



## Siyah Çay ve Siyah Çay Atığı Örneklerinin Farklı Çözgen Konsantrasyonlarında Elde Edilen Ekstraktlarının Biyoaktif Özellikleri ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Mustafa Remzi OTAĞ<sup>1\*</sup>

Giresun Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Giresun, Türkiye

Geliş Tarihi: 29.12.2022

Kabul Tarihi: 07.02.2023

Basım Tarihi: 31.03.2023

Atıf yapmak için: Otağ, M.R. (2023). Siyah Çay ve Siyah Çay Atığı Örneklerinin Farklı Çözgen Konsantrasyonlarında Elde Edilen Ekstraktlarının Biyoaktif Özellikleri ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 8(1), 80-87. <https://doi.org/10.35229/jaes.1226432>  
How to cite: Otağ, M.R. (2023). Determination of Bioactive Properties and Antimicrobial Activities of Extracts of Black Tea and Black Tea Waste Samples Obtained at Different Solvent Concentrations. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 8(1), 80-87. <https://doi.org/10.35229/jaes.1226432>

<https://orcid.org/0000-0001-5450-1546>

**Öz:** Bu çalışma siyah çay atıklarının antioksidan ve antimikrobiyal özellik gösteren fenolik bileşiklerinin katma değerli bir ürün potansiyeli olup olamayacağını belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon çözücüsünün (su, %50, %80 ve %96 etanol) siyah çay ve siyah çay atığı örnekleri üzerine etkileri ve bunların toplam fenolik, antioksidan özellik (DDPH ve ABTS) ve antimikrobiyal aktivite üzerindeki etkileşimi incelenmiştir. Siyah çay ve siyah çay atığı örneklerinin toplam fenolik madde içerikleri sırasıyla 48,79–82,61 ve 42,37–74,03 mg GAE/g aralığında değiştiği saptanmıştır. Farklı etanol konsantrasyonları ile ekstrakte edilen Siyah Çay Atığı örneklerinin antioksidan özellikleri karşılaştırıldığında en yüksek DPPH radikal süpürme etkisi ve ABTS antioksidan kapasite değeri %80 etanol ile ekstrakte edilen örneklerde gerçekleştiği ve sırasıyla %41,86 ve 2,23 µmol TE/mg ekstrakt değerlerinde olduğu saptanmıştır. Genel olarak, siyah çay atığı ekstraktlarının seçilen patojen mikroorganizmalara karşı gösterdikleri antimikrobiyal etkinlikler, ilave edilen ekstrakt miktarına bağlı olarak siyah çay ekstraktlarına göre daha yüksek değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, siyah çay atığı örneklerinin gıda takviyesi, ilaç ve yenilebilir ambalaj sektörlerindeki uygulamalar için antioksidan ve antimikrobiyal özelliklere sahip katma değerli ürünlerin geliştirilmesi için hammadde olarak kullanılabilir olduğu düşünülmektedir.

\*Sorumlu yazarın:  
Mustafa Remzi OTAĞ  
Giresun Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,  
Gıda Mühendisliği Bölümü, Giresun, Türkiye  
✉: [mustafa.otag@giresun.edu.tr](mailto:mustafa.otag@giresun.edu.tr)

**Anahtar kelimeler:** *Camellia sinensis*, ekstraksiyon, biyoaktivite, antimikrobiyal aktivite.

## Determination of Bioactive Properties and Antimicrobial Activities of Extracts of Black Tea and Black Tea Waste Samples Obtained at Different Solvent Concentrations

**Abstract:** This study was carried out to determine whether black tea wastes could be a value-added product potential as a source of antioxidant and antimicrobial phenolic compounds. The effects of extraction solvent (water, 50%, 80% and 96% ethanol) on black tea and black tea waste samples and their interaction on total phenolic, antioxidant properties (DDPH and ABTS) and antimicrobial activity were investigated. It was determined that the total phenolic content of black tea and black tea waste samples ranged between 48.79–82.61 and 42.37–74.03 mg GAE/g, respectively. When the antioxidant properties of Black Tea Waste samples extracted with different ethanol concentrations were compared, it was determined that the highest DPPH radical scavenging effect and ABTS antioxidant capacity value were observed in the samples extracted with 80% ethanol, with 41.86% and 2.23 µmol TE/mg extract, respectively. In general, it has been determined that the antimicrobial activities of Black tea waste extracts against selected pathogenic microorganisms have higher values than Black tea extracts depending on the amount of added extract. As a result, it is thought that black tea waste samples can be used as raw materials for the development of value-added products with antioxidant and antimicrobial properties for applications in the food supplement, pharmaceutical and edible packaging industries.

\*Corresponding author's:  
Mustafa Remzi OTAĞ  
Giresun University, Faculty of Engineering,  
Department of Food Engineering, Giresun,  
Türkiye  
✉: [mustafa.otag@giresun.edu.tr](mailto:mustafa.otag@giresun.edu.tr)

