

**FARKLI HASAT DÖNEMİNDE TOPLANMIŞ TAZE ÇAY
YAPRAĞININ BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİNİN
OPTİMİZE EDİLEREK BELİRLENMESİ VE *İN-VİTRO*
BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hind CHEBBI



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI HASAT DÖNEMİNDE TOPLANMIŞ TAZE ÇAY YAPRAĞININ
BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİNİN OPTİMİZE EDİLEREK BELİRLENMESİ VE
İN-VİTRO BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hind CHEBBI
0000-0001-7422-4304

Doç. Dr. Nihal TÜRKMEN EROL
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2022
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Hind CHEBBI tarafından hazırlanan “FARKLI HASAT DÖNEMİNDE TOPLANMIŞ TAZE ÇAY YAPRAĞININ BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİNİN OPTİMİZE EDİLEREK BELİRLENMESİ VE *İN-VİTRO* BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Nihal TÜRKMEN EROL

Başkan : Prof. Dr. Sedat VELİOĞLU
0000-0002-3281-6229
Ankara Üniversitesi,
Mühendislik Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

İmza

Üye : Prof. Dr. Ömer Utku ÇOPUR
0000-0002-1951-7937
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

İmza

Üye : Doç. Dr. Nihal TÜRKMEN EROL
0000-0002-5682-0177
Bursa Uludağ Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN
Enstitü Müdürü

../../....

B.U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

26/05/2022

Hind CHEBBI

TEZ YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezin/raporun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma izni Bursa Uludağ Üniversitesi'ne aittir. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet hakları ile tezin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları tarafımıza ait olacaktır. Tezde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığını ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederiz.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında, yönerge tarafından belirtilen kısıtlamalar olmadığı takdirde tezin YÖK Ulusal Tez Merkezi / B.U.Ü. Kütüphanesi Açık Erişim Sistemi ve üye olunan diğer veri tabanlarının (Proquest veri tabanı gibi) erişimine açılması uygundur.

Nihal TÜRKMEN EROL
26/05/2022

Hind CHEBBI
26/05/2022

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARKLI HASAT DÖNEMİNDE TOPLANMIŞ TAZE ÇAY YAPRAĞININ BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİNİN OPTİMİZE EDİLEREK BELİRLENMESİ VE *İN- VİTRO* BİYOERİŞİLEBİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Hind CHEBBI

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Nihal TÜRKMEN EROL

Bu çalışmada, farklı hasat yılı ve döneminin taze çay yaprağının toplam polifenol (TP), radikal tutma aktivitesi (RTA), toplam flavonoid (TF) ve askorbik asit (AA) içeriğine etkisi incelenmiştir. Taze çay yaprağından polifenollerin ekstraksiyonu yanıt yüzey yöntemi (RSM) kullanılarak optimize edilmiştir. Optimizasyon sonucunda en yüksek TP değeri elde edilebilmesi için optimum koşullar olarak, ürün/solvent (Ü/S) oranının 1/60,86, etanol konsantrasyonunun %84,65 ve ekstraksiyon süresinin 50 dak olması gerektiği belirlenmiştir. Çay yapraklarından polifenollerin optimum koşullarda yapılan ekstraksiyonu sonucunda, 2020 yılının Eylül ayında toplanmış yaprakların TP, RTA ve TF içeriği daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, 2020 yılının Eylül ayında toplanmış yaprakların bireysel fenolik bileşikler yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile analiz edilmiş olup, en fazla epigallocateşin gallat (EGCG) (57,52 mg/g kuru madde (KM)) tespit edilmiştir. Aynı örneklerin *in-vitro* sindirim sonrasında, TP ve RTA değerleri, en fazla intestinal aşamada olmak üzere önemli oranda azalmıştır ($p<0,05$). Bununla birlikte, polifenollerin biyoerişilebilirliği %48,98 olarak belirlenmiştir. İki yıl farklı dönemlerde toplanmış yaprakların HPLC ile AA analizi sonucunda, en yüksek AA içeriği, 2019 yılı için Mayıs dönemi yaprağında (41,92 mg/100 g KM), 2020 yılı için de Temmuz dönemi yaprağında (38,55 mg/100 g KM) gözlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca, örneklerin TP içeriği ve RTA için kullanılan spektrofotometrik yöntemler, bu yöntemlerin literatürde en çok kullanılan modifikasyonları ile karşılaştırılmıştır. TP ve RTA açısından, yöntemler arasında önemli farklılıklar saptanmıştır. Spektrofotometrik olarak elde edilen TP sonuçları, HPLC ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmış ve uygulanan beş farklı yöntemden sadece birinin (FCR yöntemi 1) en iyi uyumu sağladığı ve bu nedenle en fazla güvenilirliğe sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyoaktif bileşik, biyoerişilebilirlik, hasat dönemi, HPLC, RSM, taze çay yaprağı

2022, ix + 78 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

DETERMINATION OF THE BIOACTIVE COMPOUNDS OF FRESH TEA LEAF PLUCKED AT DIFFERENT HARVEST PERIODS BY OPTIMIZATION AND INVESTIGATION OF BIOACCESSIBILITY OF POLYPHENOLS

Hind CHEBBI

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nihal TÜRKMEN EROL

In this study, the effect of different plucking years and periods on total polyphenol (TP), radical scavenging activity (RSA), total flavonoid (TF) and ascorbic acid (AA) of fresh tea leaves extracts were evaluated. The extraction of polyphenols from fresh tea leaves was optimized by using the response surface methodology (RSM). The results showed that in order to obtain the highest TP, the optimal extraction conditions were found to be material-to-solvent (M/S) ratio of 1/60,86, ethanol concentration of 84,65% and extraction time of 50 min. As a result of the extraction of polyphenols from tea leaves under the optimal conditions, the leaves plucked in September 2020 had the highest TP, RSA and AA. In addition, the analysis of individual phenolic compounds of tea leaves was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) and the result indicated that the leaves plucked in September 2020 contained the highest amount of EGCG content (57,52 mg/g dry weight (DW)). After the *in-vitro* digestion of the same samples, TP and RSA values showed a significant decrease, mostly at the intestinal phase ($p<0,05$). However, the bioaccessibility of polyphenols was determined as 48,98%. The AA identification and quantification of tea leaves from different periods of two years were performed by HPLC. The obtained results revealed that leaves plucked in May for 2019 (38,55 mg/100 g DW) and those in September for 2020 (41,92 mg/100 g DW) had the highest AA contents. Additionally, in this study, the spectrophotometric methods used for TP content and RSA of the samples were compared to the modifications of these methods which are most widely used in the literature and significant differences were found between the methods regarding TP and RSA. The TP results obtained spectrophotometrically were compared with the results obtained by HPLC and it was concluded that only one of the five different methods applied (FCR method 1) provided the best fit and therefore had the most reliability.

Key words: Bioaccessibility, bioactive compound, fresh tea leaf, HPLC, plucking period, RSM

2022, ix + 78 pages.

TEŞEKKÜR

Eğitimim boyunca kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren ve karşılaştığım her zorlukta daima yanımda olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Nihal TÜRKMEN EROL'a, yardımlarını, ilgisini ve hoşgörüsünü esirgemeyen, her durumda destekçim olan sayın Doç. Dr. Bige İNCEDAYI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Maddi ve manevi desteklerini benden esirgemedi, hayatımın her döneminde yanımda olan sevgili babam Abdelaziz CHEBBI'ye, annem Najoua MIADI'ye, kardeşim Mohamed CHEBBI'ye ve ablam Islem CHEBBI'ye teşekkürlerimi sunarım.

Hind CHEBBI
26/05/2022

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Çay Bitkisi ve Botanik Özellikleri	4
2.2. Çay Çeşitleri.....	6
2.2.1. Yeşil çay.....	7
2.2.2. Oolong çay	8
2.2.3. Siyah çay	9
2.3. Taze Çay Yaprağının Bileşimi	10
2.3.1. Çay yaprağının genel bileşimi.....	10
2.3.2. Çay yaprağının fenolik madde bileşimi	12
2.3.3. Çay yaprağının fenolik madde bileşimini etkileyen faktörler.....	15
2.4. Taze Çay Yaprağındaki Fenolik Bileşiklerin Radikal Tutma Aktivitesi (RTA).	19
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	22
3.1. Materyal	22
3.1.1. Araştırma materyali.....	22
3.1.2. Ekipman, kimyasal madde ve diğer malzemeler.....	22
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. DeneySEL tasarım	23
3.2.2. Polifenol ekstraksiyonu	26
3.2.3. Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam polifenol (TP) tayini.....	26
3.2.4. Toplam flavonoid (TF) tayini.....	28
3.2.5. DPPH ile radikal tutma aktivitesi (RTA) tayini.....	28
3.2.6. HPLC ile fenolik bileşiklerin belirlenmesi	30
3.2.7. <i>In-vitro</i> gastrointestinal sindirim (biyoerişilebilirlik) tayini	32
3.2.8. Askorbik asit (AA) tayini.....	33
3.2.9. İstatistiksel analiz	34
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	36
4.1. Çay Yaprağından Polifenollerin Ekstraksiyonuna ait Model Analizi.....	36
4.2. Ekstraksiyon Parametrelerinin Çay Yaprağı Ekstraktının TP ve RTA Üzerine Etkisi.....	36
4.3. Optimizasyon Koşulları	43
4.4. Farklı Dönemlerde Toplanmış Taze Çay Yaprağının TP, RTA, TF ve AA Miktarları.....	44
4.5. Taze Çay Yaprağının Bireysel Fenolik Bileşikleri	50
4.6. Taze Çay Yaprağının TP ve RTA'nın Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemlerin Farklı Modifikasyonlarının Karşılaştırılması.....	53
4.7. <i>In-vitro</i> Sindirimin Taze Çay Yaprağının TP ve RTA Üzerine Etkisi.....	55
5. SONUÇ.....	58
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	78

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

w/v	Ağırlık/hacim
Cu	Bakır
Zn	Çinko
dak	Dakika
Fe	Demir
U/ml	Enzim aktivitesi
g	Gram
v/v	Hacim/hacim
Hz	Hertz
İ	İnhibisyon
Kons.	Konsantrasyon
L	Litre
m	Metre
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromol
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimol
M	Molar
USP U/mg	Pankreatin aktivitesi
ppm	Parts per million
s	Saniye
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
V	Volt
%	Yüzde

Kısaltmalar

Açıklama

AlCl ₃	Alüminyum klorür
AK	Antioksidan kapasite
AA	Askorbik asit
AAE	Askorbik asit eşdeğeri
BBDD	Box-Behnken deneme deseni
BHA	Bütillendirilmiş hidroksianisol
BHT	Bütillendirilmiş hidroksitoluen
DPPH	2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl
DW	Dry weight
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
EGC	Epigallokateşin
EGCG	Epigallokateşin gallat
EC	Epikateşin

ECG	Epikateşin gallat
FCR	Folin-ciocalteu reaktifi
GA	Gallik asit
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GC	Gallokateşin
GCG	Gallokateşin gallat
HCl	Hidroklorik asit
Ca	Kalsiyum
CaCl ₂	Kalsiyum klorür dihidrat
K3RG	Kamferol-3-ramnoglukozid
C	Kateşin
CE	Kateşin eşdeğeri
Q3G	Kuersetin-3-glukozid
Q3RG	Kuersetin-3-ramnoglukozid (rutin)
KA	Kuru ağırlık
KM	Kuru madde
LOF	Lack of fit
Mg	Magnezyum
Mn	Manganez
MFA	Metafosforik asit
PPO	Polifenol oksidaz
RTA	Radikal tutma aktivitesi
RNS	Reaktif azot türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
R ²	Regresyon katsayısı
RE	Rutin eşdeğeri
T-f	Serbest teaflavin
NaOH	Sodyum hidroksit
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
T33'DG	Teaflavin-3-3'-digallat
T3G	Teaflavin-3-gallat
T3'G	Teaflavin-3'-gallat
TF	Toplam flavonoid
TP	Toplam polifenol
TE	Trolox eşdeğeri
Ü/S	Ürün/solvent
RSM	Yanıt-yüzey metodu
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. <i>Camellia sinensis</i> bitkisi	6
Şekil 2.2. Farklı çay çeşitlerinin üretim aşamaları	7
Şekil 2.3. Teaflavinlerin oluşumu	10
Şekil 2.4. Kateşinlerin kimyasal yapısı	13
Şekil 2.5. Flavonolların kimyasal yapısı	14
Şekil 2.6. Hidroksibenzoik asitler (a) ve hidroksisinnamik asitlerin (b) kimyasal yapısı	15
Şekil 3.1. Öğütülmüş kuru çay yaprağı	22
Şekil 4.1. Çay yaprağı ekstraktının TP (A) ve RTA (B) için tahmini ve deneysel değerlerin karşılaştırılması	38
Şekil 4.2. Ü/S oranı, etanol konsantrasyonu ve süreye bağlı olarak TP deki değişimi gösteren yanıt yüzey (a, c ve e) ve iz düşüm (b, d ve f) grafikleri (Ü/S oranı 1/50 (e ve f), etanol konsantrasyonu %80 (c ve d) ve ekstraksiyon süresi 35 dak (a ve b) olarak sabitlenmiştir)	42
Şekil 4.3. Ü/S oranı, etanol konsantrasyonu ve süreye bağlı olarak RTA deki değişimi gösteren yanıt yüzey (a, c ve e) ve iz düşüm (b, d ve f) grafikleri (Ü/S oranı 1/50 (e ve f), etanol konsantrasyonu %80 (c ve d) ve ekstraksiyon süresi 35 dak (a ve b) olarak sabitlenmiştir)	43
Şekil 4.4. Farklı yıl ve hasat döneminde toplanmış taze çay yaprağının TP (A), RTA (B), AA (C) ve TF (D) grafikleri	45
Şekil 4.5. Çay yaprağındaki askorbik aside ait HPLC kromatogramı	49
Şekil 4.6. Çay yaprağının fenolik bileşiklerine ait HPLC kromatogramları. Pikler: 1, GA; 2, EGC; 3, EGCG; 4, ECG; 5, Q3RG (rutin); 6, Q3G; 7, K3RG	51
Şekil 4.7. 2020 yılı Eylül ayında toplanmış taze çay yaprağı ile yeşil çayların bireysel fenolik bileşik miktarlarının karşılaştırılması ..	52
Şekil 4.8. Farklı FCR (A) ve DPPH (B) yöntemlerinin karşılaştırılması	54
Şekil 4.9. Taze çay yaprağının <i>in-vitro</i> sindirimine ait TP (A), RTA (B) ve TP biyoerişilebilirliği (C) grafikleri	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge	2.1. Çay bitkisinin botanik sınıflandırılması.....	5
Çizelge	2.2. Farklı çayların biyoaktif bileşikleri.....	8
Çizelge	2.3. Çay yaprağının kimyasal bileşimi (mg/g).....	11
Çizelge	3.1. Polifenol ekstraksiyonunda kullanılan üç faktörlü Box-Behnken deneme deseni.....	25
Çizelge	3.2. Box-Behnken bağımsız değişkenler (faktörlerin) düzeyleri.....	26
Çizelge	3.3. TP yöntemlerine ait regresyon eşitlikleri.....	27
Çizelge	3.4. Fenolik bileşiklerin analizi için HPLC çalışma koşulları ve elusyon programı.....	31
Çizelge	3.5. Sindirim sıvılarının hazırlanması.....	33
Çizelge	3.6. AA analizi için HPLC çalışma koşulları ve elusyon programı....	34
Çizelge	4.1. Box-Behnken deney tasarımına göre elde edilen TP ve RTA değerleri.....	37
Çizelge	4.2. Etanol ekstraktlarının TP ve RTA için Yanıt-Yüzey Metoduna ait varyans analizi.....	38
Çizelge	4.2. Etanol ekstraktlarının TP ve RTA için Yanıt-Yüzey Metoduna ait varyans analizi (devam)	39
Çizelge	4.3. 2019 ve 2020 yılında farklı dönemlerde toplanmış taze çay yaprağının TP (mg GAE/g KM), RTA (g AAE/ 100 g KM), AA (mg/100 g KM) ve TF (mg RE/g KM) değerleri.....	44
Çizelge	4.4. 2020 yılının Eylül ayında toplanmış taze çay yaprağı ve yeşil çayların bireysel fenolik bileşik miktarları (mg/g KM)	52
Çizelge	4.5. 2020 yılının Eylül ayında toplanmış taze çay yaprağının TP ve RTA'sının belirlenmesinde farklı yöntemlerin karşılaştırılması..	54
Çizelge	4.6. Taze çay yaprağının TP (mg GAE/g KM), RTA (g AAE/ 100g KM) ve TP biyoerişilebilirliği (%).....	55

1. GİRİŞ

Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin (ROS) insan vücuduna verdiği zararlara karşı koruyucu etkiye sahip bileşiklerdir. Son zamanlarda doğal antioksidanlar, güvenli olması ve toksisite problemlerine yol açmaması nedeniyle sentetik antioksidanlara göre daha fazla ilgi görmektedir. Bitkilerde bulunan biyoaktif bileşiklerden fenolik maddeler, en önemli antioksidanlar olarak düşünülmektedir (Z. M. Chen & Lin, 2015). Çay çok önemli bir fenolik madde kaynağıdır ve çayda bulunan polifenollerin Bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA), Bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT) ve DL-alfa-tokoferol gibi sentetik antioksidanlardan daha kuvvetli antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir. Yapılan çalışmalar çayın aynı zamanda, önemli biyoaktif bileşiklerden olan askorbik asidi (AA) de içerdiğini göstermiştir (Jakubczyk vd., 2020). AA, çayda bulunan fenolik bileşiklerden rutin ile sinerjik etkisinden dolayı oksidatif strese karşı vücudu koruyucu ve dolaşım sistemini destekleyici etkiye sahiptir (Jakubczyk vd., 2020; Kochman vd., 2020).

Günümüz tüketicilerinin tazesine yakın, daha doğal, daha az yapay katkı içeren, güvenilirliği yüksek ve raf ömrü uzun gıda tüketmek istemesi, gıda üreticilerini doğal ya da daha az işlem gerektiren muhafaza yöntemlerini kullanmaya yöneltmiştir. Yapay antioksidanların ve antimikrobiyallerin kullanımı, immün sistemi baskılaması ve alerjik reaksiyonlara yol açması gibi yan etkilerinden dolayı giderek azalmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar (Albuquerque vd., 2020; Martillanes vd., 2017; Shahidi & Ambigaipalan, 2015; Tungmunthum vd., 2018; Yu vd., 2021) birçok bitkisel materyalin fenolik bileşik gibi faydalı bileşenleri fazla miktarda içerdiğini ve bunların antioksidan, antimutagenik, antikarsinogenik ve antibakteriyal aktivite gibi çok sayıda farmakolojik özelliklerinin olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle gıdaların raf ömrünü uzatmak ve kalitesini iyileştirmek amacıyla doğal bitki ekstraktlarının sentetik katkı maddelerine alternatif olarak kullanımı gitgide artış göstermektedir. Çay yaprağının çok önemli bir polifenol kaynağı olması nedeniyle, özellikle yeşil çaydan elde edilen polifenollerin gıdalarda doğrudan ya da ekstrakt olarak kullanılabileceği birçok çalışma ile gösterilmiştir (Gramza-Michałowska vd., 2016; C. W. Han vd., 2020; Rashidinejad vd., 2016).

Biyolojik materyallerin toplam polifenol analizi için çoğunlukla spektrofotometrik Folin-ciocalteu reaktifi (FCR) yöntemi kullanılmaktadır. Farklı laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan bu yöntemin detayları önemli ölçüde farklılık göstermektedir ve bu durumun, benzer araştırma sonuçlarının karşılaştırılması durumunda sonuçların güvenilirliği konusunda şüphe duyulmasına neden olacağı belirtilmektedir (Cicco vd., 2009). Polifenollerin radikal tutma aktivitesini (RTA) analiz etmek için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri de 2, 2, diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) yöntemidir. Bu yöntem, gıdaların antioksidan aktivitesini ölçmek amacıyla kullanılan en stabil serbest radikallerden biri olan DPPH'nin indirgenmesine dayanan hızlı, kolay ve ucuz bir yöntemdir (Ahmad vd., 2018). Antioksidan kapasitenin farklı standart çözeltiler (AA, trolox, BHA ve BHT gibi) ve farklı eşitlikler kullanılarak hesaplanması (Marinova & Batchvarov, 2011) da yöntemin doğruluğunu etkileyen faktörlerdendir.

Çayın polifenol içeriği, çeşit, mevsim, iklim, olgunlaşma derecesi, işleme yöntemi gibi faktörlere bağlı olarak farklılık göstermektedir (Aherne & O'Brien, 2002). Örneğin; fermentasyon, çay yaprağının başlıca polifenollerini olan kateşinlerin miktarında azalmaya neden olur. Bu yüzden yeşil çay, oolong ve siyah çaydan oldukça fazla miktarda kateşin içerir. Diğer taraftan, yeşil çay üretimi için taze toplanmış çay yapraklarına kateşinlerin oksidasyonundan sorumlu enzimleri inaktif hale getirmek için buhar verme işlemi uygulanır (Donlao & Ogawa, 2018). Ancak, bu uygulama dahi, yüksek sıcaklıklarda stabilitelerinin düşük olması nedeniyle kateşinlerde parçalanmaya neden olur (Somsong vd., 2020). Dolayısıyla, polifenol kaynağı olarak yeşil çay yerine, doğrudan taze çay yaprağını kullanmak çok daha anlamlıdır. Literatürde, farklı çay çeşitlerinin, özellikle de yeşil çayın polifenollerini üzerine çok fazla sayıda çalışma (Y. Chen vd., 2010; Dai vd., 2015; Gramza-Michałowska vd., 2016; C. W. Han vd., 2020; Rashidinejad vd., 2016) mevcut olmasına rağmen, taze çay yaprağı polifenollerine yönelik sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Daha da ötesi, taze çay yaprağı ile ilgili olarak, polifenollerin ekstraksiyonunun optimizasyonu, polifenollerin biyoerişilebilirliği, TP ve RTA'yı belirlemek için kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması ve biyoaktif bileşenlerinin mevsimsel değişimine ilişkin kapsamlı bir çalışmaya da rastlanmamıştır. Yapılan bu araştırma ile 2 farklı yıl (2019 ve 2020) içinde, üç farklı dönemde (Mayıs, Temmuz ve Eylül) hasat edilerek gölgede kurutulmuş taze çay yaprağından solvent (etil alkol) ekstraksiyonu yapılmış olup, ekstraksiyon

koşulları yanıt yüzey yöntemi (RSM) ile Box-Behnken Deseni (BBDD) kullanılarak optimize edilmiştir. Elde edilen ekstraktın toplam polifenol (TP), toplam flavonoid (TF) ve AA içerikleri ile RTA'sı tespit edilerek hasat döneminin söz konusu parametreler üzerine etkisi belirlenmiştir. En fazla TP ve RTA'nın tespit edildiği hasat dönemine ait çay yaprağına farklı FCR ve DPPH yöntemleri de uygulanarak yöntemler arasındaki farklılıklar belirlenmiştir. Aynı örneğin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile bireysel fenolik bileşiklerinin analizi gerçekleştirilmiş olup, elde edilen sonuçlar farklı spektrofotometrik FCR yöntemlerine ait sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Ayrıca söz konusu örneğin polifenollerinin *in-vitro* gastrointestinal sindiriminin (biyoerişilebilirlik) de belirlenmesiyle bu konudaki literatür eksikliğinin giderilmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Çay Bitkisi ve Botanik Özellikleri

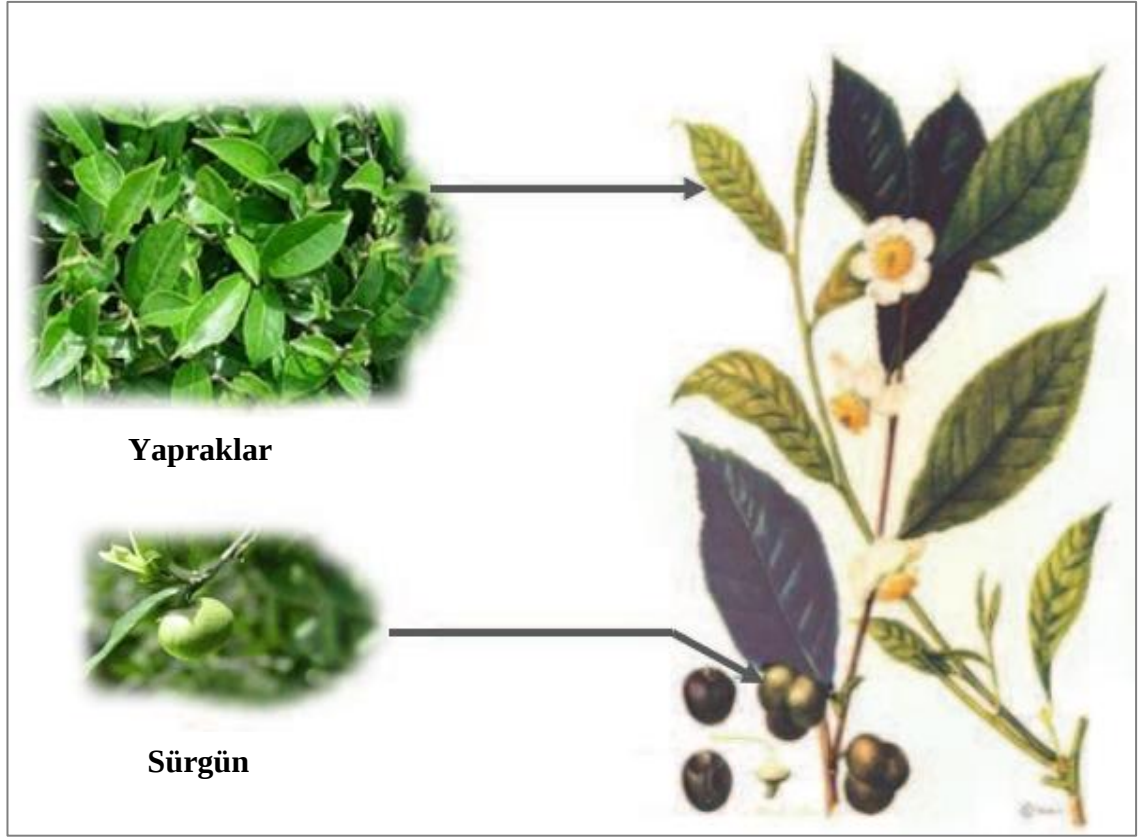
Çay tadı, aroması ve sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı dünyadaki en popüler içeceklerden biridir (Chaudhuri vd., 2000; Khokhar & Magnusdottir, 2002) ve dünyada ve Türkiye’de sudan sonra en çok tüketilen ikinci içecektir (Fisunoğlu & Besler, 2008; Sari, 2010). Çay, *Theaceae* familyasından çiçekli bir bitki cinsi olan *Camellia sinensis*'e ait yaprak ve sürgünler kullanılarak üretilmektedir (Murray & Nowicki, 2020). Dünyada Çin, Sri Lanka, Japonya ve Tayvan başta olmak üzere, yaklaşık olarak 50 ülkede çay yetiştiriciliği yapılmaktadır (Cooper vd., 2005; Wambulwa vd., 2021). Türkiye’de ise çay üretimi Gürcistan sınırı batısından Fatsa’ya kadar olan Doğu Karadeniz Bölgesinde gerçekleştirilmektedir (Polat vd., 2020; Sari, 2010). Dünya çay üretimi 2020 yılında 6,29 milyon tona ulaşmıştır. Başlıca çay üreten ve ihraç eden ülkeler: Hindistan, Çin, Sri Lanka, Arjantin ve Kenya’dır. Bazı ülkeler siyah çay üretiminde daha ön plandayken, bazı ülkelerde ise tercihen yeşil çay üretilmektedir (Intergovernmental Group on Tea, 2022).

Çay, yılın dört mevsimi yağış alan ve nemli iklim bölgelerinde yetişen kısa boylu bir bitkidir (Alikılıç, 2016). Çizelge 2.1’de çay bitkisinin botanik sınıflandırılması gösterilmektedir. *Camellia sinensis* bitkisinin birkaç çeşidi mevcut olup, ticari çaylar esas olarak iki çeşitten üretilmektedir. Birincisi, *Camellia sinensis* var. *sinensis* veya Çin çay ağacıdır. Çin ve Japonya’da yetiştirilmektedir. Koyu yeşil renkli, küçük, sert, donuk yapraklara sahiptir. *Camellia sinensis* var. *sinensis* daha çok yeşil çay üretiminde kullanılmaktadır. İkinci çeşit *Camellia sinensis* var. *assamica* veya Assam çay ağacıdır. Hindistan, Sri Lanka, Endonezya ve Afrika’da yetiştirilmektedir. Bu tür ise, yumuşak, büyük, parlak, açık yeşil yapraklara sahip olup siyah çay üretimi için kullanılmaktadır (Hilal, 2017; Preedy, 2012; Rawal vd., 2021; Sirisa-Ard vd., 2017; Unachukwu vd., 2010).

Çizelge 2.1. Çay bitkisinin botanik sınıflandırılması (Agarwal vd., 2017)

Üst alem	Plantae
Alem	Tracheobionta
Bölüm	Spermatophyte
Altbölüm	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Altsınıf	Dilleniidea
Takım	Theales
Familiya	Theaceae
Cins	Camellia L.
Tür	<i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Kuntze, syn. <i>Thea sinensis</i> L.

