

Received: 22.11.2022

Accepted: 23.12.2022

## Tannaz Enzimi Uygulamasının Siyah Çay Ekstraktlarının Bazı Özellikleri ve Krema Oluşumu Üzerine Etkisi

Esra ESİN YÜCEL<sup>1\*</sup>, Cemal KAYA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 60250, Tokat, Türkiye

### Özet

Bu çalışmada, siyah çaydan elde edilen çay ekstraktından soğuk çay üretiminde en önemli problemlerden biri olan çay kreması oluşumunu azaltmak ya da önlemek suretiyle berrak bir ürün elde etmek ve ürün kalitesini artırmak amaçlanmıştır. Bu amaçla klasik ekstraksiyon yöntemi ile, farklı demleme sıcaklık (90 ve 100°C), süre (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, bulanıklık, çay kreması, kateşin ve kafein analizleri yapılmıştır. Çay kreması miktarı enzim uygulanmış örneklerde 1.02-1.47 g/100g siyah çay, enzim uygulanmamış kontrol grubunda 1.93-2.36 g/100g siyah çay aralığında belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Tannaz, fenolik madde, kateşin, kafein, bulanıklık

## The Effect of Tannase Enzyme Application on Some Properties of Black Tea Extracts and Cream Formation

Esra ESİN YÜCEL<sup>1\*</sup>, Cemal KAYA<sup>1</sup>

### Abstract

In this study, it was aimed to obtain a clear product and increase product quality by reducing or preventing the formation of tea cream, which is one of the most important problems in the production of cold tea from tea extract obtained from black tea. For this purpose, tannase enzyme was applied to the extracts obtained by applying different brewing temperatures (90 and 100°C) and times (10 and 20 minutes), tea:water ratios (1:100; 5:100; 10:100) with the classical extraction method. Total phenolic substance, turbidity, tea cream, catechin and caffeine analyzes were made in the extracts obtained in the study. The amount of tea cream was in the range of 1.02-1.47 g/100g black tea in the enzyme-treated samples, and 1.93-2.36 g/100g black tea in the untreated control group.

**Keywords:** Tannase, phenolic substance, catechin, caffeine, turbidity

---

\*Corresponding Author, e- mail: esinyasemin@yahoo.com

## 1.Giriş

Sudan sonra en çok tercih edilen ikinci içecek olan çay, dünyada milyonlarca insan tarafından her gün zevkle tüketilmektedir [1]. Çayın tüm dünyada çok popüler ve keyif verici bir içecek olmasının yanı sıra bileşimindeki çeşitli fenolik maddelerin varlığı sayesinde antioksidan, antimikrobiyal ve antikanserojen özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir [2]. Çayın en çok dikkat çeken bileşenleri fenolik bileşiklerdir. Çaydaki temel polifenoller kateşinlerdir ve çözünür katı kısmın yaklaşık %75-80'ini oluştururlar [3]. Kateşinler, C3 atomunda bir OH grubu içerdiğinden sistematik olarak flavan-3-ol olarak adlandırılırlar. Kateşinlerin yapılarında iki asimetric karbon atomu bulunduğundan dört izomeri bulunmaktadır. C2 ve C3 atomlarına bağlı hidrojen (+)-kateşin ve (+) gallokateşin moleküllerinde trans, (-) epikateşin ve (-) epigallokateşin moleküllerinde ise cis konfigürasyonundadır. Çayın temel kateşinleri; kateşin (C), Gallokateşin (GC), Epikateşin (EC), Epikateşingallat (ECG), Epigallokateşin (EGC) ve Epigallokateşingallat (EGCG) olup, EGCG fenolik bileşiklerin %50 sinden fazlasını oluşturmaktadır [4]. Kateşinler çay üretiminde tat, aroma ve rengi etkiler. Çayın acımsı ve buruk tadı kateşinlerden kaynaklanmaktadır [5, 6].

Günümüzde çay tüketim alışkanlıkları oldukça hızlı bir şekilde değişmektedir. Piyasada klasik demleme çaya alternatif olarak birçok yeni ürün üretilmektedir. Bu ürünlerden bir tanesi de soğuk çaydır. Soğuk çay, tüm dünyada üretimi ve tüketimi hızla artan bir ürün haline gelmektedir. Soğuk çayın ticari üretimi; çay yapraklarının seçilmesi ve harmanlanması, sıcak su ekstraksiyonu, aroma geri kazanımı, krema çökeltme, süzme, çözünebilir katı maddelerin konsantrasyon edilmesi, kurutma, kümeleştirme ve aromatize etme gibi çeşitli prosesleri içermektedir [7, 8].

