

T.C. ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
KESİN RAPORU

**Farklı Çay Ekstraktlarının Antioksidan,
Antibakteriyal Etkileri ve Fenolik Madde
Dağılımının HPLC ile Belirlenmesi**

Prof. Dr. Sedat VELİOĞLU

Proje Numarası: 2006-07-45-016-HPD

Başlama Tarihi: Haziran 2006

Bitiş Tarihi: Haziran 2007

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri

Ankara-“2007”

İÇİNDEKİLER

SİMGELER DİZİNİ.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
1. PROJENİN TÜRKÇE VE İNGİLİZCE ADI ve ÖZETLERİ.....	1
2. AMAÇ VE KAPSAM.....	3
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	4
3.1. Materyal.....	4
3.2. Yöntem.....	5
3.2.1. Ekstraksiyon.....	5
3.2.2. Fraksiyonlara ayırma.....	5
3.2.3. Ekstraksiyon veriminin hesaplanması.....	6
3.2.4. Toplam polifenol tayini.....	6
3.2.5. Antioksidan aktivite tayini.....	6
3.2.6. Antibakteriyel aktivite.....	7
3.2.7. HPLC ile fenolik madde analizi.....	7
3.2.8. İstatistik Analiz.....	9
4. ANALİZ ve BULGULAR.....	10
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	15
5.1. Toplam polifenol miktarı.....	15
5.2. Antioksidan aktivite.....	16
5.3. Antibakteriyel Aktivite.....	18
5.4. Çay ekstraktlarının fenolik madde dağılımı.....	20
6. KAYNAKLAR.....	23

SİMGELER DİZİNİ

TÇY	Taze çay yaprağı
YÇ	Yeşil çay
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
Abs	Absorbans
Dw	Dry weight (kuru ağırlık)
Dk	Dakika

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. HPLC çalışma koşulları ve gradient elusyon programı.....	8
Çizelge 4.1. TÇY ve YÇ'den elde edilen farklı solvent ekstraktlarına ait farklı fraksiyonların toplam polifenol içeriği (mg GAE/g kuru ekstrakt), polifenol verimi (mg GAE/g kuru çay) ve ekstraksiyon verimi (%)......	10
Çizelge 4.2. Taze çay yaprağı ve yeşil çaydan elde edilen farklı solvent ekstraktlarına ait farklı fraksiyonların antioksidan aktivitesi (g AEAA/100 g kuru ekstrakt)......	11
Çizelge 4.3. Farklı solventler kullanılarak elde edilen ham ekstraktların kateşin (mg/g kuru çay) dağılımı.....	12
Çizelge 4.4. Farklı solventler kullanılarak elde edilen ham ekstraktların flavonol glikozid (mg/g kuru çay) dağılımı.....	12
Çizelge 4.5. Taze çay yaprağı ve yeşil çaydan elde edilen farklı solvent ekstraktlarına ait farklı fraksiyonların antibakteriyal aktivitesi.....	13

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. TÇY ve YÇ için toplam polifenol içeriği ile AA arasındaki korelasyon.....	11
Şekil 4.2. Taze çay yaprağı ve yeşil çayın metanol ekstraktlarına ait HPLC kromatogramları.....	14

1. PROJENİN TÜRKÇE VE İNGİLİZCE ADI ve ÖZETLERİ

Farklı Çay Ekstraktlarının *Antioksidan, Antibakteriyal Etkileri ve Fenolik Madde Dağılımının HPLC İle Belirlenmesi*

Determination of antioxidant and antibacterial activities and phenolic compounds distribution of different tea extracts by HPLC

ÖZET

Taze çay yaprağı (TÇY) ve yeşil çay (YÇ)'dan elde edilen metanol, etanol ve su ekstraktları ile bunların ham, etil asetat ve su fraksiyonlarının polifenol içeriği ve antioksidan aktivitesi değerlendirilmiş olup ham ekstraktların HPLC ile polifenol dağılımı belirlenmiştir. Sonuçlar, çay örneklerinde metanol veya suyun polifenol ekstraksiyonu için en etkili solvent olduğunu göstermiştir. En yüksek polifenol verimi (TÇY için 78.8-169.5 mg/g kuru çay; YÇ için 11.8-88.5 mg/g kuru çay) ham ekstraktlarla elde edilmiştir. TÇY için 523.7-680.2 mg GAE/g kuru ekstrakt; YÇ için 481.8-560.8 mg GAE/g kuru ekstrakt olmak üzere en fazla toplam polifenol içeriği, en düşük ekstraksiyon verimine sahip etil asetat fraksiyonlarında tespit edilmiştir. TÇY'ında 74.1-80.8 g ascorbic acid/100 g kuru ekstrakt ve YÇ'da 64.8-78.6 g ascorbic acid/100 g kuru ekstrakt olmak üzere en yüksek antioksidan aktiviteyi de bu fraksiyonlar göstermiştir. Her iki çay için de toplam polifenol içeriği ile antioksidan aktivite arasında oldukça yüksek korelasyon katsayısı (R^2 , TÇY için 0.9376; YÇ için 0.9783) elde edilmiştir. TÇY ve YÇ'da HPLC ile iki grup fenolik madde (kateşinler ve flavonol glikozidler) tespit edilmiştir. Çayların başlıca fenolik maddesini kateşinlerden EGCG, flavonol glikozidlerden Q3RG oluşturmuştur. Kullanılan 3 solvent içinde metanol veya suyun kateşin ve flavonol glikozidlerin ekstraksiyonu için en etkili solvent olduğu saptanmıştır. TÇY daha fazla toplam kateşin (8.49-69.62 mg/g kuru çaya karşılık 64.74-150.36 mg/g kuru çay) ve toplam flavonol glikozid (0.20-1.78 mg/g kuru çaya karşılık 1.23-3.38 mg/g kuru çay) içermiştir. Kullanılan kaynağa bağlı olarak, ham ekstraktlar ve etil asetat fraksiyonları *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus* üzerinde antibakteriyal aktivite göstermiştir. Buna karşın, su fraksiyonları incelenen bakterilerde herhangi bir aktivite göstermemiştir.

Anahtar kelimeler: Fenolik madde, çay, HPLC, antioksidan, solvent, ekstraksiyon

ABSTRACT

Polyphenol content and antioxidant activity of methanol, ethanol and water extracts and their crude, ethyl acetate and water fractions derived from fresh tea leaves (FTL) and green tea (GT) were evaluated, and polyphenol distribution of crude extracts were determined by HPLC. The results indicated that in tea samples, either methanol or water were most efficient solvents for extraction of polyphenols. Highest polyphenol yield was obtained with crude extracts, which was 78.8-169.5 mg/g dw tea for FTL and 11.8-88.5 mg/g dw tea for GT. All ethyl acetate fractions from FTL and GT contained the highest total polyphenol content, 523.7-680.2 and 481.8-560.8 mg GAE/g dry extract, respectively, with the lowest extraction yield and they possessed the greatest antioxidant activities which varied from 64.8-78.6 to 74.1-80.8 g ascorbic acid/100 g dry extract for GT and FTL, respectively. A rather high correlation coefficient ($R^2=0.9376$ for FTL and 0.9783 for GT) was obtained between antioxidant activity to total polyphenol content for both teas. Two classes of phenolics (catechins and flavonol glycosides) were detected by HPLC in tea extracts. In both FTL and GT, EGCG was the dominant catechin and Q3RG was the dominant flavonol glycoside. Among three solvents used, either methanol or water was found to be the most efficient solvent for extracting catechins and flavonol glycosides. FTL showed higher total catechins (64.74-150.36 mg/g dw tea vs 8.49-69.62 mg/g dw tea) and total flavonol glycosides (1.23-3.38 mg/g dw tea vs 0.20-1.78 mg/g dw tea). Crude extracts and ethyl acetate fractions showed antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* depending on the plant source. Water fractions did not show any activity against the studied bacteria.