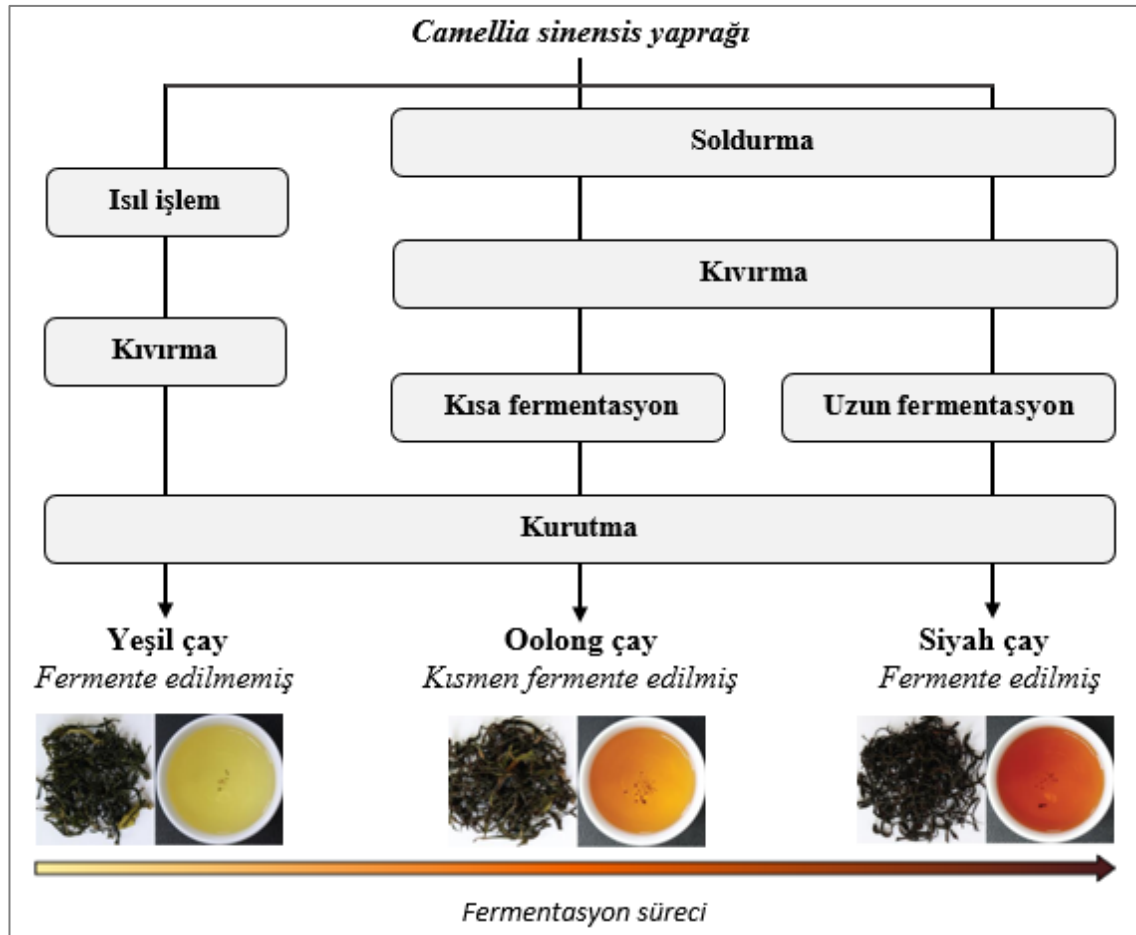
Çay bitkisi, yaprakları dökülmeyen dallı bir çalıdır (Q. Zhang vd., 2020). Özel amaçlarla yetiştirildiğinde, yapraklarının toplanmasını ve sürgün oluşumunu kolaylaştırmak için yaklaşık 1,20-1,50 metre yükseklikte tutulmaktadır (Bandara, 2012). Ancak bitki, doğal ortamda yetiştiğinde 5 ile 15 m yüksekliğe ulaşabilmektedir (Mahmood vd., 2010). Yuvarlak, kahverengi ve yağlı 1-4 adet tohum içermektedir (Shrivastava vd., 2018; Yurteri vd., 2019). *Camellia sinensis* bitkisinin yaprakları tek sıralı ve parlak koyu yeşil renkte olup, 5-14 cm uzunluğunda ve 2-5 cm genişliğindedir (Agarwal vd., 2017; Shrivastava vd., 2018). Genç yapraklar yaprağını dökmeyen, yumuşak ve tüylüdür. Yaşlı yapraklar ise tüysüz olup uzun, eliptik bir şekle sahiptir. En iyi çaylar dalların ucundaki genç yapraklardan elde edilmektedir (Singh vd., 2014). Bu nedenle, genellikle genç sürgünlerin ucunda gelişen tepe sürgünü ile bu sürgünün altındaki birinci ve ikinci yapraklar işlenmek üzere hasat edilmektedir (Sari, 2010) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *Camellia sinensis* bitkisi (Namita vd., 2012; Preedy, 2012)

2.2. Çay Çeşitleri

Ticari çaylar, üretim yöntemine göre genellikle fermente olmayan yeşil çay, kısmen ya da yarı fermente oolong çay ve tamamen fermente siyah çay olmak üzere 3 ana gruba ayrılmaktadır (Elmas & Gezer, 2019; Wheeler & Wheeler, 2004) (Şekil 2.2). Dünya genelinde, en fazla siyah çay (%76-78) üretilirken, bunu yeşil çay (%20-22) ve oolong çay (%2) takip etmektedir (Vastrad vd., 2021). Doğu ülkelerinde genellikle yeşil ve oolong çaylar daha çok tercih edilirken, Batı ülkelerinde siyah çay tercih edilmektedir (J. K. Lin & Lin-Shiau, 2006; H. Zhang vd., 2019).



Şekil 2.2. Farklı çay çeşitlerinin üretim aşamaları (Salman & Özdemir, 2018; Y. Wang vd., 2019)

2.2.1. Yeşil çay

Yeşil çay, bitkinin genç sürgünlerinden tepe sürgünü ve onu takip eden iki yaprak esas alınarak hasat edilen yapraklar kullanılarak, diğer çay çeşitlerine uygulanan kıvrırma, soldurma, parçalama işlemlerine tabi tutulmadan üretilen, okside olmamış bir çay çeşididir. Fermentasyon işlemi polifenol oksidaz nedeniyle kateşin miktarında önemli oranda azalmaya neden olduğu için yeşil çay, oolong ve siyah çaydan daha fazla kateşin içermektedir (Cabrera vd., 2003; Jiang vd., 2019) (Çizelge 2.2). Yeşil çay yapraklarında yaklaşık olarak %30 polifenol bulunmaktadır. Yeşil çayda bulunan başlıca polifenoller, flavan-3-oller (kateşinler), flavonollar, flavonlar, proantosiyanidinler ve bunların türevlerini içeren flavonoidlerdir. Çay yaprağında en fazla bulunan fenolik bileşikler olan kateşinler, kateşin (C), gallokateşin (GC), epikateşin (EC), epigallokateşin (EGC), epikateşin gallat (ECG) ve epigallokateşin gallattır (EGCG). Bunlar, fermente olmamış

yeşil çay kuru ağırlığının %20-30'unu oluşturur (Jiang vd., 2019; Zderic & Zondervan, 2016). Çay yaprağında flavonoidlerin yanı sıra fenolik asitler ve bunların türevleri de bulunmaktadır (Belitz vd., 2009; Daglia vd., 2014). Ayrıca, yeşil çay yaprakları fazla miktarda kalsiyum (Ca), bakır (Cu), demir (Fe), magnezyum (Mg), mangan (Mn), çinko (Zn) gibi mineraller ve kafein gibi ksantin bileşiklerini içermektedir (Daglia vd., 2014; Lu vd., 2004).

Çizelge 2.2. Farklı çayların biyoaktif bileşikleri (Gonçalves Bortolini vd., 2021)

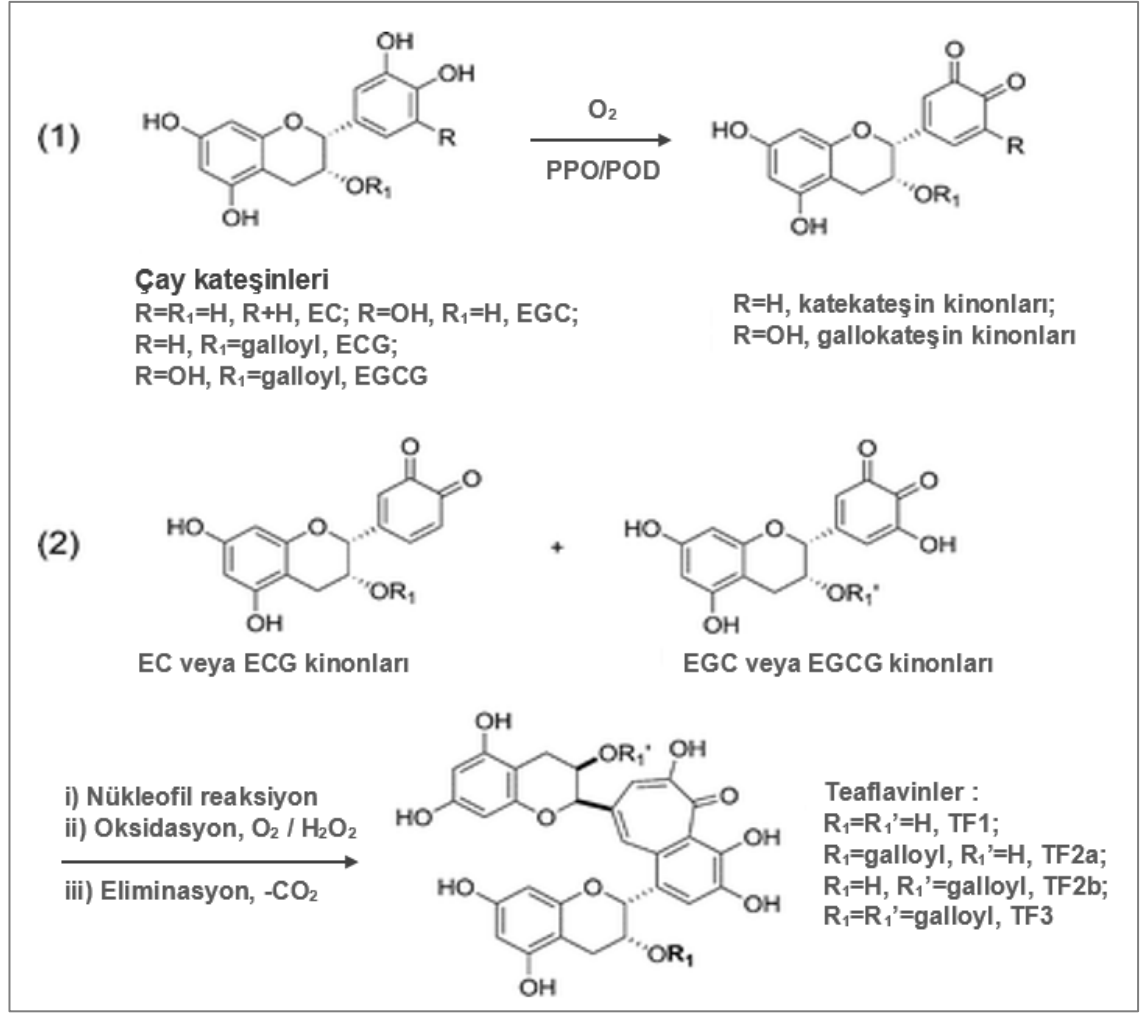
Bileşik (mg/g)	Çay çeşidi		
	Yeşil çay	Oolong çay	Siyah çay
EGCG	90–64-95,50	10,34–34,74	1,34–2,15
ECG	6,71–22,64	3,08–7,57	1,12–2,62
EGC	6,21–21,02	16,22–73,97	0,91
EC	3,18–14,21	2,45–9,19	0,45–1,33
C	1,13-6,42	0,85	0,33
Toplam kateşin	106,02-145,54	70,31-136,88	3,95–38,69
Gallik asit	0,64–2,97	0,29–3,05	2,21–6,37
Toplam flavonoid	1,16–29,9	15,07	6,36–62,10
Toplam fenolik	12,36–252,65	31,33–150,10	11,33–101,29
L-teanin	2,63–14,23	1,70–8,38	1,43–11,00
Teobromin	3,95–8,39	0,28	0,70–4,43
Kafein	2,64–42,20	12,36–31,66	4,05–39,55

2.2.2. Oolong çay

Dünya çay tüketiminin %2'sini temsil eden oolong çayı, kısmi fermentasyon ile üretilir ve işleme sırasında %10-70 oranında oksidasyona uğrar (Y. Chen vd., 2010). Oolong çayın bileşiminde, teasinensinler gibi fermentasyon işlemi sırasında oluşan dimerik ve oligomerik polifenoller bulunmaktadır. Oolong çayın polifenol profili yeşil veya siyah çayınkine benzer, ancak çay yaprakları kurutulmadan önce kısmi bir fermentasyon aşamasına tabi tutulduğu için yeşil çaydan daha düşük polifenol içerirken (Zuo vd., 2002), siyah çaydan daha fazla kateşin ve daha az polimerik polifenol içeriğine sahiptir (Sajilata vd., 2008; H. Zhang vd., 2019) (Çizelge 2.2).

2.2.3. Siyah ay

Dünya ay tüketiminin %78'ini oluşturan siyah çay, çay yapraklarının tam fermentasyona tabi tutulmasıyla elde edilmektedir (J. K. Lin & Lin-Shiau, 2006). Siyah ayın proses aşamaları hasat, soldurma, kıvırma, fermentasyon, kurutma ve sınıflandırmadan oluşmaktadır. Siyah ayın en önemli aşamalarından biri olan fermentasyon sonucunda, siyah çayın kendine has rengi ve aroması ortaya çıkmaktadır (Fisunoęlu & Besler, 2008; Henning vd., 2003; Łuczaj & Skrzydlewska, 2005). ay kateşinleri fermentasyon sırasında, polifenol oksidaz ile beraber peroksidaz gibi diğer enzimlerin katalize ettiği oksidasyon ve polimerizasyona uğramaktadır. Bunun sonucunda, çay yaprağında bulunan flavanol miktarı azalmaktadır. Ancak aya uygulanan oksidasyon işlemi ile flavanollardan, portakal-kırmızı renkli teaflavinler ve kimyasal olarak oldukça heterojen, kahverengimsi tearubijinler gibi sekonder polifenoller oluşmaktadır (Carloni vd., 2013; Jiang vd., 2019; Langley-Evans, 2000; Richelle vd., 2001; Tosun & Karadeniz, 2005; Yassin vd., 2015). Kateřinlerin oksidasyonu sonucu oluşan kinonların kondenzasyonu sonucu dört farklı teaflavin oluşmaktadır (şekil 2.3). Bunlar; serbest teaflavin (T-f), teaflavin-3-gallat (T3G), teaflavin-3'-gallat (T3'G) ve teaflavin-3-3'-digallatdır (T33'DG). Yapısı tam olarak ortaya konmuş olan teaflavinlerin miktarının çayda fazla olması, çayın duyuusal kalitesini arttırmaktadır. Tearubujinler, siyah aydaki toplam flavonoidlerin %50-60'ını oluştururken, teaflavinler %10'unu oluşturmaktadır (Abudureheman vd., 2022; Stangl vd., 2006; H. Zhang vd., 2019). Teaflavinler ve tearubijinler, siyah çayın renginden ve burukluğundan sorumludur (Obanda vd., 2004). Bu pigmentlerin çayda bulunma oranları siyah çayın işlenme koşullarına özellikle de uygulanan fermentasyon yöntemine göre farklılıklar göstermektedir (Obanda vd., 2001; Wright vd., 2000).



Şekil 2.3. Teaflavinlerin oluşumu (S. Li vd., 2013)

2.3. Taze Çay Yaprağının Bileşimi

2.3.1. Çay yaprağının genel bileşimi

Camellia sinensis yaprağının kimyasal bileşimi (Çizelge 2.3), farklı çay çeşitlerinin kalitesinde önemli rol oynamakta olup, çayın kokusunu, tadını, ağızda bıraktığı hissi ve görünümünü önemli ölçüde etkilemektedir (Chaturvedula & Prakash, 2011; Ho vd., 2015). Taze toplanmış çay yaprağı yaklaşık %70-83 su içermektedir (Jabeen vd., 2015). Çay yaprağının başlıca bileşenlerini polifenoller (kateşinler, flavonollar, fenolik asitler), polisakkaritler, amino asitler, lipidler ve alkaloidler oluşturmaktadır. Daha az miktarlarda ise vitaminler, uçucu yağlar ve mineral bileşikler (potasyum, demir, çinko, manganez, bakır, sodyum, magnezyum ve kalsiyum) yer almaktadır (Bhutia vd., 2015; Koch vd., 2018). Çay yaprağının en önemli bileşeni, çayın duyusal özelliklerinden

sorumlu tutulan bu yüzden de çay deminin kalitesini ve çayın pazar değerini etkileyen fenolik maddelerdir (Liang vd., 2003; Wright vd., 2000). Çayda bulunan fenolik maddeler esas olarak flavanollar (kateşinler) ve flavonollardır (H. Wang vd., 2000). Vitaminlerden özellikle riboflavin (B2), niasin (B3) gibi B grubu vitaminleri, C vitamini ve E vitamini önem taşımaktadır (Aboulwafa vd., 2019; Bhattacharya vd., 2021; Hosen vd., 2014; Vishnoi vd., 2018). Çay yaprağında en fazla bulunan alkaloid olan kafein çayın uyarıcı etkisinden sorumludur (Jin vd., 2016). Çayda bulunan amino asitlerden teanin, sadece çay bitkisine özgü olup tüm amino asitlerin yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır (Sari & Velioğlu, 2011; Thippeswamy vd., 2006) ve çayın umami tat ve kokusu üzerine etkilidir (Saeed vd., 2020; Shi vd., 2019). Klorofiller ve karotenoidler ise çay yaprağına rengini veren pigmentlerdir (Donlao & Ogawa, 2019; Feng vd., 2014; Paiva vd., 2020).

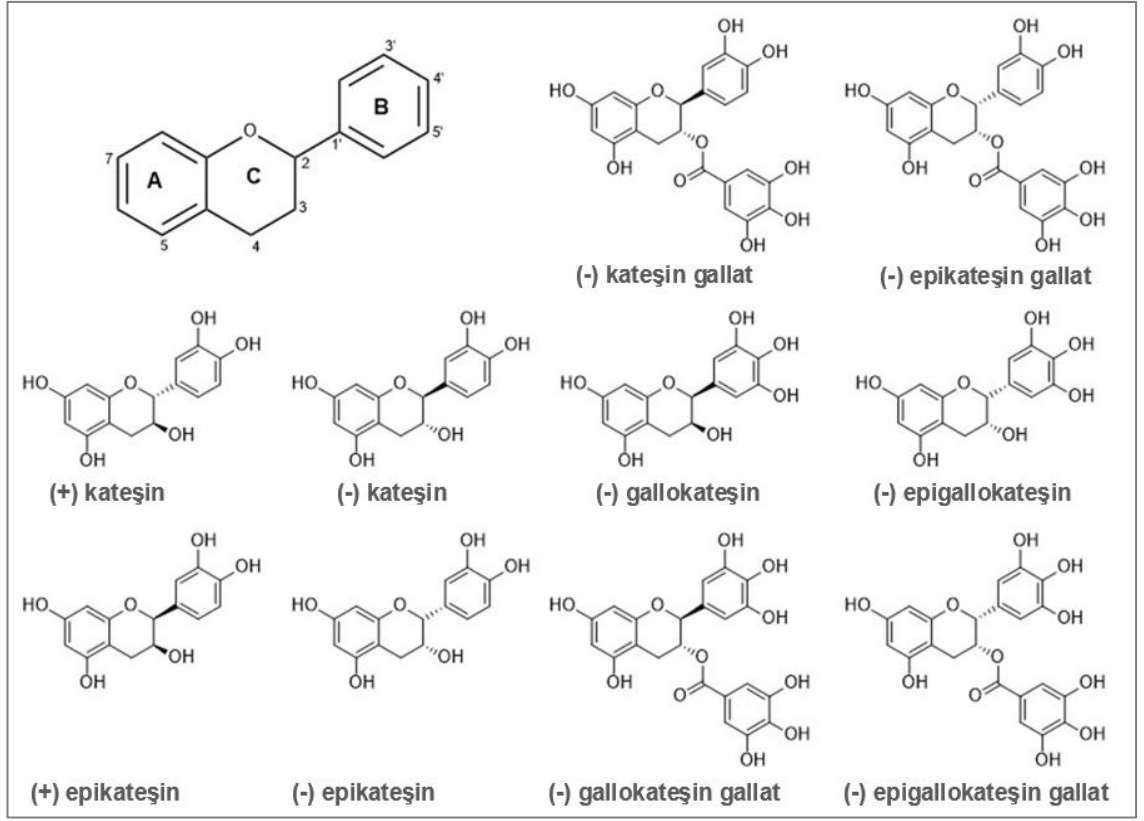
Çizelge 2.3. Çay yaprağının kimyasal bileşimi (mg/g) (D. Chen vd., 2020)

Bileşik	Miktar
EGCG	18,10-54,06
ECG	1,11-2,07
EGC	13,44-36,53
EC	4,90-7,27
C	5,37-6,51
Toplam kateşin	105,85-112,72
Toplam flavonol	30,00
Polisakkarit	130,00
Saponin	72,30-121,80
Kafein	34,86
Protein	150,00
L-teanin	0,41-4,05
Toplam amino asit	1,19-6,99
Uçucu bileşik	<0,10

2.3.2. ay yaprağının fenolik madde bileşimi

ay yaprağı, bitkilerin ikincil metabolitleri olan ve yüksek antioksidan aktiviteye sahip polifenoller açısından oldukça zengindir (Samynathan vd., 2021). Polifenoller kimyasal olarak geniş bir grubu temsil etmekte olup, 8000'den fazla molekül içermektedir. Kimyasal yapıları bir veya daha fazla sayıda hidroksil grubu içeren benzen halkasına bağlanan bir dizi aromatik halkadan oluşmaktadır. Taze ay yaprağında bulunan fenolik bileşikler esas olarak flavonoidlerin alt grupları olan kateşinler ve flavonoller ile gallik asit ve klorojenik asit gibi fenolik asitlerden oluşmaktadır (Engelhardt, 2013; Hithamani & Srinivasan, 2018; Z. Liu vd., 2020; Vastrad vd., 2021).

Kateşinler; ay yaprağında bulunan kateşinler, çayın toplam fenolik madde içeriğinin %70-80'ini oluşturmaktadır (Deka vd., 2021; Zheng vd., 2018). Çayın başlıca kateşinleri C, GC, EC, EGC, ECG ve EGCG'dir (Şekil 2.4) ve miktarları farklı çay klonlarına göre değişmektedir (Ashihara vd., 2010; Rhodes vd., 2013; Wright vd., 2000). Kateşinler renksiz ve suda çözünür bileşikler olup, çay demine burukluk verirler. Taze ay yaprağının kateşin dağılımı, elde edilecek siyah çayın kalitesi için belirleyici olabilmektedir. Wright vd. (2000) 20 iyi kaliteli ve 20 düşük kaliteli çay klonunda, kateşin bileşiminin siyah çay kalitesi ile ilişkisini incelemiş ve siyah çay kalitesiyle en yüksek korelasyona sahip bileşiğin EC olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer taraftan, Obanda vd. (1997) 15 farklı çay klonunda kateşinlerden ECG ya da EGCG'in baskın olduğunu ve her 2 kateşinin de siyah çay kalitesi ile yüksek korelasyon gösterdiklerini belirtmişlerdir. ay yaprağında bulunan kateşinlerin miktarı, çay üretimi sırasında çay çeşidine bağlı olarak değişen oranlarda azalmaktadır. Örneğin, siyah çay üretiminde fermentasyon aşamasında kateşinler önemli oranda azaldığından, son üründe kateşinler hiç bulunmaz ya da düşük miktarlarda bulunur (Stewart vd., 2005).

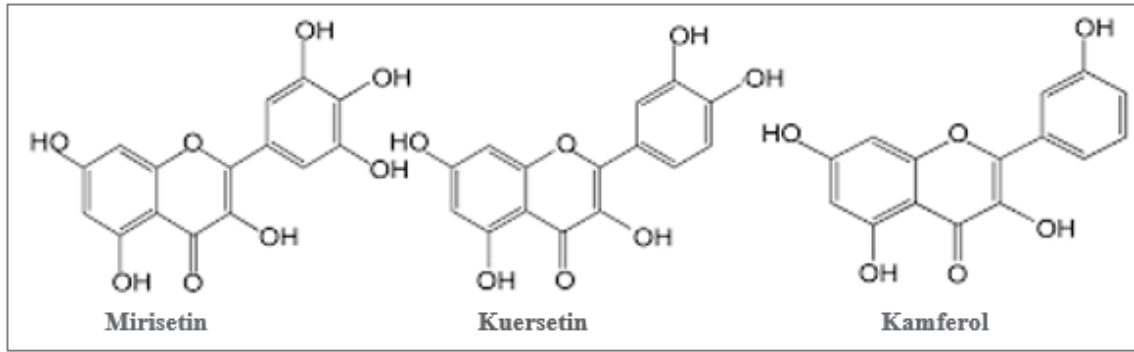


Şekil 2.4. Kateşinlerin kimyasal yapısı (Rashidinejad vd., 2021)

Çay kateşinleri, bir hidrojen atomu vericisi olarak serbest radikalleri indirgeme, zincir oksidasyon reaksiyonlarını engelleme veya metallerle çelat yapma yeteneğine sahip olduklarından antioksidan olarak davranırlar (Gramza vd., 2006). Leung vd. (2001) tarafından, EGCG'nin düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunu engelleme açısından en fazla etkiyi gösterdiği ve bunu sırasıyla ECG, EC ve EGC'nin izlediği saptanmıştır. EGCG'nin en yüksek antioksidan potansiyele sahip olduğu, Stewart vd. (2005) tarafından da belirlenmiştir. Aynı araştırmada, EGCG'yi sırasıyla ECG, EGC ve EC = GC izlemiştir. Ayrıca, Sakanaka vd.'nin (2000) çay kateşinlerinin bakteri sporlarının ısıya direnci üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında, ECG, gallocateşin gallat (GCG) ve EGCG'in galloil grubunu içermelerinden dolayı diğer kateşinlere göre *Clostridium thermoaceticum*'a ait sporların ısıya direncinin azalmasında çok etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Flavonollar; çay yaprağında bulunan flavonoidlerin diğer alt grubunu oluşturan fenolik bileşikler ise flavonollardır (Şekil 2.5) ve kimyasal yapıları kateşinlere benzerlik gösterip sadece piran halkası 4-oxo-3-hidroksi karbon halka ile yer değiştirmiştir

(Hollman & Arts, 2000). Çayın başlıca flavonolları çay kuru ağırlığının %3'ünü oluşturan kuersetin, mirisetin ve kamferoldür (Dufresne & Farnworth, 2001; M. K. Lee vd., 2019; Y. Wu vd., 2016). Bunlar şekerlerle ester yapmaları nedeniyle çoğunlukla glikozid formunda bulunurlar ve glikozid, C halkasının 3'üncü pozisyonundaki hidroksilde bulunmaktadır (Gramza & Korczak, 2005; Monobe vd., 2015). Flavonol glikozidlerin yapısında yer alan şekerler glukoz, ramnoz, galaktoz, arabinoz ve fruktozdur. Stewart vd.'ne (2005) göre çay yaprağında bulunan flavonol miktarı siyah çay üretiminde fermentasyon sırasında çok az değişime uğramaktadır. Aynı araştırmacılar, yeşil çayda 129 µM flavonol tespit ederken siyah çayda bunu 152 µM olarak tespit etmişlerdir. Çayda bulunan flavonollar arasında kuersetin glikozidleri, en fazla antioksidan aktiviteye sahiptir. Diğer taraftan şeker molekülünün bağlanması aglukon formundaki kuersetinin antioksidan aktivitesini azaltmaktadır (Dufresne & Farnworth, 2001; Heim vd., 2002).



Şekil 2.5. Flavonolların kimyasal yapısı (Kingori vd., 2021)

Fenolik Asitler; fenolik asitler, hidroksibenzoik asitler ve hidroksisinnamik asitler olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Bruneton, 2009) (Şekil 2.6).

Hidroksibenzoik asitler; C6-C1 iskelet yapısına sahip olup, benzoik asitten türemiş bileşiklerdir ve en az bir fenolik karboksil ve hidroksil grubu içermektedir (Legrand, 2015). Bu bileşikler bitkisel dokularda, serbest, konjuge ester veya heterozid formunda bulunmaktadır (Kowalski & Kowalska, 2005; X. Zhang vd., 2019). Başlıca fenolik benzoik asitler vanilik asit, genistik asit, p-hidroksibenzoik asit, salisilik asit, gallik asit ve protokateşuik asittir (Tomás-Barberán & Clifford, 2000). Çay yaprağında en fazla bulunan hidroksibenzoik asit, serbest, flavanollar tarafından esterleşmiş veya glikozid

formunda bulunan gallik asittir (X. Zhou vd., 2020). Gallik asidin, vücuda alındığında diğer polifenollere göre daha iyi absorbe olduğu belirtilmektedir (Vella vd., 2019).