**Keywords:** *Camellia sinensis*, extraction, bioactivity, antimicrobial activity.

## GİRİŞ

Küresel olarak çay, tropikal yaprak dökmeyen bir bitki olan *Camellia sinensis*'in yapraklarından yapılan bir demlemedir. Cazip ve farklı rengi, aroması, tadı ve sağlık yararları nedeniyle çay, kişi başına yaklaşık 120 mL/gün tüketimi ile dünyada en çok tüketilen ikinci içecek konumundadır (Sun vd., 2021). Yaklaşık 5000 yıl önce, çay ilk olarak Çin'de tıbbi özellikleri nedeniyle tüketilirken, günümüzde çay, çay yapraklarının ve özlerinin yüksek flavonoid içeriğine ilişkin halkın artan farkındalığına ilişkin sağlık yararları için geniş çapta kabul görmüştür (Chen & Lin, 2015). Çay üç farklı kategoride değerlendirilebilir. Bunlarda ilki fermente edilmiş siyah çay, ikincisi yarı fermente edilmiş oolong çayı ve üçüncüsü fermente edilmemiş yeşil çayıdır. Siyah çay en çok Kuzey Amerika, Avrupa ve Kuzey Afrika'da tüketilirken, yeşil çay en çok Asya'da tüketilmektedir. Oolong çayı esas olarak Çin ve Tayvan'da demlenir. Yılda yaklaşık üç milyon ton çay üretilmekte ve tüketilmektedir (Yang & Liu, 2013). Dünya çapında üretilmekte olan çayın yaklaşık %76-78'i siyah çay, %20-22'si yeşil çay ve %2'si oolong çay olarak tüketilmektedir. Çay üreten ülkeler arasında başlıca üreticiler, küresel üretimin %80'ini oluşturan Çin, Hindistan, Sri Lanka, Kenya ve Endonezya'dır. Türkiye'de çayın yetiştirildiği ve üretildiği coğrafi bölge Doğu Karadeniz bölgesidir (Kaur vd., 2015)

Siyah çay tamamen fermente edilmiştir. Solmuş yapraklar, üretim sürecindeki kıvrılma ve fermantasyon aşamalarında bir takım biyokimyasal reaksiyonlar meydana gelir ve ardından kurutma işlemine tabi tutulur. Bu çay türü, oksidasyon, polimerizasyon ve orijinal bileşenlerin diğer modifikasyonları işleme sırasında gerçekleştiği için taze çay yapraklarından farklı bir bileşime sahiptir (Carloni vd., 2013).

Dünyanın birçok ülkesinde artan tarımsal üretim ve tarıma dayalı endüstrilerin gelişmesi, çoğu yeterince yönetilmeyen ve kullanılmayan büyük miktarlarda tarımsal atık üretimine yol açmıştır. Siyah çay atığı (SÇA), esas olarak çay bitkisinin kalite standartları nedeniyle işlenmesinin farklı aşamalarında fiziksel olarak uzaklaştırılan kök, sap ve toz parçacıkları dahil lifli malzemeler gibi kısımlarını içerir. SÇA, çay fabrikalarında yüksek miktarlarda elde edilmesine ve biyoaktif bileşiklerin geri kazanımı için önemli bir hammadde olmasına rağmen, karakterizasyonu ve bir fenolik kaynak olarak işlenmesine yönelik araştırmalar oldukça yetersizdir (Abraham vd., 2021).

Antioksidanlar, gıda ürünlerinde lipid oksidasyonunu önlemek veya minimum seviyelere düşürmekte etkilidirler. BHA (Butillenmiş hidroksiyanozil), BHT (Butillenmiş hidroksitoluen) ve TBHQ (Tersiyeer Bütıl

Hidrokinon) gibi sentetik antioksidanlar, gıdalarda lipid oksidasyonunu azaltmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu tür sentetik antioksidanlar toksikolojik kaygılar nedeniyle tercih edilmemektedir. Bu nedenle, lipid bazlı gıda ürünlerinde lipid oksidasyonunu en aza indirmek için bitki ekstraktlarının değerlendirilmesine yönelik ilgi artmaktadır. Bu doğal antioksidanların çoğu meyvelerden, sebzelerden, baharatlardan, tahıllardan ve bitkilerden elde edilmektedir (Farhoosh vd., 2007).

Çay yaprakları (*Camellia sinensis* L.), kateşinler, flavonoller, flavanonlar, fenolik asitler, glikozitler ve bitki pigmentlerinin aglikonları dahil olmak üzere kuru yaprak ağırlığının %10-30'u oranında polifenol içerir (Pan vd., 2003). Çay polifenolleri doğal antioksidan özellik göstermektedir ve bu bileşiklerin antikanserojenik ve antimutajenik özelliklerinin yanı sıra kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkilerinden sorumlu oldukları düşünülmektedir (Stewart vd., 2005). Ayrıca yapılan bir çok çalışma ile çayda bulunan bu bileşiklerin bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve DL-a-tokoferolden daha güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduklarını göstermiş ve ayrıca bu çay polifenollerinin toksisitesinin BHA, BHT ve DL-a tokoferolden daha düşük değerler gösterdiği belirlenmiştir (Gadkari vd., 2014).

Fermente olmayan yeşil çay ağırlıklı olarak flavanoller, flavandioller ve gallik asit, kumarik asit veya kafeik asit gibi fenolik asitler içerir. Flavanoller, çeşitli kateşin türevlerini içerir. Siyah çay, yeşil çayın fermantasyonu ile üretildiği için fermantasyon sırasında, polifenoller oksitlenir ve enzimatik olarak theaflavinlere ve thearubigenlere polimerize olurlar. Öte yandan, başlıca çay kateşini olan epigallocatechingallat parçalanarak siyah çaydaki kırmızımsı renkten ve büzücü etkiden sorumlu olan ve aynı zamanda güçlü antioksidan aktiviteye de sahip fenolik bileşiklere dönüşmektedir (Zeng vd., 2021).

Daha önce yapılmış çalışmalar incelendiğinde, Epigallocatechin gallate (EGCG), Epicatechin gallate (ECG), Epigallocatechin (EGC) ve Epicatechin (EC), çayda bulunan en önemli antioksidan bileşenleri olduğu bilinmektedir. Bunlar arasında EGCG, çay ekstraktındaki en yüksek oranda bulunan bileşen ve biyolojik aktivite için test edilmiş en güçlü antioksidan olduğu belirlenmiştir. Birçok antibiyotik yan etkileri olması nedeniyle Çay ektratları ile antibiyotiklerin birlikte kullanımı, özellikle enteropatojenler arasında ortaya çıkan antibiyotik ilaç direnciyle mücadelede konusunda faydalı olabilir (Hu vd., 2009).

