

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YEŞİL ÇAYDAN L-TEANİN EKSTRAKSİYON OPTİMİZASYONU
VE SAFLAŞTIRILMASI**

NIHAN SAĞCAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
GIDA MÜHENDİSLİĞİ PROGRAMI**

**DANIŞMAN
PROF. DR. OSMAN SAĞDIÇ**

İSTANBUL, 2016

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YEŞİL ÇAYDAN L-TEANİN EKSTRAKSİYON OPTİMİZASYONU
VE SAFLAŞTIRILMASI

Nihan SAĞCAN tarafından hazırlanan tez çalışması 18.04.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Dr. Sena SAKLAR AYYILDIZ
TÜBİTAK MAM

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Sena SAKLAR AYYILDIZ
TÜBİTAK MAM

Prof. Dr. M. Fatih ERTUGAY
Erzincan Üniversitesi

Doç. Dr. Mehmet BAŞLAR
Yıldız Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Ertan ERMİŞ
İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi



Bu yüksek lisans tez çalışması, TÜBİTAK 112G048 numaralı ‘Çaydan Katma Değeri Yüksek Yeni Ürünler Geliştirilmesi’ isimli TARAL 1007 projesi tarafından desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olup her alanda ışık tutan değerli hocam Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ' a en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin gerçekleşmesine ve yüksek lisans eğitimime 112G048 numaralı proje ile destek sağlayan TÜBİTAK'a ve her türlü bilgi ve birikimlerini paylaşp emeklerini esirgemeyen Dr. Sena SAKLAR AYYILDIZ ve Dr. Bülent KARADENİZ' e teşekkürü bir borç bilirim.

Projeye destek sağlayan ve hammadde ihtiyacımızı karşılayan ÇAYKUR' a desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında yanımda olup beni destekleyen ve bugünlere getiren sevgili annem Nurcan ONAT, sevgili babam İsmail ONAT ve biricik kardeşim Murat ONAT' a gönül dolusu teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Hayatımı paylaştığım çok sevgili eşim Hasan SAĞCAN' a eğitimimdeki teşviklerinden ve katkılarından, her alandaki yardımlarından ve varlığından dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Nisan, 2016

Nihan SAĞCAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGE LİSTESİ.....	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xiii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.1.1 Dünyada ve Türkiye’de Çay.....	1
1.1.2 Teanın	3
1.1.3 Ekstraksiyon ve Ultrases Teknolojisi	7
1.1.4 Yanıt Yüzey Yöntemi.....	9
1.1.5 Kolon Kromatografisi.....	9
1.2 Tezin Amacı.....	10
1.3 Hipotez.....	10
BÖLÜM 2	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	11
2.1 Materyal	11
2.1.1 Çay Numunesi	11
2.1.2 Alet Ekipman Tanımları	11
2.1.3 Kimyasal Maddeler	12
2.1.4 Çözeltiler	12

2.2	YÖNTEM	12
2.2.1	Yanıt Yüzey Yöntemi ve İstatistiksel Analiz	12
2.2.2	Klasik Ekstraksiyon.....	14
2.2.3	Ultrases Ekstraksiyonu	14
2.2.4	Teanin Analiz Yöntemi	14
2.2.4.1	Analitik Tanımlama	14
2.2.4.2	Linearite Çalışması	17
2.2.5	Kafein ve Kateşin Analiz Yöntemi.....	18
2.2.5.1	Analitik Tanımlama	18
2.2.5.2	Linearite Çalışması	19
2.2.6	Kromatografi Öncesi Ön Saflaştırma	20
2.2.7	Kolon Kromatografisi.....	20
2.2.7.1	Adsorban Ön İşlemleri.....	22
2.2.7.2	Saflaştırma	22
BÖLÜM 3		
3.1	Yanıt Yüzey Yöntemiyle Optimizasyon ve İstatistiksel Analiz	24
3.2	Kolon Kromatografisi ile Saflaştırma.....	34
BÖLÜM 4		
SONUÇ VE ÖNERİLER.....		38
KAYNAKLAR		39
ÖZGEÇMİŞ		42

SİMGE LİSTESİ

(p)	Olasılık değeri
CO ₂	Karbondioksit
F	Varyans analizinin test istatistiği
R ²	Determinasyon katsayısı
R ² _{adj}	Düzeltilmiş determinasyon katsayısı

KISALTMA LİSTESİ

µL	Mikrolitre
C	Kateşin
CAF	Kafein
CCD	Merkezi Karma Tasarım
CV	Kolon hacmi
EC	Epikateşin
ECG	Epikateşingallat
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit Disodyum Tuzu
EGC	Epigallokateşin
EGCG	Epigallokateşingallat
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
g	Gram
GA	Gallik Asit
GC	Gallokateşin
GCG	Gallokateşingallat
GRAS	Genel Olarak Güvenilir
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ISO	Uluslararası Standart Örgütü
ka	Kuru ağırlık
km	Kuru madde
kHz	Kilohertz
LC	Sıvı Kromatografisi
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
MHz	Megahertz
mL	Mililitre
nm	Nanometre
ppm	Milyonda bir birim
PTFE	Politetrafloroetilen
RSM	Yanıt Yüzey Yöntemi

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1 Dünyada çay üretimi	1
Şekil 1.2 L-Teaninin kimyasal yapısı	4
Şekil 1.3 Ultrases cihazının şematik gösterimi	8
Şekil 2.1 HPLC-DAD ile okunan absorbans-konsantrasyon eğrisi	15
Şekil 2.2 Teanin standart çözeltisinin kromatogramda oluşturduğu pik	17
Şekil 2.3 Kalibrasyon grafiği	18
Şekil 2.4 Kateşin ve kafein pikleri	19
Şekil 2.5 Kafein linearitesi	20
Şekil 2.6 Kolon kromatografi sistemi ve kolon	21
Şekil 2.7 Fraksiyon toplayıcı	21
Şekil 3.1 Klasik ekstraksiyonda teanin miktarının sıcaklık ve süreyle değişimi	29
Şekil 3.2 Klasik ekstraksiyonda teanin miktarının sıcaklık ve oranla değişimi	29
Şekil 3.3 Klasik ekstraksiyonda teanin miktarının süre ve oranla değişimi	30
Şekil 3.4 Klasik ekstraksiyonda optimizasyon	31
Şekil 3.5 Ultrases ekstraksiyonda teanin miktarının sıcaklık ve süreyle değişimi	32
Şekil 3.6 Ultrases ekstraksiyonunda optimizasyon	33
Şekil 3.7 Teaninin hacme göre kromatogramı	35
Şekil 3.8 Teanin zamana göre kromatogramı	35

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 1.1 İşlenmemiş çay yaprağının kimyasal bileşimi (ka g/100g)	2
Çizelge 1.2 Yeşil çay infüzyonundaki başlıca aminoasitler ve yüzde dağılımları	3
Çizelge 1.3 Teaninin başlıca fiziksel özellikleri	5
Çizelge 1.4 Çeşitli çay örneklerinin teanin konsantrasyonları	6
Çizelge 2.1 Klasik ekstraksiyon için bağımsız değişkenlerin değerleri	13
Çizelge 2.2 Ultrases ekstraksiyon için bağımsız değişkenlerin değerleri.....	13
Çizelge 2.3 Teanin mobil faz akış diyagramı	16
Çizelge 2.4 Standart stok çözelti konsantrasyonları	17
Çizelge 2.5 Kolon kromatografi metodu	22
Çizelge 3.1 Klasik ekstraksiyon için merkezi karma tasarım deney sonuçları.....	25
Çizelge 3.2 Ultrases ekstraksiyonu için merkezi karma tasarım deney sonuçları	26
Çizelge 3.3 Klasik ekstraksiyon ANOVA sonuçları	27
Çizelge 3.4 Ultrases ekstraksiyon ANOVA sonuçları.....	28
Çizelge 3.5 Optimum koşulların karşılaştırılması	33
Çizelge 3.6 Ekstraktın saflaştırma sonuçları.....	36

ÖZET

YEŞİL ÇAYDAN L-TEANİN EKSTRAKSİYON OPTİMİZASYONU VE SAFLAŞTIRILMASI

Nihan Sağcan

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Eş Danışman: Dr. Sena SAKLAR AYYILDIZ

Teanin çaydaki buruk tadı sağlayıp çayın kalitesini belirleyen, bunun yanında birçok farmakolojik etkiye sahip, protein olmayan bir aminoasittir. Son yıllarda dünyada, çayın önemli bir bileşeni olan bu maddeyi fonksiyonel gıda bileşeni veya diyet takviyesi olarak kullanma üzerine ilgi artmaktadır. Bu amaçla teaninin çaydan uygun koşullarda ekstrakte edilip saflaştırılması gerekmektedir. Bu çalışmada klasik ve ultrases tekniğiyle farklı sıcaklık, süre ve su: çay oranları kullanılarak ekstraksiyon denemeleri yapılmıştır. Çalışmada belirli partikül boyutuna elenmiş olan işlenmiş yeşil çay örnekleri kullanılmıştır. Yanıt Yüzey Yöntemi kullanılarak yapılan ekstraksiyon optimizasyonunda her üç faktörün de teanin ekstraksiyon verimini artırdığı ve ultrases tekniği ile çaydan yaklaşık olarak % 30 daha fazla teanin ekstrakte edilebildiği görülmüştür. En uygun ekstraksiyon koşulunun ultrases tekniğinin kullanıldığı 80°C- 38 dk- 23:1 mL/g su: çay oranı olduğu belirlenmiştir. Buradan elde edilen sulu ekstrakta bu kez de etil asetatla ekstraksiyon işlemi uygulanmış buradan elde edilen su fazında teanin saflığı % 31'e çıkarılarak teanince zengin ekstrakt elde edilmiştir. Saflaştırma işlemi için kolon kromatografisi sistemi kullanılmıştır. Poliamid dolgu maddesi ile doldurulan kolonda mobil faz olarak 0.5 mL/dk akış hızında deiyonize su kullanılmıştır. Teanince zengin ekstraktın kolona verilmesi sonucu su fazında teanin ve kafein fraksiyonları ard arda kolondan ayrılmıştır. Yaklaşık olarak 40-60. dakikalar arasında gelen teanin bir

tüpte toplanmış ve yapılan HPLC analizi sonucu buradan elde edilen teaninin % 90 saflıkta olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Teanin, ekstraksiyon, yanıt yüzey yöntemi, kolon kromatografisi, saflaştırma



ABSTRACT

EXTRACTION OPTIMIZATION AND PURIFICATION OF L- THEANINE FROM GREEN TEA

Nihan SAĞCAN

Department of Food Engineering

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Co-Adviser: Dr. Sena SAKLAR AYYILDIZ

Theanine is a nonprotein aminoacid which gives the stringent and umami taste to tea. Besides that, it has a lot of pharmacological effects and indicates the quality and price of tea. Recently, there has been an interest on using this important component of tea as functional food ingredient or dietary supplement. For this purpose, theanine should be extracted and purified in suitable conditions from tea. In the present study, classical and ultrasound extraction techniques with different temperature, time and water to tearatio were tested. Processed green teas, which were sieved in same particul size, were used in the study. Extraction optimization was performed using Response Surface Methodology. It has been found that all these three factors were increased extraction yield and ultrasound technology was lead to approximately 30% increase in the amount of extracted theanine, derived from tea. Optimum extraction conditions were determined as 80°C-38 min- 23:1 mL/g with using ultrasound technique. Ethyl acetate extraction was also applied to this aqueous extract. After this process theanine rich extract was obtained with 31% purity in water phase. Column chromatography system was used for further purification. Column was filled with polyamid resin and deionized water with 0.5 mL/min flow rate was used as mobil phase. After the injection of theanine rich extract to the column, theanine and caffeine fractions were left the column one after another. Theanine fraction, which was separated approximately in 40-60

minutes, was collected in a tube. After HPLC analysis it was identified that theanine had 90% purity in this tube.