Hidroksisinnamik asitler; sennamik asit türevi olan bu bileşiklerin yapısı C6-C3 iskeletine dayanmaktadır ve doğada hidroksibenzoik asitlerden daha fazla bulunurlar. En yaygın hidroksisinnamik asitler kafeik asit, p-kumarik asit, sinapik asit ve ferulik asittir (El-Seedi vd., 2012; Lafay & Gil-Izquierdo, 2008). Bunlardan kafeik asidin kuinik asit ile yaptığı ester olan klorojenik asit de yeşil çayda bulunan diğer bir fenolik asittir (El Gharraş, 2009; Kingori vd., 2019; Macheix vd., 2005).

(a)

(b)

Hidroksibenzoik asitler	R2	R3	R4	R5	Hidroksisinnamik asitler
p-hidroksibenzoik asit	H	H	OH	H	p-kumarik asit
protokateşuik asit	H	OH	OH	H	kafeik asit
vanilik asit	H	OCH ₃	OH	H	ferulik asit
gallik asit	H	OH	OH	OH	
şiringik asit	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	sinapik asit
salisilik asit	OH	H	H	H	
genistik asit	OH	H	H	OH	

Şekil 2.6. Hidroksibenzoik asitler (a) ve hidroksisinnamik asitlerin (b) kimyasal yapısı (Chira vd., 2008)

2.3.3. Çay yaprağının fenolik madde bileşimini etkileyen faktörler

Taze çay yaprağının fenolik madde bileşimi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bu faktörler aşağıda gösterilmektedir:

Çeşit; dünya genelinde yaklaşık 1500 çay yaprağı çeşidi vardır. Her bir çeşidin kendine özgü özellikleri mevcuttur (Ding vd., 2021; Sabhapondit vd., 2012) ve kimyasal bileşimleri farklılık göstermektedir (Y. Chen vd., 2009; X. Wu vd., 2018). Fang vd. (2021), kateşinlerin ve flavonol glikozidlerin miktarının çeşide bağlı olarak değiştiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar *Camellia assamica* çeşidinde, ECG ve flavonol di-

glikozidlerin, *Camellia sinensis* çeşidinde ise EGCG ve flavonol tri-glikozidlerin miktarının daha fazla olduğunu saptamışlardır.

C. Wu vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, yeşil çay ve oolong çay üretimi için seçilen yaprak çeşitlerinde fenolik bileşiklerin miktarı oldukça değişkenlik göstermiştir. Yeşil çay üretiminde kullanılan çeşitlerde kateşinlerin, oolong çayı üretiminde kullanılan çeşitlerde ise toplam flavon ve flavonol glikozidlerin miktarının daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Gonbad vd. (2015), İran'da yetiştirilen 12 çay klonunun kimyasal bileşenlerini araştırdıkları çalışmalarında, klonlar arasında TP ve TF miktarı açısından önemli farklılıklar gözlemişlerdir. Araştırmacılar, çalışılan tüm klonlar arasında, İran 100 adlı çay klonunun en yüksek TP (8,44 mg GAE/g kuru ekstrakt) ve TF (5,40 mg RE/g kuru ekstrakt) içerdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, çay yapraklarının EGCG miktarı (1,60-4,90 mg/g) ve ECG miktarının (0,59-1,55 mg/g), klona göre değişiklik gösterdiği belirtilmiştir. Benzer şekilde, Q. Zhang vd. (2020) yaptığı çalışmada, aynı bölgede yetiştirilen ve aynı zamanda toplanan *Camellia sinensis var assamica* ve *Camellia sinensis var sinensis* çeşitlerine ait çay yapraklarının TP içeriği, %7,99-14,53 arasında değişiklik göstermiştir. Çay yaprağında bulunan fenolik asitlerden gallik asitin miktarının da çeşitlere göre farklılık gösterdiği belirtilmektedir (X. Zhou vd., 2020).

Hasat dönemi; çay yaprakları yılda 2-4 kez hasat edilmektedir (Balci & Özdemir, 2016; Sharma vd., 2011). Ekvator çevresinde yer alan ve iklim farklılıklarının az olduğu bölgelerde ise tüm yıl boyunca hasat yapılabilmektedir (Mukhopadhyay & Mondal, 2017). Çay yaprağının polifenoller, hasat edilen mevsime göre değişiklik göstermektedir (Deka vd., 2021). Bunun sebebi, gün uzunluğu, yağış miktarı, güneş ışığı ve/veya sıcaklık gibi faktörlerin mevsimlere göre önemli ölçüde farklılık göstermesidir. Soğuk aylarda toplanan taze çay yapraklarının toplam fenolik içeriğinin, sıcak aylarda toplanan yapraklara göre daha düşük olduğu belirtilmektedir (Tounekti vd., 2013). Erturk vd. (2010), Türkiye'de son hasat döneminde (Eylül) toplanmış çay yapraklarında, toplam fenolik madde miktarının birinci hasat döneminde (Mayıs) toplanmış yapraklardan daha yüksek olduğunu saptamıştır. Bu sonuçla paralel olarak, yaprakların antioksidan aktivitesi de birinci hasattan üçüncü hasada doğru artış

göstermiştir. Diğer taraftan, L. S. Lee vd. (2014), birinci hasat döneminden en son yapılan hasat dönemine doğru çay yaprağının C ve GCG miktarlarının önemli ölçüde azaldığını ancak EC, EGCG ve EGC miktarlarının ise arttığını tespit etmişlerdir. Örneğin, Nisan sonunda toplanan yaprakta 105,37 mg/g olarak tespit edilen EGCG miktarı, Mayıs sonunda toplanan yaprakta 112,86 mg/g'a yükselmiştir. Aynı yaprakların C içeriği ise 2,48 mg/g'dan 0,99 mg/g'a düşmüştür.

Hasat yöntemi; çay yaprakları elle ya da makine ile hasat edilir. Çayların kimyasal kalite parametreleri, yaprakların toplanma yöntemine göre değişmektedir. Elle toplanan çayların biyokimyasal bileşikler açısından makine ile hasat edilen çaylara göre daha zengin olması ve daha yüksek fenolik bileşik içermesi nedeniyle, kaliteli çay üretimi için çay yaprakları genellikle elle toplanmaktadır. Çay yapraklarının, makine ile hasat edilmesi sırasında mekanik olarak zarar görmesi, bunlardan elde edilecek çayın kalitesinde düşmeye neden olur (Nandagopalan vd., 2014). Yaprakların hasat standardına (iki yaprak ve bir sürgün) uygun olarak hasat edilip edilmemesi de çay kalitesini büyük ölçüde etkilemektedir (Ölmez & Yılmaz, 2010; Tang vd., 2018). Birçok fenolik bileşiğin miktarı, genç sürgünlerde olgun yapraklardan daha fazladır. Sürgünler olgunlaştıkça, toplam flavonol glikozid, mirisetin ve kateşinlerin miktarı da artmaktadır (Q. Li vd., 2015). Ravichandran ve Parthiban (1998), elle toplanan çay yapraklarının TP ve toplam kateşinlerinin (sırasıyla %27,7 ve %18,4) makasla toplanan yapraklardan (sırasıyla %26,6 ve %17,8) daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir.

Bölge; çay bitkisinin dünyadaki coğrafi dağılımı, bu bitkinin iklim faktörlerindeki değişimlere çok iyi uyum sağladığını göstermektedir (Y. S. Lin vd., 2003). Bitkinin yetiştirildiği bölgenin coğrafi, arazi, topografik ve iklim özelliklerinin farklı olmasına bağlı olarak, yaprakların fenolik bileşikler de dahil kimyasal bileşimi değişmektedir (Y. S. Lin vd., 2003; Renla & Ajungla, 2017). D. Wang vd. (2008), tarafından yapılan araştırmaya göre, Çin'in Fujian ve Tayvan bölgesinde yetişen çay yaprağı çeşitlerinde esterleşmemiş kateşinler, Guangdong bölgesinde yetişen çeşitlerde ise esterleşmiş kateşinler daha fazla tespit edilmiştir. Çay bitkisi yüksek irtifa bitkisi olarak bilinmektedir. Rakım ne kadar yüksek olursa, üretilen çayın kuru madde, aroma ve polifenol miktarları dolayısıyla kalitesi artmaktadır. Çayın yetiştirildiği bölgenin yüksekliği polifenollerden özellikle kateşinleri etkiler. Nitekim yüksek irtifa çaylarının

EGCG açısından daha zengin olduğu belirtilmektedir. Genel olarak, 600 m rakımın altında daha düşük kalitede, 1200 m rakımın üzerindeki bölgelerde ise daha yüksek kalitede çay yaprağı elde edilmektedir (Dang, 2015; W. Y. Han vd., 2017). Hava sıcaklığı ve nemi de çayın fenolik bileşikleri üzerinde etkisi olan önemli faktörlerdendir (Ghabru & Sud, 2017; L. Y. Wang vd., 2011; Wei vd., 2011). Yin vd. (2008), taze çay yapraklarında polifenoller ve toplam kateşin içeriğinin düşük bağıl nemde (%60) azaldığını, ancak yüksek bağıl nemde (%90) arttığını belirtmişlerdir. Yağış miktarının fazlalığı da çayın toplam fenolik madde miktarında ve antioksidan aktivitesinde artışa neden olmaktadır. Ahmed vd., (2014), yağışın az olduğu kurak mevsime göre yağışın fazla olduğu mevsimde, çayın fenolik bileşiklerinde, %4,5'e varan oranlarda artış olduğunu saptamışlardır.

Analiz yöntemi; çay polifenollerinin analizi için, çoğunlukla kromatografik yöntemlerden HPLC (Nian vd., 2019; Truong & Jeong, 2021; Yao vd., 2004) ve spektrofotometrik yöntemlerden Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) (L. Y. Chen vd., 2015; Y. Wang vd., 2022) kullanılmaktadır. Ancak, söz konusu yöntemlerin farklı koşullarda uygulanmasına bağlı olarak çay polifenollerinin profili ve konsantrasyonu (kons.) farklılık gösterebilmektedir.

Nishitani ve Sagesaka'nın (2004), HPLC yöntemi kullanarak farklı mobil fazların çay kateşinleri üzerine etkisini belirledikleri çalışmalarında, ECGG ve EC'nin daha iyi ayrımı için su-metanol-fosforik asitten oluşan mobil fazın gradient olarak kullanımının daha iyi sonuç verdiğini belirtmişlerdir. He vd. (2010), yeşil çaydan kateşinleri HPLC ile belirlemek için mobil faz olarak sulu asetonitril-metanolü kullandıkları çalışmalarında, %40,9 (w/w) ECGG tespit etmişlerdir. Diğer taraftan Bhandari vd. (2019), taze çay yaprağından kateşinlerin HPLC ile analizi için mobil faz olarak asetik asit-asetonitril kullanmış ve dört farklı kateşin tespit etmişlerdir. Çayda bulunan 4 önemli kateşin (EGCG, EGC, ECG ve EC) ve gallik asidin belirlenmesi için tek ve çok aşamalı ekstraksiyon yöntemlerinin kullanıldığı bir çalışmada, tek aşamalı ekstraksiyonun yeterli olmadığı, çoklu ekstraksiyon yönteminin daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir (Zuo vd., 2002). Çayda toplam polifenol analizi için kullanılan FCR yönteminde, çayın TP miktarı, sodyum karbonat ve FCR'nin ilave edilme sırası, reaksiyon karışımının inkübasyon süresi ve sıcaklığındaki farklılıklar, absorbansın 700

ile 765 nm aralığında ölçülmesi, son karışım hacminin 2 ile 100 mL aralığında olması, farklı standart madde kullanımı gibi faktörlere bağlı olarak önemli ölçüde farklılık gösterebilmektedir (Bancuta vd., 2016; Cicco vd., 2009; Hong vd., 2011; Musa & Abdulla, 2009; Singleton vd., 1999). L. Y. Chen vd.'ne (2015) göre, sodyum karbonat reaksiyon ortamına FCR'den önce ilave edildiğinde, sonra ilave edildiği duruma göre yeşil çayda daha fazla TP miktarı tespit edilmiştir. Ayrıca, Bai vd. (2018), farklı konsantrasyonlarda FCR kullanılmasının çay polifenollerine üzerine önemli etkisi olduğunu belirtmiştir. Benzer şekilde, Sateanchok vd. (2018), yeşil çayın TP'sini belirlemek amacıyla literatürde çok kullanılan FCR yöntemlerinden birini, aynı yöntemin reaksiyon süresi ve FCR konsantrasyonunu değiştirerek geliştirdikleri yeni yöntemle karşılaştırdıklarında, çayda daha fazla TP tespit etmişlerdir (74,6 mg'a GAE/g karşılık 82,00 mg GAE/g).

Çay yaprağında bulunan fenolik bileşiklerin analizi amacıyla, uygulanan ekstraksiyon işlemi sırasında, ekstraksiyon koşullarına (solvent tipi, sıcaklık, süre, solvent-materyal oranı gibi) bağlı olarak fenolik bileşiklerin konsantrasyonu ve cinsi değişmektedir (Barreira vd., 2022; Bindes vd., 2019; de Moura vd., 2022; Gadkari vd., 2015). Perva-Uzunalić vd.'ne (2006) göre, solvent, solvent-materyal oranı, ekstraksiyon sıcaklığı ve süre gibi ekstraksiyon parametrelerine göre değişmek üzere yeşil çayın kateşin miktarı önemli oranda değişiklik göstermiştir. Aynı araştırmacılar kateşinlerin ekstraksiyon sırasında parçalanmasını önlemek için kısa ekstraksiyon süresi-yüksek sıcaklık ya da uzun ekstraksiyon süresi-daha düşük sıcaklık kombinasyonunun uygulanmasını önermiştir. Taze çay yaprağından fenolik bileşiklerin HPLC ile analizi için metanol ve suyun ekstraksiyon amacıyla kullanıldığı bir araştırmada, elde edilen kateşinlerin miktarları açısından, metanolün sudan daha etkili bir solvent olduğu tespit edilmiştir (Yao vd., 2004). Zuo vd. (2002) tarafından yapılan çalışmada, yeşil, siyah ve oolong çaylarında kateşinlerin HPLC ile yapılan analizinde örnek ekstraksiyonunun kritik bir aşama olduğu ve tek aşamalı solvent ekstraksiyonuna kıyasla çok aşamalı ekstraksiyonla bütün kateşinlerin miktarında artış olduğu belirtilmiştir.

2.4. Taze Çay Yaprağındaki Fenolik Bileşiklerin Radikal Tutma Aktivitesi (RTA)

Çay polifenollerine oksidatif stresin neden olduğu hücre hasarının korunmasında rol oynayan ve çeşitli hastalıklara yakalanma riskini azaltan çok güçlü antioksidanlardır

(Camargo vd., 2016). Bunlar, lipoprotein, protein, lipit ve oligonükleik asit gibi biyomoleküllerden serbest radikalleri yakalama ve ortadan kaldırma yetenekleri nedeniyle oksidatif strese karşı savaşır (Aydin vd., 2015; Luo vd., 2012) ve hücre içinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve reaktif azot türlerinin (RNS) neden olduğu reaksiyonları önler (Aloui vd., 2020). Hücrelerde bulunan başlıca ROS ve RNS'ler superoksit anyonu, singlet oksijen, hidrojen peroksit ile hidroksil, peroksinitrit ve peroksil radikalleridir (Kalam vd., 2012). Çay yaprağında bulunan kateşinlerin özellikle de EGCG'nin ve fenolik asitlerden gallik asidin etkili ROS temizleyicisi olduğu belirtilmektedir (Can Agca vd., 2020; Masek vd., 2017). Bu etkiden dolayı çay kateşinleri antioksidan olarak davranırlar (Gramza vd., 2006). ROS'un fenolik bileşikler tarafından nötralizasyonunun veya stabilizasyonunun, ya hidroksil gruplarından hidrojen atomu transferi ile ya da bir elektronun ROS'a transferi ile gerçekleştiği belirtilmektedir (Kumar & Pandey, 2013; Prasanth vd., 2019; Wojtunik-Kulesza vd., 2020).

Fenolik bileşiklerin güçlü antiradikal kapasiteye sahip olması, esas olarak onların kimyasal yapısıyla ilişkilidir (Aydin vd., 2015). Özellikle benzoik halkalarda bulunan hidroksil gruplarının sayısı ve alkil gruplarının yakınlığı bu açıdan önem taşımaktadır (Collin & Crouzet, 2011; Musial vd., 2020). Örneğin, EGCG ve GCG'nin RTA'sı, EGC, GC, EC ve C'den daha güçlüdür (Liao vd., 2001). Fourneau vd. (1996) de çay yaprağındaki polifenollerden EGCG'nin RTA'sının diğer kateşinlerden fazla olduğunu bildirmiştir. Çay yaprağının başlıca kateşini olan EGCG'nin C ve E vitaminlerinden de daha etkili bir antioksidan olduğu belirtilmektedir (Reto vd., 2014).

Kateşinler, radikal süpürme etkilerinin yanı sıra, ROS üretiminden sorumlu pro-oksidan enzimlerin (ksantin oksidaz ve siklooksijenaz gibi) aktivitesini inhibe etme ve azaltma, zincir oksidasyon reaksiyonlarını engelleme veya metallerle çelat yapma yeteneğine de sahiptir (Mandel vd., 2006; Swarnalatha vd., 2021; Truong & Jeong, 2021). Leung vd. (2001) tarafından yapılan çalışmada, LDL oksidasyonunu en fazla EGCG engellemiştir ve bunu sırasıyla ECG, EC ve EGC izlemiştir. Benzer şekilde, yeşil çayın EGCG ve EC'nin antioksidan aktivitesi nedeniyle LDL oksidasyonunu engellediği ve *in-vitro* olarak EGCG'nin LDL oksidasyonu üzerindeki antioksidan aktivitesinin EC'den daha fazla olduğu belirtilmektedir (Gomikawa & Ishikawa, 2002). Diğer taraftan, Z. Q. Liu

vd. (2000) ise peroksil radikalının sebep olduğu lipid peroksidasyonunu engelleme açısından EC'nin en yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini ve bunu sırasıyla EGCG, ECG ve EGC'nin takip ettiğini belirtmiştir.

Flavan-3-ollerin yanı sıra, yeşil çaydan elde edilen flavonollar da, antioksidan kapasiteye sahiptir (Sirichaiwetchakoon vd., 2020). Rha vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada yeşil çaydan elde edilen flavonol glikozid ve flavonol aglikonunun, güçlü antioksidan kapasiteye sahip olduğu ve oksidatif stresi azalttığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, flavonol aglikonunun radikal süpürücü aktivitesinin flavonol glikozide göre daha yüksek olduğunu tespit etmiştir. Priyandoko vd. (2021), yeşil çay ekstraktının, flavonollardan yüksek antioksidan kapasiteye sahip mirisetin ile karşılaştırılabilir düzeyde antioksidan aktivite gösterdiğini belirtmiştir.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Araştırma materyali

Bu çalışma kapsamında Azaklıhoca (Rize) (40° 59' 35,8584" K, 40° 27' 42,8760" D) bölgesinde yer alan bir çay bahçesinden 2019 ve 2020 yıllarında Mayıs, Temmuz ve Eylül dönemlerinde, iki buçuk yaprak olarak toplanarak bekletilmeksizin gölgede kurutulmuş taze çay yaprakları kullanılmıştır. Yapraklar denemelerde kullanılmadan önce kahve öğütücü kullanılarak öğütülmüş (Şekil 3.1) ve polietilen poşetlerde 4 °C de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Öğütülmüş kuru çay yaprağı

3.1.2. Ekipman, kimyasal madde ve diğer malzemeler

Bu çalışmada yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (Shimadzu, Japonya), hassas terazi (Mettler Toledo, XS204, ABD), su banyosu (Memmert, Almanya), vorteks (Heidolph, Almanya), kahve öğütücü (Tefal, Türkiye), derin dondurucu (-28 °C, Vestel, Türkiye), buzdolabı (+4 °C, Grundig, Türkiye), mekanik çalkalayıcı (Şimşek Laboratuvar), spektrofotometre (Shimadzu-UV/VIS 1601), nem tayin cihazı (MA150, Sartorius, Almanya), santrifüj (Nüve, Türkiye) ve pH metre (DocuClip, Sartorius, Almanya) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan RP-HPLC kolon (5 µm, 250 x 4,6 mm) Nova Select'den satın alınmıştır. HPLC ile fenolik bileşiklerin analizlerinde kullanılan C, EC, GC, EGC, EGCG, EGC, Sigma Chemical Company'den (St. Louis, MO, ABD), kuersetin-3-glukozid (Q3G) Fluka'dan (BioChemica-Fluka Cheme İsviçre), kuersetin-3-ramnoglukozid (Q3RG) Wako Chem. Co.'dan (Osaka-Japonya) ve kamferol-3-

ramnoglukozid (K3RG) Chromadex'den (Santa Ana, ABD) satın alınmıştır. HPLC saflığında orto fosforik asit, asetonitril ve polifenol ekstraksiyonu için kullanılan etanol Riedel-de Haën'den satın alınmıştır. Spektrofotometrik toplam polifenol (TP) analizinde kullanılan Folin-cioacalteu reaktifi Merck Co.'dan (Darmstadt, Almanya), sodyum karbonat Carlo Erba'dan (Val de Reuil, Fransa) ve gallik asit Sigma Chemical Company'den (St. Louis, MO, ABD) satın alınmıştır. Spektrofotometrik toplam flavonoid (TF) analizinde kullanılan sodyum nitrit Carlo Erba'dan (Val de Reuil, Fransa), alüminyum klorür Sigma Chemical Company'den (St. Louis, MO, ABD), sodyum hidroksit Emsure'den, (Darmstadt, Almanya) ve rutin Acros Organics'den (Waltham, MA, ABD) satın alınmıştır. Spektrofotometrik radikal tutma aktivitesi (RTA) analizinde kullanılan 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl Sigma Chemical Company'den (St. Louis, MO, ABD) satın alınmıştır. *In-vitro* gastrointestinal sindirim analizi için kullanılan taze safra, pankreatin (porcine pancreas) ve pepsin (porcine gastric mucosa) Sigma Chemical Company'den (St. Louis, MO, ABD), potasyum klorür, sodyum klorür, kalsiyum klorür dihidrat, hidroklorik asit Isolab'dan (Wertheim, Almanya), amonyum karbonat, monopotasyum fosfat Honeywell Fluka'dan (Seelze, Almanya), magnezyum klorür heksahidrat Carlo Erba'dan (Val de Reuil, Fransa) ve sodyum hidroksit Emsure'den (Darmstadt, Almanya) satın alınmıştır.

Çalışmada kullanılan diğer sarf malzemeler, mikropipet seti (Transferpette, Brand, Almanya), 0,45 µm'lik membran filtreler, tek kullanımlık spektrofotometre küvetleri, elek, vidalı kapaklı plastik tüpler, plastik deney tüpleri, Whatman No.1 filtre kağıdı, dereceli cam balon jojeler ve diğer cam malzemelerdir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deneysel tasarım

Çay yaprağından polifenollerin ekstrakte edilmesinde, ekstraksiyon parametrelerinin (Ürün/Solvent (Ü/S) oranı, ekstraksiyon süresi ve etanol konsantrasyonu) etkisini belirlemek amacıyla Yanıt-yüzey metodu (RSM) kullanılarak Box-Behnken deneme deseni (BBDD) ile optimizasyon çalışması yapılmıştır. RSM, birden fazla faktörün etkisini ve faktörlerin etkileşimlerini belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir araçtır. Günümüzde, gıda bilimi ve teknolojisi alanında en çok tercih edilen optimizasyon

tekniklerinden biridir ve birçok çalışmada (Gunathilake vd., 2019; L. Liu vd., 2018; Riciputi vd., 2018) çeşitli bitkisel kaynaklardan biyoaktif antioksidanların ekstrakte edilmesi amacıyla kullanılmıştır. Bu çalışmada, bağımsız değişkenler (ekstraksiyon parametreleri), önceki çalışmalara (Strati vd., 2018; Y. Zhou vd., 2019) ve ön denemelere dayanılarak belirlenmiştir. İkinci dereceden modellemeye izin veren Box-Behnken deneme deseni Çizelge 3.1’de verilmiş olup, üç faktör, üç düzey ve iki tekerrürlü olarak uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan faktörlerin düzeyleri Çizelge 3.2’de verilmiştir. Çizelge 3.1’de belirtilen “-1” en az (minimum), “0” orta (merkez) ve “1” ise, en yüksek (maksimum) düzeyi ifade etmektedir. Bağımlı değişkenler olan toplam polifenol (TP) miktarı ve radikal tutma aktivitesini (RTA) açıklamak için kullanılan ikinci dereceden polinomial denklem (1) aşağıda verilmektedir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_1^2 A^2 + \beta_2^2 B^2 + \beta_3^2 C^2 + \beta_1 \beta_2 AB + \beta_1 \beta_3 AC + \beta_2 \beta_3 BC \quad (3.1)$$

Buradaki Y , tahmin edilen yanıt (bağımlı değişken); β_0 modelin regresyon denklem sabitini; β_1 , β_2 ve β_3 doğrusal etki regresyon katsayılarını; β_1^2 , β_2^2 ve β_3^2 , karesel (kuadratik) etki regresyon katsayılarını ve $\beta_1 \beta_2$, $\beta_1 \beta_3$ ve $\beta_2 \beta_3$, interaksiyon (interaktif) etki regresyon katsayılarını ifade etmektedir. A , B ve C ise çalışılan faktörleri (Ü/S oranı, ekstraksiyon süresi ve etanol konsantrasyonu) ifade etmektedir.

Her bir faktörün yanıt (TP ve RTA) üzerine etkisini belirlemek için varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Ayrıca, regresyon modelinin uyumunu değerlendirmek için, regresyon katsayısı (R^2) hesaplanmış ve model uyumsuzluğu [lack of fit (LOF)] testi uygulanmıştır. Bağımsız değişkenler ile yanıt arasındaki ilişki üç boyutlu yüzey grafiği ve kontur (iz düşüm) grafiği ile gösterilmiş ve optimum koşullar belirlenmiştir. Modele göre belirlenmiş optimum koşullarda ayrıca üç deneme yapılmış ve optimum koşullar deneysel olarak da doğrulanmıştır. Veri analizi için MINITAB 17 (State College, PA) programı kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Polifenol ekstraksiyonunda kullanılan üç faktörlü Box-Behnken deneme deseni

Deney sıra no	Bağımsız Değişkenler (Faktörler)		
	A	B	C
1	-1	1	0
2	1	1	0
3	0	0	0
4	0	-1	1
5	1	0	1
6	-1	0	1
7	1	0	-1
8	-1	1	0
9	0	1	1
10	0	1	-1
11	1	0	-1
12	0	-1	-1
13	0	1	1
14	-1	-1	0
15	1	-1	0
16	0	-1	-1
17	0	0	0
18	1	-1	0
19	0	1	-1
20	1	1	0
21	-1	0	-1
22	-1	0	1
23	0	0	0
24	0	0	0
25	0	0	0
26	0	0	0
27	0	-1	1
28	1	0	1
29	-1	0	-1
30	-1	-1	0

Çizelge 3.2. Box-Behnken bağımsız değişkenler (faktörlerin) düzeyleri

Bağımsız değişkenler	Düzeyler			
	Kodlar	-1	0	1
Ü/S oranı (g/mL)	A	1:25	1:50	1:75
Etanol kons. (%)	B	60	80	100
Ekstraksiyon süresi (dak)	C	20	35	50

3.2.2. Polifenol ekstraksiyonu

Çay yaprakları, mekanik bir çalkalayıcı kullanılarak 580 devir/dak, bilinen bir konsantrasyonda (B, %) etanol ve etanolün sulu çözeltileri ile falkon tüpünde ekstrakte edilmiştir. Bitkisel materyallerden polifenollerini ekstrakte etmek için çoğunlukla etanol kullanıldığından (Gunathilake vd., 2019; Zardo vd., 2019) ve çevre dostu olduğundan dolayı, ekstraksiyon çözeltisi olarak etanol seçilmiştir. Ekstraksiyon, Çizelge 3.2'de tanımlanmış olan, bilinen bir Ü/S oranında (A, w/v) gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sırasında fenolik bileşiklerin parçalanmasını önlemek amacıyla, falkon tüpleri alüminyum folyo ile sarılmıştır. Ekstraksiyon süresi (C, dak) tamamlandıktan sonra, süspansiyon Whatman No.1 filtre kağıdından süzölmüş ve ekstraktlar analiz edilinceye kadar -18 °C'de muhafaza edilmiştir. Ekstraksiyon koşulları Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

3.2.3. Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam polifenol (TP) tayini

Örneklerin TP içeriği, aşağıda verilen FCR yöntemi 1'e göre yapılmış olup, sonuçların karşılaştırılması amacıyla aşağıda verilen diğer yöntemler (2-5) de kullanılarak TP analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz için, kör çözelti olarak, ekstrakt yerine saf su kullanılmıştır. Sonuçlar, her bir yöntem için stok standart gallik asit çözeltisinin farklı konsantrasyonları (0-50 ppm; $R^2 = 0,99$) ile elde edilmiş olan kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliğinden (Çizelge 3.3) yararlanılarak hesaplanmıştır ve mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g kuru madde (KM) olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 3.3. TP yöntemlerine ait regresyon eşitlikleri

Yöntem	Regresyon Eşitliği
FCR yöntemi 1	$y = 0,0116x$
FCR yöntemi 2	$y = 0,0157x$
FCR yöntemi 3	$y = 0,0087x$
FCR yöntemi 4	$y = 0,0054x$
FCR yöntemi 5	$y = 0,0047x$

FCR yöntemi 1; International Organization for Standardization (2005) yöntemine göre, 0,5 mL ekstrakt, 2,5 mL Folin-Ciocalteu (%10'luk, v/v) reaktifi ile karıştırılmıştır. 5 dakika sonra bu karışıma 2 mL sodyum karbonat çözeltisi (%7,5) ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Elde edilen karışım, 60 dakika karanlıkta bekletildikten sonra oluşan mavi rengin absorbansı spektrofotometrede (Shimadzu UV-VIS 1208) 765 nm'de köre karşı okunmuştur.

