



Alınış tarihi (Received): 15.12.2023

Kabul tarihi (Accepted): 29.12.2023

Düşük Sıcaklıkta Farklı Ekstraksiyon Teknikleri Uygulanarak Elde Edilen Siyah Çay Ekstraktlarının Fitokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi¹

Esra ESİN YÜCEL^{2,*}, Cemal KAYA²

² Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 60250, Tokat, Türkiye

*Sorumlu yazar: esinyasemin@yahoo.com

ÖZET: Bu çalışmada; farklı ekstraksiyon teknikleri, çay: su oranları ve ekstraksiyon süreleri kullanılarak elde edilen Türk siyah çay ekstraktlarına tannaz enzimi uygulanmasının, ekstraktların fitokimyasal özellikleri üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla klasik ve ultrasonik ekstraksiyon yöntemleri ile 30°C demleme sıcaklığında, farklı ekstraksiyon süreleri (5, 10 ve 20 dakika) ve çay:su oranları (1:100; 5:100; 10:100) uygulanarak elde edilen ekstraktlar, tannaz enzimi ile muamele edilmiştir. Çalışmada elde edilen ekstraktlarda toplam fenolik madde, kateşin ve kafein analizleri yapılmıştır. Ekstraksiyon yöntemleri birbiriyle karşılaştırıldığında; tüm demleme süreleri ve çay:su oranlarında ultrasonik yöntemle elde edilen siyah çay ekstraktlarının toplam fenolik madde, kafein ve kateşinlerinin miktarlarının klasik ekstraksiyon yöntemine göre genellikle daha fazla olduğu görülmektedir. Ultrasonik ekstraksiyon yönteminin kullanılmasının ekstraktların fitokimyasal bileşik miktarlarında önemli düzeyde artışlar sağladığı tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler- Tannaz, fenolik madde, kateşin, kafein, ekstraksiyon

Determination of Phytochemical Properties of Black Tea Extracts Obtained by Applying Different Extraction Techniques at Low Temperature

ABSTRACT: In this study, it was investigated the effect of tannase enzyme application on the phytochemical qualities of Turkish black tea extracts that were obtained with different extraction techniques, tea:water ratios, and extraction time. To achieve this, tannase enzyme was added to extracts made using traditional and ultrasonic extraction techniques at brewing temperatures of 30°C, for different extraction times (5, 10, and 20 minutes), and different tea: water ratios (1:100, 5:100, and 10:100). The extracts obtained in the study were analysed for total phenolic matter, catechin and caffeine. When the extraction methods are compared; it can be observed that, at all brewing times and tea:water ratios, the amounts of total phenolic substances, caffeine, and catechins of black tea extracts obtained by ultrasonic method are generally higher than the amounts of these substances obtained by classical method. It was shown that the concentrations of phytochemical compounds in the extracts increased significantly when the ultrasonic extraction method was used.

Keywords- Tannase, phenolic substance, catechin, caffeine, extraction

1. Giriş

Çay; dünyada milyonlarca insan tarafından her gün zevkle tüketilen, güvenilir, ekonomik ve toplumda yer edinmiş, sudan sonra en çok tercih edilen ikinci içecektir (Guo ve ark., 2021). Bu durumun en önemli nedeni çayın rahatlatıcı, hafif uyarıcı ve ucuz bir içecek olmasıdır (Abdolmaleki, 2016). Ülkemiz dünya çay üretiminde Çin, Hindistan, Kenya, Sri Lanka ve Vietnam' dan sonra altıncı sırada yer almaktadır (Yazıcı ve ark., 2023). Çayın tüm dünyada çok popüler ve keyif verici bir içecek olmasının yanı sıra bileşimindeki çeşitli

¹ Makale, Esra ESİN YÜCEL' in "Farklı Ekstraksiyon Uygulamalarıyla Elde Edilen Siyah Çay Ekstraktlarının Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi ve Krema Oluşumunun Azaltılması" başlıklı doktora tezinin bir bölümünden üretilmiştir.

fenolik maddelerin varlığı sayesinde antioksidan, antimikrobiyal ve antikanserojen özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir (Zhang ve ark., 2019).

Herhangi bir karışımdan istenilen maddenin uygun bir çözücü yardımıyla ayrılması işlemine ekstraksiyon denir. Ekstraksiyon, katı veya sıvı herhangi bir maddenin bileşiminde bulunan unsurun veya unsurlardan bir kısmının uygun bir çözücü yardımı ile absorbe edilerek ayrılması esasına dayanır (Anonim, 2011). Ekstrakte edilecek materyalin özelliklerine bağlı olarak değişmekle birlikte ekstraksiyon yöntemleri klasik ekstraksiyon yöntemleri (soxhlet, maserasyon ve distilasyon) ve modern teknikler (ultrasonik ekstraksiyon, vurgulu elektrik, enzim destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, basınçlı sıvı ekstraksiyonu, süperkritik sıvı ekstraksiyon) olarak ikiye ayrılmaktadır (Azmir ve ark., 2013). Ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi, kullanılan suyun kalitesi, su:çay oranı, çay parçacık boyutu, ekstraksiyon pH'sı ve ekstraksiyon sayısı (tekli veya çoklu ekstraksiyon), çay bileşenlerinin ekstraksiyon verimliliğini doğrudan etkileyen önemli faktörlerdir (Vuong ve ark., 2011).

Son yıllarda, gıdaların ısı işlemlerle dayandırılmasında yüksek sıcaklıkların etkisiyle gıdanın yapısında açığa çıkan olumsuzlukların ortadan kaldırılması amacıyla "ısı olmayan yöntemlerle" gıdaların muhafazası önem kazanmıştır. Isıl olmayan alternatif teknolojilerden biri de ultrasonik ses dalgalarıdır (Uzuner, 2022). Ultrasonik ses dalgalarının uygulanması sırasında oluşan etki, sıvı içinde hava kabarcıklarının oluşumu ile sonuçlanan mekanik etkidir. Bu işlem sırasında üründe çok az bir sıcaklık artışı meydana gelmekte ve bu nedenle sıcaklıktan kaynaklanan olumsuz etkiler önemli oranda azalmaktadır (Ulusoy ve Karakaya, 2011; Uzuner, 2022).

Tannaz (Tannin Açılışhidrolaz (EC, 3.1.1.20)); hidrolize olabilen tanenlerin (tannik asit, metil gallat, etil gallat, n-propil gallat ve izoamil gallat gibi) ve gallik asit esterlerinin ester bağlarının yıkımını katalizleyen hidrolaz sınıfı hücre dışı bir enzimdir. Tannaz, tannik asidin ester bağlarına etki ederek tannik asidi gallik asit ve glikoza hidrolize etmektedir (Lekha ve Lonsane, 1997; Sarıözlü ve ark., 2011). Tannaz, farklı uygulama alanlarına sahip olmakla birlikte, enzimin endüstride en çok kullanım alanı çözünebilir çay üretimidir. Enzim; çay kateşinlerinin biyotransformasyonunu kolaylaştırarak antioksidan özelliklerini arttırmak ve krema oluşumunu azaltarak, çay ürünlerinin renk ve duyuşal özelliklerini iyileştirmek için kullanılmaktadır (Simpson ve ark., 2001).