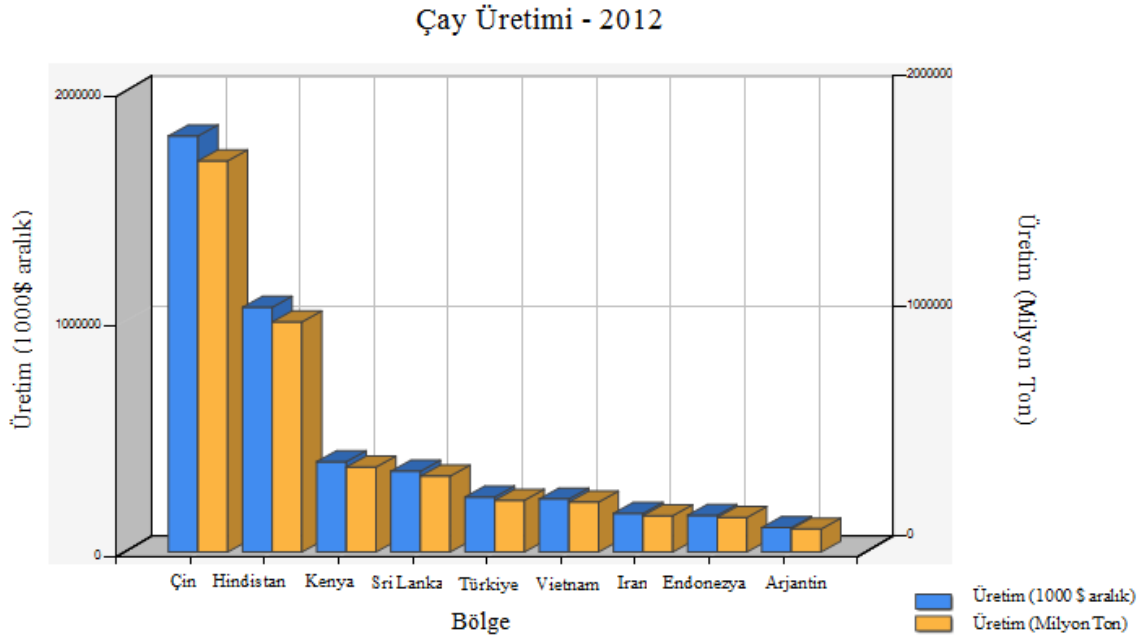
Keywords: Theanine, extraction, response surface methodology, column chromatography, purification



1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Dünyada ve Türkiye’de Çay

Dünyada sudan sonra en fazla tüketilen içecek olan çay, Theaceae familyasına ait bir bitki olup bu familyada ticari öneme sahip olan türler *Camellia sinensis* var. *sinensis* ve *Camellia sinensis* var. *assamica*’dır [1], [2]. Bol yağışlı ve sıcak iklimi seven çay bitkisi yoğun olarak Çin, Hindistan, Sri Lanka, Endonezya, Kenya ve Türkiye’nin de içinde bulunduğu 30’a yakın ülkede yetiştirilir [3]. Şekil 1.1’de 2012 yılına göre dünyadaki çay üretiminin ülkelere dağılım grafiği verilmiştir.



Şekil 1.1 Dünyada çay üretimi [4]

Dünyadaki çay üretiminin % 70'i siyah, % 23'ü yeşil, % 7'si oolong, instant, beyaz çay ve diğer çay çeşitlerinden oluşmaktadır [3]. Yeşil çay üretimi, polifenol oksidaz ve tüm yükseltgenme enzimlerini inaktive etmek için yüksek sıcaklık veya buharla şok soldurma, kıvrırma ve kurutma; siyah çay üretimi, soldurma, kıvrırma, enzimatik oksidasyon ve kurutma; oolong çay üretimi ise hafif soldurmadan sonra hafif kıvrırma, kısmen enzimatik oksidasyon ve kurutma aşamalarını içermektedir [5]. Çayın bileşiminde yüksek oranda flavonoller ve diğer polifenol bileşikler, kafein, aminoasit ve proteinler, polisakkaritler, basit karbonhidratlar, selüloz ve kül bulunur [6]. İşlenmemiş çay yaprağının bileşimi Çizelge 1.1'de miktarlarıyla birlikte verilmiştir.

Çizelge 1.1 İşlenmemiş çay yaprağının kimyasal bileşimi (ka g/100g) [1]

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

Türkiye'de Doğu Karadeniz Bölgesi'nde Gürcistan sınırından başlayarak Ordu'ya kadar olan bölgede çay tarımı yapılmaktadır ve bu bölge dünyada çay yetiştiriciliği yapılan alanlar içinde en üst sıralarda yer almaktadır [3]. Türkiye, dünyada çay üretiminde

beşinci sırada yer almasına karşın, bu ülkeler arasında kişi başına yıllık çay tüketimi açısından ilk sıradadır [1]. Türkiye’de çokça tüketilen ve önemli gelir kaynaklarından biri olan çaydan ve onun yan ürünlerinden en üst düzeyde faydalanılması gerekmektedir. Bu çalışmada da çaydan, içerdiği teanini elde etmek amacıyla yararlanılabileceği gösterilmiştir.

1.1.2 Teanin

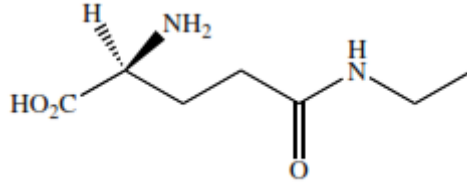
Teanin çay bitkisinde (*Camellia sinensis*) doğal olarak bulunan ve çaydaki acı, buruk ve kendine özgü tat ve kokuyu oluşturan, kompleks bir umami tada sahip, protein olmayan bir aminoasittir [1], [7]. Doğada yaygın olarak çay yapraklarında ve bazı *Camellia* türlerinde bunun yanında bazı mantar çeşitlerinde (*Xerocomus badius*) bulunur [8]. Teanin çaydaki toplam amino asitlerin % 50’sini ve çayın kuru ağırlığının % 0.1-2’sini oluşturur [9], [10]. Çizelge 1.2’de verilen yeşil çaydaki aminoasitler ve miktarları incelendiğinde teaninden sonra en fazla bulunan amino asitler glutamik asit ve aspartik asittir.

Çizelge 1.2 Yeşil çay infüzyonundaki başlıca aminoasitler ve yüzde dağılımları [1]

Amino asit	%
Teanin	45.9
Glutamik asit	12.7
Aspartik asit	10.8
Arginin	9.2
Glutamin	7.5
Serin	3.8
Treonin	1.4
Alanin	1.4
Asparagin	1.2
Lisin	1.0
Fenilalanin	1.1
Valin	1.0

Çaydaki lezzete katkısından dolayı çay yapraklarındaki teanin miktarının çay kalitesi ve fiyatı üzerinde doğrudan etkisi bulunmaktadır; yüksek oranda teanin içeren çaylar yüksek kaliteli olarak değerlendirilmekte ve yüksek fiyattan satılmaktadır [11].

γ - glutamiletilamid, 5- N-etilglutamin veya γ -etilamin-L-glutamik asit olarak adlandırılan teanin, doğada bulunan diğer aminoasitler gibi genellikle L-(S)enantiyomer formunda olup sentetik olarak üretilenlerde L- ve D- formları bir arada bulunur [7]. Yeşil çaydaki L-teanin miktarı ile çayın kalitesi arasında yüksek bir pozitif korelasyon, toplam teaninin yaklaşık %1.85'ini oluşturan D-teanin miktarı ile de ters korelasyon olduğu saptanmıştır [1]. Şekil 1.2'de L-teaninin kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 1.2 L-Teaninin kimyasal yapısı [7]

Serbest teanin çay bitkisinde genel olarak köklerde sentezlenir daha sonrabitkinin tüm kısımlarına dağılır özellikle körpe yapraklarda birikir [1], [11]. Glutamik asit ve etilamin, L-glutamat etilamin ligaz veya L-glutamik asit etilamin ligaz olarak adlandırılan teanin sentetaz enzimi yardımıyla teanin biyosentezini gerçekleştirirler [1].

Yapılan çalışmalar teaninin birçok farmakolojik etkisi olduğunu ortaya koymaktadır. Teanin relaksasyonu artırıp kişiyi sakinleştirme, konsantrasyon ve öğrenme yeteneğini iyileştirme, bazı kanserlere ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruma, kilo vermeyi hızlandırma, bağışıklık sisteminin performansını artırma, kafeinin olumsuz etkilerini inhibe etme, kan basıncını ve LDL kolesterolü düşürme gibi etkilerle ilişkilendirilir [1], [9], [11]. Teanin aynı zamanda polifenollerin biyosentezinde görev alır [12]. FDA tarafından L-Teanin GRAS bir bileşen kabul edilmiştir [13].

Teaninin sudaki çözünürlüğü (0 °C'de 385 g/L, 100 C°'de 556 g/L) kafein (21.7 g/L) ve kateşinlerden (örneğin epigallokateşin galat, 5 g/L) daha yüksektir. Bu durum sıcak suyla ekstraksiyon sırasında çaydan teaninin çok etkili difüzyonuna izin verir. Teanin, kafein ve kateşine göre metanol ve kloroform gibi organik çözücülerde daha az çözünür ve bu nedenle kolayca ayrımı sağlanır [14]. Etil asetat kateşinler için iyi bir çözücü olmasının yanısıra sıvı-sıvı ekstraksiyonlarında suyla faz ayrımı yapmaktadır [15]. Ayrıca kafein hem suda hem de etil asetatda çözünmesine karşılık teanin etil asetatda çözünmemektedir [7], [16]. Bu da çaydaki kateşinlerin ve bir miktar kafeinin etil asetatla uzaklaştırılıp teanin yüzdesinin artmasını sağlamaktadır. Çizelge 1.3'de teaninin başlıca fiziksel özellikleri verilmiştir.

Çizelge 1.3 Teaninin başlıca fiziksel özellikleri [7]

Özellik	Tanımlama
Molekül Formülü	$C_7H_{14}N_2O_3$
Molekül Ağırlık	174.2 g mol^{-1}
Erime Noktası	$217-218 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Görünüm	İğne formunda kristal
Renk	Renksiz
Çözünürlük	Suda çözünür, etanol, metanol, kloroform ve eterde çözünmez
Stabilite	Asidik koşullarda stabil, alkali koşullarda stabil değil

Yapılan çalışmalarda teanin ekstraksiyonu için genellikle yeşil çay tercih edilmiştir. Çayın teanin içeriği yetiştiği bölgeye, yetiştirme yöntemine, hasat zamanına, çay türüne göre değişkenlik göstermektedir [7]. Çizelge 1.4'e göre farklı ülkelere ait farklı çay çeşitlerinin teanin içeriklerinin % 0.60-2.38 aralığında değiştiği görülmektedir.

Çizelge 1.4 Çeşitli çay örneklerinin teanin konsantrasyonları [1]

Çay Adı	Çay Tipi	Ülke	Toplam Teanin (g/100g)
African Flower	Siyah	Kenya	1.30
Assam FOP	Siyah	Hindistan	1.05
Ceylon Broken	Siyah	Sri Lanka	1.32
Ceylon Pekoe	Siyah	Sri Lanka	2.20
Cherry Blend FOP	Siyah	Hindistan/Çin	2.04
Darjeeling FOP	Siyah	Hindistan	1.45
Early Grey	Siyah	Çin	1.07
Georgian FOP	Siyah	Gürcistan	1.16
Keemun FOP	Siyah	Çin	1.12
Lapsang Souchong	Siyah	Çin	0.82
Lemon Blend	Siyah	Hindistan/S.Lanka	1.26
Rosen	Siyah	Çin	1.03
Yunnan	Siyah	Çin	2.38
Formosa Oolong	Oolong	Tayvan	0.60
Jasmine FOP	Oolong	Çin	1.72
Gunpowder	Yeşil	Çin	1.78
Sencha	Yeşil	Japonya	1.05

Yeşil çay üretiminde soldurma ve fermentasyon aşamaları olmadığından teanin miktarının daha fazla olduğunu [1], [12] belirten yayınlara karşın siyah çayın yeşil çaydan çok daha fazla teanin içerdiğini belirten [14], [17] yayınlar da mevcuttur.

Türk siyah çayındaki teanin konsantrasyonunun incelendiği çalışmada 80°C ve 25 dakika ekstraksiyon sonucu kuru ağırlıkta % 0.32-0.43 teanin içeriğine rastlanılmıştır. Ayrıca çalışmada çayın içerdiği teanin ve kafein miktarı arasında yüksek bir korelasyon olduğu saptanmış, çayların işlenmesi sırasında her aşamada teanin ve kafein miktarının azaldığı tespit edilmiştir [1].

Yeşil çayda teanin için optimum ekstraksiyon koşullarının araştırıldığı bir çalışmada koşullar; 80°C, 30 dk, 20:1 mL/g su:çay oranı ve 0.5-1 mm çay boyutu olarak bulunmuş olup teanin miktarı 26.8 ± 0.42 mg/g olarak belirlenmiştir [11]. Yeşil çayla

yapılan başka bir çalışmada; 98°C, 40 dk, 12:1 mL/g olarak belirlenen optimum koşulda, teanin miktarı 4.11 mg/g olarak tespit edilmiştir [9].

Literatürde teaninin kolon kromatografisi ile saflaştırma denemelerinin yapıldığı üçfarklı çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmaların ilkinde sıcak suyla ekstrakte edilen yeşil çay sırasıyla poliamid ve NKA-II adsorbanlarıyla doldurulmuş kolona verilmiş ve sonuç olarak çay polifenolleri, teanin ve kafein sırasıyla % 96 ,% 99 ve %99 saflıklarında elde edilmiştir Polifenoller, teanin ve kafeinin geri kazanımları ise sırasıyla % 72, % 66 ve % 62 olarak belirlenmiştir [18].