FCR yöntemi 2; Obanda vd.'nin (1997) yöntemine göre, 1 mL ekstrakt, 1 mL Folin-Ciocalteu reaktifi (3 kat su ile seyreltilmiş) ile karıştırılmıştır. 5 dakika sonra bu karışıma 2 mL doymuş sodyum karbonat çözeltisi (%35'lik) 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 (Shimadzu UV-VIS 1208) 700 nm'de köre karşı okunmuştur.

FCR yöntemi 3; Roshanak vd.'nin (2016) yöntemine göre, 0,5 mL ekstrakt, 2,5 mL Folin-Ciocalteu reaktifi (10 kat seyreltilmiş) ve 2 mL sodyum karbonat çözeltisi (%7,5) iyice karıştırılmıştır. Karışım 45 °C'de 15 dakika bekletildikten sonra, absorbans spektrofotometrede (Shimadzu UV-VIS 1208) 700 nm'de köre karşı okunmuştur.

FCR yöntemi 4; Barreira vd.'nin (2021) yöntemine göre, 1 mL Folin-Ciocalteu reaktifi 300 µL ekstrakta ilave edilmiştir. Daha sonra, hemen 5 mL sodyum karbonat çözeltisi (%20) eklenerek iyice karıştırılmıştır. Karışım 30 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletildikten sonra, absorbans spektrofotometrede (Shimadzu UV-VIS 1208) 735 nm'de köre karşı okunmuştur.

FCR yöntemi 5; Ren vd.'ye (2021) göre, 0,5 mL ekstrakt 0,5 mL Folin-Ciocalteu reaktifi ile karıştırılmıştır. 3 mL sodyum karbonat çözeltisi (%10, w/v) ilave edilmiştir. Son hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Renk gelişimi için, oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra, 760 nm'de spektrofotometrede (Shimadzu UV-VIS 1208) absorbans ölçülmüştür.

3.2.4. Toplam flavonoid (TF) tayini

TF miktarı, spektrofotometrik yöntemle tespit edilmiştir (Rodrigues vd., 2016). Bu amaçla, 300 µL ekstrakt, 1800 µL saf su ve 100 µL sodyum nitrit (%5, w/v) ile karıştırılmıştır. Altı dakika oda sıcaklığında inkübe edilen karışım üzerine, 200 µL %10'luk alüminyum klorür (AlCl₃) (metanolde hazırlanmış) çözeltisi ilave edilmiştir. Altı dakika sonra 600 µL sodyum hidroksit (%4, w/v) eklenerek yeniden on beş dak inkübe edilmiştir. Süre sonunda absorbans değerleri 510 nm'de köre karşı okunmuştur. Standart olarak rutin kullanılmıştır ve farklı konsantrasyonları (0-1500 ppm; $R^2 = 0,9997$) ile standart kurve ($y = 0,0009x$) elde edilmiştir. Sonuçlar kurve baz alınarak hesaplanmış ve rutin eşdeğeri (RE) olarak mg RE/g KM olarak ifade edilmiştir.

3.2.5. DPPH ile radikal tutma aktivitesi (RTA) tayini

Örneklerin RTA, aşağıda verilen DPPH yöntemi 1'e göre yapılmış olup, sonuçların karşılaştırılması amacıyla aşağıda verilen yöntemler (2-5) de kullanılarak RTA belirlenmiştir. Örneklerin RTA, askorbik asit eşdeğerine dönüştürülerek, g askorbik asit eşdeğeri (AAE)/100 g KM olarak da ifade edilmiştir. Bu amaçla, aynı koşullar altında referans antioksidan olarak askorbik asit çözeltisinin 0-150 µg/mL aralığındaki farklı konsantrasyonları ile bir kalibrasyon eğrisi ($R^2 = 0,9975$) elde edilmiştir.

DPPH yöntemi 1; Türkmen Erol vd.'nin (2009) yöntemine göre, 50 µL ekstrakt, metanolde hazırlanmış 1950 µL DPPH radikali (6×10^{-5} M) ile karıştırılmıştır. Kontrol örneğinde, ekstrakt yerine saf su kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı kuvvetlice karıştırıldıktan sonra, karanlıkta 25 °C'de 60 dakika bekletilmiştir. Sürenin bitiminde karışımın ve kontrol örneğinin absorbansı, spektrofotometrede 517 nm'de metanole karşı okunmuştur. RTA (%), aşağıdaki eşitlikten (Yen & Duh, 1994) yararlanılarak hesaplanmıştır.

$$RTA (\%) = \left(\frac{Abs_{Kontrol} - Abs_{Örnek}}{Abs_{Kontrol}} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

$Abs_{Kontrol}$: Örnek içermeyen DPPH çözeltisinin absorbansı

$Abs_{Örnek}$: Örnek içeren DPPH çözeltisinin absorbansı

DPPH yöntemi 2; Topuz vd.'nin (2014) yöntemine göre, 100 µL ekstrakt, metanolde taze hazırlanmış 4 mL DPPH çözeltisine ($6 \times 10^{-5} M$) ilave edilmiştir. Karışım karıştırılmış ve oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Sürenin bitiminde karışımın ve kontrol çözeltisinin (ekstrakt yerine ekstraksiyon solventi içeren çözelti) absorbansı spektrofotometrede 516 nm'de okunmuştur. Örneklerin antioksidan aktivitesi, DPPH radikalının inhibisyon yüzdesi (I , %) olarak, aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$I (\%) = \left[\frac{A_{kontrol} - A_{örnek}}{A_{kontrol}} \right] \times 100 \quad (3.3)$$

$A_{kontrol}$: Kontrol örneğinin absorbansı

$A_{örnek}$: Ekstrakt içeren test örneğinin absorbansı

DPPH yöntemi 3; L. S. Lee vd.'ne (2013) göre, 0,5 mL ekstrakt 2,5 mL 0,12 mM DPPH çözeltisi ile karıştırılmıştır. Karışım, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Sürenin sonunda karışımın absorbansı spektrofotometrede 517 nm'de okunmuştur ve DPPH serbest radikali tutma aktivitesi aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$RTA (\%) = 100 - \left[\left(\frac{517 \text{ nm}'de \text{ örneğin absorbansı}}{517 \text{ nm}'de \text{ körün absorbansı}} \right) \times 100 \right] \quad (3.4)$$

Kör olarak örnek dışında diğer komponentlerin hepsini içeren kontrol çözeltisi kullanılmıştır.

DPPH yöntemi 4; Qu vd.'ne (2020) göre, 1,0 mL ekstrakt, metanolde çözölmüş 2,0 mL 0,15 mM DPPH çözeltisine ilave edilmiştir. Karışım, oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Sürenin sonunda karışımın absorbansı spektrofotometrede 517 nm'de okunmuştur ve DPPH serbest radikali tutma aktivitesi aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$RTA (\%) = \left(1 - \frac{OD_{\text{örnek}}}{OD_{\text{kontrol}}}\right) \times 100 \quad (3.5)$$

OD_{kontrol} :DPPH standart çözeltisinin absorbansı

$OD_{\text{örnek}}$:Örneğin absorbansı

DPPH yöntemi 5; Sentkowska ve Pyrzynska'nın (2018) yöntemine göre, 0,1 mL ekstrakt, metanolde taze hazırlanmış 2,4 mL DPPH radikali (9×10^{-5} M) ile karıştırılmıştır. Karışım karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Sürenin bitiminde karışımın ve DPPH çözeltisinin absorbansı, spektrofotometrede 518 nm'de okunmuştur. RTA, DPPH çözeltisinin rengindeki açılmanın yüzdesi olarak, aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$I (\%) = \left(\frac{A_0 - A_{30}}{A_0}\right) \times 100 \quad (3.6)$$

A_0 : Çay ekstraktı ilave edilmeden önce radikalın absorbansı

A_{30} : Çay ekstraktı ilave edilen DPPH çözeltisinin absorbansı

3.2.6. HPLC ile fenolik bileşiklerin belirlenmesi

Fenolik bileşiklerin analizi için Türkmen (2007) tarafından belirtilen yöntem, modifiye edilerek kullanılmıştır. Ekstrakt örnekleri, 0,45 µm'lik membran filtreden süzölmüş ve filtrat HPLC (Perkin Elmer, Flexar model) kolonuna enjekte edilmiştir. Analizde kullanılmış olan HPLC koşulu ve elusyon programı Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Fenolik bileşiklerin analizi için HPLC çalışma koşulları ve elusyon programı

HPLC çalışma koşulları		
Sistem	: Shimadzu (Prominence serisi)	
Yazılım	: LCb solution	
Kolon	: Novaselect (250 x4,6 mm, ID; 5 µm; C ₁₈)	
Kolon fırını	: CTO-10AS VP	
Kolon Sıcaklığı	: 30 °C	
Dedektör	: Photodiode array (PDA)	
Dedeksiyon dalga boyları	: 270 ve 355 nm	
Pompa	: LC-20AD	
Akış Hızı	: 1 mL/dak	
Enjeksiyon Miktarı	: 20 µL	
Elusyon programı		
Süre (dak)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	92	8
10	89	11
57	79	21
62	20	80
67	92	8
Solvent A: % 0,1’lik (v/v) fosforik asitli su		
Solvent B: Asetonitril		

Örneklerdeki fenolik bileşiklerin tanımlanması, bileşiklerin kolondaki alıkonma süresi, UV-spektrumlarının ilgili standart maddelere ait süre ve spektrumlarla karşılaştırılması ve standart maddelerin çay ekstraktına ilave edilmesiyle yapılmıştır. Fenolik bileşiklere ait piklerin tanımlanması ve miktarlarının hesaplanması bileşiklerin maksimum absorbans değeri verdiği dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin miktarlarının tespit edilmesinde bileşiklere ait HPLC kromatogramlarından elde edilmiş integre alanlar ve standart maddelerin ara stok çözeltileri ile hazırlanmış kalibrasyon eğrilerinden yararlanılmıştır.

3.2.7. *In-vitro* gastrointestinal sindirim (biyoerişilebilirlik) tayini

In-vitro gastrointestinal sindirim yöntemi, ekstrakt örneklerinin fenolik bileşiklerinin biyoerişilebilirliğini değerlendirmek amacıyla, Minekus vd.'ne (2014) göre, gastrik ve intestinal sindirim olmak üzere 2 aşamada gerçekleştirilmiştir. Yöntem kısaca aşağıdaki gibi uygulanmıştır:

Gastrik aşaması; 10 mL ekstrakt, 7,5 mL mide sıvısı (Çizelge 3.5), 1,6 mL stok pepsin çözeltisi (mide sıvısı ile hazırlanmış, 25000 U/mL; pepsinin aktivitesi 3200-4500 U/mg protein), 5 µL 0,3 M kalsiyum klorür dihidrat (CaCl₂), 0,2 mL 1M hidroklorik asit (HCl) (pH'yı 3'e ayarlamak için) ve 0,695 µL su ile karıştırılmıştır. Elde edilen karışımın enzim aktivitesi 2000 U/mL olmuştur. Karışım daha sonra 37 °C'de çalkalamalı su banyosunda 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ekstrakt dışında aynı kimyasallar kullanılarak aynı koşullar altında kör hazırlanmıştır.

Bağırsak aşaması; 10 mL gastrik kısım, 5,5 mL bağırsak sıvısı (Çizelge 3.5), 2,5 mL stok tripsin bazlı pankreatin çözeltisi (bağırsak sıvısı ile hazırlanmış, 800 U/mL; pankreatinin aktivitesi 100 USP U/mg protein), 1,25 mL 160 mM safra, 20 µl 0,3 M CaCl₂, 0,075 mL 1M sodyum hidroksit (NaOH) (pH'yı 7'ye ayarlamak için) ve 0,655 mL su ile karıştırılmıştır. Elde edilen karışımın enzim aktivitesi 100 U/mL olmuştur. Karışım daha sonra 37 °C'de çalkalamalı su banyosunda 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ekstrakt dışında aynı kimyasallar kullanılarak aynı koşullar altında kör hazırlanmıştır.

Son olarak, gastrik ve intestinal sindirim sonrası karışımlar 12000 x g'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, Whatman No:1 ile filtre edilmiş ve TP ve antioksidan kapasite (AK) analizleri için -18 °C de muhafaza edilmiştir.

Her iki aşama için (mide ve bağırsak); fenolik bileşiklerin miktarı spektrofotometre ile belirlendikten sonra, bileşiklerin *Biyoerişilebilirliği (%)* aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

$$Biyoerişilebilirlik (\%) = \left(\frac{K_{sindirilmiş}}{K_{sindirilmemiş}} \right) \times 100 \quad (3.7)$$

$K_{sindirilmiş}$: Mide/bağırsak aşamasından sonraki konsantrasyon (mg)

$K_{sindirilmemiş}$: Sindirilmemiş örnekteki konsantrasyon (mg)

Çizelge 3.5. Sindirim sıvılarının hazırlanması*

Bileşen	Formül	Stok çözelti (mol/L)	Mide sıvısı (pH:3)	Bağırsak sıvısı (pH:7)
			Stoktan alınan miktar (500mL)	Stoktan alınan miktar (500mL)
Potasyum klorür	KCl	0,5	6,9	6,8
Monopotasym fosfat	KH ₂ PO ₄	0,5	0,9	0,8
Sodyum karbonat	NaHCO ₃	1	12,5	42,5
Sodyum klorür	NaCl	2	11,87	9,6
Magnezyum klorür heksahidrat	MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,15	0,4	1,1
Amonyum karbonat	(NH ₄) ₂ CO ₃	0,5	0,5	-

*Tüm sindirim sıvıları distile su ile 500 mL'ye tamamlanmıştır.

3.2.8. Askorbik asit (AA) tayini

Çay yaprağından AA ekstraksiyonu için Karaca ve Velioglu (2020) tarafından belirtilen yöntem, modifiye edilerek kullanılmıştır. Buna göre örneklerden 0,25 g alınarak üzerine %0,5'lik metafosforik asit (MFA) çözeltisinden 6 mL ilave edilmiş, karışım 1 dakika vortekste tutulduktan sonra kaba filtre kağıdından süzölmüştür. Daha sonra elde edilen ekstraktlar, 0,45 µm membran filtreden geçirildikten sonra HPLC'ye enjekte edilmiştir. Örneklerde AA in tanımlanması için en uygun HPLC çalışma koşulları ve elusyon programı Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. AA analizi için HPLC çalışma koşulları ve elusyon programı

HPLC çalışma koşulları		
Sistem	: Shimadzu (Prominence serisi)	
Yazılım	: LCB solution	
Kolon	: Novaselect (250x4,6 mm, ID; 5 µm; C ₁₈)	
Kolon fırını	: CTO-10AS VP	
Kolon Sıcaklığı	: 30 °C	
Dedektör	: Photodiode array (PDA)	
Dedeksiyon dalga boyu	: 242 nm	
Pompa	: LC-20AD	
Akış Hızı	: 1 mL/dak	
Enjeksiyon Miktarı	: 20 µL	
Elusyon programı		
Süre (dak)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	95	5
10	75	25
15	95	5
Solvent A: %0,1'lik (v/v) fosforik asitli su		
Solvent B: Asetonitril		

Örneklerdeki AA'nın tanımlanması, bileşiğin kolondaki alıkonma süresi, UV-spektrumunun standart AA'ya ait süre ve spektrumla karşılaştırılması ve standart AA'nın çay ekstraktına ilave edilmesiyle yapılmıştır. AA'ya ait pikin tanımlanması ve miktarının hesaplanması bileşiğin maksimum absorbans değeri verdiği 242 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Miktar tespit edilmesinde AA'ya ait HPLC kromatogramlarından elde edilmiş integre alanlar ve standart AA'nın ara stok çözeltileri ile hazırlanmış kalibrasyon eğrilerinden yararlanılmıştır.

3.2.9. İstatistiksel analiz

İstatistik analizleri SPSS (SPSS statistics 23, IBM. 2015) programı ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, 3 tekrarlı ölçümlerin ortalaması $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Elde edilen verilere, tek yönlü ANOVA kullanılarak varyans analizi

uygulanmıştır. Ortalamalar arasındaki önemli farklılıklar, Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Çay Yaprağından Polifenollerin Ekstraksiyonuna ait Model Analizi

Çay yaprağından, sulu etanol çözeltisi kullanılarak elde edilen ekstraktlara ait deneysel ve kullanılan modele göre tahmin edilen TP ve RTA değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Etanol, ucuz olması, toksik olmaması ve çevreye dost solvent olması (Amado vd., 2014; Gunathilake vd., 2019; Sablania vd., 2019) gibi avantajları nedeniyle ekstraksiyon solventi olarak seçilmiştir. Çizelge 4.1 incelendiğinde, çay yaprağı ekstraktlarında deneysel olarak belirlenen TP ve RTA’nın sırasıyla 46,81-95,97 mg GAE/g KM ve 8,12-20,84 g AAE/100 g KM arasında değiştiği görülmektedir.

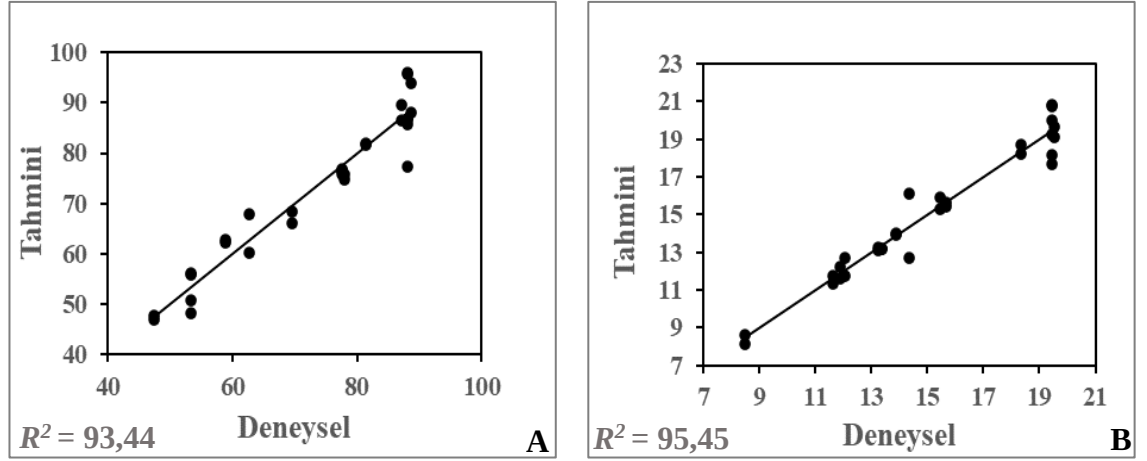
Çay yaprağı ekstraktlarının TP ve RTA için yapılan varyans analizi (ANOVA), modelin yüksek determinasyon katsayıları (R^2) ile oldukça önemli ($p<0,05$) olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.2). Bu sonuç, ekstraktların TP ($R^2 = 93,44$) ve RTA ($R^2 = 95,45$) için elde edilen deneysel ve tahmini veriler arasında yüksek korelasyon olduğunu göstermektedir (Şekil 4.1). Çizelge 4.2 incelendiğinde, elde edilen modelin uygunluğunu ölçen, model uyumsuzluğu (lack of fit) önemsiz ($p>0,05$) bulunmuştur. Bu durum, modelin bağımsız değişkenlerin (ekstraksiyon parametrelerinin) incelenen aralıklarındaki herhangi bir kombinasyonunda çay yaprağından elde edilen ekstraktların TP ve RTA’nı tahmin etmek için kullanılabileceğini göstermektedir.

4.2. Ekstraksiyon Parametrelerinin Çay Yaprağı Ekstraktının TP ve RTA Üzerine Etkisi

Varyans analizi sonuçlarına göre, ekstraksiyon parametrelerinin her iki yanıt üzerine lineer etkisinin önemli olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.2). Ancak sadece, sürenin RTA üzerine lineer etkisi önemli bulunmamıştır. Bu durum, TP ve RTA’nın ekstraksiyon parametrelerinden oldukça fazla etkilendiğini göstermektedir. Süre hariç, Ü/S oranı ve etanol konsantrasyonunun karesel terimlerinin TP ve RTA’nın her ikisi üzerine önemli bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). İnteraksiyon terimleri açısından ise sadece Ü/S oranı x etanol konsantrasyonu etkileşimi TP ve RTA’yı önemli ölçüde etkilemiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.1. Box-Behnken deney tasarımına göre elde edilen TP ve RTA değerleri

Deney no.	Bağımsız değişken			Bağımlı değişken			
	A	B	C	TP (mg GAE/g KM)		RTA (g AAE/100 g KM)	
				Deneysel	Tahmini	Deneysel	Tahmini
1	-1	1	0	62,33	58,77	11,60	11,88
2	1	1	0	81,61	81,45	14,00	13,89
3	0	0	0	86,85	88,08	20,84	19,44
4	0	-1	1	67,85	62,66	12,69	12,03
5	1	0	1	88,07	88,67	19,12	19,55
6	-1	0	1	76,30	77,65	15,64	15,64
7	1	0	-1	89,71	87,07	18,68	18,33
8	-1	1	0	62,68	58,77	12,26	11,88
9	0	1	1	75,85	77,96	12,69	14,35
10	0	1	-1	75,90	77,60	13,17	13,37
11	1	0	-1	86,58	87,07	18,22	18,33
12	0	-1	-1	55,94	53,38	11,73	11,61
13	0	1	1	74,82	77,96	16,13	14,35
14	-1	-1	0	47,59	47,45	8,63	8,46
15	1	-1	0	50,85	53,25	13,09	13,22
16	0	-1	-1	56,08	53,38	11,37	11,61
17	0	0	0	95,71	88,08	18,13	19,44
18	1	-1	0	48,21	53,25	13,24	13,22
19	0	1	-1	76,61	77,60	13,16	13,37
20	1	1	0	81,83	81,45	13,94	13,89
21	-1	0	-1	68,30	69,61	15,29	15,47
22	-1	0	1	76,85	77,65	15,41	15,64
23	0	0	0	85,78	88,08	20,71	19,44
24	0	0	0	86,89	88,08	19,25	19,44
25	0	0	0	95,97	88,08	20,00	19,44
26	0	0	0	77,27	88,08	17,68	19,44
27	0	-1	1	60,14	62,66	11,77	12,03
28	1	0	1	94,02	88,67	19,68	19,55
29	-1	0	-1	66,16	69,61	15,93	15,47
30	-1	-1	0	46,81	47,45	8,12	8,46



Şekil 4.1. Çay yaprağı ekstraktının TP (A) ve RTA (B) için tahmini ve deneysel değerlerin karşılaştırılması

Çizelge 4.2. Etanol ekstraktlarının TP ve RTA için Yanıt-Yüzey Metoduna ait varyans analizi

	Varyasyon kaynakları	SD ^a	KT ^b	KO ^c	F değeri	p değeri
	Model	9	6021,81	669,09	31,64	0,000
	Doğrusal	3	2466,21	822,07	38,87	0,000
	Ü/S oranı	1	810,12	810,12	38,31	0,000
	Konsantrasyon	1	1562,89	1562,89	73,90	0,000
	Süre	1	93,19	93,19	4,41	0,049
	Karesel	3	3352,58	1117,53	52,84	0,000
	Ü/S oranı*Ü/S oranı	1	414,88	414,88	19,62	0,000
	Kons.*Kons.	1	3056,67	3056,67	144,53	0,000
TP	Süre*Süre	1	0,20	0,20	0,01	0,923
	İnteraksiyon	3	203,02	67,67	3,20	0,045
	Ü/S oranı*Konsantrasyon	1	142,59	142,59	6,74	0,017
	Ü/S oranı*Süre	1	20,78	20,78	0,98	0,333
	Konsantrasyon*Süre	1	39,64	39,64	1,87	0,186
	Artık	20	422,98	21,15		
	Model uyumsuzluğu	3	117,91	39,30	2,19	0,127
	Hata	17	305,07	17,95		
	Toplam	29	6444,79			
$R^2 = 93,44$		Düzeltilmiş- $R^2 = 90,48$		Tahmini- $R^2 = 87,47$		

Çizelge 4.2. Etanol ekstraktlarının TP ve RTA için Yanıt-Yüzey Metoduna ait varyans analizi (devam)

	Varyasyon kaynakları	SD ^a	KT ^b	KO ^c	F değeri	p değeri
	Model	9	343,459	38,162	46,59	0,000
	Doğrusal	3	64,441	21,480	26,22	0,000
	Ü/S oranı	1	45,857	45,857	55,98	0,000
	Konsantrasyon	1	16,645	16,645	20,32	0,000
	Süre	1	1,939	1,939	2,37	0,140
	Karesel	3	274,536	91,512	111,72	0,000
	Ü/S oranı*Ü/S oranı	1	18,504	18,504	22,59	0,000
	Kons.*Kons.	1	265,152	265,152	323,69	0,000
RTA	Süre*Süre	1	2,709	2,709	3,31	0,084
	İnteraksiyon	3	4,482	1,494	1,82	0,175
	Ü/S oranı*Konsantrasyon	1	3,785	3,785	4,62	0,044
	Ü/S oranı*Süre	1	0,539	0,539	0,66	0,427
	Konsantrasyon*Süre	1	0,158	0,158	0,19	0,665
	Artık	20	16,383	0,819		
	Model uyumsuzluğu	3	0,363	0,121	0,13	0,942
	Hata	17	16,020	0,942		
	Toplam	29	359,842			
		R² = 95,45		Düzeltilmiş-R² = 93,40		Tahmini-R² = 91,07

a: Serbestlik derecesi b: Kareler toplamı c: Kareler ortalaması*: p<0,05.

Kullanılan faktör düzeyleri ile yanıtlar arasındaki ilişkiyi gösteren ve regresyon analizi sonucu elde edilen model eşitlikleri aşağıda verilmiştir.

$$TP = 88,08 + 7,12A + 9,88B + 2,41C - 7,50A^2 - 20,35B^2 + 0,17C^2 + 4,22AB - 1,61AC - 2,23BC \quad (4.1)$$

$$RTA = 19,435 + 1,693A + 1,020B + 0,348C - 1,583A^2 - 5,992B^2 - 0,606C^2 - 0,688AB + 0,260AC + 0,140BC \quad (4.2)$$

Eşitlikteki (2 ve 3) negatif değerler, faktörlerdeki artışa karşılık yanıtlardaki azalma eğilimini gösterirken, pozitif değerler artma eğilimini göstermektedir (Barizão vd.,

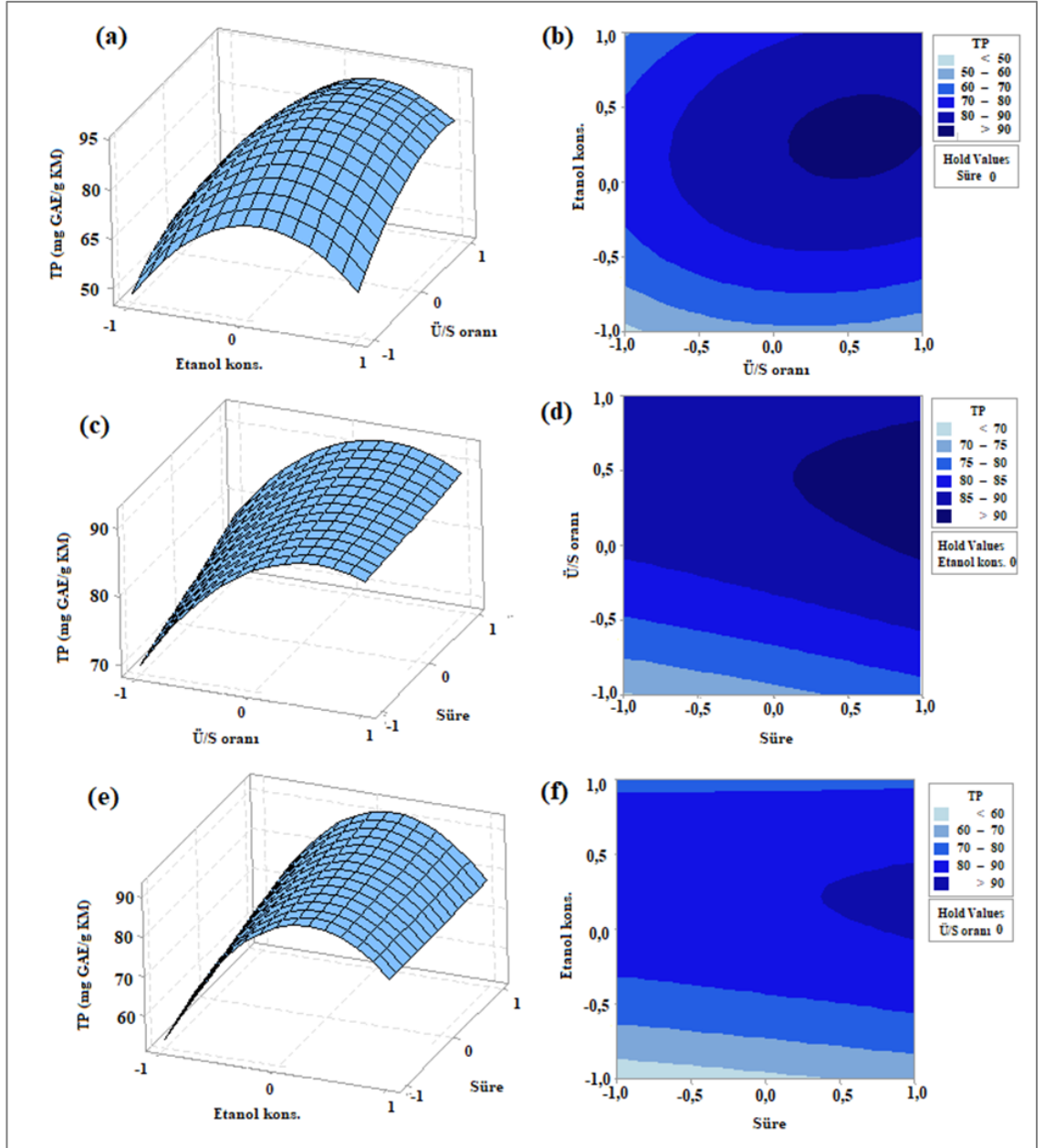
2013). Eşitliklerden görüldüğü üzere, TP ve RTA değerlerinde Ü/S oranı, etanol konsantrasyonu ve ekstraksiyon süresindeki artışa bağlı olarak β_1 , β_2 ve β_3 terimleri nedeniyle artış tespit edilmiştir. Söz konusu bağımsız değişkenlerin karesel ve interaksiyon terimleri için de pozitif ve negatif değerlerin olduğu gözlenmiştir.