Bu çalışmada, farklı ekstraksiyon teknikleri, farklı çay: su oranları ve ekstraksiyon süreleri kullanılarak elde edilen siyah çay ekstraktlarına tannaz uygulanmasının, ekstraktların fitokimyasal özellikleri üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyal

Çalışmada hammadde olarak kullanılan siyah çay; Çaykur firmasının Güneysu-Ulucami Çay Fabrikası Müdürlüğünden (nevi ve tipi: 5(BOP2)) temin edilmiştir. Çalışmada çözücü olarak distile (saf) su tercih edilmiştir.

Çalışmada kullanılan tannaz enzimi (Aktivitesi 500 U/g veya daha yüksek; optimum pH 5.0-5.5; optimum sıcaklık 40°C) Kikkoman, Japonya firmasından temin edilmiştir.

Belirlenen çay:su oranları için (1:100, 5:100, 10:100) siyah çay örneklerinden beherlere (1000 mL) tartım yapıldıktan sonra, 30°C demleme sıcaklığına uygun şekilde su ilavesi yapılmış, yaklaşık 30 sn boyunca iyice karıştırılan örnekler klasik ve ultrasonik su banyosunda farklı sürelerde (5, 10 ve 20 dakika) demlemeye bırakılmıştır. Süre sonunda örnekler iki kat kaba filtre kağıdından süzülerek ekstraktlar (İE= İlk ekstrakt) elde edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar etekli santrifüj tüplerine eşit hacimlerde olacak şekilde (40 ml) aktarılmış ve üzerlerine 1.25 U/g olacak düzeyde tannaz enzimi çözeltisinden ilave edilmiştir. Enzim ilavesi yapılan örnekler enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 40°C de 1 saat su banyosunda bekletilmiştir. Bir saatlik inkübasyon süresinden sonra örnekler önce 5 dakika boyunca bir ön soğutma işlemine tabi tutulmuş, daha sonra krema oluşumunun hızlanması için 2°C su banyosunda 2 saat boyunca bekletilmiştir. Süre sonunda örneklerin bulunduğu tüpler -2°C de, 9000 rpm hızında 20 dakika boyunca santrifüjlendikten sonra berrak kısım ve krema kısmı ayrılmıştır. Tannaz ilavesi yapılan ekstraktlar TANNAZ olarak belirtilirken, tannaz enzimi ilavesi yapılmayan ekstraktlar kontrol grubu (KNTRL) olarak adlandırılmıştır. Elde edilen berrak kısımda aşağıda belirtilen analizler yapılmıştır.

2.2. Çalışmada Uygulanan Analizler

Toplam Fenolik Madde Tayini

Siyah çay örneklerinin ve çay ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriği, ISO 14502-1'e göre yapılmıştır. Standartlarla hazırlanan grafikten faydalanılarak örneklerin fenolik madde miktarı gallik asit eşdeğeri (g GAE/100 g kuru siyah çay) olarak ifade edilmiştir (Anonim, 2005).

Siyah Çay Örneklerinin ve Çay Ekstraktlarının Kateşin Kompozisyonu ve Kafein Miktarlarının HPLC İle Belirlenmesi

Siyah çay örneklerinin ve çay ekstraktlarının bireysel kateşinlerin (Gallik asit (GA)(Sigma), epigallokateşin (EGC)(Fluka), epikateşin (EC) (Sigma), epigallokateşingallat (EGCG) (Merck), Gallokateşingallat (GCG) (Sigma), epikateşingallat (ECG) (Sigma) ve kateşingallat (CG) (Sigma)) ve kafeinin (Sigma) belirlenmesi HPLC cihazı kullanılarak Liang ve ark. (2002) yönteminin modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ekstraktlar 0.45µm gözenek çapına sahip membran filtreden süzüldükten sonra HPLC cihazına (Kolon: 5 µm, C18 (4.6mm x 250mm); Sıcaklık: 25°C; Mobil faz A: TCA (Trikloroasetik asit):ACN (Asetonitril): deionize su (%0.1 TCA; %5 ACN); Mobil faz B: ACN: TCA (%0.1 TCA); Dalga boyu: 280nm; Süre: 40 dakika; Dedektör: UV Perkin Elmer (Series-200) İtalya; Enjeksiyon hacmi: 20 µl) enjeksiyon yapılmıştır. Sonuçların hesaplanmasında, çay ekstraktlarına ait kromatogramlardan elde edilen alanlar kullanılmış ve oluşturulan standart grafikten yararlanılmış olup, miktarlar mg/L olarak belirtilmiştir.

İstatistiksel Analizler

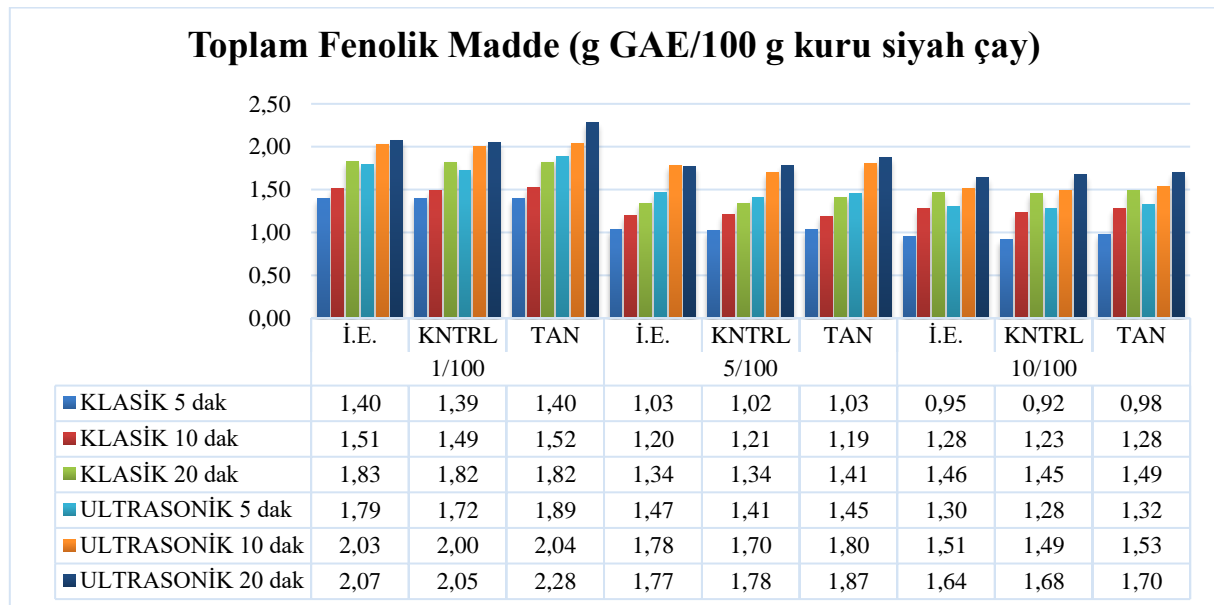
Bulgular, faktöriyel deneme planına göre varyans analizi yapıldıktan sonra SPSS paket programı kullanılarak uygulama ortalamaları Duncan çoklu karşılaştırma testine göre 0.05 güven sınırında değerlendirilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Siyah Çay Ekstraktlarına Ait Toplam Fenolik Madde Miktarları