Diğer çalışmada ise yeşil çay ekstraktındaki polifenoller, teanin ve kafeinin ayrılması için sırasıyla poliamid, makro-gözenekli (macroporous) DM 130 ve 732 katyon iyon değişim adsorbanları kullanılmıştır. Poliamidde ilk başta suyla gelen fazla kafein ve teanin fraksiyonu ayrılmış, daha sonra % 80 etanolle polifenoller elde edilmiştir. Buradan ayrılan kafein-teanin fraksiyonu DM 130 makro gözenekli adsorbana verilerek kafein saf olarak elde edilmiş, ilk fazda gelen teanin fraksiyonu ise 732 katyon iyon değişim adsorbanında saflaştırılmıştır. Sonuç olarak teanin % 98 saflıkta elde edilmiştir [19].

Diğer bir metotta ise teanin çaydan ekstrakte edildikten sonra polimerik bir dolgu maddesi (poliamid, polivinilpolipirrolidin, polivinilpirolidin, poliklar) ile doldurulmuş kolondan geçirilmiş ardından ultrafiltrasyon veya nanofiltrasyon işlemi uygulanmıştır [8].

Dünya genelinde yılda ortalama 3.5 milyon ton çay tüketilmekte olup bunun yaklaşık olarak %30'u düşük kalite ve çay işleme sırasında ortaya çıkan atıklardan oluşmaktadır. Aynı zamanda üretimde kullanılan çaylar ile düşük kaliteli ve atık çayların içerdiği biyoaktif bileşen miktarları birbirine benzerdir [19]. Endüstride kullanılmayan bu ürünlerden hem ekonomik kaybı azaltmak hem de yeni ürünler üretmek amacıyla yararlanılması mümkündür.

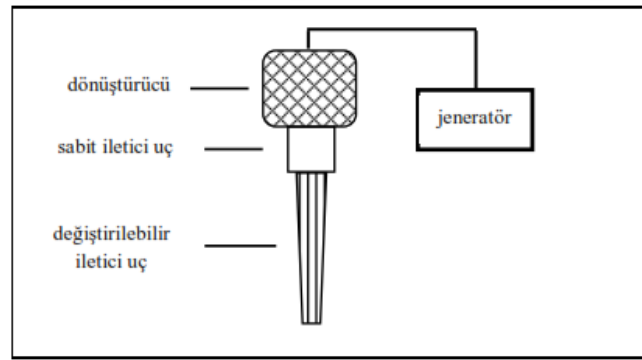
1.1.3 Ekstraksiyon ve Ultrases Teknolojisi

Ekstraksiyon, sabit sıcaklık ve basınçta bir maddenin iki fazdaki denge derişimlerinin farklı olmasından yararlanarak yapılan ayırma işlemidir [20]. Günümüzde klasik ekstraksiyonlara alternatif metotlar geliştirilmiştir. Alternatif ekstraksiyon metotları; mikrodalga destekli, ultrases destekli, süperkritik sıvı, basınçlı sıvı, vurgulu elektrik

alan destekli, enzim destekli, değiştirilebilir çözücölü ve iyonik sıvı ekstraksiyonlarıdır. Bu metotlar klasik ekstraksiyona göre daha etkin olmasının yanısıra daha az çözücü ve daha az zaman gerektirir [21].

Çaydaki polifenollerin ve diğer biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonuna dair birçok çalışma yapılmıştır. Süperkritik CO₂ ekstraksiyonunun etkili bir metot olmasına karşın yüksek kurulum ve üretim maliyeti nedeniyle uygulamaları sınırlıdır. Endüstriyel çay ekstraksiyonları genellikle karıştırma, sirkölasyon, ultrasonik, mikrodalga veya enzim uygulamalarıyla gerçekleştirilir [19]. Bu çalışmada da ekstraksiyonlarda kullanılan alternatif metotlardan biri olan ultrases tekniğinden yararlanılmıştır. Ultrases, ses dalgalarının saniyede 20.000 veya daha fazla titreşimleri sonucu oluşur ve gıda teknolojisinde 20 kHz ile 10 MHz frekans aralığı kullanılır [22]. Ultrases dalgaları insan kulağı tarafından algılanamaz ve katı, sıvı, gaz ortamda ilerleyebilir [23].

Ultrases cihazı şekil 1.3’de görüldüğü gibi alternatif akımı yüksek frekanslı alternatif akıma dönüştüren bir jeneratör, oluşan bu yüksek frekanslı akımı mekanik enerjiye dönüştüren bir dönüştürücü ve mekanik titreşimleri ortama ileten iletici uç (prob) olmak üzere 3 kısımdan oluşur [23]. Prob direkt olarak çözeltiliye daldırılarak oluşan kavitasyonun etkisiyle ekstraksiyon gerçekleştirilir.



şekil 1.3 Ultrases cihazının şematik gösterimi [23]

Ultrases yöntemi ile hücre duvarı mekanik olarak parçalandığından hücre içi bileşen solvente kolayca geçebilir [22]. Ayrıca bu yöntem ile konvansiyonel yöntemlere göre daha düşük sıcaklıklarda daha verimli ekstraksiyon yapılabildiğinden bu çalışmada klasik ekstraksiyona ilaveten ultrases ekstraksiyonu da kullanılmıştır.

1.1.4 Yanıt Yüzey Yöntemi

Yanıt yüzey yöntemi, Denemelerin Optimum Koşullara Ulaşması ismi ile 1951 yılında Box ve Wilson tarafından geliştirilmiş ve tanımlanmıştır [24]. Yöntem, sistem optimizasyonunda kullanılan bir grup istatistiksel ve matematiksel teknikten oluşmakta olup bu teknik sayesinde bağımsız değişkenlerin proses üzerine olan etkileri tek tek ve interaksiyonlar halinde incelenebilmektedir [25]. Bu amaçla sistemi tanımlayacak lineer veya polinomiye fonksiyonlar geliştirilerek deneysel koşullar fonksiyonlar üzerinden ifade edilebilmektedir [26]. Böylece zaman, emek ve finans gereksinimi en aza indirilerek çalışılan probleme ilişkin matematiksel formülle değişkenlerin optimum değerlerini elde etmek mümkündür [25].

1.1.5 Kolon Kromatografisi

Kolon kromatografisi katı-sıvı kökenli bir adsorpsiyon teknolojisi olup silindirik cam bir borunun içine doldurulmuş bir dolgu maddesi (sabit faz) ve hareketli (sıvı) faz sistemlerinden oluşur [27].

Sistem, saflaştırılmak istenen karışımın hareketli faz yardımıyla kolondaki dolgu maddesinde yürütülerek bileşiklerin farklı zamanda kolondan ayrılmasına dayanmaktadır. Kolonda kullanılan dolgu maddesi; reçine veya adsorban olarak adlandırılır.

Kolonun çapı ayrılacak olan maddenin miktarına, kolon uzunluğu ayrılacak olan maddelerin yürüme uzaklıklarına göre seçilir [27]. Saflaştırılmak istenen maddenin karakterine ve tutunma özelliklerine göre uygun bir reçine belirlenir. İlgili maddenin bu reçinede kolayca yürümesini sağlayacak veya diğer safsızlıkların uzaklaştırılıp ilgili maddenin reçinede tutunmasını sağlayacak şekilde hareketli (mobil) faz seçilir. Saflaştırılmak istenen karışım çözelti halinde sisteme enjekte edildikten sonra eş zamanlı olarak ilgili dalga boylarında kromatografi takip edilebilir. Kolondan ayrılan maddeler deney tüplerinde toplanarak içerik analizleriyle ulaşılan saflık derecesi belirlenir.

Reçine adsorbsiyon teknolojisi, daha az çözücü kullanılması, operasyon maliyetinin düşük olması, kolayca tekrar edilebilir olması ve spesifik adsorplama özellikleriyle ayırma işlemlerinde diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır [18].

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada yeşil çaydan en etkin teanin ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi ve bu koşullarda elde edilen ekstraktın kolon kromatografisi yoluyla saflaştırılması amaçlanmıştır. Bu hedefi gerçekleştirmek için çalışma 4 aşamalı olarak planlanmıştır:

- 1- Çaydan teanini ekstrakte etmek için uygun parametrelerin belirlenmesi ve Yanıt Yüzey Yöntemi kullanılarak Merkezi Karma Tasarım'ın oluşturulması,
- 2- Oluşturulan Merkezi Karma Tasarım'a göre ekstraksiyonların yapıp optimum koşulun belirlenmesi
- 3- Elde edilen ekstraktın saflığını arttırmak için ön işlemler yapılması
- 4- Kolon kromatografisi ile maksimum saflığa ulaşılması

amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Türkiye’de yaygın olarak üretilen çaydan hem teaninin farmakolojik etkilerinden faydalanma hem de ekonomiye katkı sağlama amacıyla yararlanmak mümkündür. Yurt dışında teaninin fonksiyonel gıda olarak üretimi mevcutken ülkemizde hali hazırda teanin üretimi yapan bir firma mevcut değildir. Bu çalışma ile teanin ekstraksiyon optimizasyonu ve saflaştırılması yapılarak Türkiye’deki çay potansiyelinden bu alanda da yararlanılabileceği gösterilmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Çay Numunesi

Çalışmada Rize Cumhuriyet Çay Fabrikası'nda üretilen Çaykur' a ait 2015 yılı Kardelen-2 kurutulmuş yeşil çay kullanılmış olup analize kadar +4°C'de depolanmıştır. Analiz öncesi eleme yapılarak 1-1.6 mm boyutundaki çaylar çalışmada kullanılmıştır.

2.1.2 Alet Ekipman Tanımları

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi - (HPLC-UV)-Shimadzu (Prominence Serisi)

Phenomenex, Aqua C18 125Å, 250 mm X 4,6mm, 5 µm

Eclipse Plus Phenyl-Hexyl HPLC kolon, 250 mm X 4,6 mm, 5 µm

Eclipse Plus Phenyl-Hexyl Guard kolon, 4,6 mm X 12,5 mm, 5 µm

NGC-Kolon Kromatografisi (BIO-RAD)

Saf su cihazı (Milipore Elix 5 UV, Fransa)

Çalkalamalı su banyosu (Nüve Sanayi, Ankara)

Ultrasound cihazı (Hielscher Ultrasonics GmbH, Almanya)

Balonjojeler (10 ml)

Erlenler (500ml)

Beher (250ml)

Mezür

Su ısıtıcısı

Otomatik pipetler

Terazi

Vorteks

PTFE filtreler 0.45µm

Steril şırınga (5ml)

2.1.3 Kimyasal Maddeler

L-Teanin; Fluorochem Ltd (Unit 14, Graphite Way, Hadfield, SK131QH, UK)

Caffeine; Sigma- Aldrich (Çin)

Polyamid CC 6; Macherey- Nagel GmbH & Co. KG (Düren- Almanya)

Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA); Fluka

Analytical (for HPLC, ≥99.9%, Almanya)

2.1.4 Çözeltiler

Deiyonize su (Milipore Elix 5 UV)

Acetonitrile Chromasolv®; Sigma- Aldrich (for HPLC, ≥99.9%, İsrail)

Acetic Acid Glacial; Carlo Erba Group

Methanol Chromasolv®; Sigma- Aldrich (for HPLC, ≥99.9%, İsrail)

2.2 YÖNTEM

2.2.1 Yanıt Yüzey Yöntemi ve İstatistiksel Analiz

Teanin ekstraksiyon koşullarının optimizasyonunda Yanıt Yüzey Metodu (Response Surface Methodology, RSM) kullanılmıştır. Deneysel tasarımda ise Merkezi Karma Tasarım (Central Composit Design, CCD)'dan yararlanılmıştır. Klasik ekstraksiyonda bağımsız değişkenler sıcaklık (X1), süre (X2) ve su: çay oranı (X3) olarak belirlenmiştir. Ultrases ekstraksiyonunda ise bağımlı değişkenler sıcaklık (X1) ve süre

(X2) olarak belirlenmiş olup çay:su oranı olarak da klasik ekstraksiyonda en iyi sonucu veren değer kullanılmıştır. Bağımlı değişken ise her iki ekstraksiyon türü için de teanin konsantrasyonudur. Bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve kodlanmamış değerleri klasik ekstraksiyon için Çizelge 2.1’de, ultrases ekstraksiyonu için Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Klasik ekstraksiyon için bağımsız değişkenlerin değerleri

Faktör Seviyeleri					
Bağımsız Değişkenler	En Düşük (-1.61)	Düşük (-1)	Merkez (0)	Yüksek (+1)	En Yüksek (+1.61)
Sıcaklık-°C (Faktör 1, X1)	63	70	80	90	96
Süre-dk (Faktör 2, X2)	4	15	30	45	55
Su:çay oranı-ml:g (Faktör 3, X3)	11	15	20	25	28

Çizelge 2.2 Ultrases ekstraksiyon için bağımsız değişkenlerin değerleri

Faktör Seviyeleri					
Bağımsız Değişkenler	En Düşük (-1.61)	Düşük (-1)	Merkez (0)	Yüksek (+1)	En Yüksek (+1.61)
Sıcaklık-°C (Faktör 1, X1)	55	60	70	80	84
Süre-dk (Faktör 2, X2)	8	15	30	45	51

$$Z = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^3 \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon_0 \quad (2.1)$$

Modeller Denklem 2.1’de verilen kuadratik (polinomial) denkleme göre belirtilmiştir. Burada Z bağımlı d, X bağımsız değişken, n bağımsız değişken sayısı, β_0 sabit katsayı, β_i birinci dereceden (doğrusal) denklem katsayısı, β_{ii} ikinci dereceden denklem katsayısı, β_{ij} iki faktörlü çapraz etkileşim katsayısı, ε_0 deneysel hatadır.

