satoh *et al.* 2005). Oolong çayın üretiminde kompleks bir yarı fermentasyon işlemi uygulanmakta olup, işlem basamakları aşağıda belirtildiği gibidir (Matsui 2004).

- Yaprakların toplanması
- Hidrolizasyon ve oksidasyondan sorumlu enzimleri aktive etmek için yaprakların güneş ışığı altında (solar) soldurulması
- Yaprak sıcaklığını düşürmek için soğutma uygulanması
- Hidrolizasyondan sorumlu enzimler aracılığıyla istenilen çiçeksi kokunun oluşumu için yaprakların karıştırılması

- Isı uygulaması ile enzimlerin büyük bir kısmının azaltılması, kalan enzimlerle yavaş bir fermentasyon uygulanması
- Yaprakların kıvrılarak, oksidasyondan sorumlu enzimlerle karakteristik tadın oluşturulması
- Kurutma uygulanarak fermentasyonun sonlandırılması

Karakteristik özellikleri açısından oolong çay, siyah çay ile yeşil çay arasında yer almaktadır (Wang *et al.* 2000). Ancak işleme farklılıkları nedeniyle siyah çay ile yeşil çayın karışımından oolong çayın içim özelliğinde bir çayın oluşturulması olanaksızdır (Kacar 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 and Xu 2004). Oolong çayın aroma bileşiklerinden glikozidlerin solar soldurma sırasında artmaya başladığı ve bu artışın siyah çaydan farklı olarak üretim sonuna kadar devam ettiği belirtilmektedir (Wang *et al.* 2001). Oolong çayın yapısında bulunan kateşinlerin polimerizasyonu sonucunda oluşan polifenol bileşikleri, yeşil ve siyah çaydan farklılıklar gösterir (Matsui 2004) ve kateşin, teaflavin ve tearubijinlerin karışımından oluşmaktadır (Wheeler and Wheeler 2004). EGCG ve toplam kateşin miktarları açısından yeşil çayın birinci sırada yer aldığı ve bunu sırasıyla oolong ve siyah çayın takip ettiği saptanmıştır (Lin *et al.* 2003). Benzer şekilde, en fazla kateşin miktarının yeşil (% 26.7), daha sonra oolong (% 23.2) ve en az siyah çayda (% 4.3) bulunduğu belirtilmektedir (Chan *et al.* 2007). Çayların indirgeme gücü ve DPPH radikal yöntemleri kullanılarak belirlenmiş antioksidan aktivite açısından sıralamasında da, polifenol sıralamasına uygun olarak birinci sırada yeşil çayın yer aldığı ve bunu sırasıyla oolong ve siyah çayın izlediği belirtilmektedir (Satoh *et al.* 2005). Diğer taraftan, oolong çayın bileşiminde bulunan proantosiyanidin, oolonghomobisflavan, teasinensin ve teaflavin gibi polimerize polifenollerin pankreastan salgılanan lipaz enziminin aktivitesini engellemede yeşil çayın başlıca polifenollerinden olan EGCG'dan daha etkili olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle oolong çayın insan vücudunda yağ absorpsiyonunu azaltarak obeziteyi önleyeceği düşünülmektedir (Nakai *et al.* 2005).

2.3.3 Siyah ay

Siyah ay, özellikle Batı Avrupa, Amerika, Avustralya ve bazı Asya lkelerinde tüketilmektedir (Wheeler and Wheeler 2004). Siyah ay üretimi için çoğunlukla polifenol içerikleri daha fazla olan Assam eřitleri kullanılmaktadır (Astill et al. 2001). Üretim aŐaĐıda detaylı olarak belirtildiği üzere soldurma, kıvrırma, fermentasyon ve kurutma/derecelendirme olarak 4 farklı aŐama sonucunda gerçekleŐtirilmektedir (Tomlins and Mashingaidze 1997, Łuczaj and Skrzydlewska 2005, Borah and Bhuyan 2005, Muthumani and Senthil-Kumar 2007a).

2.3.3.1 Soldurma

Soldurma, taze çay yapraklarının kısmi olarak kurutulmasıdır. Soldurma işlemi ile yaprakların bir sonraki aşama olan kıvrırma işlemine, fiziksel olarak hazırlanması amaçlanmaktadır (Ghodake *et al.* 2006). Taze ay yaprakları yaklaşık % 75-83 nem içerirken, soldurulmuş çay yaprağında % 58-67 oranında su bulunur (Kacar 1987). Soldurma işlemi geleneksel olarak, yapraklarda istenilen nem düzeyine ulaŐılana kadar ortam havasının veya ısıtılmıŐ havanın yaprakların arasından geçirilmesi ile gerçekleştirilir (Tomlins and 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 (Kacar 1987).

Soldurulmuş ay yaprağında meydana gelen başlıca fiziksel değişim, yapraktaki hücre duvarlarının geçirgenliğinin artmasıdır (Kacar 1987, Zhen 2002). Bu durum yapraktaki su kaybına bağlıdır ve yaprak hücresinde ayrı bölümlerde yer alan polifenoller ile PPO enziminin, kıvrırma aşamasında birbiriyle karıŐmasını sağlar (Muthumani and Senthil-Kumar 2007a). Soldurma sırasında yaprakta fiziksel deĐiŐikliklerin yanı sıra kimyasal değişiklikler de meydana gelmektedir (Ghodake *et al.* 2006). Soldurma sırasında meydana gelen biyokimyasal değişiklikler aşağıda belirtilmiştir (Tomlins and Mashingaidze 1997).

- Amino asitler, basit Őekerler ve kafein miktarlarında artma

- Karotenoid, klorofil ve lipid içeriklerinde azalma
- Katesin miktarı ve PPO aktivitesinde azalma

Soldurma sırasında yaprakların sahip olduğu nem içeriği ve bu sırada meydana gelen biyokimyasal değişiklikler siyah çayın kalitesini etkilemektedir (Sud and Baru 2000, Lopez *et al.* 2005, Ghodake *et al.* 2006). Örneğin, yetersiz soldurulmuş çaylar (% 67 ve daha fazla su içeren çaylar) ortodoks kıvrımda, özellikle pres uygulandığında dışarıya çok fazla su vermektedir. Çayın kalitesini oluşturan ve suda çözünen kimyasal bileşenlerin bir kısmı bu su vasıtası ile kayıp olmaktadır ve çay yaprağı elastikiyet kazanamadığından kolayca kırılmakta, iyi bir kıvrılma olamamaktadır (Özdemir ve Gökalp 1992). Ayrıca, karotenler, amino asitler, doymamış yağ asitleri ve terpen glikozidleri, siyah çayın önemli kalite parametrelerinden olan çay aromasından sorumlu bileşiklerin ön maddeleridir ve bu bileşiklerin soldurma sırasındaki değişimlerine bağlı olarak çayın aroma bileşimi de değişim göstermektedir (Ravichandran 2002). Bu nedenle, soldurma işleminin siyah çay üretiminin en önemli aşamalarından biri olduğu düşünülmektedir (Ghodake *et al.* 2006, Muthumani and Senthil-Kumar 2007a).

2.3.3.2 Kıvrırma

Kıvrırma aşamasında çay yaprakları parçalanır ve hücre yapıları da bozulduğu için çeşitli enzimler substratları (polifenoller) ile etkileşime girer (Caffin *et al.* 2004). Kıvrırma işlemi başlıca 2 şekilde, ya geleneksel olarak ortodoks yöntemi ile ya da CTC (parçalama, yırtma ve bükme) yöntemi ile gerçekleştirilir (Peterson *et al.* 2004). Ortodoks yöntemi, dünyanın en büyük çay ihracatçısı olan Sri Lanka'da yaygın olarak kullanılırken (Wijeratne 2004), CTC yöntemi çoğunlukla Hindistan (Dharmadi 2004) ve Kenya (Wachira and Ronno 2004)'da uygulanmaktadır. Ortodoks kıvrırma yönteminde soldurulmuş çay yapraklarının kıvrılması, büyüklükleri ve düzenlemeleri birbirinden farklı ancak aynı ilkelere dayanan presli ve pressiz kıvrırma makinalarında gerçekleştirilir. Sürekli bir sistem olan CTC yönteminde ise soldurulmuş yapraklar, birbirinin tersi yönünde dönen iki yatay valsten oluşan CTC makinasında işlenirler. Dakikadaki devir adetleri birbirinden farklı olan valslerin arasından yapraklar geçerken parçalanır, yırtılır ve bükülür. CTC makinaları, ortodoks kıvrırma, rotorvan (parçalayıcı)

ya da kendi aralarındaki kombinasyonlarla siyah çayın işlenmesinde kullanılmaktadır (Kacar 1987).

Yaprak hücrelerinin vakuolü etrafında bulunan ve yaprak içinde polifenoller ve enzimleri birbirinden ayıran ince membranlar kıvrırma sırasında parçalandığı (Bhattacharyya *et al.* 2007b) için kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonlar bu aşamada başlamaktadır (Caffin *et al.* 2004). Stoplazmik flavonoidlerin, kloroplast PPO'ı ve hücre duvarı peroksidaz (POD)'ı ile temas etmesi sonucunda çay yapraklarının rengi sarı-kırmızı kahverengi renk kazanmaktadır (Baruah 2003). CTC yöntemiyle üretilen çayların flavonoid özellikle de TF ve tearubijin (TR) içerikleri ortodoks çaylarından daha fazladır (Peterson *et al.* 2004). Bu farklılığın, CTC yönteminde yaprakların ortodoks yöntemine göre daha fazla parçalanmasından kaynaklandığı belirtilmektedir (Astill *et al.* 2001). Diğer taraftan, ortodoks çayları CTC çaylarından daha iyi koku ve aromaya sahiptir ve kalitesini daha iyi muhafaza eder (Ravichandran and Parthiban 2000). Bu durum karotenoid ve lipid gibi bileşiklerin parçalanma derecesiyle ilgilidir. Karotenoidlerin parçalanması CTC çaylarında ortodoks çaylarından daha fazladır. Buna bağlı olarak, CTC çayları aynı zamanda daha düşük A vitamini içermektedir ve bunun sonucu olarak tedavi edici özelliği ve besin değeri azalmaktadır (Ravichandran 2002). Siyah çayın aromasının oluşumunda, lipidlerin/yağ asitlerinin parçalanması, bu bileşiklerin istenmeyen uçucu koku bileşiklerinin ön maddesi olması nedeniyle çok önemlidir ve ortodoks çaylarda daha fazladır (Ravichandran and Parthiban 2000). Kıvrılan yapraklarda sıcaklık yükselmesi enzim-substrat reaksiyonunu zamansız bir şekilde artırır. Bu da siyah çayın kalitesini düşürür. O nedenle aşırı sıcaklık yükselmelerinden kaçınmak gerekir. Genellikle en uygun sıcaklık 27-32 °C arasındadır (Kacar 1987).

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 (Kacar 1987, Özdemir vd. 1993, Tüfekci and Güner 1997).

2.3.3.3 Fermentasyon

Kıvırma sırasında başlamış olan kateşinlerin oksidasyonunun optimum koşullarda devam etmesi için yapraklar en uygun sıcaklık ve nemin sağlandığı ortamda fermentasyona bırakılır (Caffin *et al.* 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 *et al.* 2007 a, b).

Fermentasyon sırasında polifenoller, PPO ve POD ile enzimatik oksidasyona uğratılır. Fermentasyonun başında PPO, daha sonraları ise POD daha aktiftir (Bhattacharyya *et al.* 2007a). Enzimatik oksidasyonun başında o-kinonlar oluşur ve oluşan o-kinonlar arasında bir dizi reaksiyonların gelişmesiyle TF'ler ve TR'ler oluşur (Łuczaj and Skrzydlewska 2005, Muthumani and Senthil-Kumar 2007b). Bunlar, çay deminin burukluk, parlaklık, renk ve ağızda bıraktığı his gibi özelliklerinden sorumlu bileşiklerdir (Sud and Baru 2000). Siyah çay üretimi sırasında kateşinlerin yaklaşık olarak % 75'i oksidasyonun ve kısmen de polimerizasyonun yer aldığı enzimatik dönüşüme uğratılmaktadır (Łuczaj and Skrzydlewska 2005).

Fermentasyon sırasında istenilen ürün özelliklerinin oluşumundan sorumlu en önemli faktörler süre, sıcaklık, pH, nisbi nem ve oksijendir (Muthumani and 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 *et al.* 2007a). Birçok çay fabrikasında fermentasyon odasında çay yapraklarının sıcaklığını belli düzeyde tutabilmek ve yeterli oksijen sağlayabilmek için basınçla hava verilmektedir. Aksi takdirde, yaprakların alt kısımlarına doğru sıcaklığı yükselmiş ve yeteri kadar oksijen alamamış bölümler oluşabilir ve çayın özellikleri olumsuz yönde etkilenir (Kacar 1987). Fermentasyonun süresi açısından bakıldığında ise yetersiz yapılan fermentasyon, çay deminin yeşil renkli, çiğ tatta ve ince olmasına yol açarken, aşırı fermentasyon çay deminin koyu ve

kuvvetli olmasını sağlamaktadır (Bhattacharyya *et al.* 2007a). Fermentasyonun başlangıç aşamalarında sürenin artmasıyla orantılı olarak TF miktarları en yüksek seviyelere ulaşırken bu aşamadan sonra sürenin daha fazla uzaması TF miktarlarında azalmaya neden olmaktadır (Muthumani and Senthil-Kumar 2007b). Yukarıda belirtilen bu nedenlerden dolayı, istenilen kalite özelliklerinin elde edildiği bir fermentasyonun başarılması için tüm bu faktörlerin düzenlenmesi ve ayrıca yaprağın kateşin bileşimi ve enzim aktivitesi hakkında yeterli bilgiye sahip olunması gerekmektedir (Bhattacharyya *et al.* 2007a).

Çayın aroması uçucu koku bileşikleri (VFC)'nden oluşur ve iki gruba ayrılır. Birinci grupta yer alan bileşikler esas olarak lipidlerin parçalanma ürünleridir ve çaya istenmeyen yağmsı bir koku kazandırır. İkinci grup bileşikler ise çaya tatlı bir çiçeksi aroma verir ve başlıca terpenoidler, karotenoidler ve amino asitlerin türevlerinden oluşur. İkinci grubun birinci gruba oranı aroma indeksi olarak değerlendirilir (Ravichandran 2002) ve bu indeks fermentasyon sırasında aşamalı olarak azalır (Caffin *et al.* 2004).

2.3.3.4 Kurutma/Derecelendirme

Aşırı enzim faaliyeti çay kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir (Nas ve Öksüz 1987). Bu nedenle, fermente olmuş çay yapraklarının enzim aktivitesini durdurmak ve ayrıca nem içeriğini çayın güvenle depolanacağı seviyeye (~ % 3'e) düşürmek için, kurutma, genellikle akışkan yatak kurutucu ile, işlemi uygulanmaktadır (Caffin *et al.* 2004). Kurutma işlemini etkileyen başlıca faktörler kullanılan havanın sıcaklığı, hava miktarı, süre ve kurutma bölmesindeki havanın kurutma kapasitesidir. Kurutma işlemi sırasında bir dizi biyokimyasal değişiklikler meydana gelmektedir. Bunlara örnek olarak, enzimlerin inaktivasyonu, nemin azalması, orta düzeyde siyah/kahverengi renk gelişimi, klorofilin feofitine dönüşümü, lipidlerin parçalanması, bazı koku bileşiklerinin oluşumudur. Bu aşamada bazı uçucu bileşiklerde kayıplar da olur (Bhattacharyya *et al.* 2007a). Dolayısıyla kurutma sırasında çayın neminin azalmasının yanı sıra tadı, rengi ve aroması da gelişmektedir (Caffin *et al.* 2004).

Kurutulmuş çay, uygun partikül boyutu ve şekline göre derecelendirilir. Bu amaçla mekanik olarak hareket eden delik genişlikleri farklı elekler kullanılır ve eleklerin delik genişlikleri esas alınarak derecelendirme yapılır (Tokuşoğlu 2001). Ülkemizde uygulanan derecelendirme sistemine göre, kurutma fırınından çıkan çaylar bir dizi lif alıcısı ile çöp, lif ve benzeri materyallerinden ayrılır ve 5 mm delik genişliğindeki Midilton eleğinden geçirilir. Elekten geçen kısım çay eleklerine (pakka), geçemeyen kısım kırıcıya gönderilir. Çay eleği, delik genişlikleri üstten alta doğru küçülen ve üst üste yerleştirilmiş 5 elekten oluşmaktadır. Üstten alta doğru elek genişlikleri 8, 10, 12, 20, 30 mesh'dir. Böylece ilk aşamada çay eleğinden geçirilen siyah çay 1, 2, 3 ve 7a numara ile gösterilen 4 sınıfa ayrılır (Kacar 1987). Bunlardan 1, 2 ve 3 numaralı çaylar “imalat kırığı çay” olarak adlandırılır. Bunlar kurutmadan çıkıp tasnife gelen ve herhangi bir kırma işlemine tabi tutulmadan elenen çaylardır. Elek üzerinde kalan çaylar kırıcıdan geçirildikten sonra yeniden eleklerden geçirilir. Bu çaylar ise 4, 5, 6 ve 7b numara olarak sınıflandırılır. Bunlardan 4, 5 ve 6 numaralı çaylara “kırık (kırıcıdan geçen) çaylar” denir (Kacar 1987, Özdemir vd. 1999, Çay-KUR fabrika ziyareti). Hem imalat kırığı hem de kırıcıdan geçen çayların çay eleğinin altında kalan kısmı olan ve 7a ve 7b olarak sınıflandırılan çaylar ise “toz çay” olarak adlandırılır. Söz konusu 7 sınıf çayın özgün isimleri ile bunların Türkçe karşılıkları Çizelge 2.2’de gösterilmektedir.

Çizelge 2.2 Çay-Kur tarafından işlenen siyah çayın sınıflandırılması (Kacar 1987,1992)

Numara	Türkçe	İngilizce	Tanımlanması
1	İmalat kırığı	Orange Fannings (OF)	Çok ince altınbaşı imalat kırığı çay
2	İmalat kırığı	Broken Orange Pekoe 1 (BOP1)	İnce altınbaşı kıvrım çay
3	İmalat kırığı	Orange Pekoe (OP)	Az altınbaşı kalın kıvrım çay
4	Kırıcıdan geçen	Fanning (F)	Çok ince kırık çay
5	Kırıcıdan geçen	Broken Orange Pekoe 2 (BOP2)	İnce kıvrımlı kırık çay
6	Kırıcıdan geçen	Broken Pekoe (BP)	Kalın kıvrımlı kırık çay
7	Toz	Dust (D)	Toz çay

2.4 Çayın Bileşimi

2.4.1 Çayın genel bileşimi

İşlem görmemiş çay yaprağının kimyasal bileşimi varyete farklılıkları, çevresel etkiler, toplama standardı ve üretim yöntemleri gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Kuroda and Hara 1999). Ancak genel olarak taze çay yaprağının yaklaşık % 80'i sudur. Kuru ağırlıktaki öğelerin dağılımı Çizelge 2.3'de verilmiştir. Çayın bileşenleri arasında en büyük öneme fenolik maddeler ve aralarında kafeinin de yer aldığı alkaloidler sahiptir. Ayrıca, çayda 26 çeşit amino asit bulunmaktadır ve en fazla bulunan amino asit, sadece çay bitkisine özgü olan ve toplam amino asitlerin % 50'sini oluşturan teanindir (Yao *et al.* 2006a). Teanin, yeşil çay kalitesi ile en yüksek korelasyonu gösteren ve aynı zamanda önemli biyolojik etkiye sahip bir amino asittir (Wang *et al.* 2006). Örneğin, beyindeki norepinefrin ve serotonin miktarlarını düşürdüğü, kan basıncını azalttığı ve kanser üzerine etkili olduğu belirtilmektedir (Juneja *et al.* 1999, Wang *et al.* 2006). Teanin yeşil çay demine umami (etimsi) tat ve koku vermektedir (Juneja *et al.* 1999). Teaninin bu önemli özelliklerinin anlaşılmasından sonra üzerinde giderek daha fazla durulmaktadır.

2.4.2 Çayın fenolik madde bileşimi

2.4.2.1 Taze çay yaprağının fenolik madde bileşimi

Taze çay yaprağında bulunan fenolik bileşikler, başlıca flavan-3-oller (kateşinler) ve flavonol glikozidlerden oluşmaktadır (Clifford *et al.* 2000). Taze çay yaprağında ayrıca diğer bir fenolik grup olan fenolik asitlerden gallik asit, klorojenik asit, neoklorojenik asit ve p- kumaril kuinik asit de bulunmaktadır.

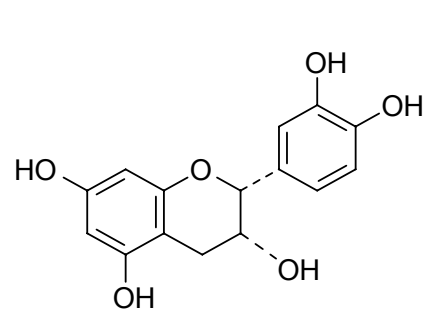
Çizelge 2.3 İşlenmemiş çay yaprağının kimyasal bileşimi (kuru ağırlıkta, %)
(Zhen 2002)

Bileşik	Miktar
Polifenol	23-39
Kafein	3-4
Amino asit	2-4
Karbonhidrat	3-5
Organik asit	0.5-2
Saponin	0.04-0.07
Pigment	0.5-1.3
Vitamin	0.6-1.0
Mineral madde	3.5-7
Selüloz	6-8
Lignin	4-6
Polisakkarit	4-10
Lipid	2-4
Uçucu bileşik	0.01-0.02

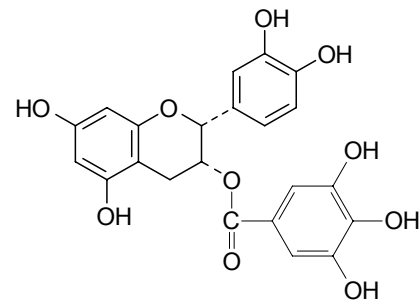
2.4.2.1.1 Flavan-3-ollar

Flavonoid grubun bir üyesi olan flavan-3-ollar (kateşinler), fenolik ve piran halkalarını içeren benzo- γ -piron türevleridir (Heim *et al.* 2002) (Şekil 2.2). Çay yaprağında hakim olan fenolik bileşikler kateşinler olup, bazı çay klonlarında kateşinlerin dağılımı Çizelge 2.4'de gösterilmektedir. Kateşinler renksiz ve suda çözünen bileşikler olup miktarları, kuru çay ağırlığının % 20-30'u kadardır (Wang *et al.* 2000).

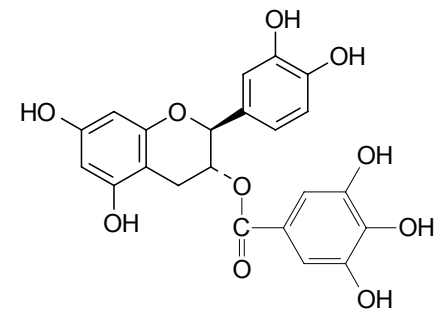
Flavan-3-ollardan EGC ya da EGCG'nin çay klonlarında en fazla bulunan kateşinler olduğu belirtilmektedir (Obanda and Owuor 1997). Afrika çaylarında yapılan bir araştırmaya göre, 40 farklı çay klonu içinde en fazla, gallsatlanmış kateşinlerden EGCG tespit edilmiş bunu gallsatlanmamış kateşinlerden EGC izlemiştir. Diğer kateşinler (C, EC ve ECG) ise daha az miktarlarda bulunmuştur (Wright *et al.* 2000).



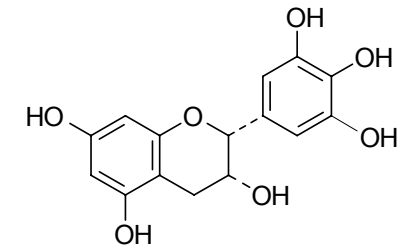
EC



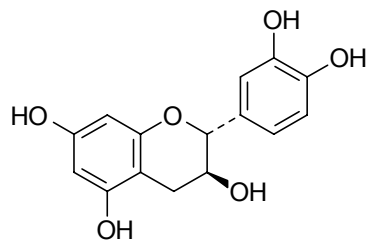
ECG



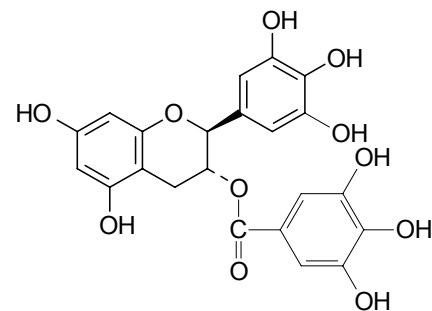
CG



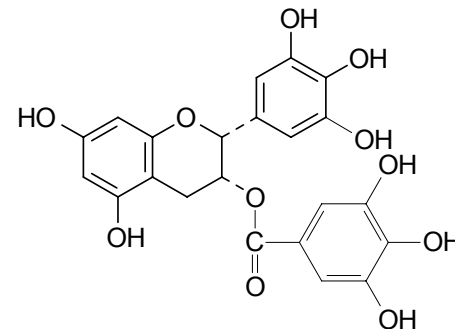
EGC



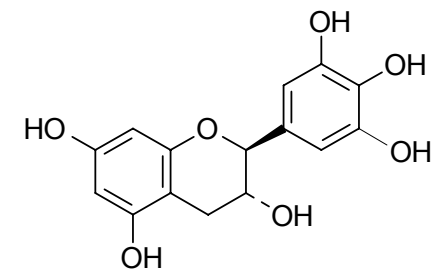
C



GCG



EGCG



GC

Şekil 2.2 Kateşinlerin yapısı (Goto *et al.* 1996)

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 *et al.* 2004). Tayvan taze yeşil çay klonlarında, kateşinlerin miktar açısından sıralaması şu şekilde bulunmuştur; EGCG>EGC>ECG>EC>C (Lin *et al.* 1996). Aynı sıralama, Aucamp *et al.* (2000) tarafından da tespit edilmiştir. Taze yaprakta başta EGCG olmak üzere ECG ve EGC'in yüksek seviyelerde bulunması, siyah çay üretimi açısından iyi kalitenin indikatörü olarak ele alınmaktadır. Teaflavinlerin oluşumunda rol oynayan ve dolayısıyla siyah çay kalitesini etkileyen kateşinler EC, EGC, ECG ve EGCG olup, diğerleri (C, CG , GCG ve GC) TF oluşum reaksiyonlarına katılmazlar (Wright *et al.* 2000, Owuor *et al.* 2006).

Çizelge 2.4 Taze çay klonlarında bireysel kateşin fraksiyonlarının dağılımı (Saravanan *et al.* 2005)

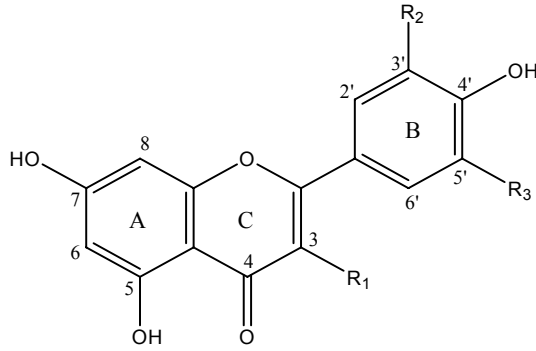
Klon	Kateşin fraksiyonu (%) ^a				Toplam kateşin (%) ^b
	EGC	EC	EGCG	ECG	
UPASI 1	2.52	1.35	11.82	1.18	16.87
UPASI 2	1.68	1.45	12.53	1.05	16.71
UPASI 3	2.28	1.74	13.86	1.86	19.74
UPASI 4	2.02	1.43	11.66	1.31	16.42
UPASI 5	1.83	1.50	10.29	1.08	14.70
UPASI 6	2.73	1.73	10.81	1.16	16.44
UPASI 7	2.08	1.32	10.46	1.13	15.00

^aHPLC yöntemi ile, ^b Spektrofotometrik yöntem ile

2.4.2.1.2 Flavonol bileşikler

Flavonol bileşikler, difenil propan halkasına (C₆-C₃-C₆) sahip olan flavonoidlerin C₂ ve C₃ yapıları arasında bir çift bağ oluşumu ile meydana gelmektedir (Tokuşoğlu 2001). Çayın başlıca flavonollarını çay kuru ağırlığının % 3'ünü oluşturan kuersetin, mirisetin ve kamferol oluşturmaktadır (Şekil 2.3). Flavonol bileşikler, çayda glikozillenmemiş formlarından (aglikon) çok, şekerlerle ester yapmaları sonucu oluşan glikozid formunda

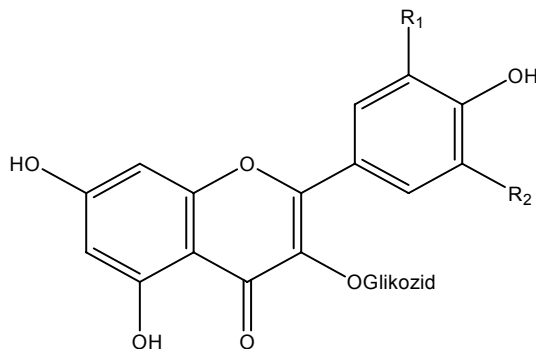
bulunurlar (Wang *et al.* 2000, Gramza and Korczak 2005) ve yapısal olarak kateşinlerden daha stabildirler (Wang and Helliwell 2001).



Mirisetin: $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$
Kuersetin: $R_1 = R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$
Kamferol: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$

Şekil 2.3 Flavonolların yapısı (Wang *et al.* 2000)

Flavonol glikozidlerin (Şekil 2.4) yapısında glukoz, ramnoz, galaktoz, arabinoz ksiloz ve rutinoz gibi şekerlerin yer almasıyla bu bileşiklerin polaritesi ve dolayısıyla suda çözünürlükleri artmaktadır ve böylece bitki hücrelerinin vakuollerinde depolanabilmektedirler.



$R_1 = R_2 = \text{H}$; Kamferol glikozid
 $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{OH}$; Kuersetin glikozid
 $R_1 = R_2 = \text{OH}$; Mirisetin glikozid

Şekil 2.4 Flavonol glikozidlerin yapısı (Tokuşoğlu 2001)

Bu bileşiklerin, bitkilerde UV radyasyonuna ve mikroorganizmalara karşı koruyucu ajan görevi üstlendikleri düşünülmektedir (Justesen *et al.* 1998).

2.4.2.2 Taze çay yaprağının fenolik madde bileşimini etkileyen faktörler

Taze çay yaprağının polifenol bileşimi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu faktörler:

2.4.2.2.1 Hasat sonrası işlem

Kateşinlerin miktarı yaprakların hasat edilmesinden işlenmesine kadar geçen sürede maruz kaldığı koşullara göre değişime uğrayabilmektedir. Örneğin, yığın halinde toplanmış yaprakların depolanma ve taşınması sırasında sıcaklık yüksek tutulduğunda yaprakların solunumu hızlanarak, daha çok ısı açığa çıkması nedeniyle kızılaşma olmakta ve bu durum yaprakların bozulmasına yol açmaktadır. Sıcaklık artışının yanı sıra yapraklar yetersiz oksijene de maruz kaldığından, aerobik solunum yerine anaerobik solunum gerçekleşir ve bu defa daha az enerji açığa çıkar. Buna karşın bu kez farklı ve istenmeyen ürünler oluşur, sonunda yaprakların kalitesi yine olumsuz yönde etkilenir. Siyah çay üretiminde bu durumlar söz konusu olduğunda, üretimi tamamlanmış olan çayda, çayın en önemli kalite kriterleri olan TF ve TR profilinde farklılıklar meydana gelmektedir. Bu nedenle sıcaklık 35 °C'yi geçmemeli ve ortamda yeterli miktarda oksijen bulunmalıdır. Bununla birlikte, yapraklarda fiziksel hasarların oluşması durumunda polifenollerin oksidasyona uğraması sonucunda kırmızı renk oluşumu görülür ki bu da kalitenin düşmesine yol açmaktadır. Kırmızı yapraklardan üretilen siyah çayların daha düşük TF içerdiği belirtilmektedir (Tomlins and Mashingaidze 1997). Sıcaklık 40 °C'nin üzerinde olduğunda oksidasyon çok daha hızlanmaktadır.

2.4.2.2.2 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). En fazla toplam kateşin genç yapraklarda (2.5 yaprak), daha sonra olgun (alttaki) yapraklarda ve en az gövdede bulunmaktadır (Caffin *et al.*

2004). Tayvan çay klonları üzerinde yapılan bir çalışmada en fazla toplam kateşinin genç yapraklarda (% 5.86), daha sonra olgun yapraklarda (% 2.15) ve en az gövdede (% 0.85) bulunduğu gösterilmiştir (Lin *et al.* 1996). Aynı çalışmada bireysel kateşinlerin miktarının da bitki organlarına göre farklılık gösterdiği belirtilmiştir. Chen *et al.* (2003) tomurcuktan itibaren 10. yaprağa kadar kateşinlerin değişimini incelemişler ve C konsantrasyonunun tomurcuk ve 3. yaprak arasında belirgin şekilde arttığını, EGCG'nin tomurcuk ve 4. yaprak arasında belirgin şekilde azaldığını, EGC'nin tomurcuk ve 6. yaprak arasında belirgin şekilde arttığını ve EC'nin tomurcuk ve 6. yaprak arasında önemli bir değişim göstermediği ancak 8 ve 10. yaprak arasında belirgin şekilde arttığını tespit etmişlerdir. CG ise hiç bir durumda tespit edilememiştir. Diğer taraftan bu sonuçlardan farklı olarak, Lin *et al.* (2003) EGCG, EGC, ECG ve EC seviyelerinin genç yapraklarda (1-3.) çok düşük, 9. yaprakta ise en fazla olduğunu göstermişlerdir. Çay kateşinlerinin özellikle kuvvetli antioksidan ve antimikrobiyel aktivitelerinden dolayı, daha fazla kateşin içeren genç yapraklarla yüksek kaliteli yeşil çay üretilmektedir. Siyah çay üretimi açısından da, 2.5 yaprak kullanıldığında siyah çayın en önemli kalite bileşenlerinden olan TF en yüksek seviyeye ulaşırken, yaprakların sayısı arttıkça polifenol miktarlarında ve polifenoloksidaz aktivitesindeki azalma nedeniyle teafavinlerde azalma görülmektedir (Tüfekci and Güner 1997).

2.4.2.2.3 Mevsimsel farklılık

Yapraklardaki polifenol miktarı ve dağılımı hasat edilen sürgün dönemlerine göre farklılık göstermektedir. Bu durum farklı mevsimlerde bitkinin gelişme oranının farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Caffin *et al.* (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, Avustralya taze çay yapraklarında soğuk mevsimde veya yavaş gelişme koşullarında gallatlanmış kateşinlerin miktarında sıcak aylara göre önemli oranda ($p < 0.05$) azalma saptanırken, esterleşmemiş kateşinlerin miktarı soğuk mevsimlerde daha fazla bulunmuştur. Siyah çay üretimi açısından ECG ve EGCG'nin fazla miktarlardaki TF oluşumundan sorumlu olması nedeniyle, aynı araştırmacılar tarafından, sıcak aylarda hasat edilen yapraklardan en iyi kalite siyah çay üretilbileceği belirtilmiştir. Lin *et al.* (1996) farklı dönemlerde hasadı yapılan 10 farklı çay klonunda HPLC ile yaptıkları kateşin analizi sonucunda yaz dönemi toplanan çayların toplam kateşin miktarlarının (ort. %

5.25) bahar döneminde toplananlardan (ort. % 3.77) daha fazla olduğunu saptamışlardır. Benzer şekilde, Chou *et al.* (1999) tarafından 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 genellikle daha yüksek kaliteli çay üretildiği belirtilmektedir (Robertson 1983).

Kateşinlerin yüksek olduğu mevsimde hasadı yapılan yapraklarla çay üretimi, çayın sağlık üzerine olan etkisini artırmaktadır. Chou *et al.* (1999), yazın toplanan çay yapraklarından üretilen oolong çayının, diğer mevsimlere göre en fazla antimikrobiyel aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Bu durumun yüksek kateşin miktarı ile ilgisi olduğu belirtilmektedir.

2.4.2.2.4 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. İşgücünü, dolayısıyla işçilik maliyetlerini azaltmak amacıyla (Ravichandran and Parthiban 1998b) makine ile hasat yapıldığı durumda, genellikle daha olgun, daha kaba, kalın ve zarar görmüş yaprak miktarı fazla olduğundan, toplanan yaprakların kateşin miktarları elle yapılan hasattakine göre daha düşüktür (Caffin *et al.* 2004). Tüm hasat dönemi süresince elle hasat edilen taze çay yapraklarında toplam fenolik bileşiklerin miktarı 258.23-304.75 mg/g ka olarak bulunurken, makine ile hasat edilenlerde daha düşük, 206.98-273.11 mg/g ka saptanmıştır (Caffin *et al.* 2004). Bunun nedeni makine ile hasatta ürüne yaşlı yaprakların da karışmasıdır. Polifenol içeriklerinin yüksek olmasının yanı sıra, elle toplanan yapraklardan üretilen çaylar, organoleptik özellikler açısından da daha üstün kabul edilmektedir (Ravichandran and Parthiban 1998b). Ancak bazen gübrelemeden kaynaklanan tersi durum da söz konusu olabilmektedir. Gübrelemenin yaprakların gelişimini hızlandırması sonucunda mekanik olarak yapılan hasat ile daha genç, körpe yapraklar toplanabilmektedir.

2.4.2.2.5 Çeşit

Taze çay yaprağında en önemli grubu oluşturan kateşinlerin miktarı çay klonlarına göre değişebilmektedir (Lopez *et al.* 2005, Saravanan *et al.* 2005). Farklı çay klonları arasında polifenollerin dağılım profili büyük farklılık gösterirken, aynı klon içinde aşağı yukarı profilin aynı olduğu ve ayrıca polifenol miktarlarında belirgin değişimler olmasına rağmen polifenollerin nispi oranları arasında farklılıklar görülmediği belirtilmektedir (Caffin *et al.* 2004). Obanda and Owuor (1997)'a göre aynı klon içinde taze çay yapraklarının toplam polifenol miktarı açısından minimal değişimler görülürken, kateşin bileşimi açısından klonlar arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Wright *et al.* (2000) tarafından, çay tadımcılarının değerlendirmelerine göre düşük ve yüksek kaliteli olarak belirlenmiş olan toplam 40 çay klonu ile yapılan bir çalışmada, teafavin oluşumu için sınırlandırıcı faktör olan dihidroksi flavan-3-ollardan başta EC ve ikinci sırada ECG açısından, yüksek ve düşük kaliteli klonlar arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Bu farklılık trihidroksi flavan-3-ollar açısından da gözlenmiş olup, öncelikle EGC daha sonra EGCG'nin klon kalitesi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Obanda and Owuor (1997)'in farklı klonlara ait Kenya çaylarında yaptıkları bir araştırmada, toplam polifenol miktarı aynı klon içinde minimal farklılıklar gösterirken klonlar arasında önemli farklılıklar görülmüştür. Klonların mg kateşin/g yaş ağırlık üzerinden 52.25-73.75 düzeyinde polifenol içerdiği saptanmıştır. Bireysel flavan-3-ol içerikleri de klonlara göre değişmiş yani flavan-3-ol kompozisyonu klona bağlı bulunmuştur. Klona göre değişmek üzere en fazla ya EGCG ya da EGC saptanmıştır. Wright *et al.* (2002) teafavin digallat dışındaki diğer bireysel teafavinler açısından düşük ve yüksek kaliteli klonlar arasında önemli farklılıklar gözlemiştirlerdir. Çay klonları arasında sadece polifenoller açısından farklılık olmayıp aynı zamanda, klonların siyah çay kalitesi açısından önemli bir enzimi olan polifenoloksidaz enzim seviyeleri de farklılık göstermektedir. Daha da ötesi enzim/substrat oranının yüksek olması TF'in miktarını artırdığından kaliteli çay klonlarının belirlenmesinde bu oranın önemli bir kalite kriteri olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (Lopez *et al.* 2005).