Yapılan varyans analizi sonucuna göre bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişki önemli bulunduğundan, ekstraksiyon parametrelerinin TP ve RTA değerlerini nasıl etkilediğini belirlemek amacıyla üç boyutlu yanıt yüzey ve iz düşüm grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3). Grafikler çizilirken, ekstraksiyon parametrelerinden biri merkez seviyede sabit tutulurken, diğer ikisi deneme aralığı içerisinde değiştirilmiştir. Şekil 4.2 a, b ve Şekil 4.3 e, f'de görüldüğü gibi TP ve RTA değerleri, etanol konsantrasyonu %100 (kod = +1) den %80'e (kod = 0) doğru düşerken artmıştır. Ancak, %60'a (kod = -1) doğru azalma eğilimi göstermiştir. Bu sonuçla uyumlu olarak C. H. Lee vd. (2016), soya fasulyesinden üç farklı konsantrasyonda etanol çözeltisi ile elde edilen ekstraktların TP içeriği, etanol konsantrasyonu %50 den %75'e çıktığında artış gösterirken, %95'lik etanol kullanıldığında azalma eğilimi göstermiştir. Benzer şekilde Y. Zhou vd. (2019), etanol konsantrasyonu %20 den %60'a doğru arttıkça antioksidan polifenollerin konsantrasyonunun arttığını, %60'ın üzerinde azaldığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu durumun farklı etanol konsantrasyonlarının polaritelerindeki farklılıktan kaynaklandığını belirtmişlerdir. Etanol konsantrasyonundaki değişiklik bileşiklerin çözünürlüklerini değiştirmesinin yanı sıra solventin fiziksel özelliklerini (yoğunluk, dinamik viskozite ve dielektrik sabiti gibi) de değiştirdiğinden bu durum fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunu etkilemektedir (Zardo vd., 2019). Etanol konsantrasyonunun polifenollerin ekstraksiyonunu etkilediği Riciputi vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada da bildirilmiştir.

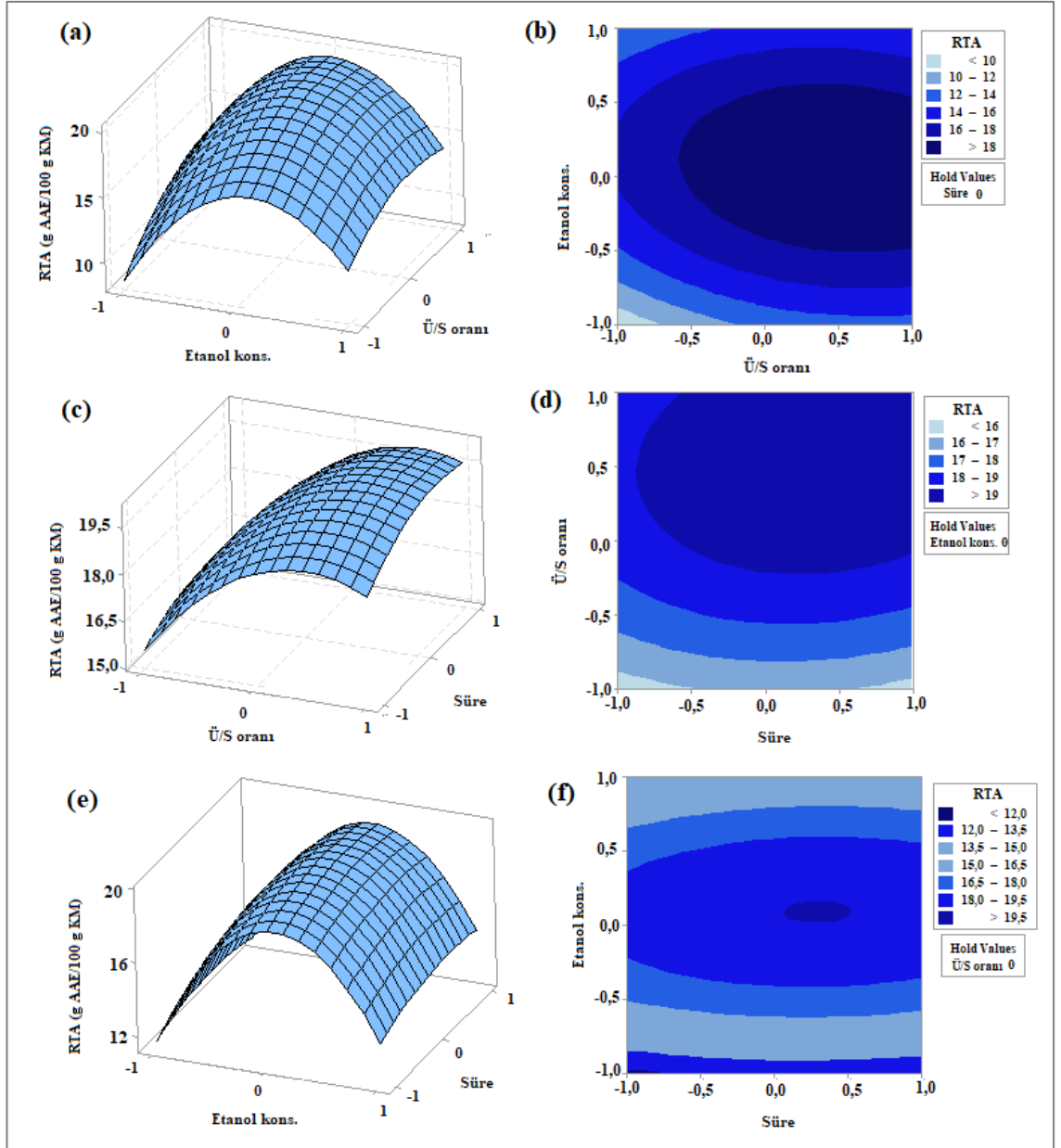
Ekstraksiyon parametrelerinden Ü/S oranı, TP ve RTA'nı önemli düzeyde etkilemiştir ($p < 0,05$). Şekil 4.2 a, d ve Şekil 4.3 a, d'de görüldüğü gibi, TP ve RTA, Ü/S oranı 1/25'ten (kod = -1), 1/50'ye (kod = 0) doğru artış göstermiş ve merkez nokta ile 1/75 oranı (kod = +1) arasında en yüksek TP ve RTA değerleri elde edilmiştir. Benzer şekilde, Y. Zhou vd. (2019) tarafından fasulye kabuğundan polifenollerin ekstraksiyonunu gerçekleştirdikleri çalışmalarında, Ü/S oranı 1/10'dan 1/25'e arttıkça

antioksidan aktivite artmış ve 1/25 ile 1/40 oranı arasında maksimum düzeye ulaşmıştır. Araştırmacılar 1/29,3 oranını optimal nokta olarak belirlemişlerdir.

Etanol konsantrasyonunun Ü/S oranı ile etkileşiminin TP ve RTA üzerine önemli etki ($p<0,05$) yaptığı gözlenmiştir (Şekil 4.2 a, b ve Şekil 4.3 a, b). Y. Zhou vd. (2019) da, kırmızı kuru fasulyeden elde ettikleri ekstraktın, antioksidan aktivesi için benzer sonucu bulmuştur. Ü/S oranı, merkez noktadan (kod = 0) maksimum noktaya (kod = +1) yaklaşırken, etanol konsantrasyonunun maksimum (kod = +1) veya minimum (kod = -1) noktadan, merkez noktaya (kod = 0) doğru yaklaştığında TP ve RTA değerlerinin arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4.2. Ü/S oranı, etanol konsantrasyonu ve süreye bağlı olarak TP'deki değişimi gösteren yanıt yüzey (a, c ve e) ve iz düşüm (b, d ve f) grafikleri (Ü/S oranı 1/50 (e ve f), etanol konsantrasyonu %80 (c ve d) ve ekstraksiyon süresi 35 dak (a ve b) olarak sabitlenmiştir)



Şekil 4.3. Ü/S oranı, etanol konsantrasyonu ve süreye bağlı olarak RTA'deki değişimi gösteren yanıt yüzey (a, c ve e) ve iz düşüm (b, d ve f) grafikleri (Ü/S oranı 1/50 (e ve f), etanol konsantrasyonu %80 (c ve d) ve ekstraksiyon süresi 35 dak (a ve b) olarak sabitlenmiştir)

4.3. Optimizasyon Koşulları

Çalışma bulguları, taze çay yaprağından ekstrakte edilen polifenol miktarının yüksek olması için faktör düzeyleri arasında belli bir dengenin olması gerektiğini göstermiştir. Bu nedenle Box-Behnken tasarımı ile optimizasyon yapılarak, polifenol miktarının maksimum olabilmesi için en uygun faktör düzeyleri belirlenmiştir. Optimizasyon

sonucu, en yüksek TP değeri elde edilebilmesi için Ü/S oranının 1/60,86, etanol konsantrasyonunun %84,65 ve ekstraksiyon süresinin 50 dakika olması gerektiği belirlenmiştir. Bu koşullar uygulanarak yapılacak ekstraksiyon sonucunda, hedeflenen tahmini TP miktarının 92,74 mg GAE/g KM olacağı tespit edilmiştir. Bu sonucun sağlanıp sağlanmadığını kontrol etmek yani modelin geçerliliğini analiz etmek amacıyla optimum olarak belirlenen koşullarda yapılan 3 tekrarlı ekstraksiyon sonucunda TP miktarı 95,79 mg GAE/g KM olarak bulunmuştur. Bu sonuç, deneysel TP miktarının optimizasyon sonucunda olması gereken tahmini TP miktarı ile oldukça uyumlu olduğunu göstermiştir.

Literatürde, farklı kaynaklardan polifenollerin ekstraksiyonunun optimizasyonu ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Bununla birlikte, bu çalışmadaki optimum ekstraksiyon koşullarını, ekstraksiyon yöntemini optimize etmek için aynı bağımsız değişkenlerin kullanıldığı önceki sınırlı çalışmalardan (Strati vd., 2018; Y. Zhou vd., 2019) elde edilenlerle karşılaştırmak oldukça zordur. Bunun başlıca nedenleri, uygulanan ekstraksiyon yöntemlerinin ve araştırma materyallerinin farklı olmasıdır.

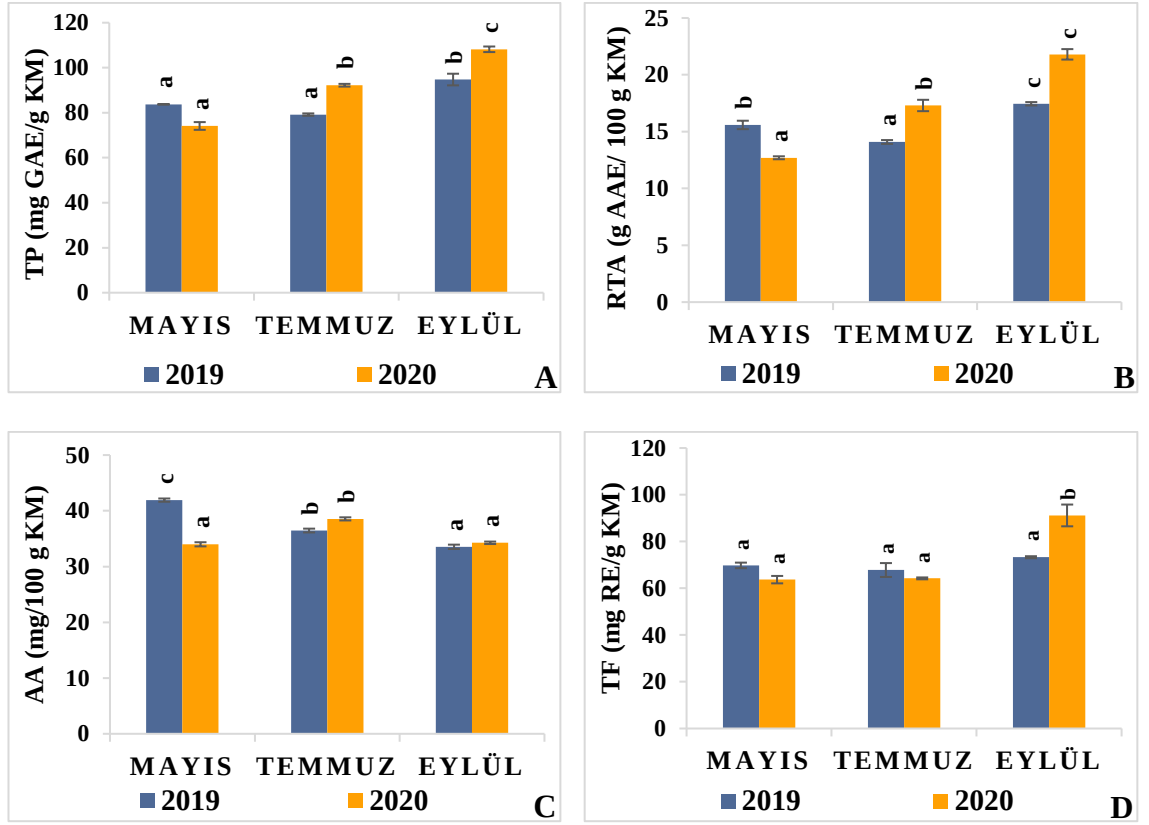
4.4. Farklı Dönemlerde Toplanmış Taze Çay Yaprağının TP, RTA, TF ve AA Miktarları

Taze çay yaprağı örneklerinden elde edilen ekstraktlara ait TP, RTA, AA ve TF değerleri Çizelge 4.3 ve Şekil 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. 2019 ve 2020 yılında farklı dönemlerde toplanmış taze çay yaprağının TP (mg GAE/g KM), RTA (g AAE/ 100 g KM), AA (mg/100 g KM) ve TF (mg RE/g KM) değerleri

		Dönem		
		Mayıs	Temmuz	Eylül
2019	TP	83,72 ± 0,02 ^{a*}	79,16 ± 0,53 ^a	94,74 ± 2,59 ^b
	RTA	15,59 ± 0,37 ^b	14,09 ± 0,17 ^a	17,45 ± 0,15 ^c
	AA	41,92 ± 0,29 ^c	36,46 ± 0,34 ^b	33,54 ± 0,39 ^a
	TF	69,79 ± 1,18 ^a	67,81 ± 2,97 ^a	73,28 ± 0,43 ^a
2020	TP	74,10 ± 1,72 ^a	92,21 ± 0,60 ^b	108,19 ± 1,24 ^c
	RTA	12,70 ± 0,13 ^a	17,30 ± 0,50 ^b	21,80 ± 0,46 ^c
	AA	33,99 ± 0,37 ^a	38,55 ± 0,28 ^b	34,26 ± 0,22 ^a
	TF	63,69 ± 1,59 ^a	64,23 ± 0,41 ^a	91,16 ± 4,66 ^b

* Aynı satırdaki küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).



Şekil 4.4. Farklı yıl ve hasat döneminde toplanmış taze çay yaprağının TP (A), RTA (B), AA (C) ve TF (D) grafikleri

TP; taze çay yaprağı örneklerinden optimum koşullarda ekstraksiyon yapılmış ve International Organization for Standardization'a (2005) (FCR yöntemi 1) göre TP analizi gerçekleştirilmiştir. Ekstraktların TP içeriği, hasat yılı ve dönemine bağlı olarak önemli oranda değişmiştir (74,10-108,19 mg GAE/g KM) (Çizelge 4.3).

Roshanak vd. (2016), hasat sonrası, 1 dak süre ile 90 °C'de haşladıktan sonra farklı kurutma yöntemleri uygulayarak kuruttukları taze çay yaprağından, %80 metanol ile yapılan ekstraksiyon sonrası TP miktarını, 109,85 mg GAE/g KA (gölgede kurutma) ile 143,09 mg GAE/g KA (dondurarak kurutma) arasında tespit etmiştir. Ertürk vd. (2010) ise üç farklı dönemde hasat edilmiş, yedi farklı klona ait taze çay yaprağının sıcak hava ile (45 °C'de, 36 saat) kurutulduktan sonra, metanol ile elde edilen ekstraktlarında 33,00 mg GAE/g KA ile 291,18 mg GAE/g KA düzeyinde TP saptamıştır. Bu çalışma kapsamında, gölgede kurutulmuş taze yapraklarda tespit edilen TP içeriği, araştırmacıların buldukları sonuç ile uyum göstermiştir. Diğer taraftan, Somsong vd. (2020), doğrudan dondurarak kurutulmuş taze çay yaprağından, %25 etanol ile elde ettikleri ekstraktta, bu

çalışmadan elde edilen sonuca göre daha fazla, 379,01 mg GAE/g KA düzeyinde TP tespit etmiştir. Sonuçlar arasındaki farklılık, ekstraksiyon koşullarının farklılığından ve çay yapraklarının farklı klonlara ait olmasından kaynaklanabilmektedir.

Bu çalışma ile elde edilen TP sonuçları, polifenollerce zengin olarak bilinen yeşil çayın TP değerleriyle de karşılaştırılmıştır. Buna göre, daha önce yapılan bazı çalışmalarda, yeşil çayın su ekstraktlarında, 88-173 mg GAE/g KA (Donlao & Ogawa, 2018), 116,30 mg GAE/g KA (Park vd., 2009), 66,91-139,24 mg GAE/g (Guo vd., 2016) ve 1345,41-1765,12 mg/L (76,88-100,86 mg GAE/g KA'ya karşılık gelmektedir) (Jakubczyk vd., 2020) ve etanol (%80) ekstraktında 45,7 mg GAE/g KA (Cho vd., 2014) düzeyinde TP olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlar, taze çay yaprağının, yeşil çaya göre işlem görmemiş olması nedeniyle, daha ekonomik bir polifenol kaynağı olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Hasat yılı ve döneminin çay yaprağının TP miktarı üzerine etkisi incelendiğinde, 2020 yılına ait yaprakların TP içeriği genellikle daha yüksek bulunmuştur. Hasat dönemi, yaprakların TP içeriğini önemli ölçüde etkilemiştir ($p<0,05$). En fazla TP, her iki yıl için de Eylül ayında toplanan yapraklarda tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Erturk vd. (2010) da ilk hasat dönemi olan Mayıs'tan, üçüncü ve son hasat dönemi olan Eylül'e doğru taze çay yapraklarının TP içeriğinde artış gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar, bu duruma Rize'nin Eylül ayında daha fazla güneş almasının ve bu ayda gece ve gündüz sıcaklık farkının yüksekliği ve yağışların düzensizliğinden kaynaklanan stres koşullarının sebep olabileceğini belirtmişlerdir. Dai vd. (2015) ise farklı dönemlerde toplanan çay yapraklarından üretilen yeşil çayın fenolik bileşiklerinin, döneme göre farklılıklar gösterdiğini bildirmişlerdir. Y. Chen vd. (2010), farklı yüksekliklerde ve farklı mevsimlerde toplanan çay yapraklarından oolong çay elde ettikleri çalışmalarında, alçak bölgelerden sonbaharda toplanan yapraklar kullanıldığında, oolong çayın önemli kalite parametrelerinden olan toplam kateşinlerin, ilkbahara göre daha fazla olduğunu saptamışlardır.

RTA; taze çay yapraklarından optimum koşullarda yapılan ekstraksiyon sonucunda, elde edilen ekstraktların RTA değerleri, hasat yılı ve dönemine bağlı olarak 12,70 ile 21,80 g AAE/100 g KM arasında değişkenlik göstermiştir (Çizelge 4.3). Taze çay

yaprağının antioksidan aktivitesine ilişkin literatürde az sayıda çalışmaya rastlanmıştır olup, bu çalışmalarda aynı antioksidan yöntemi farklı modifikasyonlarla uygulanmış, farklı standart maddeler kullanılmış ve sonuçlar farklı birimler üzerinden ifade edilmiştir. Bu durum, bu çalışmadan elde edilen sonuçların literatür değerleriyle karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır. Ancak, diğer taraftan yeşil çayın antioksidan aktivitesi üzerine daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında; örneğin, Ramírez-Aristizabal vd.'nin (2017) yeşil çayın farklı sıcaklıktaki su ekstraktlarında, bu çalışmanın sonuçlarından daha düşük antioksidan aktivite (22,36-110,01 mg trolox eşdeğeri (TE)/g çay) tespit ettikleri söylenebilmektedir.

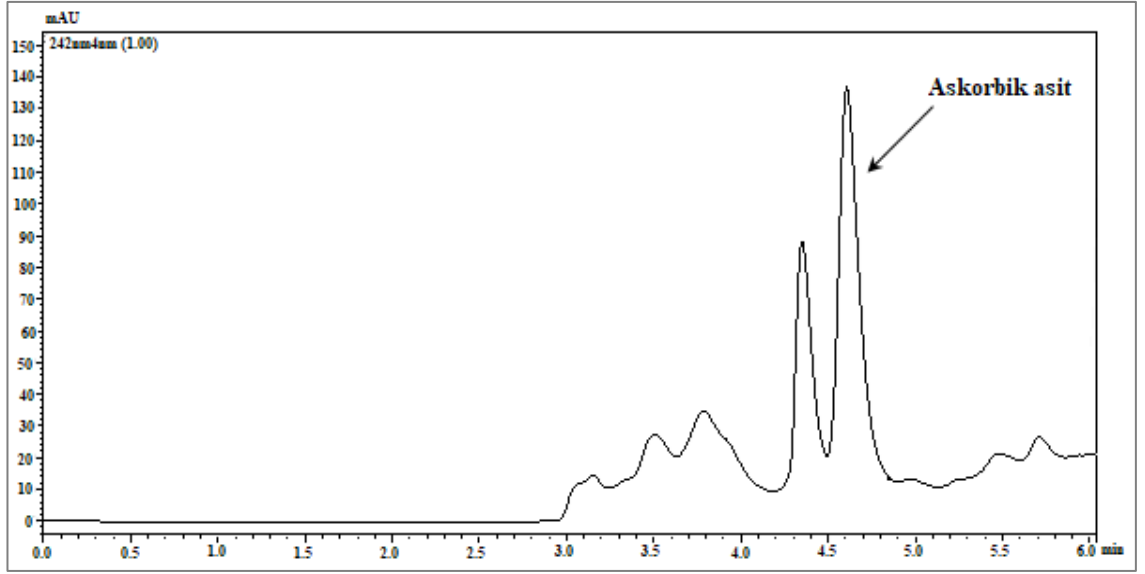
RTA değeri, en fazla 2020 yılının Eylül döneminde toplanmış çay yaprağında bulunmuş olup, sonuçlar TP miktarları ile paralellik göstermiştir. Bu durum, antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinen polifenollerin, en fazla Eylül dönemine ait yaprakta tespit edilmesi ile açıklanabilmektedir. Nitekim daha önce yapılan birçok çalışmada (Figuerola vd., 2016; Lutz vd., 2015), bitkisel materyallerin toplam fenolik madde içeriği ile antioksidan aktiviteleri arasında kuvvetli bir ilişki olduğu saptanmıştır. Erturk vd. (2010) da, bu çalışmanın sonucu ile uyumlu olarak, Eylül dönemi hasat edilen taze çay yapraklarının, Mayıs ve Temmuz'a göre en yüksek antioksidan aktivite içerdiğini belirtmişlerdir. Ancak, bu çalışmanın sonucundan farklı olarak, Topuz vd. (2014), Mayıs ve Temmuz ayında hasat edilen çay yapraklarından, 120 °C'de 90 s süre ile buhar uygulaması, soğutma ve 95 °C'de kurutma uygulayarak elde ettikleri yeşil çay tozunda, antioksidan aktivite açısından bir farklılık olmadığını saptamışlardır. Bu durum, çay yapraklarının ekstraksiyonunda kullanılan solventin farklı olması ve dolayısıyla farklı polariteye sahip antioksidan bileşiklerin aktivitelerinin farklı olmasından kaynaklanabilmektedir. Çünkü antioksidan aktivite antioksidan bileşiklerin sadece miktarı ile ilişkili olmayıp aynı zamanda onların kimyasal yapısı ve birbirleriyle olan etkileşimleri ile de ilişkilidir (L. S. Lee vd., 2013).

TF; Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi, çay yapraklarının TF miktarı, 63,69 ile 91,16 mg RE/g KM olarak hasat yılı ve dönemine göre değişiklik göstermiştir. Bu sonuçlar, yaprak örneklerinin TF miktarının, TP miktarından daha düşük olduğunu göstermektedir. Roshanak vd. (2016), hasat sonrası, gölgede kurutma da dahil farklı kurutma yöntemleri uygulayarak kuruttukları taze çay yaprağından, %80 metanol ile

yapılan ekstraksiyon sonrası TF miktarını, 14,30 (mikrodalga ile kurutma) ile 38,18 mg kuersetin eşdeğeri/g KA (100 °C'de sıcak hava ile kurutma) arasında, tespit etmiştir. Araştırmacıların bulduğu bu sonuçlar, bu çalışmadan elde edilen TF değerlerinden düşük olmasına rağmen, bu sonuçların aynı araştırmada belirtilen TP değerlerinden düşük olması, bu çalışmanın sonuçlarıyla uyum sağlamaktadır. Benzer şekilde, yeşil çayın etanol (%80) ekstraktında ve farklı sıcaklıktaki su ekstraktlarında sırasıyla 34,3 mg kateşin eşdeğeri (CE)/g çay (Cho vd., 2014) ve 2,67-8,41 mg CE/g çay (Ramírez-Aristizabal vd., 2017) düzeyinde, aynı çayların TP miktarlarından daha az miktarlarda TF tespit edilmiştir.

Hasat dönemi açısından, TF içeriği, TP ve RTA sonuçları ile paralellik göstermiş olup, en fazla her iki yıla ait Eylül döneminde toplanmış çay yapraklarında saptanmıştır. Bu durumun, TP bölümünde bahsedildiği gibi, Eylül ayına ait meteorolojik parametrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, 2020 yılı Eylül dönemi yapraklarının TF içeriğinin, 2019 yılı Eylül dönemine göre daha fazla olduğu gözlenmiştir.

AA; taze çay yaprağının, esas olarak polifenollerce zengin olmasına rağmen, vitamin ve mineraller açısından da önemli bir kaynak olduğu belirtilmektedir (Roshanak vd., 2016). AA, hem antioksidan aktiviteye (Park vd., 2009) sahip olması hem de çay yaprağının fenolik bileşikleri arasında yer alan rutin ile dolaşım sistemi üzerine sinerjik etkiye sahip olması (Jakubczyk vd., 2020) nedeniyle çay yaprağının önemli bileşenlerinden biridir. Ancak, çay yaprağının çaya işlenmesi sırasında, üretilen çay çeşidine göre değişen oranlarda parçalandığı hatta siyah çaydaki miktarının, tespit edilemeyecek düzeye düştüğü belirtilmektedir (S. D. Lin vd., 2014).



Şekil 4.5. Çay yaprağındaki askorbik aside ait HPLC kromatogramı

Yaprak örneklerinin AA miktarı HPLC analizi (Şekil 4.5) ile belirlenmiş olup, hasat yılı ve dönemine bağlı olarak 33,54-41,92 mg/100 g KM arasında değişkenlik göstermiştir (Çizelge 4.3). Hasat sonrası, farklı yöntemlerle kurutulan taze çay yaprağında bu çalışmadan elde edilen sonuçlardan daha düşük miktarda AA (10,00-16,36 mg/100 g KM) tespit edilmiştir (Roshanak vd., 2016). Diğer taraftan, Jakubczyk vd. (2020), matcha çayının su ekstraktlarında daha yüksek, 32,12-44,80 mg/L (183,54-256,00 mg/100 g KA'ya karşılık gelmektedir), AA saptamıştır. Sonuçlar arasında görülen bu farklılıklar, yaprak çeşidi, analiz öncesi uygulanan ekstraksiyon yöntemi ve analizin gerçekleştirildiği yöntemin (spektrofotometrik ya da kromatografik gibi) farklı olmasından kaynaklanabilmektedir. Örneğin; spektrofotometrik yöntemin hassasiyetinin, HPLC yönteminden daha az olması, sonucun olduğundan daha yüksek çıkmasına neden olmaktadır. Ayrıca, AA'nın, nemli ve oksijenli ortamlarda kolaylıkla okside olması (Zhao vd., 2012) nedeniyle, yaprağın maruz kaldığı koşullara bağlı olarak analiz öncesinde ve sırasında değişen oranlarda parçalanabileceği düşünülmektedir. Nitekim Das ve Eun, (2018), çaydan AA ekstraksiyonu sırasında, ekstraksiyon süre ve sıcaklığındaki artışla AA'nın azaldığını belirtmiştir.