Design Expert 9.0.6 bilgisayar programı, deneysel verilerin regresyon analizi ile Denklem 2.1’in katsayılarının hesaplanması ve ANOVA analizi için kullanılmıştır.

Klasik ve ultrases ekstraksiyon sonuçlarına ANOVA istatistiksel analizi ayrı ayrı uygulanmıştır. Yapılan denemelerde en uygun yanıt yüzey modelinin her iki ekstraksiyon tipi için de kuadratik model olduğu görülmüştür. Design Expert 9.0.6

programında yapılan ANOVA analizinde kareler toplamı, serbestlik derecesi, karelerin ortalaması, F değeri, olasılık değeri, önem derecesi, R^2 değerleri ve denklem katsayıları tespit edilmiştir.

2.2.2 Klasik Ekstraksiyon

Ekstraksiyonda teanin için en uygun çözücü olan su kullanılmıştır. Klasik ekstraksiyonda 500 ml hacmindeki şilifli erlenlerle çalışılmıştır. Erlene çay tartılıp üzerine istenilen sıcaklığa getirilmiş 200 ml deiyonize su eklenmiş ve belirlenen süre boyunca çalkalamalı su banyosunda 100 rpm’de çalkalanmıştır. Burada kullanılan çay miktarı, su sıcaklığı ve süreler Çizelge 3.1’de verilmiştir. Süresi gelen erlendeki çay bir bez yardımıyla süzölmüş ardından 0.45 µm’lik PTFE filtreden geçirilmiştir. Ekstrakt 1:1 oranında deiyonize su ile seyreltilerek viallenmiştir.

2.2.3 Ultrases Ekstraksiyonu

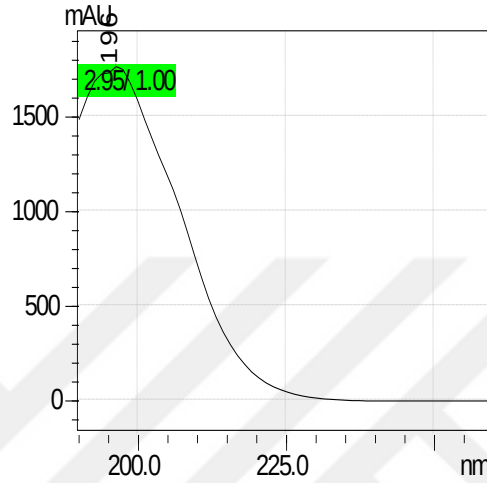
Ultrases ekstraksiyonunda 250 ml’lik behere 8 g çay tartılıp üzerine ilgili sıcaklığa getirilen 200 ml deiyonize su eklenmiştir. Ultrases cihazında yapılan ön denemelerde en iyi verim % 75 amplitude değerinde alındığı için çalışmalar bu genlik değerinde yapılmıştır. Cihazın probu beherin içine daldırılarak % 75 amplitude değerinde Çizelge 3.2’deki sürelerde bekletilmiştir. Bu sırada oluşan ses dalgaları çayın sıcaklığını arttırdığından beherin etrafına buz kompresleri uygulayarak iç sıcaklık sabit tutulmaya çalışılmıştır. Ardından beherdeki çay bir bez yardımıyla süzölüp 0.45 µm’lik PTFE filtreden geçirilmiştir. Ekstrakt 1:1 oranında deiyonize su ile seyreltilerek viallenmiştir. Ayrıca ultrases ekstraksiyonunda çözücü olarak etil alkol-su karışımı kullanılarak da deneme yapılmıştır.

2.2.4 Teanin Analiz Yöntemi

2.2.4.1 Analitik Tanımlama

Teaninin HPLC ’de tanımlanması için öncelikle literatürdeki diğer çalışmalara göre oldukça pratik ve hızlı bir teknik olan, karmaşık kimyasallar içermeyen ve diğer metotlardan farklı olarak analiz öncesi türevlendirmeye ihtiyaç duyulmayan bir metot denenmiştir [28]. Bu metotta ilgili pik zamanlarının kaymasıyla hangi pikin teanine ait olduğundan kesin olarak emin olunamaması ve kolonun uzun süreli çalışmaları için

uygun olmadığının düşünülmesi sonucu yeni bir metot arayışına girilmiştir. Bunun üzerine henüz taslak halinde yayınlanmış ve yorumlara açık olan, aynı zamanda denenen önceki metoda oldukça benzerlik gösteren ISO standart metodu kullanılmıştır [10]. Bu metotta kullanılan dalga boyunun 210 nm olmasına karşın HPLC-DAD tekniği ile yapılan ön denemelerde maksimum absorbanstın Şekil 2.1’de görüldüğü gibi 196 nm’de olduğu görülmüştür.



Şekil 2.1 HPLC-DAD ile okunan absorbanst-konsantrasyon eğrisi

Bunun üzerine hangi dalga boyunda daha doğru sonuç alındığını tespit etmek için konsantrasyonu bilinen teanin standardı ile hem 196 nm’de hem de 210 nm’de analiz gerçekleştirilmiş ve 196 nm’deki sonucun, standardın konsantrasyonuna daha yakın olduğu tespit edilmiştir. Bunun üzerine diğer koşullar sabit tutularak 196 nm’de ISO metoduna göre tüm analizler gerçekleştirilmiştir. Analitik koşullar aşağıda belirtilmiştir.

HPLC Mobil Fazları

Mobil Faz A; Saf su

Mobil Faz B; Asetonitril

Mobil faz akış diyagramı;

Elüsyon: ilk 0-10. dakika’da 1 ml/dk akış hızıyla %100 A,

Kolon yıkama: 10-12. dakika arası 1 ml/dk hızla %20 A ve %80 B’ye ulaşacak, 12-20. dakikada 1 ml/dk hızla %80 B,

Şartlama: 20-22. dakikada 1ml/dk hızla %100 A ve %0 B’ye ulaşacak, 22-40. 1 ml/dk hızla %100 A.

Mobil faz akış diyagramı Çizelge 2.3’de verilmiştir.

Çizelge 2.3 Teanın mobil faz akış diyagramı

Süre(dk)	Akış Hızı(ml/dk)	% A	% B
0,01	1.0	100	0
10,00		100	0
10,01	1.0	100	0
12,00		20	80
12,01	1.0	20	80
20,00		20	80
20,01	1.0	20	80
22,00		100	0
22,01	1.0	100	0
40,00		100	0

Sistem: Shimadzu (Prominence Serisi)

Yazılım : LC Solution

Kolon: Phenomenex, Aqua C18, 250 mm X 4,6 mm, 5 µm

Akış Hızı: 1 ml/dk.

Dedektör: UV Dedektör

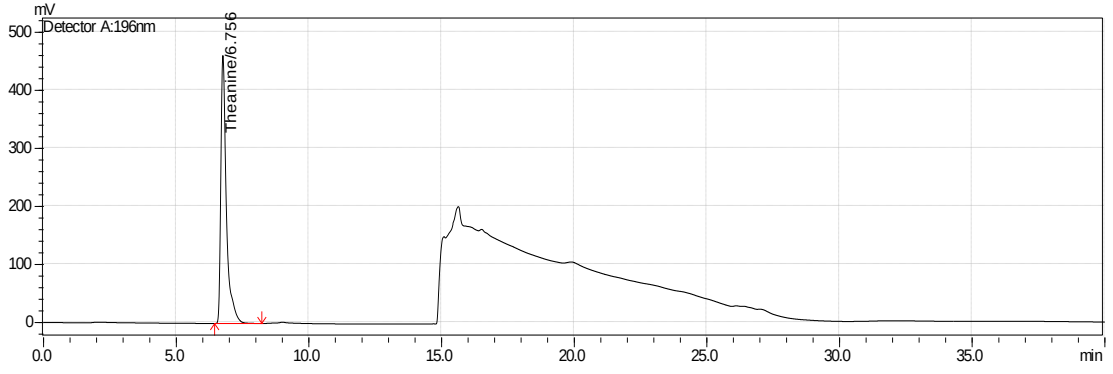
Dalga Boyu: 196 nm

Sıcaklık: 20 °C

Enjekte edilen hacim: 20 µl

Toplam Analiz Süresi : 40 dakika

Şekil 2.2’de 200 ppm’lik standardın kromatogramı görülmektedir. Buna göre teanın piki yaklaşık olarak 6.7-6.8. dakikalarda gelmektedir.



Şekil 2.2 Teanin standart çözeltisinin kromatogramda oluşturduğu pik

2.2.4.2 Linearite Çalışması

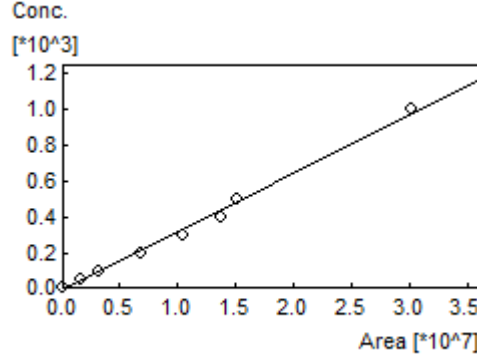
Teanin için hazırlanan stok standart çözeltiler Çizelge 2.4'e göre standart karışım çözeltisi haline getirilmiştir.

Çizelge 2.4 Standart stok çözelti konsantrasyonları

Standart No	1	2	3	4	5	6	7	8
Konsantrasyon (ppm)	10	50	100	200	300	400	500	1000

0,05 g teanin standardının balonjojede 50 ml'ye tamamlanmasıyla 1000 ppm'lik stok çözelti hazırlanmış olup diğer konsantrasyonlar stok çözeltilerden seyreltilerek elde edilmiştir. 8 adet standart karışım çözeltisi cihaza 3'er defa otomatik enjektörle 10 µl enjekte edilmiştir. Enjeksiyon sonucu elde edilen kromatogramlardan teanin bileşiğinin kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur (Şekil 2.3).

IN# : 1
Name : Theanine
Quantitative Method : External Standard
Function : $f(x)=3.29938e-005x-16.0157$
Rr1=0.9975046 Rr2=0.9950155
MeanRF:3.35096e-005 RFSD:1.0942e-005 RFRSD:32.6532
FitType : Linear
ZeroThrough : Not Through
WeightedRegression : None
Detector Name : Detector A



Şekil 2.3 Kalibrasyon grafiği

2.2.5 Kafein ve Kateşin Analiz Yöntemi

2.2.5.1 Analitik Tanımlama

Kafein ve kateşinlerin tanımlanmasında ISO 14502-2 metodu kullanılmıştır [29]. Kafeinler ve 8 farklı kateşin (GA-GC-EGC-C-EC-EGCG-GCG-ECG) HPLC-UV tekniği ile tespit edilmiştir. Analitik koşullar aşağıda belirtilmiştir.

HPLC mobil fazları:

Mobil faz A: % 9 acetonitril (v/v), % 2 asetik asit (v/v), 20 µg/ml EDTA,

180 ml acetonitril, 40 ml asetik asit 2 litrelik balona eklenir, balon ayrıya kadar suyla doldurulur ve 4 ml EDTA çözeltisi eklenir. Suyla 2 litreye tamamlanır, karıştırılır ve 0,45 µm filtreyle süzülür.

Mobil faz B: % 80 acetonitril (v/v), % 2 asetik asit (v/v), 20 µg/ml EDTA,

800 ml acetonitril, 20 ml asetik asit 1 litrelik balona eklenir, üzerine 100 ml su ve 2 ml EDTA çözeltisi eklenir. Suyla 1 litreye tamamlanır, karıştırılır ve 0,45 µm filtreyle süzülür.

Mobil faz akış diyagramı: İlk 0-10. dakika'da % 100 A, 10.-15 dakika arası % 68 A ve % 32 B'ye ulaşacak, 15-25. dakikada % 68 A ve % 32 B, 25-35. dakikada % 100 A (post time)

Sistem: Shimadzu (Prominence Serisi)

Yazılım: LC Solution

Kolon: Eclipse Plus Phenyl-Hexyl HPLC kolon, 250 mm X 4,6 mm, 5 µm

Eclipse Plus Phenyl-Hexyl Guard kolon, 4,6 mm X 12,5 mm, 5 µm

Akış Hızı: 1 ml/dk.