Düşük ve yüksek kaliteli ya da farklı özellikteki klonlar genellikle karıştırılarak çaya işlenmektedir. Örneğin, yavaş fermente özelliğine sahip bir klon ile hızlı fermente

olabilen bir klon karıştırıldığında, optimal teafavin oluşumu için daha elverişli bir ortam sağlanmaktadır. Aynı zamanda ortalama verimden daha fazla verim elde edilmektedir. Çay üretimi için fermentasyon yeteneği düşük olan klonlar tek başına kullanıldığında 90 dk süren fermentasyon sonrasında dahi renkleri yeşil kalabilmektedir. Bu özelliğe sahip klonların yeşil çay üretimi için daha uygun olduğu belirtilmektedir. Karışım yapıldığı durumda ise, karışım oranları istenilen verim ve kalite arasındaki dengeye göre belirlenmektedir (Owuor and Obanda 1999).

2.4.2.3 Taze çay yaprağında bulunan fenolik maddelerin sağlık üzerine etkileri

2.4.2.3.1 Flavan-3-ol bileşiklerinin etkileri

Son yıllarda çay kateşinlerine biyolojik aktivitelerinden dolayı çok fazla ilgi gösterilmektedir (Chen *et al.* 2001). Çayın yararlı özelliklerinin antioksidan (Zandi and Gordon 1999, Mello *et al.* 2005, Navas *et al.* 2006), antimutajenik (Halder *et al.* 2005), antikarsinojenik (Han 1997) ve antibakteriyel (An *et al.* 2004) etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çay kateşinleri, bir H atomu vericisi olarak serbest radikalleri indirgeme, zincir oksidasyon reaksiyonlarını engelleme veya metallerle çelat yapma yeteneğine sahip olduğundan antioksidan olarak davranırlar (Gramza *et al.* 2006). Bireysel kateşinlerin antioksidan aktivitesi fenolik hidroksil grupların sayısı ve konumuna bağlı olarak farklılık göstermektedir. Nanjo *et al.* (1996)'nın kateşinlerin DPPH radikalini bağlaması üzerine etkisini inceledikleri çalışmada, galloillenmiş kateşinler (ECG, CG, EGCG ve GCG) galloillenmemiş kateşinlerden (C, EC, EGC ve GC) daha güçlü antioksidan aktivite göstermiştir. Galloil grubun ve B halkasındaki orto-trihidroksil grubun serbest radikal bağlama açısından çok önemli yapısal özellikler olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçla uyumlu olarak, Leung *et al.* (2001) tarafından, EGCG'nin 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 *et al.* (2005) tarafından da gösterilmiştir. Aynı çalışmada, EGCG'ı sırasıyla ECG, EGC ve EC=GC izlemiştir. Diğer taraftan, Liu *et al.* (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, çay polifenollerinin peroksil radikalinin neden olduğu lipid peroksidasyonunu engellediği saptanmıştır ve en yüksek antioksidan

aktiviteye sahip polifenolün, EC olduğu ve bunu sırasıyla EGCG, ECG ve EGC'in izlediği belirtilmiştir.

Kateşinlerin etkinlik açısından antioksidan aktivitelerinin sıralamasındaki farklılık, kullanılan yöntemlerin farklılığından kaynaklanmaktadır (Hu and Skibsted 2002). Bunlar, genel olarak, radikal tutma yeteneğini ve hızlandırılmış koşullarda lipid oksidasyonunu engelleme yeteneğini ölçen testler olmak üzere iki grup altında toplanmaktadır ve bu metotlar farklı fiziksel ve kimyasal prensiplere dayandığından antioksidanların aktivitesi, kullanılan yöntemle ilgili olarak değişebilmektedir (Schwarz *et al.* 2001). Birinci grup antioksidanlar hidrojen vericisi (donör) olarak serbest radikalleri bağlarken, ikinci grup antioksidanlar alıcı (akseptör) olarak oksijeni bağlama, metallere kompleks yapma veya UV radyasyonunu absorbe etme gibi mekanizmalarla lipidleri oksidasyona karşı korur (Gramza and Korczak 2005).

Kateşinler gerek gıdalarda bozulma yapan gerekse insanlarda hastalık etmeni olan patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyel etki göstermektedir. Bu etkileri mikroorganizma ve kateşin cinsine göre değişiklik göstermektedir. Kateşinlerin genel olarak Gram (+) bakterilere, Gram (-) bakterilerden (*E. coli* ve *S. enteridis* gibi) daha etkili olduğu bilinmektedir (Dufresne and Farnworth 2001, Proestos *et al.* 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 *et al.* 2003). Japonya'da sıcak içecek sunan makineler aracılığı ile tüketilen, "shiruko" içeceğine farklı konsantrasyonlarda ilave edilen yeşil çay ekstraktının bu içeceklerde gelişebilen *B. stearothermophilus* IAM 1035 sporlarına karşı etkili oldukları saptanmıştır (Sakanaka *et al.* 2000).

Kateşinlerin antioksidan aktiviteleri arasında görülen farklılık, benzer biçimde, antimikrobiyel özellikleri için de gözlenmektedir. Kajiya *et al.* (2002)'nin, model bakteri membranı olarak liposomları kullanarak yaptıkları çalışmada, yeşil çay kateşinlerinin lipid tabakalarına affinite (ilgi) gösterdiği ve bu durumun kateşinlerin yapılarında bulunan B halkasındaki hidroksil grup sayısına, galloil yapının olup olmamasına ve stereo-kimyasal yapılarına bağlı olarak farklılık gösterdiği saptanmıştır.

Sugita-Konishi *et al.* (1999), yeşil çay kateşinlerinin *Escherichia coli*'nin salgıladığı *vero* toksinler üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada, EGCG ve GCG'ın belirgin biçimde söz konusu toksini inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Sakanaka *et al.* (2000) başlıca çay polifenollerinden C, EC, GC, EGC, ECG, EGCG ve GCG'ın bakteri sporlarının ısıya direnci üzerine etkisini incelemişler ve ECG, GCG ve EGCG'ın galloil grubunu içermelerinden dolayı diğer kateşinlere göre *Clostridium thermoaceticum* sporlarının ısıya direncinin azalmasında çok etkili olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde, mide hastalıklarının etmenlerinden biri olan ve antibiyotiklere direnç gösteren *Helicobacter pylori* suşlarına karşı, kateşinlerin antimikrobiyel etkisinin incelendiği bir araştırmada, EGCG ile ECG anti-*H. pylori* aktivitesi gösterirken diğer kateşinler herhangi bir etki göstermemiştir (Yanagawa *et al.* 2003).

Yeşil çay polifenollerini aynı zamanda antimitojenik aktiviteye sahiptir (Hour *et al.* 1999). Geetha *et al.* (2004)'nın yeşil çay ekstraktı (GT), C ve EC'in antimitojenik aktivitesini araştırdıkları bir çalışmada, her üçünün de iyi bilinen bir antioksidan olan askorbik asitten daha etkili olduğu ve EC'in C'den 1.2 kat , GT'ndan ise 5 kat daha fazla aktivite gösterdiği saptanmıştır.

2.4.2.3.2 Flavonol bileşiklerin etkileri

Flavonol bileşiklerin antikarsinojenik ve antioksidan özelliklerinin olduğu bilinmektedir (Wang and Sporns 2000). Kuersetin glikozidlerinin flavonol glikozidler içinde en fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Diğer taraftan, kuersetinin antioksidan aktivitesinin aglikon formunda iken yüksek, şekerlerle birleştiğinde ise daha az olduğu belirtilmektedir (Rice-Evans *et al.* 1997, Dufresne and Farnworth 2001, Caffin *et al.* 2004). Buna ilave olarak, bağlanan şekerlerin cinsi de antioksidan aktiviteyi etkilemektedir. Örneğin, kuersetine bir ramnoz bağlandığında, rutinozun bağlandığı duruma göre radikal tutma kapasitesi önemli oranda azalmaktadır (Heim *et al.* 2002). Aglikon formundaki kuersetinin antioksidan aktivitesindeki artışa C halkasında, glikozid formundan farklı olarak, 3-hidroksil grubunu içermesi neden olmaktadır (Rice-Evans 1997). Kuersetin bileşiğinde antioksidan aktiviteden sorumlu

gruplar, B halkasındaki o-dihidroksi yapı ve C halkasındaki 2-3 çift bağ, 4 keto (karbonil) ve 3 hidroksi yapılarıdır.

2.4.2.4 Siyah çayın fenolik madde bileşimi

2.4.2.4.1 Flavan-3-ol bileşikleri

Önceki bölümlerde belirtildiği gibi çay yaprağında bulunan kateşinlerin miktarı, siyah çay üretimi sırasında fermentasyon aşamasında önemli oranda azalmaktadır. Bu nedenle, yeşil çayın başlıca fenolik bileşikleri olan kateşinlerin, siyah çayda ya hiç bulunmadığı ya da düşük miktarda bulunduğu açıktır (Stewart *et al.* 2005) (Çizelge 2.5). Lin *et al.* (1998) fermentasyonun çay kateşinleri üzerine etkisini göstermek amacıyla taze çay yaprağını % 0 ile % 85 arasında değişen oranlarda fermentasyona uğratarak siyah çay da dahil olmak üzere dört farklı tipte çay elde etmişlerdir. Araştırmacıların sözü konusu çaylarda yaptıkları kateşin analizi sonucunda, mg/g ka olarak EGCG miktarının 64.6'dan 3.0'e, EGC'in 7.2'den 1.9'a, EC'in 5.4'den 0.4'e düştüğü, diğer kateşinlerin (ECG, C ve GCG) ise saptanamadığı belirtilmiştir.

Çizelge 2.5 Farklı tipte çayların kateşin ve kafein miktarları (mg /100ml dem)
(Wang *et al.* 2000)

Kateşin	Gunpowder yeşil çayı	Sencha yeşil çayı	Keemun siyah çayı	Sri Lanka siyah çayı
GC	2.57	2.81	0.4	1.57
EGC	29.7	36.2	0.9	1.84
C	0.69	1.41	t.e.	0.5
EGCG	32.6	28.8	0.95	1.16
EC	5.58	9.54	t.e.	1.45
GCG	0.51	1.02	t.e.	t.e.
ECG	4.26	4.92	1.19	2.92
Toplam kateşin	76	84.6	3.44	9.43
Kafein	23.9	28.9	38.2	22.9

^{t.e.} Tespit edilemedi

2.4.2.4.2 Flavonol bileşikler

Flavonol bileşiklerden siyah çayda en fazla kuersetin ve kamferol bulunurken en az mirisetin bulunmaktadır (Çizelge 2.6). Hertog *et al.* (1993) çeşitli siyah çaylarda flavonoid olarak sırasıyla kuersetin (10-25 mg/L), kamferol (6.3-17 mg/L) ve mirisetin (1.7-5.2 mg/L) saptamışlardır. Justesen *et al.* (1998) tarafından çeşitli gıdalarda flavonoidlerin araştırıldığı bir çalışmada, çayda kamferol ve daha fazla miktarda kuersetin olmak üzere 2 flavonol bileşiği belirlenmiştir.

Çizelge 2.6 Farklı çay yapraklarının flavonol içeriği (g/kg kuru yaprak)
(Wang and Helliwell 2001)

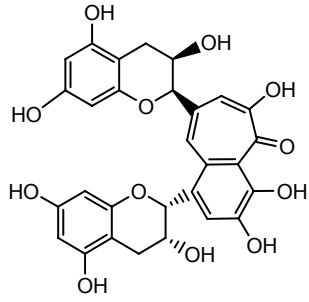
Çay yaprağı	Mirisetin	Kuersetin	Kamferol
<i>Yeşil çay</i>			
Gunpowder	1.59	4.05	1.56
Zhejiang	0.93	2.84	2.38
<hr/>			
Sencha	1.32	3.75	3.31
Longjing	0.83	1.79	2.41
<hr/>			
<i>Siyah çay</i>			
Qimen	0.24	1.04	2.31
Seylan	0.52	3.03	1.72

Flavonol glikozid olarak da, siyah çaylarda en önemli grubu toplam flavonol içeriğinin % 50-76'sını oluşturan kuersetin glikozidler oluştururken kamferol glikozidleri ikinci sırada yer almaktadır. Mirisetin glikozidleri ise yalnızca bazı siyah çaylarda bulunmaktadır (Price *et al.* 1998). Stewart *et al.* (2005), yeşil ve siyah çayın % 1'lik su ekstraktında sırasıyla 129 µM ve 152 µM toplam flavonol olmak üzere kuersetin ve kamferol glikozidlerini saptamışlardır. Araştırmacılar, kuersetin glikozidlerin miktarının kamferol glikozidlerden daha fazla olduğunu ve ayrıca çay yaprağında bulunan flavonol miktarının, siyah çay üretiminde fermentasyon sırasında çok az değişime uğradığını belirtmişlerdir. Flavonol glikozidlerin miktarının, siyah çay üretimi sırasında PPO enziminden etkilenmediği, bir dereceye kadar mirisetinin etkilendiği belirtilmektedir.

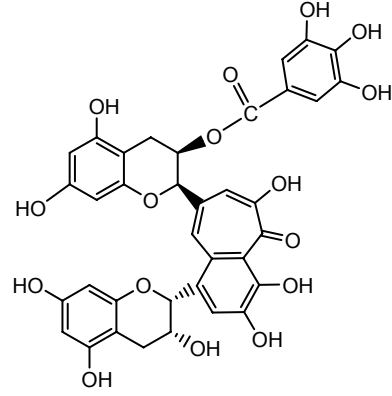
(Wang and Helliwell 2001). Bu sonuçlarla uyumlu olarak, Hertog *et al.* (1993) yeşil ve siyah çayda bulunan flavonoid (kuersetin, kamferol ve mirisetin) miktarlarının Sencha yeşil çayındaki mirisetin miktarı hariç birbirine yakın olduğunu belirtmişlerdir. Mirisetin miktarında fermentasyon aşamasında azalma meydana gelmesi, aynı şekilde azalma gösteren EGCG ile kimyasal yapı olarak benzerlik göstermesi ile ilişkilendirilmektedir (Peterson *et al.* 2005).

2.4.2.4.3 Teaflavin ve tearubijin bileşikleri

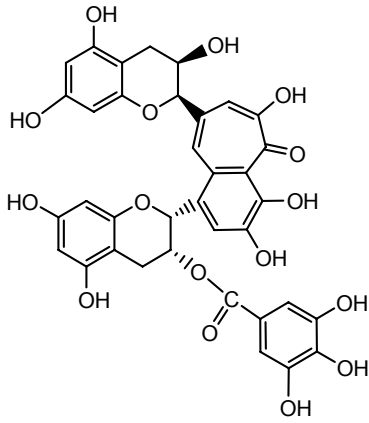
Siyah çay üretimi sırasında, yaprakların oksidasyona uğratılmasıyla önemli biyokimyasal değişiklikler meydana gelir ve çayın kalite bileşenleri ile karakteristik aroması oluşur. Oksidasyon sırasında genellikle yaprakların kloroplast bölümünde yer alan PPO enzimi, esas olarak vakuolde lokalize olan fenolik bileşiklerle bunların başında da kateşinlerle kıvrırma/parçalama ve fermentasyon sırasında oksijen eşliğinde reaksiyona girer (Lopez *et al.* 2005) ve siyah çayın en önemli fenolik bileşiklerinden ve aynı zamanda pigmentlerinden dimerik TF (Şekil 2.5) ve polimerik TR (Şekil 2.6) oluşur. 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 *et al.* 2001). Siyah çayın kalitesi ve pazar değeri ile teaflavinlerin yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (Wright *et al.* 2000). Siyah çayda toplam konsantrasyonu % 2'yi geçmeyen, hatta genellikle % 0.3 gibi düşük düzeyde olabilen, parlak portakal kırmızı renkteki TF'in sentezi ve moleküler yapısı çok iyi bilinirken, daha heterojen yapıdaki, kuru çay ağırlığının % 10-15'ini oluşturan, kahverengimsi kırmızı renkteki TR'in kimyasal yapısı ve oluşum mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Wright *et al.* 2002, Bonnely *et al.* 2003, Haslam 2003, Obanda *et al.* 2004, Sang *et al.* 2004, Owuor and Obanda 2007).



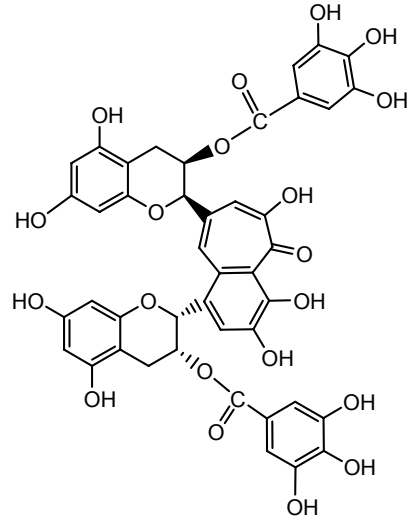
Basit teaflavin (TF-f)



Teaflavin-3-gallat (TF-3-G)

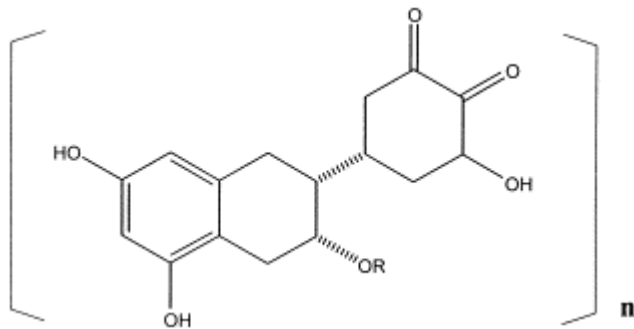


Teaflavin-3'-gallat (TF-3'-G)



Teaflavin-3-3'-digallat (TF-3-3'-DG)

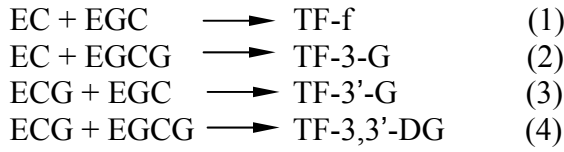
Şekil 2.5 Teaflavinlerin yapısı (Kuroda and Hara 1999)



Şekil 2.6 Tearubijinlerin genel yapısı (Wang *et al.* 2000)

Polifenollerin oksidasyon reaksiyonlarında başlıca iki enzim rol oynar. Bunlardan biri, PPO olup, esas olarak kateşinlerin kinonlara dönüşümünü sağlar. Çay yapraklarının PPO aktivitesi klon, mevsim, yaprağın bölümleri ve proses gibi çeşitli parametrelere bağlı olarak geniş ölçüde farklılık göstermektedir (Çizelge 2.7). Lopez *et al.* (2005)'in, çay klonlarının enzim aktivitesi ve substrat seviyesindeki değişiklikleri inceledikleri araştırmada kateşinler ve PPO değişim göstermiş ve bu durum siyah çay kalitesini etkilemiştir. Araştırmacılara göre enzim-substrat oranı yüksek olan klonlardan üretilen siyah çayın TF miktarı önemli oranda yüksek bulunmuştur.

PPO enzimi, kateşinlerin o-dihidroksi (kateşin) ve o-trihidroksi (gallokateşin) fenil "B" halkalarının, oldukça reaktif o-kinon türevlerine oksidasyonunu katalize eder (Haslam 2003). Aşağıdaki eşitliklerde (1-4) görüldüğü gibi, B halkası dihidroksillenmiş kateşinlerin, EC ve ECG, oksidasyonundan oluşan kinonlar ile B halkası trihidroksillenmiş kateşinlerden, EGC ve EGCG, oluşan kinonların kondenzasyonu sonucu 4 farklı TF oluşur (Obanda *et al.* 2001).

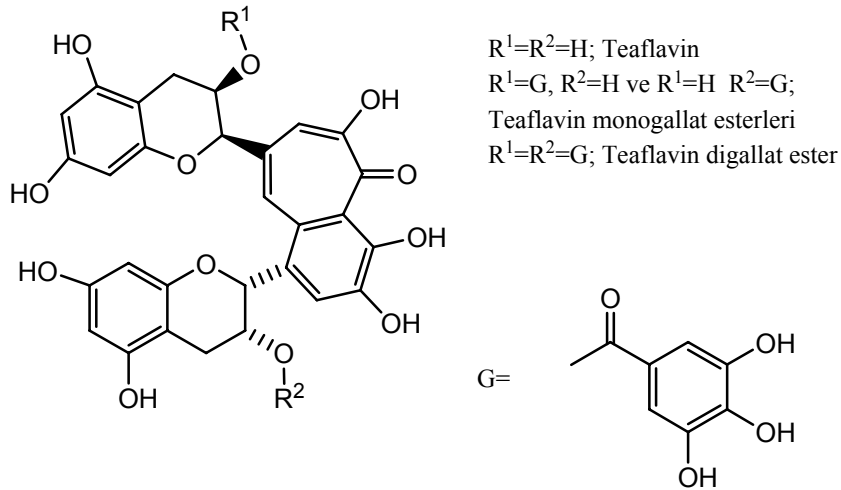
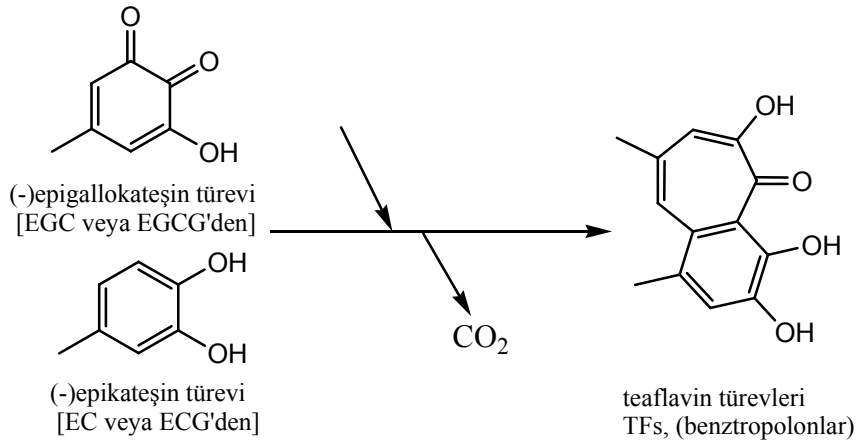
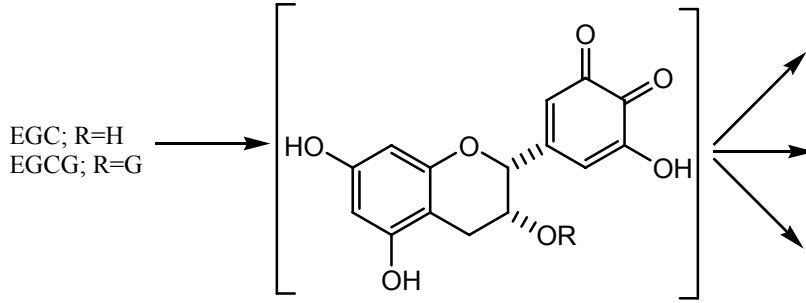
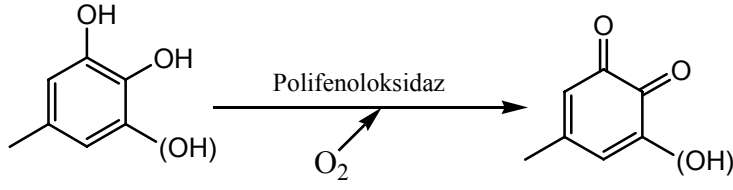


Çizelge 2.7 Çay yapraklarının PPO aktivitesi* değişimi
(Ravichandran and Parthiban 1998a)

Parametre	PPO*	
Klon	UPASI-3	46
	UPASI-9	36
	UPASI-17	29
	SA-6	14
	TRI-2024	39
	CR-6017	41
	Yaprak bölümü	Tomurcuk ve 1. Yaprak
2. Yaprak		34
3. Yaprak		31
4. Yaprak		29
Gövde		9
Mevsim	Ocak-Mart	29
	Nisan-Haziran	38
	Temmuz-Eylül	33
	Ekim-Aralık	35
Proses	Taze yaprak	37
	Hasar görmüş yaprak	33
	Soldurulmuş yaprak	
	hafif	33
	normal	30
	aşırı	28
	Kıvrılmış yaprak	35
	Fermente olmuş yaprak	
	15 dk	39
	30 dk	39
	45 dk	34
	60 dk	21
	Kurutulmuş yaprak	
1 dk	24	
10 dk	9	
20 dk	4	
30 dk	2	
Kuru çay (Altı ay depolanmış)	0	

* 1 ünite = 1 dakikada okside olan 1 µmol kateşin

Şekil 2.7’de teaflavinlerin oluşumu görülmektedir. ECG ve EGCG, galletlanmış kateşinler, galletlanmamış kateşinlerden daha hızlı harcanır (Bonnely *et al.* 2003). Dolayısıyla galletlanmış TF’ler daha önce oluşur.



Şekil 2.7 Teaflavinlerin oluşumu (Haslam 2003)

TF'ler, oksidasyonun ilk 5 dakikasında meydana gelir, 15 dakika sonra ise maksimum verime ulaşılır. Diğer taraftan, oksidasyon devam ederken TF'ler dereceli olarak azalır, 3 saat sonra yaklaşık % 70'i, 7 saat sonra ise % 30'u ortamda kalır (Bonnely *et al.* 2003). Oksidasyon reaksiyonu, oksidasyonun başlangıç aşamalarında hızlı gerçekleşirken oksijen tüketiminin arttığı aşamada azalma göstermektedir (Lopez *et al.* 2005).

Siyah çay üretiminde pigment oluşumunda rol oynayan ikinci önemli anahtar enzim de POD'dır (Bonnely *et al.* 2003). POD enzimi, o-difenoller, peroksit varlığında kinonlara katalize edebilmektedir. PPO'nun belirli kateşinler üzerine etkisi sırasında oluşan H₂O₂ POD için gerekli peroksit kaynaklarından birisidir. POD'ın siyah çay pigmentlerinin oluşumuna katkısı, hala tam olarak aydınlatılmamasına karşın at kestanesi POD'ının çay kateşinlerini, H₂O₂ varlığında, teaflavin tipi bileşiklere okside ettiği saptanmıştır (Sang *et al.* 2004). Diğer taraftan POD, TF'lerin galloil ester gruplarının, H₂O₂ varlığında kateşinlerle reaksiyona girerek yeni teaflavin benzeri kateşin trimerlerini oluşturmasında da rol oynamaktadır (Haslam 2003). Dolayısıyla, TF'lerin O₂ ve PPO enzimine karşı oldukça stabil olmasına karşın, POD teaflavinlerin azalmasına neden olabilmektedir. POD enzimi, flavonol glikozidlerin miktarında da (mirisetin glikozidleri hariç) azalmaya neden olmaktadır.

TF'ler, siyah çayın kalitesini belirlemede en önemli kriter olduğundan (McDowell *et al.* 1991, Wright *et al.* 2002) çayda yüksek miktarda bulunmaları çayın piyasa değerini artırmaktadır. Farklı ülkelerde üretilen farklı tipte siyah çaylarda çayın duyu kalitesi ile teaflavin bileşiklerinin toplamı ya da bireysel teaflavin bileşikleri arasında yüksek korelasyon bulunmuştur (Wright *et al.* 2000, Obanda *et al.* 2001, Liang *et al.* 2003, Owuor *et al.* 2006). Teaflavin bileşiklerinin aynı zamanda siyah çayın antioksidan aktivitesinde önemli paya sahip olması (Miller *et al.* 1996, Leung *et al.* 2001, Stewart *et al.* 2005) nedeniyle, çayda miktarlarının fazla olması istenir.

Farklı tipte siyah çaylar arasında, fenolik madde bileşimi açısından işleme yöntemi (Ortodoks, CTC), hibrit tipi (Hindistan, Çin), ülke ya da bölge (Assam, Çin, Kenya)

(Çizelge 2.8) ve çeşide (karışık veya saf) göre farklılıklar görülmektedir (Peterson *et al.* 2004).

Çizelge 2.8 Farklı ülkelerde üretilmiş siyah çayların kateşin ve TF içerikleri*
(Ding *et al.* 1992)

Bileşik	Assam Broken	Kenya	Çin
EGCG	1.21	0.84	0.36
EGC	2.72	2.21	1.23
ECG	1.03	0.74	0.28
EC	0.14	0.19	0.08
C	0.21	0.22	0.07
TF-f	0.16	0.11	0.07
TF-3-G	0.12	0.06	0.03
TF-3'-G	0.24	0.18	0.11
TF-3,3'-DG	0.31	0.12	0.08
Toplam TF	0.83	0.47	0.29

* g /100g KM

2.4.2.5 Siyah çayın fenolik madde bileşimini etkileyen faktörler

Hangi tip siyah çay olursa olsun, siyah çayın üretim aşamaları, çayın fenolik madde bileşimini özellikle de teaflavin içeriğini önemli ölçüde etkilemektedir.

2.4.2.5.1 Soldurmanın etkisi

Soldurulmuş yaprakların nem içeriğinin fazla olması (kısa süren soldurma sonucu) daha sonraki fermentasyon aşamasında teaflavinlerin oluşumunu, dolayısıyla çay likörünün parlaklığını artırmaktadır. Nemdeki azalmaya bağlı olarak polifenollerin oksidasyonundan sorumlu olan polifenoloksidaz aktivitesinde kayıp görülmektedir (Ravichandran and Parthiban 1998a). Bunun sonucu olarak, örneğin nem içeriğinin % 72.5'dan % 68'e düşmesi, TF'lerde % 16 azalmaya yol açmaktadır (Tomlins and Mashingaidze 1997).

2.4.2.5.2 Kivırma / parçalamanın etkisi

Kivırma işlemi ile yaprakların hücre yapıları parçalanır ve hücre içindeki oksidasyondan sorumlu enzimler ile kateşinlerin teması gerçekleşir. Kateşinlerin enzimatik oksidasyonu, yaprakların zarar görmesinin hemen ardından başlar (Borah and Bhuyan 2005) ve oksidasyonun derecesi yaprakların parçalanma derecesine bağlı olarak değişir (Astill *et al.* 2001). Örneğin, CTC yönteminde yaprak hücreleri ortodoks yöntemle göre, çok daha etkili parçalanmaktadır ve bu nedenle TF'lerin oluşumu daha kısa sürede gerçekleşmektedir (Hazarika *et al.* 1984, Mahanta 1988). Kateşinlerin başlıca oksidasyon ürünü olan TF'lerin miktarı yaprağın bu mekanik hasara karşı direnci ve işleme yönteminin yanı sıra, yaprağın kateşin içeriği ve oksidaz aktivitesine bağlı olarak da değişmektedir.

2.4.2.5.3 Fermentasyonun etkisi

Fermentasyon sırasında siyah çayın polifenolleri çeşitli faktörler tarafından etkilenmektedir. Bu faktörler şu şekilde sıralanabilir:

Polifenoloksidaz aktivitesi: Çay yaprağının enzim aktivitesi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Ravichandran and Parthiban 1998a). TF miktarı, PPO enzim aktivitesinin yanı sıra enzim/substrat oranına da bağlıdır. Bu oran ne kadar yüksekse TF miktarı da o kadar artış ($r^2 = 0.955$) göstermektedir (Lopez *et al.* 2005).

Sıcaklık: Düşük sıcaklıklarda (20 °C) uygulanan fermentasyon sırasında, yüksek sıcaklıklarda (30 °C) uygulanan fermentasyona göre daha fazla TF oluşurken, bu sonuca paralel olarak çay deminin burukluğu ve parlaklığı da önemli düzeyde artış göstermektedir (Obanda *et al.* 2001).

Süre: Fermentasyonun ilk aşamasında süredeki artışa bağlı olarak TF'lerin miktarı da artmaktadır. Sürenin artmasıyla en fazla TF oluşumunun görüldüğü nokta arasındaki süre en uygun fermentasyon süresi olarak düşünülür. Bu noktadan sonra süredeki artışa bağlı olarak TF'lerin miktarında azalma meydana gelmektedir (Muthumani and Senthil-

Kumar 2007b). Azalmanın derecesi, fermentasyon sıcaklığı yükseldikçe artmaktadır (Obanda *et al.* 2001). En uygun fermentasyon süresini belirlemek için farklı ülkelerde aşağıda belirtilen farklı metodlar kullanılabilir (Caffin *et al.* 2004).

- EGCG'daki azalmanın belirlenmesi (Hindistan)
- Üretim sırasında, oluşan teaflavin miktarının tadımcılar tarafından belirlenmesi (Malawi)
- Çay tadımcıları ile duyu test yapılması (Kenya)
- Üretilen çayda teaflavin içeriğinin belirlenmesi (Kenya)

Özellikle yaz aylarında daha fazla görülen gün içindeki sıcaklık değişimlerinin fermentasyon oranını etkilemesi nedeniyle, proses sırasında fermentasyon süresinin sıcaklık değişimlerine göre ayarlanması gerekmektedir (Caffin *et al.* 2004).

pH değeri: Fermente olan çayın pH'sının 5.5'den 4.5-4.8'e ayarlanması, TR'lere dönüşümlerinin engellenmesi nedeniyle TF'lerin miktarında artışa yol açmaktadır. Endüstriyel ölçekli asitlendirmenin uygulanabilir olduğu ve bu uygulamanın yapıldığı çayların pazar değerinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Caffin *et al.* 2004).

Oksijen: Fermentasyon sırasında ortamda oksijen konsantrasyonunun düşük olması, TF'lerin oluşumundan çok TR'lerin üretimini teşvik etmektedir (Robertson 1983).

Substrat konsantrasyonu: Yapraktaki toplam kateşin konsantrasyonundaki artış, PPO aktivitesini etkilemektedir. Bu nedenle TF'lerin oluşumu baskılanmaktadır. Bireysel kateşinlerin enzim üzerine etkisi farklı olup, ECG ve EGCG enzim inhibisyonuna neden olurken EC ve EGC böyle bir etki göstermemektedir (Robertson 1983). Dolayısıyla taze yaprakta basit kateşinlerin kateşin gallatlara oranı arttıkça, siyah çayda TF'lerin TR'lere oranı artmaktadır.

2.4.2.5.4 Kurutma

Kurutma işleminin, fermente olmuş yapraktaki bireysel fenolik bileşiklerde, hasat dönemine ve fenolik madde cinsine bağlı olarak azalmaya veya çok az artışa neden

olduğu belirtilmektedir (Caffin *et al.* 2004). Kıvrırma yöntemindeki farklılık, kurutulacak yaprak boyutlarının farklı olmasına yol açtığından kurutma işlemi çayın TF ve TR profilini değiştirebilmektedir. Ortodoks yöntemi ile işlenmiş yaprakların boyutlarının CTC yöntemine göre daha iri olması, kurutma sıcaklığının daha yüksek olmasını veya süresinin daha uzun olmasını gerektirmektedir. Bu durum ortodoks çaylarda yüksek molekül ağırlıklı TR'lerin miktarının, CTC çaylarına göre daha fazla olmasına yol açmaktadır (Hazarika *et al.* 1984).

2.4.2.6 Siyah çayda bulunan fenolik maddelerin sağlık üzerine etkileri

Kateşinlerin, sağlık üzerine çok fazla etkisinin olduğu iyi bilinmesine rağmen, siyah çayın fenolik bileşiklerinden TF'lerin de güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip (Liebert *et al.* 1999) ve kanseri önlemede çok etkili olduğu belirtilmektedir (Lee and Ong 2000). Yedi farklı marka İngiliz siyah çayının fenolik bileşenlerinin ve antioksidan aktivitelerinin incelendiği bir araştırmada, siyah çayların İngiliz halkının günlük beslenmesi için tükettiği birçok besin maddesinden daha fazla antioksidan aktivite gösterdiğini ve mükemmel bir polifenol kaynağı olduğu gösterilmiştir (Rechner *et al.* 2002). Serbest radikallerden reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif azot türlerinin (RNS) koroner kalp hastalığı, hücrel yaşlanma ve kanser gibi çeşitli hastalıklara neden olduğu bilinmektedir (Heim *et al.* 2002, Aruoma 2003). Sarkar and Bhaduri (2001), siyah çayın, ROS'nden superoksit anyonu (O_2^-) ve RNS'nden nitrik oksit (NO) üretimini engellemede yeşil çaydan çok daha etkili olduğunu belirlemişlerdir. Leung *et al.* (2001) tarafından yapılan çalışmada siyah çaydaki teaflavinlerin antioksidan aktivitesinin yeşil çay kateşinlerinkine eşit olduğu saptanmıştır ve bu sonuç doğrultusunda, siyah çay üretiminde fermentasyon sırasında kateşinlerin teaflavinlere dönüşümünün, bunların serbest radikal tutma yeteneğini değiştirmediği belirtilmiştir. Benzer şekilde, serum lipoproteininin oksidasyonunun engellenmesi açısından, siyah ve yeşil çayın antioksidan aktivitesi arasında önemli bir fark bulunamamıştır (Hodgson *et al.* 1999). Ayrıca, Stewart *et al.* (2005), TF'in EC monomerlerinkine yakın antioksidan aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Diğer taraftan, bu sonuçlardan farklı olarak Langley-Evans (2000) tarafından, demir indirgeme gücü (FRAP) yöntemi ile yeşil ve siyah çayların antioksidan potansiyellerinin incelendiği bir araştırmada, yeşil

çayın siyah çaya göre yaklaşık 2.5 kat daha fazla antioksidan potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir.

Yenilebilir yağlar ve yağlı gıdalarda meydana gelen oksidasyon, ürünün duyuşal özellikleri ve besin değeriinde kayıplara neden olmasının yanı sıra ürünün aynı zamanda sağlık açısından risk oluşturmasına yol açmaktadır (Gramza *et al.* 2006, Navas *et al.* 2006). Bu tip işlenmiş gıdalarda, sentetik antioksidanlara alternatif olarak doğal antioksidan kaynağı olarak bilinen bitkilerin kullanılması gıda endüstrisinde giderek artan bir önem kazanmaktadır (Proestos *et al.* 2006). Örneğın, siyah çayın havanda ezilerek toz halinde mısır yağına ilavesinin, yağın depolanması sırasında stabilitesini artırdığı ortaya konulmuştur (Navas *et al.* 2006).

Yapılan çalışmalar bireysel TF'ler arasında antioksidan aktivite açısından farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Miller *et al.* (1996) tarafından TF-3,3'-DG, hem hidrofilitik hem de lipofilitik fazda en fazla radikal tutma kapasitesine sahip bileşik olarak belirlenmiştir. Bunu takip eden diğeri bileşiklerin sıralaması TF-3'-G = TF-3-G>TF-f olarak bulunmuştur. Benzer şekilde Leung *et al.* (2001), bireysel TF bileşiklerinin LDL oksidasyonunu engellemesi üzerine etkisini incelemişlerdir. Antioksidan aktivite açısından bileşiklerin sıralaması TF-3-3'-DG>TF-3'-G>TF-3-G>TF-f olarak belirlenmiştir.

Gerek siyah çay ekstraktı, gerekse siyah çayın aktif polifenollerini olan TF ve TR önemli antimitajenik etkiye sahiptir (Gupta *et al.* 2002). Halder *et al.* (2005)'e göre TF ve TR, benzo[a]piren mutajenine karşı önemli ölçüde antimitajenik ve antiklastojenik etki göstermiştir. Daha da ötesi, Kuroda and Hara (1999) tarafından *S. typhimurium* suşlarına karşı siyah çay polifenollerinin, yeşil çay polifenollerinden daha fazla antimitajenik etki gösterdiği saptanmıştır. Diğeri taraftan, çayların antimitajen aktivitesi mutajenlerin tipine göre farklılık göstermektedir. Hour *et al.* (1999) tarafından aralarında yeşil ve siyah çayın da bulunduğu dört farklı çay ekstraktının çeşitli mutajenleri önlemesine ilişkin yapılan bir çalışmada, folpet ve monokrotofos mutajenlerine karşı en fazla etkiyi yeşil çay ekstraktının gösterdiği ancak benzo[a]piren mutajenine karşı siyah çay ekstraktının en etkili ekstrakt olduğu ortaya konulmuştur.