Çay yaprağının AA içeriği üzerine, hasat yılının ve döneminin etkisi olmamasına rağmen (Çizelge 4.3), 2019 yılı için en yüksek AA içeriği Mayıs dönemi yaprağında 2020 yılı için de Temmuz dönemi çaylarda gözlenmiştir.

4.5. Taze Çay Yaprağının Bireysel Fenolik Bileşikleri

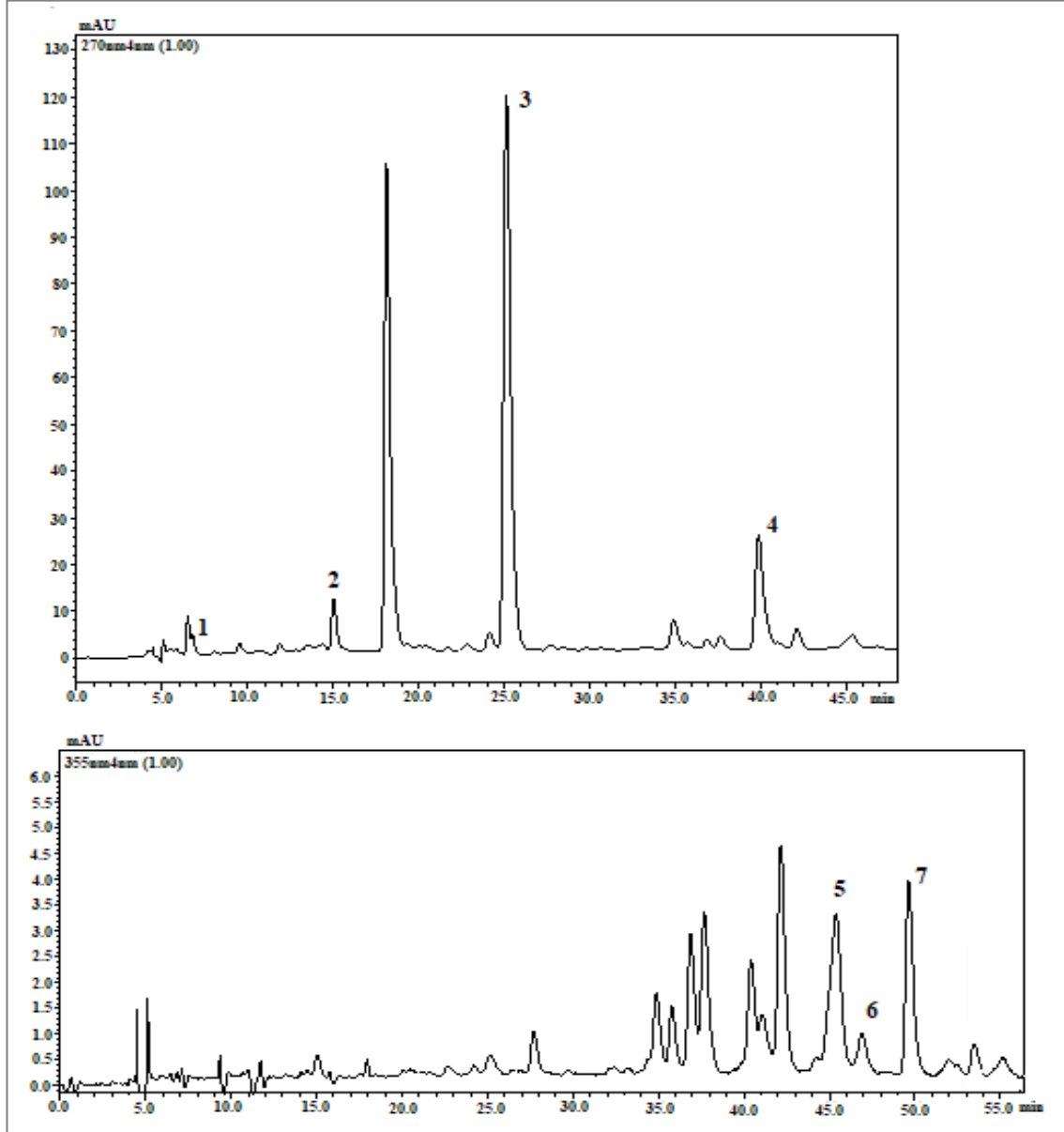
Çay yaprağı örneklerinin TP analizi sonucunda en yüksek TP içerdiği tespit edilen 2020 yılının Eylül dönemine ait çay yaprağında bireysel fenolik bileşikleri belirlemek amacıyla HPLC analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.6). Analiz sonucunda çay yaprağında fenolik asitlerden gallik asit (GA), kateşinleri (flavan-3-olları) oluşturan bileşiklerden EGC, EGCG ve ECG ve flavonol glikozidlerden Q3RG, Q3G ve K3RG tanımlanarak miktarları belirlenmiştir (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.7).

Çay yaprağında diğer fenolik bileşiklere göre en az düzeyde, GA (0,15 mg/g KM) tespit edilmiştir. Diğer taraftan, Jiang vd. (2019), taze çay yaprağında bu çalışmadan elde edilen GA miktarının yarısı kadar GA saptamıştır. GA'nın antioksidan aktivitesinin yüksek ve vücuda alındığında diğer polifenollere göre daha iyi absorbe olduğu belirtilmektedir (Vella vd., 2019).

Çay yaprağında kateşinlerden en fazla EGCG tespit edilmiş olup, onu sırasıyla EGC ve ECG izlemiştir (Çizelge 4.4). Bu sıralama, çayda kateşinlerin belirlenmesi üzerine, daha önce yapılan çalışmalar (Green vd., 2007; Rusak vd., 2008) ile uyum sağlamıştır. Y. L. Lin vd. (1996), mikrodalga fırında (110 V/60 Hz'de 1,5 dak) polifenol oksidaz (PPO) enzimini inaktive ettikten sonra, kurutulmuş (105 °C de 2 saat) taze çay yaprağında ve Gadkari vd. (2015), -20 °C'de dondurulmuş taze çay yaprağında kateşinlerden en fazla EGCG tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, Jiang vd. (2019), -80 °C'de muhafaza ettikleri taze çay yaprağında ve bundan elde ettikleri farklı çaylarda kateşinlerden en fazla EGCG tespit etmiştir. Araştırmacıların yaptıkları çalışmada, EGCG içeriği açısından taze çay yaprağı (30,9 mg/g) birinci sırada yer alırken bunu sırasıyla yeşil çay, sarı çay, beyaz çay, oolong çay ve siyah çay izlemiştir. EGCG, sağlık etkisi açısından tüm kateşinler içinde en yüksek antioksidan aktiviteye sahip kateşin olması (Dufresne & Farnworth, 2001; Higdon & Frei, 2003; Stewart vd., 2005) nedeniyle, çay ürünlerinde genellikle kalite indikatörü olarak kabul edilmektedir (L. S. Lee vd., 2013).

Çay yaprağında flavonol glikozitlerden en fazla K3RG tespit edilmiş olup, onu sırasıyla Q3RG ve Q3G izlemiştir (Çizelge 4.4). Çay yaprağının flavonol glikozitleri üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamakla beraber Somsong vd. (2020), taze çay yaprağında flavonol aglikon olarak sırasıyla en fazla kuersetin daha sonra kamferol ve

mirisetin tespit etmiştir. Sonuçlar arasındaki farklılık, çeşit, bölge, toprak bileşimi ve iklimin farklı olmasından kaynaklanabilmektedir. Ayrıca, Veljković vd. (2013), yeşil çayın su ekstraktında, bu çalışmadan elde edilen değerden daha düşük düzeyde (1,091 g/kg) rutin tespit etmişlerdir.



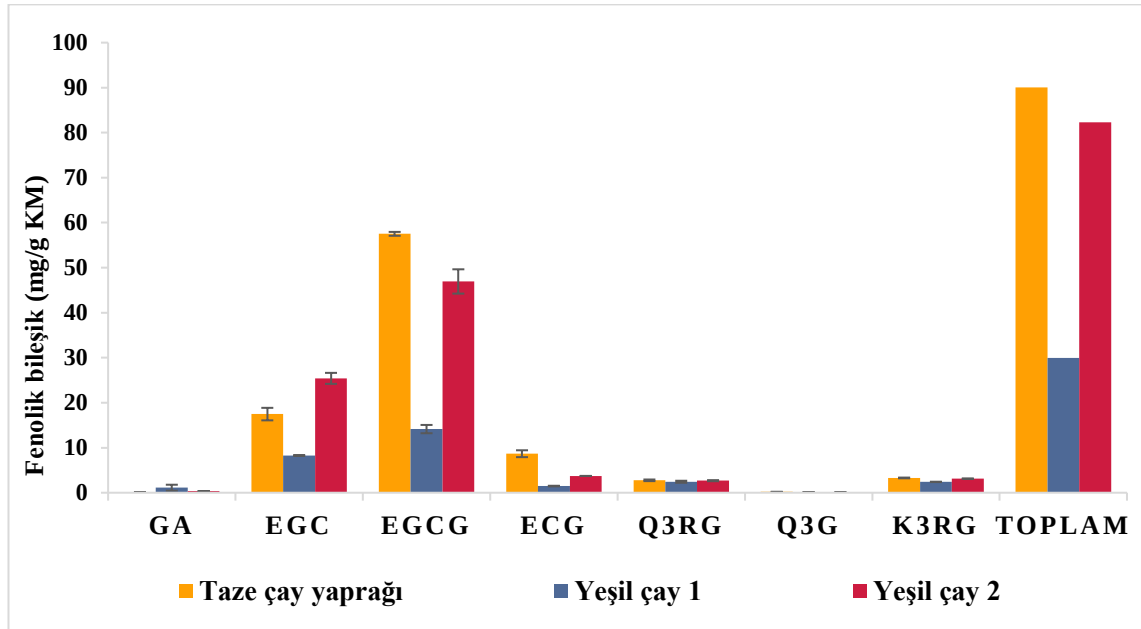
Şekil 4.6. Çay yaprağının fenolik bileşiklerine ait HPLC kromatogramları. Pikler: 1, GA; 2, EGC; 3, EGCG; 4, ECG; 5, Q3RG (rutin); 6, Q3G; 7, K3RG

Çizelge 4.4’de görüldüğü gibi çay yaprağının fenolik bileşikleri, referans olarak piyasadan temin edilen yeşil çay örnekleri ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Buna göre, toplam bireysel fenolik bileşik miktarının en fazla çay yaprağında tespit edilmiş

olması, çay yaprağının yeşil çaya işlenmeden zengin bir fenolik bileşik kaynağı olarak değerlendirilebileceğini göstermesi açısından oldukça anlamlıdır.

Çizelge 4.4. 2020 yılının Eylül ayında toplanmış taze çay yaprağı ve yeşil çayların bireysel fenolik bileşik miktarları (mg/g KM)

Fenolik bileşik	Taze çay yaprağı	Yeşil çay 1	Yeşil çay 2
GA	0,15 ± 0,01	1,12 ± 0,66	0,33 ± 0,01
EGC	17,47 ± 1,39	8,27 ± 0,10	25,41 ± 1,22
EGCG	57,52 ± 0,43	14,14 ± 0,92	46,94 ± 2,70
ECG	8,67 ± 0,76	1,48 ± 0,07	3,73 ± 0,01
Q3RG	2,76 ± 0,18	2,44 ± 0,22	2,68 ± 0,12
Q3G	0,19 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,01
K3RG	3,29 ± 0,08	2,41 ± 0,04	3,12 ± 0,06
Toplam	90,05	29,96	82,29



Şekil 4.7. 2020 yılı Eylül ayında toplanmış taze çay yaprağı ile yeşil çayların bireysel fenolik bileşik miktarlarının karşılaştırılması

4.6. Taze Çay Yaprağının TP ve RTA'nın Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemlerin Farklı Modifikasyonlarının Karşılaştırılması

FCR yöntemi, basitliği, herhangi bir ekipmanı gerektirmemesi ve tekrarlanabilirliğinin iyi olması nedeniyle biyolojik materyallerde TP analizi için yaygın olarak kullanılmaktadır (L. Y. Chen vd., 2015). Benzer şekilde, DPPH yöntemi de basit, hızlı, radikal stabilitesi yüksek ve ekonomik olması gibi nedenlerle gıdalardaki kimyasalların antioksidan aktivitesini değerlendirmek için sıklıkla kullanılmaktadır (X. Chen vd., 2020; Marinova & Batchvarov, 2011). Ancak bu yöntemlerin uygulanışına yönelik, literatürde çok fazla sayıda modifikasyona rastlanmaktadır. Bu durum, yapılan çalışmaların sonuçlarının karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada, aynı örneğe her iki yöntemin beş farklı modifikasyonu uygulanmış ve elde edilen sonuçların, farklılık düzeyi belirlenmiştir.

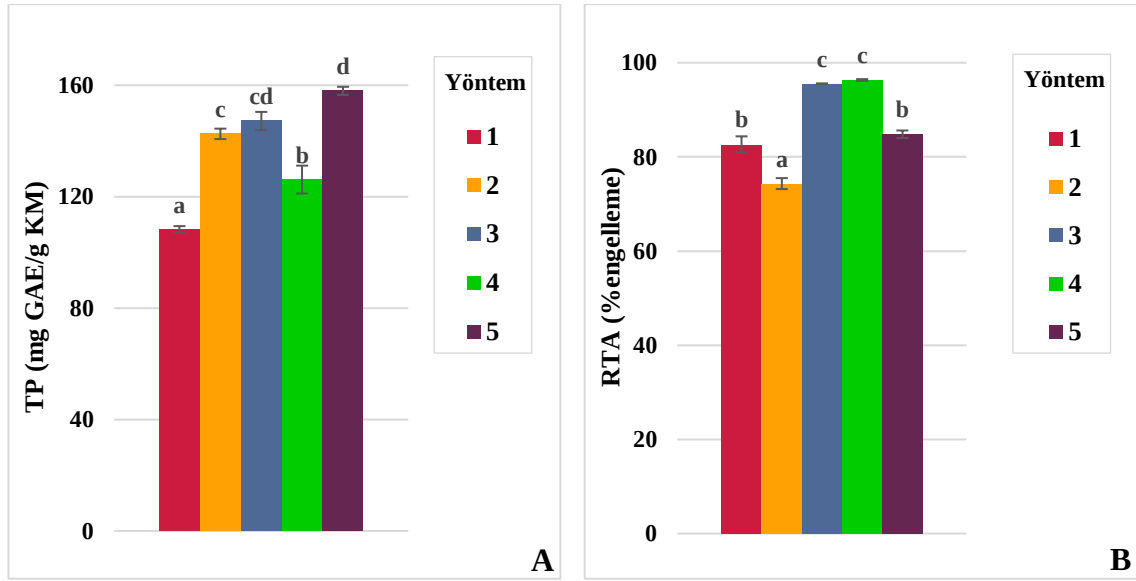
Çay yaprağına FCR'nin farklı modifikasyonlarının uygulanması sonucunda, TP miktarı 108,19-158,00 mg GAE/g KM arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.8). Bu durum, reaksiyon ortamını oluşturan kimyasal ve FC ayırıcının sıralamasının, konsantrasyonunun ve inkübasyon süre ve sıcaklığının TP sonucunu etkileyen önemli faktörler (Cicco vd., 2009) olması nedeniyle, uygulanan yöntemle bağlı olarak reaksiyon koşullarının farklı olmasından kaynaklanabilmektedir. Diğer taraftan, FCR yönteminin yukarıda bahsedilen avantajlarının yanı sıra fenolik bileşiklere spesifitesinin zayıf olması gibi bir dezavantajı vardır. Şöyle ki, FC ayırıcı sadece fenollerle reaksiyona girmeyip, fenolik madde olmayan ve gıdalarda sıklıkla bulunan organik asit, şeker, protein, demir iyonu ve sülfid gibi diğer indirgen özellikteki bileşiklerle de reaksiyona girebilmektedir (Bouayed vd., 2012; Magalhães vd., 2010). Bu durum, analiz edilen materyalde TP değerinin gerçekte olması gereken değerden daha yüksekmiş gibi sonuçlanmasına neden olmaktadır. Bütün bu nedenlerden dolayı, beş farklı yöntemin uygulanması sonucu elde edilen TP sonuçları, HPLC yönteminin daha hassas olması nedeniyle, Çizelge 4.5'de görülen aynı örneğe ait HPLC sonucu ile karşılaştırılmıştır. HPLC ile çay yaprağında tespit edilen fenolik bileşiklerin toplam miktarı 90,05 mg/g KM olup, spektrofotometrik olarak bulunan TP sonuçlarından daha düşüktür. Bu sonuç daha önceki çalışmaların (Park vd., 2009; Veljković vd., 2013) sonuçlarıyla uyum sağlamıştır. HPLC ile bulunan bu sonuca spektrofotometrik olarak

en yakın sonucu veren FCR yöntemi 1 olduğundan bu yöntemin daha güvenilir olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle bu çalışma kapsamında, örneklerin TP miktarlarını belirlemek için kullanılmıştır.

Çizelge 4.5. 2020 yılının Eylül ayında toplanmış taze çay yaprağının TP ve RTA'sının belirlenmesinde farklı yöntemlerin karşılaştırılması

FCR yöntemi	TP (mg GAE/g KM)	DPPH yöntemi	RTA (%engelleme)
1	108,19 ± 1,24 ^{a*}	1	82,63 ± 1,74 ^b
2	142,55 ± 1,87 ^c	2	74,33 ± 1,16 ^a
3	147,17 ± 3,26 ^{cd}	3	95,55 ± 0,05 ^c
4	126,13 ± 5,01 ^b	4	96,33 ± 0,19 ^c
5	158,00 ± 1,45 ^d	5	84,80 ± 0,81 ^b

*: Aynı sütundaki küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir (p<0,05).



Şekil 4.8. Farklı FCR (A) ve DPPH (B) yöntemlerinin karşılaştırılması

Çay yaprağına DPPH yönteminin farklı modifikasyonlarının uygulanması sonucunda, RTA değeri %74,33-96,33 arasında değişiklik göstermiştir. Bu durum, TP için uygulanan FCR yöntemlerinde olduğu gibi, uygulanan yönteme bağlı olarak reaksiyon koşullarının farklı olmasından kaynaklanabilmektedir. Marinova ve Batchvarov (2011), DPPH yönteminin, farklı solvent, radikal çözeltisi/ekstrakt oranı, radikal çözeltisi konsantrasyonu, süre ve dalga boyu kullanımı gibi farklı koşullarda uygulandığını ve solvent ile radikal çözeltisi/ekstrakt oranının, yöntemin doğruluğu üzerine önemli etkisi

olduğunu bildirmiştir. Bu çalışma kapsamında, yaprak ekstraktında antioksidan aktiviteyi belirlemek için, daha önce yapılan çalışmalarda (Türkmen Erol vd., 2009; Turkmen vd., 2006) TP miktarı ile uyumlu sonuç vermesi nedeniyle DPPH yöntemi 1 kullanılmıştır.

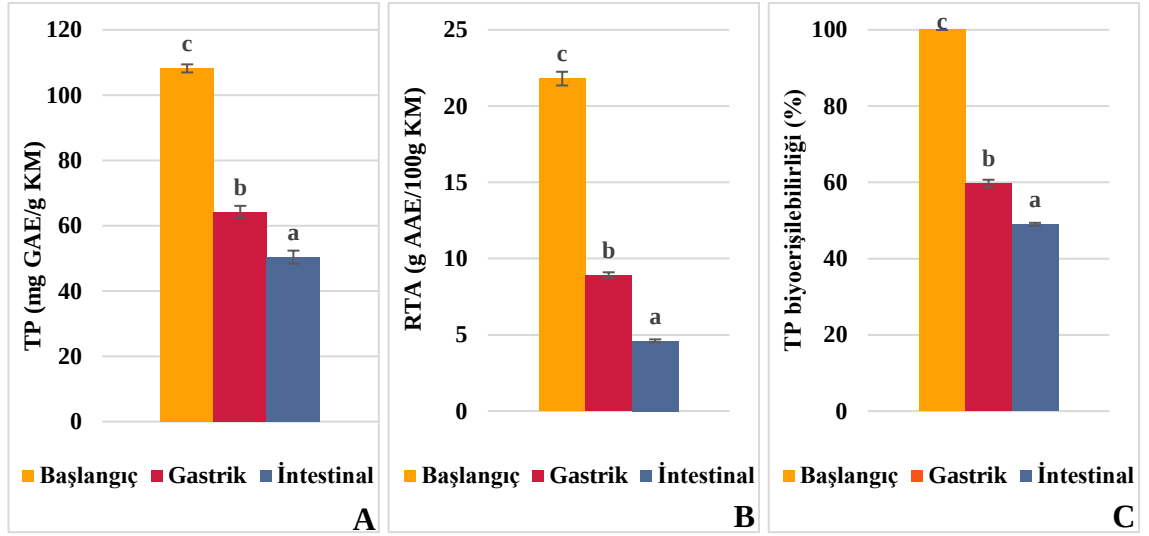
4.7. *In-vitro* Sindirimin Taze Çay Yapağıının TP ve RTA Üzerine Etkisi

2020 yılı Eylül dönemine ait çay yapağı ekstraktının, başlangıç ve sindirim sonrasındaki TP ve RTA değerleri Çizelge 4.6 ve Şekil 4.9’da verilmiştir. Görüldüğü gibi, TP ve RTA değerleri, sindirim sonrasında benzer bir eğilim göstermiş olup, her ikisi de başlangıç değerlerine göre, önemli düzeyde azalmıştır ($p<0,05$) (Çizelge 4.6). TP ve RTA değerlerinde en fazla düşüş, intestinal aşamada tespit edilmiştir. Bu durum, intestinal sindirim sırasındaki alkali ortamdan dolayı, polifenollerin stabilitesinin daha düşük olmasıyla ilişkilendirilmektedir (Fawole & Opara, 2016). Polifenollerin sindirim sırasındaki azalmasında; 1) polifenollerin, farklı kimyasal özellikleri olan farklı formlara dönüşmesi, 2) kalıntı çözünmüş oksijen, yüksek pH veya reaktif oksijen türlerinin varlığında görülen epimerizasyon ve otooksidasyon ve 3) polifenollerin gıdanın yapısındaki diğer bileşiklerle olan etkileşiminin rolü olduğu belirtilmektedir (Donlao & Ogawa, 2018; Laib vd., 2021).

Çizelge 4.6. Taze çay yapağıının TP (mg GAE/g KM), RTA (g AAE/ 100g KM) ve TP biyoerişilebilirliği (%)

	Sindirim Aşaması		
	Başlangıç	Gastrik	İntestinal
TP	108,19 ± 1,24 ^{c*}	64,29 ± 1,81 ^b	50,40 ± 1,99 ^a
RTA	21,80 ± 0,45 ^c	8,92 ± 0,18 ^b	4,60 ± 0,100 ^a
TP biyoerişilebilirliği	100,00 ± 0,00 ^c	59,67 ± 1,02 ^b	48,98 ± 0,40 ^a

*: Aynı satırdaki küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir ($p<0,05$).



Şekil 4.9. Taze çay yaprağının *in-vitro* sindirimine ait TP (A), RTA (B) ve TP biyoerişilebilirliği (C) grafikleri

Taze çay yaprağı polifenollerinin ve antioksidan aktivitesinin sindirim sonrası değişimi üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu konuda yapılan sınırlı çalışmalar, yeşil çay polifenollerinin değişimi üzerine yoğunlaşmıştır. Rodrigues Silva vd. (2021) ile Shu vd. (2019), yeşil çay polifenollerinin biyoerişilebilirliğini, bu çalışmadan elde edilen sonuca (%48,98) göre daha düşük, sırasıyla %25,9 ve %9,69-15,57 olarak tespit etmişlerdir. Diğer taraftan, Donlao ve Ogawa (2018), yeşil çayın farklı infüzyonlarındaki polifenollerin çoğunun gastrik ve intestinal sindirim aşamasında stabil olduğunu ve en fazla %6,12 oranında bir azalma görüldüğünü ancak antioksidan aktivitenin daha fazla etkilenerek, en fazla %25,7 oranında azalma görüldüğünü bildirmişlerdir. Green vd.'ne (2007) göre, gastrik ve intestinal sindirim sonrasında, yeşil çayın su ekstraktındaki toplam kateşinlerde, en fazla EGC ve EGCG'de olmak üzere, yaklaşık %80,4 oranında azalma görülmüştür. Araştırmacılar, en fazla azalmanın intestinal aşamada olduğunu belirtmişlerdir.