Key words: Phenolic compound, tea, HPLC, antioxidant, antibacterial, solvent, extraction

2. AMAÇ ve KAPSAM

Çay, beslenme açısından en önemli polifenol kaynağıdır (Gramza and Korczak, 2005). TÇY'ları polifenollerce, özellikle de flavan-3-ol (kateşin) ve flavonol glikozidlerce zengindir (Clifford et al. 2000). YÇ, taze toplanmış yeşil yaprakların soldurma, kıvrırma, kurutma ve kavurma işlemine uğratılması ile üretildiği için polifenol bileşimi taze çay yapraklarından çok az farklılık göstermektedir (Wheeler and Wheeler, 2004). Son yıllarda çay kateşinlerine biyolojik aktivitelerinden dolayı çok fazla ilgi gösterilmektedir (Chen et al. 2001). Çayın yararlı özelliklerinin onun antioksidan (Zandi and Gordon, 1999; Mello et al. 2005; Navas et al. 2005), antimutajenik (Halder et al. 2005), antikarsinojenik (Han, 1997; Zu et al. 2005) ve antibakteriyel (An et al. 2004) etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çay şu anda dünyada sadece popüler bir içecek değil aynı zamanda çeşitli fiziksel formlarda hazırlanmış ekstraktları gıda, temizlik ve kozmetik sanayinde kullanılmaktadır (Wang et al. 2000). Örneğin, yenilebilir yağlarda (Navas et al. 2005; Chen and Chan 1996; Yılmaz, 2006) ve pişirilmiş et ürünlerinde (Nissen et al. 2004; Tang et al. 2001) çay ekstraktlarının kullanımı peroksit birikimini engelleyerek ürün stabilitesini artırmaktadır. Tüm bu gerçekler nedeniyle, TÇY ve YÇ'in fenolik madde bileşimini daha doğru olarak belirleyebilmek için öncelikle uygun bir ekstraksiyon gerekmektedir. Ancak, yapılan literatür taraması sonucunda YÇ (Sharma et al. 2005; Baptista et al. 1999; Perva-Uzunalic et al. 2006; Bu-Abbas et al. 1997; Row and Jin, 2005) ve TÇY'ndan (Yao et al. 2004) polifenollerin ekstraksiyonu üzerine fazla miktarda çalışma olmasına rağmen farklı ekstraksiyon metotlarının TÇY ve YÇ'in fenolik madde dağılımı ve antioksidan aktivitesine etkisi üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu araştırma ile ekstraksiyon koşullarının TÇY ve YÇ'in fenolik madde dağılımı ve bunun yanı sıra toplam polifenol içeriği ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi saptanacağından bu konudaki literatür eksikliği biraz giderilmiş olacaktır.

Bu çalışmada öncelikle çay örneklerinin metanol, etanol ve su ile ekstraksiyonlarından elde edilen çeşitli fraksiyonların toplam fenolik madde içeriği spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Söz konusu solventler, gıda maddelerinden polifenol bileşiklerin ekstraksiyonu için yaygın olarak kullanılmalarından (Pinelo et al. 2004b) dolayı seçilmiştir. Daha sonra, en yüksek polifenol verimi elde edilen fraksiyonların (etilasetat, kloroform ve su) fenolik madde dağılımının HPLC yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda, farklı ekstraksiyon koşulları altında fenolik madde bileşimi ile antioksidan aktivite arasında bir ilişki olup olmadığı da saptanmış olacaktır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Proje materyali olarak kullanılan TÇY (Mayıs 2005'te toplanmış Muradiye klonu) örnekleri Çay Araştırma Enstitüsü-Rize'den temin edilerek en kısa sürede laboratuvar liyofilizerinde (Labconco FreeZone 6, Maryland-USA) kurutulmuştur. YÇ örneği (Çay-Kur marka) ise Ankara'daki bir marketten temin edilmiştir. Her iki çay örneği bir kahve öğütücüsü ile öğütülerek 150-300 µm partikül boyutlarında olacak şekilde elenmiş ve kullanılıncaya kadar +4°C de muhafaza edilmiştir.

Polifenol ekstraksiyonu için kullanılan metanol, etanol ve kloroform HPLC saflığında olup Riedel-de Haën (BioChemica Fluka Cheme GmbH Buchs-İsviçre)'den, etil asetat Merck (Darmstadt-Almanya)'den satın alınmıştır. Spektrofotometrik toplam polifenol analizinde kullanılan *Folin-Cioacaltea reaktifi* ve Na₂CO₃ E. Merck Co. (Darmstadt, Almanya)'den, antioksidan analizinde kullanılan 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, ABD)'den satın alınmıştır. Kullanılan diğer kimyasallar analitik saflıkta olup Merck (Almanya) satın alınmıştır. HPLC ile fenolik madde analizinde kullanılan Kateşin (C), Epikateşin (EC), Gallokateşin (GC), Epigallokateşin (EGC), Epigallokateşin gallat (EGCG) ve Epigallokateşin (EGC) Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, ABD)'den, Kuersetin-3-glukozid (Q3G) Fluka'dan (Biochemica-Fluka Cheme- İsviçre), Rutin (Kuersetin 3-ramnoglukozid, Q3RG) Wako Chem. Co.'den ve Kamferol 3-ramnoglukozid (K3RG) Chromadex (Santa Ana, ABD)' den satın alınmıştır. HPLC saflıkta fosforik asit ve asetonitril Riedel-de Haën' den satın alınmıştır. Çalışmalarda kullanılan RP-HPLC kolon (5µm Tracer Extrasil –0052 (250x4.6 mm) (Teknokroma Barselona, İspanya), 0.45 µm'lik PTFE membran filtreler Macherey-Nagel (Almanya)'den satın alınmıştır. Çalışmada orbital çalkalayıcı (Biosan, OS-10), derin dondurucu (-28 °C) (Philco), buzdolabı (+4 °C) (Arçelik), HPLC degazör (Shimadzu, DGU-14A), spektrofotometre (Shimadzu, UV-VIS 1601), santrifüj (SIGMA 2-16) kullanılmıştır.

3.2.Yöntem

3.2.1. Ekstraksiyon

Öğütülmüş çay örneği, ham ekstrakt elde etmek amacıyla etanol, metanol ve saf su ile 3 tekerrürlü olarak aşağıda belirtildiği gibi ekstrakte edilmiştir. Su ekstraktı için; 1g örnek üzerine 50g taze olarak kaynatılmış su eklenerek termos içinde 10 dk süreyle infüzyona (demleme) uğratılmıştır. Elde edilen infüzyon, pamuktan geçirilerek filtre edilmiş ve süratle musluk suyu altında soğutulmuştur. Daha sonra bu ekstrakt liyofilizerde kurutulmuş ve ekstraksiyon verimini hesaplamak amacıyla hassas terazide tartılmıştır.

Metanol ve etanol ekstraktları için de aşağıdaki yöntem takip edilmiştir: 1g örnek 50 ml metanol veya etanol ile 2 saat süreyle orbital çalkalayıcı ile oda sıcaklığında, karanlıkta ekstrakte edilmiştir. Karışım, Whatman No.1 filtre kağıdından filtre edildikten sonra berrak filtrat rotary evaporatör kullanılarak 40 °C'de vakum altında kurutulmuştur. Elde edilen kuru ham ekstrakt ekstraksiyon verimini hesaplamak amacıyla tartılmıştır.

3.2.2. Fraksiyonlara ayırma

Ham kuru ekstrakt 10 ml saf su içerisinde çözündürülmüştür. Sulu çözelti, çay bileşenlerini ayırmak için yaygın olarak kullanılan solventlerden önce kloroform (kafein ve pigmentleri uzaklaştırmak için) ile daha sonra etil asetat ile 1:1 (v/v) oranında sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Her bir sıvı-sıvı ekstraksiyonu, ayırma hunisi kullanılarak 10'ar dakikadan 2'şer kez olmak üzere, çalkalayıcı üzerinde gerçekleştirilmiştir ve elde edilen organik fazlar birleştirilmiştir. Etil asetat fazlarının suyu, susuz sodyum sülfat ile uzaklaştırılmış ve filtre edilmiştir. Tüm organik fazlar, vakum altında evapore edilerek kurutulmuştur. Kuru ekstraktlar tartıldıktan sonra sulu etanol (%50) içinde çözündürülmüştür. Geride kalan sulu fazlar ise liyofilize edilerek kurutulmuş, tartılmış ve saf su içinde çözündürülmüştür.

3.2.3. Ekstraksiyon veriminin hesaplanması

Evapore ya da liyofilize edilerek kurutulmuş ekstraktların verimi (kuru ağırlık bazında) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ verim} = (W_1 * 100) / W_2$$

Formülde W_1 solvent uzaklaştırılarak kurutulmuş ekstraktın ağırlığını, W_2 ise çay ya da çay yaprağının kuru ağırlığını göstermektedir.

3.2.4. Toplam polifenol tayini

Toplam polifenol analizi spektrofotometrik Folin-Ciocalteu yöntemine göre (Obanda ve Owuor, 1997) yapılmıştır. Bu analiz için standart gallik asit çözeltisinin 0.005-0.05 mg/ml aralığındaki 9 farklı konsantrasyonu ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir ($R^2=0.99$). Sonuçlar elde edilen eğrinin regresyon eşitliğinden yararlanılarak hesaplanmış ve *mg gallik asit eşdeğeri (GAE)* olarak ifade edilmiştir.