Çalışmada farklı ekstraksiyon teknikleri, farklı çay:su oranları, farklı demleme süreleri kullanılması ve tannaz ilave edilmesiyle elde edilen siyah çay ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı Şekil 1’de verilmiştir. Klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ilk ekstraktlarda toplam fenolik madde miktarı 0.95-1.83 g GAE/100 g kuru siyah çay aralığında değişirken enzim uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) örneklerinde sırasıyla 0.98-1.82 ve 0.92-1.82 g GAE/100 g kuru siyah çay olarak belirlenmiştir. Ultrasonik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ilk ekstraktlarda toplam fenolik madde değerleri 1.30-2.07 g GAE/100 g kuru siyah çay aralığında değişirken enzim uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) örneklerinde sırasıyla 1.32-2.28 ve 1.28-2.05 g GAE/100 g kuru siyah çay olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmada en yüksek toplam fenolik madde miktarı ultrasonik ekstraksiyon yönteminde 1:100 çay:su oranında, 30°C’de 20 dakikalık demleme koşullarında 2.28 g GAE/100 g kuru siyah çay değeri ile tannaz uygulanmış örneklerde elde edilmiştir. Bulgular incelendiğinde demleme sürelerinin artması ile ekstraktların toplam fenolik madde miktarlarında artış olduğu ve bu miktarlar arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak da önemli ($p<0.05$) olduğu belirlenmiştir.

Ekstraksiyon işlemindeki çay oranının artması ile tüm demleme sürelerinde toplam fenolik madde miktarında genellikle azalmalar meydana geldiği ve bu miktarsal farklılıkların istatistiksel olarak da önemli ($p<0.05$) olduğu belirlenmiştir. Ekstraksiyon işleminde çay:su oranının artması ile diğer bir deyişle çözgen (su) oranının azalması ile fenolik maddelerin ekstrakta geçişinin azaldığı, mutlak anlamda ekstrakt veriminin düştüğü görülmektedir. Tüm çay:su oranları ve demleme sürelerinde enzim uygulanan örneklerin toplam fenolik madde miktarlarında kontrol örneklerine göre artışlar meydana geldiği, miktarlar arasındaki bu farklılıkların genellikle istatistiksel olarak da önemli olduğu ($p<0.05$) görülmüştür.



Şekil 1. Siyah çay ekstraktlarının toplam fenolik madde değerleri (g GAE/100 g kuru siyah çay)
Figure 1. Total phenolic values of black tea extracts (g GAE/100 g dry black tea)

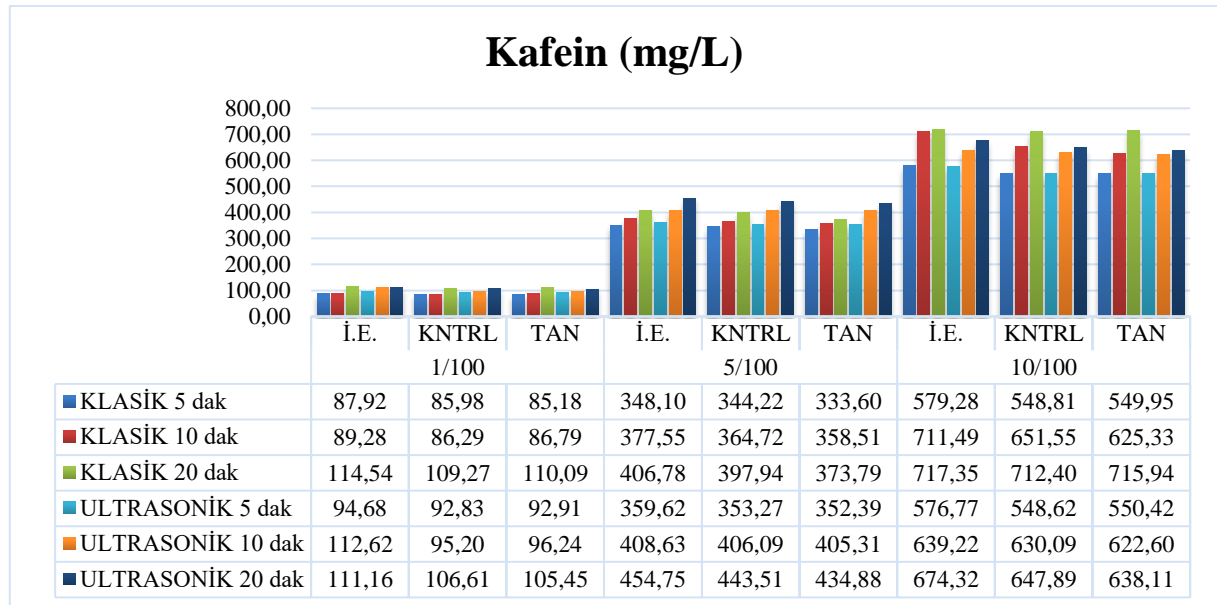
Ekstraksiyon yöntemleri birbiriyle karşılaştırıldığında, tüm demleme süreleri ve çay:su oranlarında ultrasonik yöntemle elde edilen siyah çay ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarlarının klasik ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstraktların fenolik madde miktarlarından daha fazla olduğu görülmektedir.

Rusaczonok ve ark. (2010), yaptıkları çalışmada 1:100 çay:su oranında kaynama sıcaklığındaki su ile 5 dakikalık demleme sonucunda siyah çayda toplam fenolik madde miktarını 112-151 mg GAE/g olarak belirtmişlerdir. Hanay (2011), 5. nevi Türk siyah çaylarında 2.83:250 çay:su oranı kullanarak 90°C de 20 dakikalık demleme sonunda ekstraktın toplam fenolik madde miktarını 38.37±0.75 mg/g olarak bulduğunu belirtirken, aynı sürede 100°C demleme sonucunda 60.97±1.36 mg/g olarak bulduğunu belirtmiştir.

Yapılan çalışmalarda siyah çay ekstraktlarının fenolik madde içeriklerinin birbirinden farklılık göstermesinde, çalışmalarda kullanılan çayların ekstraksiyon yöntem ve koşullarının farklı olmasının etkili olabileceği düşünülmektedir.