Soğuk çay üretimi sürecinde karşılaşılan en önemli problemlerden biri çay kreması oluşumudur. Çayda bulunan ve çay tanenleri olarak adlandırılan theaflavin ve thearubijinin kafein ile oluşturdukları kafein-tannat kompleksleri, sıcak suda çözünür; fakat soğuk suda, özellikle sertlik derecesi yüksek sularda çözünmeyerek bulanık bir görünüme neden olurlar. Soğukta gerçekleşen bu çökeltiye "krema", bulanma ve çökelti oluşması olayına da "kremalaşma" adı verilir [3, 7, 9, 10]. Çay kreması oluşumu bir bozulma nedeni olarak kabul edilmemekle birlikte, görsel olarak bulanıklığa neden olması sebebiyle hem üreticiler hem de tüketiciler tarafından istenmemektedir [11-13].

Tannaz (Tannin Açılhidrolaz (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 [14-18]. Tannaz enzimi, farklı uygulama alanlarına sahip olmakla birlikte, enziminin endüstride en çok kullanım alanı çözünebilir çay üretimidir. Enzim; çay kateşinlerinin biyotransformasyonunu kolaylaştırarak antioksidan özelliklerini arttırmak ve krema oluşumunu azaltarak, çay ürünlerinin renk ve duyu özelliklerini iyileştirmek için kullanılmaktadır [19].

Bu çalışmada, siyah çaydan çay ekstraktı elde ederken karşılaşılan en önemli problemlerden biri olan çay kreması oluşumunun azaltılması ya da önlenmesi, berrak bir ürün elde edilmesi ve ürün kalitesinin yükseltilmesi amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Yöntem

### 2.1. Materyal

Çalışmada hammadde olarak kullanılan siyah çay; Çay-kur firmasının Güneysu-Ulucami Çay Fabrikası Müdürlüğünden (nevi ve tipi: 5(BOP2)) temin edilmiştir. Çalışmada çözücü olarak destile (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, farklı demleme sıcaklıklarına (90 ve 100 °C) uygun şekilde su ilavesi yapılmış, yaklaşık 30 sn boyunca iyice karıştırılan örnekler klasik su banyosunda farklı sürelerde (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) ilave edilmiş ve üzerlerine 1.5 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

#### Bulanıklık Tayini

Çay ekstraktlarının bulanıklık ölçümleri turbidimetre kullanılarak (La Matte 2200, 2020 we, Amerika) belirlenmiş ve sonuçlar NTU olarak ifade edilmiştir [20].

#### Çay Kreması Miktarı Tayini

Çay ekstraktlarının krema oluşum miktarı Nagalashmi ve ark. [21] tarafından belirtildiği şekilde yapılmıştır. Buna göre ekstraktlar 20 dakika boyunca -2 °C de 9000 rpm devirde santrifüj (BOECO centrifuges U-32/32R) edilmiş ve berrak kısım uzaklaştırılmıştır. Çökelti iki defa 5 ml su ile darası bilinen kuru madde kaplarına yıkanmış ve 105 °C de 16 saat kurumaya bırakılmış, krema miktarı aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmış ve sonuçlar % olarak ifade edilmiştir.

$$\%KREMA = \frac{A}{[(B * C)/D]} * 100$$

A= Ham krema (g)

B= Analizde kullanılan ekstrakt miktarı (ml)

C= Ekstraksiyonda kullanılan siyah çay miktarı (g)

D= Demleme işleminde elde edilen ekstrakt miktarı (ml)

## **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 [22].

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

Siyah çay örneklerinin ve çay ekstraktlarının bireysel kateşinlerin [GA (Sigma), EGC (Fluka), EC (Sigma), EGCG (Merck), GCG (Sigma), ECG (Sigma) ve CG (Sigma)] ve kafeinin (Sigma) belirlenmesi HPLC cihazı kullanılarak Liang ve ark. [23] yönteminin modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ekstraktlar 0.45µm gözenek çapına sahip membran filtreden süzöldükten 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 kromotogramlardan elde edilen alanlar kullanılmış ve oluşturulan standart grafikten yararlanılmış olup, miktarlar mg/l olarak belirtilmiştir.