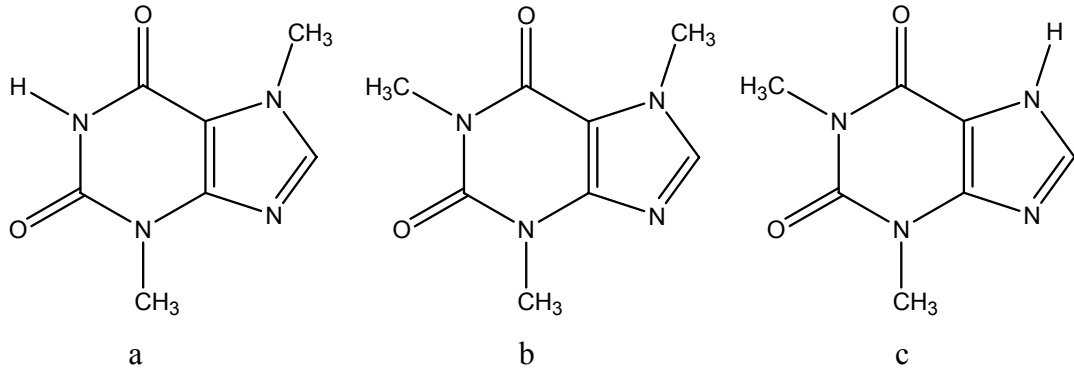
Çay ekstraktları, *Salmonella*, *Shigella* ve *Clostridium* gibi çeşitli mikroorganizmaların gelişmesini engelleyici etkiye sahiptir (Dufresne and Farnworth 2001). Satoh'un (2005) yaptığı bir çalışmada, siyah çayın su ekstraktı çok güçlü bir nörotoksin olan *C. botulinum* toksinini inaktif hale getirirken, yeşil çayın su ekstraktı yok denecek kadar az bir etki göstermiştir. Aynı araştırmada çayların su ekstraktları, etil asetat, kloroform ve bütanol ile ekstrakte edildiğinde yeşil çayın sadece etil asetat ekstraktı etki gösterirken, siyah çayın hem etil asetat hem de bütanol ekstraktları yeşil çayın etil asetat ekstraktından daha fazla etki göstermiştir.

2.4.3 Çayda bulunan alkaloid bileşikler

Siyah çayın alkaloid bileşiklerini, çay kuru ağırlığının % 1-5'ini oluşturan kafein ve az miktarlarda teobromin (% 0.2-0.4) ve teofillin (~ % 0.02) oluşturmaktadır (Lin *et al.* 1998, Perva-Uzunalić *et al.* 2006, Yang *et al.* 2007) (Şekil 2.8). Metilksantin bileşikleri olarak da bilinen bu üç alkaloid, çayın uyarıcı etkisinden sorumlu bileşiklerdir (Goto *et al.* 1996, Fernández *et al.* 2003, Yao *et al.* 2006a). Gıdalarla 50-200 mg/gün doz metilksantin alındığında, gündüz uykulu hissetme durumunun ortadan kalktığı ve yorgunluğun azaldığı ancak 200-500 mg/gün doz alındığında baş ağrısı ve sinirlilik gibi sağlık problemlerinin oluşabileceği belirtilmektedir (Hicks *et al.* 1996). Kafeinin merkezi sinir, kas ve dolaşım sistemi üzerine uyarıcı etkide bulunması belirli hastalıklara neden olmaktadır. Bu nedenle çay yapraklarının dekafeinasyonu önem kazanmıştır ve yaprakları kafein içermeyen ya da çok az içeren çay kültürlerinin yetiştirilmesi ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (Khanchi *et al.* 2007). Diğer taraftan çayda bulunan kafeinin patojenik bir fungusu karşı etkili olduğu belirtilmektedir (Coelho *et al.* 2007). Teobrominin ise kuvvetli diüretik etkisinin olduğu belirtilmektedir (Tokusoglu and Ünal 2002). Bazı bitkiler stresli koşullar altında alkaloid üretimini artırmaktadır. Gölgeye toleranslı bazı bitkilerde de gölge derecesi arttıkça alkaloid üretimi artmaktadır (Streit *et al.* 2007).

Khanchi *et al.* (2007) çeşitli yeşil ve siyah çaylarda fazla miktarda kafein (12.32-19.60 mg/g çay yaprağı) ve az miktarda teobromin (0.34-0.45 mg/g çay yaprağı) tespit ederken, örneklerin hiçbirinde teofilline rastlamamışlardır. Bu sonuç, Hicks *et al.*

(1996)'in bulgularıyla benzerlik göstermektedir. Teofillinin taze çay yaprağında dahi saptanamadığı Chen *et al.* (2003) tarafından gösterilmiştir. Zuo *et al.* (2002) farklı tipte çaylarda kafein içeriğini 7.44-29.6 mg/g çay olarak, geniş bir aralıkta saptamışlardır. Khokhar and Magnusdottir (2002), yeşil çaylarda kafein içeriğini 11.5-19.5 mg/g KM, siyah çaylarda ise daha yüksek 22.1-28.0 mg/g KM olarak belirlemişlerdir. Bu sonuçla uyumlu olarak, Keemun siyah çayının yeşil çaylardan daha fazla kafein içerdiği belirtilmektedir (Çizelge 2.4).



Şekil 2.8 Alkaloidlerin kimyasal yapısı (Brunetto *et al.* 2007)
a. teobromin, b. kafein, c. teofillin

Lin *et al.* (2003) tarafından yapılan çalışmada da kafein miktarı açısından siyah çay birinci sırada yer alırken, bunu sırasıyla oolong çay, yeşil çay ve taze çay yaprağı izlemiştir. Benzer sonuç, Cabrera *et al.* (2003) tarafından da elde edilmiştir. Siyah çayın kafein içeriğinin daha yüksek olmasına, siyah çay üretiminde çoğunlukla kafein içeriği daha yüksek olan Çin hibrit çeşitlerinin kullanılması neden olmaktadır (Astill *et al.* 2001). Ayrıca çay bitkisinde kafein, nükleik asitlerin parçalanması sonucu oluşmaktadır ve bu parçalanma soldurma aşamasında da devam ettiği için siyah çayın kafein içeriği artmaktadır (Kacar 1987). Nitekim, Çizelge 2.9'da siyah çay üretimi sırasında taze çay yaprağında bulunan kafein içeriğinin arttığı görülmektedir.

Siyah çayın kalite özelliklerinden birisi de çay deminin soğuması sonucunda kafeinin TF'lerle birlikte oluşturduğu “çay kreması” adı verilen kahverenkli tortudur ve bu tortunun oluşma derecesi çayda bulunan kafein miktarına bağlıdır (Obanda and Owuor 1997). Ancak kafein, çay deminde yeterli miktarda pyrogallol grupları olduğunda krema oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Liang and Xu 2003). Kafein, ayrıca çayın

burukluğundan sorumlu bileşikleri arasında yer almaktadır (Borse *et al.* 2002, Yao *et al.* 2006a).

Çizelge 2.9 Üretim aşamalarında siyah çayın kafein içeriğindeki değişim (Astill *et al.* 2001)

Üretim aşaması	Kafein (%)
Taze yaprak	3.18
Soldurma	3.57
CTC kıvrırma	3.75
Fermentasyon, 60 dk	3.65
Kurutma	3.58

Çay bitkisinin olgun yapraklarında körpe yapraklara göre daha az miktarda kafein bulunmaktadır (Kacar 1987, Lin *et al.* 2003, Chen *et al.* 2003). Çayın alkaloid içeriği uygulanan ekstraksiyon koşullarına göre değişmektedir. Perva-Uzunalić *et al.* (2006) tarafından farklı konsantrasyonlarda organik solvent ve farklı sıcaklıklarda su kullanılarak yeşil çaydan kafeinin ekstrakte edildiği bir çalışmada, ekstraksiyon etkinliğinin % 6.9-89.1 oranında değiştiği saptanmıştır. Sharma *et al.* (2005) çayın kateşin ve alkaloidlerinin etkin bir ayrımını sağlamak için bir HPLC yöntemi geliştirmişler ve aynı zamanda farklı ekstraksiyon koşullarının bu bileşiklere etkisini ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar, kullanılan ekstraksiyon solventi ile uygulanan ekstraksiyon süresi ve aşama sayısına ve S:M oranına bağlı olarak yeşil çayın kafein, teobromin ve teofillin içeriğinin sırasıyla 5.0-98.9 mg/g ka, 0.0-33.0 mg/g ka ve 0.0-1.99 mg/g ka olarak değiştiğini saptamışlardır. Khokhar and Magnusdottir (2002), siyah çaydan kafeinin ekstrakte edilmesi için en iyi solventin kaynar su olduğunu ve bunu sırasıyla % 80'lik metanol ve % 70'lik etanolün izlediğini göstermişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

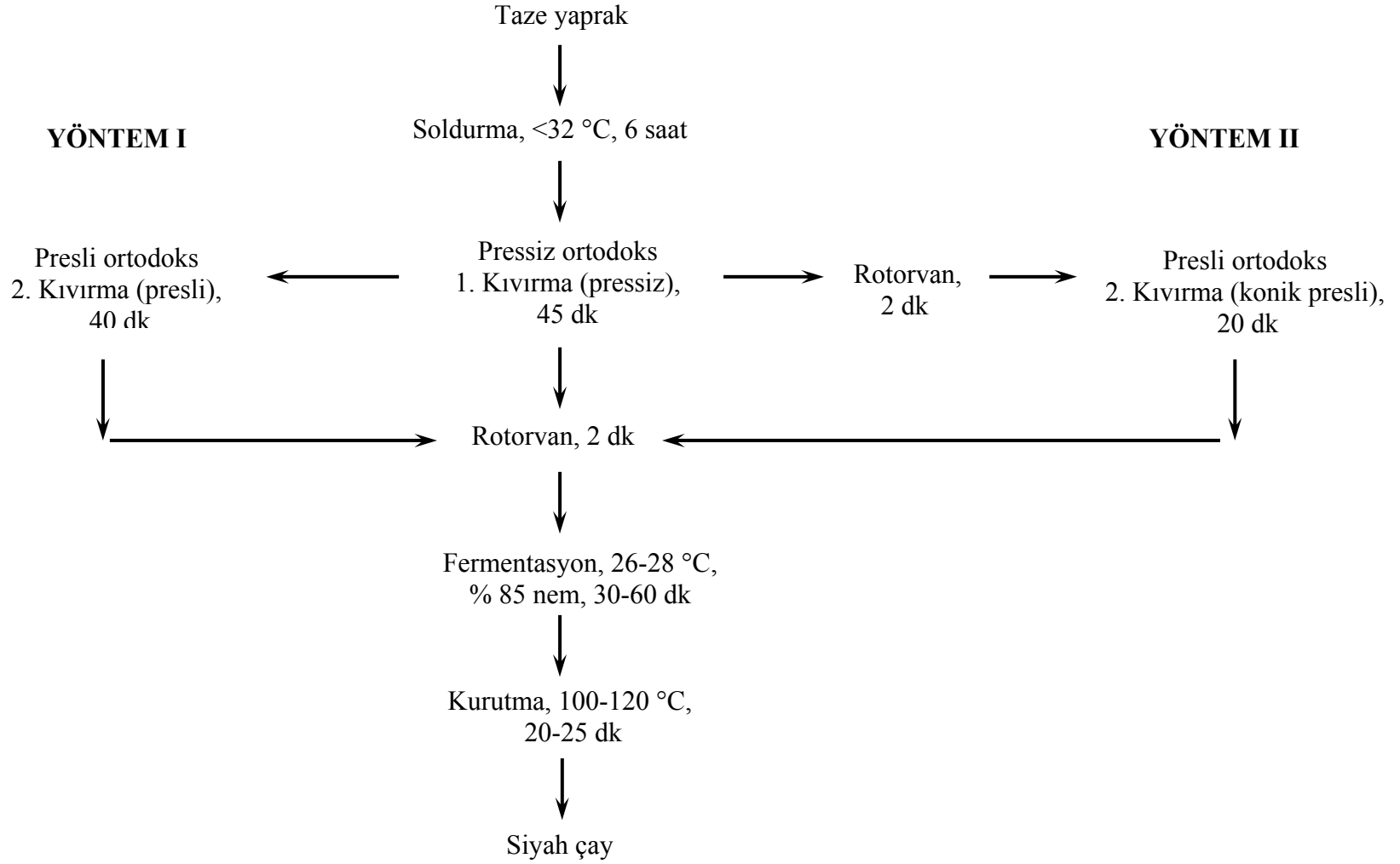
3.1.1 Araştırma materyali

Araştırmada materyal olarak Doğu Karadeniz bölgesindeki farklı kıvrırma yöntemleriyle (Şekil 3.1) çay işleyen Melyat (Yöntem I) ve Zihniderin (Yöntem II) fabrikalarından sağlanan siyah çay örnekleri kullanılmıştır. Şekil 3.1'den görüleceği üzere bu işletmelerin işleme yöntemleri arasındaki başlıca farklar; iki kıvrırma arasında rotorvan kullanılıp kullanılmaması, ikinci kıvrırma makinasının tipi ve toplam kıvrırma süresidir. Yapraklar, farklı sürgün dönemlerinde (Mayıs-Temmuz-Eylül) 3 tekerrürlü olarak toplanarak bu iki işletmede işlenmiş ve ülkemizde çok yaygın olarak kullanılan Midilton ve pakka elek sistemiyle 7 farklı sınıf (Çizelge 2.1) oluşturacak şekilde partikül büyüklüğü ve kaliteye göre gruplara ayrılmıştır. Eleme tekniği hakkında detaylı bilgi, Bölüm 2.3.3.4'te verilmiştir.

Yukarıda sözü edilen toplam 126 (2 yöntem x 3 sürgün dönemi x 7 çay sınıfı x 3 tekerrür) çay örneğinin yanı sıra esasen araştırma kapsamında olmamakla birlikte siyah çaylarla aradaki farkı ortaya koyabilmek ve ileride yapılması planlanan çalışmalara ışık tutabilmek amacıyla 3 örnek daha incelenmiştir. Bunlardan ikisi Rize Çay Araştırma Enstitüsünce sağlanan taze çay filizleri (Muradiye ve Fener klonları), diğeri ise üretimine yeni başlanan Çay-Kur poşet yeşil çayıdır.

3.1.2 Ekipman, kimyasal madde ve diğer malzeme

Polifenol ekstraksiyonu için kullanılan HPLC saflığında metanol, Riedel-de Haën (BioChemica Fluka Cheme GmbH Buchs-İsviçre)'den satın alınmıştır. Spektrofotometrik toplam polifenol analizinde kullanılan Folin-Cioacaltea çözeltisi, Na₂CO₃ E. Merck Co. (Darmstadt, Almanya)'dan satın alınmıştır.



Şekil 3.1 Farklı kıvrırma yöntemlerine göre siyah çay üretimi (Kacar 1992, Tüfekci and Güner 1997, ay-KUR fabrika ziyareti)

HPLC ile alkaloid ve polifenol analizlerinde kullanılan C, EC, GC, EGC, EGCG, EGC, GA ve çay ekstraktı (tea ekstrakt) Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, ABD)'den, kafein (1,3,7- trimetilksantin), teobromin (3,7-dimetilksantin) ve Q3G Fluka (BioChemica Fluka Cheme GmbH Buchs- İsviçre)'dan, Q3RG Wako Chem. Co.'den (Osaka-Japonya) ve K3RG Chromadex'den (Santa Ana, ABD) satın alınmıştır. HPLC saflığında H₃PO₄ ve CH₃NH Riedel-de Haën'den satın alınmıştır. Çalışmalarda kullanılan RP-HPLC kolon (5 µm Tracer Extrasil, 250 x 4.6 mm) Teknokroma'dan (Barselona, İspanya) ve 0.45 µm'lik membran filtreler Macherey-Nagel'den (Almanya) satın alınmıştır. Çalışmalarda mekanik çalkalayıcı (Şimşek Laboratuvar), derin dondurucu (-28 °C, Philco), buzdolabı (+4 °C, Arçelik), HPLC (Shimadzu, Japonya), spektrofotometre (Shimadzu-UV/VIS 1601) ve santrifüj (Sigma 2-16, ABD) kullanılmıştır. Azot gazı, mikropipet seti (Eppendorf), tek kullanımlık steril şırınga, vidalı kapaklı plastik tüpler, dereceli cam balon jojeler ve diğer cam malzemeler kullanılan diğer sarf malzemeleridir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Çay örneklerinin hazırlanması

Üç tekerrürlü olarak temin edilen çay örnekleri, laboratuvar tipi diskli değirmende öğütüldükten sonra gözenek aralığı 0.422 mm ve 0.177 mm olan eleklerden geçirilmiş ve analizlerde boyutları bu aralıkta olan örnekler kullanılmıştır. Örnekler kullanılıncaya kadar -24 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2 Fenolik maddelerin ekstraksiyonu

Polifenollerin ekstraksiyonu için farklı parametreler (solvent, S:M oranı, ekstraksiyon tipi, ekstraksiyon aşama sayısı) kullanılarak ekstraksiyon koşulları optimize edilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda belirlenen en uygun ekstraksiyon yöntemine göre; kapakları contalı sızdırmaz nitelikli santrifüj tüplerine 0.2 g çay örneği tartılmış ve 10 ml % 80'lik metanol (v/v) ile mekanik çalkalayıcıda 14 saat süresince, karanlıkta oda sıcaklığında ekstrakte edilmiştir. Sürenin bitiminde karışım 13000 d/d'da 10 dk santrifüj edilerek,

sıvı ve katı kısımlar birbirlerinden ayrılıp, sıvı kısım vidalı kapaklı kahverengi tüplere alınmıştır. Tüpe alınan ekstraktlar analiz anına kadar -24 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.3 Fenolik madde ve alkaloid bileşiklerin HPLC ile analizi

Santrifüj edilmiş ekstraktlar, HPLC’de ayrımı kolaylaştırmak amacıyla ekstrakttaki metanol oranını % 18.5 düzeyine düşürmek için saf su ile seyreltilmiş ve 0,45 µm’lik membran filtreden süzülmüştür. Filtre edilmiş ekstraktın 20 µl’si HPLC kolonuna enjekte edilmiştir. HPLC’nde gradient elusyon programıyla 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş olan siyah çay örneklerinin fenolik madde ve alkaloid bileşiklerinin kalitatif ve kantitatif tayinleri için HPLC çalışma koşulu ve gradient elusyon programı Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 HPLC çalışma koşulu ve gradient elusyon programı

HPLC çalışma koşulu		Gradient elusyon programı		
		süre	B (%)	A (%)
Model	: Shimadzu	0	8	92
Kolon	: Teknokroma Extrasil ODS2 (250 x 4.6 mm; 5 µm; C ₁₈)	10	8	92
		57	18	82
Kolon Fırını	: CTO-10A SVp	78	24	76
System Kontroler	: SCL-10 AVp	80	26	74
Dedektör	: PDA	92	28	72
Basınç	: 250 Kgf/cm ²	98	80	20
Pompa	: LC-10 ADVp	108	8	92
Mobil Faz	: A : Su + % 0.1 fosforik asit (w/v) B : Asetonitril			
Dedeksiyon	: 270 ve 355 nm			
Akış Hızı	: 1 ml/dk			
Kolon Sıcaklığı	: 40 °C			
Enjeksiyon Miktarı	: 20 µl			

Standart maddelerin Hazırlanması ve Kalibrasyon:

Fenolik madde ve alkaloid bileşiklerin analizi için kullanılan standart maddeler Çizelge 3.2'de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. Ara stok çözeltilerin her birinin 0.25-250 mg/kg arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlanması ile elde edilen kalibrasyon eğrileri linear olup, korelasyon katsayıları 0.9969-1.000 (Çizelge 3.3) olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.2 Kullanılan standart maddeler ve hazırlanması *

Standart madde	Stok çözelti konsantrasyonu	Çalışma çözeltisi konsantrasyonu
Teobromin	1000	0.25-5
Kafein	1000	25-250
GA	1000	2-8
(+)- C	1000	5- 50
(-)- EC	1000	5-50
(-)-GC	500	0.5-5
(-)-EGC	500	25-200
(-)- EGCG	1000	1-50
(-)-ECG	1000	0.5-50
(-)-CG	500	0.25-5
Q3RG	1000	5-40
Q3G	500	1-5
K3RG	1000	10-75
TF-f	1000	2.99-26.52
TF-3-G	1000	6.31-51.11
TF-3'-G	1000	5.04-39.74
TF-3,3'-DG	1000	10.65-82.6

* Standart maddelerden teobromin damıtık suda, diğerleri % 80'lik metanolde hazırlanmıştır, birimler mg/kg'dır

Siyah çay örneklerinin fenolik madde ve alkaloid bileşiklerinin kantitatif olarak tayini HPLC kromatogramlarından elde edilmiş olan integre alanlar kullanılmak suretiyle kalibrasyon eğrilerinden elde edilen değerler doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar mg/g ka olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 3.3 Standart maddelere ilişkin regresyon denklemi* ve korelasyon katsayısı

Standart madde	Regresyon denklemi (y = ax + b)	Korelasyon katsayısı (r ²)
Teobromin	y = 100933x + 247.44	0.9999
Kafein	y = 68555x + 169429	0.9995
GA	y = 66074x + 582.29	0.9997
(+)-C	y = 10352x - 2877	0.9999
(-)-EC	y = 12555x -267.2	0.9999
(-)-GC	y = 22941x + 50.134	0.9996
(-)-EGC	y = 6390.3x + 6848.6	0.9998
(-)- EGCG	y = 33153x -2407.5	0.9999
(-)-ECG	y = 41172x - 464.99	1.0000
(-)-CG	y = 48200x - 1531.1	0.9998
Q3RG	y = 38273x - 4329.3	1.0000
Q3G	y = 30489x - 10487	0.9980
K3RG	y = 42575x - 133777	0.9969
TF-f	y = 34637x + 13331	0.9989
TF-3-G	y = 34633x + 27310	0.9987
TF-3'-G	y = 34648x + 21257	0.9987
TF-3,3'-DG	y = 34630x + 44557	0.9987

* a ve b, y = ax + b denklemindeki katsayılarıdır

Kromatogramlardaki bileşiklerin kalitatif olarak analizi; (1) Bu bileşiklere ait standart maddelerin çay ekstraktına ilave edilmesi (2) Söz konusu bileşiklerin UV-spektrumları ve (3) alıkonma sürelerinin ilgili standart maddelerinki ile karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada 3 farklı şekilde doğrulama yapılmıştır. Flavan-3-ol, TF ve alkaloid bileşiklere ait piklerin tanımlanması ve miktarlarının

hesaplanması bu bileşiklerin en fazla absorbands değeri verdiği 270 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Ancak flavonol glikozidlerin tanımlanması, bunların iki farklı dalga boyunda en fazla absorbands değeri vermeleri nedeniyle 270 nm ve 355 nm’de yapılmış ve miktarlarının hesaplanması için 270 nm’de absorbands veren diğer piklerin etkisini ortadan kaldırmak için 355 nm dalga boyu seçilmiştir.

3.2.4 Toplam fenolik madde tayini

Toplam fenolik madde tayini Obanda and Owuor (1997) tarafından belirtilen Folin-Ciocalteu spektrofotometrik yönteminin modifiye edilmesiyle, 3 tekrarlı olarak aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.1 Toplam fenolik madde analizi için gerekli çözeltilerin hazırlanması

- Folin-Ciocalteu çözeltisi; 1:3 oranında seyreltilmiştir.
- Doygun sodyum karbonat (% 35) çözeltisi; 87.5 gr sodyum karbonat distile suda çözündürülüp 250 ml’ye tamamlanmıştır. Bir gece bekletilerek, filtre edilmiştir.
- Gallik asit stok çözeltisinin (500 µg/ml) hazırlanması; 100 ml saf suda 50 mg gallik asit çözündürülerek taze olarak hazırlanmıştır.
- Gallik asit çalışma çözeltilerinin hazırlanması; 500 µg/ml gallik asit stok çözeltisinden her biri 5’er ml’lik ölçü balonlarında, konsantrasyonu 0-55 µg/ml arasında değişen 9 ayrı çalışma çözeltisi hazırlanmıştır.

3.2.4.2 Kalibrasyon eğrisinin elde edilmesi

Farklı konsantrasyonlardaki gallik asit çalışma çözeltilerinin (9 adet) her birinden 0.5 ml alınarak 0.5 ml Folin-Ciocalteu çözeltisi ile karıştırılmıştır. Karışıma 5 dk sonra 1 ml sodyum karbonat ilave edilerek iyice karıştırılmış ve 1 ml su ile 3 ml’ye seyreltilmiştir. Elde edilen karışım 30 dk karanlıkta bekletildikten sonra oluşan mavi rengin spektrofotometrede 700 nm’de absorbandsı okunmuştur. Gallik asidin bu farklı konsantrasyonlarına karşı okunan absorbandsların grafiğe geçirilmesi ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir ($r^2 = 0.996$).

3.2.4.3 Siyah ay örneğinde toplam fenolik madde tayini

Örneklere toplam fenolik madde tayini için çayların % 80'lik metanoldeki ekstraktları uygun absorbans değerleri elde etmek için damıtık su ile 50 kez seyreltilmiştir. Elde edilen seyreltilmiş ekstraktların toplam fenolik madde içeriği yukarıda belirtildiği gibi saptanmıştır. Burada farklı olarak, standart gallik asit ozeltisi yerine çay ekstraktı kullanılmıştır. Toplam fenolik madde içeriği, mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/ g ka olarak ifade edilmiştir.

3.2.5 Çayın su ekstraktı tayini

Sonuçların değerlendirilmesinde yardımcı olabileceği düşüncesiyle aynı zamanda çay rneklarının su ekstrakt miktarları TS 1563'te önerilen yönteme göre belirlenmiştir.

3.2.6 İstatistik analiz

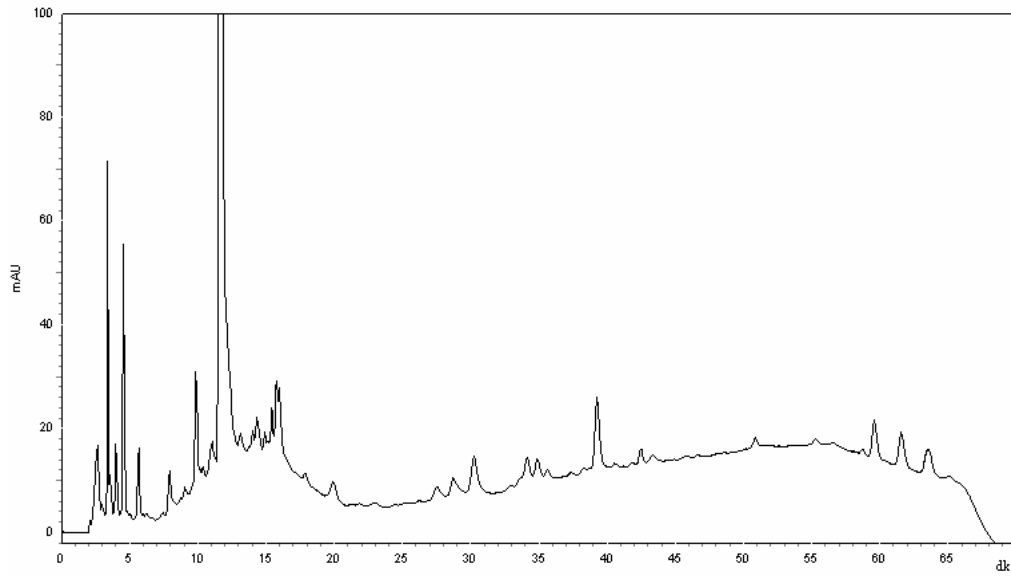
İstatistik analizler SPSS programı (10.1 versiyonu) ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. Varyans analizleri tek yönlü ANOVA ve genel linear model (GLM) olarak yapılmıştır. Ortalamalar arasındaki önemli farklılıklar Duncan oklu karşılaştırmalı testi ile belirlenmiştir. Farklılıkların $p < 0.05$ seviyesinde önemli olduğu düşünülmüştür (Sokal and Rohlf 1995).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Uygun HPLC Yönteminin Saptanması

Araştırma kapsamında 2 ayrı yöntemle işlenmiş, 3 farklı sürgün dönemine (Mayıs-Temmuz-Eylül) ait 7 farklı sınıf çayda kromatografik olarak fenolik madde ve alkaloid bileşiklerin kalitatif ve kantitatif analizlerini gerçekleştirmek amacıyla öncelikle bir HPLC yöntemi geliştirilmiş ve yöntemin geçerliliği test edilmiştir.

Araştırma çay örneklerinin fenolik madde ve alkaloid bileşik analizi için, mevcut literatürde çay için belirtilen bazı yöntemler uygulanmıştır. Ancak Şekil 4.1’de görüldüğü gibi, elde edilen kromatogramlarda piklerin ayrımı sağlanamamıştır. Bu nedenle yapılan denemeler sonucunda koşulları Çizelge 3.1’de belirtilen yeni bir yöntem geliştirilmiştir.



Şekil 4.1 Literatürde (Dalluge *et al.* 1998) belirtilen HPLC koşullarında elde edilen bir çay ekstraktı kromatogramı

4.1.1 HPLC yönteminin geçerliliği

Geliştirilen yöntemle göre elde edilmiş HPLC kromatogramlarında (Şekil 4.2 ve Şekil 4.5), çayda bulunan fenolik madde ve alkaloid bileşiklerin iyi düzeyde ayrıldıkları görülmektedir. Örneklerde beklenen konsantrasyonları kapsayacak şekilde seçilen standart madde konsantrasyonları ile bu konsantrasyonlara karşılık gelen pik alanları arasındaki ilişki a, b ve r^2 (korelasyon katsayısı; linearite) değerleri olarak Çizelge 4.1'de gösterilmektedir. 0.9969-1 arasında saptanan korelasyon katsayıları, bütün bileşiklerin test edilen konsantrasyon aralıklarında iyi bir lineariteye sahip olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.1 Bileşik konsantrasyonları (mg/kg) ile pik alanları arasındaki ilişki

Bileşik	Konsantrasyon	a	b	r^2
Teobromin	0.25-5	100933	247.44	0.9999
Kafein	25-250	68555	169429	0.9995
GA	2-8	66074	582.29	0.9997
EGC	25-200	6390.3	6848.6	0.9998
C	5-50	10352	2877	0.9999
EC	5-50	12555	267.2	0.9999
EGCG	1-50	33153	2407.5	0.9999
ECG	0.5-50	41172	464.99	1.0000
GC	0.5-5	22941	50.134	0.9996
CG	0.25-5	48200	1531.1	0.9998
Q3RG	5-40	38273	4329.3	1.0000
Q3G	1-5	30489	10487	0.9980
K3RG	10-75	42575	133777	0.9969
TF-f	2.99-26.52	34637	13331	0.9989
TF-3-G	6.31-51.11	34633	27310	0.9987
TF-3'-G	5.04-39.74	34648	21257	0.9987
TF-3,3'-DG	10.65-82.60	34630	44557	0.9987

Geliştirilen yöntemin kesinliğini test etmek amacıyla analiz edilecek çay örneklerinden birine ait metanol ekstraktı (Yöntem II'ye göre işlenmiş Mayıs dönemine ait 5. sınıf çay örneği) Çizelge 3.1'de belirtilen kromatografik koşullar altında aynı gün içinde 4 defa ve ayrı günlerde ardışık olarak 5 defa enjekte edilerek analiz edilmiştir. Gün içi ve günlerarasına ait bileşiklerin VK'ları, sırasıyla % 0.09-0.76 ve % 0.28-1.66 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2).

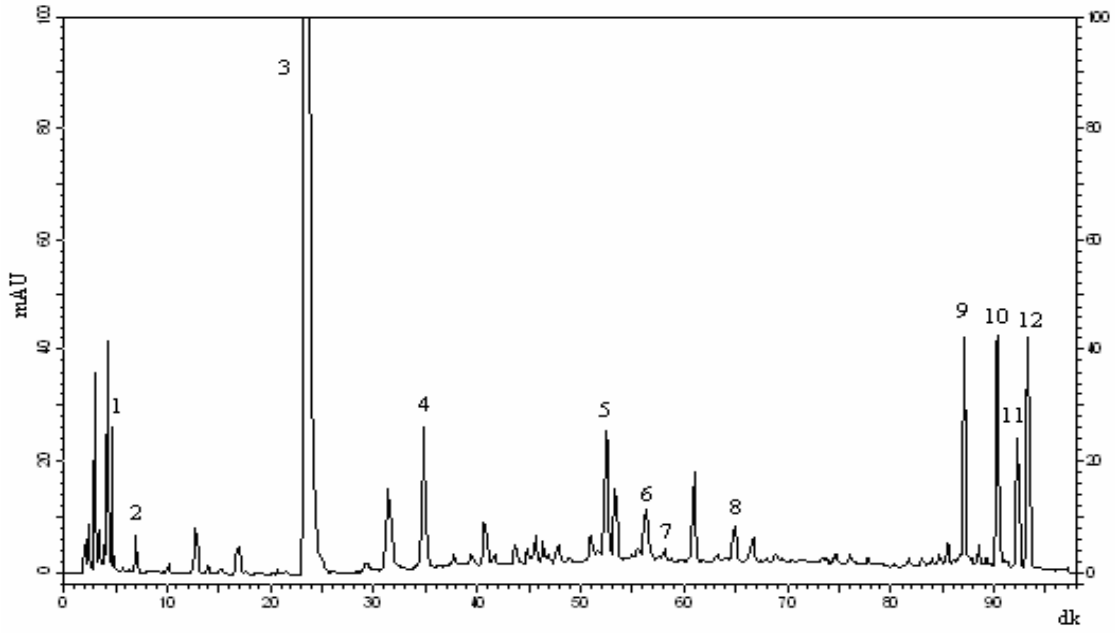
Çizelge 4.2 HPLC yönteminin kesinliği (Yöntem II'ye göre işlenmiş Mayıs dönemine ait 5. sınıf çay örneği)

Bileşik	Gün içi (n=4)		Günlerarası (n=5)	
	SD	VK (%)	SD	VK (%)
Teobromin	0.00	0.09	0.00	0.94
Kafein	0.08	0.36	0.18	0.82
EGCG	0.01	0.29	0.02	0.54
ECG	0.01	0.35	0.04	1.65
Q3RG	0.01	0.44	0.01	0.77
Q3G	0.00	0.55	0.01	1.46
K3RG	0.00	0.05	0.00	0.28
TF-f	0.02	0.76	0.05	1.66
TF-3-G	0.03	0.70	0.04	1.08
TF-3'-G	0.02	0.72	0.02	0.89
TF-3,3'-DG	0.02	0.40	0.03	0.80
Toplam TF	0.03	0.21	0.11	0.82

Varyasyon katsayılarının % 5'in oldukça altında bulunması bu çalışma için geliştirilen HPLC yönteminin kesinliğinin çok yüksek olduğunu göstermiştir. Elde edilen tüm bu sonuçlar, geliştirilen HPLC yönteminin geçerliliğini doğrulamıştır.

4.2 Siyah Çayda Fenolik Madde ve Alkaloid Bileşiklerin Tanımlanması

Geliştirilen HPLC yöntemi ile yapılan fenolik madde ve alkaloid bileşik analizine ilişkin örnek bir kromatogram Şekil 4.2’de gösterilmektedir. Bölüm 3.2.3’de belirtilen doğrulama yöntemine göre, siyah çay örneklerinde flavan-3-ol bileşiklerinden EGCG ve ECG, flavanol glikozidlerden Q3RG, Q3G ve K3RG, kompleks polifenollerden TF-f, TF-3-G, TF-3'-G ve TF-3,3'-DG ve alkaloid bileşiklerden kafein ve teobromin saptanmıştır. Diğer fenolik bileşiklerden flavan-3-ol grubunda yer alan EGC, C, EC, GC ve CG siyah çaylarda belirlenememiştir. Araştırma çay örneklerinde ayrıca, fenolik asitlerden gallik asit (Şekil 4.2) tanımlanmış olmakla birlikte çözünürlüğünün çok iyi olmaması nedeniyle bu bileşiğin kantitatif analizi yapılamamıştır.

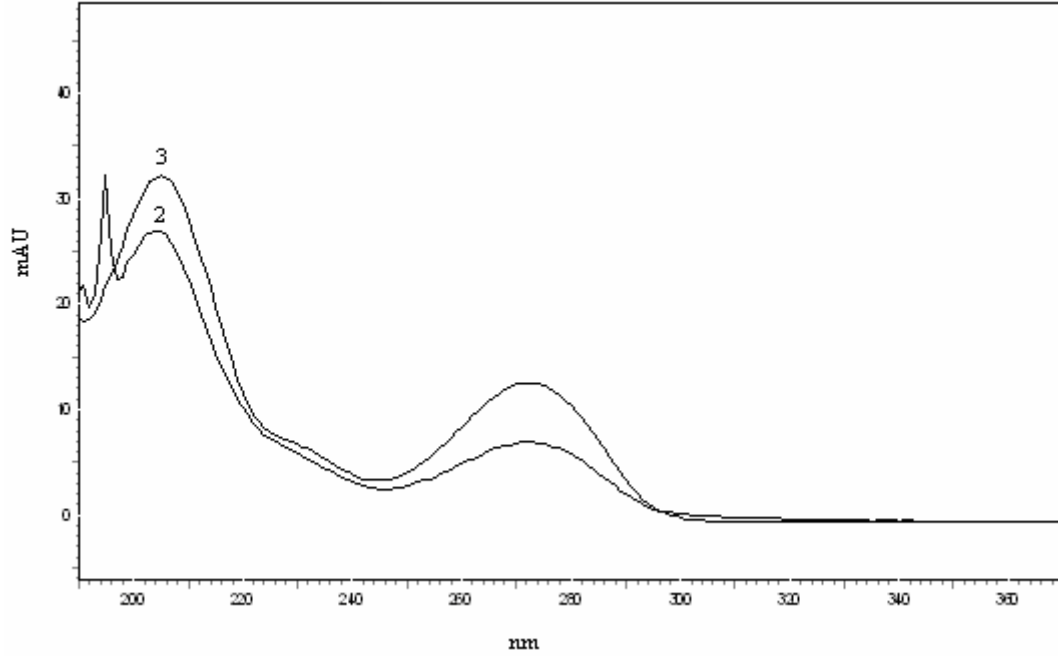


Şekil 4.2 Yöntem II’ye göre işlenmiş Mayıs dönemi 5. sınıf siyah çay örneğine ait tipik bir HPLC kromatogramı. Pikler: 1,GA; 2, teobromin; 3, kafein; 4, EGCG; 5, ECG; 6, Q3RG; 7, Q3G; 8, K3RG; 9, TF-f; 10, TF-3-G; 11, TF-3'-G; 12, TF-3,3'-DG

4.2.1 Alkaloidler

Literatüre göre siyah çayın başlıca alkaloid bileşiklerini pürin türevleri olan kafein ve teobromin oluşturmaktadır. Şekil 4.2’de görülen 2 ve 3 numaralı piklerin sırasıyla

teobromin ve kafein olduğu anlaşılmıştır. Bu piklerin PDA dedektörle elde olunan spektrumları, bir fikir vermesi amacıyla Şekil 4.3'te verilmiştir.



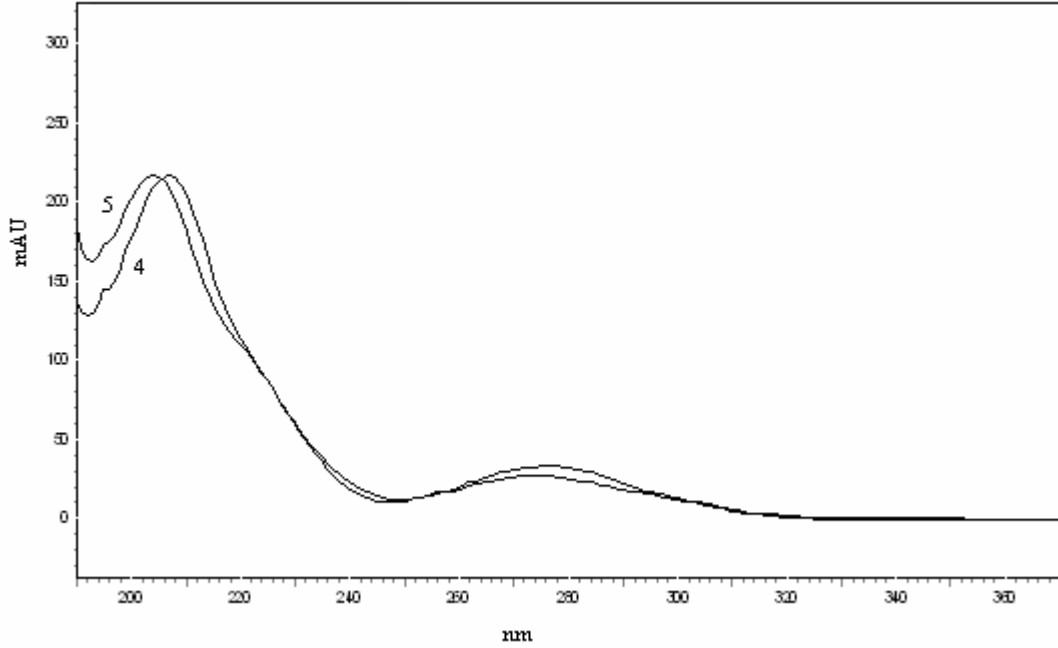
Şekil 4.3 Teobromin ve kafeinin PDA spektrumu (2, teobromin; 3, kafein)

4.2.2 Flavan-3-ollar

Siyah çayın fenolik bileşiklerinden olan flavan-3-olları oluşturan bileşiklerin başlıcaları C, EGC, EC, EGCG ve ECG'dır (Peterson *et al.* 2005). Araştırmada incelenen çay örneklerinde flavan-3-ol bileşiklerden sadece EGCG ve ECG belirlenebilmiştir. Diğer flavan-3-ol bileşiklerden EGC, C ve EC ise hiçbir örnekte saptanamamıştır. Diğer bir deyişle, sadece esterleşmiş formdaki kateşinler belirlenebilmiştir. Şekil 4.2'de görülen örnek kromatogramda 4 ve 5 numaralı pikler, sırasıyla EGCG ve ECG olarak tanımlanmıştır. Bu piklerin Şekil 4.4'de görülen spektrumları, bu bileşiklere ait standartların spektrumları ile aynı bulunmuştur.