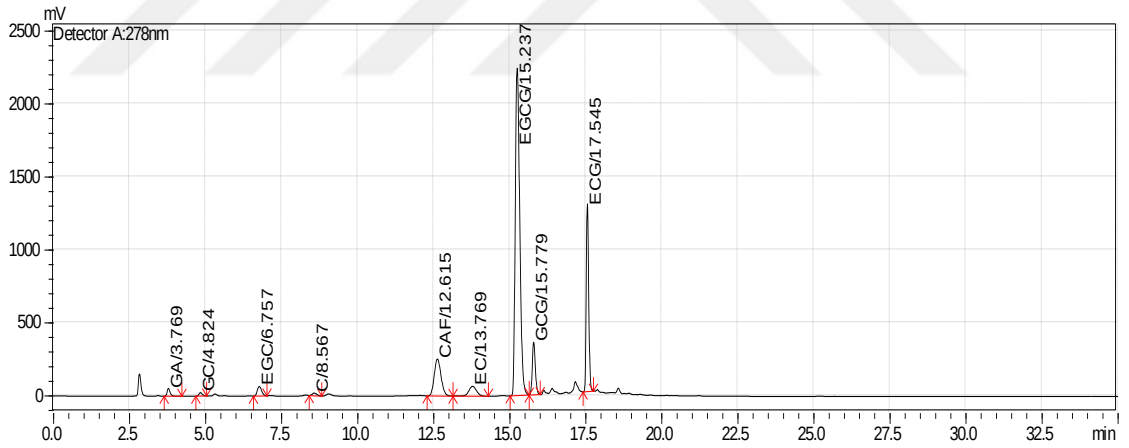
Dedektör: UV Dedektör

Dalga Boyu: 278 nm

Sıcaklık : 35 °C ± 0,5 °C

Enjekte edilen hacim : 10 µl

Toplam Analiz Süresi : 25 Dakika ve 10 dakika post time = 35 dakika



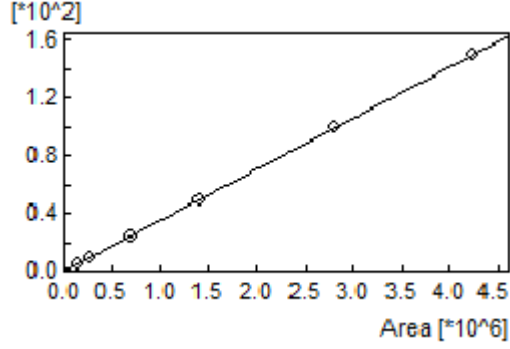
Şekil 2.4 Kateşin ve kafein pikleri

Şekil 2.4'te standart referans maddeverildiğinde kromatogramdaki kafein ve kateşin pikleri görülmektedir. Buna göre kafein piki yaklaşık olarak 12. dakikada gelmektedir.

2.2.5.2 Linearite Çalışması

Yeşil çaylardaki farklı kateşin bileşikleri ve kafein miktarlarına göre linearite aralığı 2,5 ile 400 ppm arasındadır. Linearite eğrisi 6 farklı noktadan oluşturulmuştur. Şekil 2.5'te kafein linearitesi örnek olarak verilmiştir.

In# : 5
 Name : CAF
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=3.54845e-005x+0$
 Rr1=0.9999805 Rr2=0.9999811
 MeanRF:3.57101e-005 RFSD:2.0613e-007 RFRSD:0.57723
 FitTvoe : Linear
 ZeroThrough : Through
 WeightedRearession : None
 Detector Name : Detector A
 Conc.



Şekil 2.5 Kafein linearitesi

2.2.6 Kromatografi Öncesi Ön Saflaştırma

Suyla ekstraksiyon sonucu elde edilen çay ekstraktının kateşin ve kafein içeriğinin azaltılıp teanin yüzdesinin artırılması için çay ekstraktı bu kez de etil asetatla ekstrakte edilmiştir. 1:1 hacminde çay ekstraktı ve etil asetat musluklu ayırma hunisine alınarak 5 dakika boyunca çalkalanıp 5 dakika beklemeye bırakılmıştır. Bekleme sırasında etil asetat ve su fazı ayrılmış olup verimi arttırmak için alınan su fazına 2 kez daha aynı işlem uygulanmıştır. Elde edilen su fazı, içinde kalmış olabilecek etil asetat kalıntısını uzaklaştırmak için 50°C’de 100 mbar’a kadar düşürülen vakum altında döner buharlaştırıcıda buharlaştırılmıştır. Bu işlemler sonunda elde edilen ekstrakt teanince zengin sulu ekstrakt olarak tanımlanmıştır.

2.2.7 Kolon Kromatografisi

Çalışmada biyomoleküllerin saflaştırılması için geliştirilmiş otomatik sıvı kromatografi cihazı kullanılmıştır. Cihazın genel görünümü Şekil 2.6’da verilmiştir. Cihaz ana sistemin yanında kromatogramın görülüp kontrolün sağlanabileceği bir monitör, sistemin bağlandığı ve dolgu maddesi ile doldurmuş bir kolonve kolondan ayrılan fraksiyonların toplandığı bir fraksiyon toplayıcıdan (Şekil 2.7) oluşmaktadır.



Şekil 2.6 Kolon kromatografi sistemi ve kolon



Şekil 2.7 Fraksiyon toplayıcı

Kolon kromatografisinde uygun bir adsorban (dolgu maddesi) kullanılarak teanince zengin ekstrakttaki polifenoller, pektin, proteinler ve diğer safsızlıkların uzaklaştırılması amaçlanır [8].

Bu çalışmada kolon dolgu maddesi olarak poliamid kullanılmıştır. Poliamid'in hidrofobik karakterde olması suda çözünen bileşiklerin kolonda tutulmayıp hemen ayrılmasını sağlamaktadır [8].

Mobil faz olarak su kullanılması ise teaninin en iyi çözücüsü olmasından [7] ve hidrofobik karakterli kolondan hızlıca ayrılmasından dolayıdır. Ardından çözücününüğücü etil alkol ile arttırılarak kolona daha sıkı tutunan diğer bileşiklerin ayrılması sağlanabilmektedir [8].

Kolon kromatografisi çalışmaları adsorbanı hazırlamak için yapılan ön işlemler ve kolondaki saflaştırma çalışmaları olarak iki başlıkta incelenmiştir.

2.2.7.1 Adsorban Ön İşlemleri

Adsorbana içinde bulunabilecek kirlilikten arındırmak ve adsorplama kapasitesini arttırmak amacıyla ön işlem uygulanır. Burada kullanılacak miktarda adsorban bir beherin içine alınarak üzerini bir parmak geçecek kadar metanol eklenip 15 dk karıştırılır. 10 dk beklenip üst kısımdaki metanol dikkatlice dökülür. Ardından aynı işlem bu kez de saf su ile iki kez daha yapılarak metanolün iyice uzaklaşması sağlanır. Son işlemde suyu süzmeye gerek yoktur. Sulu adsorban bir süzgeç kağıdı yerleştirilmiş huni yardımıyla süzülür. Süzgeç kağıdında kalan adsorban kağıdın üzerine yayılarak kuruması için oda sıcaklığında bir gün bekletilir.

2.2.7.2 Saflaştırma

Poliamid ile doldurulan kolona bu işlemde teanine zengin sulu ekstrakt enjekte edilmiştir. Çizelge 2.5’ te metodun detayları verilmiştir.

Çizelge 2.5 Kolon kromatografi metodu

Kolon	Boy: 20 cm - Çap: 1.5 cm
Akış Hızı	0.5 mL/dk
Metot	Dengeleme: 0.1 kolon hacmi
	Örnek Yükleme: 0.1 kolon hacmi
	Dengeleme: 0.1 kolon hacmi
	Elüsyon: 2 kolon hacmi
Dalga Boyu	196 nm
Sıcaklık	Sıcaklık uygulanmayıp oda sıcaklığında çalışılmıştır
Mobil faz	Deiyonize su
Enjeksiyon miktarı	1 mL
Toplama hacmi	10 mL
Toplam Analiz Süresi	Teanin eldesi: 60 dk
	Kolon temizliği: 400dk

Metotta öncelikle kolondan bir süre su geçirilerek kolonun tamamen temizlenmesi sağlanmıştır. Örnek kolona gönderildikten sonra çok kısa bir süre daha su verilip ardından asıl yıkama kısmına geçilmiştir. Bu kısımda kolondan ayrılan tüm sıvılar 10

ml'lik tüplerde toplanmıştır. İlk önce teaninin elde edileceği 2 CV' lik elüsyon fazı uygulanmış daha sonra kolonun temizlenmesi için 8 CV % 80'lik etanol geçirilmiştir. Son olarak kolon tekrar suyla dengeye getirilip bir sonraki çalışma için hazır durumda bırakılmıştır.



BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Yanıt Yüzey Yöntemiyle Optimizasyon ve İstatistiksel Analiz

Yanıt yüzey yönteminde merkezi karma tasarıma göre bağımsız değişkenler ve değer aralıkları girilerek çalışılacak deney koşulları tablosu elde edilmiştir. Bu koşullarda deney yapılarak elde edilen bağımlı değişken değerlerikuru ağırlıkta g/100g cinsinden tabloya girilmiştir. Klasik ve ultrases ekstraksiyonu için iki farklı tasarım yapılmıştır. Deney koşulları ve elde edilen bağımsız değişken değerleri Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre klasik ekstraksiyonda ekstrakttaki teanin miktarı 0.330-0,399 g/100g aralığında, ultrases ekstraksiyonunda ise 0,400-0,582 g/100g aralığında bulunmuştur.

Çizelge 3.1 Klasik ekstraksiyon için merkezi karma tasarım deney sonuçları

Deney	Faktör 1 A:Sıcaklık (°C)	Faktör 2 B:Süre (dk)	Faktör 3 C:Oran (su/çay %)	Cevap: Teanin (g/100g km)
1	70	45	25	0,350
2	80	30	20	0,375
3	70	15	15	0,334
4	90	15	25	0,368
5	80	30	20	0,378
6	90	45	15	0,375
7	70	15	25	0,330
8	90	45	25	0,394
9	70	45	15	0,359
10	90	15	15	0,368
11	80	30	20	0,375
12	80	30	20	0,380
13	80	55	20	0,377
14	96	30	20	0,399
15	80	4	20	0,331
16	80	30	28	0,377
17	80	30	20	0,381
18	80	30	20	0,376
19	63	30	20	0,339
20	80	30	11	0,343

Çizelge 3.2 Ultrases ekstraksiyonu için merkezi karma tasarım deney sonuçları

Deney	Faktör 1 A:Sıcaklık (°C)	Faktör 2 B:Süre (dk)	Cevap: Teanin (g/100g km)
1	70	30	0,507
2	60	15	0,415
3	80	45	0,557
4	70	30	0,507
5	70	30	0,507
6	60	45	0,495
7	80	15	0,525
8	84	30	0,582
9	70	30	0,577
10	70	30	0,507
11	70	30	0,507
12	70	8	0,444
13	70	51	0,524
14	55	30	0,400

Ayrıca ultrases ekstraksiyonunda çözücü olarak su yerine etanol-su karışımının ekstraksiyon verimine etkisi de araştırılmıştır. Bu amaçla %40 etanol-su karışımı kullanılarak 60°C’de 30 dakikalık bir ekstraksiyon denemesi yapılmıştır. Elde edilen ekstraktın teanin içeriği 0.218 g/100g olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre teaninin sudaki ekstraksiyon veriminin etil alkole göre daha fazla olması nedeniyle etil alkol ekstraksiyonu ile ilgili bir tasarım yapılmamıştır.

Yanıt yüzey kuadratik modeline göre yapılan analizlerde ANOVA (Varyans Analizi) sonuçları Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4’te verilmiştir.

Çizelge 3.3 Klasik ekstraksiyon ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı (Sum of Squares)	Serbestlik Derecesi (DF)	Ortalamanın Karesi (Mean Square)	F değeri	Olasılık (p)>F
Model	0.00768	2	0.00085	17.29	0.0002
A-Sıcaklık	0.00397	9	0.00397	80.47	0.0001
B-Süre	0.00176	1	0.00176	35.80	0.0003
C-Oran	0.00029	1	0.00029	5.92	0.0410
Arta Kalan (Residual)	0.00039	8	0.00005		
Uyum Eksikliği (Lack of Fit)	0.00036	5	0.00007	7.43	0.0647
Hata (Pure Error)	0.00003	3	0.00001		
Düzeltilmiş Toplam	0.00813	19			
$R^2=0.9511$	$R^2_{adj}=0.8961$				

Elde edilen sonuçların anlamlı olabilmesi için modelde p değerlerinin 0.05'in altında olması gerekir. Elde edilen 0.0002 değeri modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Bağımsız değişkenler olan sıcaklık, süre ve orana ait p değerlerinin her üçünün de 0.05'in altında olması her üç parametrenin de istatistiksel olarak ekstraksiyon verimini etkilediğini göstermektedir. Parametrelerin içinde en yüksek p değerine sahip olan oran ekstraksiyon veriminde en az etkiye sahiptir. Uyum eksikliği regresyonda içerilmeyen noktalarda deneysel kümedeki verileri göstermek için modelin başarısını ölçer [30]. 0.0647 olan uyum eksikliği anlamlı değildir. Modelin başarılı olması için uyum eksikliğinin anlamlı olmaması yani 0.05'in üzerinde olması gerekir. Fakat %10'un altında olan olasılık değeri (% 6.4) düşüktür.