Bu çalışmanın amacı, SÇA'nın bir antioksidan ve antimikrobiyal bileşik kaynağı olarak potansiyelini araştırmaktır. Bu amaçla, SÇ ve SÇA örneklerinin etanolle elde edilen ekstraktlarının toplam fenolik madde, antioksidan kapasitesi ve antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

**Materyal:** Siyah çay (SÇ) ve siyah çay atığı (SÇA) örnekleri, 2021 yılı hasat döneminde (Mayıs-Temmuz)Türkiye'nin Karadeniz bölgesinde yer alan Tirebolu'daki bir siyah çay fabrikasında aynı işleme hattından alınmıştır. Işık ve hava geçirmeyen torbalarda Giresun Üniversitesi Gıda Mühendisliği Laboratuvarına nakledilmiş ve burada analizler gerçekleştirilinceye kadar -18 °C'de saklanmıştır.

**Çözgen Ekstraksiyonu:** Siyah çay ve siyah çay atığı örnekleri, Su, %50, 80 ve 96 etanol (v/v) kullanılarak 50 °C'de 6 saat boyunca 150 rpm'de çalıştırılan bir orbital çalkalayıcı ile bir su banyosu kullanılarak üç tekrar olacak şekilde ekstrakte edilmiştir. Vakum altında süzöldükten sonra, etanol ekstraktlarındaki etanol bir döner buharlaştırıcı kullanılarak buharlaştırıldıktan sonra dondurularak kurutuldu. Tüm ekstraktlar, analizleri gerçekleştirilinceye kadar -40 °C'de muhafaza edilmiştir.

**Toplam Fenolik Madde Analizi:** Toplam fenolik madde içeriği (TFM), Singleton vd., (1999) 'da bildirildiği gibi Folin-Ciocalteu analiz yönteminin kısmen modifiye edilmesi sayesinde belirlenmiştir. Kısaca, 0,5 mL çay ekstraktı, üç tekerrürlü olacak şekilde test tüplerine konulmuştur. Ardından 2,5 mL Folin-Ciocalteu reaktifi (saf su ile on katına kadar seyreltilmiş) ilave edilmiş ve karışım daha sonra 3 dakika bekletildikten sonra 2 mL sodyum karbonat (%7,5 w/v) eklenmiştir. Tüpler iyice çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında (25±1 °C) 60 dk karanlık bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Absorbans değerleri, UV spektrofotometre (Hach DR6000, Lange GmbH, 189 Almanya) kullanılarak 765 nm'de köre karşı ölçülmüştür ve ardından Gallik asit kullanılmak suretiyle standart eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisini elde etmek amacıyla 0 ila 400 mg/L arasında değişen konsantrasyonlara sahip gallik asit sulu çözeltileri kullanılmıştır (R<sup>2</sup>=0,9994). TFM, g başına mg gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edilmiştir. Stok gallik asit standardı, 100 mg saf Gallik asidin bir litre distile suda seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

**Antioksidan kapasite analizi:** Siyah çay ve siyah çay atığı ekstraktlarının antioksidan aktivitesi, ABTS ve DPPH analizleri gerçekleştirilerek belirlenmiştir. Ekstraktlar %80 etanol içinde 15 dakika süreyle ultrasonik banyoda (Bandelin, Sonorex Digitec, Almanya) çözülmüş ve örnek ekstraktları ile trolox standardını yedi farklı seyreltik çözeltisi, %80 etanol içinde 0 ve 0.06 mg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanmıştır. Antioksidan analizleri, konsantrasyona karşı oluşturulan absorbans değerleri ile grafikleri çizilmiş ve grafiklerin lineer kısımlarının eğimleri belirlenmiştir. Ekstraktların antioksidan aktiviteleri daha sonra ekstraktların eğimlerinin Trolox standardının eğimine

bölünmesiyle hesaplanmıştır. Sonuçlar µmol Trolox eşdeğeri (TE)/mg ekstrakt olarak ifade edilmiştir.

Siyah çay ve siyah çay atığı ekstraktlarının antioksidan aktivitesini belirlemedeki ikinci yöntemde, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalini yakalama kabiliyetine dayanılarak ölçüm yapılmıştır (Engin vd., 2018). Antioksidanın, kararlı ve sentetik bir radikal olan DPPH serbest radikali yakalama yeteneği ölçülerek antioksidan aktivite tanımlanır. Yöntemde özetle, metanolde 1 mM DPPH • çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra, 600 µL DPPH beş ayrı test tüpüne aktarılmış ve spesifik konsantrasyonlarda (20, 40, 60, 80, 100 µL) ekstraksiyon çözeltileri ilave edilmiştir. Hacim metanol ile 6 mL'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon karışımı bir vorteks karıştırıcıda kullanılarak gerçekleştirilmiş ve örnekler karanlıkta 60 dakika oda sıcaklığında bırakılmıştır. 60 dakikalık bir reaksiyondan sonra, karışımın absorbansı bir UV-VIS spektrofotometresi (Hach DR6000, Lange GmbH, 189 Almanya) ile 517 nm'de okunmuştur. Radikal temizleme aktivitesi, DPPH inhibisyonunun % 'si olarak ifade edilir ve aşağıdaki denkleme (Eq.1) göre hesaplanan antioksidan aktivite, AA (%) olarak ifade edilmiştir.

$$AA (\%) = \frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \times 100 \quad (1)$$

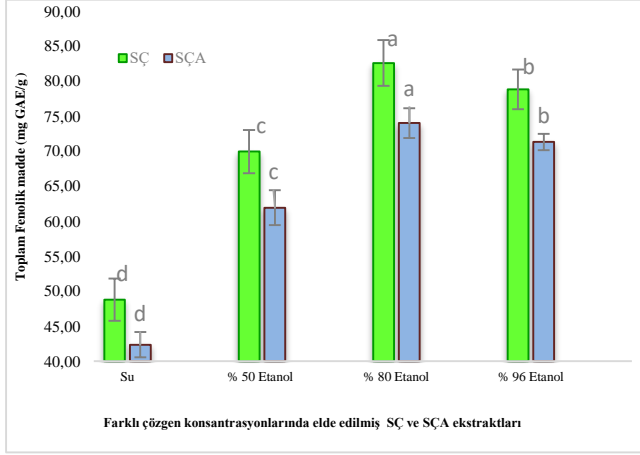
Ablank ve Asample, sırasıyla çay ekstraktı ilaveli ve ilavesiz DPPH çözeltisinin absorbansını temsil eder.