Siyah çay üretiminde, kateşinlerden EGC ve EC oksidasyon sırasında TF'lere dönüşürken, C bu reaksiyonlarda yer almamaktadır (Obanda *et al.* 2001, Wright *et al.* 2002, Bonnelly *et al.* 2003). Gallokateşinler, özellikle EGC ve EGCG, yüksek oksidasyon potansiyeline sahip olmaları ve taze yaprakta yüksek konsantrasyonda

(Çizelge 4.3) bulunmaları nedeniyle PPO enzimi ile ilk önce oksidasyona uğramaktadır (Satoh *et al.* 2005). Benzer sonuçlar Caffin *et al.* (2004) tarafından da belirtilmiştir.



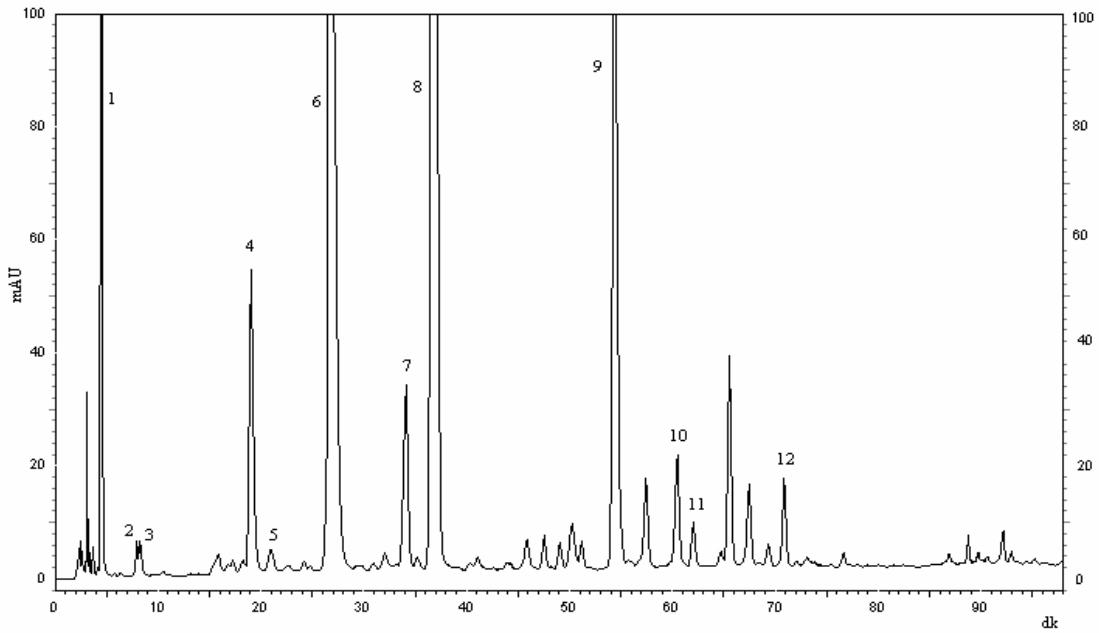
Şekil 4.4 EGCG ve ECG'nin PDA spektrumu (4, EGCG; 5, ECG)

Wang *et al.* (2000), Çin'de üretilen Keemun siyah çayında kateşinlerden GCG, C ve EC'i belirleyememişlerdir. Benzer şekilde, Obanda *et al.* (2001) çay yapraklarına 20 ve 30 °C fermentasyon sıcaklıklarında 60-150 dk süre ile uygulanan fermentasyon sonucunda, siyah çayda EGC'i hiç bir durumda belirleyememiş, C'i ise ancak 20 °C'de 60-90 dk sonrasında az miktarda saptamışlardır. Model çay fermentasyon sistemi üzerine yapılan bir çalışmada ise TF oluşumuna katılan kateşinler arasında öncelikle EGC ve EGCG'nin, EC ve ECG'a göre daha kolay oksidasyona uğradığı ve çalışılan tüm kateşin kombinasyonlarının oksidasyonu sonucunda hiçbir durumda EGC ve EGCG'a rastlanmadığı belirtilmiştir (Sanderson *et al.* 1972). Bu çalışmada ele alınan siyah çaylarda da EGC'in saptanamaması bu sonuçları doğrulamıştır. Tüm bunlara ilave olarak, Shishikura and Khokhar'ın (2005) kateşin düzeylerini inceledikleri yeşil çayların çoğunluğunda C'i belirleyememiş olması da yeşil çayın fermente olmayan bir çay olması nedeniyle dikkat çekicidir.

Diğer taraftan, taze çay filizlerinden birinci dönem (Mayıs) sürgünü Muradiye (Şekil 4.5) ve Fener ile yeşil çayda yapılan HPLC analizi sonucunda saptanmış olan başlıca kateşinlerin miktar açısından sıralaması şu şekildedir:

EGCG>EGC>ECG>EC>C (Çizelge 4.3)

Bu sıralama, taze çay filizlerinde (Lin *et al.* 1996, Yao *et al.* 2004, Yang *et al.* 2007) ve yeşil çaylarda (Zuo *et al.* 2002, Bonoli *et al.* 2003, Nishitani and Sagesaka 2004), kateşinlerin belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalar ile uyum içindedir. Ayrıca, ilk 4 kateşinin taze çay filizlerinde bulunan başlıca kateşinler olduğu belirtilmektedir (Higdon and Frei 2003). Çay filizleri ve yeşil çayın kateşin miktarları arasındaki farklılık, kateşinlerin hemen hiç oksidasyona uğramamış (çay filizinde) ya da çok az uğramış (yeşil çayda) olmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.5 Taze çay filizine (Muradiye) ait HPLC kromatogramı. Pikler: 1, GA; 2, GC; 3, teobromin; 4, EGC; 5, C; 6, kafein; 7, EC; 8, EGCG; 9, ECG; 10, Q3RG; 11, Q3G; 12, K3RG

Çizelge 4.3’de görüldüğü gibi, siyah çaylarda belirlenememiş olan kateşinlerden, TF’lerin oluşumunda rolü olan EC ile, bu oluşum reaksiyonlarında yer almayan C, siyah çayın hammaddesi olarak düşünülebilecek taze çay filizlerinde ve ayrıca yeşil çayda

diğer kateşinlere göre daha az miktarda bulunmuştur. Bu durumun, bu 2 kateşinin siyah çay örneklerinde saptanamamasının sebeplerinden biri olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, GC'in her 2 çay filizinde çok düşük miktarlarda belirlenmesi ve CG'in ise saptanamamış olması da dikkati çekmektedir. Diğer taraftan, kateşinler pH, sıcaklık ve oksijen gibi çevresel faktörlere karşı farklı stabilite göstermektedirler (Robertson 1983, Wang and Helliwell 2000, Ito *et al.* 2003, Su *et al.* 2003). Bu farklılık da EGC, EC ve C'in çay örneklerinde saptanamamış olmasında bir etken olabilmektedir.

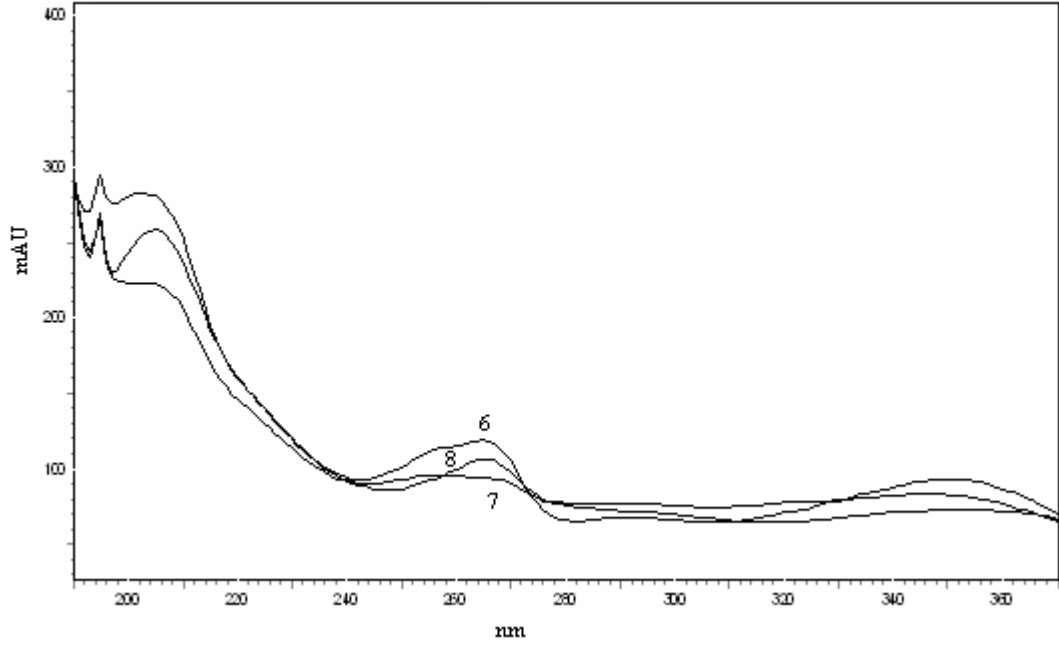
Çizelge 4.3 Taze çay filizi (Muradiye ve Fener) ve yeşil çayın fenolik madde ve alkaloid miktarları (mg/g ka)

Bileşik	Muradiye	Fener	Yeşil çay
Teobromin	0.20	0.11	0.17
Kafein	29.12	37.40	20.54
GA	5.93	5.32	1.24
GC	0.74	0.22	0.72
EGC	47.11	29.62	28.82
C	2.58	1.64	0.60
EC	16.01	14.68	8.52
EGCG	130.46	87.69	61.06
ECG	21.60	16.82	10.86
CG	t.e.	t.e.	0.09
Q3RG	2.75	4.40	1.79
Q3G	1.64	0.40	0.50
K3RG	2.36	0.81	0.88

^{t.e.} Tespit edilemedi

4.2.3 Flavonol glikozidler

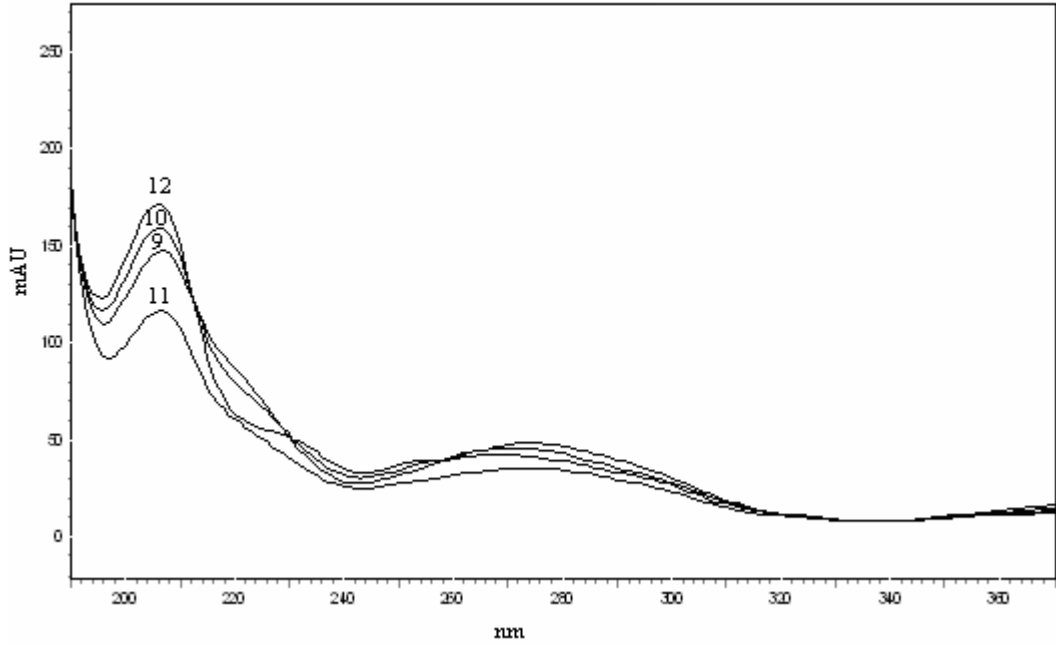
Siyah çay örneklerinde flavonol glikozidlerden Q3RG (pik no 6), Q3G (pik no 7) ve K3RG (pik no 8) tanımlanarak çayda buldukları kesin olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2). Bunlara ait spektrumlar Şekil 4.6'da gösterilmektedir.



Şekil 4.6 Q3RG, Q3G ve K3RG'in PDA spektrumu (6, Q3RG; 7, Q3G; 8, K3RG)

4.2.4 Teaflavinler

Kateşinlerin oksidasyon ürünü olan TF'ler, polaritelerinin düşük olması nedeniyle alıkonma süreleri en uzun olan, dolayısıyla kolondan en son yıkanan bileşikler olmuştur (Şekil 4.2). Kromatogramda 9-12 olarak numaralandırılmış pikler, sırasıyla TF-f, TF-3-G, TF-3'-G ve TF-3,3'-DG olarak tanımlanmıştır. Bu bileşiklere ait piklerin spektrumu Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



Şekil 4.7 TF'lerin PDA spektrumu (9, TF-f; 10, TF-3-G; 11, TF-3'-G; 12, TF-3,3'-DG)

4.3 Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu

4.3.1 Ekstraksiyon tipinin belirlenmesi

Araştırma kapsamında aynı çay örneğinde (Yöntem II'ye göre işlenmiş Mayıs dönemi 7. sınıf) 3 farklı ekstraksiyon tipi (40 dk ultrasonik banyo, 15 dk vorteks ve 14 saat çalkalayıcı) kullanılarak ekstraksiyon yapılmıştır. Elde edilen ekstraktlarda yapılan HPLC analizine göre, çaydaki bileşiklerin miktarları Çizelge 4.4'de gösterilmiştir. Buna göre tüm bileşikler açısından çalkalamalı ekstraksiyonun, en etkili ekstraksiyon tipi olduğu belirlenmiş ve bu nedenle araştırmada çalkalamalı (14 saat) ekstraksiyon tipi seçilmiştir. Ancak yapılan istatistik analizi sonucunda, ekstraksiyon tipleri arasında bileşik miktarları açısından önemli farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$). Çaylardan ve diğer bitkilerden polifenol ekstraksiyonu için çalkalayıcı en yaygın kullanılan ekstraksiyon tipi (Goto *et al.* 1996, Zuo *et al.* 2002, An *et al.* 2004, Lapornik *et al.* 2004, Miliuskas *et al.* 2004, Yu *et al.* 2005) olmakla birlikte ultrasonik banyo ile ekstraksiyon (Sargenti and Vichnewski 2000, Ito *et al.* 2003, Wang *et al.* 2004, Goli *et al.* 2005, Maksimovic *et al.* 2005) ve vorteks ile ekstraksiyon da (Leong and Shui 2002,

Bonnely *et al.* 2003, Sharma *et al.* 2005) kullanılan ekstraksiyon tipleri arasındadır. Her 3 ekstraksiyon tipinin birlikte kullanılarak karşılaştırıldığı bir araştırmaya rastlanmamış olmasına karşın soya bitkisinden fenolik bileşiklerin Soxhlet, ultrasonik banyo ve süperkritik CO₂ ile ekstraksiyonunda ekstraksiyon tiplerinin etkinliği, bileşiklerin cinsine bağlı olarak değişmiştir (Rostagno *et al.* 2002). Diğer taraftan, Tsanova-Savova *et al.* (2005) meyvelerden C ve EC'in analizi için ultrasonik banyo ile 5 dk'lık ekstraksiyon sonucunun 1 saatlik mekanik çalkalayıcı uygulaması ile eşdeğer olduğunu göstermişlerdir.

Çizelge 4.4 Farklı ekstraksiyon tiplerinin çayın fenolik madde ve alkaloid miktarları (mg/g ka) üzerine etkisi

Bileşik	Ekstraksiyon tipi		
	Ultrasonik (40 dk)	Vorteks (15 dk)	Çalkalamalı (14 saat)
Teobromin	0.24±0.02 ^{a*}	0.22±0.00 ^a	0.25±0.00 ^a
Kafein	21.36±1.18 ^a	20.33±0.29 ^a	22.07±0.34 ^a
EGCG	0.70±0.01 ^a	0.63±0.22 ^a	0.86±0.18 ^a
ECG	0.79±0.08 ^a	0.65±0.08 ^a	0.84±0.01 ^a
Q3RG	1.58±0.18 ^a	1.61±0.04 ^a	1.99±0.04 ^b
Q3G	0.42±0.01 ^b	0.33±0.01 ^a	0.40±0.02 ^b
K3RG	0.59±0.03 ^a	0.54±0.01 ^a	0.61±0.00 ^a
TF-f	2.80±0.65 ^a	2.29±0.12 ^a	3.28±0.33 ^a
TF-3-G	3.99±0.66 ^a	3.42±0.17 ^a	4.86±0.40 ^a
TF-3'-G	2.23±0.34 ^a	2.00±0.07 ^a	2.89±0.22 ^a
TF-3-3'-DG	3.89±0.47 ^{ab}	3.24±0.02 ^a	4.80±0.16 ^b
Toplam TF	12.92±2.12 ^a	10.96±0.33 ^a	15.83±1.11 ^a

* Aynı satırda farklı harflere sahip ortalamalar arasındaki fark önemli düzeyde (p<0.05) farklı

4.3.2 Ekstraksiyon solventinin belirlenmesi

Polifenollerin ekstraksiyonunda ekstraksiyon verimliliği, ekstraksiyon yönteminin yanısıra ekstraksiyon solventine bağlı olarak da değişmektedir (Goli *et al.* 2005). Araştırma kapsamında en etkili solventi seçmek amacıyla, yaygın olarak kullanılan

solvent sistemlerinden su, % 80'lik etanol, % 80'lik metanol, % 100'lük metanol ve % 50'lik metanol test edilmiştir. Bulgular Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5 Farklı solventlerin çayın fenolik madde ve alkaloid miktarları (mg/g ka) üzerine etkisi (Yöntem II'ye göre işlenmiş Mayıs dönemine ait 5. sınıf çay örneği, n=2)

Bileşik	Solvent				
	Su	Metanol			Etanol
		% 50	% 80	% 100	% 80
Teobromin	0.18±0.00 ^{d*}	0.14±0.01 ^{ab}	0.16±0.00 ^c	0.13±0.01 ^a	0.15±0.00 ^{bc}
Kafein	23.33±0.01 ^c	22.16±0.47 ^{bc}	22.18±0.11 ^{bc}	19.03±0.57 ^a	21.49±0.12 ^b
EGCG	1.47±0.01 ^a	2.60±0.06 ^b	3.39±0.00 ^c	2.49±0.00 ^b	3.27±0.03 ^c
ECG	0.81±0.01 ^a	2.39±0.02 ^c	2.48±0.00 ^c	1.69±0.11 ^b	2.41±0.01 ^c
Q3RG	1.12±0.00 ^b	1.22±0.06 ^{bc}	1.29±0.00 ^c	0.83±0.02 ^a	1.25±0.01 ^c
Q3G	0.33±0.00 ^a	0.45±0.02 ^c	0.49±0.00 ^d	0.36±0.01 ^b	0.50±0.00 ^d
K3RG	0.98±0.00 ^c	0.75±0.01 ^a	1.02±0.01 ^d	0.91±0.00 ^b	1.01±0.00 ^d
TF-f	0.55±0.00 ^a	1.56±0.02 ^b	2.90±0.00 ^d	2.24±0.02 ^c	3.24±0.02 ^e
TF-3-G	0.24±0.00 ^a	2.28±0.00 ^b	3.93±0.03 ^d	2.69±0.01 ^c	4.59±0.02 ^e
TF-3'-G	t.e.	1.06±0.01 ^a	2.24±0.01 ^c	1.44±0.03 ^b	2.60±0.07 ^d
TF-3,3'-DG	t.e.	2.16±0.05 ^a	4.20±0.00 ^c	2.47±0.05 ^b	5.11±0.00 ^d
Toplam TF	0.65±0.01 ^a	7.06±0.06 ^b	13.26±0.01 ^d	8.84±0.11 ^c	15.54±0.07 ^e

^{t.e.} Tespit edilemedi, * Aynı satırda farklı harflere sahip ortalamalar arasındaki fark önemli düzeyde (p<0.05) farklı

Aynı çay örneği kullanılarak 5 farklı solventle çalkalayıcı aracılığıyla ekstraksiyon yapılmış ve elde edilen ekstraktların HPLC analizleri sonucunda çaydaki bileşiklerin miktarları arasında önemli farklılıklar bulunmuştur (p<0.05). Solventlerin etkinliği bileşik cinsine bağlı olarak değişmiştir. Çizelge 4.5'den de görüldüğü gibi fenolik bileşikler özellikle de TF'ler açısından en az etkili solventin su olduğu saptanmıştır. Ancak solvent olarak su kullanıldığında, diğer solventlere göre daha fazla alkaloid ekstrakte edilmiştir. Bu sonuçla uyumlu olarak, Perva-Uzunalić *et al.* (2006) yeşil çaydan farklı konsantrasyonlarda (% 25-100) aseton, metanol, etanol, asetonitril ve farklı sıcaklıklardaki su ile yaptıkları ekstraksiyon sonucunda en fazla kafein miktarını 95 °C sıcaklığında su kullanıldığında elde etmişlerdir. Benzer şekilde, Khokhar and

Magnusdottir (2002) siyah çaydan kafeinin ekstrakte edilmesinde ekstraksiyon solventi olarak kaynar suyun, % 80'lik metanol ve % 70'lik etanolden daha iyi sonuç verdiğini göstermişlerdir.

Araştırma kapsamında diğer 4 organik solvent arasında karşılaştırma yapıldığında ise, TF'ler açısından en etkili solvent % 80'lik etanol olmuştur. Bunu sırasıyla % 80'lik metanol, saf metanol ve % 50'lik metanol izlemiştir. TF'lerin dışında kalan bileşikler açısından ise % 80'lik metanol ve % 80'lik etanolün en etkili solvent olduğu ve bu iki solventi sırasıyla % 50'lik metanol ve saf metanol izlemiştir. Lapornik *et al.* (2005) tarafından çeşitli meyve posalarından su, % 70'lik etanol ve % 70'lik metanol ile yapılan ekstraksiyon sonucunda etanol ve metanol ekstraktlarının toplam polifenol içerikleri birbirine yakın bulunurken, su ile daha düşük değerler saptanması bu araştırma sonuçlarını kısmen doğrulamıştır. Benzer şekilde, ekstraksiyon koşullarının siyah çayın polifenolik madde dağılımı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisinin belirlendiği bir çalışmada % 80'lik metanol ile % 80'lik etanolün aynı derecede etkili olduğu saptanmıştır (Velioğlu vd. 2007). Ayrıca, daha önce yapılan bazı çalışmalarda mate çayı (Martinez *et al.* 1997), Echinacea bitkisi (Pellati *et al.* 2005) ve çaydan (Poon 1998, Zuo *et al.* 2002) fenolik bileşiklerin ekstrakte edilmesi amacıyla % 80'lik metanolün kullanıldığı belirtilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, bu çalışmada ekstraksiyon solventi olarak % 80'lik metanol seçilmiştir.

4.3.3 Ekstraksiyon aşama sayısının belirlenmesi

Ekstraksiyon aşama sayısı da çaydaki bileşiklerin ekstraksiyonunu etkileyen parametrelerdendir. Bu nedenle aynı çay örneği (Yöntem II'ye göre işlenmiş Mayıs dönemine ait 5. sınıf çay örneği), kademeli (5 aşamalı, 6 saat) ve tek aşamalı (14 saat) olarak mekanik çalkalayıcı aracılığıyla ekstrakte edilmiş ve ekstraktlarda HPLC analizi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi beş aşamalı ekstraksiyon sonucu elde edilen bileşiklerin miktarları tek aşamalı ekstraksiyona göre daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlarla uyumlu olarak, Zuo *et al.* (2002) yeşil, siyah ve oolong çaylarında kademeli

ekstraksiyonun polifenol ve kafein içerikleri üzerine daha etkili olduğunu saptamışlardır. Benzer şekilde, Perva-Uzunalić *et al.* (2006) yeşil çayda kateşin ve kafein ekstraksiyonunun etkinliğinin ekstraksiyon kademe sayısı arttıkça arttığını, ancak, kademeli ekstraksiyonun tek başına % 3 düzeyinde deneysel hataya neden olduğunu belirtmişlerdir.

Çizelge 4.6 Beş aşamalı ve tek aşamalı ekstraksiyonunun çayın fenolik madde ve alkaloid miktarları (mg/g ka) üzerine etkisi (n=2)

Bileşik	Ekstraksiyon aşama sayısı	
	Beş aşamalı	Tek aşamalı
Teobromin	0.18±0.00	0.16±0.00
Kafein	25.20±0.44	22.18±0.11
EGCG	3.85±0.03	3.39±0.00
ECG	2.65±0.01	2.48±0.00
Q3RG	1.43±0.01	1.29±0.00
Q3G	0.53±0.02	0.49±0.00
K3RG	1.05±0.00	1.02±0.00
TF-f	3.75±0.05	2.90±0.01
TF-3-G	5.05±0.14	3.93±0.03
TF-3'-G	2.76±0.01	2.24±0.01
TF-3,3'-DG	5.22±0.22	4.20±0.00
Toplam TF	16.77±0.15	13.26±0.01

Diğer taraftan, daha önce yapılan bazı çalışmalarda, çay polifenolleri ve alkaloidlerin analizi için tek aşamalı ekstraksiyon uygulanmıştır (Goto *et al.* 1996, Justesen *et al.* 1998, Wright *et al.* 2000, Yao *et al.* 2004, Lopez *et al.* 2005, Row and Jin 2006). Bu araştırmanın asıl amacı, farklı dönem ve sınıfa ait çay örnekleri arasındaki farklılıkları belirlemek olduğundan, doğru bir karşılaştırma yapılabilmesi için özellikle ekstraksiyondan kaynaklanacak deneysel hataları en aza indirmek amaçlanmıştır. Bu nedenle çay örneklerinin ekstraksiyonu tek aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir.

4.3.4 S:M oranının belirlenmesi

Çay örneklerindeki bileşiklerin en fazla ekstrakte edildiği S:M oranını belirlemek amacıyla, Mayıs dönemi Yöntem II ile işlenmiş 6. sınıf çay örneği ile 3 farklı oran (10:1, 20:1, 50:1) kullanılarak ekstraksiyon yapılmıştır. Elde edilen ekstraktların HPLC analiz sonuçları Çizelge 4.7’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.7 S:M oranının çayın fenolik madde ve alkaloid miktarları (mg/g ka) üzerine etkisi

Bileşik	S:M oranı		
	50:1	20:1	10:1
Teobromin	0.19	0.17	0.19
Kafein	23.84	22.95	22.38
EGCG	2.42	2.25	2.28
ECG	2.21	1.74	1.67
Q3RG	1.67	1.58	1.55
Q3G	0.49	0.47	0.44
K3RG	1.11	0.67	0.54
TF-f	2.58	2.15	2.09
TF-3-G	4.36	3.76	3.62
TF-3'-G	2.21	1.90	1.77
TF-3,3'-DG	5.13	4.69	4.40
Toplam TF	14.28	12.50	11.88

S:M oranı arttıkça ekstraksiyonun etkinliği artmış olup, 50 ml solvente karşılık 1g çay örneği kullanıldığında özellikle TF miktarları açısından belirgin farklılık gözlenmiştir. Bu nedenle, bu çalışmada 50:1 S:M oranı seçilmiştir. Daha önce bu konuda yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar alınmıştır. Perva-Uzunalić *et al.* (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, S:M oranı azaldıkça yeşil çayda bulunan kafein ve kateşinlerin ekstraksiyon etkinliğinin, azaldığı gözlenmiştir. Benzer şekilde, Cacace ve Mazza (2003) üzüksü meyvelerin 2 farklı solvent (etanol ve kükürtlü su) ile ekstraksiyonunda

S:M oranı arttıkça toplam fenolik ve antosiyanin verimlerinin arttığını ortaya koymuşlardır.

4.4 Ekstraksiyon Yönteminin Tekrarlanabilirliği

İki ya da daha fazla sayıda uygulanan ekstraksiyonlar arasındaki değişimi/farklılığı belirlemek amacıyla VK değeri kullanılmaktadır (Caffin *et al.* 2004). Bu çalışmada, aynı çay örneği (Yöntem II'ye göre işlenmiş, Mayıs dönemine ait 5. sınıf çay örneği) 5 tekrarlı olarak ekstrakte edilmiş ve elde edilen ekstraktlarda HPLC ile fenolik madde ve alkaloid analizi gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.8'de çay ekstraktlarındaki bileşiklerin miktarlarına ilişkin SD ve VK değerleri verilmektedir.

Çizelge 4.8 Ekstraksiyon yönteminin kesinliği (n=5)

Bileşik	SD	VK (%)
Teobromin	0.00	0.39
Kafein	0.25	1.07
EGCG	0.03	1.17
ECG	0.02	1.18
Q3RG	0.03	1.99
Q3G	0.01	1.16
K3RG	0.00	0.40
TF-f	0.03	1.38
TF-3-G	0.06	1.40
TF-3'-G	0.03	1.38
TF-3,3'-DG	0.02	0.39
Toplam TF	0.11	0.78

Tüm bileşikler için VK'nın % 5'in altında saptanması ekstraksiyon yönteminin tekrarlanabilirliğinin çok iyi olduğunu göstermiştir. Caffin *et al.* (2004) taze çay filizlerinde alkaloid ve fenolik bileşikleri belirlemek için metanol ile uyguladıkları ekstraksiyon yönteminin tekrarlanabilirliğini test etmiş ve EGC, EC, EGCG, ECG ve kafein için VK'nı araştırma sonuçlarımızdan daha yüksek, sırasıyla % 8.55, 5.09, 4.12,

4.15 ve 3.74 olarak bulmuşlardır. Diğer taraftan, Sharma *et al.* (2005) yeşil ve siyah çayda % 70'lik metanol ile uyguladıkları ekstraksiyonun tekrarlanabilirliği analizi sonucunda, çaylardaki teobromin, kafein, EGC, EC ve ECG için araştırma bulgularımızdan daha düşük VK (% 0.0-0.4) saptamışlardır.

4.5 Ekstrakt Solvent Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Araştırma kapsamında hangi düzeydeki metanol konsantrasyonunun çayın fenolik madde ve alkaloid bileşiklerinin HPLC kolonunda en iyi ayrımını sağladığını görmek ve bu öğelerin yüksek düzeyde elde edilebilmesi amacıyla ekstrakttaki metanol düzeyi optimize edilmiştir. Bu amaçla, Mayıs dönemi Yöntem II ile işlenmiş 6. sınıf çay örneğine ait % 80 metanol konsantrasyonuna sahip ekstraktlar, doğrudan ve daha düşük metanol konsantrasyonları (% 40, % 25, % 18.5) elde edilecek şekilde saf su ile seyreltilerek HPLC kolonuna enjekte edilmiştir. Daha önce bu konuda yapılan çalışmalarda enjeksiyon solventinin, HPLC ile analizi yapılacak bileşiklerin ayrımına ve miktarlarına etkisi olduğu belirlenmiştir (Wang *et al.* 2000, Wang *et al.* 2004). Ekstraktların kolona enjeksiyonu öncesi, en uygun metanol konsantrasyonunu belirlemek amacıyla % 80, % 40, % 25 ve % 18.5 metanol içeren çay ekstraktlarının HPLC analiz sonuçları Çizelge 4.9'da gösterilmiştir. Enjeksiyonu yapılan çay ekstraktındaki metanol konsantrasyonu % 80'den % 18.5'a doğru azaldıkça, hem çayda bulunan bileşiklere ait piklerin ayrımında iyileşme hem de seyreltme oranları dikkate alınarak yapılan hesaplama sonucu bileşiklerin miktarında artış saptanmıştır. Genellikle, fenolik madde ve alkaloid miktarları açısından % 18.5 metanol konsantrasyonu ile diğer üç metanol konsantrasyonu arasındaki fark önemli ($p < 0.05$) bulunmuştur. Bu duruma, yüksek metanol konsantrasyonlarında ekstrakttaki solvent konsantrasyonunun HPLC mobil fazından daha kuvvetli olması nedeniyle bileşiklerin kolondan yıkanmasının güçleşmesi neden olmaktadır. Benzer şekilde Wang *et al.* (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, % 60'lık etanol ile siyah ve yeşil çaylardan elde edilen % 60'lık etanol ekstraktları HPLC'ye enjekte edildiğinde kateşinler ve kafein için iyi bir ayırım sağlanamamış ancak etanol konsantrasyonu %15'in altına düştüğünde en iyi ayırım elde edilmiştir.

Çizelge 4.9 Ekstrakt metanol konsantrasyonunun çayın fenolik madde ve alkaloid miktarları (mg/g ka) üzerine etkisi (n=2)

Bileşik	Metanol konsantrasyonu (%)			
	80	40	25	18.5
Teobromin	0.13±0.00 ^{a*}	0.15±0.00 ^b	0.15±0.00 ^b	0.18±0.01 ^c
Kafein	18.97±0.30 ^a	20.63±0.28 ^b	21.61±0.21 ^c	22.62±0.11 ^d
EGCG	1.36±0.08 ^a	3.31±0.23 ^b	3.45±0.29 ^b	3.53±0.27 ^b
ECG	1.85±0.02 ^a	2.20±0.09 ^{ab}	2.50±0.18 ^b	2.71±0.24 ^b
Q3RG	1.45±0.10 ^{ab}	1.28±0.06 ^a	1.32±0.04 ^{ab}	1.61±0.08 ^b
Q3G	0.38±0.01 ^a	0.45±0.02 ^a	0.47±0.01 ^a	0.48±0.06 ^a
K3RG	0.46±0.01 ^a	0.65±0.01 ^b	0.84±0.02 ^c	1.02±0.00 ^d
TF-f	2.55±0.08 ^a	2.60±0.12 ^a	2.72±0.16 ^{ab}	3.16±0.13 ^b
TF-3-G	3.54±0.08 ^a	3.82±0.02 ^b	4.00±0.05 ^{bc}	4.10±0.02 ^c
TF-3'-G	1.87±0.01 ^a	1.97±0.05 ^a	2.07±0.16 ^{ab}	2.39±0.04 ^b
TF-3,3'-DG	3.69±0.05 ^a	3.86±0.03 ^b	4.07±0.00 ^c	4.47±0.00 ^d
Toplam TF	11.66±0.12 ^a	12.25±0.22 ^{ab}	12.86±0.28 ^b	14.12±0.18 ^c

* Aynı satırda farklı harflere sahip ortalamalar arasındaki fark önemli düzeyde (p<0.05) farklı

4.6 Farklı Sınıf Çayların Fenolik Madde ve Alkaloid Bileşiklerinin Kıvrırma Yöntemi ve Hasat Dönemine Göre Değişimi

4.6.1 Alkaloid bileşikler

Yapılan kalitatif analiz sonunda çay örneklerinde belirlenmiş olan kafein ve teobromine ait kantitatif analiz sonuçları Çizelge 4.10'da gösterilmektedir.

Üç farklı sürgün döneminde hasat edilerek iki ayrı yöntemle işlenen çayların kafein içeriği 17.51-26.26 mg/g ka olarak saptanmıştır (Çizelge 4.10). Kafein, çayda en fazla bulunan metilksantin bileşimidir ve çay polifenolleri ile özellikle de teafavinlerle kompleks oluşturarak çayın tad özelliklerini olumlu yönde etkilemektedir (Obanda and Owuor1997).

Çizelge 4.10 Alkaloidlerin hasat dönemi, kıvrırma yöntemi ve çay sınıfına göre değişimi (mg/g ka)

Yöntem	Sınıf	Kafein			Teobromin		
		Mayıs	Temmuz	Eylül	Mayıs	Temmuz	Eylül
I	1	25.72±0.64 ^{abB}	24.40±0.15 ^{eb}	20.27±0.66 ^{da}	0.20±0.01 ^{aA*}	0.19±0.01 ^{bA}	0.17±0.01 ^{ca}
	2	25.86±1.28 ^{bc}	23.11±0.12 ^{cdB}	20.10±0.47 ^{cdA}	0.20±0.02 ^{aA}	0.18±0.01 ^{abA}	0.16±0.00 ^{ca}
	3	23.78±0.65 ^{abB}	23.81±0.40 ^{deB}	19.33±0.41 ^{bcdA}	0.18±0.01 ^{aA}	0.16±0.01 ^{abA}	0.16±0.00 ^{ba}
	4	23.28±0.40 ^{abB}	22.47±0.22 ^{bcB}	18.38±0.58 ^{abA}	0.16±0.00 ^{aAB}	0.17±0.01 ^{abB}	0.14±0.00 ^{aA}
	5	23.79±0.90 ^{abB}	21.74±0.49 ^{abB}	17.84±0.28 ^{abA}	0.20±0.02 ^{aA}	0.17±0.00 ^{abA}	0.14±0.00 ^{aA}
	6	24.19±0.82 ^{abC}	21.52±0.36 ^{abB}	17.51±0.53 ^{aA}	0.18±0.01 ^{abB}	0.16±0.01 ^{aAB}	0.15±0.00 ^{abA}
	7	23.12±0.61 ^{ab}	22.81±0.03 ^{cb}	18.74±0.11 ^{abcA}	0.18±0.01 ^{abB}	0.17±0.00 ^{abB}	0.14±0.00 ^{aA}
II	1	25.97±0.53 ^{cb}	25.03±0.69 ^{eb}	20.85±0.66 ^{bcA}	0.20±0.02 ^{ab}	0.21±0.01 ^{ab}	0.15±0.00 ^{abcA}
	2	24.14±0.41 ^{abB}	23.68±0.11 ^{cdB}	20.39±0.69 ^{abcA}	0.19±0.01 ^{aA}	0.20±0.01 ^{aA}	0.16±0.00 ^{bcA}
	3	24.65±0.33 ^{bc}	22.63±0.28 ^{bcB}	19.16±0.33 ^{aA}	0.19±0.01 ^{ab}	0.19±0.01 ^{ab}	0.14±0.01 ^{abA}
	4	24.08±0.17 ^{abC}	22.76±0.38 ^{bcB}	19.54±0.35 ^{abA}	0.18±0.01 ^{ab}	0.18±0.01 ^{ab}	0.14±0.00 ^{abA}
	5	23.16±0.33 ^{ab}	22.13±0.31 ^{abB}	19.00±0.40 ^{aA}	0.18±0.01 ^{ab}	0.17±0.01 ^{aAB}	0.14±0.00 ^{abA}
	6	23.03±0.41 ^{aC}	21.37±0.25 ^{ab}	19.33±0.26 ^{aA}	0.18±0.01 ^{aA}	0.17±0.01 ^{aA}	0.16±0.00 ^{bcA}
	7	26.26±0.06 ^{cc}	24.10±0.33 ^{deB}	21.05±0.11 ^{ca}	0.20±0.01 ^{ab}	0.18±0.00 ^{aA}	0.16±0.00 ^{bcA}

* Her yöntem için aynı sütundaki farklı harfler (a-c) ve aynı satırdaki farklı harfler (A-C) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05)

Khokhar and Magnusdottir (2002) 12 farklı siyah çayda kafein içeriğini 25-28 mg/g, Zuo *et al.* (2002) Fujian tipi siyah çayda 21.6 mg/g, Sharma *et al.* (2005) ortodoks ve CTC tipi siyah çayda sırasıyla 17.9 ve 17.5 mg/g ka, Özdemir (2006) 7 farklı sınıf Türk siyah çayında kuru ağırlık üzerinden % 1.505-2.490 düzeyinde belirlemişlerdir. Görüldüğü gibi, bu araştırma kapsamındaki çaylarda bulunan kafein içerikleri literatürde belirtilen bu değerlerle uyum sağlamıştır. Ancak, Khanchi *et al.* (2007) 3 farklı İran siyah çayında 12.32-19.60 mg/g çay yaprağı, Poyrazoğlu ve Gürses (2004) ülkemiz piyasa çaylarında % 1.59-1.89 ve Obanda *et al.* (2001) ise farklı sıcaklık ve sürede fermentasyon uygulayarak elde ettikleri siyah çaylarda 14.25-16.95 mg/g KM düzeyinde kafein belirlemişlerdir ki bu miktarlar tarafımızdan belirlenen düzeylerden genellikle daha düşüktür. Diğer taraftan, Ding *et al.* (1992) 15 farklı siyah çayda yapılan kafein analizinde, çayların kafein içeriğini 19.9-35.2 mg/g olarak belirlemişlerdir ki bu düzeyler, genel olarak bu çalışmada belirlenen düzeylerden daha yüksektir.