Bu yöntemde 100 µg/ml'ye saf su ile seyreltilmiş 1 ml çay ekstraktı 1 ml (3 kez su ile seyreltilmiş) Folin-Ciocalteu reaktifi ile karıştırılmıştır. 5 dakika sonra bu karışıma 2 ml (% 35'lik) doygun sodyum karbonat çözeltisi ilave edilerek iyice karıştırılmış ve 2 ml su ile 6 ml'ye seyreltilmiştir. Elde edilen karışım 30 dakika karanlıkta bekletildikten sonra oluşan mavi rengin absorbansı spektrofotometrede 700 nm'de okunmuştur.

3.2.5. Antioksidan aktivite tayini

Çay örneklerinin antioksidan aktivitesi, DPPH yöntemi (Katalinić et. al. 2004; Atoui, 2005) kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla, otomatik pipet yardımıyla 50 µl çay ekstraktından (200 µg/ml) alınarak 1950 µl 6×10^{-5} molar DPPH radikali (metanolde hazırlanmış) ile karıştırılmıştır. Kontrol olarak saf su kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı vorteks karıştırıcıda karıştırılıp oda sıcaklığında 60 dakika süreyle karanlıkta bekletilmiştir. Sürenin bitiminde

karışımın absorbansı spektrofotometrede 517 nm’de metanole karşı okunmuştur. Antioksidan aktivite (% AA), aşağıdaki eşitlikten (Yen and Duh, 1994) yararlanılarak hesaplanmıştır.

$$AA(\%) = \frac{Abs_{Kontrol} - Abs_{\text{örnek}}}{Abs_{Kontrol}} \times 100$$

Formülde $Abs_{Kontrol}$ örnek içermeyen DPPH çözeltisinin absorbansını, $Abs_{\text{örnek}}$ örnek içeren DPPH çözeltisinin absorbansını göstermektedir. Aynı koşullar altında referans antioksidan olarak askorbik asit çözeltisinin 0-150 µg/ml aralığındaki farklı konsantrasyonları ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Örneklerin AA’si askorbik asit eşdeğerine dönüştürülerek *g askorbik asit eşdeğeri (AEAA)/100 g kuru ekstrakt* olarak açıklanmıştır. Yüksek AEAA değerleri örnek AA’sinin yüksekliğini göstermektedir.

3.2.6. Antibakteriyel aktivite

Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesinde kullanılan bakteri kültürleri (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *E. coli* O157:H7, *Hafnia alvei*, *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *E. coli* Type 1 and *Bacillus cereus*) Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Test bakterileri Tyryptic Soy Broth (Merck, Germany) besiyerinde 37°C’de 18-24 saat süreyle geliştirilmiştir. Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesinde kullanılan disk difüzyon metodunda (Bauer et al., 1966) 6 mm çapında standart boş diskler (Oxoid, Basinstoke, UK) kullanılmıştır. Disklerin her birine TÇY ve YÇ ekstraktlarından (2 mg/mL) 200µl emdirilmiş ve laminar akışlı kabinde (Forma Scientific) kurutulmuştur. Test bakterileri steril svab ile Nutrient Agar (Merck, Germany) besiyerinin yüzeyine ince bir film halinde yayılmıştır. İnoküle edilen ve disklerle yerleştirilen petri plakları 37 °C’de 18-24 h inkübe edilmiş ve inkübasyon süresi sonunda disk çevresindeki gelişme olmayan bölgede inhibisyon zonu ölçülmüş ve mm olarak kaydedilmiştir. Aynı işlem kontrol amacıyla % 50 etanol çözeltisine uygulanmıştır.

3.2.7. HPLC ile fenolik madde analizi

Suda çözüldürülmüş olan ham ekstrakt saf su ile konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde seyreltilmiş ve 0,45 µm’lik membran filtreden geçirilerek filtre edilmiştir. Filtre edilmiş

ekstraktın 20 µl' si HPLC kolonuna enjekte edilmiştir. HPLC analizinde uygulanan koşullar Çizelge 3.1'de verilmiştir (Turkmen and Velioglu, 2006).

Örnekteki fenolik bileşiklerin tanımlanması, bileşiklerin kolondaki alıkonma süresi ve UV-spektrumlarının ilgili standart maddelere ait süre ve spektrumlarla karşılaştırılmasıyla yapılmıştır. Fenolik bileşiklere ait piklerin tanımlanması ve miktarlarının hesaplanması bileşiklerin maksimum absorbans değeri verdiği dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle, kateşinler ve flavonol glikozidlerin analizi için 270 nm dalga boyu seçilmiştir.

Bileşiklerin miktarlarının tespit edilmesinde bileşiklere ait HPLC kromatogramlarından elde edilmiş entegre alanlar ve standart maddelerin ara stok çözeltileri ile hazırlanmış kalibrasyon eğrilerinden yararlanılmıştır.

Çizelge 3.1. HPLC çalışma koşulları ve gradient elusyon programı

HPLC çalışma koşulları		Gradient elusyon programı		
		süre (dak)	A (%)	B (%)
Model	: Shimadzu			
Kolon	: Teknokroma Extrasil ODS2 (250x4.6 mm; 10 µm; C ₁₈)	0	8	92
Kolon Fırını	: CTO – 10A SVp	10	8	92
Sistem Kontrol Ünitesi	: SCL-10 Avp	57	18	82
Dedektör	: Fotodiyot array (PDA)	78	24	76
Basınç	: 250 Kgf	80	26	74
Pompa	: LC-10 ADVp	92	28	72
Mobil Faz	: A = Asetonitril B = Su + % 0,1 fosforik asit (w/v)	98	80	20
Dedeksiyon	: 270 ve 355 nm	108	8	92
Akış Hızı	: 1 ml/dk.			
Kolon Sıcaklığı	: 40 °C			
Enjeksiyon Miktarı	: 20 µl			

3.2.8. İstatistik analiz

İstatistik analizler SPSS programı (10.1 versiyonu) ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar 3 tekrarlı ölçümlerin ortalaması \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. Tek yönlü varyans analizi yapılmıştır ve uygulamalar arasındaki önemli farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırmalı testi ile belirlenmiştir. Farklılıkların $p < 0.05$ seviyesinde önemli olduğu düşünülmüştür. Değişkenler arasındaki korelasyonlar regresyon analizi (Sokal and Rohlf, 1995) ile gerçekleştirilmiştir.

4. ANALİZ ve BULGULAR

Araştırma kapsamında TÇY ve YÇ da farklı solventler kullanılarak yapılan ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstraktlarda gerçekleştirilen toplam polifenol ve AA analizlerinin sonucu Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Ayrıca, toplam polifenol içeriği ile AA arasındaki ilişki Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Hem TÇY hem de YÇ örneklerinde en yüksek polifenol veriminin bu örneklere ait ham ekstraktlarda elde edilmesi nedeniyle bu ekstraktların HPLC ile polifenol (kateşin ve flavonol glikozid) dağılımı belirlenmiştir. Buna ilişkin sonuçlar Çizelge 4.3 ve 4.4’de verilmiştir. TÇY ve YÇ’den elde edilen farklı solvent ekstraktlarının farklı fraksiyonlarının antibakteriyel aktiviteleri Çizelge 4.5’de verilmiştir. Söz konusu ekstraktlara ait örnek kromatogramlar Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4. 1. TÇY ve YÇ den elde edilen farklı solvent ekstraktlarına ait farklı fraksiyonların toplam polifenol içeriği (mg GAE/g kuru ekstrakt), polifenol verimi (mg GAE/g kuru çay) ve ekstraksiyon verimi (%)