**Çay ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi:** SÇ ve SÇA ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin analizi için Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi, standart yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. SÇ ve SÇA'nın antibakteriyel aktivitelerinin varlığını değerlendirmek için ekstraktları, Muller Hinton agar (MHA, Merck) besiyeri içeren petrilere seçilen bakteri kültürleri (0,5 McFarland standardına ayarlanmıştır) steril bir swap yardımıyla ekilmişlerdir. Ekimleri tamamlanan Petri kutuları 15 dakika kurutulduktan sonra duyarlılık testi için kullanılmıştır. SÇ ve SÇA ekstraktlarının antimikrobiyal etkilerinin tespiti amacıyla farklı konsantrasyonlarda ekstraktları (10, 20, 30 ve 40 µL) olarak boş steril disklere emdirilmiştir. Herhangi bir ekstrakt içermeyen steril boş bir disk ise negatif kontrol olarak analizlerde kullanılmıştır. Petri kutuları daha sonra testte kullanılan 37°C'de 18 - 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra Petri kutuları zon oluşumun kontrolü amacıyla kumpas kullanılarak ölçülmüş ve mm olarak kaydedilmiştir. Güvenilirliği sağlamak için analiz üç kez tekrarlanmıştır (CLSI, 2016).

**İstatiksel Analiz:** Verilerin analizleri SPSS (Version 16 for Windows, SPSS Inc.) programı ile yapıldı ve mean±standart olarak kaydedildi. Varians analizleri ise ANOVA prosedürüne göre değerlendirildi. Değerler arasındaki farklar ise Duncan çoklu karşılaştırma testine göre yapılmıştır. p≤0.05 değerleri önemli görülmüştür.

## BULGULAR

Siyah çay ve siyah çay atığı örneklerinin su ve üç farklı konsantrasyonda kullanılan etanol-su çözgeni ile elde edilen ekstraktlarının toplam fenolik madde değerleri Şekil 1’de gösterilmektedir.



Şekil 1. Farklı çözgen konsantrasyonlarıyla elde edilen SÇ ve SÇA ekstraktlarının toplam fenolik madde değerleri.

Figure 1. Total phenolic substance values of BT\* and BTW\*\* extracts obtained with different solvent concentrations.

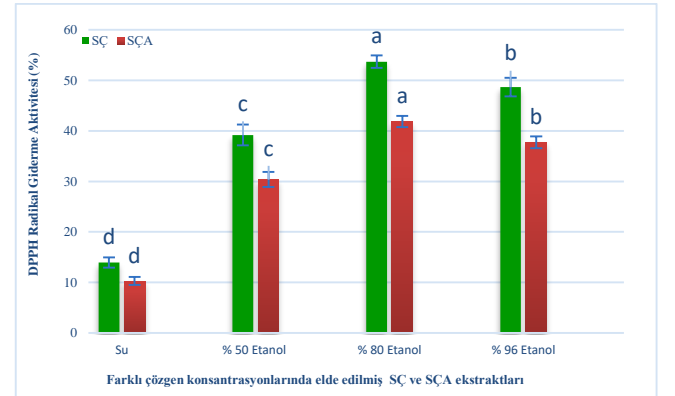
\* Black Tea

\*\* Black Tea Waste

SÇ ve SÇA örneklerinin toplam fenolik madde içeriğinin  $42,37 \pm 1,79$  ile  $82,61 \pm 3,26$  mg GAE/g değerleri arasında değiştiği tespit edilmiştir. Dört farklı çözgen konsantrasyonu ile ekstrakte edilen SÇ ve SÇA örnekleri arasında en yüksek toplam fenolik içeriği % 80 etanol içeren çözgen ile ekstrakte edilen SÇ örnekleri olduğu belirlenmiş, bunu %96 etanol konsantrasyonunda ekstrakte edilen SÇ örnekleri izlemiştir. En düşük toplam fenolik madde içeriği önceden de düşünüldüğü gibi su ile ekstrakte edilen SÇA örnekleri göstermiştir. Çay örnekleri ekstraktları için çözgenin etanol konsantrasyonunun %80’e kadar artmasıyla toplam fenolik madde miktarında artış göstermekle birlikte bu konsantrasyondan sonra hem SÇ hem de SÇA örneklerinin TFM değerlerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir. SÇ ve SÇA örnekleri karşılaştırıldığında SÇ örneklerinin toplam fenolik madde değerlerinin SÇA örneklerine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Li vd.(2006) nar kabuğu ve nar pulunun antioksidan özelliklerinin değerlendirilmesine ilişkin yaptıkları çalışmada farklı konsantrasyonlarda kullanılan etanolün konsantrasyonunun artmasıyla toplam fenolik madde içeriğinin ve FRAP değerinin azaldığını tespit etmişler ve bunun nedenin farklı çözgen karışımlarının sinerjistik etkisi ile ekstraksiyon gücünü artırmasından ileri gelebileceğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen toplam fenolik madde içeriklerine ait bulgular, Güçlü Üstündağ vd. (2016) siyah çay işleme atıklarının antimikrobiyal fenolik ve antioksidan içerikleriyle ilgili yaptıkları çalışmayla karşılaştırıldığında