Çayların değişik düzeylerdeki kafein içeriğinin, çayların hasat dönemi, bölgesel farklılıklar, işlenme yöntemi ve yaprak cinsi ve yapısındaki farklılıklar gibi faktörlerden kaynaklanabileceği belirtilmektedir (Khokhar and Magnusdottir 2002, Zuo *et al.* 2002). Bunlara ilave olarak çayın kafein içeriği uygulanan ekstraksiyon yöntemine göre de değişmektedir. Perva-Uzunalić *et al.* (2006) yeşil çaydan kafeinin ekstrakte edilmesinde ekstraksiyon etkinliğinin, kullanılan solvante göre % 9.2-89.1 oranında değiştiğini belirlemişlerdir. Benzer şekilde, Sharma *et al.* (2005) yeşil çayın kafein ve teobromin içeriğinin kullanılan ekstraksiyon solventine göre sırasıyla 8.5-46.0 ile 0.0-8.5 mg/g ka; ekstraksiyon süresi ve aşama sayısına göre 5-46 ile 0.0-5.5 mg/g ka ve S:M oranına göre ise 54.5-98.9 ile 12.8-33.0 mg/g ka olarak değiştiğini saptamışlardır.

Her iki yöntem ile işlenmiş (Şekil 3.1) çay örneklerinde, genel olarak teobromin miktarları sınıf ve dönem farkı olmaksızın 0.14-0.21 mg/g ka olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.10). Çayların teobromin içerikleri üzerine yapılmış çok sınırlı sayıda araştırmaya rastlanmıştır. Sharma *et al.* (2005)'nin yaptığı bir çalışmada, siyah çaylarda bu araştırmada belirlenen düzeylerden daha yüksek düzeylerde (1.06-2.5 mg/g ka) teobromin saptanmıştır. Khanchi *et al.* (2007) tarafından yapılan bir çalışmada ise üç farklı İran siyah çayında, bu araştırma bulgularından daha yüksek ancak Sharma *et al.*

(2005)'nin sonuçlarından çok daha düşük teobromin (0.36-0.45 mg/g çay yaprağı) belirlenmiştir.

Varyans analizi sonucunda araştırmada kullanılan çay örneklerinin kafein ve teobromin miktarları arasında işleme yöntemi, sınıf farklılıkları ve hasat edildiği dönem açısından önemli farklılıklar bulunmuştur (Çizelge 4.11). İstisna olarak, yöntemlerin, teobromin düzeyleri üzerine etkisi olmadığı saptanmıştır.

Çizelge 4.11 Alkaloidlerin hasat dönemi, kıvrırma yöntemi ve çay sınıfına göre değişimine ait varyans analizi sonuçları

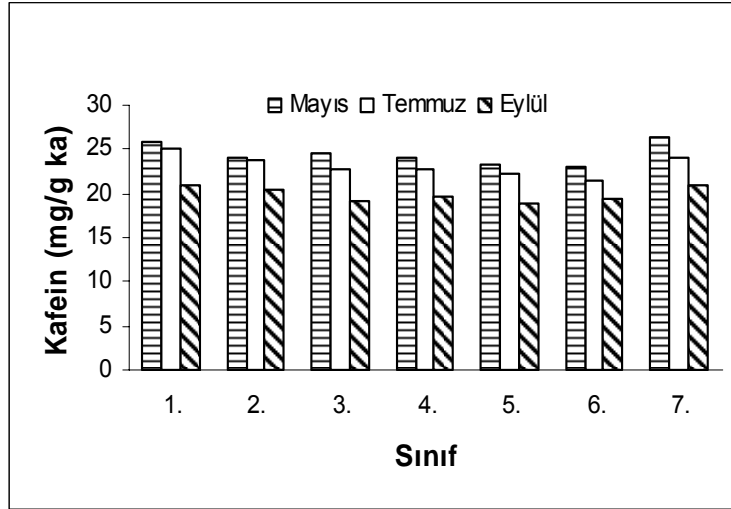
VARYASYON KAYNAKLARI	Kafein			Teobromin		
	SD [†]	KO [†]	F [†]	SD	KO	F
Dönem	2	276.064	390.928*	2	0.014	48.423*
Yöntem	1	7.950	11.258*	1	0.001	3.091
Sınıf	6	15.320	21.694*	6	0.001	4.393*
Dönem x Yöntem	2	2.136	3.024	2	0.000	1.688
Dönem x Sınıf	12	0.382	0.541	12	0.000	0.517
Yöntem x Sınıf	6	3.227	4.570*	6	0.000	0.957
Dönem x Yöntem x Sınıf	12	1.349	1.910*	12	0.000	0.826

* p<0.05 düzeyinde önemli, [†]SD, Serbestlik derecesi; KO, Kareler ortalaması ve F, F (Fisher) değeri

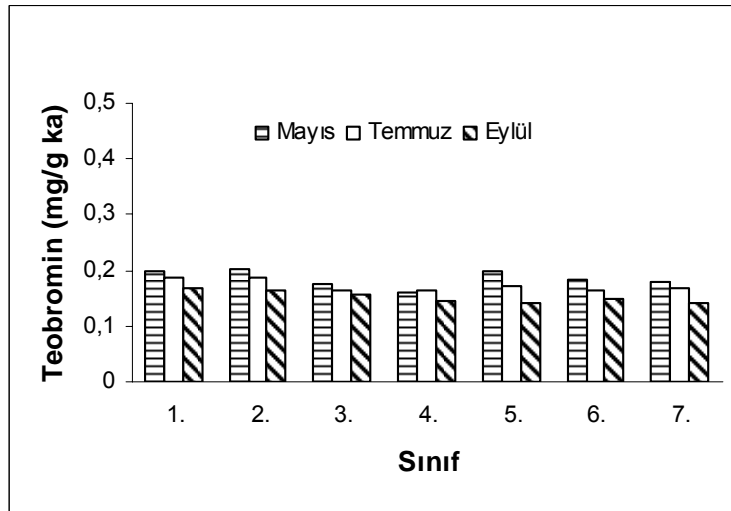
Yöntem farkı olmaksızın, sadece hasat dönemi açısından incelendiğinde, en fazla teobromin ve kafein içeriği Mayıs dönemine ait çaylarda bulunmuştur. Bunu sırasıyla Temmuz ve Eylül dönemi çaylar izlemiştir (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9). Bu sonuçlarla uyumlu olarak, Özdemir (2006) en yüksek kafein içeriğini, 1. sürgün döneminde üretilen çaylarda, en düşük kafein içeriğini de 3. sürgün döneminde üretilen çaylarda belirlemişlerdir.

Yöntem II'ye göre işlenen çayların kafein içeriği (19.00-26.26 mg/g ka), Yöntem I ile işlenen çayların kafein içeriğinden (17.51-25.86 mg/g ka) daha yüksek bulunmuştur. Yöntemler arasında kafein açısından görülen bu farklılık istatistiksel açıdan önemli (Çizelge 4.11) olmasına rağmen, her iki yönteme ait bu değerlerin birbirine yakın olduğu söylenebilir. Benzer şekilde, Astill *et al.* (2001) CTC ve ortodoks olarak 2 farklı yöntemle ürettikleri siyah çayların kafein içerikleri arasındaki farklılıkların fazla

olmadığını (sırasıyla % 2.12-2.20 ve % 2.00-2.04) saptamışlardır. Teobromin açısından yöntemler arasında önemli bir fark gözlenmemiştir. Nitekim, alkaloidlerin fermentasyon işleminden çok az etkilendiği ya da hiç etkilenmediği belirtilmektedir (Schulz *et al.* 1999).



Şekil 4.8 Yöntem II'ye göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda kafein içeriğinin hasat dönemine göre değişimi



Şekil 4.9 Yöntem I'e göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda teobromin içeriğinin hasat dönemine göre değişimi

Çizelge 4.10'da ve Şekil 4.8-4.9'da görüldüğü üzere, genellikle 1. ve 2. sınıf çayların teobromin içeriği ve 1., 2. ve 7. sınıf çayların kafein içeriğinin diğer sınıflara göre daha

yüksek olduğu söylenebilmektedir. Benzer şekilde, Özdemir (2006) 1., 7. ve 2. sınıf çayların en yüksek kafein içeriğine sahip olduğunu saptamışlardır. Çay sınıfları arasındaki bu farklılığın temel nedeni, uygulanan sınıflandırma yönteminin çay sınıflarının partikül büyüklüğü ve kaliteye göre oluşturulmasıdır. Daha önce de belirtildiği gibi 1. ve 2. sınıf çaylar imalat kırığı çaylardır. Bu nedenle kısmen de olsa, işlenen çay yaprağının uç ve taze kısımları bu çay sınıfları içinde daha yüksek oranda bulunmaktadır. Yedinci sınıf çayların kafein içeriğindeki yükseklik ise bunların hem imalat kırığı hem de kırıcıdan geçen çaylardan elde edilmesinden kaynaklanmaktadır.

4.6.2 Fenolik bileşikler

4.6.2.1 Flavan-3-ol bileşikleri

Araştırma kapsamındaki çay örneklerinde EGCG ve ECG olmak üzere başlıca iki kateşin saptanmıştır (Çizelge 4.12). Bu sonuç, Obanda *et al.* (2001)'nin bulgularıyla uyum sağlamıştır.

Çay örneklerinde Yöntem I ile işlenen çaylarda 0.25-0.69 mg/g ka, Yöntem II ile işlenen çaylarda 0.69-3.16 mg/g ka arasında EGCG belirlenmiştir (Çizelge 4.12). Bu miktarlar aynı araştırma kapsamında taze çay yapraklarında belirlenen 130.46 mg/g ka (Muradiye) ile 87.69 mg/g ka (Fener) düzeyindeki EGCG miktarları ile kıyaslandığında (Çizelge 4.3), başlangıçtaki EGCG'nin çok büyük kısmının işleme sırasında başka bileşiklere dönüştüğü görülmektedir. Yöntem II ile işlenmiş çay örneklerinde bulunan EGCG miktarlarının, Liang *et al.* (2003) tarafından su ile ekstrakte edilen 17 farklı tipte siyah çayın 16'sında buldukları 0.72-3.53 mg/g ka EGCG miktarları ile uyumlu olduğu saptanmıştır. Aynı araştırmacılar, yeşil çayda buldukları % 8.4 oranındaki EGCG'nin çok büyük kısmının çayın fermentasyonu sırasında okside olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırma kapsamında incelenen Çay-Kur yeşil çayında belirlenen % 6.11 oranındaki (Çizelge 4.3) EGCG miktarına karşılık siyah çay örneklerinde düşük EGCG miktarlarının (0.25-3.16 mg/g ka) saptanması da bu araştırmacıların buldukları sonuçlarla uyum sağlamaktadır.

Çizelge 4.12 EGCG ve ECG'nın hasat dönemi, kıvrırma yöntemi ve çay sınıfına göre değişimi (mg/g ka)

Yöntem	Sınıf	EGCG			ECG		
		Mayıs	Temmuz	Eylül	Mayıs	Temmuz	Eylül
I	1	0.34±0.01 ^{aAB*}	0.26±0.02 ^{aA}	0.36±0.04 ^{bcB}	0.26±0.04 ^{aA}	0.17±0.01 ^{aA}	0.23±0.04 ^{bcA}
	2	0.38±0.07 ^{abA}	0.38±0.01 ^{cA}	0.39±0.07 ^{cA}	0.34±0.01 ^{abB}	0.20±0.02 ^{abA}	0.17±0.02 ^{abA}
	3	0.42±0.01 ^{abB}	0.37±0.03 ^{bcB}	0.26±0.00 ^{aA}	0.52±0.02 ^{bb}	0.22±0.01 ^{abA}	0.19±0.02 ^{abcA}
	4	0.49±0.07 ^{abB}	0.34±0.02 ^{bcA}	0.27±0.01 ^{abA}	0.55±0.04 ^{bb}	0.23±0.02 ^{abA}	0.25±0.02 ^{cA}
	5	0.69±0.03 ^{bb}	0.32±0.032 ^{abcA}	0.40±0.03 ^{cA}	0.56±0.04 ^{bb}	0.21±0.01 ^{abA}	0.18±0.01 ^{abcA}
	6	0.37±0.07 ^{aAB}	0.46±0.02 ^{dB}	0.27±0.02 ^{abA}	0.42±0.10 ^{abB}	0.26±0.04 ^{bAB}	0.16±0.01 ^{aA}
	7	0.61±0.22 ^{abA}	0.31±0.01 ^{abA}	0.25±0.01 ^{aA}	0.53±0.14 ^{bb}	0.21±0.01 ^{abA}	0.16±0.01 ^{aA}
II	1	1.18±0.04 ^{ab}	0.70±0.14 ^{aA}	0.77±0.11 ^{aA}	0.94±0.07 ^{abB}	0.40±0.01 ^{aA}	0.35±0.06 ^{aA}
	2	1.57±0.27 ^{abB}	0.78±0.13 ^{aA}	0.90±0.15 ^{abAB}	1.26±0.13 ^{bcB}	0.52±0.06 ^{abA}	0.42±0.03 ^{abA}
	3	2.05±0.20 ^{bcB}	0.89±0.16 ^{abA}	0.85±0.16 ^{abA}	1.47±0.14 ^{cdB}	0.53±0.12 ^{abA}	0.45±0.06 ^{abcA}
	4	2.38±0.22 ^{cdB}	1.06±0.15 ^{abA}	0.80±0.04 ^{abA}	1.90±0.09 ^{deB}	0.61±0.10 ^{abA}	0.43±0.04 ^{abA}
	5	3.00±0.30 ^{eB}	1.14±0.22 ^{abA}	1.06±0.12 ^{abA}	2.18±0.24 ^{efB}	0.79±0.13 ^{bA}	0.52±0.07 ^{bcA}
	6	3.16±0.40 ^{eB}	1.38±0.21 ^{bA}	1.15±0.04 ^{bA}	2.54±0.22 ^{fB}	0.74±0.14 ^{bA}	0.59±0.03 ^{cA}
	7	1.06±0.12 ^{ab}	0.69±0.01 ^{aA}	0.71±0.02 ^{aA}	0.73±0.07 ^{ab}	0.37±0.01 ^{aA}	0.34±0.01 ^{aA}

* Her yöntem için aynı sütundaki farklı harfler (a-d) ve aynı satırdaki farklı harfler (A,B) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05)

CTC çayından elde edilen % 70'lik metanol ekstraktında belirlenmiş 0.5 mg/g ka (Sharma *et al.* 2005), 30 °C'de 60 dk fermentasyon uygulamasıyla üretilen siyah çayda saptanmış 2.95 mg/g ka (Obanda *et al.* 2001) ve Lin *et al.* (1998)'in % 85 oranında fermentasyon ile elde ettikleri siyah çayda buldukları 3 mg/g ka düzeyindeki EGCG miktarları tarafımızdan belirlenen EGCG miktarları ile uyum içindedir. Wang *et al.* (2000) tarafından yapılan bir çalışmada Keemun ve Sri Lanka siyah çaylarına ait su ekstraktlarında bulunan, sırasıyla 0.95 (0.48) ve 1.16 (0.58) mg/100ml (mg/g ka) düzeyindeki EGCG miktarları da araştırma bulguları ile benzerlik göstermiştir. Diğer taraftan Khokhar and Magnusdottir (2002) 12 farklı çeşit siyah çayda; Lee and Ong (2000) su ile ekstrakte edilmiş Seylan tipi siyah çay ekstraktında ve farklı markalarda Afrika çaylarına ait su ekstraktlarında bu araştırma verilerine göre daha yüksek miktarda, sırasıyla 2.7-25.2, 5.52 ve 3.916-7.284 mg/g ka düzeyinde, EGCG saptamışlardır. Kuo *et al.* (2005) tarafından yapılan bir çalışmada ise siyah çayın EGCG düzeyi 0.17 mg/g ka olarak belirtilmiştir. Sonuçlar arasında görülen bu farklılıklar, muhtemelen kateşin miktarlarının çayda bulunma düzeylerini belirleyen faktörlerin başında gelen çay yaprağının kalitesi ve çay üretim yöntemindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (Khokhar and Magnusdottir 2002, Shishikura and Khokhar 2005).

Araştırmada kullanılan siyah çay örneklerinin EGCG miktarları üzerine hasat dönemi, kıvırma yöntemi ve sınıf farklılığının etkisi önemli bulunmuştur (Çizelge 4.13). Buna göre en fazla EGCG içeriği, Mayıs döneminde toplanarak işlenmiş çay örneklerinde saptanırken, Temmuz ve Eylül dönemi toplanmış çayların EGCG miktarları birbirine yakın bulunmuştur (Şekil 4.10).

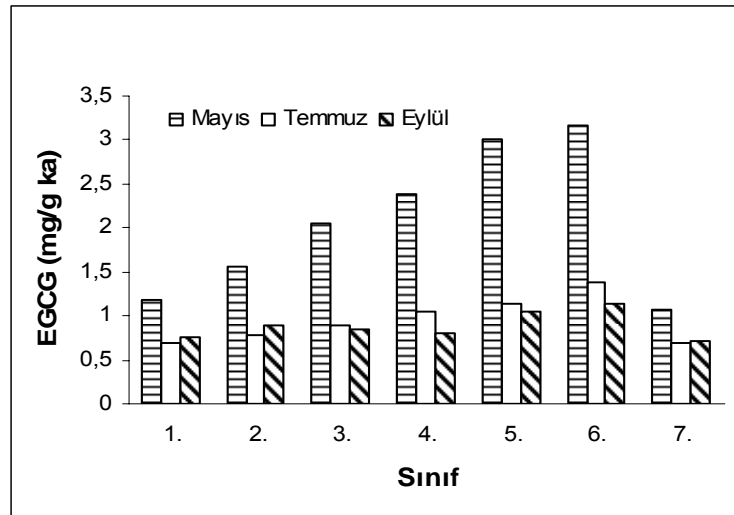
Siyah çayın polifenol miktarı ve dağılımı üzerine, hasat yapılan sürgün dönemlerinin etkisi ülkeye ve bölgeye göre farklılıklar taşımaktadır. Örneğin, Caffin *et al.* (2004) Avustralya siyah çaylarının üretiminde hasat döneminin etkisini belirlemek için yaptıkları çalışmada, bu araştırma sonuçlarından farklı olarak, Ocak (yaz) dönemine ait siyah çay örneklerinde (16.23 mg/g ka), Ekim (sonbahar) ve Haziran (bahar) dönemi çaylarından (sırasıyla 5.19 ile 3.62 mg/g ka) daha fazla EGCG saptamışlardır. Taze çay yapraklarının kateşin konsantrasyonu, bitkinin yavaş ve hızlı geliştiği dönemlere göre değişmektedir (Robertson 1983).

Çizelge 4.13 EGCG ve ECG'nin hasat dönemi, kıvrırma yöntemi ve çay sınıfına göre değişimine ait varyans analizi sonuçları

VARYASYON KAYNAKLARI	EGCG			ECG		
	SD [†]	KO [†]	F [†]	SD	KO	F
Dönem	2	5.776	105.499*	2	6.165	307.661*
Yöntem	1	26.697	487.602*	1	10.421	520.026*
Sınıf	6	0.840	15.345*	6	0.469	23.384*
Dönem x Yöntem	2	3.479	63.551*	2	2.377	118.615*
Dönem x Sınıf	12	0.246	4.499*	12	0.175	8.742*
Yöntem x Sınıf	6	692	12.636*	6	0.367	18.315*
Dönem x Yöntem x Sınıf	12	0.217	3.956*	12	0.143	7.154*

*p<0.05 düzeyinde önemli, [†]SD, Serbestlik derecesi; KO, Kareler ortalaması ve F, F (Fisher) değeri

Bu nedenle, siyah çayın EGCG içeriğindeki mevsimsel değişimin, aynı değişimin hammadde olarak kullanılan taze yaprakların EGCG içeriğinde de görülmesinden kaynaklanabilmektedir. Diğer taraftan, Caffin *et al.* (2004), siyah çayın EGCG miktarlarındaki mevsimsel farklılığa ilişkin eğilimin, taze yaprakların EGCG miktarlarının hasat edildiği mevsime göre izlediği eğilimden farklı olduğunu ve bu farklılığın üretim sırasında oluştuğunu belirtmişlerdir.



Şekil 4.10 Yöntem II'ye göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda EGCG içeriğinin hasat dönemine göre değişimi

Mayıs dönemi çaylarının daha fazla EGCG içermesinin, bunların sudaki ekstrakt miktarlarının diğer dönemlerden daha yüksek olması (EK 1) ile ilişkili olabileceği düşünülebilir. Ancak analizlerin, sulu metanol ekstraktlarında yapılmış olması böyle bir olasılığın düşük olduğunu göstermektedir. EGCG'nın çayın önemli kalite kriterlerinden biri olarak kabul edilmesi (Caffin *et al.* 2004) ve sağlık etkisi açısından tüm kateşinler içinde en yüksek antioksidan aktiviteye sahip kateşin olması (Dufresne and Farnworth 2001, Higdon and Frei 2003, Stewart *et al.* 2005) nedeniyle Mayıs dönemi hasat edilen Yöntem II ile işlenmiş çayların kalitesinin daha yüksek olduğu söylenebilmektedir.

Kıvırma yöntemi dikkate alındığında, Yöntem II ile işlenen çay örneklerinde Yöntem I ile işlenen çaylardan daha fazla EGCG saptanmıştır. Kıvırma sırasında çay yapraklarının ortodoks yöntemle göre çok daha etkin parçalandığı CTC yöntemi ile işlenen çaylarda polifenol oksidasyonu çok hızlıdır (Hazarika *et al.* 1984, Kacar 1987). Nitekim Sharma *et al.* (2005), toplam kateşin içeriğini ortodoks çayında 59.2 mg/g ka bulurken CTC çayında 5.6 mg/g ka olarak belirlemiştir. CTC-Ortodoks benzetmesine dayanarak Yöntem II'de, Yöntem I'den farklı olarak kıvırma sırasında rotorvan kullanılması nedeniyle yapraktaki kateşinlerin daha iyi oksidasyona uğraması, dolayısıyla daha düşük EGCG düzeyleri beklenmektedir. Ancak ilginç bir sonuç olarak, Yöntem I'de daha düşük EGCG saptanması şu iki nedenden kaynaklanabilmektedir: (1) Kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonlar daha çay yapraklarının kıvrılması sırasında başlar (Chou *et al.* 1999). Örneğin, Bonnely *et al.* (2003) siyah çay üretimi sırasında EGCG'dan oksidatif olarak gallik asitin ayrıldığını ve ayrılan gallik asitin çoğunun kimyasal reaksiyonla aşamalı olarak harcandığını belirtmiştir. Bu gerçekler ışığında Yöntem I'de kıvırma işleminin daha uzun uygulanması (Şekil 3.1) sonucunda, henüz fermentasyon öncesinde, kateşinlerde otooksidasyon veya enzimatik olmayan kimyasal oksidasyon (Guyot *et al.* 1996, Tomlins and Mashingaidze 1997) meydana gelebilmektedir. (2) Bazı kateşinler ve EGCG'nın da yer aldığı kateşin gallatlar epimerize olabilirler (Wang and Helliwell 2000, Caffin *et al.* 2004). Ancak, EGCG'nın TF oluşumunda yer alan başlıca 4 kateşinden biri olmasına karşın, onun epimerizasyon ürünü olan GCG'nın, TF oluşumunda neredeyse hiç rolü yoktur. Ancak, ülkemiz koşulları dikkate alındığında bu sonuçlara neden olan başka faktörler de olabilir. Bunların başında hasat standardı gelmektedir. Fabrika ziyaretleri sırasındaki

gözlemlerimize de bağı olarak şunu söylemek mümkündür ki Yöntem I'le çay işleyen bölge üreticileri daha derin hasadı tercih etmektedirler. Bu da hammaddede EGCG miktarını düşürmektedir. Buna bağı olarak, siyah çayda da EGCG miktarı düşük olabilmektedir.

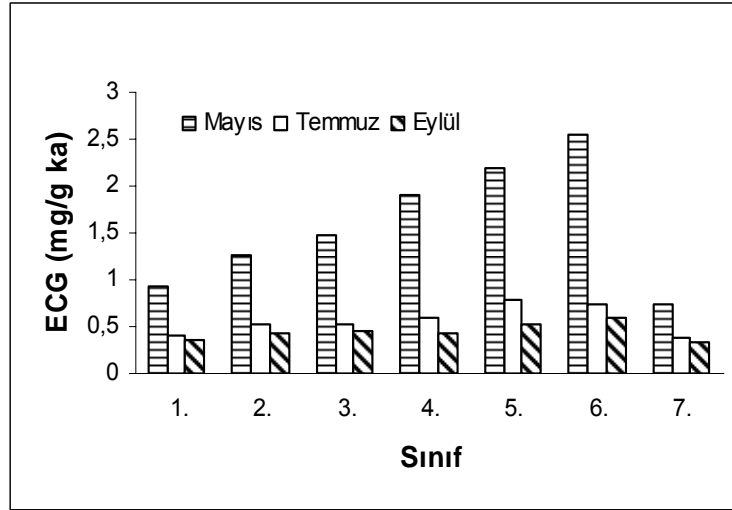
Sınıf farklılıkları açısından Yöntem I'de genellikle 5., Yöntem II'de ise 6. sınıf çayların, diğeri bir deyişle kırıcıdan geçirilmiş çayların EGCG miktarı daha yüksek bulunmuştur. Bu durum şöyle açıklanabilir: kırıcıdan geçirilen çaylar daha yaşlı ve kart yapraklardan elde edilir (Özdemir vd. 1999) ve bunların PPO aktiviteleri körpe yapraklara göre daha düşüktür (Ravichandran and Parthiban 1998a). Öte yandan Özdemir vd. (1999)'e göre 5. ve 6. sınıf çayların elde edildiği yapraklar üretim sırasında tam olarak parçalanmamıştır. Dolayısı ile bu çay sınıflarını oluşturan yapraklarda hücre parçalanma oranı daha düşüktür. Buna bağı olarak, kateşinleri oksidasyona uğratabilecek PPO enzimi daha az bulunabilmiştir. Bu nedenle bu yapraklarda yeterli oksidasyonun, ezme, parçalama, kırma ve kıvrıma işlemlerinin etkinliğinin azlığından dolayı gerçekleşmediği söylenebilmektedir. Kurutma sonrasında kırıcı ile boyut küçültmesinin ise bu oksidasyon üzerinde etkili olamayacağı açıktır. Diğeri taraftan, kart yaprakların aksine körpe yapraklardaki EGCG'nin daha fazla enzimatik oksidasyona uğratılmış olduğu düşünülmektedir.

Çay örneklerinde EGCG'nin yanı sıra 0.16-2.54 mg/g ka düzeyinde ECG saptanmıştır. Bu değerlerin EGCG miktarlarından (0.25-3.16) daha düşük olduğu görülmektedir. Nitekim literatürde farklı solventlerle (% 40 etanol, % 80 metanol, su gibi) ekstrakte edilen siyah çayda en fazla bulunan kateşinin EGCG olduğu belirtilmektedir (Bronner and Beecher 1998, Wright *et al.* 2000, Rechner *et al.* 2002, Zuo *et al.* 2002, Higdon and Frei 2003, Shishikura and Khokhar 2005). EGCG düzeyinde olduğu gibi, örneklerdeki ECG düzeyinin, taze çay filizlerinde (16.82 ve 21.60 mg/g ka) ve yeşil çayda (10.86 mg/g ka) bulunan ECG düzeyinden çok daha düşük olması ECG'nin da büyük kısmının siyah çay üretimi sırasında parçalandığını göstermektedir. Fermentasyonun kateşinlerin oksidasyonu üzerine etkisinin model sistemde araştırıldığı bir çalışmada gallsatlanmış kateşinlerin, gallsatlanmamış kateşinlerden daha hızlı okside olduğu ve taze yaprakta bulunan yüksek miktardaki EGCG ve ECG'nin siyah çayın TF-3,3'-DG içeriğinin daha

fazla olmasına yol açacağı belirtilmiştir (Bonnely *et al.* 2003). Çay örneklerinde bulunan ECG miktarlarının (0.16-2.54 mg/g ka), Sharma *et al.* (2005)'nin % 70 metanol ekstraksiyonu ile ortodoks ve CTC siyah çaylarında (sırasıyla 1.0 ve 1.5 mg/g ka) ve Liang *et al.* (2003)'in 17 farklı tipte siyah çayda (0.61-13.55 mg/g ka) buldukları değerler arasında olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, Luximon-Ramma *et al.* (2005), çeşitli Mauritius çaylarına ait su ekstraktlarında 2.661-8.265 mg/g ka ECG saptamışlardır. Bu araştırma sonuçlarının suyun polifenol ekstraksiyonu açısından iyi bir solvent olmadığını göstermesine karşın, araştırmacıların oldukça yüksek ECG değerleri saptamış olması, yaprak çeşidi ve kalitesi ve üretim yöntemindeki olası farklılıklardan kaynaklanabilmektedir. Benzer şekilde, Zuo *et al.* (2002) % 80 metanol ekstraksiyonu ile Fujian siyah çayında ve Nishitani and Sagesaka (2004), % 50 asetonitril ile ekstrakte edilen siyah çayda daha yüksek düzeyde (sırasıyla 4.45 ve 18 mg/g ka) ECG saptamışlardır. Ancak bu sonuçlardan farklı olarak, Lin *et al.* (1998) % 85 oranında fermentasyon ile elde ettikleri siyah çayda ECG'ı belirleyememişlerdir.

Araştırma çay örneklerinin ECG miktarları hasat dönemi, kıvrırma yöntemi ve çay sınıfına göre önemli farklılıklar göstermiştir (Çizelge 4.13). Şekil 4.11'de en fazla ECG içeriğinin Mayıs dönemi hasat yapılarak işlenmiş yapraklarda saptandığı ve bunu Temmuz ve Eylül dönemi çayların izlediği görülmektedir. Siyah çayların kateşin içeriğinin mevsimsel farklılık gösterdiği daha önce yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir (Caffin *et al.* 2004). Farklı sınıflara ait Türk siyah çaylarında yapılan bir çalışmada ise bu araştırma sonuçlarıyla uyumlu olarak, 1. sürgün döneminden 3. sürgün dönemine doğru çayların kateşin içeriğinin önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir (Özdemir 2006).

Yöntem II ile işlenmiş çaylarda (0.34-2.54 mg/g ka) Yöntem I ile işlenmiş çaylara (0.16-0.52 mg/g ka) göre daha yüksek düzeyde ECG saptanmıştır (Çizelge 4.12). Bu durumun EGCG için açıklanan aynı sebeplerden dolayı olabileceği düşünülmektedir. Genellikle Yöntem I ile işlenen 4. sınıf çayların ve Yöntem II ile işlenen 6. sınıf çayların ECG düzeylerinin daha yüksek olduğu görülmektedir. EGCG'da olduğu gibi, sınıflandırma sırasında kırıcıdan geçirilmiş çaylar, darbe görmemiş ve kırıcıdan geçirilmemiş çaylardan daha fazla ECG içermiştir.



Şekil 4.11 Yöntem II'ye göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda ECG içeriğinin hasat dönemine göre değişimi

4.6.2.2 Flavonol glikozidler

Çay örneklerinde flavonol glikozid olarak 3 bileşik Q3RG, Q3G ve K3RG belirlenmiş ve kantitatif analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçları Çizelge 4.14'de gösterilmiştir. Yöntem I'e göre işlenmiş çay örneklerinin Q3RG, Q3G ve K3RG içerikleri sırasıyla 0.89-1.61, 0.37-0.51 ve 0.90-1.10 mg/g ka olarak saptanmıştır. Yöntem II'ye göre işlenmiş çaylarda ise sırasıyla 0.87-2.01, 0.38-0.55 ve 0.89-1.10 mg/g ka düzeyinde Q3RG, Q3G ve K3RG belirlenmiştir. Belirlenen bu 3 bileşik içinde çay örneklerinde en fazla bulunan flavonol glikozidin Q3RG olduğu ve bunu sırasıyla K3RG ve Q3G'in izlediği görülmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, siyah çaylarda en fazla bulunan flavonol glikozidlerin başında Q3RG'in geldiği belirtilmektedir (McDowell *et al.* 1990, Stewart *et al.* 2005). Dokuz farklı marka Mauritius siyah çayın sulu metanol ekstraktında (Luximon-Ramma *et al.* 2005) ve 12 çeşit siyah çayın su ekstraktında (Hertog *et al.* 1993) aglikon olarak sırasıyla 1.07-3.29 mg/g ka ve 10-25 mg/L (g çay/100 ml dem) düzeyinde kuersetin belirlenirken, 0.27-0.70 mg/g ka ve 6.3-17 mg/L yani daha az miktarda kamferol saptanmıştır. Benzer sonuçlar Justesen *et al.* (1998) tarafından da saptanmıştır Japon yeşil çayında (Sencha) yapılan flavonol analizi sonucunda da çayda kuersetinin (1.56 mg/g ka), kamferol (1.49 mg/g ka) ve mirisetine (1.31 mg/g ka) göre daha baskın olduğu gösterilmiştir (Toyoda *et al.* 1997).

Çizelge 4.14 Q3RG, Q3G ve K3RG'in hasat dönemi, kıvrırma yöntemi ve çay sınıfına göre değişimi (mg/g ka)

Yöntem	Sınıf	Q3RG			Q3G			K3RG		
		Mayıs	Temmuz	Eylül	Mayıs	Temmuz	Eylül	Mayıs	Temmuz	Eylül
I	1	1.56±0.17 ^{ab*}	1.00±0.04 ^{aA}	1.02±0.12 ^{abA}	0.50±0.02 ^{ab}	0.41±0.03 ^{aA}	0.44±0.05 ^{aAB}	1.09±0.04 ^{ab}	0.95±0.02 ^{aA}	0.94±0.05 ^{aA}
	2	1.61±0.19 ^{ab}	0.96±0.03 ^{aA}	1.14±0.07 ^{abA}	0.51±0.04 ^{aA}	0.41±0.01 ^{aA}	0.43±0.08 ^{aA}	1.10±0.08 ^{ab}	0.94±0.01 ^{aA}	0.92±0.05 ^{aA}
	3	1.42±0.10 ^{ab}	1.02±0.01 ^{aA}	0.96±0.18 ^{abA}	0.47±0.01 ^{ab}	0.43±0.00 ^{aAB}	0.40±0.03 ^{aA}	1.06±0.04 ^{ab}	0.95±0.01 ^{aA}	0.92±0.04 ^{aA}
	4	1.56±0.09 ^{ab}	0.97±0.04 ^{aA}	0.93±0.08 ^{abA}	0.44±0.01 ^{aA}	0.40±0.02 ^{aA}	0.39±0.03 ^{aA}	1.04±0.02 ^{ab}	0.94±0.01 ^{aA}	0.91±0.03 ^{aA}
	5	1.52±0.22 ^{ab}	0.91±0.07 ^{aA}	0.89±0.06 ^{aA}	0.47±0.02 ^{ab}	0.40±0.02 ^{aAB}	0.37±0.02 ^{aA}	1.09±0.06 ^{ab}	0.93±0.02 ^{aA}	0.90±0.03 ^{aA}
	6	1.48±0.15 ^{ab}	0.89±0.04 ^{aA}	0.90±0.07 ^{aA}	0.45±0.02 ^{aA}	0.40±0.02 ^{aA}	0.40±0.03 ^{aA}	1.07±0.03 ^{ab}	0.93±0.01 ^{aA}	0.91±0.02 ^{aA}
	7	1.38±0.18 ^{ab}	0.96±0.01 ^{aA}	1.20±0.09 ^{abAB}	0.43±0.04 ^{aA}	0.40±0.01 ^{aA}	0.39±0.01 ^{aA}	1.05±0.04 ^{ab}	0.92±0.00 ^{aA}	0.93±0.01 ^{aA}
II	1	1.75±0.08 ^{abB}	1.08±0.03 ^{bcA}	1.00±0.11 ^{aA}	0.52±0.02 ^{cdB}	0.41±0.01 ^{abA}	0.43±0.05 ^{aAB}	1.10±0.03 ^{ab}	0.95±0.01 ^{bA}	0.92±0.04 ^{aA}
	2	1.74±0.05 ^{abB}	1.02±0.02 ^{abcA}	1.00±0.12 ^{aA}	0.52±0.01 ^{cdB}	0.41±0.01 ^{abA}	0.44±0.05 ^{aA}	1.08±0.03 ^{ab}	0.94±0.01 ^{abA}	0.93±0.04 ^{aA}
	3	1.82±0.07 ^{bcB}	0.94±0.02 ^{aA}	0.95±0.15 ^{aA}	0.55±0.01 ^{dB}	0.40±0.01 ^{abA}	0.42±0.04 ^{aA}	1.08±0.02 ^{ab}	0.92±0.01 ^{abA}	0.91±0.04 ^{aA}
	4	1.63±0.08 ^{abB}	0.99±0.02 ^{abcA}	0.87±0.14 ^{aA}	0.45±0.02 ^{abA}	0.42±0.01 ^{bA}	0.38±0.05 ^{aA}	1.08±0.02 ^{ab}	0.93±0.01 ^{abA}	0.89±0.04 ^{aA}
	5	1.53±0.10 ^{ab}	0.96±0.04 ^{abA}	1.04±0.08 ^{aA}	0.44±0.01 ^{aA}	0.41±0.01 ^{abA}	0.42±0.05 ^{aA}	1.06±0.02 ^{ab}	0.92±0.01 ^{abA}	0.91±0.04 ^{aA}
	6	1.63±0.05 ^{abB}	0.90±0.01 ^{aA}	1.07±0.12 ^{aA}	0.48±0.04 ^{abcA}	0.39±0.01 ^{aA}	0.41±0.05 ^{aA}	1.05±0.03 ^{ab}	0.91±0.01 ^{aA}	0.90±0.04 ^{aA}
	7	2.01±0.04 ^{cb}	1.10±0.08 ^{ca}	1.10±0.10 ^{aA}	0.51±0.00 ^{bcdB}	0.39±0.01 ^{abA}	0.42±0.02 ^{aA}	1.09±0.01 ^{ab}	0.93±0.00 ^{abA}	0.92±0.00 ^{aA}

* Aynı sütundaki farklı harfler (a-c) ve aynı satırdaki farklı harfler (A,B) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05)

Price *et al.* (1998)'ın 11 farklı çeşit siyah çayın flavonol glikozid içeriğine ilişkin yaptıkları çalışmada, çayların su ekstraktında (15 g/L) flavonol glikozidler içinde en önemli grubu (% 36) kuersetin glikozidlerinin oluşturduğu ve çayların Q3RG içeriğinin 0-24.1 mg/L (0-1.6 mg/g) olduğu saptanmıştır. Araştırma çay örneklerinin Q3RG miktarları araştırmacıların buldukları bu değerlerle uyum sağlamıştır. Rechner *et al.* (2002)'in farklı marka siyah çayların fenolik bileşiklerini ve antioksidan aktivitelerini araştırdıkları bir çalışmada, flavonol glikozidler içinde ilk üç sırayı Q3RG, Q3G ve K3RG almıştır. Ancak bunlar arasındaki miktar açısından sıralama çay markasına göre değişmiştir. Tarafımızdan yapılan araştırma sonucu ile uyumlu olarak sadece bir çay markasında ilk sırayı Q3RG almıştır ve bunu sırasıyla K3RG ve Q3G izlemiştir. Benzer şekilde Wang and Helliwell (2001), siyah çayda aglikon olarak belirledikleri kuersetin ve kamferolün, çayda bulunma miktarlarına göre sıralanmalarının çay çeşidine göre farklılık gösterdiğini saptamışlardır.