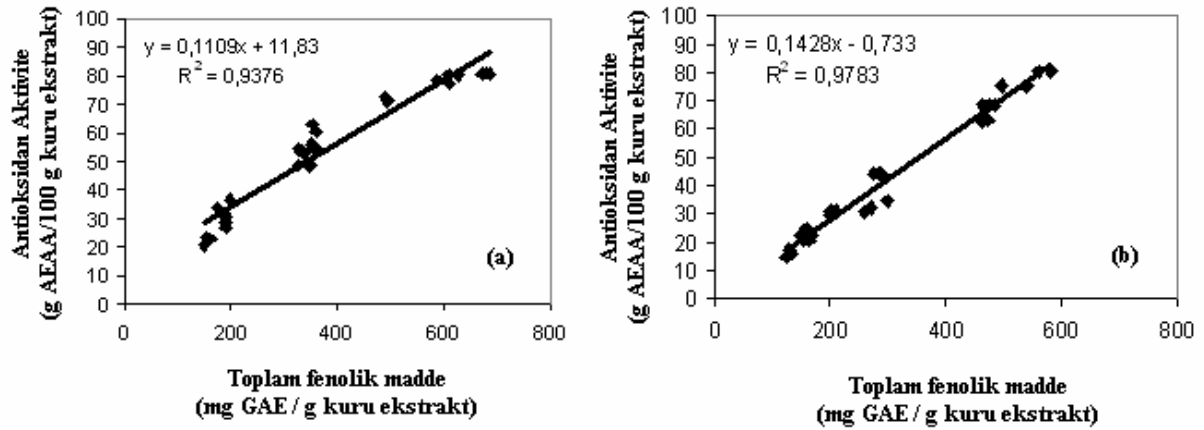
Örnek	Fraksiyon	Ekstrakt		
		Metanol	Etanol	Su
TÇY	<i>Polifenol içeriği</i>			
	Ham	338.4±6.14 ^{a*}	355.2±2.21 ^a	351.2±11.54 ^a
	Etil asetat fraksiyonu	523.7±31.92 ^a	680.2±4.44 ^b	615.8±5.98 ^b
	Su fraksiyonu	192.2±2.88 ^b	155.4±3.18 ^b	183.3±4.99 ^b
	<i>Polifenol verimi</i>			
	Ham	169.5±3.55 ^c	78.8±0.63 ^a	133.6±2.16 ^b
	Etil asetat fraksiyonu	119.9±1.80 ^c	60.6±1.81 ^a	93.2±2.08 ^b
	Su fraksiyonu	43.7±1.93 ^c	18.3±0.49 ^a	38.0±0.70 ^b
	<i>Ekstraksiyon verimi</i>			
	Ham	50.1±0.23	22.5±0.94	39.4±1.34
	Etil asetat fraksiyonu	23.3±1.20	10.3±0.23	13.5±1.13
	Su fraksiyonu	24.1±1.71	10.5±0.52	24.3±0.26
YÇ	<i>Polifenol içeriği</i>			
	Ham	283.6±3.96 ^b	276.5±11.70 ^b	204.4±3.02 ^a
	Etil asetat fraksiyonu	481.8±9.48 ^a	560.8±11.99 ^b	470.2±3.68 ^a
	Su fraksiyonu	161.4±2.84 ^b	128.6±1.92 ^a	155.9±4.05 ^b
	<i>Polifenol verimi</i>			
	Ham	64.9±3.14 ^b	11.8±0.29 ^a	88.5±3.19 ^c
	Etil asetat fraksiyonu	42.1±1.43 ^b	7.4±0.15 ^a	49.6±0.56 ^c
	Su fraksiyonu	22.4±0.50 ^b	5.3±0.21 ^a	32.7±1.47 ^c
	<i>Ekstraksiyon verimi</i>			
	Ham	22.1±1.06	5.8±0.22	32.0±0.47
	Etil asetat fraksiyonu	8.6±0.57	1.6±0.07	8.6±0.03
	Su fraksiyonu	13.8±0.20	3.3±0.29	24.1±0.70

*: Her çay örneği için aynı satırdaki farklı harfler, istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Çizelge 4. 2. Taze çay yaprağı ve yeşil çaydan elde edilen farklı solvent ekstraktlarına ait farklı fraksiyonların antioksidan aktivitesi (g AEAA/100 g kuru ekstrakt)

Örnek	Fraksiyon	Ekstrakt		
		Metanol	Etanol	Su
TÇY	Ham	52.0±1.76 ^{a*}	52.1±1.72 ^a	59.8±2.02 ^b
	Etil asetat fraksiyonu	74.1±2.19 ^a	79.3±0.92 ^b	80.8±0.13 ^b
	Su fraksiyonu	32.0±2.42 ^b	30.7±2.14 ^b	22.2±0.75 ^a
YÇ	Ham	44.3±0.08 ^b	30.5±0.46 ^a	32.5±1.17 ^a
	Etil asetat fraksiyonu	70.8±2.28 ^a	64.8±1.76 ^a	78.6±1.66 ^b
	Su fraksiyonu	23.3±0.77 ^b	21.8±0.69 ^b	16.1±0.66 ^a

*: Her çay örneği için aynı satırdaki farklı harfler, istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05).



Şekil 4.1. TÇY (a) ve YÇ (b) için toplam polifenol içeriği ile AA arasındaki korelasyon

Çizelge 4. 3. Farklı solventler kullanılarak elde edilen ham ekstraktların kateşin (mg/g kuru çay) dağılımı

Örnek	Solvent	Kateşin				Toplam kateşin
		EGC	ECG	EC	EGCG	
YÇ	Etanol	3.05±0.18 ^a	0.68±0.01 ^a	0.90±0.02 ^a	3.86±0.19 ^a	8.49±0.41 ^a
	Metanol	17.95±0.71 ^b	4.80±0.11 ^b	5.41±0.10 ^b	27.33±0.46 ^b	55.49±0.24 ^b
	Su	25.94±0.80 ^c	4.74±0.18 ^b	7.53±0.13 ^c	31.41±0.73 ^c	69.62±0.02 ^c
TÇY	Etanol	16.67±0.16 ^a	6.09±0.16 ^a	7.46±0.02 ^a	34.53±0.85 ^a	64.74±1.09 ^a
	Metanol	34.28±0.16 ^b	13.85±0.03 ^c	16.01±0.08 ^b	86.22±0.80 ^c	150.36±0.91 ^c
	Su	28.39±2.49 ^b	9.03±0.56 ^b	14.80±1.06 ^b	58.57±4.19 ^b	110.79±8.30 ^b

*: Her çay örneği için aynı sütundaki farklı harfler, istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Çizelge 4. 4. Farklı solventler kullanılarak elde edilen ham ekstraktların flavonol glikozid (mg/g kuru çay) dağılımı

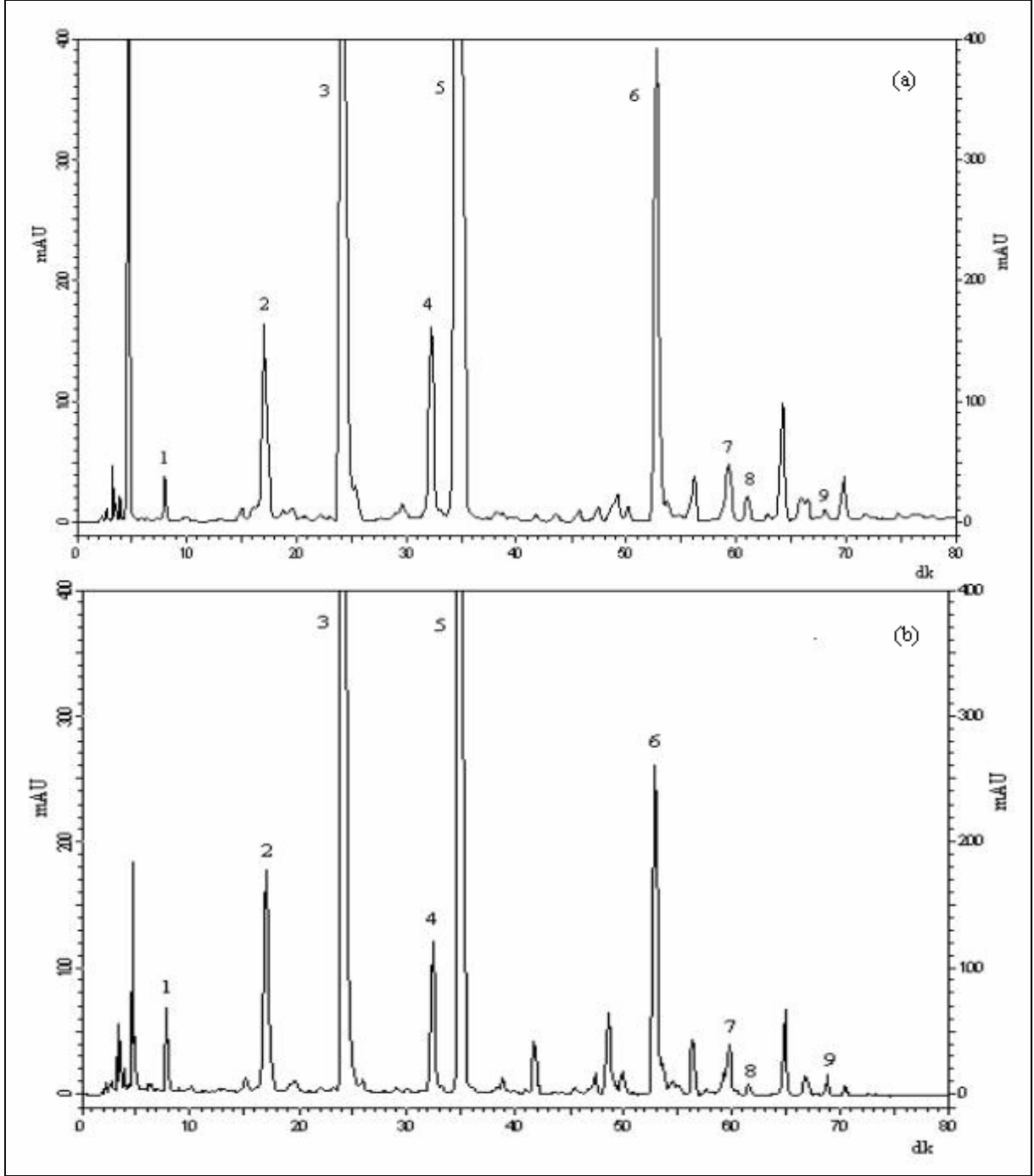
Örnek	Solvent	Flavonol glikozid			Toplam flavonol glikozid
		Q3RG	Q3G	K3RG	
YÇ	Etanol	0.07±0.01 ^a	0.04±0.00 ^a	0.09±0.00 ^a	0.20±0.01 ^a
	Metanol	0.47±0.00 ^b	0.21±0.00 ^b	0.26±0.00 ^b	0.94±0.00 ^b
	Su	0.95±0.06 ^c	0.30±0.01 ^c	0.52±0.00 ^c	1.78±0.07 ^c
TÇY	Etanol	0.66±0.05 ^a	0.43±0.02 ^a	0.14±0.01 ^a	1.23±0.08 ^a
	Metanol	1.99±0.02 ^c	1.02±0.01 ^c	0.37±0.00 ^b	3.38±0.02 ^b
	Su	1.56±0.13 ^b	0.86±0.06 ^b	0.59±0.02 ^c	3.01±0.21 ^b