benzerlik göstermektedir. Nadiah & Uthumporn, (2015), çeşitli ekstraksiyon yöntemleriyle taze ve bekletilmiş çaylarda fenolik ve antioksidan özelliklerin belirlenmesine ilişkin yaptıkları çalışmada elde ettikleri toplam fenolik madde içeriklerinin çalışmamızda tespit edilen TFM değerlerinde daha yüksek olduğu görülmüştür. Nor Qhairul Izzreen & Mohd Fadzelly, (2013) *Camellia sinensis* yapraklarının farklı kısımlarının fitokimyasalları ve antioksidan özellikleri konusunda yaptıkları çalışmada buldukları toplam fenolik madde değerlerinin siyah çay ve siyah say kompostu örnekleri için sırasıyla 76,93 ve 70,70 mg GAE/g olarak rapor etmişlerdir. Bulunan değerlerin bu çalışmada elde edilen TFM değerlerinde daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Fenolik bileşikler, doğrudan antioksidan etkiye katkıda bulunabilen güçlü zincir kırıcı antioksidanlar olarak bilinirler. Bu bileşikler bitkilerin çok önemli bileşenleridir ve radikal yakalama yetenekleri içerdikleri hidroksil gruplarından kaynaklanmaktadır (Lorenzo & Munakata, 2016). DPPH ve ABTS’in etki mekanizmaları farklılık göstermektedir. SÇ ve SÇA örneklerinin su ve üç farklı konsantrasyonda kullanılan etanol-su çözgeni ile elde edilen ekstraktlarının DPPH radikal süpürme etkisi değerleri Şekil 2’de gösterilmiştir.



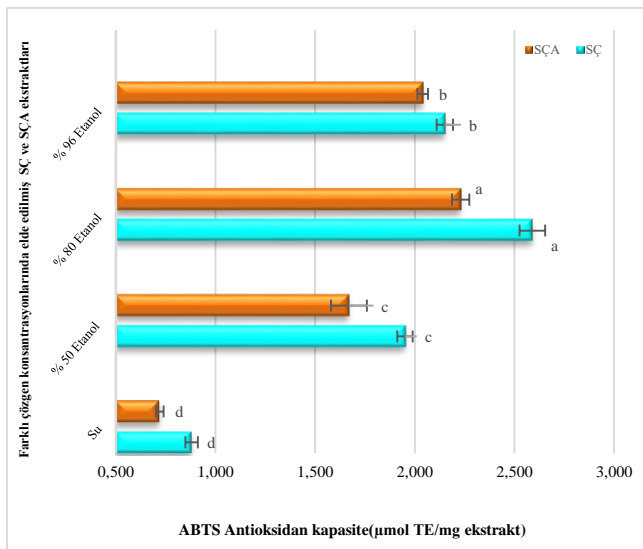
Şekil 2. Farklı çözgen konsantrasyonlarıyla elde edilen SÇ ve SÇA ekstraktlarının DPPH radikal giderme etkisi.

Figure 2. DPPH radical scavenging effect of BT and BTW extracts obtained with different solvent concentrations.

Şekil 2’den de görüleceği üzere SÇ ve SÇA atıklarının dört farklı etanol konsantrasyonuyla elde ekstraktlarının, çözgen içindeki etanol konsantrasyonunun %80 derişime kadar artmasıyla DPPH radikal süpürme etkisinin artmasını sağladığı bununla birlikte çözgen içindeki etanol konsantrasyonunu artmaya devam etmesiyle DPPH % inhibisyon değerlerini bir miktar azalttığı tespit edilmiştir. Bunun nedeni olarak, etanol konsantrasyonunu artmasıyla daha yüksek miktarda antioksidan özellik gösteren maddeleri ekstrakte ettiği ancak belli bir seviyeden sonra ise çözgenin polaritesinde meydana gelen azalma etkisiyle ekstraksiyon veriminin olumsuz yönde etkilenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. SÇ ve

SÇA ekstraktlarının Radikal giderme etkisinin % 10,28 ile % 53,71 aralığında değiştiği tespit edilmiştir. En yüksek DPPH radikal giderme etkisinin %80 etanol ile ekstrakte edilen SÇ örneklerinde olduğu belirlenirken en düşük Radikal giderme aktivitesinin su ile ekstrakte edilen SÇA örneklerinde meydana geldiği tespit edilmiştir. SÇ ve SÇA örnekleri karşılaştırıldığında ise SÇ örneklerinin SÇA örneklerine oranla daha yüksek DPPH radikal giderme etkisine sahip olduğu belirlenmiştir. Abdelatif vd., (2018), bekletilmiş kahve ve siyah çay (işleme) atıklarının fenolik ve flavonoid bileşiklerinin ve antioksidan aktivitesinin belirlendiği bir çalışmada siyah çay atıklarının DPPH radikal giderme aktivitesini çalışmamızda elde edilen bulgularla uyumlu olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, Farhoosh vd., (2007), eski siyah çay yapraklarının ve siyah çay atıklarının yüksek antioksidan aktivite oranına sahip olduğunu bildirmiştir.

SÇ ve SÇA örneklerinin dört farklı konsantrasyonda kullanılan etanol-su çözgeni ile elde edilen ekstraktlarının ABTS antioksidan kapasitesi değerleri Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. Farklı çözgen konsantrasyonlarıyla elde edilen SÇ ve SÇA ekstraktlarının ABTS antioksidan kapasite değerleri.

Figure 3. ABTS antioxidant capacity values of BT and BTW extracts obtained with different solvent concentrations.

Table 1. SÇ ve SÇA ekstraktlarının *in vitro* antimikrobiyal etkileri (mm).

Table 1. In vitro antimicrobial effects of BT and BTW extracts (mm).