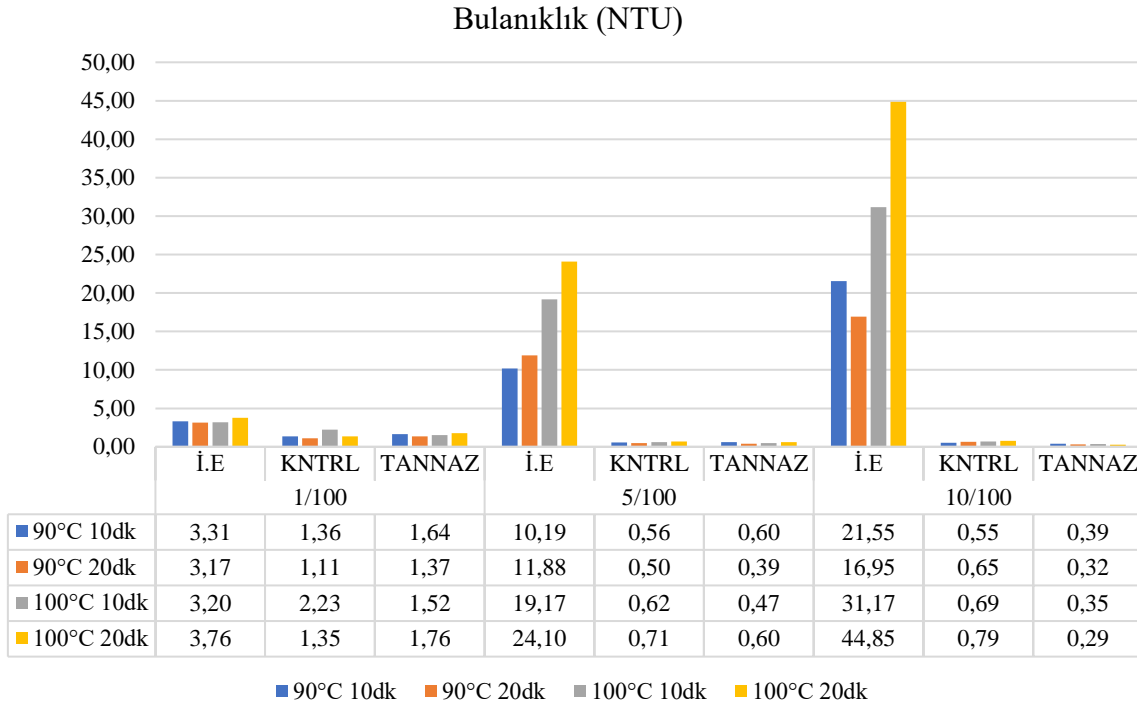
## **İstatistiksel Analizler**

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 Bulanıklık (NTU) Değerleri**

Çay kreması oluşumu, çay ürünlerinin stabilitesini etkileyen çökelti oluşumlarına neden olur. Çay ekstraktından ışık geçirildiğinde çay kremasını oluşturan partiküller ışığın dağılmasına neden olur ve ekstraktın puslu görünmesine yol açar [24]. Çalışmada farklı çay:su oranları, demleme sıcaklık ve süreleri kullanılması ve tannaz enzimi ilave edilmesiyle elde edilen siyah çay ekstraktlarının NTU değerleri Şekil 1'de verilmiştir. Klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ilk ekstraktlarda bulanıklık değeri 3.17-44.85 NTU aralığında değişirken, enzim uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) örneklerinde sırasıyla 0.29-1.76 NTU ve 0.50-2.23 NTU olarak belirlenmiştir. Bulgular incelendiğinde çay:su oranının, demleme sıcaklığı ve süresinin örneklerin bulanıklık (NTU) değerleri üzerinde istatistiksel olarak önemli ( $p<0.05$ ) bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Tüm çay:su oranı, demleme sıcaklığı ve sürelerinde enzim uygulanan örneklerin NTU değerlerinde, kontrol örneklerine göre genellikle azalmalar meydana geldiği enzim uygulanan ve uygulanmayan (kontrol) örneklerin NTU değerleri arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemsiz ( $p>0.05$ ) olduğu belirlenmiştir.