*: Her çay örneği için aynı sütundaki farklı harfler, istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Çizelge 4.5. Taze çay yaprağı ve yeşil çaydan elde edilen farklı solvent ekstraktlarına ait farklı fraksiyonların antibakteriyel aktivitesi

Bakteri	Fraksiyon	TÇY			YÇ		
		İnhibisyon zon çapı (mm)			İnhibisyon zon çapı (mm)		
		<i>Metanol</i>	<i>Etanol</i>	<i>Su</i>	<i>Metanol</i>	<i>Etanol</i>	<i>Su</i>
<i>S. aureus</i>	Ham	12.0±0.00	12.0±0.00	11.5±0.00	zy*	zy	10.0±0.00
	Etil asetat	13.0±1.00	15.0±0.00	15.3±0.33	10.0±0.00	11.0±0.52	14.8±0.60
	Su	zy	zy	zy	zy	zy	zy
<i>H. alvei</i>	Ham	zy	zy	zy	zy	zy	zy
	Etil asetat	zy	zy	zy	zy	zy	zy
	Su	zy	zy	zy	zy	zy	zy
<i>Sal. enterocolitica</i>	Ham	zy	zy	zy	zy	zy	zy
	Etil asetat	zy	zy	zy	zy	zy	zy
	Su	zy	zy	zy	zy	zy	zy
<i>L. monocytogenes</i>	Ham	zy	zy	zy	zy	zy	zy
	Etil asetat	zy	zy	zy	zy	zy	zy
	Su	zy	zy	zy	zy	zy	zy
<i>B. cereus</i>	Ham	zy	zy	zy	zy	zy	zy
	Etil asetat	8.0±0.00	8.7±0.33	8.5±0.29	7.0±0.00	8.2±0.17	8.3±0.17
	Su	zy	zy	zy	zy	zy	zy
<i>E. coli</i> O157:H7	Ham	zy	zy	zy	zy	zy	zy
	Etil asetat	zy	zy	zy	zy	zy	zy
	Su	zy	zy	zy	zy	zy	zy
<i>E. coli</i>	Ham	zy	zy	zy	zy	zy	zy
	Etil asetat	zy	zy	zy	zy	zy	zy
	Su	zy	zy	zy	zy	zy	zy

zy: zon yok



Şekil 4. 2. Taze çay yaprağı (a) ve yeşil çayın (b) metanol ekstraktlarına ait HPLC kromatogramları. 1-Teobromin, 2-EGC, 3-Kafein, 4-EC, 5- EGCG, 6-ECG, 7-Q3RG, 8-Q3G, 9-K3RG

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1. Toplam Polifenol

Ekstrakt tipine, kullanılan ekstraksiyon solventine ve materyale bağlı olarak toplam polifenol içeriği TÇY ve YÇ için sırasıyla 155.4-680.2 mg GAE/g kuru ekstrakt ve 128.6-560.8 mg GAE/g kuru ekstrakt olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1). TÇY ve YÇ'a ait en düşük polifenol içeriği kloroform fraksiyonu (1 mg/g ka'dan daha az) ile elde edilmiştir. Bu sonuç kloroform fraksiyonu ile ilgili yeterli çalışma bulunmamasına rağmen, yeşil çay ve *warmwood* bitkisi ile yapılan çalışmalar (Bu-Abbas et al. 1997; Canadanovic-Brunet et al. 2005) ile uyum sağlamıştır. Tablo 2'de görüldüğü gibi, ekstrakt bazında hem TÇY hem de YÇ için en yüksek polifenol içeriği etil asetat fraksiyonundan elde edilirken bunu sırasıyla ham ekstrakt ve su fraksiyonu izlemiştir. Bunun, etil asetatın çayın başlıca fenolik bileşikleri olan kateşin ve teaflavin gibi daha az polar bileşikler daha fazla ekstrakte etmesinden (Larger et al. 1998; Su et al. 2003) kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer bulgular, tatlı portakal kabuğu (Anagnostopoulou et al., 2006), *Sorbus domestica* meyvesi (Termentzi et al. 2005), kırmızı algler (Duan et al. 2006) ve mantar (Cheung et al. 2005) ile yapılan çalışmalarda da elde edilmiştir. Copeland et al. (1998) tarafından yapılan çalışmada ise yeşil çay ekstraktlarının etil asetat ile fraksiyonlarına ayrılması sonucunda bütün flavanoller ve flavonol glikozidler etil asetat fazını tercih etmişlerdir. Genel olarak, hem TÇY hem de YÇ için ekstraksiyon solventi olarak su kullanıldığında, ham ekstraktların ve etil asetat fraksiyonlarının polifenol içeriği metanol ve etanole göre önemli düzeyde fazla tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Bu durum solventlerin çay bileşenlerine karşı gösterdiği ilgilerinin (affinite) farklı olmasından (Farhoosh et al. 2007) kaynaklanabilmektedir. Ancak, su fraksiyonları farklı eğilim göstermiş olup en yüksek polifenol içeriği metanol ile elde edilmiştir ve bunu sırasıyla etanol ve su izlemiştir. YÇ ekstraktlarının toplam polifenol içeriği TÇY'na göre daha düşük tespit edilmiştir. Bunun nedeninin polifenol oksidaz enzimini inaktif hale getirmek için uygulanan ısı işlem süresince polifenollerin parçalanması olduğu düşünülmektedir.

TÇY ekstraktlarının polifenol verimi (% 18.3-169.5 mg GAE/g ka), YÇ'ın polifenol veriminden (% 5.3-88.5 mg GAE/g ka) çok daha yüksek bulunmuştur. Ekstraksiyon verimlerinde de aynı eğilim gözlenmiştir. Araştırma bulgularımızla uyumlu olarak, Chan et al.(2006) yeşil çayın toplam polifenol veriminin taze çay yapraklarından önemli düzeyde daha

düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Wright et al. (2000) % 40'lık etanol kullanarak 40 farklı taze çay yaprağının polifenol içeriğini 104.3-290.09 mg/g kuru çay yaprağı olarak tespit etmişlerdir ve bu sonuçlar bu çalışmanın sonuçları ile kısmen uyum içerisindedir. Khokhar and Magnusdottir (2002)'in çalışmasındaki farklı yeşil çayların su ekstraktlarına ait ortalama 86.3 mg GAE/g kuru madde toplam fenolik verimi araştırmamız bulguları ile benzerlik göstermiştir. Fenolik bileşenler çoğunlukla hücre vakuollerinde, çözünür veya çözünmez formda ve hücre duvarı bileşenleriyle kombinasyon halinde bulunurlar (Wach et al. 2007). Achouri et al. (2005)'e göre protein-polifenol kompleksi oluşumunda hidrojen, iyonik ve kovalent bağlar da dahil çeşitli interaksiyonlar bunların başında da hidrofobik interaksiyonlar rol oynamaktadır. Bu interaksiyonlar sıcaklık, pH gibi çeşitli faktörlerden oldukça fazla etkilenmektedir. Bu gerçekler ışığında, yeşil çaydan polifenollerin daha az ekstrakte edilmesinin nedeninin çözünmez formdaki polifenol-protein ve polifenol-karbonhidrat yapılarının olabileceği düşünülmektedir (Siddhuraju, 2006). Benzer şekilde Yu et al. (2006)'ın çalışmasında, doğrudan kabuğu soyulmuş yerfıstığının toplam fenolik madde içeriği ısı uygulanarak kabuğu soyulmuş yerfıstığınıninkinden yüksek bulunmuştur.