R^2 değerinin mümkün olduğunca 1'e ve R^2_{adj} değerine yakın olması istenir. Modelde 0.9511 olan R^2 değeri toplam değişimin %95'inin bağımsız değişkenlere atfedilebileceğini, toplam değişimin yalnızca % 4.8'inin modelle ifade edilemeyeceğini gösterir [30].

Çizelge 3.4 Ultrases ekstraksiyon ANOVA sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı (Sum of Squares)	Serbestlik Derecesi (DF)	Ortalamanın Karesi (Mean Square)	F değeri	Olasılık (P)>F
Model	0.0320	5	0.0064	8.77	0.0063
A-Sıcaklık	0.0230	1	0.0230	31.27	0.0008
B-Süre	0.0063	1	0.0063	8.60	0.0220
Arta Kalan (Residual)	0.0051	7	0.0007		
Uyum Eksikliği (Lack of Fit)	0.0089	3	0.0006	0.77	0.5668
Hata (Pure Error)	0.0032	4	0.0008		
Düzeltilmiş Toplam	0.0380	13			
R ² =0.8623	R ² _{adj} =0.7640				

Çizelge 3.4'teki sonuçlara göre ultrases ekstraksiyonunda 0.0063 olan p değeri anlamlıdır. Her iki bağımsız değişkenin de istatistiksel olarak önemli olduğu görülmektedir. Uyum eksikliği anlamlı değildir ve % 56 olan olasılık değeri iyidir.

Klasik ekstraksiyon analizi sonucu elde edilen kodlanmış değerler cinsinden denklem katsayılarının Denklem 2.1'e yerleştirilmesiyle Denklem 3.1 elde edilmiştir.

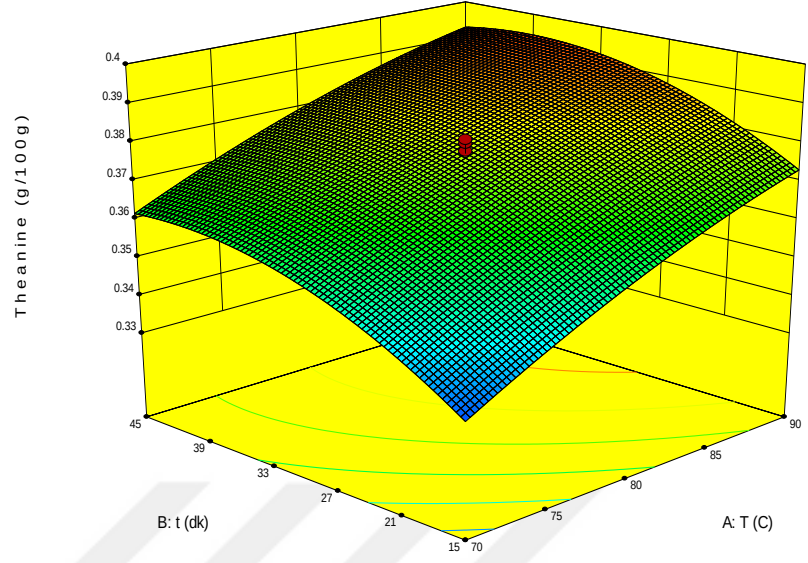
$$\text{Teanin}=0.38+0.017A+0.011B+0.00462C-0.0015AB+0.004AC+0.00175BC-0.003067A^2-0.008371B^2-0.006249C^2 \quad (3.1)$$

Ultrases ekstraksiyonu analizi sonucu elde edilen kodlanmış değerler cinsinden denklem katsayılarının Denklem 2.1'e yerleştirilmesiyle Denklem 3.2 elde edilmiştir.

$$\text{Teanin}=0.52+0.054A+0.028B-0.012AB-0.011A^2-0.015B^2 \quad (3.2)$$

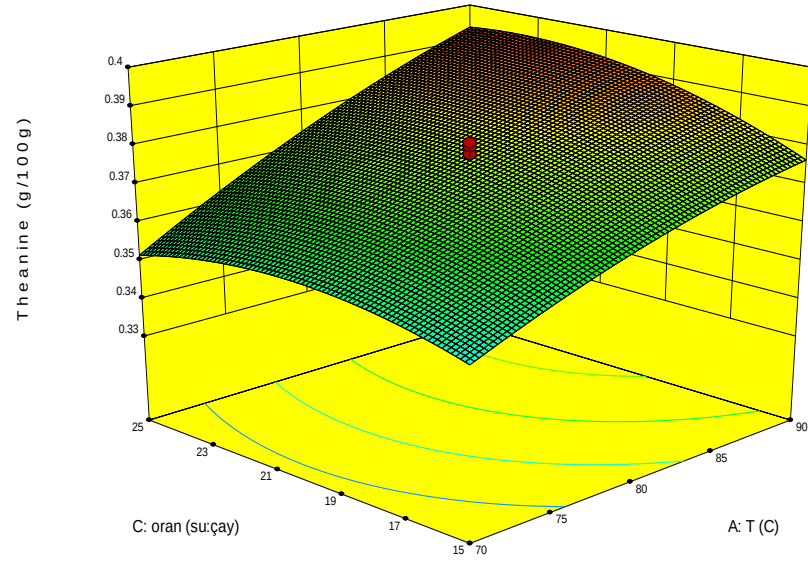
Design Expert programında teanin konsantrasyonunun sıcaklık-süre ve oranla değişiminin interaksiyonlu 3 boyutlu grafikleri klasik ekstraksiyon için Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'te verilmiştir.

Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Theanine (g/100g)
 ● Design points above predicted value
 ○ Design points below predicted value
 0.399
 0.33
 X1 = A: T
 X2 = B: t
 Actual Factor
 C: oran = 20



Şekil 3.1 Klasik ekstraksiyonda teanin miktarının sıcaklık ve süreyle değişimi

Design-Expert® Software
 Factor Coding: Actual
 Theanine (g/100g)
 ● Design points above predicted value
 ○ Design points below predicted value
 0.399
 0.33
 X1 = A: T
 X2 = C: oran
 Actual Factor
 B: t = 30



Şekil 3.2 Klasik ekstraksiyonda teanin miktarının sıcaklık ve oranla değişimi

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

Theanine (g/100g)

● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

0.399

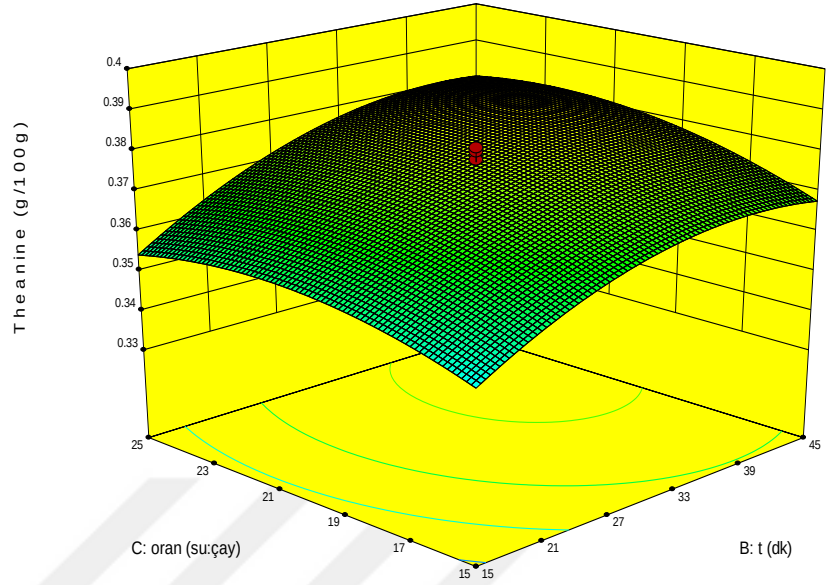
0.33

X1 = B: t

X2 = C: oran

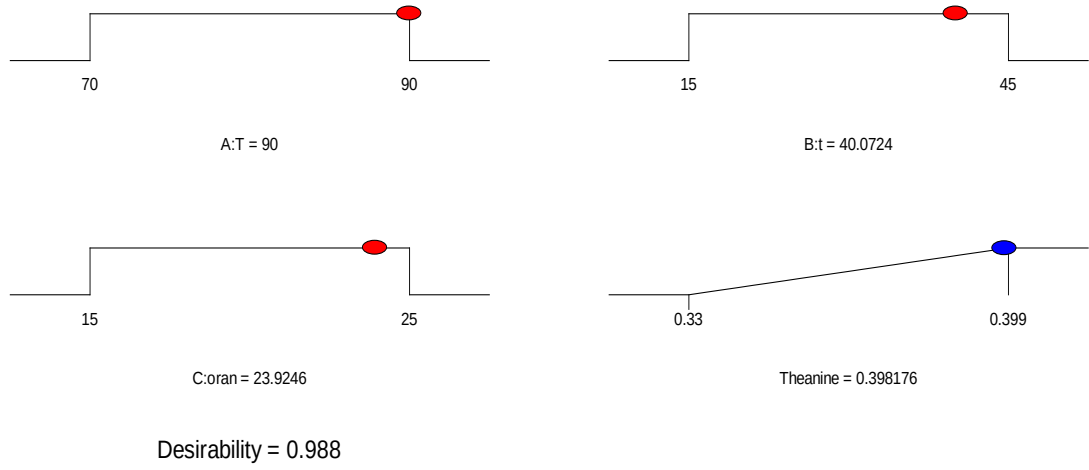
Actual Factor

A: T = 80



Şekil 3.3 Klasik ekstraksiyonda teanın miktarının süre ve oranla değişimi

Grafiklerde de görüldüğü gibi klasik ekstraksiyonda teanın miktarı sıcaklık, süre ve oranla birlikte artma eğilimindedir. Klasik ekstraksiyonda teanın verimi için optimum nokta; 90°C, 40 dk, 23:1 mL/g su:çay oranı olarak görülmektedir. Bu noktada elde edilen maksimum teanın konsantrasyonu % 0.398'dir. Optimize edilmiş koşullar Şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.4 Klasik ekstraksiyonda optimizasyon

25:1 mL/g su:çay oranı ile çalışılan ultrases ekstraksiyonunda teanin konsantrasyonunun sıcaklık ve süreyle değişim grafiği 3 boyutlu olarak Şekil 3.5'te verilmiştir.