Yapılan istatistik analizi sonucuna göre çay örneklerinin flavonol glikozid miktarları, bileşik cinsine bağlı olarak, hasat dönemi, kıvrırma yöntemi ve çay sınıfı açısından önemli farklılıklar göstermiştir (Çizelge 4.15).

Yöntem farkı olmaksızın Q3RG, Q3G ve K3RG'in her 3'ü için de geçerli olmak üzere Mayıs dönemi çaylarının flavonol glikozid içeriği genellikle daha yüksek ($p<0.05$) bulunmuştur. Temmuz ve Eylül dönemi çaylarının miktarları ise birbirine yakın olup, önemli bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).

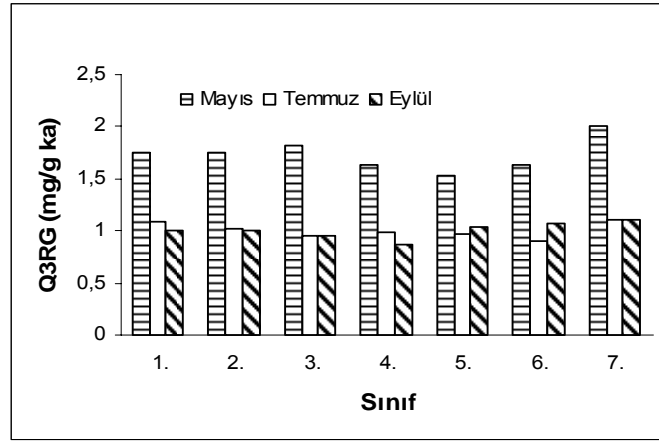
Kıvrırma yönteminlerinin, çay örneklerinin Q3RG içeriği üzerine etkisi önemli bulunurken, Q3G ve K3RG içerikleri üzerine herhangi bir etkisi görülmemiştir. Kateşinlerde olduğu gibi, Yöntem II ile işlenen çay örneklerinde Yöntem I ile işlenmiş çay örneklerinden daha fazla Q3RG belirlenmiştir.

Çizelge 4.15'de görüldüğü gibi, sınıf farklılıklarının çay örneklerinin Q3G hariç, Q3RG ve K3RG içeriği üzerine önemli bir etkisi görülmemiştir. 1., 2. ve 3. sınıf çayların genellikle daha fazla Q3G içerdiği gözlenmiştir (Çizelge 4.14).

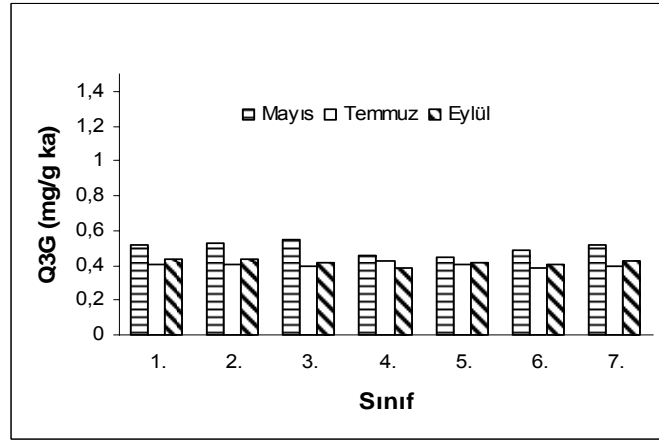
Çizelge 4.15 Q3RG, Q3G ve K3RG'in hasat dönemi, kıvrırma yöntemi ve çay sınıfına göre değişimine ait varyans analizi sonuçları

VARYASYON KAYNAKLARI	Q3RG			Q3G			K3RG		
	SD [†]	KO [†]	F [†]	SD	KO	F	SD	KO	F
Dönem	2	5.496	199.231*	2	0.079	36.770*	2	0.321	148.668*
Yöntem	1	0.256	9.290*	1	0.005	2.346	1	0.001	0.338
Sınıf	6	0.060	2.184	6	0.005	2.252*	6	0.002	0.865
Dönem xYöntem	2	0.152	5.496*	2	0.003	1.556	2	0.001	0.359
Dönem x Sınıf	12	0.010	0.347	12	0.001	0.573	12	0.000	0.145
Yöntem x Sınıf	6	0.023	0.850	6	0.001	0.294	6	0.000	0.188
Dönem xYöntem x Sınıf	12	0.038	1.382	12	0.001	0.614	12	0.001	0.300

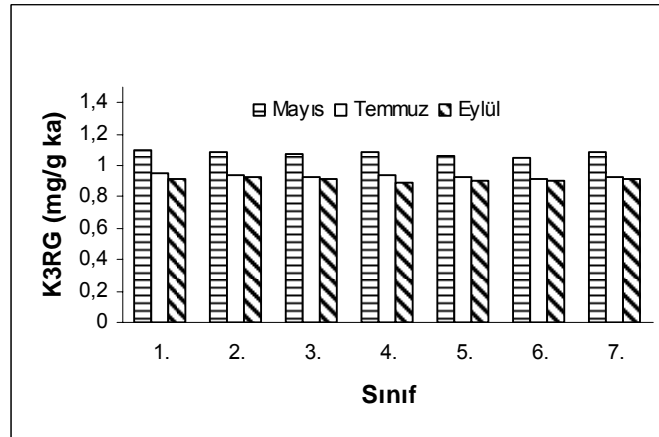
* p<0.05 düzeyinde önemli, [†] SD, Serbestlik derecesi; KO, Kareler ortalaması ve F, F (Fisher) değeri



Şekil 4.12 Yöntem II'ye göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda Q3RG içeriğinin hasat dönemine göre değişimi



Şekil 4.13 Yöntem II'ye göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda Q3G içeriğinin hasat dönemine göre değişimi



Şekil 4.14 Yöntem II'ye göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda K3RG içeriğinin hasat dönemine göre değişimi

Flavonol glikozidler içinde kuersetin bileşiklerinin en fazla antioksidan aktiviteye sahip olması nedeniyle Q3RG çayın önemli bileşenlerinden biridir. Stewart *et al.* (2005) tarafından, siyah çayın flavonol bileşiklerinden kuersetin glikozidlerine ait antioksidan aktivite (0.6-1.2 TEAC) belirlenirken kamferol glikozidlerine ilişkin herhangi bir aktivite belirlenmemiştir. Ayrıca, çay dahil birçok gıdada saptanan aglikon formundaki kuersetinin troloks eşdeğeri olarak antioksidan aktivitesinin (4.7 mM) yine aynı formdaki kamferolün antioksidan aktivitesinden (1.3mM) daha fazla olduğu belirtilmektedir (Rice-Evans *et al.* 1997). Bu sonuçlar dikkate alındığında, en fazla Q3RG içerdiği belirlenen Mayıs döneminde Yöntem II'ye göre işlenmiş çayların diğer çaylara göre daha iyi kalitede olduğu söylenebilmektedir.

4.6.2.3 Teaflavinler

Çayda bulunan fenolik bileşiklerden kateşinlerin oksidasyon ürünü olan ve daha kompleks yapıdaki TF'ler, siyah çayın en önemli bileşenleridir. Çizelge 4.16'da görüldüğü üzere, araştırmada incelenen siyah çayların TF içerikleri aşağıdaki gibidir:

TF-f :	1.21-4.34	mg/g ka
TF-3-G :	2.49-6.10	mg/g ka
TF-3'-G :	1.56-3.64	mg/g ka
TF-3,3'-DG :	4.19-6.12	mg/g ka

Çay örneklerinde, TF bileşiklerinden en fazla TF-3,3'-DG saptanmıştır. Bunu sırasıyla TF-3-G, TF-f ve TF-3'-G bileşikleri izlemiştir. Toplam TF olarak örneklerde 9.89-19.95 mg/g ka düzeyinde TF bulunmuştur. Farklı kaynaklarda siyah çayların su ekstraktlarında toplam TF miktarı mg/g çay olarak şu şekilde belirlenmiştir: Seylan çayında 10.70 (Lee and Ong 2000), Çin çaylarında ortalama 8.54 (Liang *et al.* 2003), Türk çaylarında 2.56-3.73 (Poyrazoğlu ve Gürses 2004) ve çeşitli siyah çaylarda 3.57-11.57 (Peterson *et al.* 2004) ve 4.32-14.48 (Steinhaus and Engelhardt 1989). Bu değerlerin araştırma çay örneklerinin toplam TF düzeylerinden daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durumun ekstraksiyon farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.16 Teaflavinlerin hasat dönemi, kıvrırma yöntemi ve çay sınıfına göre değişimi (mg/g ka)

Yöntem	Sınıf	TF-f			TF-3-G		
		Mayıs	Temmuz	Eylül	Mayıs	Temmuz	Eylül
I	1	2.23±0.22 ^{ab*}	1.59±0.16 ^{abA}	1.58±0.04 ^{cA}	4.09±0.10 ^{bcB}	3.53±0.27 ^{cAB}	3.07±0.07 ^{cA}
	2	2.16±0.05 ^{aB}	1.81±0.09 ^{bA}	1.54±0.11 ^{cA}	4.34±0.31 ^{cB}	3.49±0.09 ^{bcA}	3.01±0.02 ^{cA}
	3	2.19±0.24 ^{aB}	1.75±0.09 ^{bAB}	1.37±0.01 ^{abA}	3.74±0.16 ^{abcB}	3.49±0.09 ^{bcB}	2.87±0.05 ^{bcA}
	4	2.05±0.11 ^{aB}	1.40±0.10 ^{aA}	1.30±0.01 ^{abA}	3.66±0.01 ^{abcB}	2.93±0.16 ^{abA}	2.74±0.08 ^{bA}
	5	1.64±0.23 ^{aA}	1.35±0.12 ^{aA}	1.30±0.06 ^{abA}	3.12±0.17 ^{aB}	2.84±0.22 ^{aAB}	2.49±0.08 ^{aA}
	6	1.78±0.26 ^{aB}	1.38±0.06 ^{aAB}	1.21±0.00 ^{aA}	3.37±0.39 ^{abA}	2.89±0.24 ^{aA}	2.49±0.05 ^{aA}
	7	1.97±0.15 ^{aB}	1.56±0.06 ^{abA}	1.46±0.04 ^{bcA}	3.44±0.49 ^{abcA}	3.06±0.01 ^{abcA}	2.93±0.10 ^{bcA}
II	1	3.87±0.24 ^{bcB}	2.36±0.20 ^{cA}	1.95±0.15 ^{cA}	5.49±0.10 ^{dB}	3.88±0.28 ^{cA}	3.25±0.13 ^{cA}
	2	3.89±0.31 ^{bcB}	2.18±0.09 ^{bcA}	1.78±0.09 ^{abcA}	5.27±0.10 ^{cdC}	3.54±0.13 ^{abcB}	3.19±0.04 ^{bcA}
	3	3.68±0.29 ^{abcB}	1.99±0.05 ^{abA}	1.78±0.12 ^{abcA}	5.10±0.15 ^{cB}	3.22±0.13 ^{abA}	2.94±0.09 ^{abA}
	4	3.28±0.23 ^{abB}	1.96±0.06 ^{abA}	1.55±0.05 ^{abA}	4.72±0.05 ^{bc}	3.30±0.20 ^{abB}	2.72±0.06 ^{aA}
	5	2.98±0.17 ^{aB}	1.81±0.07 ^{aA}	1.64±0.12 ^{abcA}	4.23±0.09 ^{aC}	3.07±0.12 ^{abB}	2.69±0.10 ^{aA}
	6	2.97±0.21 ^{aB}	1.83±0.15 ^{aA}	1.48±0.06 ^{aA}	4.19±0.09 ^{aB}	2.98±0.16 ^{aA}	2.75±0.11 ^{aA}
	7	4.34±0.25 ^{cb}	2.21±0.03 ^{bcA}	1.80±0.03 ^{bcA}	6.10±0.21 ^{eB}	3.61±0.08 ^{bcA}	3.17±0.02 ^{bcA}

* Her yöntem için aynı sütundaki farklı harfler (a-c) ve aynı satırdaki farklı harfler (A-C) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05)

Çizelge 4.16 Teaflavinlerin hasat dönemi, kıvrıma yöntemi ve çay sınıfına göre değişimi (mg /g ka) (devam)

Yöntem	Sınıf	TF-3'-G			TF-3'-DG			Toplam TF		
		Mayıs	Temmuz	Eylül	Mayıs	Temmuz	Eylül	Mayıs	Temmuz	Eylül
I	1	2.25±0.13 ^{aB*}	2.30±0.20 ^{aA}	2.15±0.07 ^{cA}	4.96±0.14 ^{aA}	5.34±0.30 ^{abA}	5.29±0.19 ^{bA}	13.53±0.35 ^{abA}	12.76±0.93 ^{abA}	12.10±0.22 ^{cA}
	2	2.18±0.15 ^{bA}	2.03±0.22 ^{aA}	1.97±0.17 ^{bcA}	5.34±0.60 ^{aA}	5.45±0.17 ^{abA}	5.19±0.33 ^{abA}	14.02±1.09 ^{bA}	12.78±0.50 ^{abA}	11.71±0.58 ^{cA}
	3	1.93±0.20 ^{abA}	2.24±0.20 ^{aA}	1.88±0.03 ^{abcA}	4.58±0.15 ^{aA}	5.81±0.23 ^{bB}	5.01±0.15 ^{abA}	12.44±0.73 ^{abAB}	13.29±0.60 ^{bB}	11.13±0.12 ^{bcA}
	4	1.93±0.05 ^{abA}	1.89±0.11 ^{aA}	1.77±0.09 ^{abA}	4.55±0.05 ^{aA}	5.14±0.17 ^{abB}	4.70±0.21 ^{abAB}	12.19±0.18 ^{abB}	11.36±0.49 ^{abAB}	10.52±0.38 ^{abA}
	5	1.56±0.11 ^{aA}	1.89±0.13 ^{aA}	1.72±0.08 ^{abA}	4.31±0.15 ^{aA}	5.01±0.28 ^{aA}	4.56±0.21 ^{aA}	10.63±0.35 ^{aA}	11.09±0.74 ^{aA}	10.07±0.29 ^{aA}
	6	1.70±0.23 ^{abA}	1.91±0.09 ^{aA}	1.66±0.04 ^{aA}	4.19±0.40 ^{aA}	5.13±0.26 ^{abA}	4.53±0.14 ^{aA}	11.03±1.25 ^{aA}	11.31±0.64 ^{abA}	9.89±0.14 ^{aA}
	7	1.86±0.20 ^{abA}	2.07±0.02 ^{aA}	1.99±0.01 ^{bcA}	4.24±0.50 ^{aA}	5.33±0.01 ^{abB}	4.98±0.03 ^{abAB}	11.50±1.34 ^{abA}	12.02±0.08 ^{abA}	11.36±0.17 ^{bcA}
II	1	3.38±0.10 ^{deB}	2.84±0.19 ^{cAB}	2.36±0.18 ^{bA}	5.84±0.01 ^{bA}	6.12±0.39 ^{aA}	5.60±0.37 ^{aA}	18.58±0.30 ^{cB}	15.20±1.03 ^{bA}	13.17±0.72 ^{bA}
	2	3.09±0.12 ^{cdB}	2.53±0.11 ^{bcA}	2.19±0.18 ^{abA}	5.79±0.03 ^{bA}	5.99±0.26 ^{aA}	5.50±0.46 ^{aA}	18.04±0.49 ^{cB}	14.25±0.59 ^{abA}	12.66±0.71 ^{abA}
	3	2.90±0.12 ^{bcB}	2.23±0.06 ^{abA}	2.07±0.15 ^{abA}	5.76±0.11 ^{bA}	5.59±0.19 ^{aA}	5.27±0.37 ^{aA}	17.43±0.46 ^{cB}	13.02±0.38 ^{aA}	12.06±0.60 ^{abA}
	4	2.56±0.09 ^{abB}	2.28±0.08 ^{abB}	1.94±0.12 ^{abA}	5.12±0.13 ^{aA}	5.54±0.25 ^{aA}	5.21±0.32 ^{aA}	15.68±0.32 ^{bc}	13.09±0.57 ^{abB}	11.42±0.43 ^{abA}
	5	2.31±0.05 ^{aB}	2.08±0.06 ^{aAB}	1.87±0.09 ^{aA}	4.74±0.16 ^{aA}	5.29±0.19 ^{aA}	5.09±0.37 ^{aA}	14.27±0.09 ^{abB}	12.25±0.43 ^{aA}	11.30±0.48 ^{aA}
	6	2.33±0.06 ^{aB}	2.09±0.11 ^{aAB}	1.84±0.09 ^{aA}	4.69±0.22 ^{aA}	5.31±0.28 ^{aA}	5.06±0.38 ^{aA}	14.18±0.12 ^{abB}	12.22±0.68 ^{aA}	11.12±0.40 ^{aA}
	7	3.64±0.24 ^{eB}	2.55±0.14 ^{bcA}	2.24±0.03 ^{abA}	5.87±0.20 ^{bA}	5.84±0.18 ^{aA}	5.51±0.04 ^{aA}	19.95±0.85 ^{dB}	14.20±0.42 ^{abA}	12.72±0.12 ^{abA}

* Her yöntem için aynı sütundaki farklı harfler (a-c) ve aynı satırdaki farklı harfler (A-C) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05)

Liang *et al.* (2003) su ile ekstrakte edilmiş 17 çay örneğinde ortalama değerler olarak en fazla TF-3'-G (2.98 mg/g) ve bunu takiben sırasıyla TF-f (2.35 mg/g), TF-3,3'-DG (2.33 mg/g) ve TF-3-G (0.89 mg/g) saptamışlardır. Araştırma çay örnekleri ile kıyaslandığında, hem çaylarda baskın olan TF bileşiği farklı hem de bireysel TF'lerin miktarları daha düşüktür. Çay polifenollerinin analizinde, kullanılan ekstraksiyon solventi bu bileşiklerin saptanan düzeylerinde çok önemli rol oynamaktadır (Perva-Uzunalić *et al.* 2006, Turkmen *et al.* 2006).

Bu araştırma kapsamında, en etkili solventi belirlemek amacıyla yapılan analizlerde, su ile yapılan ekstraksiyon sonucunda TF bileşikleri içinde sadece TF-f ve TF-3-G ancak çok düşük düzeylerde (sırasıyla 0.55 ve 0.24 mg/g ka) saptanmıştır (Çizelge 4.5). Bu değerler araştırma çay örneklerinde sulu metanol ekstraksiyonu ile belirlenen TF miktarlarının çok altında kalmıştır. Su ile ekstrakte edilerek TF bileşiklerinin belirlendiği diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar alınmıştır. Bunlardan, Steinhaus and Engelhardt (1989) farklı tipte siyah çayların su ekstraktında mg/g olarak 1.35-5.27 TF-f, 0.94-4.96 TF-3,3'-DG, 1.10-4.13 TF-3'-G ve 0.92-2.60 TF-3-G saptamışlardır. Siyah çayda, kateşin ve TF'lerin çayın tadı üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, su ekstraktlarının çok düşük seviyelerde TF içerdiği ve çaylara göre değişmek üzere TF bileşiklerinden birinin çayda daha baskın olduğu belirtilmiştir (Ding *et al.* 1992).

Caffin *et al.* (2004), farklı metanol konsantrasyonları ile kademeli ekstraksiyon uyguladıkları siyah çayda, bu araştırma bulgularından daha yüksek TF değerleri (8.86 mg/g TF-f, 9.82 mg/g TF-3-G, 5.38 mg/g TF-3'-G ve 11.57 mg/g TF-3,3'-DG) saptamışlardır. Aynı araştırmacılar, farklı çalışmalarda bulunan TF miktarlarındaki düşüklüğün olası sebepleri olarak yetersiz ekstraksiyon, ticari çaylar için uzun süre depolanmışlık ve ortodoks yönteminin kullanılmış olmasını göstermişlerdir.

İncelenen çay örneklerinde TF bileşiklerinden en fazla TF-3,3'-DG bulunmasına karşılık daha önce yapılmış çalışmalarda genellikle birbirinden farklı TF bileşiklerinin çayda daha baskın olduğu saptanmıştır. Bu farklılığın oluşmasında bölgesel, genetik, agronomik ve işleme yöntemi gibi faktörlerin rol oynadığı belirtilmektedir (Owuor *et al.*

2006). Bunlardan yola çıkarak aslında, bu araştırmadan elde edilen TF miktarlarını ve dağılımını önceki çalışmalarla kıyaslamak, öncelikle klon çeşidi, üretim koşulu ve iklim, çay üretim yöntemi ve kullanılan analitik yöntemdeki farklılıklardan dolayı oldukça zordur.

TF bileşiklerinin siyah çayın duyusal özelliklerini belirlemede çok önemli rolü vardır. Owuor *et al.* (2006), burukluk olarak TF monogallatların ve digallatın, TF-f'den sırasıyla 2.22 ve 6.4 kat daha fazla burukluğa sahip olduğunu belirtmişler ve TFDGE'nin Kenya siyah çaylarının kalitesinin belirlenmesinde çok önemli bir parametre olduğunu saptamışlardır. Buna karşılık siyah çaydaki TF-f ve TF-3'-G ile çayın toplam kalitesi arasında yüksek bir korelasyon belirlenmiştir (Liang *et al.* 2003). Ayrıca, siyah çayın antioksidan aktivitesinin % 28.8'inden kateşinlerin, % 27.0'sinden ise TF bileşiklerinin sorumlu olduğu belirtilmektedir (Stewart *et al.* 2005). TF'lerin antioksidan aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada en yüksek antioksidan aktiviteyi TF-3,3'-DG'ın gösterdiği ve bunu sırasıyla TF-3-G = TF-3'-G ve TF-f'in izlediği saptanmıştır (Miller *et al.* 1996). Bu sonuca göre, çay örneklerinde TF bileşiklerinden en fazla TFDG'ın bulunması çaylarımızın kalitesi açısından olumlu bir özellik olarak düşünülebilir.

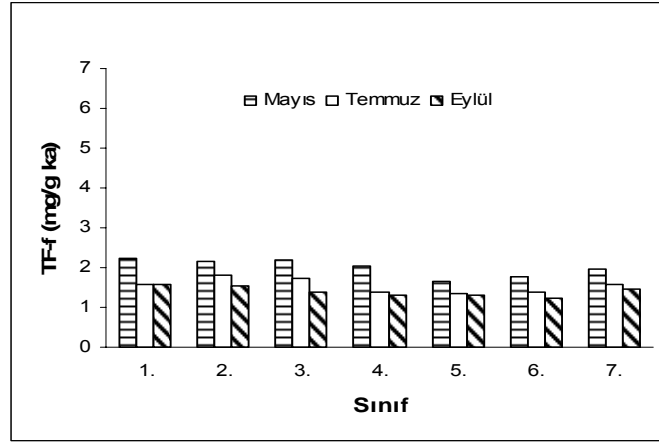
Çay örneklerinin TF bileşiklerinin miktarı hasat dönemi, kıvrırma yöntemi ve sınıf farklılıklarına göre önemli değişiklik göstermiştir (Çizelge 4.17).

Bu çalışmada, Mayıs dönemi çayları TF-f, TF-3-G ve TF-3'-G açısından önemli ($p < 0.05$) farklılık göstermiştir (Çizelge 4.16). Söz konusu TF'in miktarı açısından, Mayıs dönemini Temmuz ve Eylül dönemleri izlemiştir (Şekil 4.15-Şekil 4.18). TF oluşumundan sorumlu PPO enzimi ile kateşinler arasındaki etkileşim oldukça karışıktır (Wright *et al.* 2002). Buna karşın, daha önceki bölümlerde belirtildiği gibi taze çay yaprağındaki kateşin miktarlarının mevsimlere bağımlılığı nedeniyle Mayıs dönemi işlenmiş taze yapraklardaki kateşin düzeyinin yüksek olma olasılığının bu sonuca yol açtığı düşünülebilir. Siyah çaydaki TF seviyesi, taze yapraklardaki kateşin içeriğinin yanı sıra yaprakların PPO aktivitesine de bağlıdır (Lopez *et al.* 2005).

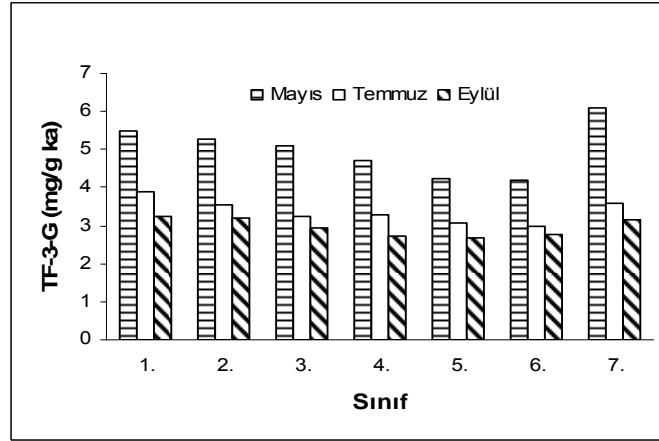
Çizelge 4.17 Teaflavinlerin hasat dönemi, kıvrıma yöntemi ve çay sınıfına göre değişimine ait varyans analizi sonuçları

VARYASYON	TF-f			TF-3-G			TF-3'-G			TF-3-3'-DG			Toplam TF		
	SD	KO	F	SD	KO	F	SD	KO	F	SD	KO	F	SD	KO	F
Dönem	2	17.948	269.588*	2	24.197	288.227*	2	1.917	36.561*	2	2.807	13.239*	2	96,604	91,481*
Yöntem	1	19.965	299.875*	1	9.991	119.010*	1	7.791	148.625*	1	8.797	41.497*	1	179,192	169.690*
Sınıf	6	0.823	12.360*	6	1.952	23.253*	6	1.073	20.463*	6	1.662	7.841*	6	20.943	19.832*
Dönem x Yöntem	2	4.808	72.222*	2	4.671	55.639*	2	1.825	34.809*	2	0.629	2.967	2	41.830	39.611*
Dönem x Sınıf	12	0.091	1.364	12	0.132	1.577	12	0.063	1.207	12	0.088	0.417	12	1.205	1.141
Yöntem x Sınıf	6	0.132	1.981	6	0.340	4.046*	6	0.154	2.932*	6	0.151	0.714	6	2.837	2.687*
Dönem x Yöntem x Sınıf	12	0.085	1.271	12	0.181	2.155*	12	0.078	1.496	12	0.167	0.787	12	1.687	1.597

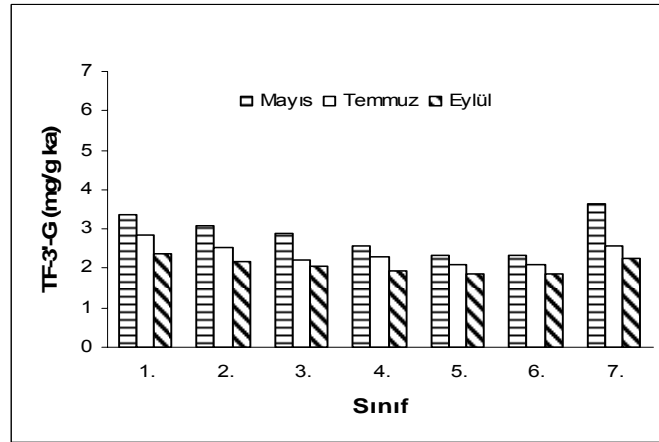
* p<0.05 düzeyinde önemli, ¹SD, Serbestlik derecesi; KO, Kareler ortalaması ve F, F (Fisher) değeri



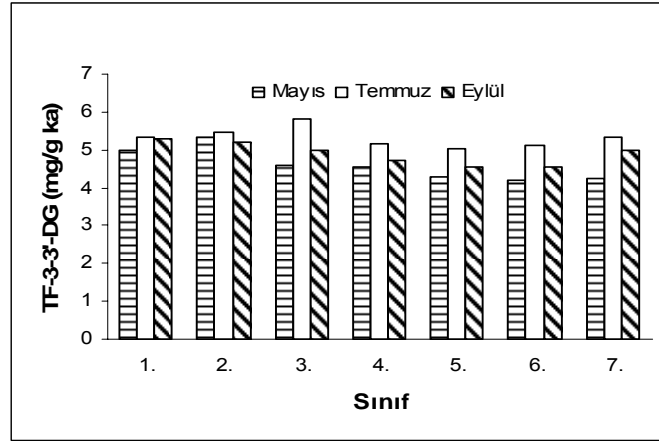
Şekil 4.15 Yöntem I'e göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda TF-f içeriğinin hasat dönemine göre değişimi



Şekil 4.16 Yöntem II'ye göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda TF-3-G içeriğinin hasat dönemine göre değişimi



Şekil 4.17 Yöntem II'ye göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda TF-3'-G içeriğinin hasat dönemine göre değişimi



Şekil 4.18 Yöntem I'e göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda TF-3,3'-DG içeriğinin hasat dönemine göre değişimi

Nitekim, Mayıs dönemi taze çay yapraklarının PPO aktivitesi Temmuz ve Eylül dönemine göre daha yüksek bulunmuştur (Ravichandran and Parthiban 1998a). Bunlara ilave olarak, hasat mevsimine bağlı olarak hava sıcaklığı ve nemdeki değişiklik çayın işleme aşamalarını dolayısıyla TF miktarlarını etkilemektedir. Sud and Baru (2000) siyah çayın TF bileşiklerinin ve organoleptik özelliklerinin, mevsime bağlı olarak, nisbi nem, yağış düzeyi, sıcaklık ve evaporasyon gibi meteorolojik koşullardaki farklılık nedeniyle, değişiklik gösterdiğini saptamışlardır. Aynı araştırmacılar serin ve nemli dönemlerde TF miktarının azaldığını belirlemişlerdir. Mevsimsel farklılıklar ülkemizde daha belirgindir. Örneğin, Temmuz dönemi ile Eylül dönemi arasında ortalama sıcaklık, gece gündüz sıcaklık farkı ve nem farkı oldukça yüksektir. Diğer birçok çay üreticisi ülkeler genellikle tropik kuşakta yer alırlar. Bu ülkelerde çay hasadı yılın oniki ayına yayılırken ülkemizde bu sadece 6 aydır.

Araştırmada kullanılan çay örneklerinin TF-3,3'-DG miktarı, diğer üç TF bileşiğinden farklı olarak en fazla Temmuz döneminde belirlenmiş olup bunu sırasıyla Eylül ve Mayıs ayları izlemiştir (Şekil 4.18). Caffin *et al.* (2004) tarafından yapılan bir çalışmada da siyah çaydaki bireysel TF bileşiklerinin hasat dönemlerine karşı farklı eğilimler gösterdiği ortaya konulmuştur. TF-3,3'-DG'nin oluşumunda esterleşmiş formdaki kateşinler (EGCG ve ECG) yer alır. Kateşin konsantrasyonlarının PPO aktivitesi üzerine etkisinin incelendiği bir model fermentasyon sisteminde EGC ve EC konsantrasyonundaki artış TF oluşumunu artırmış ancak EGCG ve ECG deki artış belli

bir noktadan sonra enzim inhibisyonu nedeniyle TF miktarında azalmaya yol açmıştır (Robertson 1983). İncelenen Mayıs dönemi örneklerinde daha fazla TF-f, TF-3-G ve TF-3'-G belirlenmesi, Mayıs dönemi taze yapraklardaki daha fazla kateşinden kaynaklandığı varsayıldığında, kateşinlerden EGCG ve ECG fazlalığının TF-3,3'-DG miktarını sınırlandırabileceği söylenebilir.

TF bileşiklerinin siyah çayın kalitesini belirleyen en önemli parametrelerden biri olması nedeniyle en fazla TF-3,3'-DG içeren Temmuz dönemi çaylarının kalitesinin daha yüksek olduğu söylenebilmektedir. Diğer taraftan TF-f, TF-3-G ve TF-3'-G bileşikleri açısından da Mayıs dönemi çayları için aynı değerlendirme yapılabilmektedir. Bu konuda kesin bir sonuca varabilmek için hangi TF bileşiğinin çayın duyusal kalitesi ile ilişkili olduğunun belirlenmesine gereksinim duyulmaktadır. Ükelere hatta aynı ülke içinde farklı bölgelere göre değişmek üzere TFDG veya TFDGE (Owuor *et al.* 2006), TF-f ve TF-3'-G (Liang *et al.* 2003) veya TF-3'-G'nin (Wright *et al.* 2002) çayın duyusal kalite özellikleriyle yüksek korelasyon gösterdiği ortaya konulmuştur.

Yöntem I'e göre işlenmiş çaylarda saptanmış TF bileşiklerinin miktarı aşağıda belirtildiği gibidir :

TF-f : 1.21-2.23 mg/g ka
TF-3-G : 2.49-4.34 mg/g ka
TF-3'-G : 1.56-2.25 mg/g ka
TF-3,3'-DG : 4.19-5.81 mg/g ka

Yöntem II'ye göre işlenmiş çay örneklerinde ise daha yüksek TF bileşikleri saptanmış olup, sonuçlar aşağıdaki gibidir :

TF-f : 1.48-4.34 mg/g ka
TF-3-G : 2.69-6.10 mg/g ka
TF-3'-G : 1.84-3.64 mg/g ka
TF-3,3'-DG : 4.69-6.12 mg/g ka

Yöntem I'e göre işlenmiş çayların TF değerlerinin düşük olmasının nedenleri şu şekilde açıklanabilir: (1) Yöntem II'de, yaprakların kıvrırma sırasında rotorvan (Şekil 3.1)

aracılığıyla daha iyi parçalanması ve daha fazla hücre öz suyunun dışarı çıkarılabilmesi sağlandığından, fermentasyon sırasında polifenoller daha hızlı oksidasyona uğrar. Yöntem I'de ise kıvrırma sırasında rotorvan kullanılmadığından (Şekil 3.1) yaprak hücreleri daha az zarar görmektedir ve PPO enzimi ile fenolik maddelerin oksidasyonu daha yavaş gerçekleşmektedir (Hazarika *et al.* 1984, Mahanta 1988). Yöntem I bu yönüyle ortodoks yöntemine benzetilebilir. Nitekim, daha önce yapılan çalışmalarda ortodoks yöntemiyle işlenen çayların TF miktarlarının rotorvanın kullanıldığı yöntemlere göre daha düşük olduğu belirtilmiştir (Biswas *et al.* 1971, Mahanta 1988, Caffin *et al.* 2004). (2) Presli kıvrırma sırasında oluşabilecek yetersiz havalandırma (ÇAY-KUR sözlü görüşme 2006) kateşinlerin yetersiz enzimatik oksidasyonuna neden olabilmektedir. (3) Kıvrırma süresinin uzunluğu nedeniyle TF oluşumunda yer alan kateşinlerde degradasyon meydana gelebilir. Fermentasyon süresinin uzunluğu TF'lerde azalmaya neden olmaktadır (Muthumani and Senthil-Kumar 2007b). Fermentasyonun kıvrırma sırasında başlaması nedeniyle Yöntem I'de toplam fermentasyon süresinin daha uzun olduğu düşünülebilir. (4) Fermentasyonu tamamlanmış yaprakların boyutlarının kıvrırma yöntemine bağlı olarak farklılık göstermesi, kurutma aşamasında çayın TF ve TR bileşimini değiştirmektedir. Örneğin, ortodoks yönteminde yaprak parçalarının boyutlarının CTC yöntemine göre daha büyük olması, kurutmanın yüksek sıcaklık veya daha uzun sürede yapılmasını gerektirir. Bu durum ise TF'lerin TR'lere dönüşmesine yol açar (Hazarika *et al.* 1984). Benzer durum Yöntem I ve II için düşünülebilir. Bunlara ek olarak, TF miktarlarındaki farklılığın diğer olası nedenleri arasında hammadde kalitesi ve oksidasyon süresi ve koşulları da sayılabilir. Ülkemizde toplama standardı hammadde kalitesini düşürmektedir. Yine ülkemiz koşullarında proses kurutma performansına endekslidir. Yani herhangi bir nedenle kurutma işlemi yavaşladığında, çayın oksidasyon süresi uzamaktadır. Bu da oluşan TF'lerin daha kompleks bileşikler olan TR'lere dönüşmesine neden olabilmektedir.

TF bileşiklerinin çay sınıfına göre değişimi düzenli bir eğilim göstermemekle birlikte 1. sınıf çayların TF düzeyleri, diğer sınıflara göre daha farklı ($p < 0.05$) ve daha fazla belirlenmiştir (Çizelge 4.16). İkinci ve yedinci sınıf çayların TF miktarlarının ise 1. sınıf çaylarınkine yakın olduğu gözlenmiştir. 1. ve 2. sınıf çaylar, çayların sınıflandırılması (derecelendirilmesi) sırasında darbe görmemiş ve kırıcıdan geçirilmemiş olan çaylardır.

Bu nedenle, polifenollerini daha az zarar görmüş olabilir ve bu durum, bu çayların TF içeriklerinin yüksekliğinin nedenlerinden sayılabilir. Ayrıca, bu çayların daha küçük çay yapraklarından oluşması ve dolayısıyla daha iyi oksidasyona uğramaları da diğer olası nedenlerdendir. 7. sınıf çay ise kırıcıdan geçen ve geçmeyen çayların eilenmesi sırasında elek altında kalan en ince çaylardır. Bunların TF içeriklerinin yüksekliği ise kırıcıdan geçmeyen çaylara ait elek altı kısmını daha fazla oranda içermelerinden kaynaklanabilir.

4.7 Farklı Sınıf Çayların Toplam Fenolik Madde İçerikleri ve Bunların Kıvrırma Yöntemi ve Hasat Dönemine Göre Değişimi

HPLC sonuçlarıyla karşılaştırma yapmak amacıyla, çay örneklerinde ayrıca, spektrofotometrik olarak toplam fenolik madde analizi gerçekleştirilmiştir. Örneklerde Folin-Ciocalteu yöntemiyle yapılan toplam fenolik madde analizi sonucunda, Yöntem I'e göre işlenen çaylarda 47.05-67.74 mg GAE/g ka, Yöntem II'ye göre işlenen çaylarda ise 53.03-83.40 mg GAE/g ka toplam fenolik madde saptanmıştır (Çizelge 4.18). Daha önce yapılmış çalışmalarda, demir tartarat yöntemiyle Çin'in farklı bölgelerinden toplanmış siyah çay örneklerinde 50.2-131 mg/g ka (Liang *et al.* 2003), Folin-Ciocalteu yöntemiyle de İngiltere piyasasından 4 farklı markaya ait siyah çayda 80.5-134.9 mg GAE/g KM (Khokhar and Magnusdottir 2002), Malezya'da 2 farklı yükseklikte yetişen yapraklardan üretilen siyah çaylarda 60.61 ve 74.09 mg GAE/g ka (Chan *et al.* 2007), İtalya'ya ait bir piyasa siyah çayında 801.16 mg GAE/L (10 g/L) (Manzocco *et al.* 1998), İspanya'ya ait bir piyasa siyah çayında 93.62 mg/100ml (1.5 g çay/150ml dem) (Bravo *et al.* 2007) ve farklı sınıf Türk siyah çaylarında 37.90-83.55 mg GAE/g ka (Özdemir 2006) düzeyinde toplam fenolik madde belirlenmiştir. Tarafımızdan yapılan çalışmada incelenen çay örneklerinin toplam fenolik madde düzeyleri yukarıda belirtilen bu değerler arasında yer almıştır. Buna karşın Caffin *et al.* (2004) siyah çay üretiminin farklı aşamalarında demir tartarat yöntemiyle siyah çayda 94.15-170.19 mg/g KM düzeyinde daha yüksek toplam fenolik madde ve Nas ve Öksüz (1991) ise farklı ambalaj materyalleri ile farklı koşullarda depolanan Türk çayında ortalama % 3.544 (35.44 mg/g çay) düzeyinde daha düşük polifenol belirlemişlerdir. Araştırmacıların ulaştığı sonuçların bu araştırmanın bulgularından ve önceki çalışmalardan daha farklı olması, çayların çeşit, işleme yöntemi ve analiz öncesindeki depolanma sürelerindeki

farklılıklardan kaynaklanabilmektedir. Örneğin, botanik orijini Sri Lanka olan iki farklı yeşil çayın toplam polifenol içeriği (% 26 ve % 34), orijini Çin olan üç farklı yeşil çayın polifenol içeriğinden (% 21, % 21 ve % 23) daha fazla bulunmuştur (Yao *et al.* 2006b).