Yeşil çay ve taze çay yaprağının polifenol verimi üzerine ekstraksiyon solventlerinin etkisi önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Ancak her iki materyalin polifenol verimlerinde farklı eğilimler gözlenmiştir. Taze çay yaprağı için metanolün, yeşil çay için ise suyun en etkili solvent olduğu tespit edilmiştir. Benzer bir durum Pinelo et al. (2004a)'ın çalışmasında da gözlenmiştir.

Bu çalışmada, daha önce yapılan çalışmalar (Pinelo et al. 2004a; Jayaprakasha et al. 2003)'a benzer olarak TÇY ve YÇ'in her ikisi için de geçerli olmak üzere, toplam polifenol verimi ve toplam polifenol içeriği arasında herhangi bir korelasyon bulunamamıştır. Benzer şekilde, Sun and Ho (2005) tarafından yapılan çalışmada toplam fenolik madde içeriği birbirine yakın olmasına rağmen *buckwheat* bitkisinden elde edilen metanol ekstraktının veriminin etanol veriminden daha yüksek olduğu saptanmıştır.

5.2. Antioksidan Aktivite

TÇY ve YÇ'in fraksiyonlarının AA'si fraksiyon tipi, ekstraksiyon solventi ve materyale bağlı olarak, 200 µg/ml konsantrasyonda sırasıyla 22.2-80.8 ve 16.1-78.6 g askorbik asit/100g ekstrakt olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2). Her iki materyal için de en yüksek AEAA değeri

etil asetat fraksiyonu ile elde edilmiştir. Bunun nedeni bu ekstraktların, DPPH radikaliyle hızlı etkileşime giren ve radikal moleküllerinin büyük kısmını indirgeyen antioksidan bileşenlerini daha fazla içermesi olabilir (Canadanovic-Brunet et al. 2005). Etil asetat fraksiyonunu sırasıyla, ham ekstrakt ve su fraksiyonu izlemiştir. Araştırmamız bulguları, TÇY ve YÇ'in su ekstraktlarının etil asetat fraksiyonlarının antioksidan aktivitesinin iyi bilinen bir antioksidan olan askorbik asit ile karşılaştırılabileceğini göstermiştir. Farklı bitkilerle yapılan çeşitli çalışmalar (Duan et al., 2006; Farhoosh et al. 2007; Anagnostopoulou et al., 2006; Canadanovic-Brunet et al. 2005) da en fazla aktiviteyi etil asetat fraksiyonunun göstermesi, araştırmamız sonuçlarını doğrulamıştır.

Kullanılan ekstraksiyon solventi açısından, örneğin, TÇY'nin etanol ve su ekstraktlarından elde edilen etil asetat fraksiyonlarının aktiviteleri arasında önemli bir fark bulunmazken YÇ için önemli ($p < 0.05$) bir fark bulunmuştur. Literatürde, farklı bitkiler kullanılarak farklı ekstraktların antioksidan aktivitelerinin karşılaştırılmasına ilişkin yeterli çalışma bulunurken çaya ilişkin çalışmalar yok denecek kadar azdır. Yu et al. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada doğrudan soyulmuş yerfıstığı kabuklarından elde edilen metanol ve etanol ekstraktlarının TAA değerleri benzer sonuç verirken, kavrulmuş yerfıstığı kabuğunun etanol ekstraktlarının TAA değeri metanol ekstraktından fazla bulunmuştur. Pinelo et al. (2004a)'ın çalışmasında da benzer sonuçlar gözlenmiştir.

Aynı konsantrasyonda (200 µg/ml) TÇY ekstraktlarının antioksidan aktivitesi YÇ ekstraktlarından daha yüksek bulunmuştur. Aynı polifenol profiline sahip olmalarına rağmen (Şekil 2), bu farklılık TÇY ekstraktlarının polifenol konsantrasyonunun daha yüksek olmasından kaynaklanabilmektedir. Bu nedenle, TÇY'nin daha iyi antioksidan kaynağı olduğu söylenebilmektedir.

Ekstraktların AAsi ile polifenol içeriği arasında iyi bir korelasyon (TÇY için $R^2=0.9376$, YÇ için $R^2=0.9783$) tespit edilmiştir (Şekil 4.2 a ve b). Bu sonuçlar daha önce yapılan çalışmalar (Sun and Ho, 2005; Thaipong et al., 2006; Duan et al., 2006)la uyum sağlamıştır ve bu durum, ekstraktların AA'si üzerine polifenollerin önemli katkısının olduğunu göstermektedir (Banerjee et al. 2005; Negi et al. 2005; Leong and Sui, 2002; Miliauskas et al. 2004; Yu et al. 2005). Diğer taraftan araştırma bulgularımızdan farklı olarak, *Sorbus domestica* meyvesiyle yapılan çalışmada toplam polifenol içeriği ve DPPH metoduyla ölçülen AA arasında düşük korelasyon ($R^2=0.2532$) bulunmuştur (Termentzi et al. 2005). Bu farklılığa, söz konusu

meyvelerde polifenollerin dışında bulunan askorbik asit, karotenoid ve tokoferol gibi antioksidan bileşiklerin AA'ye katkıda bulunması ve bunlar arasındaki etkileşimin neden olduğu düşünülebilmektedir (Sun and Ho, 2005).

5.3. Antibakteriyel Aktivite

Araştırmada kontrol olarak kullanılan solventin incelenen altı bakteri üzerinde inhibe edici etkisi olmamıştır. İncelenen örneğe bağlı olmaksızın, ham ekstraktların su fraksiyonları da incelenen bakteri örneklerinde herhangi bir antibakteriyel etki göstermemiştir. Ancak, TÇY ve YÇ ekstraktlarının her ikisinin de etil asetat fraksiyonları ve ham ekstraktları incelenen bakterilerin yalnızca iki tanesinde, yani *S. aureus* ve *B. cereus* üzerinde ekstrakt tipine bağlı olarak antibakteriyel aktivite göstermiştir. TÇY'da *S. aureus* etil asetat fraksiyonu ve ham ekstraktla inhibe edilebilirken, *B. cereus* yalnızca etil asetat fraksiyonu ile inhibe edilebilmiştir. YÇ örneğinde ise yalnızca etil asetat fraksiyonu bu iki bakteriye karşı etkili olmuş, ancak ham ekstraktlar yalnızca *S. aureus* üzerinde etkili olmuştur. Görüleceği üzere, TÇY ve YÇ örneklerinin etil asetat fraksiyonları genellikle ham ekstrakta göre daha fazla antibakteriyel etkiye sahiptir. Bu olgu, antioksidatif aktivite konusunda ulaşılan bulgularla da uyumlu olup bu durum ekstraktların içerdiği polifenol miktarının yüksekliği ile bağlantılıdır. TÇY'da kullanılan ekstraktlar göz önüne alındığında etanol, metanol ve su benzer etkilere sahip olmuştur. YÇ örneklerinde ise su, diğer iki solvente göre daha etkilidir.

İncelenen gram-pozitif bakterilerden *S. aureus*'un *B. cereus* 'a göre daha duyarlı olduğu görülmüştür. Bu patojen, bitki ekstraktlarının ve diğer maddelerin antimikrobiyal testlerinde geniş ölçekte kullanılmaktadır (Dupont et al., 2006). Ancak, incelenen çay ekstraktlarının incelenen konsantrasyonlarında gram-negatif bakterilere karşı etkisi görülmemiştir. Wu et al. (2007) yeşil çay da dahil olmak üzere inceledikleri çay ekstraktlarında 2 mg/mL'lik konsantrasyonlarda *S. aureus* ve *B. subtilis*'e karşı antimikrobiyel aktivite görüldüğünü,

ancak gram-negatif *E. coli*'ye karşı görülmediğini bildirmiştir ki bu bulgu, bizim sonuçlarımızla uyum içerisindedir. Gram-negatif bakterilerini daha yüksek direnç göstermesinin nedeninin dış membranlarında lipopolisakkarit içermelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Alzoreky and Nakahara, 2003; Negi et al., 2005). Diğer taraftan, antimikrobiyal aktivite kullanılan ekstraktların konsantrasyonu ile de ilişkilidir. Örneğin An et al. (2004), %60'lık asetonla ekstrakte edilen ekstraktların 250 µg/disk düzeyinde kullanımı durumunda *E. coli*'de inhibisyon görülmezken, her bir diske yüklenen ekstrakt miktarı 500 ve 1000 µg/disk düzeyine çıktığında inhibisyonun olduğunu görmüşlerdir, ki bu düzeyler tarafımızdan kullanılan 400 µg/disk'e göre oldukça yüksek miktarlardır. Benzer şekilde, Jayaprakasha et al. (2003) üzüm çekirdeği ekstraktlarından elde ettikleri ekstraktların 850-1000 ppm'lik konsantrasyonlarının gram-pozitif bakterileri tamamen inhibe ettiğini, buna karşın gram-negatif bakterilerin ancak 1250-1500 ppm'lik dozlarda inaktive edilebildiğini belirtmişlerdir. Özkan et al. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada da üzüm posası ekstraktlarının % 2.5-20 (1250-10000 µg/disk) düzeyinde kullanıldığında farklı çürütme etkeni veya aralarında patojenlerin de bulunduğu gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Tarafımızdan elde olunan verilere göre, ele alınan bakterilerde, daha yüksek düzeyde polifenol içeren TÇY ekstraktları, daha az polifenol içeren YÇ ekstraktlarına göre daha fazla antibakteriyel aktivite göstermiştir. Bu durum ekstraktların antibakteriyel etkisinin içerdikleri polifenollerden kaynaklandığının bir göstergesidir. Benzer şekilde, Chou et al. (1999) fermente olmamış çayların antimikrobiyal aktivitesinin daha az kateşin içeren fermente olanlarıkinden daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Ancak bunun tersine, Yildirm et al. (2003) düşük düzeyde fenolik madde içeren *Polygonum cognatum Meissn*'in eter ekstraktlarının yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiğini, buna karşın daha yüksek fenolik