TP ve dolayısıyla antioksidan aktivitenin, gastrointestinal sindirim sonrasında azalması, daha önce farklı gıdalarla yapılan çalışmalarda da ortaya konmuştur. Bouayed vd. (2012), ortalama 44,42 mg/100 g taze ağırlık düzeyinde TP içeren dört farklı elma çeşidinin gastrik aşama sonrası TP içeriğinin 35,95 mg/100 g taze ağırlık, pankreatik aşama sonrası ise 21,84 mg/100 g taze ağırlık düzeyine düştüğünü belirtmişlerdir. Benzer şekilde, on farklı ceviz çeşidinin TP ve RTA değerleri *in-vitro* sindirim

sonrasında, başlangıç değerlerine göre sırasıyla ortalama %74,1 ve %77 oranında azalmıştır (Figueroa vd., 2016). Ancak, bu sonuçlardan farklı olarak, S. Wang vd. (2017), *in-vitro* sindirimin üzüm posasının TP ve RTA üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında, gastrik aşama sonrasında, bu değerlerin sindirim öncesi değerlerine göre değişmediğini, intestinal aşama sonrasında ise azaldığını bildirmiştir. Nar ürünleri ve atıkları ile yapılan bir çalışmanın sonucuna göre de, başlangıç TP ve RTA değerleri *in-vitro* sindirim sonrasında, araştırmada kullanılan materyale ve ekstraksiyon çözeltisine göre farklı eğilimler göstermiştir. Her iki aşama sonunda TP miktarlarında, hem azalma hem artış görülürken, RTA değerlerinde, gastrik aşama sonunda azalma, intestinal aşama sonunda ise artış gözlenmiştir (Fawole & Opara, 2016). Sonuçlar arasındaki bu farklılıkların, materyallerdeki polifenollerin stabilitelerinin ve *in-vitro* sindirim koşullarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada, taze çay yaprağının biyoaktif bileşikleri üzerine hasat yılı ve döneminin etkisi belirlenmiştir. Çay yapraklarından, Yanıt Yüzey Yöntemi kullanılarak belirlenen optimum koşullarda yapılmış polifenol ekstraksiyonu sonucunda, 2020 yılının Eylül ayında toplanmış yaprakların TP, RTA ve TF içeriği daha yüksek bulunmuştur. Bu yaprakların fenolik bileşik olarak en fazla EGCG içerdiği tespit edilmiştir. Çay yapraklarında bulunan diğer bir biyoaktif bileşik olan AA'nın miktarı da hasat yılı ve dönemine göre değişkenlik göstermiştir. Örneklerin TP ve RTA'nın belirlenmesinde, aynı zamanda literatürde en çok kullanılan FCR ve DPPH yöntemlerinin farklı modifikasyonları da karşılaştırılmıştır. Yöntemler arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar gözlenmiştir ($p<0,05$). Çay yaprağının, TP ve RTA değerleri, *in-vitro* sindirim sonrasında, en fazla intestinal aşamada olmak üzere önemli oranda azalmıştır ($p<0,05$). Bu çalışma, uygun dönemde toplanan çay yaprağının, yeşil çaya işlemeden sadece gölgede kurutulmasıyla önemli bir polifenol kaynağı olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

- Aboulwafa, M. M., Youssef, F. S., Gad, H. A., Altyar, A. E., Al-Azizi, M. M., & Ashour, M. L. (2019). A comprehensive insight on the health benefits and phytoconstituents of *Camellia sinensis* and recent approaches for its quality control. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(10), 455. <https://doi.org/10.3390/antiox8100455>
- Abudurehman, B., Yu, X., Fang, D., & Zhang, H. (2022). Enzymatic oxidation of Tea catechins and its mechanism. *Molecules*, 27(3), 942. <https://doi.org/10.3390/molecules27030942>
- Agarwal, U., Pathak, D. P., Bhutani, R., Kapoor, G., & Kant, R. (2017). Review on *Camellia sinensis*–Nature’s gift. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 9(8), 1119–1126. <https://doi.org/10.25258/phyto.v9i08.9619>
- Aherne, S. A., & O’Brien, N. M. (2002). Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism chemistry and structure of the flavonoids. *Nutrition*, 18(1), 75–81.
- Ahmad, N. A., Jumbri, K., Ramli, A., Ghani, N. A., Ahmad, H., & Lim, J. W. (2018). A kinetic approach of DPPH free radical assay of ferulate-based protic ionic liquids (PILs). *Molecules*, 23(12), 3201. <https://doi.org/10.3390/molecules23123201>
- Ahmed, S., Stepp, J. R., Orians, C., Griffin, T., Matyas, C., Robbat, A., Cash, S., Xue, D., Long, C., Unachukwu, U., Buckley, S., Small, D., & Kennelly, E. (2014). Effects of extreme climate events on tea (*Camellia sinensis*) functional quality validate indigenous farmer knowledge and sensory preferences in Tropical China. *PLoS ONE*, 9(10), e109126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109126>
- Albuquerque, B. R., Heleno, S. A. 8., Oliveira, M. B. P. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2020). Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. *Food and Function*, 12(1), 14–29. <https://doi.org/10.1039/d0fo02324h>
- Alikılıç, D. (2016). Çay’ın karadeniz bölgesi için önemi ve tarihi seyri. *Karadeniz İncelemeleri Dergisi*, 21, 269–280.
- Aloui, F., Nefzi, A., Jedidi, S., Selmi, H., Hasnaoui, F., Dallali, S., Bouraou, H., Mouhbi, R., & Abbes, C. (2020). Phytochemical analysis and in vitro digestibility evaluation of leaf and cones parts of *Cupressus sempervirens* originating from Tunisia. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*, 71(2), 4311–4318.
- Amado, I. R., Franco, D., Sánchez, M., Zapata, C., & Vázquez, J. A. (2014). Optimisation of antioxidant extraction from *Solanum tuberosum* potato peel waste by surface response methodology. *Food Chemistry*, 165, 290–299. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.201505.103>
- Ashihara, H., Deng, W. W., Mullen, W., & Crozier, A. (2010). Distribution and biosynthesis of flavan-3-ols in *Camellia sinensis* seedlings and expression of genes encoding biosynthetic enzymes. *Phytochemistry*, 71(5–6), 559–566. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.01.010>
- Aydin, S., Tokaç, D., Başaran, N., & Başaran, A. A. (2015). Effect of epigallocatechin gallate on oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(1), 19–28.
- Bai, X. L., Guo, W. H., Liu, S. H., Li, C. W., & Kong, J. H. (2018). Effects of different concentrations of Folin reagent on the test results of tea polyphenols. *Journal of*

- Food Safety and Quality*, 9(21), 5637–5641.
- Balci, F., & Özdemir, F. (2016). Influence of shooting period and extraction conditions on bioactive compounds in Turkish green tea. *Food Science and Technology, Campinas*, 36(4), 737–743. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.17016>
- Bancuta, O. R., Chilian, A., Bancuta, I., Ion, R. M., Setnescu, R., Setnescu, T., & Gheboianu, A. (2016). Improvement of spectrophotometric method for determination of phenolic compounds by statistical investigations. *Romanian Journal of Physics*, 61(7–8), 1255–1264.
- Bandara, S. N. (2012). *Agronomy of irrigated tea in low elevation growing areas of Sri Lanka* [Doktora Tezi, Adelaide Üniversitesi]. Adelaide Research & Scholarship. <https://hdl.handle.net/2440/78732>
- Barizão, É. O., Martins, A. C., Ercoli, L., Kvitschal, M. V., Silva, R., Pezoti Junior, O., Visentainer, J. V., & de Cinque Almeida, V. (2013). Optimization of antioxidant compounds extraction from flesh of new developed apple cultivar using response surface methodology. *Food Analytical Methods*, 6(5), 1407–1415. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9558-4>
- Barreira, S., Moutinho, C., Silva, A. M. N., Neves, J., Seo, E. J., Hegazy, M. E. F., Efferth, T., & Gomes, L. R. (2021). Phytochemical characterization and biological activities of green tea (*Camellia sinensis*) produced in the Azores, Portugal. *Phytomedicine Plus*, 1(1), 100001. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2020.100001>
- Barreira, S., Silva, A. M. N., Moutinho, C., Seo, E. J., Hegazy, M. E. F., Efferth, T., & Gomes, L. R. (2022). Effect of extraction methodology on the phytochemical composition for *Camelia sinensis* “Powdered Tea Extracts” from different provenances. *Beverages*, 8(1), 13. <https://doi.org/10.3390/beverages8010013>
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). Sugars, sugar alcohols and honey. In *Food chemistry* (4. baskı, s. 862-891). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-07279-0_20
- Bhandari, K., De, B., & Goswami, T. K. (2019). chemometrics assisted validated HPLC method detecting seasonal variances of secondary metabolites of *Camellia sinensis* considering the abiotic stresses. *World Journal of Biology and Biotechnology*, 4(2), 9–15. <https://doi.org/10.33865/wjb.004.02.0212>
- Bhattacharya, T., Dey, P. S., Akter, R., Kabir, T., Rahman, H., & Rauf, A. (2021). Effect of natural leaf extracts as phytomedicine in curing geriatrics. *Experimental Gerontology*, 150, 111352. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2021.111352>
- Bhutia, P. H., Sharangi, A. B., Lepcha, R., & Tamang, D. (2015). Bioactive compounds and antioxidant properties of Tea: Status, global research and potentialities. *Journal of Tea Science Research*, 5(11), 1–13. <https://doi.org/10.5376/2015.05.0011>
- Bindes, M. M. M., Cardoso, V. L., Reis, M. H. M., & Boffito, D. C. (2019). Maximisation of the polyphenols extraction yield from green tea leaves and sequential clarification. *Journal of Food Engineering*, 241, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.08.006>
- Bouayed, J., Deußer, H., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry*, 131(4), 1466–1472. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.030>
- Bruneton, B. (2009). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* (4. baskı). Technique & Documentation.

- Cabrera, C., Giménez, R., & López, M. C. (2003). Determination of tea components with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4427–4435. <https://doi.org/10.1021/jf0300801>
- Camargo, L. E. A., Pedroso, L. S., Vendrame, S. C., Mainardes, R. M., & Khalil, N. M. (2016). Antioxidant and antifungal activities of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze leaves obtained by different forms of production. *Brazilian Journal of Biology*, 76(2), 428–434. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.18814>
- Can Agca, A., Batcioglu, K., & Sarer, E. (2020). Evaluation on gallic acid, EGCG contents and antiradical activity of green tea and black tea extracts. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 44(1), 50–60. <https://doi.org/10.33483/jfpau.644407>
- Carloni, P., Tiano, L., Padella, L., Bacchetti, T., Customu, C., Kay, A., & Damiani, E. (2013). Antioxidant activity of white, green and black tea obtained from the same tea cultivar. *Food Research International*, 53(2), 900–908. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.057>
- Chaturvedula, V. S. P., & Prakash, I. (2011). The aroma, taste, color and bioactive constituents of tea. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(11), 2110–2124.
- Chaudhuri, L., Basu, S., Seth, P., Chaudhuri, T., Besra, S. E., Vedasiromoni, J. R., & Ganguly, D. K. (2000). Prokinetic effect of black tea. *Life Sciences*, 66(9), 847–854.
- Chen, D., Chen, G., Sun, Y., Zeng, X., & Ye, H. (2020). Physiological genetics, chemical composition, health benefits and toxicology of tea (*Camellia sinensis* L.) flower: A review. *Food Research International*, 137, 109584. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109584>
- Chen, L. Y., Cheng, C. W., & Liang, J. Y. (2015). Effect of esterification condensation on the Folin-Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chemistry*, 170, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.038>
- Chen, X., Liang, L., & Han, C. (2020). Borate suppresses the scavenging activity of gallic acid and plant polyphenol extracts on DPPH radical: A potential interference to DPPH assay. *LWT-Food Science and Technology*, 131, 109769. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109769>
- Chen, Y., Jiang, Y., Duan, J., Shi, J., Xue, S., & Kakuda, Y. (2010). Variation in catechin contents in relation to quality of “Huang Zhi Xiang” Oolong tea (*Camellia sinensis*) at various growing altitudes and seasons. *Food Chemistry*, 119(2), 648–652. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.014>
- Chen, Y., Yu, M., Xu, J., Chen, X., & Shi, J. (2009). Differentiation of eight tea (*Camellia sinensis*) cultivars in China by elemental fingerprint of their leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(14), 2350–2355. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3716>
- Chen, Z. M., & Lin, Z. (2015). Tea and human health: biomedical functions of tea active components and current issues. *Journal of Zhejiang University: Science B*, 16(2), 87–102. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1500001>
- Chira, K., Suh, J. H., Saucier, C., & Teissèdre, P. L. (2008). Grape phenolics. *Phytothérapie*, 6(2), 75–82. <https://doi.org/10.1007/s10298-008-0293-3>
- Cho, H., Cho, E., Jung, H., Yi, H. C., Lee, B., & Hwang, K. T. (2014). Antioxidant activities of sea buckthorn leaf tea extracts compared with green tea extracts. *Food Science and Biotechnology*, 23(4), 1295–1303. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0178-1>

- Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M., & Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, 91(1), 107–110. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2008.08.011>
- Collin, S., & Crouzet, J. (2011). *Polyphénols et procédés: Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agroalimentaire*. Tec & Doc.
- Cooper, R., Morré, D. J., & Morré, D. M. (2005). Medicinal benefits of green tea : Part I . *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 11(3), 521–528.
- Daglia, M., Antiochia, R., Sobolev, A. P., & Mannina, L. (2014). Untargeted and targeted methodologies in the study of tea (*Camellia sinensis* L.). *Food Research International*, 63, 275–289. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.070>
- Dai, W., Qi, D., Yang, T., Lv, H., Guo, L., Zhang, Y., Zhu, Y., Peng, Q., Xie, D., Tan, J., & Lin, Z. (2015). Nontargeted analysis using Ultraperformance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry uncovers the effects of harvest season on the metabolites and taste quality of tea (*Camellia sinensis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(44), 9869–9878. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03967>
- Dang, T. M. L. (2015). *Indication géographique au Vietnam : Cas du thé vert Tan Cuong, Thai Nguyen* [Doktora Tezi, Liège Üniversitesi]. ORBi. <https://hdl.handle.net/2268/188939>
- Das, P. R., & Eun, J. B. (2018). A comparative study of ultra-sonication and agitation extraction techniques on bioactive metabolites of green tea extract. *Food Chemistry*, 253, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.080>
- de Moura, C., Kabbas Junior, T., Pedreira, F. R. de O., Azevedo, L., Furtado, M. M., Sant'Ana, A. S., Franchin, M., Gonzaga, V. R., Cui, Y., Wen, M., Zhang, L., Pereira, R. P., & Granato, D. (2022). Purple tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) leaves as a potential functional ingredient: From extraction of phenolic compounds to cell-based antioxidant/biological activities. *Food and Chemical Toxicology*, 159, 112668. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112668>
- Deka, H., Barman, T., Dutta, J., Devi, A., Tamuly, P., Kumar Paul, R., & Karak, T. (2021). Catechin and caffeine content of tea (*Camellia sinensis* L.) leaf significantly differ with seasonal variation: A study on popular cultivars in North East India. *Journal of Food Composition and Analysis*, 96, 103684. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103684>
- Ding, Z. J., Shi, Y. Z., Li, G. X., Harberd, N. P., & Zheng, S. J. (2021). Tease out the future: How tea research might enable crop breeding for acid soil tolerance. *Plant Communications*, 2(3), 100182. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100182>
- Donlao, N., & Ogawa, Y. (2018). Impacts of processing conditions on digestive recovery of polyphenolic compounds and stability of the antioxidant activity of green tea infusion during in vitro gastrointestinal digestion. *LWT-Food Science and Technology*, 89, 648–656. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.051>
- Donlao, N., & Ogawa, Y. (2019). The influence of processing conditions on catechin, caffeine and chlorophyll contents of green tea (*Camelia sinensis*) leaves and infusions. *LWT-Food Science and Technology*, 116, 108567. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108567>
- Dufresne, C. J., & Farnworth, E. R. (2001). A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 12(7), 404–421. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(01\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(01)00155-3)

- El-Seedi, H. R., El-Said, A. M. A., Khalifa, S. A. M., Göransson, U., Bohlin, L., Borg-Karlson, A. K., & Verpoorte, R. (2012). Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(44), 10877–10895. <https://doi.org/10.1021/jf301807g>
- El Gharras, H. (2009). Polyphenols: food sources, properties and applications-a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), 2512–2518. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2009.02077.x>
- Elmas, C., & Gezer, C. (2019). Çay bitkisinin (*Camellia sinensis*) bileşimi ve sağlık etkileri. *Akademik Gıda*, 17(3), 417–428. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.647733>
- Engelhardt, U. H. (2013). Chemistry of tea. In Reedijk, J. (Ed.), *Reference module in chemistry, molecular sciences and chemical engineering*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.02784-0>
- Erturk, Y., Ercisli, S., Sengul, M., Eser, Z., Haznedar, A., & Turan, M. (2010). Seasonal variation of total phenolic, antioxidant activity and minerals in fresh tea shoots (*Camellia sinensis* var. *sinensis*). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1), 69–74.
- Fang, Z. T., Yang, W. T., Li, C. Y., Li, D., Dong, J. J., Zhao, D., Xu, H. R., Ye, J. H., Zheng, X. Q., Liang, Y. R., & Lu, J. L. (2021). Accumulation pattern of catechins and flavonol glycosides in different varieties and cultivars of tea plant in China. *Journal of Food Composition and Analysis*, 97, 103772. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103772>
- Fawole, O. A., & Opara, U. L. (2016). Stability of total phenolic concentration and antioxidant capacity of extracts from pomegranate co-products subjected to in vitro digestion. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16, 358. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1343-2>
- Feng, L., Gao, M. J., Hou, R. Y., Hu, X. Y., Zhang, L., Wan, X. C., & Wei, S. (2014). Determination of quality constituents in the young leaves of albino tea cultivars. *Food Chemistry*, 155, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.044>
- Figuerola, F., Marhuenda, J., Zafrilla, P., Martínez-Cachá, A., Mulero, J., & Cerdá, B. (2016). Total phenolics content, bioavailability and antioxidant capacity of 10 different genotypes of walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Food and Nutrition Research*, 55(3), 229–236.
- Fisunoğlu, M., & Besler, H. T. (2008). *Çay ve sağlık ilişkisi* (Yayın 727). Sağlık Bakanlığı. <https://www.halksagligiokulu.org/Kitap/DownloadEBook/2e4c33f2-f826-42d9-bc3e-d53fb1ccc0a0>
- Fourneau, C., Laurens, A., Hocquemiller, R., & Cavé, A. (1996). Radical scavenging evaluation of green tea extracts. *Phytotherapy Research*, 10(6), 529–530. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199609\)10:6<529::AID-PTR887>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199609)10:6<529::AID-PTR887>3.0.CO;2-F)
- Gadkari, P. V., Balarman, M., & Kadimi, U. S. (2015). Polyphenols from fresh frozen tea leaves (*Camellia assamica* L.) by supercritical carbon dioxide extraction with ethanol entrainer-application of response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 720–730. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1085-9>
- Ghabru, A., & Sud, R. G. (2017). Variations in phenolic constituents of green tea [*Camellia sinensis* (L) O Kuntze] due to changes in weather conditions. *Journal of*

- Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(5), 1553–1557.
- Gomikawa, S., & Ishikawa, Y. (2002). Effects of catechins and ground green tea drinking on the susceptibility of plasma and LDL to the oxidation in vitro and ex vivo. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 32, 55–68. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.32.55>
- Gonbad, R. A., Afzan, A., Karimi, E., Sinniah, U. R., & Swamy, M. K. (2015). Phytoconstituents and antioxidant properties among commercial tea (*Camellia sinensis* L.) clones of Iran. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(6), 433–438. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.08.007>
- Gonçalves Bortolini, D., Windson Isidoro Haminiuk, C., Cristina Pedro, A., de Andrade Arruda Fernandes, I., & Maria Maciel, G. (2021). Processing, chemical signature and food industry applications of *Camellia sinensis* teas: An overview. *Food Chemistry: X*, 12, 100160. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100160>
- Gramza-Michałowska, A., Kobus-Cisowska, J., Kmiecik, D., Korczak, J., Helak, B., Dziedzic, K., & Górecka, D. (2016). Antioxidative potential, nutritional value and sensory profiles of confectionery fortified with green and yellow tea leaves (*Camellia sinensis*). *Food Chemistry*, 211, 448–454. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.048>
- Gramza, A., Khokhar, S., Yoko, S., Gliszczynska-Swiglo, A., Hes, M., & Korczak, J. (2006). Antioxidant activity of tea extracts in lipids and correlation with polyphenol content. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(4), 351–362. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200500330>
- Gramza, A., & Korczak, J. (2005). Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Science and Technology*, 16(8), 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.02.004>
- Green, R. J., Murphy, A. S., Schulz, B., Watkins, B. A., & Ferruzzi, M. G. (2007). Common tea formulations modulate in vitro digestive recovery of green tea catechins. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(9), 1152–1162. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700086>
- Gunathilake, K. D. P. P., Ranaweera, K. K. D. S., & Rupasinghe, H. P. V. (2019). Response surface optimization for recovery of polyphenols and carotenoids from leaves of *Centella asiatica* using an ethanol-based solvent system. *Food Science and Nutrition*, 7(2), 528–536. <https://doi.org/10.1002/fsn3.832>
- Guo, L., Guo, J., Zhu, W., & Jiang, X. (2016). Optimized synchronous extraction process of tea polyphenols and polysaccharides from Huaguoshan Yunwu tea and their antioxidant activities. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.08.001>
- Han, C. W., Ma, M., Zhang, H. H., Li, M., & Sun, Q. J. (2020). Progressive study of the effect of superfine green tea, soluble tea, and tea polyphenols on the physico-chemical and structural properties of wheat gluten in noodle system. *Food Chemistry*, 308(2020), 125676. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125676>
- Han, W. Y., Huang, J. G., Li, X., Li, Z. X., Ahammed, G. J., Yan, P., & Stepp, J. R. (2017). Altitudinal effects on the quality of green tea in east China: a climate change perspective. *European Food Research and Technology*, 243(2), 323–330. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2746-5>
- He, Q., Lv, Y., Zhou, L., & Shi, B. (2010). Simultaneous determination of caffeine and catechins in tea extracts by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 33(4), 491–498. <https://doi.org/10.1080/10826070903574469>

- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572–584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- Henning, S. M., Fajardo-Lira, C., Lee, H. W., Youssefian, A. A., Go, V. L. W., & Heber, D. (2003). Catechin content of 18 teas and a green tea extract supplement correlates with the antioxidant capacity. *Nutrition and Cancer*, 45(2), 226–235. <https://doi.org/10.1207/S15327914NC4502>
- Higdon, J. V., & Frei, B. (2003). Tea catechins and polyphenols: Health Effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(1), 89–143. <http://dx.doi.org/10.1080/10408690390826464>
- Hilal, Y. (2017). Morphology, Manufacturing, Types, Composition and Medicinal Properties of Tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Basic & Applied Plant Sciences*, 1(2), 107.
- Hithamani, G., & Srinivasan, K. (2018). Polyphenols in our food: Phytochemicals with promising health benefits. *Dream 2047*, 21(1), 28–31.
- Ho, C. T., Zheng, X., & Li, S. (2015). Tea aroma formation. *Food Science and Human Wellness*, 4(1), 9–27. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.04.001>
- Hollman, P. C., & Arts, I. C. (2000). Flavonols, flavones and flavanols-Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1081–1093. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1081::AID-JSFA566>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1081::AID-JSFA566>3.0.CO;2-G)
- Hong, J., Kim, H. J., & Kim, J. Y. (2011). Factors affecting reactivity of various phenolic compounds with the folin-ciocalteu reagent. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 40(2), 205–213. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2011.40.2.205>
- Hosen, M., Karmokar, N., Bhuiyan, M., Khanam, J., & Rahman, M. (2014). Estimation of caffeine, niacin and calorie content in tea commonly consumed by Dhaka city residents. *Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research*, 2(4), 84–88. <https://doi.org/10.30750/ijpbr.2.4.14>
- Intergovernmental Group on Tea. (2022). Current global market situation and emerging issues. In *committee on commodity problems* (CCP:TE 22/CRS 1). Food and Agriculture Organization of The United Nations. <https://www.fao.org/3/ni282/ni282.pdf>
- International Organization for Standardization. (2005). *Determination of substances characteristic of green and black tea—Part 1: Content of total polyphenols in tea—Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent* (ISO Standard No. 14502-1: 2005). <https://www.iso.org/standard/31356.html>
- Jabeen, S., Alam, S., Saleem, M., Ahmad, W., Bibi, R., Hamid, F. S., & Shah, H. U. (2015). Withering timings affect the total free amino acids and mineral contents of tea leaves during black tea manufacturing. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 2411–2417. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.03.011>
- Jakubczyk, K., Kochman, J., Kwiatkowska, A., Kałdunska, J., Dec, K., Kawczuga, D., & Janda, K. (2020). Antioxidant properties and nutritional composition of matcha green tea. *Foods*, 9(4), 483. <https://doi.org/10.3390/foods9040483>
- Jiang, H., Yu, F., Qin, L., Zhang, N., Cao, Q., Schwab, W., Li, D., & Song, C. (2019). Dynamic change in amino acids, catechins, alkaloids, and gallic acid in six types of tea processed from the same batch of fresh tea (*Camellia sinensis* L.) leaves. *Journal of Food Composition and Analysis*, 77, 28–38.

- <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.01.005>
- Jin, J. Q., Yao, M. Z., Ma, C. L., Ma, J. Q., & Chen, L. (2016). Association mapping of caffeine content with TCS1 in tea plant and its related specie. *Plant Physiology and Biochemistry*, 105, 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.032>
- Kalam, S., Singh, R., Khan, F. N., Mani, A., Patel, J., Khan, N., & Pandey, A. (2012). Antioxidants: elixir of life. *International Multidisciplinary Research Journal*, 2(1), 18–34.
- Karaca, H., & Velioglu, Y. S. (2020). Effects of ozone and chlorine washes and subsequent cold storage on microbiological quality and shelf life of fresh parsley leaves. *LWT-Food Science and Technology*, 127, 109421. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109421>
- Khokhar, S., & 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(3), 565–570. <https://doi.org/10.1021/jf010153l>
- Kingori, S. M., Ochanda, S. O., Kipsura, E. J., & Titus, K. (2019). Effects of processing technologies on the levels of chlorogenic acid, gallic acid and theanine in selected kenyan tea cultivars by HPLC-PDA. *Journal of Food Science and Nutrition Research*, 2(1), 38–48. <https://doi.org/10.26502/jfsnr.2642-1100007>
- Kingori, S. M., Ochanda, S. O., & Koech, R. K. (2021). Variation in levels of flavonols myricetin, quercetin and kaempferol—In kenyan tea (*Camellia sinensis* L.) with processed tea types and geographic location. *Open Journal of Applied Sciences*, 11(6), 736–749. <https://doi.org/10.4236/ojapps.2021.116054>
- Koch, W., Kukula-Koch, W., Komsta, Ł., Marzec, Z., Szwer, W., & Głowniak, K. (2018). Green tea quality evaluation based on its catechins and metals composition in combination with chemometric analysis. *Molecules*, 23(7), 1689. <https://doi.org/10.3390/molecules23071689>
- Kochman, J., Jakubczyk, K., Antoniewicz, J., Mruk, H., & Janda, K. (2020). Health benefits and chemical composition of matcha green tea: A Review. *Molecules*, 26(1). <https://doi.org/10.3390/molecules26010085>
- Kowalski, R., & Kowalska, G. (2005). Phenolic acid contents in fruits of aubergine (*Solanum melongena* L.). *Polish journal of food and nutrition sciences*, 14/55(1), 37–42.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 16275. <https://doi.org/10.2307/j.ctt1w0ddx8.35>
- Lafay, S., & Gil-Izquierdo, A. (2008). Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 301–311. <https://doi.org/10.1007/s11101-007-9077-x>
- Laib, I., Kehal, F., Arris, M., Maameri, M. I., Lachlah, H., Bensouici, C., Mosbah, R., Houasnia, M., & Barkat, M. (2021). Effect of in vitro gastrointestinal digestion on phenolic compounds and the antioxidant activity of *Camellia sinensis* L. green tea from organic farming. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 35(3), 212–221. <https://doi.org/10.1016/j.nupar.2020.12.003>
- Langley-Evans, S. C. (2000). Consumption of black tea elicits an increase in plasma antioxidant potential in humans. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 51(5), 309–315. <https://doi.org/10.1080/096374800426902>
- Lee, C. H., Hwang, K. E., Kim, H. W., Song, D. H., Kim, Y. J., Ham, Y. K., Choi, Y. S., Jang, S. J., Jeong, T. J., & Kim, C. J. (2016). Antioxidant activity of brown

- soybean ethanolic extracts and application to cooked pork patties. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36(3), 359–368. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.3.359>
- Lee, L. S., Kim, S. H., Kim, Y. B., & Kim, Y. C. (2014). Quantitative analysis of major constituents in green tea with different plucking periods and their antioxidant activity. *Molecules*, 19(7), 9173–9186. <https://doi.org/10.3390/molecules19079173>
- Lee, L. S., Lee, N., Kim, Y. H., Lee, C. H., Hong, S. P., Jeon, Y. W., & Kim, Y. E. (2013). Optimization of ultrasonic extraction of phenolic antioxidants from green tea using response surface methodology. *Molecules*, 18(11), 13530–13545. <https://doi.org/10.3390/molecules181113530>
- Lee, M. K., Kim, H. W., Lee, S. H., Kim, Y. J., Asamenew, G., Choi, J., Lee, J. W., Jung, H. A., Yoo, S. M., & Kim, J. B. (2019). Characterization of catechins, theaflavins, and flavonols by leaf processing step in green and black teas (*Camellia sinensis*) using UPLC-DAD-QToF/MS. *European Food Research and Technology*, 245(5), 997–1010. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3201-6>
- Legrand, G. (2015). *Contribution à la caractérisation du métabolisme des acides chlorogéniques chez la chicorée : approches biochimique et moléculaire* (Yayın No. 930605533) [Doktora Tezi, Lille 1 Üniversitesi]. Worldcat. <https://www.worldcat.org/search?q=no%3A930605533>
- Leung, L. K., Su, Y., Chen, R., Zhang, Z., Huang, Y., & Chen, Z. Y. (2001). Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *Journal of Nutrition*, 131(9), 2248–2251. <https://doi.org/10.1093/jn/131.9.2248>
- Li, Q., Li, J., Liu, S., Huang, J., Lin, H., Wang, K., Cheng, X., & Liu, Z. (2015). A comparative proteomic analysis of the buds and the young expanding leaves of the tea plant (*Camellia sinensis* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 14007–14038. <https://doi.org/10.3390/ijms160614007>
- Li, S., Lo, C. Y., Pan, M. H., Lai, C. S., & Ho, C. T. (2013). Black tea: Chemical analysis and stability. *Food and Function*, 4(1), 10–18. <https://doi.org/10.1039/c2fo30093a>
- Liang, Y., Lu, J., Zhang, L., Wu, S., & Wu, Y. (2003). Estimation of black tea quality by analysis of chemical composition and colour difference of tea infusions. *Food Chemistry*, 80(2), 283–290. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1953>
- Liao, S., Kao, Y. H., & Hiipakka, R. A. (2001). Green tea: Biochemical and biological basis for health benefits. *Vitamins and Hormones*, 62, 1–94. [https://doi.org/10.1016/s0083-6729\(01\)62001-6](https://doi.org/10.1016/s0083-6729(01)62001-6)
- Lin, J. K., & Lin-Shiau, S. Y. (2006). Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50(2), 211–217. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500138>
- Lin, S. D., Udornpormmongkol, P., Yang, J. H., Chen, S. Y., & Mau, J. L. (2014). Quality and antioxidant property of three types of tea infusions. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(4), 1401–1408. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12099>
- Lin, Y. L., Juan, I. M., Chen, Y. L., Liang, Y. C., & 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(6), 1387–1394. <https://doi.org/10.1021/jf950652k>
- Lin, Y. S., Tsai, Y. J., Tsay, J. S., & Lin, J. K. (2003). Factors affecting the levels of tea

- polyphenols and caffeine in tea leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 1864–1873. <https://doi.org/10.1021/jf021066b>
- Liu, L., Chen, L., Abbasi, A. M., Wang, Z., Li, D., & Shen, Y. (2018). Optimization of extraction of polyphenols from Sorghum Moench using response surface methodology, and determination of their antioxidant activities. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 17(4), 619–626. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v17i4.8>
- Liu, Z., Bruins, M. E., de Bruijn, W. J. C., & Vincken, J. P. (2020). A comparison of the phenolic composition of old and young tea leaves reveals a decrease in flavanols and phenolic acids and an increase in flavonols upon tea leaf maturation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 86, 103385. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103385>
- Liu, Z. Q., Ma, L. P., Zhou, B., Yang, L., & Liu, Z. L. (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(1), 53–63. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(00\)00133-X](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(00)00133-X)
- Lu, Y., Guo, W. F., & Yang, X. Q. (2004). Fluoride content in tea and its relationship with tea quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4472–4476. <https://doi.org/10.1021/jf0308354>
- Łuczaj, W., & Skrzydlewska, E. (2005). Antioxidative properties of black tea. *Preventive Medicine*, 40(6), 910–918. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2004.10.014>
- Luo, X. Y., Li, N. N., & Liang, Y. R. (2012). Effects of *Ilex latifolia* and *Camellia sinensis* on cholesterol and circulating immune complexes in rats fed with a high-cholesterol diet. *Phytotherapy Research*, 27(1), 62–65. <https://doi.org/10.1002/ptr.4693>
- Lutz, M., Hernández, J., & Henríquez, C. (2015). Phenolic content and antioxidant capacity in fresh and dry fruits and vegetables grown in Chile. *CyTA-Journal of Food*, 13(4), 541–547. <https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1012743>
- Macheix, J.-J., Fleuriet, F. & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique*. Presses Polytechniques et universitaires romandes. https://ulyse.univ-lorraine.fr/permalink/33UDL_INST/1suc3pr/alma991005009729705596
- Magalhães, L. M., Santos, F., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. (2010). Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*, 83(2), 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.09.042>
- Mahmood, T., Akhtar, N., & Khan, B. A. (2010). The morphology, characteristics, and medicinal properties of *Camellia sinensis*’ tea. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(19), 2028–2033. <https://doi.org/10.5897/jmpr10.010>
- Mandel, S., Amit, T., Reznichenko, L., Weinreb, O., & Youdim, M. B. H. (2006). Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50(2), 229–234. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500156>
- Marinova, G., & Batchvarov, V. (2011). Evaluation of The methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 17(1), 11–24.
- Martillanes, S., Rocha-Pimienta, J., Cabrera-Bañegil, M., Martín-Vertedor, D., & Delgado-Adámez, J. (2017). Application of phenolic compounds for food preservation: Food additive and active packaging. In M. Soto-Hernandez,