Çizelge 4.18 Toplam fenolik maddelerin çay sınıfı, kıvrırma yöntemi ve hasat dönemine göre değişimi (mg GAE/g ka)

Yöntem	Sınıf	Toplam fenolik madde		
		Mayıs	Temmuz	Eylül
I	1	66.48±0.42 ^{dB*}	62.87±2.28 ^{cAB}	57.75±1.39 ^{cA}
	2	67.74±0.91 ^{dC}	61.61±0.93 ^{cB}	57.83±1.00 ^{cA}
	3	61.61±0.57 ^{cB}	59.17±0.80 ^{bcB}	55.47±0.75 ^{cA}
	4	59.56±0.14 ^{abcC}	52.87±1.37 ^{aB}	47.05±0.76 ^{aA}
	5	56.26±0.71 ^{aB}	53.19±1.47 ^{aB}	48.15±0.57 ^{bA}
	6	56.81±1.38 ^{abC}	52.83±1.04 ^{aB}	49.02±0.47 ^{abA}
	7	60.66±2.71 ^{bcB}	56.49±0.59 ^{abAB}	52.01±0.70 ^{bA}
II	1	83.40±1.6 ^{eC}	70.73±2.88 ^{cB}	61.14±1.64 ^{bA}
	2	76.00±0.75 ^{cC}	67.19±2.12 ^{bcB}	57.99±1.72 ^{abA}
	3	75.45±0.39 ^{bcB}	65.54±3.76 ^{abcA}	56.81±2.57 ^{abA}
	4	72.86±0.63 ^{abC}	61.14±1.78 ^{abB}	53.50±0.34 ^{aA}
	5	71.84±0.49 ^{aC}	60.90±0.87 ^{abB}	53.03±1.86 ^{aA}
	6	73.96±0.59 ^{abcC}	58.54±1.02 ^{aB}	53.90±0.47 ^{aA}
	7	79.94±1.23 ^{dB}	61.92±0.36 ^{abA}	59.17±0.70 ^{bA}

* Her yöntem için aynı sütundaki farklı harfler (a-c) ve aynı satırdaki farklı harfler (A-C) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05)

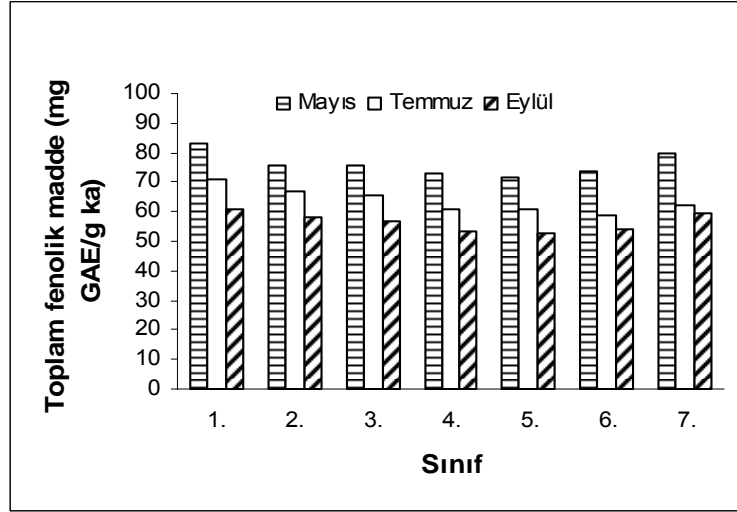
Bu çalışmada, çay örneklerinin toplam fenolik madde miktarı üzerine hasat dönemi, kıvrırma yöntemi ve çay sınıfının etkisi önemli (p<0.05) bulunmuştur (Çizelge 4.19). Hasat dönemi dikkate alındığında en fazla toplam fenolik madde Mayıs (56.26-83.40 mg GAE/g ka) dönemine ait çaylarda belirlenmiştir. Bunu sırasıyla Temmuz (52.83-70.73 mg GAE/g ka) ve Eylül (47.05-61.14 mg GAE/g ka) dönemi izlemiştir (Şekil 4.19). Bu sonuç siyah çay örneklerinde HPLC ile belirlenmiş olan fenolik madde ve alkaloid bileşiklerin hasat dönemlerine göre değişimi ile benzerlik göstermiştir. Toplam

fenolik madde miktarının hasat dönemine göre değiştiği, Caffin *et al.* (2004) tarafından Avustralya siyah çayları için de belirtilmiştir. Bu araştırma sonuçlarıyla uyumlu olarak, Özdemir (2006) tarafından, 1.sürgün döneminden 3. sürgün dönemine doğru Türk siyah çaylarının toplam fenolik madde içeriğinin önemli oranda azaldığı ve 3. sürgün döneminde üretilen çayların fenolik madde miktarının en düşük düzeyde kaldığı saptanmıştır. HPLC ile tespit edilen fenolik bileşik miktarlarında görüldüğü gibi, toplam fenolik madde açısından Yöntem II ile işlenmiş çaylarda daha yüksek değerler elde edilmiştir. Yedi farklı sınıfa ait çay örneklerinin toplam fenolik madde düzeyleri karşılaştırıldığında ise en yüksek toplam fenolik madde içeriği 1., 2. ve 3. sınıf çaylarda saptanmıştır. Bu çayları 7. sınıf çaylar takip etmiştir. 4., 5. ve 6. sınıf çaylar ise daha düşük düzeyde toplam fenolik madde içermiştir. Bu sonuçlar, Özdemir (2006) tarafından elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermiştir.

Çizelge 4.19 Toplam fenolik maddelerin hasat dönemi, kıvrırma yöntemi ve çay sınıfına göre değişimine ait varyans analizi sonuçları

VARYASYON KAYNAKLARI	Toplam fenolik madde		
	SD [†]	KO [†]	F [†]
Dönem	2	2160.011	356.197*
Yöntem	1	2301.370	379.508*
Sınıf	6	267.337	44.085*
Dönem x Yöntem	2	336.826	55.544*
Dönem x Sınıf	12	6.304	1.040
Yöntem x Sınıf	6	17.795	2.935*
Dönem x Yöntem x Sınıf	12	6.731	1.110

* p<0.05 düzeyinde önemli, [†]SD, Serbestlik derecesi; KO, Kareler ortalaması ve F, F (Fisher) değeri



Şekil 4.19 Yöntem II'ye göre işlenmiş farklı sınıf çaylarda toplam fenolik madde içeriğinin hasat dönemine göre değişimi

Bu eğilim, incelenen örneklerin polifenollerinin en büyük kısmını oluşturan teaflavin bileşikleri açısından göstermiş olduğu eğilimle uyumludur.

5. SONUÇ

Bu araştırmada farklı sınıf çaylarda, farklı hasat dönemi ve çay kıvrıma yöntemlerinin çayın fenolik madde ve alkaloid bileşimine etkisi belirlenmiştir. Bu amaçla önce yöntem geliştirilmiştir. Araştırmadan elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

5.1 Yöntem Geliştirmeye İlişkin Sonuçlar

1. Çay örneklerinde fenolik madde ve alkaloid bileşiklerin analizleri, tarafımızdan geliştirilen HPLC yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Siyah çayda flavan-3-ol bileşiklerinden EGCG ve ECG, flavonol glikozidlerden Q3RG, Q3G ve K3RG, kompleks polifenollerden TF-f, TF-3-G, TF-3'-G ve TF-3,3'-DG ve alkaloid bileşiklerden kafein ve teobromin tanımlanarak kantitatif analizi yapılmıştır. Çayda bulunan bu bileşiklerin test edilen konsantrasyon aralıklarında iyi bir linearite (0.9969-1) göstermesi ve aynı bileşiklerin gün içi ve günler arası varyasyon katsayılarının sırasıyla % 0.09-0.76 ve % 0.28-1.66 olarak bulunması yöntemin geçerliliğini doğrulamıştır.
2. Fenolik madde ve alkaloid bileşiklerin çaydan ekstrakte edilmesi amacıyla farklı ekstraksiyon teknikleri (ultrasonik, vorteks ve çalkalamalı) karşılaştırılmış ve örneklerin ekstraksiyonunda en iyi sonuç veren tekniğin, çalkalamalı ekstraksiyon olduğu ortaya konulmuştur.
3. En etkili ekstraksiyon solventini belirlemek amacıyla farklı solventlerin (su, % 80'lik etanol, % 80'lik metanol, % 100'lük metanol ve % 50'lik metanol) karşılaştırılması sonucunda solventlerin etkinliğinin bileşik cinsine bağlı olarak değiştiği ortaya konulmuştur. Suyun alkaloidler açısından en etkili solvent olduğu ancak fenolik bileşikler açısından en az etkili solvent olduğu belirlenmiştir. Organik solventler arasında, TF'ler açısından % 80'lik etanolün, TF'lerin dışında kalan bileşikler açısından ise % 80'lik metanol ve % 80'lik etanolün en etkili solventler olduğu

belirlenmiştir. Bu nedenle, örneklerin ekstraksiyonunda % 80'lik metanol kullanılmıştır.

4. Kademeli (beş aşamalı) ve tek aşamalı ekstraksiyonlar karşılaştırıldığında kademeli ekstraksiyon sonucu elde edilen bileşiklerin miktarları, tek aşamalı ekstraksiyona göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak, deneysel hataları en aza indirmek ve ele alınan diğer kriterlerin etkisini daha duyarlı olarak belirlemek amacıyla bu çalışmada çay örneklerinin ekstraksiyonu tek aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir.
5. Farklı S:M oranları (10:1, 20:1, 50:1) içinde 50:1 oranı uygulandığında çaydan en fazla fenolik madde ve alkaloid bileşik ekstraksiyonun sağlandığı belirlenmiş ve araştırmada bu oran uygulanmıştır.
6. Çayda belirlenen fenolik madde ve alkaloid bileşiklerin miktarına ilişkin varyasyon katsayılarının % 0.38-1.99 olarak belirlenmesi, ekstraksiyon yönteminin tekrarlanabilirliğinin çok iyi olduğunu göstermiştir.
7. Ekstraktların HPLC'ye doğrudan (% 80 metanol içeren) veya damıtık su ile seyreltilerek (% 40, % 25 ve % 18.5 metanol) enjeksiyonunun sonuçlara etkisi araştırılmıştır. En yüksek fenolik madde ve alkaloid değerlerinin metanol oranı % 18.5'a düşürüldüğünde elde edildiği anlaşılmış ve çalışmada kullanılan ekstraktlar bu düzeyde seyreltilmiştir.

5.2. Örneklerin Karşılaştırılmasına İlişkin Sonuçlar

1. Çalışmada ele alınan her iki yöntemle işlenmiş çay örneklerinde, kafein ve teobromin miktarları sınıf ve dönem farkı olmaksızın mg/g ka olarak sırasıyla, 17.51-26.26 ve 0.14-0.21 düzeyinde belirlenmiştir. Mayıs dönemine ait çayların alkaloid içeriği diğer dönemlerden fazla bulunmuştur. Yöntem II'ye göre işlenmiş çaylar daha fazla kafein içerirken, teobromin açısından yöntemler arasında bir fark gözlenmemiştir. Genellikle 1. ve 2. sınıf çayların teobromin içeriği ve 1., 2. ve 7. sınıf çayların kafein içeriğinin diğer sınıflara göre daha fazla olduğu söylenebilmektedir.

2. Flavan-3-ol bileşikleri açısından çayların EGCG içeriği, ECG içeriğinden daha fazla bulunmuştur. Yöntem II'ye göre işlenmiş çaylarda 0.69-3.16 mg/g ka düzeyinde EGCG ve 0.34-2.54 mg/g ka düzeyinde ECG bulunmuştur. Yöntem I'e göre işlenen çaylarda ise daha düşük düzeylerde EGCG (0.25-0.69 mg/g ka) ve ECG (0.16-0.52 mg/g ka), belirlenmiştir. Yöntemler arasındaki bu farklılığın istatistiksel olarak önemli olduğu gözlenmiştir. En fazla flavan-3-ol içeriği, Mayıs döneminde hasat yapılarak işlenmiş yapraklarda gözlenmiş olup bunu Temmuz ve Eylül dönemi çayları izlemiştir. Genellikle, Yöntem I'e göre işlenen 4. sınıf çayların ECG düzeyi ve 5. sınıf çayların EGCG düzeyi ile Yöntem II'ye göre işlenen 6. sınıf çayların hem EGCG hem de ECG düzeylerinin diğer çaylardan daha yüksek olduğu saptanmıştır.
3. Çay örneklerinde en fazla bulunan flavonol glikozidin Q3RG olduğu ve bunu sırasıyla K3RG ve Q3G'in izlediği gözlenmiştir. Yöntem I'e göre işlenmiş çay örneklerinin Q3RG, Q3G ve K3RG içerikleri sırasıyla 0.89-1.61, 0.37-0.51 ve 0.90-1.10 mg/g ka olarak tespit edilmiştir. Yöntem II'ye göre işlenmiş çaylarda ise sırasıyla 0.87-2.01, 0.38-0.55 ve 0.89-1.10 mg/g ka düzeyinde Q3RG, Q3G ve K3RG belirlenmiştir. Mayıs dönemi çaylarının flavonol glikozid içeriği genellikle daha yüksek ($p<0.05$) bulunmuştur. Temmuz ve Eylül dönemi çaylarının miktarları ise birbirine yakın olup, önemli bir fark gözlenmemiştir. Kateşinlerde olduğu gibi, Yöntem II ile işlenen çay örneklerinde Yöntem I ile işlenmiş çay örneklerinden daha fazla Q3RG saptanmıştır. Ancak, kıvrırma yöntemlerinin Q3G ve K3RG içerikleri üzerine herhangi bir etkisi görülmemiştir ($p>0.05$). Sınıf farklılıklarının çay örneklerinin Q3G hariç, Q3RG ve K3RG içeriği üzerine önemli bir etkisi görülmemiştir. Q3G açısından, genellikle 1., 2. ve 3. sınıf çayların daha fazla flavonol glikozid içerdiği gözlenmiştir.
4. Çay örneklerinde, TF bileşiklerinden en fazla TF-3,3'-DG saptanmıştır. Bunu sırasıyla TF-3-G, TF-f ve TF-3'-G bileşikleri izlemiştir. Örneklerde 9.89-19.95 mg/g ka düzeyinde toplam TF bulunmuştur. Mayıs dönemi çayları TF-f, TF-3-G ve TF-3'-G açısından önemli ($p<0.05$) farklılık göstermiştir. Söz konusu TF'in miktarı açısından, Mayıs dönemini Temmuz ve Eylül dönemleri izlemiştir. Ancak, TF-3,3'-DG miktarı, diğer üç TF bileşiğinden farklı olarak en fazla Temmuz döneminde

belirlenmiş olup, bunu sırasıyla Eylül ve Mayıs ayları izlemiştir. Yöntem II'ye göre işlenmiş çay örneklerinde daha yüksek düzeyde TF bileşikleri saptanmıştır. Yöntem I'e göre işlenen çaylarda 9.89-13.29 mg/g ka, Yöntem II'ye göre işlenen çaylarda ise 11.12-19.95 mg/g ka düzeyinde toplam TF bulunmuştur. TF bileşiklerinin çay sınıfına göre değişimi düzenli bir eğilim göstermemekle birlikte birinci sınıf çayların TF düzeyleri, diğer sınıflara göre daha farklı ($p<0.05$) ve daha fazla belirlenmiştir. İkinci ve yedinci sınıf çayların TF miktarlarının ise 1. sınıf çaylarınkine yakın olduğu gözlenmiştir

5. Folin-Ciocalteu yöntemiyle yapılan toplam fenolik madde analizi sonucunda mg GAE/g ka olarak, Yöntem I'e göre işlenen çaylarda 47.05-67.74, Yöntem II'ye göre işlenen çaylarda ise 53.03-83.40 düzeyinde daha yüksek toplam fenolik madde saptanmıştır. Hasat dönemi dikkate alındığında en fazla toplam fenolik madde Mayıs (56.26-83.40 mg GAE/g ka) dönemine ait çaylarda belirlenmiştir. Bunu sırasıyla Temmuz (52.83-70.73 mg GAE/g ka) ve Eylül (47.05-61.14 mg GAE/g ka) dönemi çaylar izlemiştir. Dönemler arasında görülen bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Yedi farklı sınıfa ait çay örneklerinin toplam fenolik madde düzeyleri karşılaştırıldığında, en yüksek toplam fenolik madde içeriği 1., 2. ve 3. sınıf çaylarda belirlenmiştir. Bu çayları 7. sınıf çaylar izlemiştir. İncelenen parametreler açısından, çayların toplam fenolik madde içeriğinde görülen eğilim, HPLC ile saptanan fenolik bileşik miktarlarında görülen eğilimle genellikle önemli bir uyum sağlamıştır.

KAYNAKLAR

- An, B., Kwak, J., Son, J., Park, J., Lee, Jo., C. and Byun, M. 2004. Biological and anti-microbial activity of irradiated green tea polyphenols. *Food Chemistry*, 88, 549-555.
- Anonymous. 2004. Turkish black tea. *Business Highlights*, 2, 1-7.
- Aruoma, O.I. 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research*, 523-524, 9-20.
- 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.
- Aucamp, J.P., Hara, Y. and Apostolides, Z. 2000. Simultaneous analysis of tea catechins, caffeine, gallic acid, theanine and ascorbic acid by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*, 876, 235-242.
- 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.
- 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.
- Biswas, A.K., Biswas, A.K. and Sarkar A.R. 1971. Biological and chemical factors affecting the valuations of North-East Indian plains teas. II.*-Statistical evaluation of the biochemical constituents and their effects on briskness, quality and cash valuations of black teas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 22, 196-204.
- 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.
- Borse, B.B., Rao, L.J.M., Nagalakshmi, S. and Krishnamurthy, N. 2002. Fingerprint of black teas from India: identification of the regio-specific characteristics. *Food Chemistry*, 79, 419-424.
- Bravo, L., Goya, L. and Lecumberri, E. 2007. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. *Food Research International*, 40, 393-405.
- 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.
- Brunetto, M.R., Gutiérrez, L., Delgado, Y., Gallignani, M., Zambrano, A., Gómez, A., Ramos, G. and Romero, C. 2007. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*, 100, 459-467.
- 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.
- Cacace, J.E. and Mazza, G. 2003. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59, 379-389.
- 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.
- 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., Chen, Y. and Chang, C. 2000. Separation of catechins from green tea using carbon dioxide extraction. *Food Chemistry*, 68, 109-113.
- 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.

- Chen, C.N., Liang, C.M., Lai, J.R., Tsai, Y.J., Tsay, J.S. and Lin, J.K. 2003. Capillary electrophoretic determination of theanine, caffeine, and catechins in fresh tea leaves and oolong tea and their effects on rat neurosphere adhesion and migration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7495-7503.
- 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.
- Clifford, M.N., Copeland, E.L., Bloxsidge, J.P. and Mitchell, L.A. 2000. Hippuric acid as a major excretion product associated with black tea consumption. *Xenobiotica*, 30, 317-326.
- Coelho G.C., Rachwal, M.F.G., Dedecek, R.A., Curcio, G.R., Nietsche, K. and Schenkel, E.P. 2007. Effect of light intensity on methylxanthine contents of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 75-80.
- Dalluge, J.J., Nelson, B.C., Thomas, J.B. and Sander, L.C. 1998. Selection of column and gradient elution system for the separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 793, 265-274.
- Demir, A. 2002. Çay. *Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü -Bakış*, 1, 1-4.
- Dharmadi, A. 2004. Contributions of research and it's impact on tea production in Indonesia. *International Conference on O-CHA(tea) Culture and Science*, 55-58.
- Ding, Z., Kuhr, S. and Engelhardt, U.H. 1992. Influence of catechins and theaflavins on the astringent taste of black tea brews. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 195, 108-111.
- 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.
- FAO. 2005a. Tea compendium. *FAO-Committee on Commodity Problems*, Bali, Indonesia, 20-25 July 2005, Sixteenth session, CCP:TE 05/CRS 2.
- FAO. 2005b. Major food and agricultural commodities and producers. <http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html?item=667&lang=en&year=2005>. Erişim tarihi: 24.01.2007.
- 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.

- Geetha, T., Garg, A., Chopra, K. and Kaur, I.P. 2004. Delineation of antimutagenic activity of catechin, epicatechin and green tea extract. *Mutation Research*, 556, 65-74.
- Ghodake, H.M., Goswami, T.K. and Chakraverty, A. 2006. Mathematical modelling of withering characteristics of tea leaves. *Drying Technology*, 24, 159-164.
- Goli, A.H., Barzegar, M., and Sahari, M.A. 2005. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, 92, 520-525.
- 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.
- Gupta, S., Chaudhuri, T., Seth, P., Ganguly, D.K. and Giri, A.K. 2002. Antimutagenic effects of black tea (world blend) and its two active polyphenols theaflavins and thearubigins in *Salmonella* assays. *Phytotherapy Research*, 16, 655-661.
- Guyot, S., Vercauteren, J. and Cheynier, V. 1996. Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry*, 42, 1279-1288.
- 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.
- Haslam, E. 2003. Thoughts on thearubigins. *Phytochemistry*, 64, 61-73.
- Hazarika, M., Chakravarty, S.K. and Mahanta, P.K. 1984. Studies on thearubigin pigments in black tea manufacturing systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35, 1208-1218.

- 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 van de Putte, B. 1993. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1242-1246.
- Hicks, M.B., Hesieh, Y-H.P. and Bell, L.N. 1996. Tea preparation and its influence on methylxanthine concentration. *Food Research International*, 29, 325-330.
- Higdon, J.V. and Frei, B. 2003. Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 89-143.
- Hodgson, J.M., Proudfoot, J.M., Croft, K.D., Puddey, I.B., Mori, T.A. and Beilin, L.J. 1999. Comparison of the effects of black and green tea on *in vitro* lipoprotein oxidation in human serum. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 561-566.
- Hour, T., Liang, Y., Chu, I. and Lin, J. 1999. İnhibition of eleven mutagens by various tea extracts, (-) epigallocatechin-3-gallate, gallic acid and caffeine. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 569-579.
- Hu, M. and Skibsted, L.H. 2002. Antioxidant capacity of rhizome extract and rhizome knot extract of edible lotus (*Nelumbo nuficera*). *Food Chemistry*, 76, 327-333.
- Hudaykuliyeu, Y. 2003. İşlenmiş Türk çaylarının flor içeriği üzerine araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Ito, R., Yamamoto, A., Kodama, S., Kato, K., Yoshimura, Y., Matsunaga, A. and Nakazawa, H. 2003. A study on the change of enantiomeric purity of catechins in green tea infusion. *Food Chemistry*, 83, 563-568.
- 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.
- Justesen, U., Knuthsen, P. and Leth, T. 1998. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 799, 101-110.
- Kacar, B. 1987. Çayın Biyokimyası ve İşleme Teknolojisi. Çay İşletmeleri Genel Müdürlüğü, Çay-Kur Yayını No:6, 329 s., Ankara.
- Kacar, B. 1992. Yapraktan bardağa. T.C. Ziraat Bankası Kültür Yayınları No:23, 441 s., Ankara.

- Kajiya, K., Kumazawa, S. and Nakayama, T. 2002. Effects of external factors on the interaction of tea catechins with lipid bilayers. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66, 2330-2335.
- Khanchi, A.R., Mahani, M.K., Hajhosseini, M., Maragheh, M.G., Chaloosi, M. and Bani, F. 2007. Simultaneous spectrophotometric determination of caffeine and theobromine in Iranian tea by artificial neural Networks and its comparison with PLS. *Food Chemistry*, 103, 1062-1068.
- Khokhar, S. and Magnusdottir, S.G.M. 2002. Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 565-570.
- 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.
- Kuroda, Y. and Hora, Y. 1999. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutation Research*, 436, 69-97.
- Langley-Evans, S.C. 2000. Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 51, 181-188.
- Lapornik, B., Prosěk, M. and Wondra, A.G. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71, 214-222.
- Lee, B.L. and Ong, C.N. 2000. Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 881, 439-447.
- Leong, L.P. and Shui, G. 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*, 76, 69-75.
- 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, Y. and Xu, Y. 2003. Effect of extraction temperature on cream and extractability of black tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *International Journal of Food Science and Technology*, 38, 37-45.
- Liang, Y., Lu, J., Zhang, L., Wu, S. and Wu, Y. 2003. Estimation of black tea quality by analysis of chemical composition and colour difference of tea infusions. *Food Chemistry*, 80, 283-290.

- Liebert, M., Licht, U., Böhm, V. and Bitsch, R. 1999. Antioxidant properties and total phenolics content of green and black tea under different brewing conditions. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 208, 217-220.
- 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-radical-absorbing capacity with antiproliferative actions in fibroblast cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1387-1394.
- Lin, J.K., Lin, C.L., Liang, Y.C., Lin-Shiau, S.Y. and Juan, I.M. 1998. Survey of catechins, gallic acid, and methylxanthines in green, oolong, pu-erh, and black teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3635-3642.
- 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.
- Luximon-Ramma, A., Bajorun, T., Crozier, A., Zbarsky, V., Datla, K.P., Dexter, D.T. and Aruoma, O.I. 2005. Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas. *Food Research International*, 38, 357-367.
- Mahanta, P.K. 1988. Chemical basis of liquor characteristics and made tea. *Two and A Bud*, 35, 66-70.
- Maksimović, Z., Malenčić D. and Kovačević, N. 2005. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Maydis stigma* extracts. *Bioresource Technology*, 96, 873-877.
- Manzocco, L., Anese, M. and Nicoli, M.C. 1998. Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 31, 694-698.
- Martínez, M.A.D.P., Pelotto, J.P. and Basualdo, N. 1997. Distribution of flavonoid aglycones in *Ilex* species (Aquifoliaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 25, 619-622.

- Matsui, Y. 2004. The origin of oolong tea. International Conference on O-CHA(tea) Culture and Science, 669-672, November 4-6, Shizuoka, Japan.
- McDowell, I., Bailey, R.G. and Howard, G. 1990. Flavonol glycosides in black tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53, 411-414.
- McDowell, I., Feakes, J. and Gay, C. 1991. Phenolic composition of black tea liquors as a means of predicting price and country of origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 55, 627-641.
- 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.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R. and van Beek, T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85, 231-237.
- Miller, N.J., Castelluccio, C., Tijburg, L. and Rice-Evans, C. 1996. The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters-radical scavengers or metal chelators? *FEBS Letters*, 392, 40-44.
- Mizukami, Y., Sawai, Y. and Yamaguchi, Y. 2006. Moisture content measurement of tea leaves by electrical impedance and capacitance. *Biosystems Engineering*, 93, 293-299.
- 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.
- 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.
- 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.
- Nas, S. ve Öksüz, M. 1987. Siyah çayda kalite. *Gıda*, 3, 157-162.

- Nas, S. ve Öksüz, M. 1991. Farklı paketleme materyalleri ile paketlenen ve farklı sıcaklık ve nisbi rutubette 12 ay depolanan siyah çayların depolama süresince theaflavin, polifenol ve suda çözünür kurumadde miktarlarındaki değişimler. *Gıda*, 16, 29-37.
- Nas, S., Gökalp, H.Y. ve Öksüz, M. 1991. Değişik yörelerde üretilen farklı sürgün dönemi yaş çay ve bu çayların farklı fabrikasyonu sonucu elde edilen siyah çayın total kül, suda çözünen ve çözünmeyen kül içerikleri. *Gıda*, 16, 241-247.
- 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.
- Obanda, M. and Owuor, P.O. 1997. Flavanol composition and caffeine content of green leaf as quality potential indicators of Kenyan black teas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 209-215.
- 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. and 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. 1999. The effects of blending clonal leaf on black tea quality. *Food Chemistry*, 66, 147-152.
- 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.
- 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.
- Özdemir, F. ve Gökalp, H.Y. 1992. Siyah çay imalatında kıvrırma teknolojisi ve dikkat edilecek hususlar. *Gıda*, 17, 73-79.

- Özdemir, F., Nas, S. ve Gökalp, H.Y. 1993. Siyah çay imalatında farklı kıvrırma metotlarının üç sürgün dönemi çayın işlenmesi üzerindeki etkinliği ve üretilen siyah çayların bazı karakteristik özellikleri. *Standard*, Nisan, 46-50.
- Özdemir, F., Topuz, A. ve Erbaş, M. 1999. Ortodoks ve Çaykur yöntemleri ile üretilen farklı sınıf siyah çayların mineral içerikleri. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 23, 809-815.
- Özdemir, F., Doğan, Ü. ve Certel, M. 2000. Harmanlanmamış bazı siyah çayların kurşun ve kadmiyum içeriği. *Gıda*, 25, 331-336.
- Özdemir, F., Gölükcü, M. ve Erbaş, M. 2001. Çay tohumunun bazı özellikleri ve çay tohumu yağının yağ asiti kompozisyonu. *Gıda*, 26, 135-138.
- Özdemir, F. 2006. Yeşil çay ve işlenmiş farklı sınıf çayların sürgün dönemi ve rakıma bağlı olarak polifenolik madde değişimi. TÜBİTAK-TOGTAĞ, Proje Sonuç Raporu, No: 3286, (Basılmamış).
- Pellati, F., Benvenuti, S., Melegari, M. and Lasseigne, T. 2005. Variability in the composition of anti-oxidant compounds in *Echinacea* species by HPLC. *Phytochemical Analysis*, 16, 77-85.
- 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., Rand, W., 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.
- Peterson, J., Dwyer, J., Bhagwat, S., Haytowitz, D., Holden, J., Eldridge, A.L., Beecher, G. and Alsdeman, J. 2005. Major flavonoids in dry tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 487-501.
- Poon, G.K. 1998. Analysis of catechins in tea extracts by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 794, 63-74.
- Poyrazoğlu, E.S. ve Gürses, Ö.L. 1991. İşlenmiş Türk çaylarının kaliteleri üzerinde araştırma. *Gıda*, 16, 201-208.
- Poyrazoğlu, E.S. ve Gürses, Ö.L. 2004. Çay deminin bileşimine etkili bazı faktörler üzerinde araştırma. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 17, 38-45.
- Price, K.R., Rhodes, M.J.C. and Barnes, K.A. 1998. Flavonol glycoside content and composition of tea infusions made from commercially available teas and tea products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2517-2522.

- 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.
- Ravichandran, R. 2002. Carotenoid composition, distribution and degradation to flavour volatiles during black tea manufacture and the effect of carotenoid supplementation on the tea quality and aroma. *Food Chemistry*, 78, 23-28.
- 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. 1998a. Changes in enzyme activities (polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia-lyase) with type of tea leaf and during black tea manufacture and the effect of enzyme supplementation of dhool on black tea quality. *Food Chemistry*, 62, 277-281.
- 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.
- Ravichandran, R. and Parthiban, R. 2000. Lipid occurrence, distribution and degradation to flavour volatiles during tea processing. *Food Chemistry*, 68, 7-13.
- Rechner, A.R., Wagner, E., VanBuren, L., VanDePut, F., Wiseman, S. and Rice-Evans, C.A. 2002. Black tea represents a major source of dietary phenolics among regular tea drinkers. *Free Radical Research*, 36, 1127-1135.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
- Rio, D.D., Stewart, A.J., Mullen, W., Burns, J., Lean, M.E.J., Brighenti, F. and Crozier, A. 2004. HPLC-MSⁿ analysis of phenolic compounds and purine alkaloids in green and black tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2807-2815.
- Robertson, A. 1983. Effects of catechin concentration on the formation of black tea polyphenols during *in vitro* oxidation. *Phytochemistry*, 22, 897-903.
- Rostagno, M.A., Araújo, J.M.A. and Sandi, D. 2002. Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour. *Food Chemistry*, 78, 111-117.
- Row, K.H. and Jin, Y. 2006. Recovery of catechin compounds from Korean tea by solvent extraction. *Bioresource Technology*, 97, 790-793.
- Sakanaka, S., Juneja, L.R. and Taniguchi, M. 2000. Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90, 81-85.

- Sanderson, G.W., Berkowitz, J.E., Co, H. and Graham, H.N. 1972. Biochemistry of tea fermentation: Products of the oxidation of tea flavanols in a model tea fermentation system. *Journal of Food Science*, 37, 399-404.
- 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.
- Sargenti, S.R. and Vichnewski, W. 2000. Sonication and liquid chromatography as a rapid technique for extraction and fractionation of plant material. *Phytochemical Analysis*, 11, 69-73.
- Sarkar, A. and Bhaduri, A. 2001. Black tea is a powerful chemopreventor of reactive oxygen and nitrogen species: comparison with its individual catechin constituents and green tea. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284, 173-178.
- Satoh, E. 2005. Ethyl acetate extract from black tea prevents neuromuscular blockade by botulinum neurotoxin type A *in vitro*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56, 543-550.
- 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.
- Schulz, H., Engelhardt, U.H., Wegent, A., Drews, H.H. and Lapczynski, S. 1999. Application of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy to the simultaneous prediction of alkaloids and phenolic substances in green tea leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 5064-5067.
- Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L. R., Gardner, P. T., Heinonen, M. I., Hopia, A., Huynh-Ba, T., Lambelet, P., McPhail, D., Skibsted, L.H. and Tijburg, L. 2001. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research and Technology*, 212, 319-328.
- Sharma, V., Gulati, A., Ravindranath, S.D. and Kumar, V. 2005. A simple and convenient method for analysis of tea biochemicals by reverse phase HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 583-594.
- Shishikura, Y. and Khokhar, S. 2005. Factors affecting the levels of catechins and caffeine in tea beverage: estimated daily intakes and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2125-2133.

- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. 1995. Biometry, The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. W. H. Freeman and Co., 887pp, New York.
- Steinhaus, B. and Engelhardt, U.H. 1989. Theaflavins in black tea. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung, 188, 509-511.
- Stewart, A.J., Mullen, W. and Crozier, A. 2005. On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea. Molecular Nutrition and Food Research, 49, 52-60.
- Streit, N.M., Hecktheuer, L.H.R., do Canto, M.W., Mallmann, C.A., Streck, L., Parodi, T.V. and Canterle, L.P. 2007. Relation among taste-related compounds (phenolics and caffeine) and sensory profile of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Food Chemistry, 102, 560-564.
- Su, Y.L., Leung, L.K., Huang, Y. and Chen, Z. 2003. Stability of tea theaflavins and catechins. Food Chemistry, 83, 189-195.
- Sud, R.G. and Baru, A. 2000. Seasonal variations in theaflavins, thearubigins, total colour and brightness of Kangra orthodox tea (*Camellia sinensis* (L) O Kuntze in Himachal Pradesh. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, 1291-1299.
- Sugita-Konishi, Y., Hara-Kudo, Y., Amano, F., Okubo, T., Aoi, N., Iwaki, M. and Kumagai, S. 1999. Epigallocatechin gallate and gallic acid in green tea catechins inhibit extracellular release of Vero toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Biochimica et Biophysica Acta, 1472, 42-50.
- Tokuşoğlu, Ö. 2001. Siyah çayların başlıca fenolik bileşenleri (flavanoller, flavonoller, tanninler) ve aroma özellikleri üzerine araştırmalar. Doktora tezi, Ege Üniversitesi, Bornova, İzmir.
- Tokusoglu, Ö. and Ünal, M.K. 2002. Optimized method for simultaneous determination of catechin, gallic acid, and methylxanthine compounds in chocolate using RP-HPLC. European Food Research and Technology, 215, 340-346.
- 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.
- Toyoda, M., Tanaka, K., Hoshino, K., Akiyama, H., Tanimura, A. and Saito, Y. 1997. Profiles of potentially antiallergic flavonoids in 27 kinds of health tea and green tea infusions. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 2561-2564.
- TS 1563. 1990. Çay-su ekstraktı tayini. Türk Standartları Enstitüsü Yayını, 5 s., Ankara.

- Tsanova-Savova, S., Ribarova, F. and Gerova, M. 2005. (+)-Catechin and (-)-epicatechin in Bulgarian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 691-698.
- Turkmen, N., Sari, F. and Velioglu, Y.S. 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99, 835-841.
- Turkmen, N. and Velioglu, Y.S. 2007. Determination of alkaloids and phenolic compounds in black tea processed by two different methods in different plucking seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (Basımda).
- Tüfekci, M. and Güner, S. 1997. The determination of optimum fermentation time in Turkish black tea manufacture. *Food Chemistry*, 60, 53-56.
- Velioglu, Y.S., Türkmen, N. ve Sarı, F. 2007. Ekstraksiyon koşullarının siyah çayın polifenolik madde dağılımı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkileri. TÜBİTAK-TOVAG, Proje Sonuç Raporu, No: 105-O-232, (Basılmamış).
- 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.
- Wachira, F.N. and Ronno, W. 2004. Current research on tea in Kenya. *International Conference on O-CHA(tea) Culture and Science*, 59-65, November 4-6, Shizuoka, Japan.
- 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 infusions. *Food Chemistry*, 70, 337-344.
- Wang, H. and Helliwell, K. 2001. Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography. *Food Research International*, 34, 223-227.
- 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., Provan, G.J. and Helliwell, K. 2004. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chemistry*, 87, 307-311.
- Wang, J. and Sporns, P. 2000. MALDI-TOF MS analysis of food flavonol glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1657-1662.

- 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.
- Wheeler, D.S. and Wheeler, W.J. 2004. The medicinal chemistry of tea. *Drug Development Research*, 61, 45-65.
- Wijeratne, M.A. 2004. Tea industry in Sri Lanka. International Conference on O-CHA(tea) Culture and Science, 51-54, November 4-6, Shizuoka, Japan.
- 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.
- 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.
- Yanagawa, Y., Yamamoto, Y., Hara, Y. and Shimamura, T. 2003. A combination effect of epigallocatechin gallate, a major compound of green tea catechins, with antibiotics on *Helicobacter pylori* growth in vitro. *Current Microbiology*, 47, 244-249.
- Yang, X.R., Ye, C.X., Xu, J.K. and Jiang Y.M. 2007. Simultaneous analysis of purine alkaloids and catechins in *Camellia sinensis*, *Camellia ptilophylla* and *Camellia assamica* var. *Kucha* by HPLC. *Food Chemistry*, 100, 1132-1136.
- 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.
- Yao, L.H., Jiang, Y.M., Caffin, N., D'Arcy, B., Datta, N., Liu, X., Singanusong, R. and Xu, Y. 2006b. Phenolic compounds in tea from Australian supermarkets. *Food Chemistry*, 96, 614-620.

- 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.
- Yu, J., Ahmedna, M. and Goktepe, I. 2005. Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanut skin phenolics. *Food Chemistry*, 90, 199-206.
- 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 O-CHA(tea) Culture and Science*, 673-675, November 4-6, Shizuoka, Japan.
- Zhen, Y. 2002. *Tea: bioactivity and therapeutic potential*. Taylor and Francis. 257 pp., 11 New Fetter Lane, 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.