3.2. Siyah Çay Ekstraktlarının Kafein ve Kateşin Miktarları

Çalışmada farklı ekstraksiyon teknikleri, farklı çay:su oranları, demleme süreleri kullanılması ve tannaz ilave edilmesiyle elde edilen siyah çay ekstraktlarının kafein ve kateşin değerleri Şekil 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 'de verilmiştir. Klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ilk ekstraktlarda kafein miktarı 87.92-717.35 mg/L aralığında değişirken, enzim uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) örneklerde sırasıyla 85.18-715.94 mg/L ve 85.98-712.40 mg/L olarak belirlenmiştir. Ultrasonik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ilk ekstraktlarda kafein miktarı 94.68-674.32 mg/L aralığında değişirken, enzim uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) örneklerde sırasıyla 92.91-638.11 mg/L ve 92.83-647.89 mg/L olarak belirlenmiştir (Şekil 2).

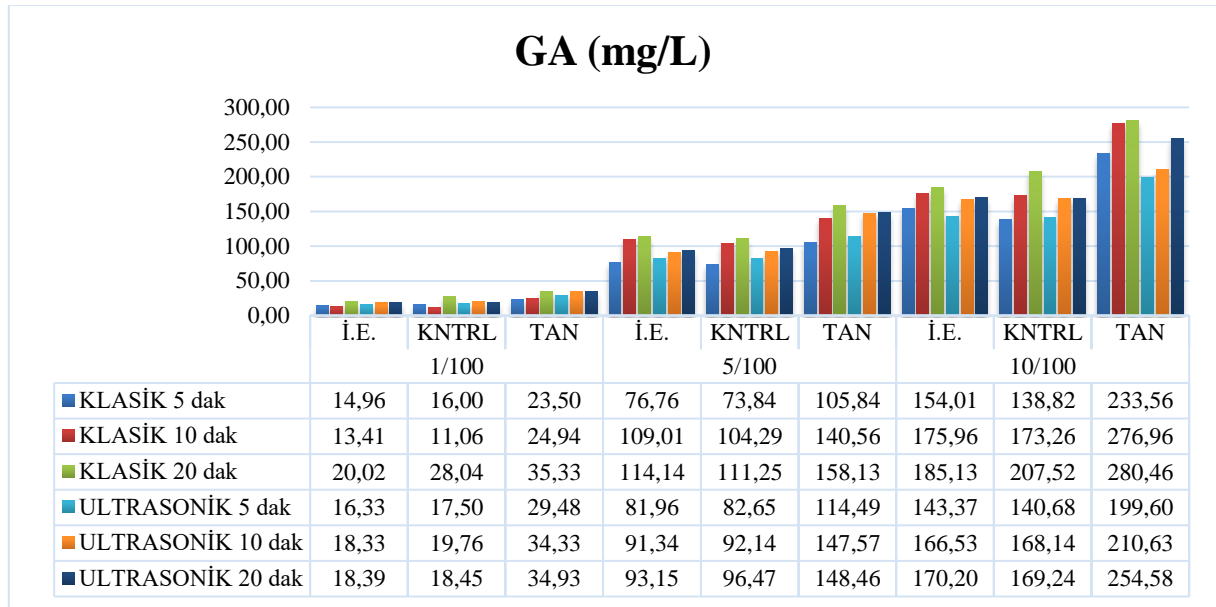


Şekil 2. Siyah çay ekstraktlarının kafein miktarı (mg/L)

Figure 2. Caffeine content of black tea extracts (mg/L)

Bulgular incelendiğinde çay:su oranının ve demleme süresinin örneklerin kafein miktarı üzerinde istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) etkisinin olduğu; çay:su oranı ve süre arttıkça kafein miktarında genellikle artış olduğu gözlemlenmiştir. Tüm uygulama koşullarında elde edilen çay ekstraktlarında enzim uygulanan ve uygulanmayan örneklerin kafein miktarları arasında önemli bir istatistiksel farkın bulunmadığı ($p>0.05$) belirlenmiştir. Ekstraksiyon yöntemleri birbiriyle karşılaştırıldığında, tüm demleme süreleri ve çay:su oranlarında ultrasonik yöntemle elde edilen siyah çay ekstraktlarının kafein miktarlarının klasik ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstraktların kafein miktarlarından genellikle daha fazla olduğu görülmektedir.

Klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ilk ekstraktlarda GA miktarı 13.41-185.13 mg/L aralığında değişirken, enzim uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) örneklerde sırasıyla 23.50-280.46 mg/L ve 11.06-207.52 mg/L olarak belirlenmiştir. Ultrasonik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ilk ekstraktlarda GA miktarı 16.33-170.20 mg/L aralığında değişirken, enzim uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) örneklerde sırasıyla 29.48-254.58 mg/L ve 17.50-169.24 mg/L olarak belirlenmiştir (Şekil 3).



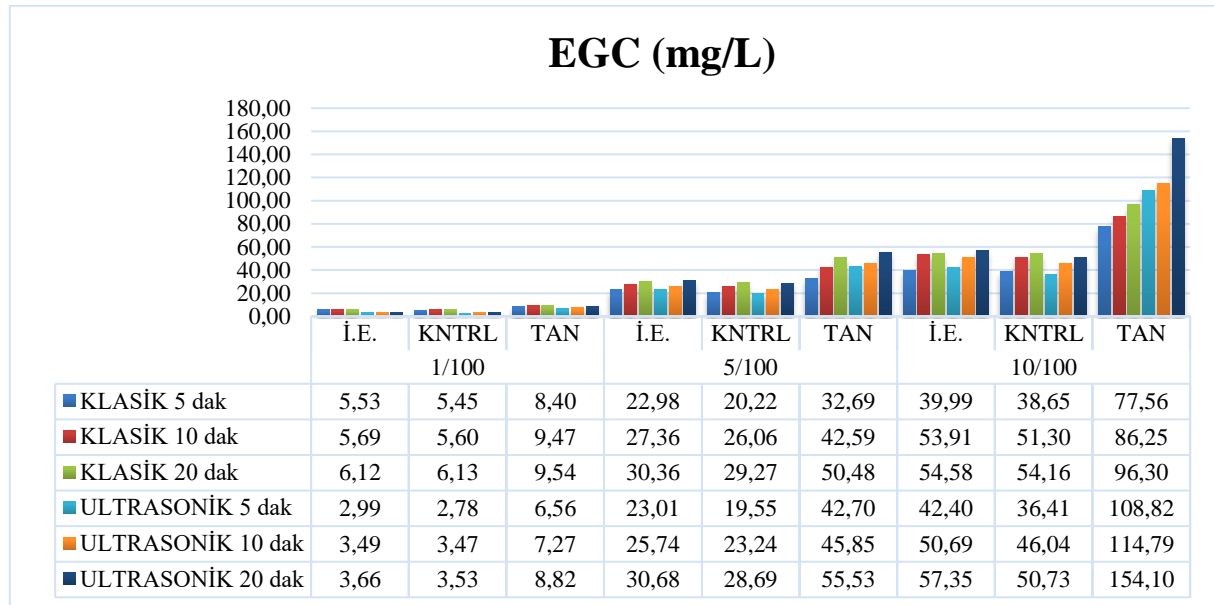
Şekil 3. Siyah çay ekstraktlarının Gallik Asit (GA) miktarı (mg/L)

Figure 3. Gallic Acid (GA) content (mg/L) of black tea extracts

Bulgular incelendiğinde çay:su oranının ve demleme süresinin örneklerin GA değerleri üzerinde istatistiksel olarak da önemli ($p<0.05$) bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Hem çay:su oranlarının değişmesi ile hem de demleme sürelerinin artışına bağlı olarak ekstraktların GA miktarlarında genellikle artışlar meydana geldiği, örneklerin GA miktarları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak da önemli ($p<0.05$) olduğu görülmüştür. Tüm demleme sürelerinde çay ekstraktlarına tannaz uygulanması ile birlikte örneklerin GA miktarlarında artışlar meydana geldiği ve bu artışların istatistiksel olarak da önemli ($p<0.05$) olduğu belirlenmiştir. Enzim uygulanan örneklerin GA miktarlarındaki artışa EGCG, ECG gibi gallik asit esterlerinin tannaz enzimi ile GA ve EGC veya EC ye hidroliz olmasının sebep olduğu düşünülmektedir.

Klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ilk ekstraktlarda EGC miktarı 5.53-54.58 mg/L aralığında değişirken, enzim uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) örneklerde sırasıyla

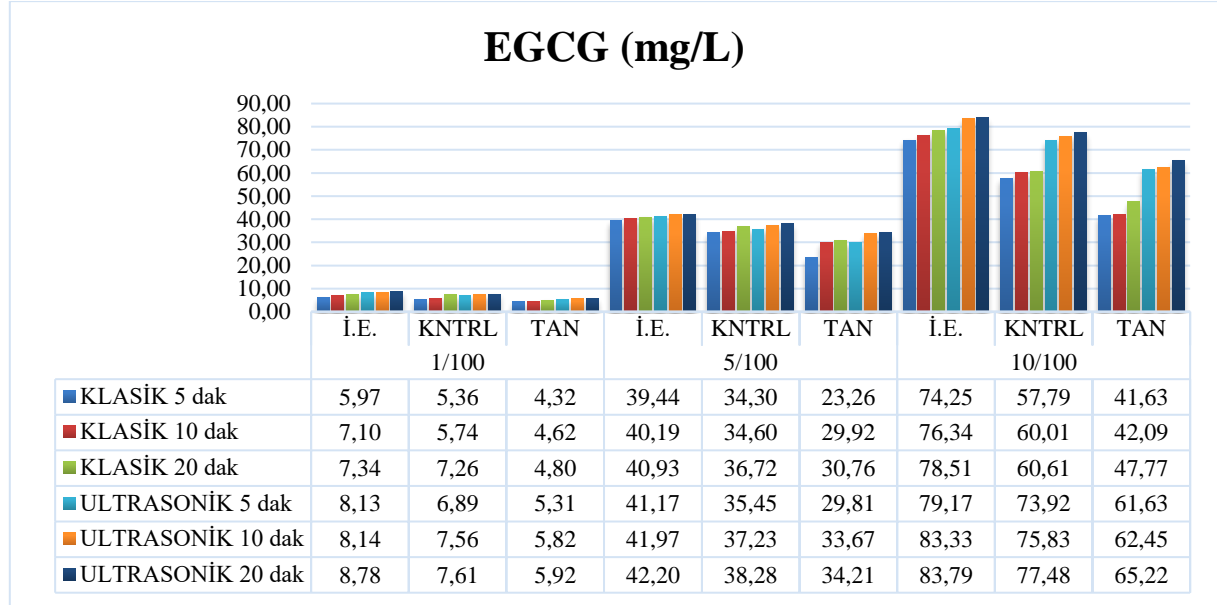
8.40-96.30 mg/L ve 5.45-54.16 mg/L olarak belirlenmiştir. Ultrasonik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ilk ekstraktlarda EGC miktarı 2.99-57.35 mg/L aralığında değişirken, enzim uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) örneklerde sırasıyla 6.56-154.10 mg/L ve 2.78-50.73 mg/L olarak belirlenmiştir (Şekil 4). Bulgular incelendiğinde, çay:su oranının örneklerin EGC değerleri üzerinde istatistiksel olarak da önemli ($p<0.05$) bir etkiye sahip olduğu; çay:su oranı arttıkça EGC miktarında artış olduğu gözlemlenmiştir. Tüm demleme sürelerinde çay ekstraktlarına tannaz uygulanması ile birlikte örneklerin EGC miktarlarında artışlar meydana geldiği ve bu artışların genellikle istatistiksel olarak da önemli ($p<0.05$) olduğu belirlenmiştir. Tüm uygulama koşullarında elde edilen çay ekstraktlarında enzim uygulanan örneklerin EGC miktarlarının enzim uygulanmayan örneklerin EGC miktarlarına göre daha fazla olduğu görülmektedir. Ekstraksiyon yöntemleri birbiriyle karşılaştırıldığında, tüm demleme süreleri ve çay:su oranlarında ultrasonik yöntemle elde edilen siyah çay ekstraktlarının toplam EGC miktarlarının klasik ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstraktların EGC miktarlarından genellikle daha fazla olduğu görülmektedir. Enzim uygulanan örneklerin EGC miktarlarındaki artışa EGCG kondense kateşininin, tannaz ile GA ve EGC ye hidroliz olmasının sebep olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4. Siyah çay ekstraktlarının epigallokateşin (EGC) miktarı (mg/L)

Figure 4. Epigallocatechin (EGC) content of black tea extracts (mg/L)

Klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ilk ekstraktlarda EGCG miktarı 5.97-78.51 mg/L aralığında değişirken, enzim uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) örneklerde sırasıyla 4.32-47.77 mg/L ve 5.36-60.61 mg/L olarak belirlenmiştir. Ultrasonik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ilk ekstraktlarda EGCG miktarı 8.13-83.79 mg/L aralığında değişirken, enzim uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) örneklerde sırasıyla 5.31-62.45 mg/L ve 6.89-77.48 mg/L olarak belirlenmiştir (Şekil 5).