- M. Palma-Tenango, & M. d. R. Garcia-Mateos (Eds.), *Phenolic compounds-Biological activity* (s. 39–58). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/66885>
- Masek, A., Chrzescijanska, E., Latos, M., Zaborski, M., & Podsedek, A. (2017). Antioxidant and antiradical properties of green tea extract compounds. *International Journal of Electrochemical Science*, 12(7), 6600–6610. <https://doi.org/10.20964/2017.07.06>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Monobe, M., Nomura, S., Ema, K., Matsunaga, A., Nesumi, A., Yoshida, K., Maeda-Yamamoto, M., & Horie, H. (2015). Quercetin glycosides-rich tea cultivars (*camellia sinensis* L.) in Japan. *Food Science and Technology Research*, 21(3), 333–340. <https://doi.org/10.3136/fstr.21.333>
- Mukhopadhyay, M., & Mondal, T. K. (2017). Cultivation, improvement, and environmental impacts of tea. In *Oxford research encyclopedia of environmental science*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acrefore/9780199389414.013.373>
- Murray, M. T., & Nowicki, J. (2020). 60 – *Camellia sinensis* (green tea). In Pizzorno, J. E. & Murray, M. T. (Eds.), *Natural medicine* (5. baskı, s. 465–469.e1). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-43044-9.00060-1>
- Musa, K. H., & Abdulla, A. (2009, Ocak 1). *Effect of time and temperature on Folin-Ciocalteu index* [Conference presentation abstract]. The annals of nutrition and metabolism.
- Musial, C., Kuban-Jankowska, A., & Gorska-Ponikowska, M. (2020). Beneficial properties of green tea catechins. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1744. <https://doi.org/10.3390/ijms21051744>
- Namita, P., Mukesh, R., & Vijay, K. J. (2012). *Camellia sinensis* (green tea): A review. *Global Journal of Pharmacology*, 6(2), 52–59.
- Nandagopalan, V., Balamurugan, T., & Lakshmi prabha, A. (2014). Impact of modernization of harvesting in tea plantation to improve the productivity and quality (*Camellia* spp.). *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8(9), 55–59. <https://doi.org/10.9790/2402-08935559>
- Nian, B., Chen, L., Yi, C., Shi, X., Jiang, B., Jiao, W., Liu, Q., Lv, C., Ma, Y., & Zhao, M. (2019). A high performance liquid chromatography method for simultaneous detection of 20 bioactive components in tea extracts. *Electrophoresis*, 40(21), 2837–2844. <https://doi.org/10.1002/elps.201900154>
- Nishitani, E., & 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(5), 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.09.009>
- Obanda, M., Okinda Owuor, P., & 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(4), 395–404. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00223-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00223-0)
- Obanda, M., Owuor, P. O., Mang’oka, R., & 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(2), 163–173. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00183-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00183-8)
- Obanda, M., Owuor, P. O., & Taylor, S. J. (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(2), 209–215. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0010\(199706\)74:2<209::aid-jsfa789>3.3.co;2-w](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0010(199706)74:2<209::aid-jsfa789>3.3.co;2-w)
- Ölmez, H., & Yilmaz, A. (2010). Changes in chemical constituents and polyphenol oxidase activity of tea leaves with shoot maturity and cold storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34(SUPPL. 2), 653–665. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2009.00423.x>
- Paiva, L., Lima, E., Motta, M., Marccone, M., & Baptista, J. (2020). Variability of antioxidant properties, catechins, caffeine, L-theanine and other amino acids in different plant parts of Azorean *Camellia sinensis*. *Current Research in Food Science*, 3, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2020.07.004>
- Park, J. H., Lee, J. M., Cho, Y. J., Kim, C. T., Kim, C. J., Nam, K. C., & Lee, S. C. (2009). Effect of far-infrared heater on the physicochemical characteristics of green tea during processing. *Journal of Food Biochemistry*, 33(2), 149–162. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2008.00203.x>
- Perva-Uzunalić, A., Škerget, M., Knez, Ž., Weinreich, B., Otto, F., & Grüner, S. (2006). Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chemistry*, 96(4), 597–605. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.015>
- Polat, E., Karaman, A., & Öğüt, S. (2020). Çayın kardiyovasküler hastalıklar üzerine etkisi. *Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 17(1), 131–136. <https://doi.org/10.25308/aduziraat.658756>
- Prasanth, M. I., Sivamaruthi, B. S., Chaiyasut, C., & Tencomnao, T. (2019). A review of the role of green tea (*Camellia sinensis*) in antiphotaging, stress resistance, neuroprotection, and autophagy. *Nutrients*, 11(2), 474. <https://doi.org/10.3390/nu11020474>
- Preedy, V. R. (2012). *Tea in health and disease prevention*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-64948-0>
- Priyandoko, D., Widowati, W., Kusuma, H. S. W., Afifah, E., Wijayanti, C. R., Wahyuni, C. D., Idris, A. M., Putdayani, R. A., & Rizal, R. (2021, Temmuz 14–16). *Antioxidant activity of green tea extract and myricetin*, [Conference presentation abstract]. 2021 IEEE International Conference on Health, Instrumentation & Measurement, and Natural Sciences (InHeNce), Medan, Indonesia. <https://ieeexplore.ieee.org/document/9537285>
- Qu, F., Zeng, W., Tong, X., Feng, W., Chen, Y., & Ni, D. (2020). The new insight into the influence of fermentation temperature on quality and bioactivities of black tea. *LWT-Food Science and Technology*, 117, 108646. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108646>
- Ramírez-Aristizabal, L. S., Ortiz, A., Restrepo-Aristizabal, M. F., & Salinas-Villada, J. F. (2017). Comparative study of the antioxidant capacity in green tea by extraction at different temperatures of four brands sold in Colombia. *Vitae*, 24(2), 132–145. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v24n2a06>
- Rashidinejad, A., Birch, E. J., & Everett, D. W. (2016). The behaviour of green tea catechins in a full-fat milk system under conditions mimicking the cheesemaking

- process. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67(6), 624–631. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1195797>
- Rashidinejad, A., Boostani, S., Babazadeh, A., Rehman, A., Rezaei, A., Akbari-Alavijeh, S., Shaddel, R., & Jafari, S. M. (2021). Opportunities and challenges for the nanodelivery of green tea catechins in functional foods. *Food Research International*, 142, 110186. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110186>
- Ravichandran, R., & Parthiban, R. (1998). The impact of mechanization of tea harvesting on the quality of south Indian CTC teas. *Food Chemistry*, 63(1), 61–64. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00219-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00219-7)
- Rawal, H. C., Borchetia, S., Bera, B., Soundararajan, S., Ilango, R. V. J., Barooah, A. K., Sharma, T. R., Singh, N. K., & Mondal, T. K. (2021). Comparative analysis of chloroplast genomes indicated different origin for indian tea (*Camellia assamica* cv TV1) as compared to chinese tea. *Scientific Reports*, 11(1), 110. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80431-w>
- Ren, T., Zheng, P., Zhang, K., Liao, J., Xiong, F., Shen, Q., Ma, Y., Fang, W., & Zhu, X. (2021). Effects of GABA on the polyphenol accumulation and antioxidant activities in tea plants (*Camellia sinensis* L.) under heat-stress conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 159, 363–371. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.01.003>
- Renla, T., & Ajungla, T. (2017). *Camellia sinensis* (L.) O. kuntze and its beneficial soil microflora. *Innovare Journal of Life Sciences*, 5(1), 1–4.
- Reto, M., Almeida, C., Rocha, J., Sepodes, B., & Figueira, M.-E. (2014). Green Tea (*Camellia sinensis*): Hypocholesterolemic effects in humans and anti-inflammatory effects in animals. *Food and Nutrition Sciences*, 5(22), 2185–2194. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.522231>
- Rha, C. S., Jeong, H. W., Park, S., Lee, S., Jung, Y. S., & Kim, D. O. (2019). Antioxidative, anti-inflammatory, and anticancer effects of purified flavonol glycosides and aglycones in green tea. *Antioxidants*, 8, 278. <https://doi.org/10.3390/antiox8080278>
- Rhodes, L. E., Darby, G., Massey, K. A., Clarke, K. A., Dew, T. P., Farrar, M. D., Bennett, S., Watson, R. E. B., Williamson, G., & Nicolaou, A. (2013). Oral green tea catechin metabolites are incorporated into human skin and protect against UV radiation-induced cutaneous inflammation in association with reduced production of pro-inflammatory eicosanoid 12-hydroxyeicosatetraenoic acid. *British Journal of Nutrition*, 110(5), 891–900. <https://doi.org/10.1017/S0007114512006071>
- Richelle, M., Tavazzi, I., & Offord, E. (2001). Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3438–3442. <https://doi.org/10.1021/jf0101410>
- Riciputi, Y., Diaz-de-Cerio, E., Akyol, H., Capanoglu, E., Cerretani, L., Caboni, M. F., & Verardo, V. (2018). Establishment of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from industrial potato by-products using response surface methodology. *Food Chemistry*, 269, 258–263. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.154>
- Rodrigues, M. J., Neves, V., Martins, A., Rauter, A. P., Neng, N. R., Nogueira, J. M. F., Varela, J., Barreira, L., & Custódio, L. (2016). *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties of Limonium algarvense flowers' infusions and decoctions: A comparison with green tea (*Camellia sinensis*). *Food Chemistry*,

- 200, 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.048>
- Rodrigues Silva, F. M., Ribeiro da Silva, L. M., Gomes Duarte, A. S., da Silva Monteiro, C. E., Campos, A. R., Rodrigues Holanda, D. K., Silva de Lima, A. C., Bruno de Sousa Sabino, L., & Wilane de Figueiredo, R. (2021). Microencapsulation of green tea extract (*Camellia sinensis* var *assamica*) to increase the bioaccessibility of bioactive compounds and gastroprotective effects. *Food Bioscience*, 42, 101190. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101190>
- Roshanak, S., Rahimmalek, M., & Goli, S. A. H. (2016). Evaluation of seven different drying treatments in respect to total flavonoid, phenolic, vitamin C content, chlorophyll, antioxidant activity and color of green tea (*Camellia sinensis* or *C. assamica*) leaves. *Journal of Food Science and Technology*, 53(1), 721–729. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2030-x>
- Rusak, G., Komes, D., Likić, S., Horžić, D., & Kovač, M. (2008). Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*, 110(4), 852–858. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.072>
- Sabhapondit, S., Karak, T., Bhuyan, L. P., Goswami, B. C., & Hazarika, M. (2012). Diversity of catechin in Northeast Indian Tea cultivars. *The Scientific World Journal*, 2012, 485193. <https://doi.org/10.1100/2012/485193>
- Sablania, V., Bosco, S. J. D., & Bashir, M. (2019). Extraction process optimization of *Murraya koenigii* leaf extracts and antioxidant properties. *Journal of Food Science and Technology*, 56(12), 5500–5508. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04022-y>
- Saeed, M., Khan, M. S., Kamboh, A. A., Alagawany, M., Khafaga, A. F., Noreldin, A. E., Kumar, M., Safdar, M., Hussain, M., Abd El-Hack, M. E., & Chao, S. (2020). L-theanine: an astounding sui generis amino acid in poultry nutrition. *Poultry Science*, 99(11), 5625–5636. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.07.016>
- Sajilata, M. G., Bajaj, P. R., & Singhal, R. S. (2008). Tea polyphenols as nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(3), 229–254. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2008.00043.x>
- Sakanaka, S., Juneja, L. R., & Taniguchi, M. (2000). Antimicrobial Effects of Green Tea Polyphenols on Thermophilic Spore-Forming Bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90(1), 81–85. <https://doi.org/10.1263/jbb.90.81>
- Salman, S., & Özdemir, F. (2018). Beyaz Çay: Üretimi, bileşimi ve sağlık üzerine etkileri. *Akademik Gıda*, 16(2), 218–223. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.449867>
- Samynathan, R., Shanmugam, K., Nagarajan, C., Murugasamy, H., Ilango, R. V. J., Shanmugam, A., Venkidasamy, B., & Thiruvengadam, M. (2021). The effect of abiotic and biotic stresses on the production of bioactive compounds in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Plant Gene*, 27, 100316. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2021.100316>
- Sari, F. (2010). *Çay işlemede teanin miktarının değişimi* [Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi]. Ankara Üniversitesi Akademik Arşiv Sistemi. <https://dspace.ankara.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12575/34489>
- Sari, F., & Velioglu, Y. S. (2011). Effects of particle size, extraction time and temperature, and derivatization time on determination of theanine in tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(8), 1130–1135. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.04.003>
- Sateanchok, S., Wangkarn, S., Saenjum, C., & Grudpan, K. (2018). A cost-effective

- assay for antioxidant using simple cotton thread combining paper based device with mobile phone detection. *Talanta*, 177, 171–175. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.073>
- Sentkowska, A., & Pyrzynska, K. (2018). Investigation of antioxidant interaction between Green tea polyphenols and acetaminophen using isobolographic analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 159, 393–397. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.07.029>
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects-A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820–897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- Sharma, V., Joshi, R., & Gulati, A. (2011). Seasonal clonal variations and effects of stresses on quality chemicals and prephenate dehydratase enzyme activity in tea (*Camellia sinensis*). *European Food Research and Technology*, 232(2), 307–317. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1379-3>
- Shi, J., Xie, D., Qi, D., Peng, Q., Chen, Z., Schreiner, M., Lin, Z., & Baldermann, S. (2019). Methyl jasmonate-induced changes of flavor profiles during the processing of green, oolong, and black tea. *Frontiers in Plant Science*, 10, 781. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00781>
- Shrivastava, R. R., Pateriya, P., & Singh, M. (2018). Green tea-A short review. *International Journal of Indigenous Herbs and Drugs*, 3(2), 12–21.
- Shu, Y., Li, J., Yang, X., Dong, X., & Wang, X. (2019). Effect of particle size on the bioaccessibility of polyphenols and polysaccharides in green tea powder and its antioxidant activity after simulated human digestion. *Journal of Food Science and Technology*, 56(3), 1127–1133. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03573-4>
- Singh, V., Kumar Verma, D., & Singh, G. (2014). Processing Technology and Health Benefits of Green Tea. *Popular Kheti*, 2(1), 23–30.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.11.004>
- Sirichaiwetchakoon, K., Lowe, G. M., & Eumkeb, G. (2020). The free radical scavenging and anti-isolated human LDL oxidation activities of *Pluchea indica* (L.) Less. Tea compared to green tea (*Camellia sinensis*). *BioMed Research International*, 2020, 4183643. <https://doi.org/10.1155/2020/4183643>
- Sirisa-Ard, P., Peerakam, N., Sutheeponhwirot, S., Shimamura, T., & Kiatkarun, S. (2017). Biological evaluation and application of fermented Miang (*Camellia sinensis* var. *assamica* (J.W.Mast.) Kitam.) for tea production. *Journal of Food and Nutrition Research*, 5(1), 48–53. <https://doi.org/10.12691/jfnr-5-1-8>
- Somsong, P., Santivarangkna, C., Tiayon, P., Hsieh, C. M., & Srichamnong, W. (2020). Assessing polyphenol components and antioxidant activity during fermented assam tea ball processing. *Sustainability*, 12(14), 5853. <https://doi.org/10.3390/su12145853>
- Stangl, V., Lorenz, M., & Stangl, K. (2006). The role of tea and tea flavonoids in cardiovascular health. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50(2), 218–228. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500118>
- Stewart, A. J., Mullen, W., & 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(1), 52–60.

<https://doi.org/10.1002/mnfr.200400064>

- Strati, I. F., Kostomitsopoulos, G., Lytras, F., Zoumpoulakis, P., Proestos, C., & Sinanoglou, V. J. (2018). Optimization of polyphenol extraction from allium ampeloprasum var. porrum through response surface methodology. *Foods*, 7, 162. <https://doi.org/10.3390/foods7100162>
- Swarnalatha, G., Nath, B. S., Naik, N. L., Amaladhas, P. H., & Emerald, F. M. E. (2021). Therapeutic potential of green tea catechins-A magical herb. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 10(2), 3560–3571. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2021.1002.392>
- Tang, P., Shen, D. Y., Xu, Y. Q., Zhang, X. C., Shi, J., & Yin, J. F. (2018). Effect of fermentation conditions and plucking standards of tea leaves on the chemical components and sensory quality of fermented juice. *Journal of Chemistry*, 2018, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2018/4312875>
- Thippeswamy, R., Gouda, K. G. M., Rao, D. H., Martin, A., & Gowda, L. R. (2006). Determination of theanine in commercial tea by liquid chromatography with fluorescence and diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7014–7019. <https://doi.org/10.1021/jf061715+>
- Tomás-Barberán, F. A., & Clifford, M. N. (2000). Dietary hydroxybenzoic acid derivatives—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1024–1032. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1118::AID-JSFA570>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1118::AID-JSFA570>3.0.CO;2-9)
- Topuz, A., Dinçer, C., Torun, M., Tontul, I., Şahin-Nadeem, H., Haznedar, A., & Özdemir, F. (2014). Physicochemical properties of Turkish green tea powder: Effects of shooting period, shading, and clone. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 38(2), 233–241. <https://doi.org/10.3906/tar-1307-17>
- Tosun, İ., & Karadeniz, B. (2005). Çay ve çay fenoliklerinin antioksidan aktivitesi. *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20(1), 78–83.
- Tounekti, T., Joubert, E., Hernández, I., & Munné-Bosch, S. (2013). Improving the polyphenol content of tea. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 32(3), 192–215. <https://doi.org/10.1080/07352689.2012.747384>
- Truong, V. L., & Jeong, W. S. (2021). Cellular defensive mechanisms of tea polyphenols: Structure-activity relationship. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9109. <https://doi.org/10.3390/ijms22179109>
- Tungmunnithum, D., Thongboonyou, A., Pholboon, A., & Yangsabai, A. (2018). Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. *Medicines*, 5(3), 93. <https://doi.org/10.3390/medicines5030093>
- Turkmen, N., Sari, F., & 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(4), 835–841. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.034>
- Türkmen Erol, N., Sari, F., Polat, G., & Velioglu, Y. S. (2009). Antioxidant and antibacterial activities of various extracts and fractions of fresh tea leaves and green tea. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 15(4), 371–378. https://doi.org/10.1501/tarimbil_0000001113
- Türkmen, N. (2007). *Farklı sınıf çaylarda kıvrırma proseslerinin ve değişik hasat dönemlerinin çayın fenolik madde ve alkaloid bileşimine etkisi* [Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi]. Ankara Üniversitesi Akademik Arşiv Sistemi.

<https://dspace.ankara.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12575/34319>

- Unachukwu, U. J., Ahmed, S., Kavalier, A., Lyles, J. T., & Kennelly, E. J. (2010). White and green teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*): Variation in phenolic, methylxanthine, and antioxidant profiles. *Journal of Food Science*, 75(6), 541–548. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01705.x>
- Vastrad, J. V., Badanayak, P., & Goudar, G. (2021). Phenolic compounds in tea: Phytochemical, biological, and therapeutic applications. In *Phenolic compounds-Chemistry, synthesis, diversity, non-conventional industrial, pharmaceutical and therapeutic applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.98715>
- Veljković, J. N., Pavlović, A. N., Mitić, S. S., Tošić, S. B., Stojanović, G. S., Kalićanin, B. M., Stanković, D. M., Stojković, M. B., Mitić, M. N., & Brcanović, J. M. (2013). Evaluation of individual phenolic compounds and antioxidant properties of black, green, herbal and fruit tea infusions consumed in Serbia: Spectrophotometrical and electrochemical approaches. *Journal of Food and Nutrition Research*, 52(1), 12–24.
- Vella, F. M., De Masi, L., Calandrelli, R., Morana, A., & Laratta, B. (2019). Valorization of the agro-forestry wastes from Italian chestnut cultivars for the recovery of bioactive compounds. *European Food Research and Technology*, 245(12), 2679–2686. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03379-w>
- Vishnoi, H., Bodla, R. B., & Kant, R. (2018). Green tea (*Camellia sinensis*) and its antioxidant property: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(5), 1723–1736. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9\(5\).1723-36](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.9(5).1723-36)
- Wambulwa, M. C., Meegahakumbura, M. K., Kamunya, S., & Wachira, F. N. (2021). From the wild to the cup: tracking footprints of the tea species in time and space. *Frontiers in Nutrition*, 8, 706770. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.706770>
- Wang, D., Lu, J., Miao, A., Xie, Z., & Yang, D. (2008). HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis of polyphenols and purine alkaloids in leaves of 22 tea cultivars in China. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(5), 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.01.002>
- Wang, H., Provan, G. J., & Helliwell, K. (2000). Tea flavonoids: Their functions, utilisation and analysis. *Trends in Food Science and Technology*, 11(4–5), 152–160. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)00061-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)00061-3)
- Wang, L. Y., Wei, K., Jiang, Y. W., Cheng, H., Zhou, J., He, W., & Zhang, C. C. (2011). Seasonal climate effects on flavanols and purine alkaloids of tea (*Camellia sinensis* L.). *European Food Research and Technology*, 233(6), 1049–1055. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1588-4>
- Wang, S., Amigo-Benavent, M., Mateos, R., Bravo, L., & Sarriá, B. (2017). Effects of in vitro digestion and storage on the phenolic content and antioxidant capacity of a red grape pomace. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 68(2), 188–200. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1228099>
- Wang, Y., Cui, Q., Jin, S., Zhuo, C., Luo, Y., Yu, Y., Ning, J., & Zhang, Z. (2022). Tea Analyzer: A low-cost and portable tool for quality quantification of postharvest fresh tea leaves. *LWT-Food Science and Technology*, 159, 113248. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113248>
- Wang, Y., Kan, Z., Thompson, H. J., Ling, T., Ho, C. T., Li, D., & Wan, X. (2019). The impact of six typical processing methods on the chemical composition of tea leaves using a single *Camellia sinensis* cultivar, Longjing 43. *Journal of Agricultural and*

- Food Chemistry*, 67(19), 5423–5436. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05140>
- Wei, K., Wang, L., Zhou, J., He, W., Zeng, J., Jiang, Y., & Cheng, H. (2011). Catechin contents in tea (*Camellia sinensis*) as affected by cultivar and environment and their relation to chlorophyll contents. *Food Chemistry*, 125(1), 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.029>
- Wheeler, D. S., & Wheeler, W. J. (2004). The Medicinal Chemistry of Tea. *Drug Development Research*, 61(2), 45–65. <https://doi.org/10.1002/ddr.10341>
- Wojtunik-Kulesza, K., Oniszczuk, A., Oniszczuk, T., Combrzyński, M., Nowakowska, D., & Matwijczuk, A. (2020). Influence of in vitro digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols—a non-systematic review. *Nutrients*, 12(5), 1401. <https://doi.org/10.3390/nu12051401>
- Wright, L. P., Mphangwe, N. I. K., Nyirenda, H. E., & Apostolides, Z. (2000). 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*, 80(13), 1823–1830. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1074>
- Wu, C., Xu, H., Hérítier, J., & Andlauer, W. (2012). Determination of catechins and flavonol glycosides in chinese tea varieties. *Food Chemistry*, 132(1), 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.045>
- Wu, X., Zhu, J., Wu, B., Sun, J., & Dai, C. (2018). Discrimination of tea varieties using FTIR spectroscopy and allied Gustafson-Kessel clustering. *Computers and Electronics in Agriculture*, 147, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.02.014>
- Wu, Y., Jiang, X., Zhang, S., Dai, X., Liu, Y., Tan, H., Gao, L., & Xia, T. (2016). Quantification of flavonol glycosides in *Camellia sinensis* by MRM mode of UPLC-QQQ-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 1017–1018, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.01.064>
- Yao, L., Jiang, Y., Datta, N., Singanusong, R., Liu, X., Duan, J., Raymont, K., Lisle, A., & 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(2), 253–263. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00209-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00209-7)
- Yassin, G. H., Koek, J. H., & Kuhnert, N. (2015). Model system-based mechanistic studies of black tea thearubigin formation. *Food Chemistry*, 180, 272–279. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.108>
- Yen, G. C., & Duh, P. Der. (1994). Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(3), 629–632. <https://doi.org/10.1021/jf00039a005>
- Yin, J.-F., Min, H., Xu, Y.-Q., Yuan, H.-B., & Wei, K.-K. (2008). Effects of spreading environment on tea polyphenols and catechin components in tea fresh leaves of high quality green tea. *Journal of Tea Science*, 28(1), 22–27.
- Yu, M., Gouvínhas, I., Rocha, J., & Barros, A. I. R. N. A. (2021). Phytochemical and antioxidant analysis of medicinal and food plants towards bioactive food and pharmaceutical resources. *Scientific Reports*, 11(1), 10041. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89437-4>
- Yurteri, E., Ozcan, A., & Seyis, F. (2019). Tea (*Camellia sinensis*) Cultivation and Breeding in Turkey: Past and Present Status. *Ekin Journal of Crop Breeding and Genetics*, 5(2), 111–119.
- Zardo, I., de Espíndola Sobczyk, A., Marczak, L. D. F., & Sarkis, J. (2019). Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from

- sunflower seed cake using response surface methodology. *Waste and Biomass Valorization*, 10(1), 33–44. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0038-3>
- Zderic, A., & Zondervan, E. (2016). Polyphenol extraction from fresh tea leaves by pulsed electric field: A study of mechanisms. *Chemical Engineering Research and Design*, 109, 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2016.03.010>
- Zhang, H., Qi, R., & Mine, Y. (2019). The impact of oolong and black tea polyphenols on human health. *Food Bioscience*, 29, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.03.009>
- Zhang, Q., Li, T., Wang, Q., LeCompte, J., Harkess, R. L., & Bi, G. (2020). Screening tea cultivars for novel climates: Plant growth and leaf quality of *Camellia sinensis* cultivars grown in Mississippi, United States. *Frontiers in Plant Science*, 11, 280. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00280>
- Zhang, X., Zhang, C., Sun, X., Yang, J., & Zhu, C. (2019). Mechanism and kinetic study of the reaction of benzoic acid with OH, NO₃ and SO₄-radicals in the atmosphere. *RSC Advances*, 9(33), 18971–18977. <https://doi.org/10.1039/c9ra02457c>
- Zhao, L., Li, F., Chen, G., Fang, Y., An, X., Zheng, Y., Xin, Z., Zhang, M., Yang, Y., & Hu, Q. (2012). Effect of nanocomposite-based packaging on preservation quality of green tea. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(3), 572–578. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02879.x>
- Zheng, X. Q., Nie, Y., Gao, Y., Huang, B., Ye, J. H., Lu, J. L., & Liang, Y. R. (2018). Screening the cultivar and processing factors based on the flavonoid profiles of dry teas using principal component analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 67, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.016>
- Zhou, X., Zeng, L., Chen, Y., Wang, X., Liao, Y., Xiao, Y., Fu, X., & Yang, Z. (2020). Metabolism of gallic acid and its distributions in tea (*Camellia sinensis*) plants at the tissue and subcellular levels. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5684. <https://doi.org/10.3390/ijms21165684>
- Zhou, Y., Xu, X. Y., Gan, R. Y., Zheng, J., Li, Y., Zhang, J. J., Xu, D. P., & Li, H. Bin. (2019). Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant polyphenols from the seed coats of red sword bean (*Canavalia gladiata* (Jacq.) DC.). *Antioxidants*, 8(7), 200. <https://doi.org/10.3390/antiox8070200>
- Zuo, Y., Chen, H., & 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(2), 307–316. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00030-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00030-9)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	: Hind CHEBBI
Doğum Yeri ve Tarihi	: Fransa 20.10.1992
Yabancı Dil	: Arapça, Fransızca, İngilizce ve Türkçe
Eğitim Durumu	
Lise	: Abou Kacem Chebbi (2008-2011)
Lisans	: Tunis El Manar Üniversitesi, Tunis Fen Bilimleri Fakültesi, Fizik-Kimyada Hazırlık Döngüsü Anabilim Dalı (2011-2013), Carthage Üniversitesi, Tunus Gıda Endüstri Yüksek Okulu, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (2013-2016)
Yüksek Lisans	: Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (2018-2022)
Çalıştığı Kurum	:Tozeur Vaha Tarımında Bölgesel Araştırma Merkezi (CRRAO), Tunus (04/2018-08/2018)
İletişim (e-posta)	: hyndchebbi4@gmail.com