Mikroorganizma	SÇ*				SÇA*			
	10µL	20µL	30µL	40µL	10µL	20µL	30µL	40µL
<i>E. coli</i>	12,00±0,70 <sup>aA</sup>	13,00±0,70 <sup>aA</sup>	15,00±1,41 <sup>abA</sup>	19,00±0,70 <sup>bA</sup>	13,00±0,70 <sup>aB</sup>	15,00±0,70 <sup>bB</sup>	20,00±0,00 <sup>cB</sup>	25,00±1,41 <sup>dB</sup>
<i>S. aureus</i>	12,00±0,70 <sup>aA</sup>	16,00±0,70 <sup>bA</sup>	18,00±0,70 <sup>bcA</sup>	20,00±0,70 <sup>cA</sup>	18,00±1,41 <sup>aB</sup>	21,00±0,70 <sup>bB</sup>	21,00±0,70 <sup>bB</sup>	22,00±0,70 <sup>bB</sup>
<i>B. cereus</i>	12,00±0,00 <sup>aA</sup>	14,00±0,70 <sup>bA</sup>	15,00±0,70 <sup>bA</sup>	17,00±0,70 <sup>cA</sup>	14,00±1,41 <sup>aB</sup>	16,00±0,70 <sup>bB</sup>	17,00±0,70 <sup>bB</sup>	20,00±1,41 <sup>cB</sup>
<i>S. Typhimurium</i>	13,00±0,00 <sup>aB</sup>	16,00±0,70 <sup>bB</sup>	19,00±0,70 <sup>cB</sup>	23,00±0,70 <sup>dB</sup>	10,00±0,70 <sup>aA</sup>	14,00±0,70 <sup>bA</sup>	15,00±0,70 <sup>bcA</sup>	16,00±0,70 <sup>cA</sup>

\*\*Ortalama ve std. hata; a-c: Ekstraktların farklı konsantrasyonlarında farklı üst simgeler p<0,05 seviyesinde önemli bir fark olduğunu gösterir. A-B: Farklı ekstraktların aynı konsantrasyonlarında farklı üst simgeler p<0,05 seviyesinde önemli bir fark olduğunu gösterir.

Tablo 1'de görüldüğü üzere, en düşük antimikrobiyal etki 10 µL SÇ ekstraktı ile *E. coli*, *S. aureus* ve *B. cereus*'a karşı elde edilmişken, en yüksek antimikrobiyal etki 40 µL SÇA ile *E.coli*'ye karşı elde

ABTS testi için örneklerin kendi arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmamasıyla birlikte, çözgen etkisinin önemli olduğu görülmektedir. SÇ ve SÇA örneklerinin Sulu etanol ekstraktları, su ile gerçekleştirilen ekstraksiyona göre önemli ölçüde daha yüksek ABTS antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. SÇ ve SÇA örneklerinin ABTS antioksidan kapasite değerlerinin 0,72± 0,02 µmol TE/mg ekstrakt ile 2,59± 0,06 µmol TE/mg ekstrakt aralığında değiştiği belirlenmiştir. En yüksek antioksidan kapasitenin TFM ve DPPH bulgularında olduğu gibi %80 etanolle ekstrakte edilen SÇ örneklerinde (2,59± 0,06 µmol TE/mg ekstrakt) gerçekleştiği tespit edilirken en düşük antioksidan kapasitenin benzer şekilde su ile ekstrakte edilen SÇA örneklerinde bulgulanmıştır. Literatürde siyah çay için bildirilen ABTS değerlerinde, fenolik içerikteki içsel varyasyonlara ek olarak ekstraksiyon parametrelerindeki veya ABTS analiz prosedürlerindeki değişimler nedeniyle geniş farklılıklar vardır. Dubeau vd., (2010) tarafından bildirilen siyah çayın su ekstraktının ABTS antioksidan kapasitesi (3,97 µmol TE/L), muhtemelen daha kısa ekstraksiyon sürelerinden (10 dk) dolayı çalışmamızda elde edilen değerlerden daha düşüktür. Liebert vd., (1999) siyah çay için daha da uzun ekstraksiyon süreleri kullanarak daha yüksek ABTS değerleri (1,7–3,6 mmol TE/L) elde ettikleri düşünülmektedir. Şekiller incelendiğinde SÇ ve SÇA ekstraktların toplam fenolik, DPPH radikal giderme aktivitesi ve ABTS antioksidan kapasitesi arasında önemli bir korelasyonun olduğu gözlenmiştir.

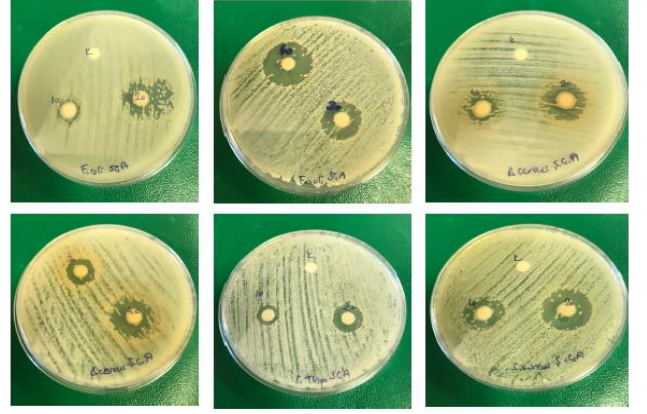
Disk difüzyon yönteminin kullanıldığı çalışmada farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 30 ve 40 µl) SÇ ve SÇA örneklerinin en yüksek antioksidan aktivite gösteren % 80 etanolle elde edilen ekstraktlarının disklerle ilave edilmesi sonrasında sürdürülen inkübasyon ile meydana gelen zon çapların ölçülmesiyle antimikrobiyal etki tespit edilmiştir. Ekstraktların antimikrobiyal etkileri sonucu oluşan zon çapları Tablo 1'de gösterilmiştir.