EKLER

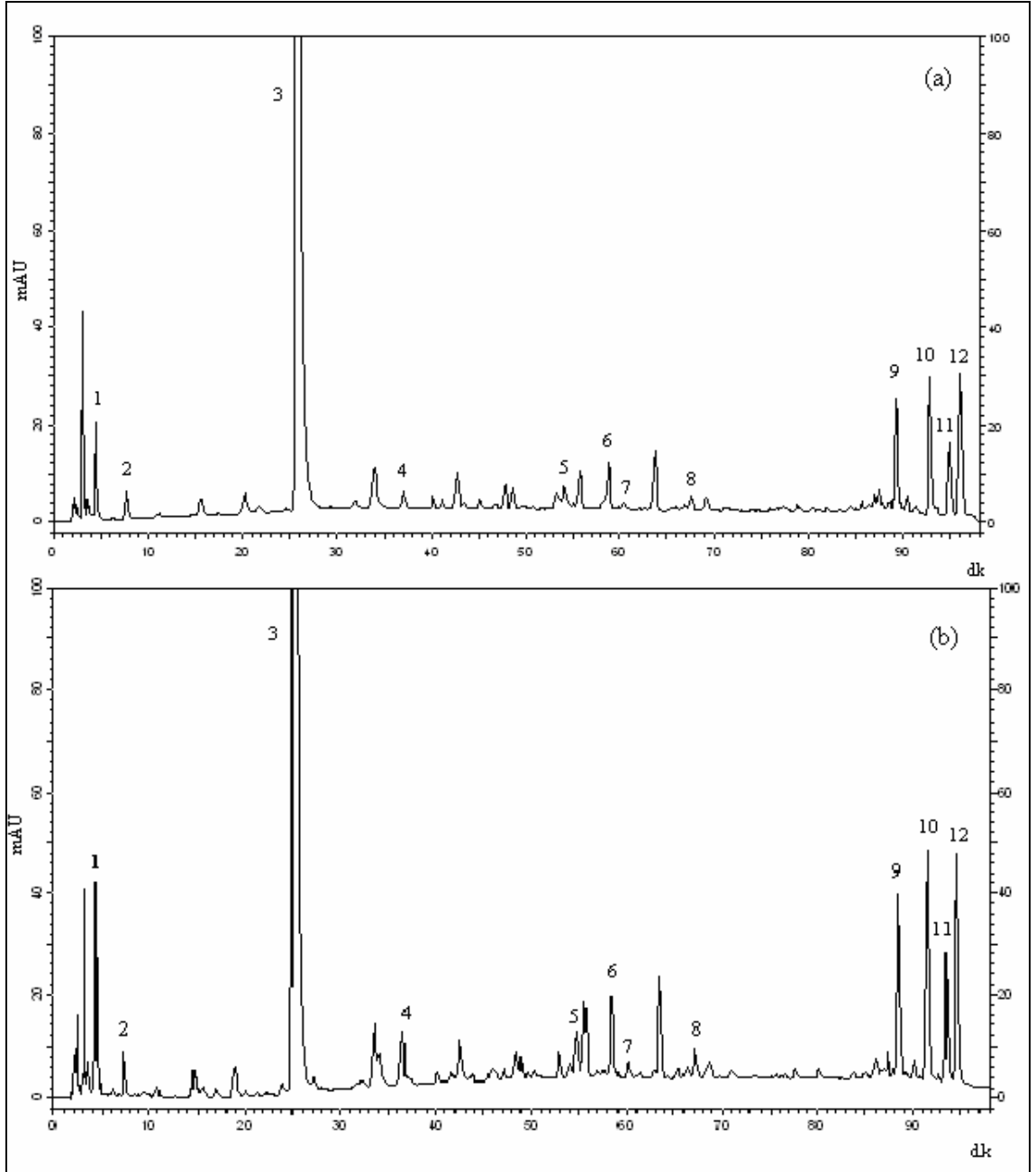
- EK 1** Yöntem I ve II'ye göre işlenmiş Mayıs, Temmuz ve Eylül dönemine ait çay örneklerinin su ekstraktı miktarları (g/100g KM)
- EK 2** Farklı yöntemle işlenmiş Mayıs dönemi 7. sınıf çaylara ait kromatogramlar
(a) Yöntem II, (b) Yöntem I
- EK 3** Farklı dönemlerde Yöntem II ile işlenmiş 2. sınıf çaylara ait kromatogramlar
(a) Mayıs, (b) Temmuz, (c) Eylül
- EK 4** Farklı dönemlerde Yöntem II ile işlenmiş 3. sınıf çaylara ait kromatogramlar
(a) Mayıs, (b) Temmuz, (c) Eylül
- EK 5** Farklı dönemlerde Yöntem II ile işlenmiş 4. sınıf çaylara ait kromatogramlar
(a) Mayıs, (b) Temmuz, (c) Eylül
- EK 6** Farklı dönemlerde Yöntem II ile işlenmiş 5. sınıf çaylara ait kromatogramlar
(a) Mayıs, (b) Temmuz, (c) Eylül
- EK 7** Farklı dönemlerde Yöntem II ile işlenmiş 6. sınıf çaylara ait kromatogramlar
(a) Mayıs, (b) Temmuz, (c) Eylül
- EK 8** Farklı dönemlerde Yöntem I ile işlenmiş 2. sınıf çaylara ait kromatogramlar
(a) Mayıs, (b) Temmuz, (c) Eylül
- EK 9** Farklı dönemlerde Yöntem I ile işlenmiş 3. sınıf çaylara ait kromatogramlar
(a) Mayıs, (b) Temmuz, (c) Eylül
- EK 10** Farklı dönemlerde Yöntem I ile işlenmiş 4. sınıf çaylara ait kromatogramlar
(a) Mayıs, (b) Temmuz, (c) Eylül

EK 1 Yöntem I ve II'ye göre işlenmiş Mayıs, Temmuz ve Eylül dönemine ait çay örneklerinin su ekstraktı miktarları (g/100g KM)

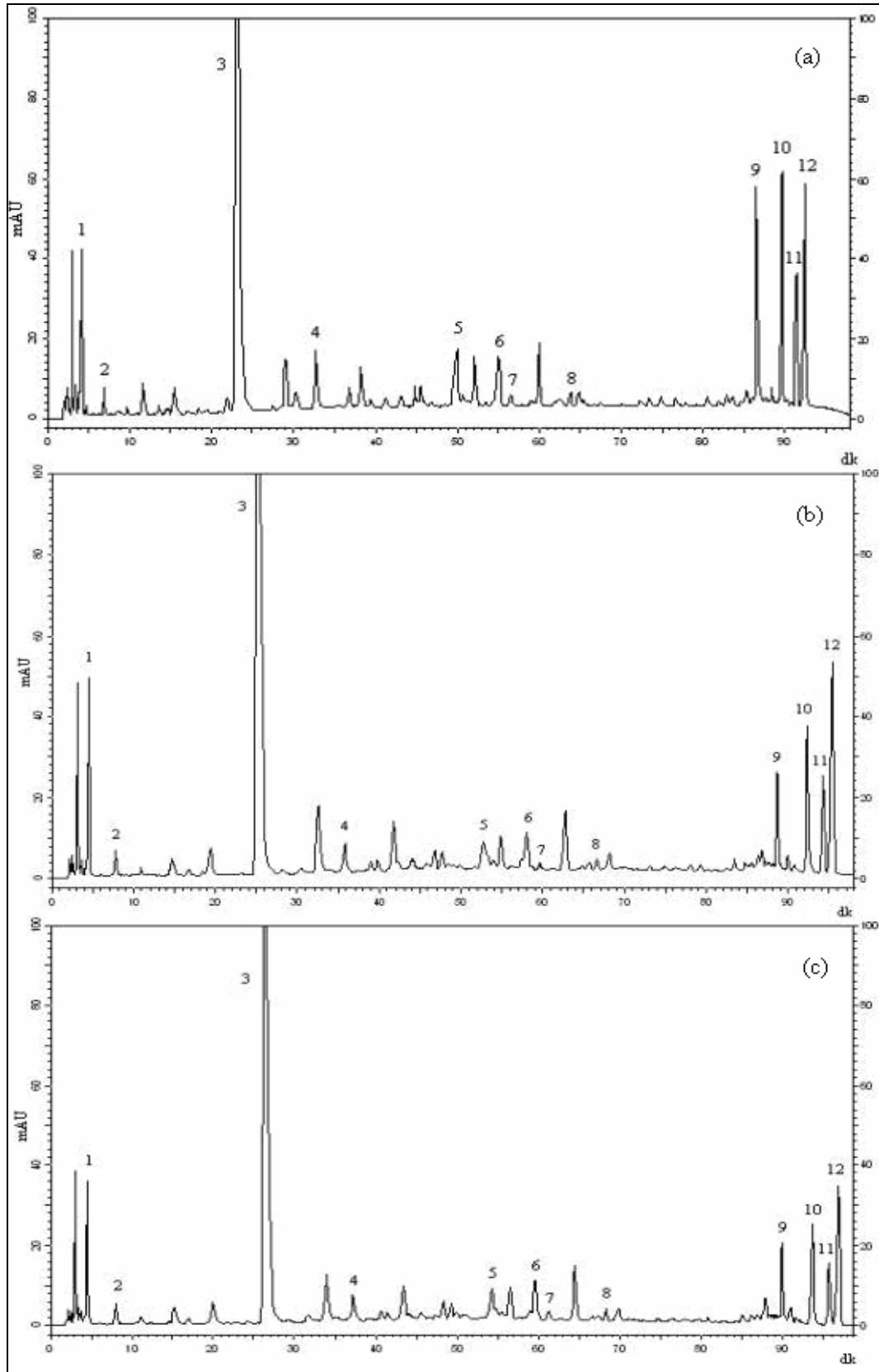
Yöntem	Su ekstrakt miktarı **		
	Mayıs	Temmuz	Eylül
II	31.60±0.61 ^{c*}	27.92±0.50 ^b	25.34±0.60 ^a
I	30.88±0.26 ^c	27.71±0.27 ^b	25.62±0.39 ^a

* Aynı satırda farklı harflere sahip ortalamalar arasında önemli düzeyde ($p<0.05$) fark vardır, ** Yapılan analizler sonucunda sınıflar arasında ekstrakt miktarları açısından önemli farklar görülmediğinden, Ek 1'de gösterilen değerler, 7 sınıfın ortalamaları dikkate alınarak hesaplanmış ekstrakt miktarlarıdır

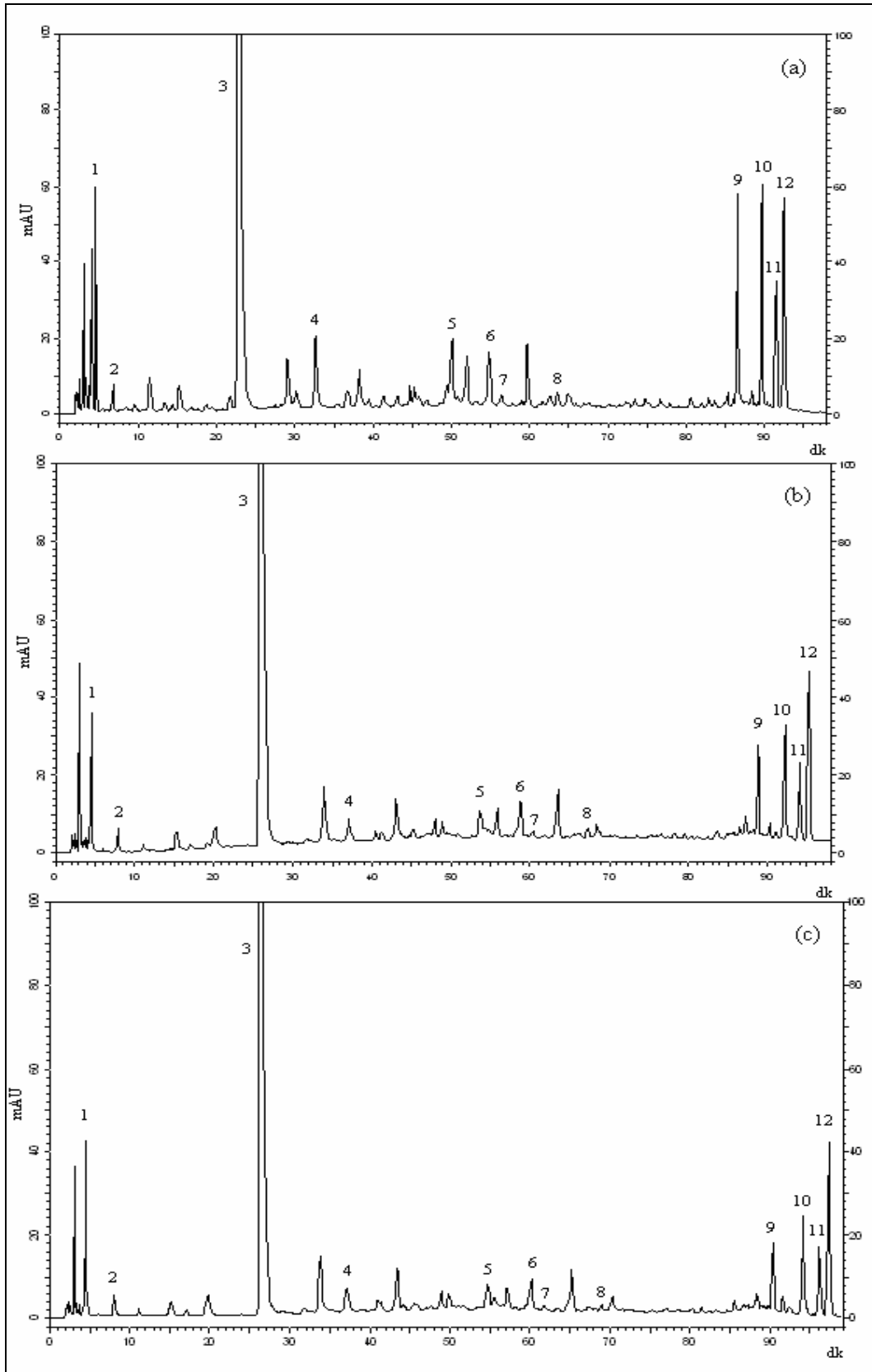
**EK 2 Farklı yöntemle işlenmiş Mayıs dönemi 7. sınıf çaylara ait kromatogramlar
(a) Yöntem II, (b) Yöntem I**



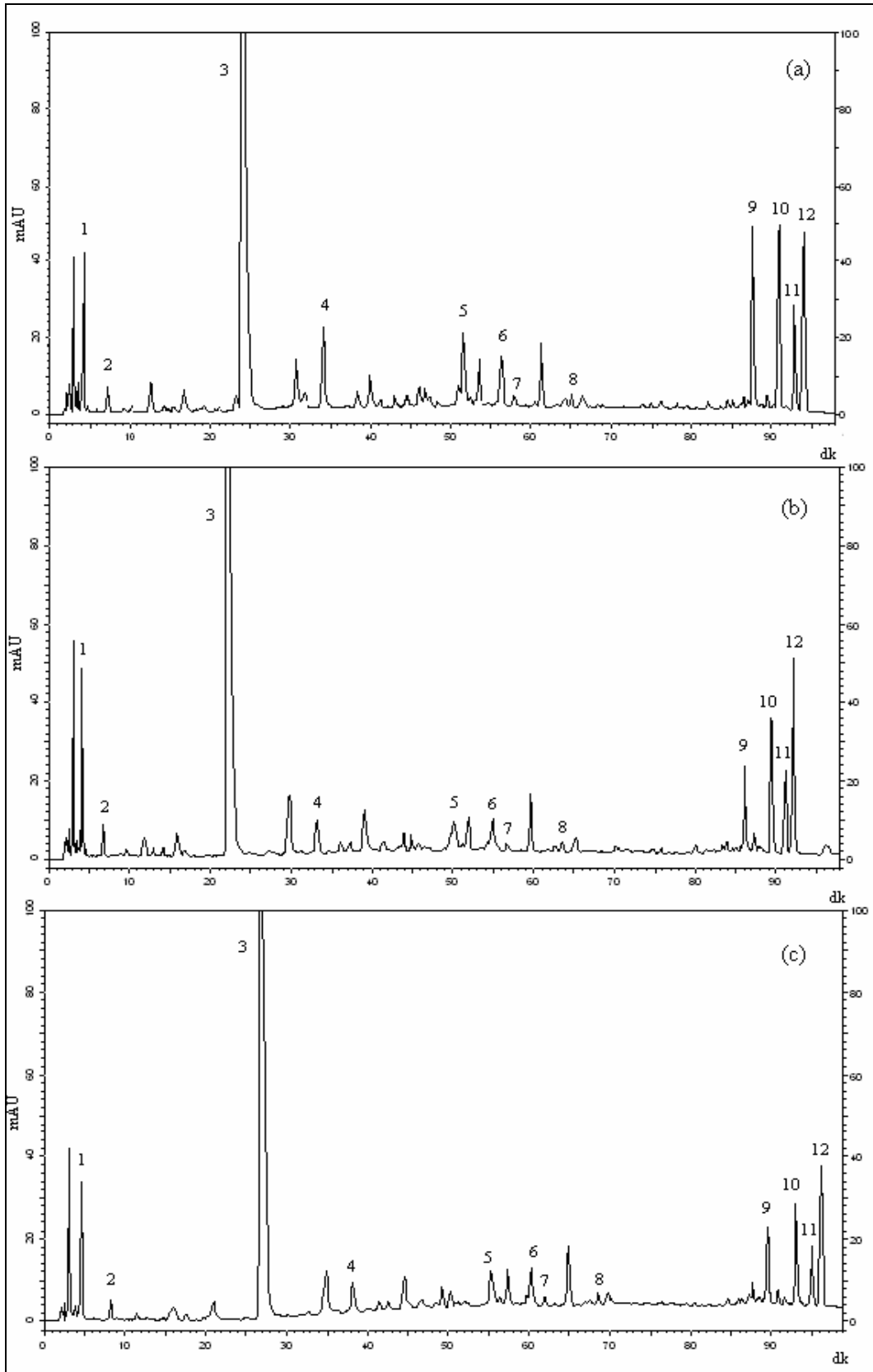
**EK 3 Farklı dönemlerde Yöntem II ile işlenmiş 2. sınıf çaylara ait kromatogramlar
(a) Mayıs, (b) Temmuz, (c) Eylül**



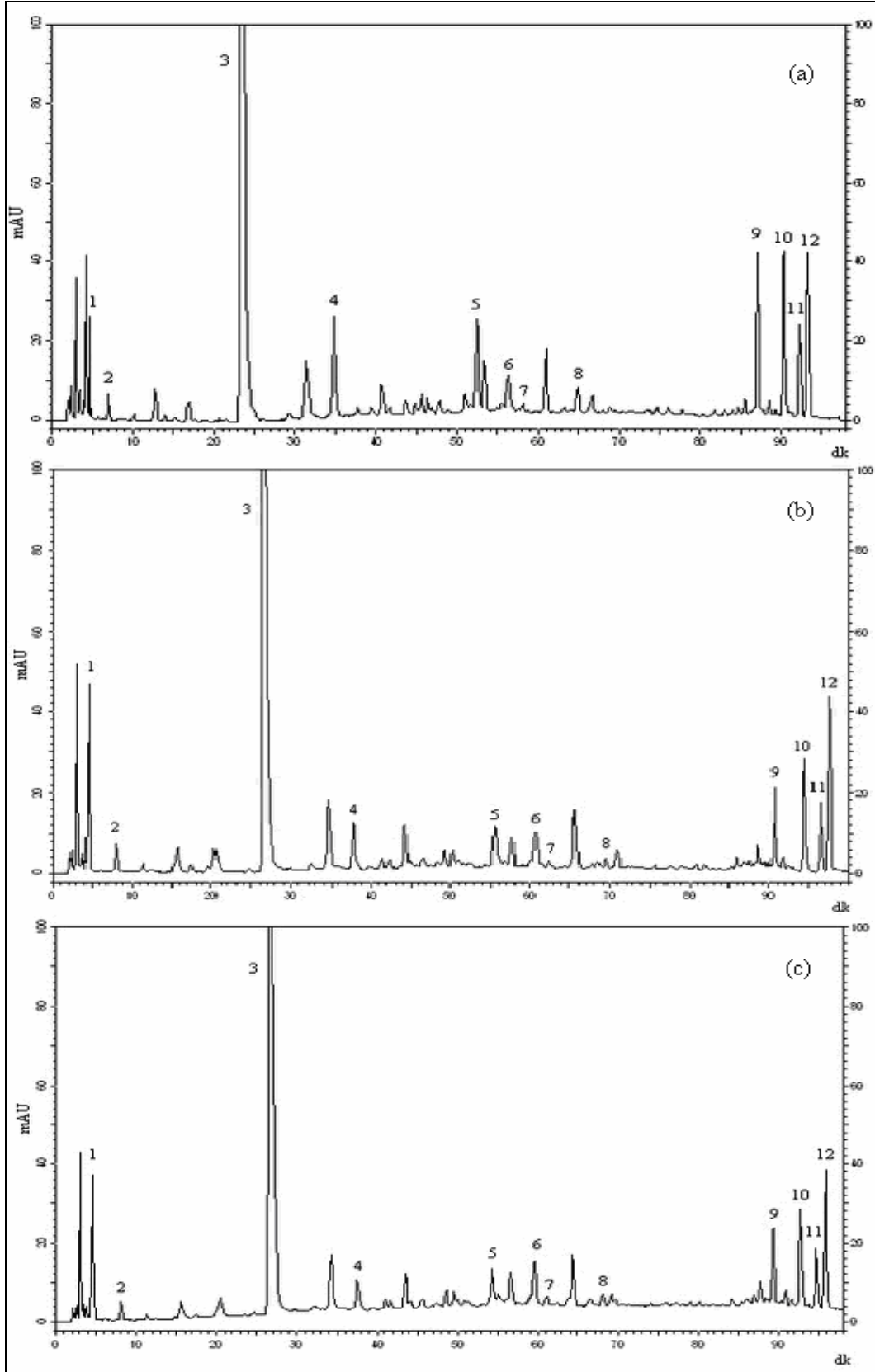
**EK 4 Farklı dönemlerde Yöntem II ile işlenmiş 3. sınıf çaylara ait kromatogramlar
(a) Mayıs, (b) Temmuz, (c) Eylül**



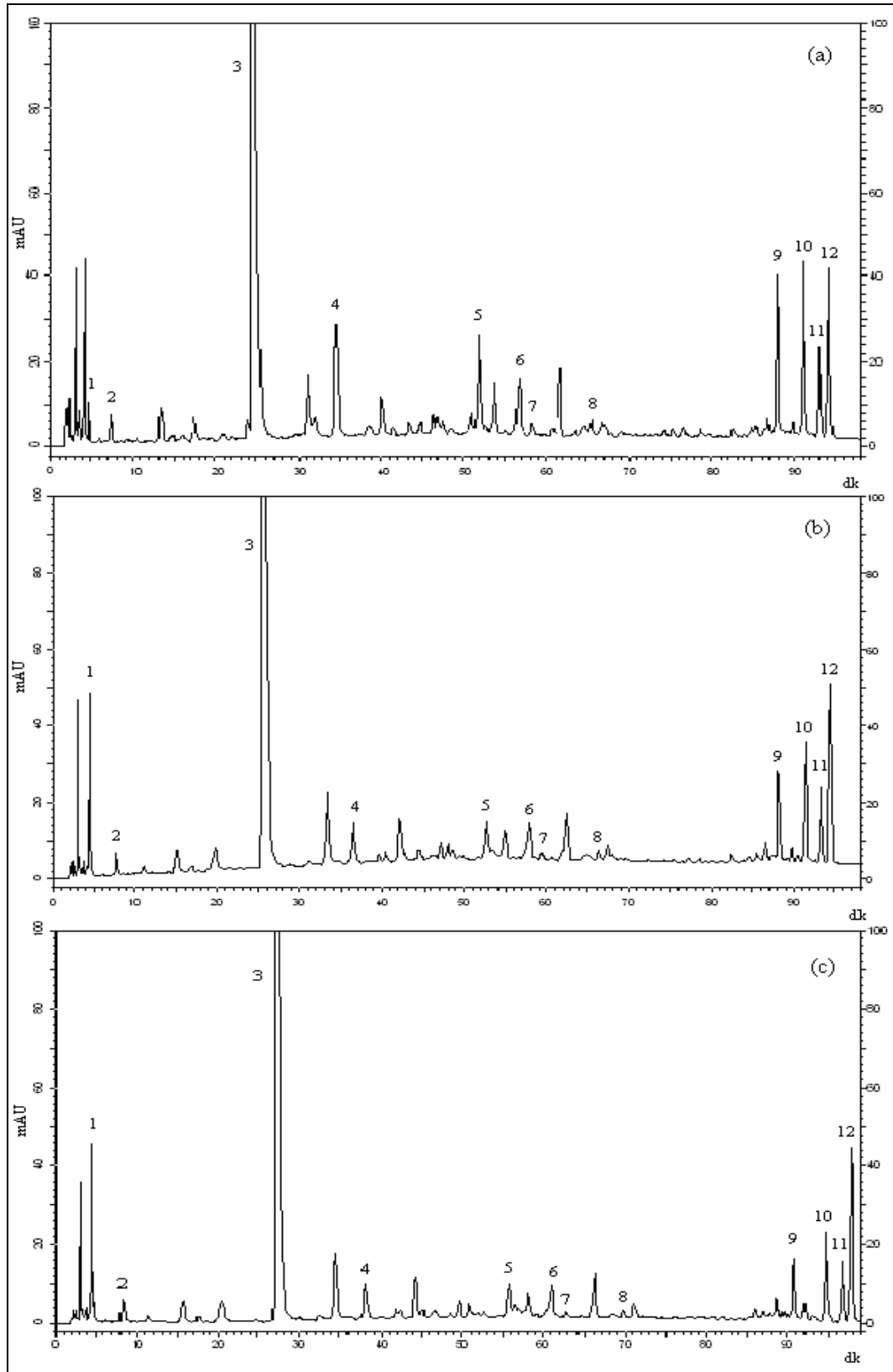
**EK 5 Farklı dönemlerde Yöntem II ile işlenmiş 4. sınıf çaylara ait kromatogramlar
(a) Mayıs, (b) Temmuz, (c) Eylül**



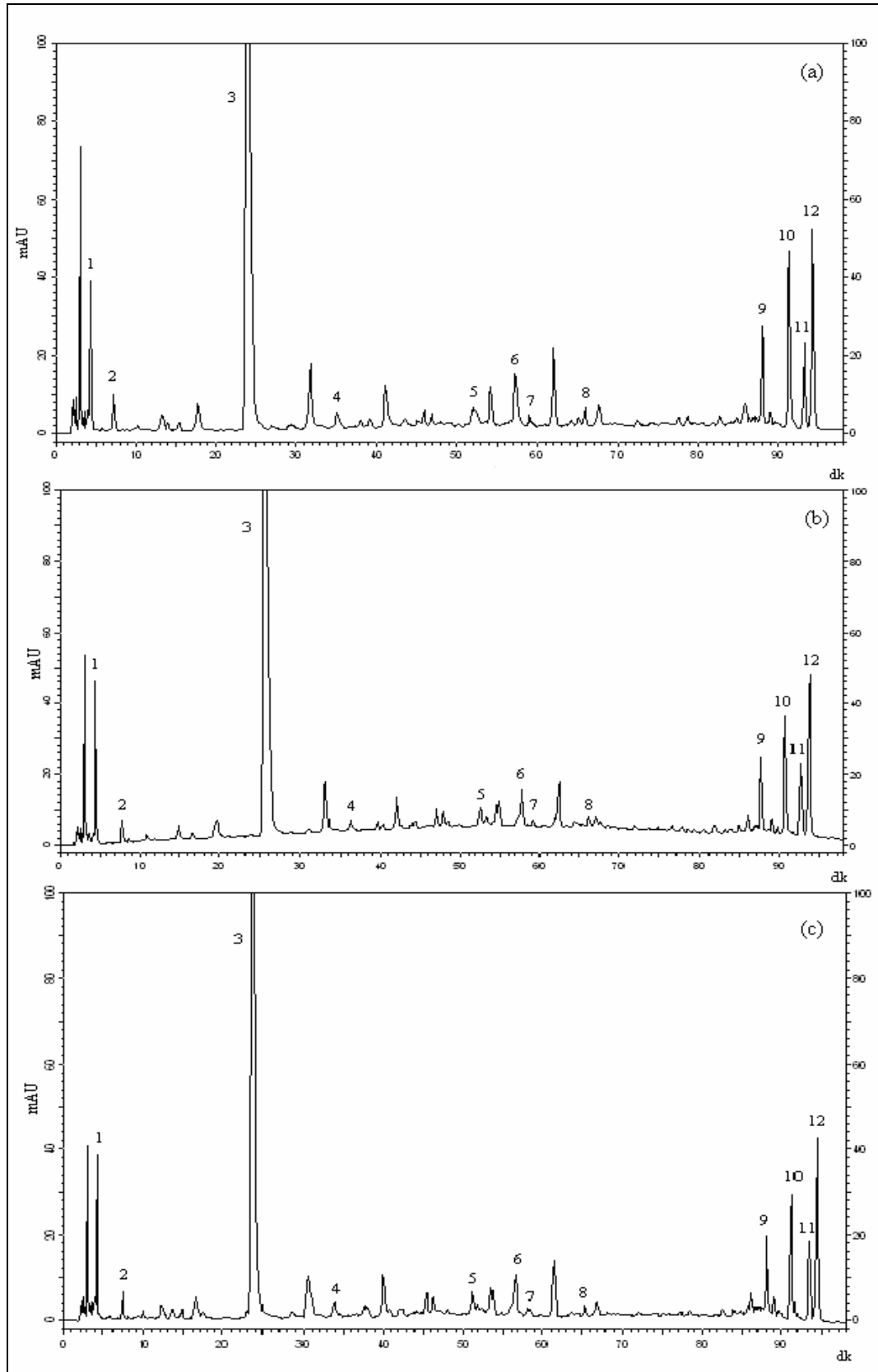
**EK 6 Farklı dönemlerde Yöntem II ile işlenmiş 5. sınıf çaylara ait kromatogramlar
(a) Mayıs, (b) Temmuz, (c) Eylül**



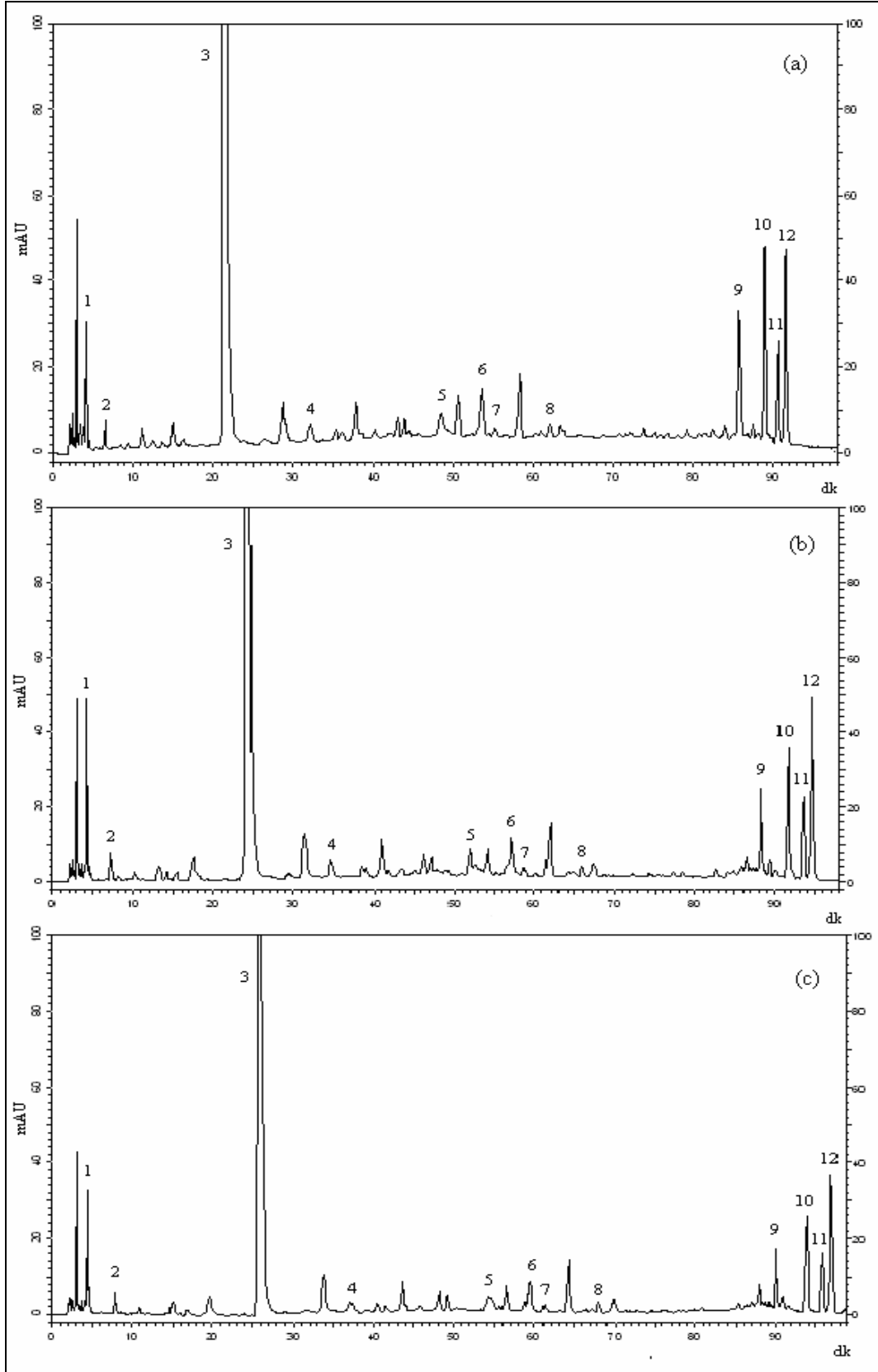
EK 7 Farklı dönemlerde Yöntem II ile işlenmiş 6. sınıf çaylara ait kromatogramlar
(a) Mayıs, (b) Temmuz, (c) Eylül



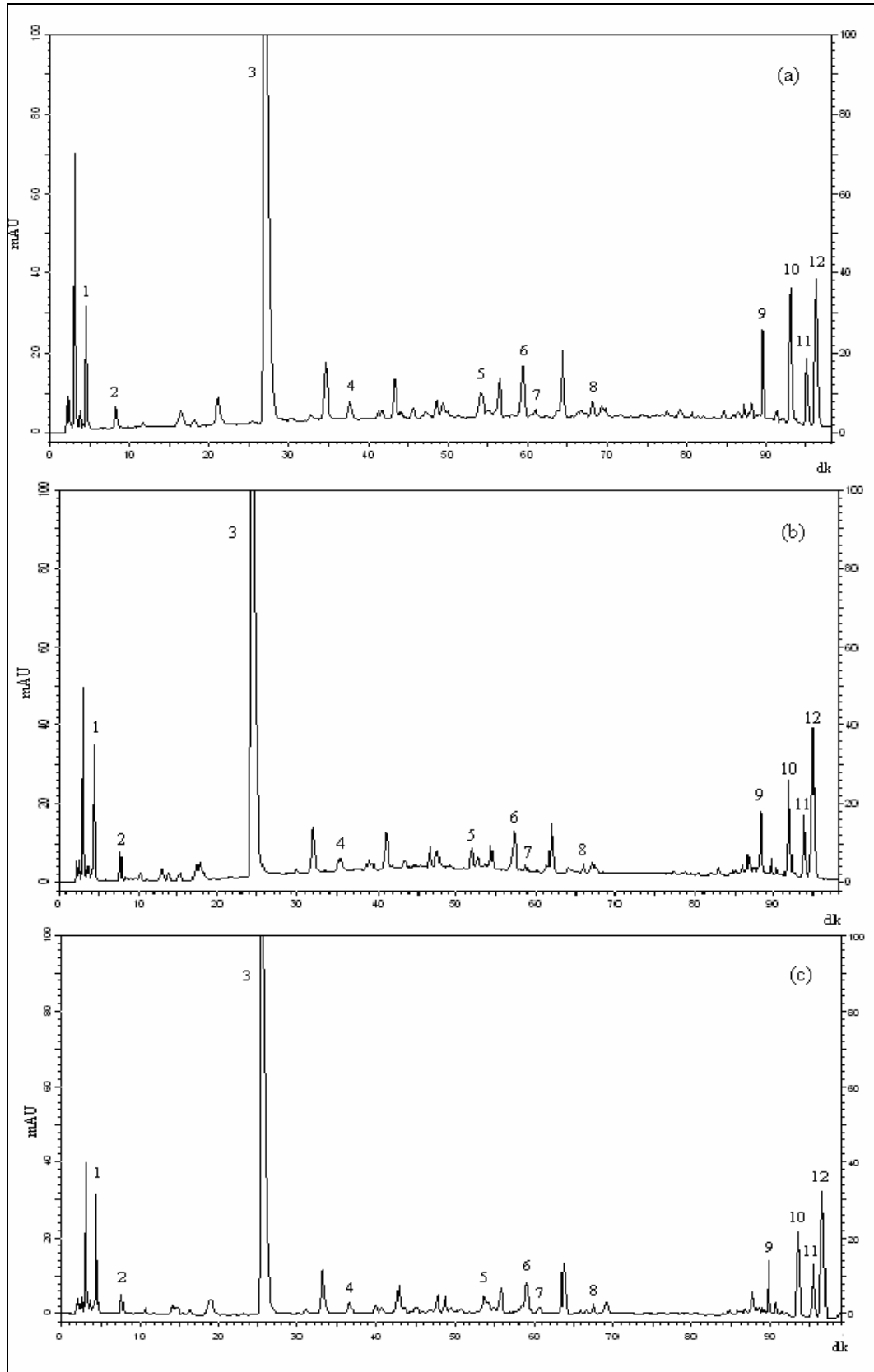
**EK 8 Farklı dönemlerde Yöntem I ile işlenmiş 2. sınıf çaylara ait kromatogramlar
(a) Mayıs, (b) Temmuz, (c) Eylül**



**EK 9 Farklı dönemlerde Yöntem I ile işlenmiş 3. sınıf çaylara ait kromatogramlar
(a) Mayıs, (b) Temmuz, (c) Eylül**



**EK 10 Farklı dönemlerde Yöntem I ile işlenmiş 4. sınıf çaylara ait kromatogramlar
(a) Mayıs, (b) Temmuz, (c) Eylül**



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nihal TÜRKMEN
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 30. 10. 1967
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Ankara Başkent Lisesi – 1984
Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü – 1988
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi Anabilim Dalı – 1995

Çalıştığı Kurumlar

1990 - 2002 : Uludağ Üniversitesi Bursa Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu - Öğretim Görevlisi
1990 - 1991 : HumberSide Polytechnic, İngiltere - Bursiyer
2002 - : Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü – Araştırma Görevlisi

Yayımları

A. Araştırma Makaleleri

A1. SCI kapsamındaki dergilerde yayınlanan araştırma makaleleri

- 1. Turkmen, N., Sari, F. and Velioglu, Y.S.** 2005. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. Food Chemistry, 93, 713-718.
- 2. Turkmen, N., Sari, F., Poyrazoglu, E.S. and Velioglu, Y.S.** 2006. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. Food Chemistry, 95, 653-657.

3. **Turkmen, N.**, Poyrazoglu, E.S., Sari, F. and Velioglu, Y.S. 2006. Effects of cooking methods on chlorophylls, pheophytins and colour of selected green vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 281-288.
4. **Turkmen, N.**, Sari, F., Polat, G. and Velioglu, Y.S. 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, 99, 835-841.
5. **Turkmen, N.** and Velioglu, Y.S. 2007. Determination of alkaloids and phenolic compounds in black tea processed by two different methods in different plucking seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (Basımda).
6. **Turkmen, N.**, Velioglu, Y.S., Sari, F. and Polat, G. 2007. Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molecules*, 12, 484-496.
7. Sari, F., **Turkmen, N.**, Polat, G. and Velioglu, Y.S. 2007. total polyphenol antioxidant and antibacterial activities of black mate tea. *Food Science and Technology Research*, (Basımda).

B. Derleme Makaleler

B1. Hakemli dergilerde yayınlanan derleme makaleler

1. **Türkmen, N.** ve Sarı, F. 2004. Minimal işlem görmüş meyve ve sebze üretimi ve gıda güvenliği açısından değerlendirilmesi. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5, 223-232.

B2. Diğer derleme makaleler

1. Velioglu, S. ve **Türkmen, N.** 2003. Toroslardan Gelen Umut: Keçiboynuzu. *CineTarım*, 6, 16-17.

C. Tebliğ

1. Poyrazoglu, E. S., **Turkmen, N.** and Velioglu, Y.S. 2004. Determination of flavanols, and caffeine and antioxidant activity of fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Turkey. *ICOS 2004 International Conference on O-Cha (tea) Culture and Science*. November 4-6, 741-745, Shizuoka-Japan.
2. **Turkmen, N.**, Sari, F., Polat, G. and Velioglu, Y.S. 2006. Various extracts and their fractions obtained from fresh tea leaves and green tea: antioxidant and antibacterial activities. *The SAFE Consortium International Congress on Food Safety*. 11-14 June, 16-17, Budapest-Hungary.