madde içeren su herhangi bir aktivite göstermediğini ortaya koymuşlardır. Çay polifenollerinin antibakteriyel aktivitesinin, bu bileşiklerin bakteri yüzeyindeki proteinlerle interaksiyona girmesinden veya absorbe edilmesinden kaynaklanmaktadır (Wu et al., 2007). He et al. (2007) yeşil çaydan elde olunan ekstraktların proteinlerle bağlandığını, veya onları çöktürdüğünü, ayrıca bakterilerin yapısında bulunan α -amilaz, pepsin, tripsin ve lipaz enzimlerini inhibe etme kapasitesinde olduğunu ortaya koymuştur.

5.4. Çay Ekstraktlarının Fenolik Madde Dağılımı

TÇY ve YÇ ham ekstraktlarının fenolik madde bileşiminin, başlıca kateşin ve flavonol glikozidlerden meydana geldiği tespit edilmiştir (Şekil 4.2). TÇY ekstraktlarında başlıca 4 kateşin tespit edilmiştir ve bunlar içinde birinci sırada EGCG (34.53-86.22 mg/g kuru çay) yer almıştır. Bunu EGC (16.67-34.28 mg/g kuru çay), EC (7.46-16.01 mg/g kuru çay) ve ECG (6.09-13.85 mg/g kuru çay) izlemiştir Çizelge 4.3). Daha önce yapılan çalışmalar da, taze çay yapraklarında en fazla bulunan kateşinin ya EGC ya da EGCG olduğunu göstermiştir (Obanda ve Owuor, 1997). Çay yaprağında bu 4 kateşinin özellikle de EGCG'ın fazla miktarda bulunması siyah çay kalitesi için çok önemlidir (Caffin et al. 2004). Bunun nedeni bu kateşinlerin, diğerlerinden farklı olarak, siyah çayın kalitesinden sorumlu başlıca teaflavinlerin oluşumunda rol oynamasıdır. (Wright et al. 2000; Owuor et al. 2006).

Wright et al. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, 40 farklı Afrika çay klonunda en fazla bulunan kateşinin EGCG olduğu ve bunu EGC'in izlediği saptanmıştır. Diğer kateşinlerin (C, EC ve ECG) ise çok az bulunduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlar araştırmamız sonuçlarını doğrulamıştır. Benzer şekilde Avustralya ve Tayvan taze çay yapraklarında EGCG'ın hakim olduğu, EGC'in de 2. sırada yer aldığı tespit edilmiştir (Yao et al. 2004; Lin et al.1996). TÇY ekstraktlarında toplam kateşin miktarı 64.74 ile 150.36 mg/g kuru çay arasında değişim göstermiştir. Kateşin miktarı yaprak çeşidi, hasat mevsimi, iklim, işleme yöntemi ve analitik yöntem gibi çeşitli faktörlerden oldukça fazla etkilenmektedir (Zuo et al. 2002; Gramza and Korczak 2005; Wheeler and Wheeler, 2004; Shishikura and Khokhar, 2005). Buna rağmen araştırmamız sonuçları Obanda ve Owuor (1997)'in 15 farklı klona ait taze yaprakta tespit ettikleri toplam kateşin miktarları (128.1-226.0 mg/g kuru madde) ile kısmen uyum içindedir.

Buna ilave olarak, Yang et al. (2007) taze yaprakta ağırlık bazında %10.81 düzeyinde toplam kateşin saptamışlardır ve araştırmamız bulguları (% 6.47-15.04) ile uyum sağlamıştır.

Araştırmamız YÇ ekstraktlarında da TÇY ekstraktlarında olduğu gibi aynı kateşinler ancak daha düşük miktarlarda tespit edilmiştir. Bunların başında EGCG (3.86-31.4 mg/g kuru çay) gelirken, bunu sırasıyla EGC (3.05-25.94 mg/g kuru çay), EC (0.9-7.53 mg/g kuru çay) ve ECG (0.68-4.80 mg/g kuru çay) izlemiştir (Tablo 4). Bu sıralama, yeşil çayda daha önce yapılan çalışmalarda da tespit edilmiştir (Wang et al. 2000; Chang et al. 2000). Araştırmamız yeşil çay ekstraktlarında bulunan toplam kateşin miktarı 8.49 ile 69.62 mg/g kuru çay arasında değişim göstermiştir. Bu sonuçlar, Shishikura ve Khokhar (2005) ile Khokhar ve Magnusdottr (2002)'in çeşitli yeşil çaylarda tespit ettikleri toplam kateşin miktarları (43-117 mg/g kuru madde; 51.5-84.3 mg/g kuru madde) ile kısmen uyum içindedir.

TÇY ve YÇ ekstraktlarında flavonol glikozid olarak en fazla Q3RG (sırasıyla, 0.66-1.99 mg/g kuru çay ve 0.07-0.95 mg/g kuru çay) tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). Bunu TÇY ekstraktlarında Q3G (0.43-1.02 mg/g kuru çay), YÇ ekstraktlarında ise K3RG (0.09-0.52 mg/g kuru çay) izlemiştir. Her 2 çay örneğinde de Q3RG miktarı, K3RG miktarından fazla bulunmuştur. Benzer sonuçlar, Price et al. (1998)'in siyah çayda ve Stewart et al. (2005)'in yeşil ve siyah çayda yaptıkları çalışmalarda da elde edilmiştir. Luximon-Ramma et al. (2005) ise taze yaprak ekstraktında 1.50 mg/g kuru ağırlık kuersetin, 0.57 mg/g kuru ağırlık kamferol tespit etmişlerdir. Söz konusu flavonolların glikozid formunda değil de aglukon formunda olmaları nedeniyle tam bir karşılaştırma yapılamamaktadır.

Çizelge 4.3 ve 4.4'te görüldüğü gibi TÇY ham ekstraktlarının YÇ ekstraktlarından daha fazla kateşin ve flavonol glikozid içerdiği tespit edilmiştir. Bu sonuç, toplam polifenol ve antioksidan aktivite için alınan sonuçlarla benzerlik göstermiştir. Daha önce belirtildiği gibi çay polifenollerini etkileyen birçok faktör olmasına rağmen, YÇ'in fenolik madde miktarındaki düşüklük polifenol oksidaz enzimini inaktif hale getirmek için uygulanan ısı işlem sırasında fenolik maddelerin protein ve karbonhidratlar ile çözünmez kompleks oluşturmasından kaynaklanabilmektedir.