edilmiştir. Veriler incelendiğinde antimikrobiyal etkinin ekstrakt konsantrasyonunun artışına paralel olarak, artış gösterdiği tespit edilmiştir (p<0,05). Ayrıca, genel olarak, SÇA ekstraktlarının seçilen patojen mikroorganizmalara



karşı gösterdikleri antimikrobiyal etkinlikler, ilave edilen ekstrakt miktarına bağlı olarak SÇ ekstraktlarına göre daha yüksektir ( $p \leq 0,05$ ). Bu durum, yalnızca *S. Typhimurium*'a karşı elde edilen antimikrobiyal etkide farklılık göstermiştir ( $p \leq 0,05$ ). Çayın fitokimyasal taraması, alkaloidler, saponinler, tanenler, kateşinler ve diğer birçok polifenol gibi çeşitli bileşiklerin varlığını ortaya koymuştur (Archana ve Abraham, 2011). Polifenoller, çay bitkisi tarafından üretilen, bitki fizyolojisinde çok sayıda temel rol oynayan ve antioksidanlar, ayrıca anti-alerjik, antienflamatuvar, antikanser, antihipertansif ve antimikrobiyal ajanlar gibi insan sağlığı için potansiyel sağlık özelliklerine ve faydalarına sahip olan ikincil metabolitlerdir (Koech vd., 2013). Çay yapraklarındaki polifenoller 3 gruba ayrılabilir: kateşinler, theaflavinler ve thearubijenler. Siyah çayın %30'unu oluşturan polifenoller izoflavon yapıdaki bileşiklerdir ve bunlar içindeki en basit bileşik ise kateşindir. Kuru ağırlığın, %5'ini oluşturan kateşinler, epikateşin, epikateşin gallate, epigallokateşin, epigallokateşin gallate olarak dört farklı formda bulunmaktadır. Epikateşinlerin bakteri büyümesini inhibe ettiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalar, çay polifenollerinin sadece bağırsak kökenli patojenlere karşı değil, aynı zamanda bakteriyel, fungal ve viral patojenler dahil olmak üzere daha geniş bir mikroorganizma yelpazesine karşı çok faydalı antimikrobiyal etkilerinin olduğu ortaya koymuştur (Zhao vd., 2013). Ayrıca, Zhao vd., (2013) göre EGCG (Epigallocatechin-3-Gallate), muhtemelen mikrobiyal sitoplazmik lipitlere ve proteinlere zarar vererek, çok çeşitli antimikrobiyal aktiviteler sağlayan birçok proteinle çapraz bağlanma yeteneğine sahiptir. Mahmud vd., (2013), EGCG'nin ana antibakteriyel mekanizmasının, kendisini bakteri hücre duvarlarının peptidoglikan tabakasına doğrudan bağlayarak çapraz bağlanan peptidlere zarar vermesine ve dolayısıyla hücre duvarlarına zarar vermesine atfedildiğini bildirmiştir. Bu etki, tür seçiciliği ile sınırlı olmamakla birlikte, çeşitli araştırmalar tarafından minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ile ilgili olarak bildirilen farklılıklara katkıda bulunabilmektedir. Benzer şekilde, Zhao vd., (2013), EGCG'nin bu antibakteriyel aktiviteleri, kısmen bakteriyel sitoplazmik lipitlere, membran proteinlerine veya jelatinaz, protein tirozin fosfataz, dihidrofolat redüktaz, DNA giraz vb. antibiyotiklere ve böylece bakterileri çeşitli antibakteriyel maddelere karşı daha duyarlı hale getirir. Çalışmamıza benzer olarak, Olosunde vd. (2012) tarafından *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. subtilis* ve *S. aureus*'a karşı siyah çayın su ve metil alkol ekstraktlarının 8,5 - 28 mm'lik zon çapları ile antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Şekil 4'de en yüksek antimikrobiyal etkinin görüldüğü SÇA ekstraktlarının antimikrobiyal aktivite test sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 4. SÇA ekstraktlarının mikroorganizmalar üzerinde oluşturduğu zonlar.

Figure 4. Zones formed by BTW extracts on microorganisms.

## SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada siyah çay ve siyah çay atığı örneklerinin farklı konsantrasyonlardaki çözücüler ile elde edilen ekstraktlarının biyoaktif özellikleri ve antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmeye çalışılmıştır. Toplam fenolik madde miktarını belirlemede uygulanan Folin-Ciocalteu yöntemi sonucunda, SÇ ve SÇA örneklerinin farklı konsantrasyonlardaki etanol çözenleri ile hazırlanan ekstraktlarından %80 etanol çözgeniyle hazırlanan ekstraktlarının hem SÇ hem de SÇA örnekleri daha yüksek sonuç verdiği tespit edilmiştir. Antioksidan aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan DPPH ve ABTS metotları ile radikal giderme aktivitesi ve antioksidan kapasiteleri ölçülmüştür. SÇ örneklerinin SÇA örneklerine göre daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip oldukları tespit edilmekle birlikte SÇA örneklerinin de oldukça yüksek antioksidan varlığını işaret etmektedir. Antimikrobiyal aktivite için yapılan disk difüzyon yöntemiyle petrilere görülen zon çapları ölçülerek 4 farklı gıda kaynaklı patojen mikroorganizma üzerinde analizler yapılmıştır. Analizler sonucu, disklere ilave edilen ekstrakt konsantrasyonu artışı ile antimikrobiyal etkiyi gösteren zon çaplarında da artış görülmüştür. SÇA ekstraktlarının seçilen patojen mikroorganizmalara karşı gösterdikleri antimikrobiyal etkinlikler, ilave edilen ekstrakt miktarına bağlı olarak SÇ ekstraktlarına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, siyah çay atıklarının hem biyoaktif özellikleri hem de antimikrobiyal özellikleri dikkate alındığında gıda endüstrisinde gıda takviye ürünleri ve yenilebilir gıda ambalajları açısından son derece önemli bir kaynak olabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

Abdelatif, S.A., Sirekhatim, K.A. & Hassan, A.B. (2018). Estimation of Phenolic and Flavonoid Compounds and Antioxidant Activity of Spent