Design-Expert® Software

Factor Coding: Actual

Teanin

● Design points above predicted value

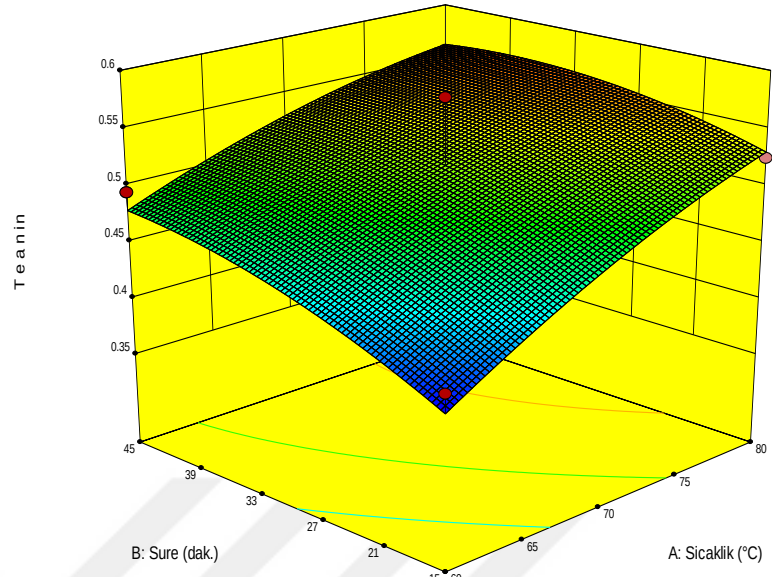
○ Design points below predicted value

0.582

0.4

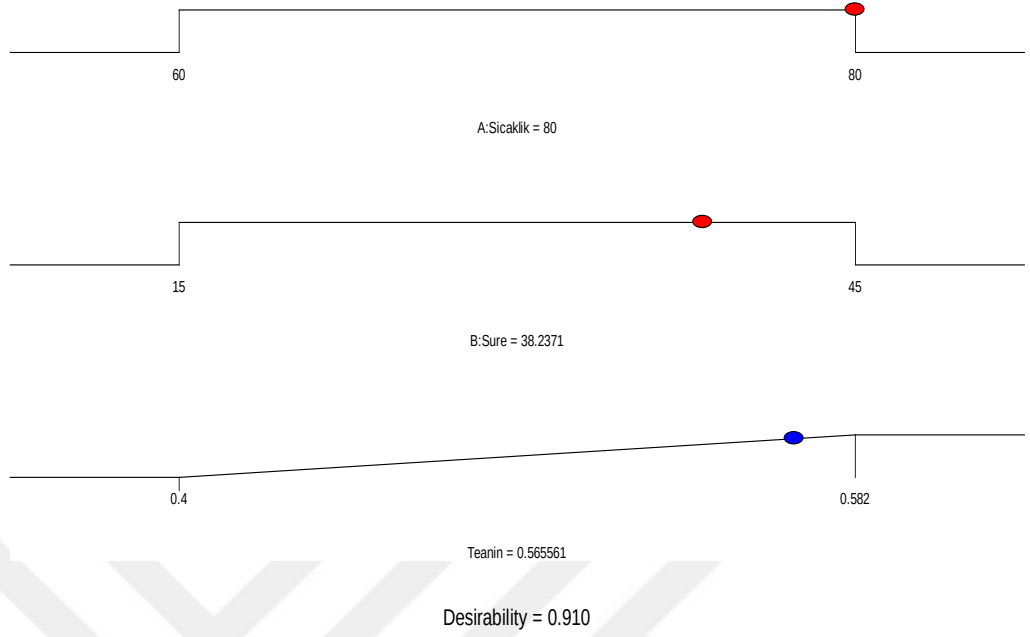
X1 = A: Sıcaklık

X2 = B: Sure



Şekil 3.5 Ultrases ekstraksiyonda teanin miktarının sıcaklık ve süreyle değişimi

Ultrases ekstraksiyonunda da teanin miktarı sıcaklık ve süreyle doğru orantılı olarak artmaktadır. Optimum nokta 80°C ve 38 dk olarak belirlenmiştir. Bu noktada edilen en yüksek teanin konsantrasyonu % 0.565'e ulaşmıştır. Optimize edilmiş koşullar Şekil 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3.6 Ultrases ekstraksiyonunda optimizasyon

Elde edilen ekstraksiyon koşullarının literatürdeki koşullarla karşılaştırılması Çizelge 3.5’te verilmiştir.

Çizelge 3.5 Optimum koşulların karşılaştırılması

Çalışma ¹	Çay Çeşidi	Sıcaklık(°C)	Süre(dk)	Su:Çay (mL/g)	Teanin (%)
Klasik	Yeşil-Türkiye	90	40	23:1	0.39
Ultrases	Yeşil-Türkiye	80	38	-	0.56
[1]	Siyah-Türkiye	80	25	-	0.32-0.43
[11]	Yeşil-Vietnam	80	30	20:1	2.6
[9]	Yeşil-Çin	98	40	12:1	0.41

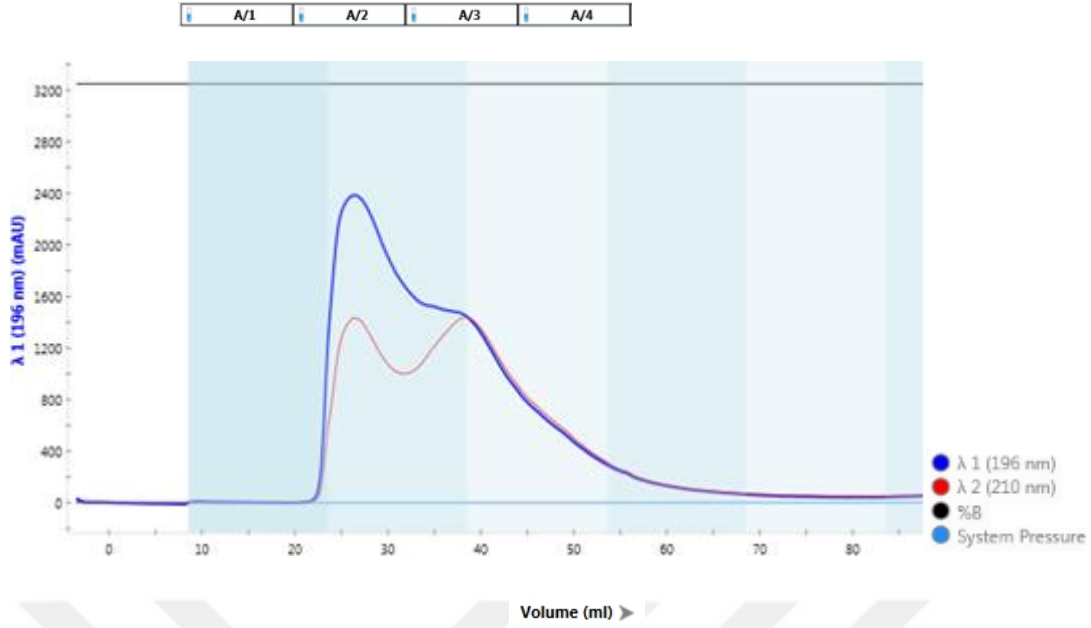
¹Klasik ve ultrases olarak belirtilen koşullar bu çalışmada elde edilen koşullar olup diğer koşullar ilgili numaralara ait kaynaklarda belirtilen koşullardır.

Çizelge 3.5 incelendiğinde ultrases ekstraksiyonu ile klasik ekstraksiyona göre 10°C daha düşük sıcaklıkta daha yüksek teanin verimine ulaşıldığı görülmektedir. Böylelikle hem enerjiden tasarruf edilip hem de verim arttırılabilir. Daha önceki çalışmada [1] siyah çayla yapılan ekstraksiyon optimizasyonunda 80°C'nin üzerine çıkıldığında teanin veriminin azaldığı görülmüştür fakat bu çalışmada artan sıcaklıkla birlikte verim artmaktadır. Bu sonuç ekstraksiyon koşullarındaki farklılıktan kaynaklanabileceği gibi siyah ve yeşil çaya sıcaklığın etkilerinin farklı olmasından da oluşabilir. Yeşil vietnam çayında [11] çalışılan maksimum ekstraksiyon sıcaklığı 80°C'dir, daha yüksek sıcaklıkların etkisi çalışılmadığından sıcaklık yükseldikçe verimin artma ihtimali mevcuttur. Yeşil Çin çayında [9] ise bu çalışmayı doğrulayıcı olarak çalışılan en üst sıcaklık derecesinde en yüksek teanin verimi elde edilmiştir. Ekstraksiyon süreleri ise siyah çayın dışında birbirine çok yakındır. Su:çay oranının ekstraksiyon verimine etkisi ise her çalışmada farklı bulunmuştur. Bu çalışmada da su:çay oranının etkisi istatistiksel olarak önemli çıkmakla birlikte yine de önem derecesi oldukça düşüktür. Çalışmalar arasındaki farklılıklar da oranın verim üzerinde etkisi hakkında kesin sonuca varılamayacağını göstermektedir. Siyah Türk çayı [1] ile yapılan çalışmada elde edilen %0,32-0,43'lük teanin konsantrasyonu incelendiğinde bu çalışmada elde edilen sonuçlara oldukça yakın görülmektedir. Aradaki küçük fark siyah çayın teanin içeriğinin daha düşük olmasından kaynaklanabilir. Yeşil Çin çayının [9] optimum ekstraksiyon koşulları gibi teanin içeriği de Türk çayına oldukça yakındır. Fakat Yeşil Vietnam [11] çayının ekstraksiyon koşullarının uyumlu olmasına rağmen teanin içeriği oldukça yüksektir. Bu sonuç çay çeşidinden veya farklı analiz yöntemlerinden kaynaklanabilmektedir.

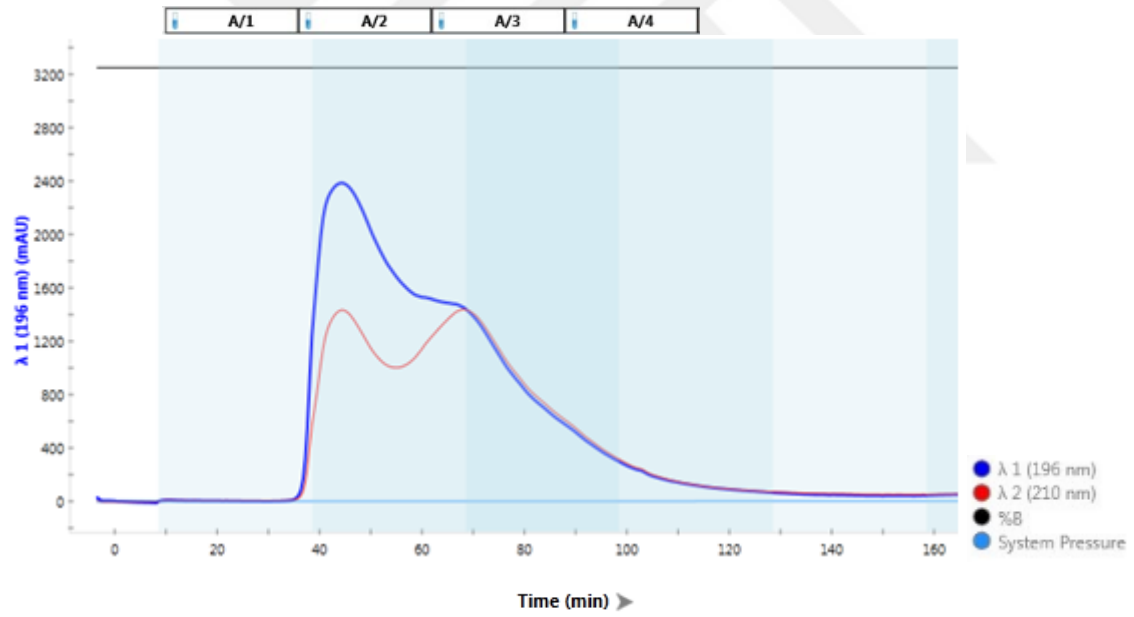
Literatürde yeşil ve siyah çayın hangisinin teanin içeriğinin fazla olduğuna yönelik farklı bilgiler bulunması üzerine iki çayın bileşimini karşılaştırmak için aynı koşullarda iki tür çayda da ekstraksiyon yapılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. İki paralel halinde çalışılmış olup ortalaması alınan sonuçlara göre yeşil çayda 0,441 g/100g olan teanin içeriği siyah çayda 0.411 g/100g olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç siyah çay ve yeşil çayın teanin içeriğinin birbirine oldukça yakın olduğunu göstermektedir.

3.2 Kolon Kromatografisi ile Saflaştırma

Poliamid ile doldurulmuş kolona ilgili metotta teanince zengin sulu ekstraktın verilmesiyle elde edilen kromatogram Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7 Teaninin hacme göre kromatogramı



Şekil 3.8 Teanin zamana göre kromatogramı

Kromatogramlarda birbirine çok yakın iki pik görülmektedir. Bu ayrım 210 nm dalga boyunda daha belirgindir. A/2 tüpünde toplanan yaklaşık olarak 22-32 ml ve 40-60 dakika arasına denk gelen kısımda ilk pik görülmektedir. Bunun hemen ardından A/3 tüpünde toplanan 33-43 ml ve 60-80 dakika arasında ikinci pik görülmekte ve pik A/4 tüpünün sonuna kadar devam etmektedir. Bunun üzerine A/1-A/2-A/3 ve A/4 tüplerinden örnek alınarak HPLC'ye verilmiş, hem teanin hem kafein-kateşin analizleri

yapılmıştır. Aynı analizler başlangıçta kolona verilen teanince zengin sulu ekstrakt için de yapılmış ve tüm sonuçlar Çizelge 3.6’da verilmiştir. Burada bileşimi verilen teanince zengin ekstrakt Bölüm 2.2.6’da açıklanan işlemler sonucu elde edilen ekstraktır.