Gerek TÇY gerekse YÇ ekstraktlarında solvent çeşidi kateşin ve flavonol glikozid miktarını önemli ölçüde etkilemiştir (Çizelge 4.3 ve 4.4). Bu çalışmada, TÇY ve YÇ'dan kateşin ekstraksiyonu için en etkili solventin sırasıyla metanol ve su olduğu, her ikisi için de en az

etkili solventin ise etanol olduğu tespit edilmiştir. Solventler arasındaki bu sıralama, TÇY ve YÇ'dan elde edilen ham ekstraktların toplam polifenol verimi sonuçları ile benzerlik göstermiştir (Çizelge 4.1). Daha önce yapılan çalışmalarda, kullanılan ekstraksiyon solventine göre yeşil çaydan elde edilen kateşin miktarlarının farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Pervaz-Uzunalic et al. 2006; Yao et al. 2004; Khokhar ve Magnusdottir, 2002). Üstelik, Shishikura ve Khokhar (2005)'e göre, etkinlik derecesi açısından solventler arasındaki sıralama kateşin cinsine göre değişmektedir. Araştırmamız bulgularına göre, kateşin içeriği açısından etanolün en az etkili solvent olmasına rağmen antioksidan aktivite açısından TÇY ham ekstraktlarında metanole, YÇ ekstraktlarında ise suya eşdeğer aktivite göstermiştir (Çizelge 4.2). Bu durum, etanol ekstraktlarında polifenollerin dışında antioksidan aktiviteye sahip ancak bu araştırma kapsamında olmayan bileşiklerin bulunmasından kaynaklanabilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Achouri, A., Boye, J.I. and Belanger, D. (2005). Soybean isoflavones: Efficacy of extraction conditions and effect of food type on extractability, *Food Research International* 38, 1199-1204.
- Alzoreky, N.S., Nakahara, K., 2003. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology* 80, 223-230.
- An, B., Kwak, J., Son, J., Park, J., Lee, J.C. and Byun, M. (2004). Biological and antimicrobial activity of irradiated green tea polyphenols. *Food Chemistry* 88, 549-555.
- Anagnostopoulou, M.A., Kefalas, P., Papageorgiou, V.P. Assimopoulou, A.N. and Boskou, D. (2006). Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). *Food Chemistry* 94, 19-25.
- Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G. and Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry* 89, 27-36.
- Banerjee, A., Dasgupta, N. and De, B. (2005). In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry* 90, 727-733.
- Baptista, J.A.B., Tavares, J.F.P. and Carvalho, R.C.B. (1999). Comparative study and partial characterization of Azorean green tea polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis* 12, 273-287.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C. and Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by single disk method. *American Journal of Clinical Pathology* 45, 493-496.
- Bu-Abbas, A., Copeland, E., Clifford, M. N., Walker, R. and Ioannides, C. (1997). Fractionation of green tea extracts: correlation of antimutagenic effect with flavanol content. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 75, 453-462.
- Caffin, N., D'Arcy, B., Yao, L. and Rintoul, G. (2004). *Developing an index of quality for Australian tea*. RIRDC Publ. No. 04/033. Queensland-Australia: Australian Government Rural Industries Research and Development Corporation.
- Canadanovic-Brunet, J.M., Djilas, S.M. and Cetkovic, G.S. (2005). Free-radical scavenging activity of wormwood (*Artemisia absinthium*) extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85, 265-272.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y. and Chew, Y.L. (2006). Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. *Food Chemistry* (in press).
- 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.Y. and Chan, P.T. (1996). Antioxidative activity of green tea catechins in canola oil. *Chemistry and Physics of Lipids* 82, 163-172.

- 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.
- Cheung, L.M. and Cheung, P.C.K. (2005). Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. *Food Chemistry* 89, 403-409.
- 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., Bloxside, J.P. and Mitchell, L.A. (2000). Hippuric acid as a major excretion product associated with black tea consumption. *Xenobiotica* 30, 317-326.
- Copeland, E.L., Clifford, M.N. and Williams, C.M. (1998). Preparation of (-)-epigallocatechin gallate from commercial green tea by caffeine precipitation and solvent partition. *Food Chemistry* 61, 81-87.
- Duan, X., Zhang, W., Li, X. and Wang, B. (2006). Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry* 95, 37-43.
- Dupont, S., Caffin, N., Bhandari, B. and Dykes, G.A., 2006. In vitro antibacterial activity of Australian native herb extracts against food-related bacteria. *Food Control* 17, 929-932.
- Farhoosh, R. Golmovahhed, G.A. and Khodaparast, M.H.H. (2007). Antioxidant activity of various extracts of old tea leaves and black tea wastes (*Camellia sinensis L.*). *Food Chemistry* 100, 231-236.
- Gramza, A. and Korczak, J. (2005). Tea constituents (*Camellia sinensis L.*) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Science & Technology* 16, 351-358.
- 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.
- He, Q., Lv, Y. and Yao, K., 2007. Effects of tea polyphenols on the activities of α -amylase, pepsin, trypsin, and lipase, *Food Chemistry* 101, 1178-1182.
- Jayaprakasha, G.K., Selvi, T. and Sakariah, K.K. (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International* 36, 117-122.
- Katalinic, V., Milos, M., Modun, D., Music, I. and Boban, M. (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chemistry* 80, 593-600.

- 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.
- Larger, P.J., Jones, A.D. and Dacombe, C. (1998). Separation of tea polyphenols using micellar electrokinetic chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A* 799, 309-320.
- Leong, L.P. and Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry* 76, 69-75.
- Lin, Y., Juan, I., Chen, Y., Liang, Y. and Lin, J. (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.
- Luximon-Ramma, A., Bahorun, 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.
- 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.
- Navas, P.B., Carrasquero-Durán, A. and Flores, I. (2005). 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* 40, 1-5.
- Negi, P.S., Chauhan, A.S., Sadia, G.A., Rohinishree, Y.S. and Ramteke, R.S. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed extracts. *Food Chemistry* 92, 119-124.
- Nissen, L.R., Byrne, D.V., Bertelsen, G. and Skibsted, L.H. (2004). The antioxidative activity of plant extracts in cooked pork patties as evaluated by descriptive sensory profiling and chemical analysis. *Meat Science* 68, 485-495.
- 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.
- 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.

- Özkan, G., Sagdic, O., Baydar, N.G. and Karamahmutoglu, Z., 2004. Antibacterial activities and total phenolic contents of grape pomace extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84, 807-1811.
- Perva-Uzunalic, A., Skerget, M., Knez, Z., 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.
- Pinelo, M., Manzocco, L., Nunez, M.J. and Nicoli, M.C. (2004). Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. *Food Chemistry* 88, 201-207.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J. and Nunez, M. J. (2004). Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry* 85, 267-273.
- Row, K.H. and Jin Y. (2005). Recovery of catechin compounds from Korean tea by solvent extraction. *Bioresource Technology* 97, 790-793.
- Siddhuraju, P. (2006). The antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of phenolics of raw and dry heated moth bean (*Vigna aconitifolia*) (Jacq.) Marechal seed extracts. *Food Chemistry* 99, 149-157.
- 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. (887p). New York.
- Su, Y.L., Leung, L.K., Huang, Y. and Chen, Z. (2003). Stability of tea theaflavins and catechins. *Food Chemistry* 83, 189-195.
- Sun, T. and Ho, C. (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry* 90, 743-749.
- 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 & Food Research* 49, 52-60.
- Tang, S., Kerry, J., Sheehan, D., Buckley, D.J. and Morrissey, P.A. (2001). Antioxidative effects of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. *Food Research International* 34, 651-657.
- Termentzi, A., Kefalas, P. and Kokkalou, E. (2005). Antioxidant activities of various extracts and fractions of *Sorbus domestica* fruits at different maturity stages. *Food Chemistry* 98, 599-608.

- Turkmen, N. and Velioglu, Y.S. (2006). Variables affecting polyphenols in fresh and processed tea leaves. *Food Reviews International* (submitted).
- Wach, A., Pyrzyńska, K. and Biesaga, M. (2007). Quercetin content in some food and herbal samples. *Food Chemistry* 100, 699-704.
- Wang, H., Provan, G .J. and Helliwell, K. (2000). Tea flavonoids: their functions, utilization and analysis. *Trends in Food Science and Technology* 11, 152-160.
- Wheeler, D. and Wheeler, W. (2004). The medicinal chemistry of tea. *Drug Development Research* 61, 45-65.
- Wright, L.P., Mphangwe, N.I.K., 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.
- Wu, S., Yen, G., Wang, B., Chiu, C., Yen, W., Chang, L. and Duh, P., 2007. Antimutagenic and antimicrobial activities of pu-erh tea. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 40, 506-512.
- 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*, *Camellia assamica* var. *kucha* by HPLC. *Food Chemistry* 100, 1132-1136.
- Yao, L., Jiang, Y., Datta, N., Singanusong, R., Liu, X., Duan, J., et al. (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.
- Yen, G. C. and Duh, P. D. (1994). Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42, 629-632.
- Yilmaz, Y. (2006). Novel uses of catechins in foods. *Trends in Food Science & Technology* 17, 64-71.
- Yu, J., Ahmedna, M., Goktepe, I. and Dai, J. (2006). Peanut skin procyanidins: Composition and antioxidant activities as affected by processing. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 364-371.
- 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.

Zhu, Y. Huang, H. and Tu, Y. (2005). A review of recent studies in China on the possible beneficial health 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.

6. EKLER

a) Projede yalnızca 1 adet HPLC (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) pompası satın alınmıştır. Bu aygıt için 4.720 YTL ödenmiştir. Demirbaş no henüz belli değildir (mükerrer).

b) Yukarıda belirtilen bu aygıt elde mevcut bulunan bir sistemin içerisindeki parçalardan biri olup, yalnız başına kullanılabilirliği yoktur. Halen sisteme takılı olarak kullanılmaktadır.

c) Yoktur.

d) Yoktur.

e) Bir makale yazım aşamasındadır.