- Coffee and Black Tea (Processing) Waste for Potential Recovery and Reuse in Sudan. *Recycling*, 3(27), 2-9.
- Abraham, A.M., Alnemari, R.M., Brüßler, J. & Keck, C.M. (2021).** Improved Antioxidant Capacity of Black Tea Waste Utilizing PlantCrystals. *Molecules*, 26, 592.
- Archana, S. & Abraham, J. (2011).** Comparative analysis of antimicrobial activity of leaf extracts from fresh green tea, commercial green tea and black tea on pathogens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(8), 149-152.
- Carlioni, 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, 900-908.
- Chen, Z. & Lin, Z. (2015).** Tea and human health: biomedical functions of tea active components and current issues. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 16, 87-102.
- CLSI. (2012).** *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Twenty-second Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, M100-S22. 59p
- Dubeau, S., Samson, G. & Tajmir-Riahi, H.A. (2010).** Dual effect of milk on the antioxidant capacity of green, Darjeeling, and English breakfast teas. *Food Chemistry*, 122, 539-545.
- Engin, M.S., Kalkan, S., Çay, S., Güder, A., Otağ, M.R., Gür, G. & Kablan, A. (2018).** DPPH Radical Scavenging, Phenolic and Antimicrobial Activity of Momordica charantia and Rheum ribes. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 9(4), 447-458.
- Farhoosh, R., Golmovahhed, G.A. & Khodaparast, M.H. (2007).** Antioxidant activity of various extracts of old tea leaves and black tea wastes (*Camellia sinensis L.*). *Food Chemistry*, 100, 231-236.
- Gadkari, P.V., Kadimi, U.S. & Balaraman, M. (2014).** Catechin concentrates of garden tea leaves (*Camellia sinensis L.*): extraction/isolation and evaluation of chemical composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(14), 2921-2928.
- Güçlü Üstündağ, Ö., Erşan, S., Özcan, E., Özcan, G., Kayra, N. & Ekinci, F.Y. (2016).** Black tea processing waste as a source of antioxidant and antimicrobial phenolic compounds. *European Food Research and Technology*, 242, 1523-1532.
- Hu, J., Zhou, D. & Chen, Y. (2009).** Preparation and antioxidant activity of green tea extract enriched in epigallocatechin (EGC) and epigallocatechin gallate (EGCG). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1349-1353.
- Kaur A., Kaur M., Kaur P., Kaur H., Kaur S. & Kaur K. (2015).** Estimation and comparison of total phenolics and total antioxidants in green tea and black tea. *Global Journal of Bio-science and Biotechnology*, 4(1), 116-120.
- Koech, K.R., Wachira, F.N., Ngure, R.M., Wanyoko, J.K., Bii, C.C., Karori, S.M. & Kerio, L.C. (2013).** Antimicrobial, Synergistic and Antioxidant Activities of Tea Polyphenols. In Méndez-Vilas, A. (Ed.) *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*. Vol. 2, p. 971 - 981. Spain: Formatex Research Center.
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J.Z., & Cheng, S. (2006).** Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96, 254-260.
- Liebert, M.A., Licht, U., Böhm, V. & Bitsch, R. (1999).** Antioxidant properties and total phenolics content of green and black tea under different brewing conditions. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 208, 217-220.
- Lorenzo, J. & Munekata, P.E. (2016).** Phenolic compounds of green tea: Health benefits and technological application in food. *Asian pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6, 709-719.
- Mahmoud, M., Alkhaleefah, F. & Sheriff, D.M. (2013).** Antimicrobial Effects of Epi-Gallo-Catechin-Gallate and Epicatechins of Green tea on Planktonic and Biofilm Forms of *Staphylococcus aureus*, Including MRSA. *Nature and Science*, 11(6), 70-79.
- Nadiah, N.I. & Uthumporn, U. (2015).** Determination of phenolic and antioxidant properties in tea and spent tea under various extraction method and determination of catechins, caffeine and gallic acid by HPLC. *IJASEIT* 5(3), 158-164.
- Nor Qhairul Izzreen, M.N. & Mohd Fadzelly, A.B. (2013).** Phytochemicals and antioxidant properties of different parts of *Camellia sinensis* leaves from Sabah Tea Plantation in Sabah, Malaysia. *International Food Research Journal*, 20(1), 307-312.
- Olosunde, O.F., Abu-Saeed, K. & Abu-Saeed, M.B. (2012).** Phytochemical screening and antimicrobial properties of a common brand of

black tea (*Camellia sinensis*) marketed in Nigerian environment. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2(2), 259-263.

- Pan, X., Niu, G. & Liu, H. (2003).** Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing*, 42, 129-133.
- Singleton, V.L., Orthofer, R. & Lamuela-Raventós, 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.
- 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 & Food Research*, 49(1), 52-60.
- Sun, L., Fan, K., Wang, L., Ma, D., Wang, Y., Kong, X., Li, H., Ren, Y. & Ding, Z. (2021).** Correlation among Metabolic Changes in Tea Plant *Camellia sinensis* (L.) Shoots, Green Tea Quality and the Application of Cow Manure to Tea Plantation Soils. *Molecules*, 26.
- Yang, J. & Liu, R.H. (2013).** The phenolic profiles and antioxidant activity in different types of tea. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 163-171.
- Zhao, L., Li, W., Zhu, S., Tsai, S., Li, J., Tracey, K. J., Wang, P., Fan, S., Sama, A.E. & Wang, H. (2013).** Green Tea Catechin Quenches the Fluorescence of Bacterial-Conjugated Alexa Fluor Dyes. *Inflammation and Allergy –Drug Targets*, 12(5), 308 -314.
- Zheng, Q., Li, W. & Gao, X. (2021).** The effect of storage time on tea Polyphenols, catechin compounds, total flavones and the biological activity of Ya'an Tibetan tea (*Camellia sinensis*). *Journal of Food Processing and Preservation*, e16004