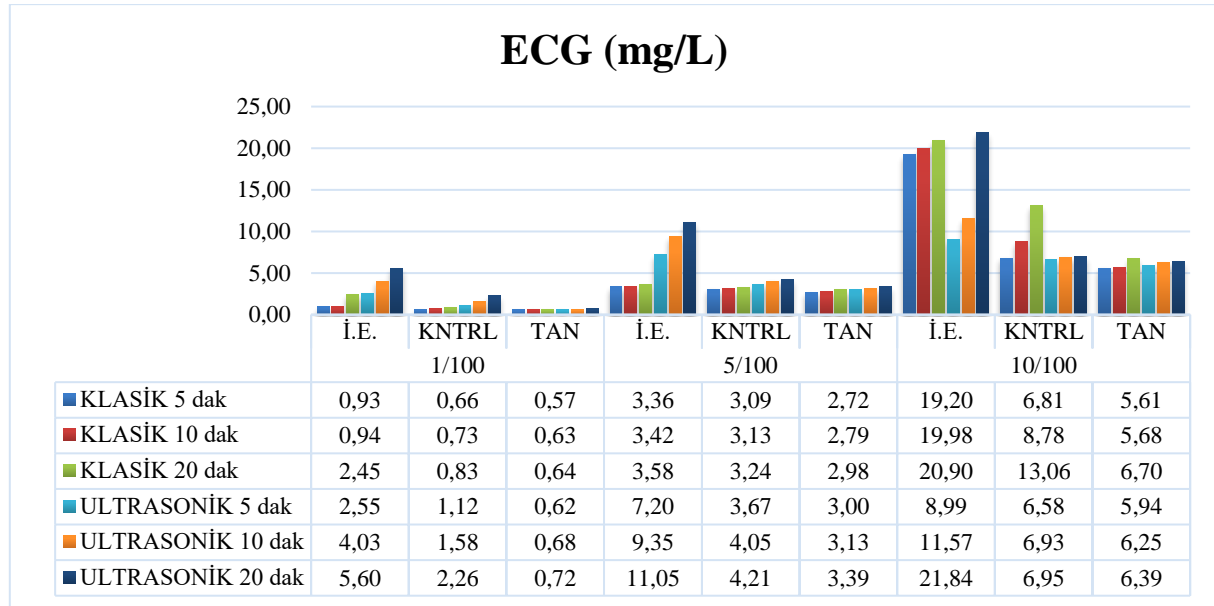
Şekil 5. Siyah çay ekstraktlarının epigallokateşingallat (EGCG) miktarı (mg/L)

Figure 5. Epigallocatechingallate (EGCG) content of black tea extracts (mg/L)

Bulgular incelendiğinde çay:su oranının, artmasıyla ekstraktların EGCG değerlerinde artış meydana geldiği ve bu artışların istatistiksel olarak da önemli ($p<0.05$) olduğu belirlenmiştir. Demleme sürelerinin artmasına bağlı olarak ekstraktların EGCG miktarlarında artışlar meydana geldiği, örneklerin EGCG miktarları arasındaki farklılıkların genellikle istatistiksel olarak da önemli ($p<0.05$) olduğu görülmüştür. Tüm çay:su konsantrasyonlarında ve demleme sürelerinde çay ekstraktlarına tannaz uygulaması ile birlikte örneklerin EGCG miktarlarında azalmalar meydana geldiği ve bu azalmaların istatistiksel olarak da önemli ($p<0.05$) olduğu belirlenmiştir. Enzim uygulanan örneklerin EGCG miktarlarındaki azalışta EGCG gibi gallik asit esterlerinin, tannaz enzimi ile GA ve EGC'ye hidroliz olmasının etkili olduğu düşünülmektedir.

Ekstraksiyon yöntemleri birbiriyle karşılaştırıldığında, tüm demleme süreleri ve çay:su oranlarında ultrasonik yöntemle elde edilen siyah çay ekstraktlarının toplam EGCG miktarlarının klasik ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstraktların EGCG miktarlarından genellikle daha fazla olduğu görülmektedir.

Klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ilk ekstraktlarda ECG miktarı 0.93-20.90 mg/L aralığında değişirken, enzim uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) örneklerde sırasıyla 0.57-6.70 mg/L ve 0.66-13.06 mg/L olarak belirlenmiştir. Ultrasonik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ilk ekstraktlarda ECG miktarı 2.55-21.84 mg/L aralığında değişirken, enzim uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) örneklerde sırasıyla 0.62-6.39 mg/L ve 1.12-6.95 mg/L olarak belirlenmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Siyah çay ekstraktlarının ECG miktarı (mg/L)

Figure 6. ECG content of black tea extracts (mg/L)

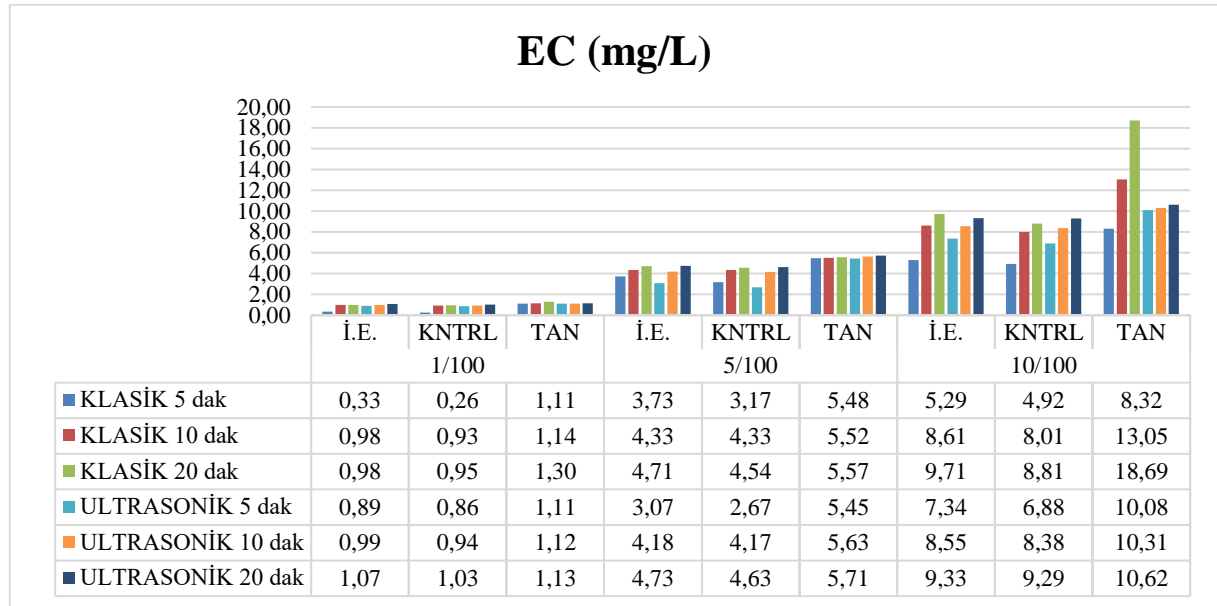
Hem tüm çay:su konsantrasyonlarında hem de tüm demleme sürelerinin artışına bağlı olarak ekstraktların ECG miktarlarında artışlar meydana geldiği, örneklerin ECG miktarları arasındaki farklılıkların genellikle istatistiksel olarak da önemli ($p < 0.05$) olduğu görülmüştür. Tüm çay:su konsantrasyonları ve demleme sürelerinde çay ekstraktlarına tannaz enzimi ilavesi ile birlikte örneklerin ECG miktarlarında azalmalar meydana geldiği görülmektedir. Enzim uygulanan örneklerin ECG miktarlarının azalmasında ECG' nin tannaz enziminin hidroliz etkisi ile GA ve EC'ye parçalanmasının etkili olduğu düşünülmektedir.

Ekstraksiyon yöntemleri birbiriyle karşılaştırıldığında, tüm demleme süreleri ve çay:su oranlarında ultrasonik yöntemle elde edilen siyah çay ekstraktlarının toplam ECG miktarlarının klasik ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstraktların ECG miktarlarından genellikle daha fazla olduğu görülmektedir.

Klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ilk ekstraktlarda EC miktarı 0.33-9.71 mg/L aralığında değişirken, enzim uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) örneklerde sırasıyla 1.11-18.69 mg/L ve 0.26-8.81 mg/L olarak belirlenmiştir. Ultrasonik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ilk ekstraktlarda EC miktarı 0.89-9.33 mg/L aralığında değişirken, enzim uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) örneklerde sırasıyla 1.11-10.62 mg/L ve 0.86-9.29 mg/L olarak belirlenmiştir (Şekil 7). Hem çay:su oranlarının değişmesi ile hem de demleme sürelerinin artışına bağlı olarak ekstraktların EC miktarlarında artışlar meydana geldiği, örneklerin EC miktarları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak da önemli ($p < 0.05$) olduğu görülmüştür. Tüm demleme sürelerinde çay ekstraktlarına tannaz uygulanması ile birlikte örneklerin EC miktarlarında artışlar meydana geldiği ve bu artışların genellikle istatistiksel olarak da önemli ($p < 0.05$) olduğu belirlenmiştir. Enzim uygulanan örneklerin EC miktarlarındaki artışa ECG gibi kondense kateşinin tannaz ile GA ve EC ye hidroliz olmasının sebep olabileceği düşünülmektedir.

Ekstraksiyon yöntemleri birbiriyle karşılaştırıldığında, tüm demleme süreleri ve çay:su oranlarında ultrasonik yöntemle elde edilen siyah çay ekstraktlarının toplam EC

miktarlarının klasik ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstraktların EC miktarlarından genellikle daha fazla olduğu görülmektedir.



Şekil 7. Siyah çay ekstraktlarının epikateşin (EC) miktarı (mg/L)

Figure 7. Epicatechin (EC) content of black tea extracts (mg/L)

Raghuwanshi ve ark. (2013), *Penicillium Charlesii* 'den elde ettikleri tannaz enziminin CTC ve orthodoks yöntem ile elde edilen kangra siyah çay ekstraktına etkilerini inceledikleri çalışmada 5:100 çay:su oranında 85°C de 20 dakika demleme ile elde ettikleri ekstraktlarda; CTC kontrol grubunda kafein miktarını 16.8 mg/g çay olarak belirtirken, enzim ilave edilmiş örneklerde 3.60 mg/g çay olarak, GA miktarını kontrol grubunda ve enzim uygulanmış örneklerde sırasıyla 10.10 mg/g çay ve 113.2 mg/g çay, kontrol grubunda ve enzim uygulanmış örneklerde EGC miktarını sırasıyla 18.96 mg/g çay ve 42.12 mg/g çay, kontrol grubunda ve enzim uygulanmış örneklerde EGCG miktarını sırasıyla 26.54 mg/g çay ve 2.830 mg/g çay, kontrol grubunda ve enzim uygulanmış örneklerde ECG miktarını sırasıyla 3.20 mg/g çay ve 0.35 mg/g çay, kontrol grubunda ve enzim uygulanmış örneklerde EC miktarı sırasıyla 1.20 mg/g çay ve 4.05 mg/g çay; olarak bildirmiştir.

Carloni ve ark. (2013), 0.5 g siyah çay üzerine 20 ml 90°C de su ilave edilerek 7 dakika demleme uyguladıkları çalışmada; kafein miktarını 0.617±0.070 mg/mL, CTC siyah çayda GA içeriğini 0.045±0.004 mg/mL; orthodoks yöntemi ile işlenen siyah çayda 0.081±0.006 mg/ml, CTC siyah çayda EGC içeriğini 0.029±0.007 mg/ml orthodoks yöntemi ile işlenen siyah çayda 0.848±0.118 mg/mL, CTC siyah çayda EGCG içeriğini 0.011±0.009 mg/mL, orthodoks yöntemi ile işlenen siyah çayda ise, 0.461±0.103 mg/mL, CTC siyah çayda ECG içeriğini 0.038±0.010 mg/mL, orthodoks yöntemi ile işlenen siyah çayda 0.230±0.066 mg/mL olarak belirtmişlerdir.

Hanay (2011), 5. nevi Türk siyah çaylarında 2.83:250 çay:su oranı kullanarak 90°C de 20 dakikalık demleme sonunda ekstraktın kafein miktarını 25.23±0.95 mg/g KM, GA miktarını 1.67±0.13 mg/g KM, ECG miktarını 0.92±0.10 mg/g KM, EC miktarını 3.86±0.29 mg/g KM, EGCG miktarını 1.65±0.08 mg/g KM, EGC miktarını 9.08±0.14 mg/g KM olarak bulunduğunu belirtirken, aynı sürede 100°C demleme sonucunda kafein miktarını 35.96±0.18 mg/g KM, GA miktarını 3.19±0.02 mg/g KM, ECG miktarını 1.16±0.02 mg/g

KM, EC miktarını 4.81 ± 0.30 mg/g KM EGCG miktarını 2.87 ± 0.25 mg/g KM, EGC miktarını 9.11 ± 0.51 mg/g KM olarak bulduğunu belirtmiştir.

Chandini ve ark. (2011a), siyah çay ekstraktlarında ekstraksiyon koşullarının (90°C de 10-120 dakika, %10-60 konsantrasyon) polifenol içeriğine ve krema oluşumuna etkilerini inceledikleri çalışmalarında; 90°C de 40 dakikalık demleme sonucunda kafein miktarını 1:10 çay su oranı için %2.41 olarak belirtirken 1:20.1:40 ve 1:60 çay su oranları için sırasıyla %2.58 ve %3.33 ve %3.51 olarak bildirmişlerdir. Çay:su oranı kafeinin ekstrakte edilebilirliğinde önemli bir etkenken, 30 dakikalık ekstraksiyon süresinin kafein ekstraksiyonu için yeterli olduğunu belirtmişlerdir.

Chandini ve ark. (2011b), siyah çay ekstraktlarında kaliteyi artırmak için farklı enzim uygulamaları denedikleri çalışmada; Hindistan'dan temin edilen CTC tipi siyah çay kullanarak 2:100 çay:su oranında 90°C de 40 dakika uyguladıkları ekstraksiyon işleminden sonra elde edilen ekstraktta kontrol örneğinde kafein içeriğini 31.9 ± 2.3 g/kg siyah çay olarak belirtilirken, 10 ve 20 U/g-siyah çay dozajında tannaz ilave edilmiş örnekler için sırasıyla 29.0 ve 28.5 g/kg siyah çay, EGC miktarını kontrol örneğinde 3.69 ± 0.16 , 10 ve 20 U/g-siyah çay dozajında tannaz ilave edilmiş örnekler için sırasıyla 3.82 ± 0.13 ve 3.90 ± 0.00 , EC miktarını kontrol örneğinde 1.47 ± 0.01 , 10 ve 20 U/g-siyah çay dozajında tannaz ilave edilmiş örnekler için sırasıyla %1.70 ve %2.05 ve ECG miktarını kontrol örneğinde 1.58 ± 0.04 , 10 ve 20 U/g-siyah çay dozajında tannaz ilave edilmiş örnekler için sırasıyla 1.40 ± 0.06 ve 1.36 ± 0.15 olarak belirtmiştir.