Çizelge 3.6 Ekstraktın saflaştırma sonuçları

Bileşik ¹	Teanince Zengin Ekstrakt	Saflaştırma Sonuçları (ppm)			
	Konsantrasyon (ppm)	A/1	A/2	A/3	A/4
GA	7,321	0,000	1,389	4,196	0,000
GC	56,285	0,000	0,000	0,000	0,000
EGC	369,641	0,000	13,662	0,000	3,217
C	76,002	0,000	11,713	3,907	0,000
CAF	245,425	0,000	5,036	145,153	92,968
EC	14,546	0,000	0,000	0,000	0,000
EGCG	26,330	0,000	2,405	0,000	0,000
GCG	6,790	0,000	0,000	0,000	0,000
ECG	12,608	0,000	0,000	0,000	0,000
Teanin	374,038	0,000	308,075	42,224	0,000
TOPLAM	1188,986	0,000	342,280	195,480	96,185
%Teanin	31,459	0,000	90,007	21,600	0,000

Çizelge 3.6’ya göre kromatogramda da görüldüğü gibi A/1 tüpünde hiçbir bileşiğe rastlanmamıştır. En büyük pikin oluştuğu A/2 tüpü % 90 saflıkta teanin içermektedir ve ekstrakttaki toplam teaninin % 82’si burada gelmektedir. A/3 tüpünde belirgin olarak kafein gelmekte ve teanin miktarı azalmaktadır. A/4 tüpünde ise bir miktar daha kafein gelmekte ve teanin tamamen sonlanmaktadır. Bu sonuçlar başlangıçtaki ekstraktın içeriği ile de uyumlu olup tüplerde toplanan teanin ve kafein miktarları ekstrakttaki miktarlara oldukça yakındır. Aynı çalışma 3 kez tekrarlanmış olup bu çalışmalarda elde edilen saflık yüzdesi % 85-% 90 aralığında değişmiştir.

¹ GA: Gallik asit, GC: Gallokateşin, EGC: Epigallokateşin, C: Kateşin, CAF: Kafein, EC: Epikateşin, EGCG: Epigallokateşingallat, GCG: Gallokateşingallat, ECG: Epikateşingallat

Literatürdeki teanin saflaştırma çalışmalarına [18], [19] bakıldığında poliamidin ardından kafein ve teanini birbirinden ayırmak için NKA-II, DM 130 ve 732 katyon iyon değişim gibi adsorbanlar kullanılmıştır. İkinci bir saflaştırma işleminden sonra % 98-% 99 saflığa ulaşılmıştır. Diğer bir kaynakta [8] ise teaninin içinde poliamidin de bulunduğu polimerik bir dolgu maddesi kullanılarak saflaştırılabileceğinden bahsedilmiştir.

Bu çalışmada da sadece poliamid dolgu maddesi kullanılarak ayırım sağlanabilmiştir. Teanin ve kafein birbirine çok yakın zamanlarda kolondan ayrılmaktadır. Bu nedenle yüksek saflıkta ürün elde etmek için iki bileşiğin birbirinden ayrıldığı zaman çok iyi tespit edilmeli ve bu noktada farklı tüplere toplama işlemi yapılmalıdır. Bu ayırma göre saflık % 85-90 arasında değişebilmektedir. Aynı çalışma 1ml/dk akış hızında yapıldığında teanin- kafein ayrımı kromatogramda net olarak görülememiştir. Hız azaltılınca iki bileşiğin ayrımı daha kolay tespit edilebilmekte böylece teanin ve kafein ayrımı sağlanabilmektedir. Bu yöntemle ikinci bir dolgu maddesi ile tekrar saflaştırma işlemi yapmaya gerek kalmamaktadır. Tek bir dolgu maddesi kullanılarak yapılan bu çalışma teanin saflaştırılmasında oldukça pratik ve ekonomik bir yöntemdir. Üstelik teanince zengin ekstrakt kolona verildikten sonra ilk 60 dakikada teanin fraksiyonu elde edilebildiğinden hızlı bir yöntemdir. Elde edilen saflık yüzdesi (% 90) önceki çalışmalara (% 98, % 99) kıyasla bir miktar düşük olmasına karşın o çalışmalardan farklı olarak tek dolgu maddesi kullanılıp fazladan bir proses uygulanmamıştır. Ayrıca teanin geri kazanımı (% 82) önceki çalışmalara (% 66) göre daha yüksektir. Bu yöntemle, % 90 saflığın kabul edilebilir olduğu alanlarda diğer yöntemlere kıyasla zamandan, maliyetten ve emekten büyük oranda tasarruf sağlanabilir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada yeşil çaydan teanin ekstraksiyonu için yanıt yüzey yöntemiyle optimizasyon yapılmış olup en uygun koşulun ultrases tekniğinin kullanıldığı 80°C- 38 dk- 23:1 mL/g su:çay oranı olarak belirlenmiştir. Ultrases ekstraksiyonu ile çaydan en fazla % 0.565 oranında teanin ekstrakte edilmiştir. Klasik ekstraksiyonda ise teanin ekstraksiyonunda optimum koşullar 90°C, 40 dk, 23:1 mL/g su:çay oranı olup en yüksek teanin içeriği % 0.398 olarak belirlenmiştir. Elde edilen ekstrakta ilave ekstraksiyon işlemleri uygulanarak % 31 oranında teanin içeren ekstrakt elde edilmiştir. Ardından bu ekstraktın kolon kromatografisinde saflaştırma çalışmaları yapılmış ve sonuç olarak % 90 saflığa ulaşılmıştır.

Sadece tek bir dolgu maddesi kullanılarak saflaştırma yapılması bakımından yöntem oldukça pratik ve ekonomiktir. Fakat poliamiddeki teanin-kafein ayrımı çok hassastır ve yüksek saflığa ulaşmak için dikkatli takip edilmesi gerekmektedir. Laboratuvar ölçekte uygulanıp oldukça iyi sonuç veren bu çalışmanın pilot veya sanayi ölçekte uygulanabilirliğinin denenmesi gerekmektedir. Aynı zamanda ürün denemeleri yapılarak formülasyonlarda kullanımının ve biyoaktif özelliklerinin incelenmesi de öneriler arasındadır.

KAYNAKLAR

-
- [1] Sarı, F., (2010). Çay İşlemede Teanin Miktarının Değişimi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [2] Fisunoğlu, M. ve Besler, T., Çay ve Sağlık İlişkisi, <http://sbu.saglik.gov.tr/Ekutuphane/kitaplar/t63.pdf>, 8 Şubat 2016.
- [3] Doğu Karadeniz İhracatçılar Birliği Genel Sekreterliği, Dünya’da ve Türkiye’de Çay Sektörü & Dünya’da Çay Sektöründeki Son Gelişmeler, www.dkib.org.tr, 26 Şubat 2016.
- [4] FAOSTAT, Food and Agricultural Commodities Production, <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339>, 26 Şubat 2016.
- [5] Tosun, İ. ve Karadeniz, B., (2005). “Çay ve Çay Fenoliklerinin Antioksidan Aktivitesi”, OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 20(1):78-83.
- [6] Sarıca, Ş., Karataş, Ü. ve Diktaş, M., (2008). “Çay (*Camellia sinensis*); İçeriği, Metabolizma ve Sağlık Üzerine Etkileri, Antioksidan Aktivitesi ve Etlik Piliç Karma Yemlerinde Kullanımı”, GOÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 25(2):79-85.
- [7] Vuong, Q.V., Bowyer, M.C. ve Roach, P.D., (2010). “L-Theanine: Properties, Synthesis and Isolation from Tea”, Journal of the Science of Food and Agriculture, 91:1931–1939.
- [8] United States Patent, Process for Enriching Extracts of Natural Theanine.(Patent No: US 7,303,773 B2), 04.12.2007, 1-8.
- [9] Zhang, X., Xu, F., Gao, Y., Wu, J., Sun, Y. ve Zeng, X., (2012). “Optimising the extraction of tea polyphenols, (-)-epigallocatechin gallate and theanine from summer green tea by using response surface methodology”, International Journal of Food Science and Technology, 47:2151–2157.
- [10] ISO 19563, (2016). Determination of Theanine in Tea and Instant Tea in Solid Form Using High Performance Liquid Chromatography, BSI, London.
- [11] Vuong, Q.V., Stathopoulos, C.E., Golding, J.B., Nguyen, M.H. ve Roach, P.D., (2011). “Optimum Conditions for the Water Extraction of L-Theanine from Green Tea”, Journal of Separation Science, 34: 2468–2474.
- [12] Alcazar, A., Ballesteros, O., Jurado, J.M., Pablos, F., Martin, M.J., Vilches, J.L. ve Navalón, A., (2007). “Differentiation of Green, White, Black, Oolong, and Pu-erh Teas According to Their Free Amino Acids Content”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55: 5960-5965.

- [13] Mu, W., Zhang, T. ve Jiang, B., (2015). “An Overview of Biological Production of L-Theanine”, *Biotechnology Advances*, 33: 335-342.
- [14] Koca, İ. ve Bostancı, Ş., (2011). “Çayda Bulunan Bir Aminoasit: L- Teanin”, 7. Gıda Mühendisliği Kongresi, 24-26 Kasım 2011, Ankara.
- [15] Green, R. J., (2008). Impact of green tea formulation on measures of tea catechin bioavailability, Doktora Tezi, Purdue University Graduate School, Indiana.
- [16] Hasdemir, M.İ., İnci, İ., Bilgin, B., Önder, M. ve Aydın, A., (2000). “Kafeinin Su ve Bazı Organik Çözücüler Arasındaki Dağılıma Katsayılarının Sıcaklığa Bağlı Olarak Değişiminin İncelenmesi”, *Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 6: 255-258.
- [17] Keenan, E.K., Finnie, M.D.A., Jones, P.S., Rogers, P.J. ve Priestley, C.M., (2011). “How much theanine in a cup of tea? Effects of tea type and method of preparation”, *Food Chemistry*, 125: 588-594.
- [18] Zhang, X., Lei, S.C., Jabbar, S., Hu, B., Sun, Y. ve Zeng, X.X., (2013). “Simultaneous separation and purification of tea bioactives from summer green tea by column chromatography”, *Journal of the Chemical Society of Pakistan* 35: 5.
- [19] Wang, L., Gong, L.H., Chen, C.J., Han, H.B. ve Li, H.H., (2012). “Column-chromatographic extraction and separation of polyphenols, caffeine and theanine from green tea”, *Food Chemistry*, 131: 1539–1545.
- [20] Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Laboratuvarı II, <http://mf.omu.edu.tr/kimya/wp-content/uploads/sites/9/2015/01/Kat%C4%B1-S%C4%B1v%C4%B1-Ekstraksiyonu.pdf>, 4 Mart 2016.
- [21] Grosso, C., Valentão, P., Ferreres, F. ve Andrade, P.B., (2015). “Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds”, *Marine Drugs*, 13: 3182-3230.
- [22] Ergün, A.R., Baysal, T. ve Bozkır, H., (2013). “Ultras ses Yöntemi ile Karotenoidlerin Ekstraksiyonu”, *GIDA*, 38 (4): 239-246.
- [23] Türkmen, F., (2012). Yüksek Güçlü Ultras ses İşleminin Sütün Fizikokimyasal ve Jelleşme Özelliklerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [24] Koç, B. ve Ertekin, F.K., (2010). “Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları”, *GIDA*, 35: 63-70.
- [25] Değirmencioglu, A. ve Yazgı, A., (2006). “Tepki Yüzeyleri Metodolojisi Optimizasyon Esaslı Çalışmalara İlişkin Teorik Esaslar ve Tarımsal Mekanizasyon Uygulamaları”, *Tarım Makinaları Bilimi Dergisi*, 2 (2): 111-115.
- [26] Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S. ve Escaleira, L.A., (2008). “Response Surface Methodology (RSM) as a Tool for Optimization in Analytical Chemistry”, *Talanta*, 76: 965–977.

- [27] Megep, (2013). Kromatografik Analizler, http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Kromatografik%20Analizler.pdf, 7 Mart 2016.
- [28] Csupor, D., Boros, K., Jedlinszki N., Hohmann, J., (2014). “A Validated RP-HPLC-DAD Method for the Determination of L-Theanine in Tea”, Food Analytical Methods, 7:591–596.
- [29] ISO 14502-2, (2005). Determination of Substances Characteristic of Green and Black Tea- (Part 2) Content of Catechins in Green Tea — Method Using High-Performance Liquid Chromatography, ISO, I. Baskı, Switzerland.
- [30] Erşan, M. ve Açıkel, Ü., (2014). “R. Delemar’ın Asit Fosfataz Üretimi Ve Zn (II)Biyobirikiminin Cevap Yüzey Yöntemi Kullanarak Optimize Edilmesi”, Gazi Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Dergisi, 29 (2):321-329.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Nihan SAĞCAN
Doğum Tarihi ve Yeri : 31/01/1991 İstanbul
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : onatnihan@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Gıda Mühendisliği	Yıldız Teknik Üniversitesi	2016
Lisans	Gıda Mühendisliği	İstanbul Teknik Üniversitesi	2013
Lise	Fen	Hüseyin Avni Sözen Anadolu Lisesi	2009

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2014-2016	TÜBİTAK Gıda Enstitüsü	Bursiyer
2014	Azık Gıda A.Ş. & Asya Gıda LTD. ŞTİ.	Gıda Mühendisi

YAYINLARI

Proje

1. aydan Katma Değeri Yüksek Yeni rnler Geliştirilmesi (TÜBİTAK TARAL-1007)-2014-2016
2. Siyah aya Bal İlavесinin Antioksidan Kapasitesi ve Biyoyararlılığı- Lisans Tezi - 2012-2013