Yapılan çalışmalarda siyah çay ekstraktlarının kafein ve kateşin içeriklerinin birbirinden farklılık göstermesinin çalışmalarda kullanılan çayların ekstraksiyon yöntem ve koşullarının farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4. Sonuç

Bu çalışmada ülkemizin önemli çay üreticilerinden Çaykur işletmesine ait Güneysu-Ulucami çay fabrikası müdürlüğünden temin edilen siyah çay örneklerine klasik ve ultrasonik ekstraksiyon yöntemleri ile, 30°C demleme sıcaklığında ve farklı demleme sürelerinde (5, 10 ve 20 dakika), çay:su oranları (1:100; 5:100; 10:100) kullanılarak elde edilen ekstraktlara tannaz enzimi uygulanmıştır. Çalışmada elde edilen ekstraktlarda toplam fenolik madde, kafein ve kateşinlerin miktarları belirlenmiştir.

Ekstraksiyon yöntemleri birbiriyle karşılaştırıldığında, tüm demleme süreleri ve çay:su oranlarında ultrasonik yöntemle elde edilen siyah çay ekstraktlarının toplam fenolik madde, kafein ve kateşinlerin miktarlarının klasik ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde, kafein ve kateşinlerin miktarlarından genellikle daha fazla olduğu görülmektedir. Ultrasonik ekstraksiyon yönteminin kullanılmasının ekstraktların fitokimyasal bileşik miktarlarında önemli düzeyde artışlar sağladığı tespit edilmiştir.

5. Teşekkür

Araştırma, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP 2014/77) tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederiz.

6. Kaynaklar

- Abdolmaleki, F., 2016. Chemical Analysis and Characteristics of Black Tea Produced In North of Iran. *Journal of Food Biosciences and Technology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Vol. 6, No. 1, 23-32, 2016*
- Anonim, 2005. Determination of substances characteristic of green and black tea - part 1: content of total polyphenols in tea colorimetric method using Folin Ciocalteu Reagent. International Standard (ISO) 14502-1. <https://www.iso.org/standard/31356.html>
- Anonim, 2011. Millî Eğitim Bakanlığı, Kimya Teknolojisi, Karışımları Ayırma 524k10234, Ankara, http://Www.Megep.Meb.Gov.tr/Mte_Program_Modul/Moduller_Pdf/Kar%C4%B1%C5%9f%C4%B1mlar%C4%B1%20ay%C4%B1rma.Pdf (01.02. 2023)
- Azmir J., Zaidul I. S. M., Rahman M. M., Sharif K. M., Mohamed A., Sahena F., Jahurul M.H.A., Ghafoor K. , Norulaini N.A.N. & Omar A. K. M., 2013. Techniques For Extraction of Bioactive Compounds From Plant Materials: A Review. *Journal of Food Engineering, 117(4), 426-436.*
- Carloni P, Tiano L, Padella L, Bacchetti T, Customu C, Kay A, Damiani E., 2013. Antioxidant activity of white, green and black tea obtained from the same tea cultivar. *Food Research International, 53(2), 900–908.* <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.057>
- Chandini S K, Rao L J, Subramanian R., 2011a. Influence of extraction conditions on polyphenols content and cream constituents in black tea extracts. *International Journal Of Food Science And Technology, 46, 879–886.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02576.x>
- Chandini S K, Rao L J, Gowthaman M K, Haware D J, Subramanian R., 2011b. Enzymatic treatment to improve the quality of black tea extracts. *Food Chemistry, 127(3),1039–1045.* <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.078>
- Guo, X., Ho, C. T., Schwab, W., & Wan, X., 2021. Aroma Profiles of Green Tea Made With Fresh Tea Leaves Plucked In Summer. *Food Chemistry, 363, 130328.* <https://Doi.Org/10.1016/J.Foodchem.2021.130328>
- Hanay N., 2011. Farklı ekstraksiyon süre ve sıcaklıklarının çaydan deme geçen fenolik ve alkaloid madde miktarı üzerine etkisi. (Yüksek Lisans Tezi), Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya.
- Lekha P K, Lonsane B.K., 1997. Production and Application of Tannin Acyl Hydrolase: State of The Art.. *Advances In Applied Microbiology, 44, 216-260.*
- Liang Y R, Lu J L, Zhang L Y., 2002. Comparative study of cream in infusions of black tea and green tea (*Camellia Sinensis L.*) O. Kuntze). *International Journal Of Food Science & Technology, 37(6), 627-634.* <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00589.x>
- Raghuwanshi S, Misra S, Saxena R K, 2013. Enzymatic treatment of black tea (CTC and kangra orthodox) using *Penicillium Charlesii* tannase to improve the quality of tea. *Journal of Food Processing and Preservation, 37(5), 855–863.* <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2012.00721.x>
- Rusaczonk A, Świdorski F, Waszkiewicz-Robak B., 2010. Antioxidant properties of tea and herbal infusions – a short report. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 60(1), 33–35.*
- Sarıözül N Y, Çakır E, Kivanç M, Tunçel M., 2011. A Method For The Determination of Tannase Activity Based On Gallic Acid Measurement By High Performance Liquid Chromatography (HPLC) . *African Journal of Microbiology Research, 5(2), 158-163.*
- Simpson A., Shaw L. & Smith A., 2001. Tooth Surface pH During Drinking of Black Tea. *British Dental Journal, 190(7), 374-376.*
- Ulusoy K. & Karakaya M., 2011. Gıda Endüstrisinde Ultrasonik Ses Dalgalarının Kullanımı. *Gıda, 36 (2), 113-120.*
- Uzuner, S., 2022. Ultrasonication Effects on Quality of Tea-Based Beverages. *Beverages, 9(1), 1.*
- Vuong Q. V., Golding J.B., Stathopoulos C.E., Nguyen M.H. & Roach P.D., 2011. Optimizing Conditions For The Extraction of Catechins From Green Tea Using Hot Water. *Journal of Separation Science. 34(21), 3099–3106.*
- Yazıcı, K. , Göksu Karaoğlu, B. , Şavşatlı, Y. , Akbulut, M., Seyis, F. , Sarı, H. , Atay, Y. , Karaoğlu, A. & Üst, E., 2023. Çay (*Camellia Sinensis L.*) O. Kuntze) Bitkisi Verimine Farklı Gübre ve Kaolin Uygulamalarının Etkileri. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 10 (1) , 29-38.* Doi: 10.30910/Turkjans.1137413
- Zhang H, Qi R, & Mine Y., 2019. The Impact of Oolong and Black Tea Polyphenols On Human Health. *Food Bioscience, 29, 55-61.* <https://Doi.Org/10.1016/J.Fbio.2019.03.009>