**Şekil 1.** Siyah çay ekstraktlarının bulanıklık (NTU) değerleri

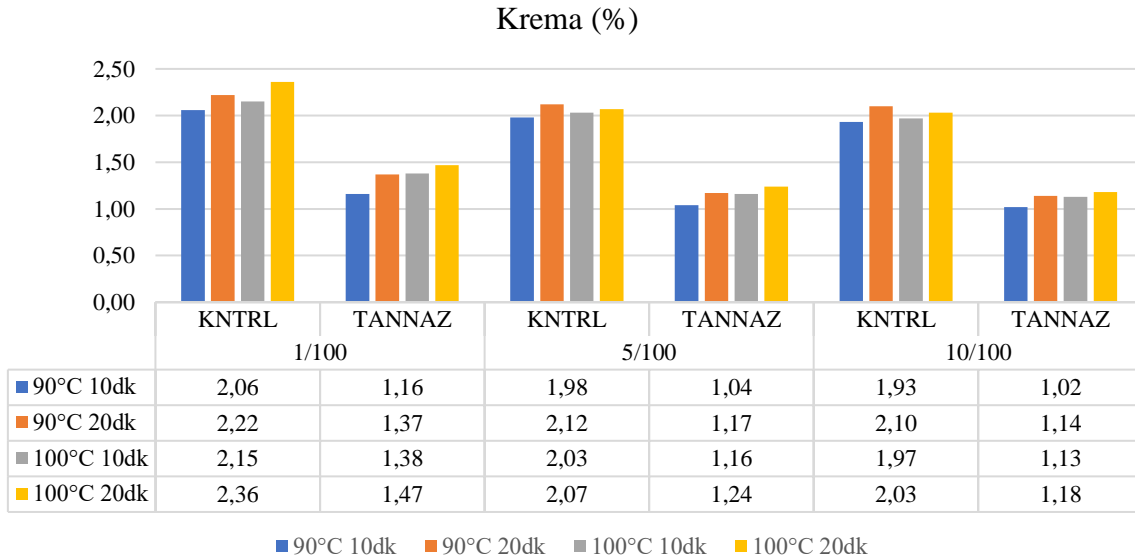
Chandini ve ark. [25], %2 çay oranı kullanımında ekstraksiyon süresinin siyah çay kalitesine etkisini inceledikleri çalışmalarında süre arttıkça bulanıklık değerlerinde artış gözlemlenmiştir. 10, 20, 30 ve 40 dakika demlemede bulanıklık değerlerinin sırasıyla 19.2, 25.6, 35.2 ve 38.2 NTU olduğunu belirtmişlerdir. Chandini ve ark. [12], bir başka çalışmada Hindistan'dan temin edilen CTC (Crush-ezme, Tear-yırtma, Curl-kıvrırma) tipi siyah çay kullanarak 2:100 çay:su oranında 90 °C de 40 dakika uyguladıkları ekstraksiyon işleminden sonra elde edilen ekstraktta kaliteyi artırmak için farklı enzim uygulamaları denedikleri çalışmada; bulanıklık ölçümü için tüm örnekleri 0.25:200 çay:su oranı olacak şekilde ayarlamışlar ve NTU ölçümlerini buna göre yapmışlardır. İlk ekstraktta bulanıklık 32.8 NTU; 10 ve 20 U/g-siyah çay tannaz ilave edilmiş örneklerde bulanıklık değeri sırasıyla 30.5±1.4 ve 31.4±3.4 NTU olarak belirlenirken, santrifüj edilmiş (5600 g ve 20 dakika) örneklerde bu değerler kontrol örneği için 0.76 NTU, 10 ve 20 U/g-siyah çay tannaz ilave edilmiş örneklerde bulanıklık değerinin sırasıyla 0.67±0.12 ve 0.62±0.24 NTU olduğunu belirtmişlerdir. Depolanmış (5°C de 1 hafta) örneklerde bulanıklık değeri ise kontrol, 10 ve 20 U/g-siyah çay tannaz uygulanmış örneklerde sırasıyla 15.2, 5.6±1.2 ve 5.4±1.3 NTU olarak belirlenmiştir. Boadi ve Neufeld [26], çay tanenlerinin hidrolizi için tannaz enkapsülasyonunu denedikleri çalışmada; çay örneğinin 23°C de ölçülen bulanıklık değeri 400 NTU iken tannaz ile muamele edilen örneklerde 75 NTU olarak, 7 gün 5 °C de depolama sonucunda kontrol ve tannaz ilave edilmiş örnekler için bu değerler sırasıyla 802 ve 237 NTU; 7 gün 5°C de depolama sonucunda santrifüj edilen örneklerde kontrol ve tannaz ilave edilmiş örnekler için bu değerler sırasıyla 480 ve 128 NTU olarak belirtilmiştir. Polat ve ark. [27], 1/20 çay:su oranında 10 dakika demleme sonrasında çay ekstraktlarının bulanıklık değerini 11.69±0.18 NTU, 20 dakika demleme sonrasında 36.64± 2.14 NTU aralığında değişim gösterdiğini belirtmiştir.

Çalışmada elde edilen bulanıklık (NTU) değerlerine ilişkin bulguların bazı çalışmalardaki bulgularla benzerlik gösterdiği, bazı çalışmalarla karşılaştırıldığında ise daha düşük düzeyde olduğu görülmektedir. Bununla beraber tüm çalışmalarda tannaz enzimi uygulamasının örneklerin bulanıklık (NTU) değerlerinde azalmaya sebebiyet verdiği görülmektedir.

### 3.2. Siyah Çay Ekstraktlarının Krema Miktarı

Çalışmada farklı çay:su oranları, demleme sıcaklık ve süreleri kullanılması ve tannaz enzimi ilave edilmesiyle elde edilen siyah çay ekstraktlarının çay kreması miktarlarında meydana gelen değişimler Şekil 2’de verilmiştir. Klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen örneklerde çay kreması miktarı enzim uygulanmamış kontrol grubunda %1.93-2.36, enzim uygulanmış örneklerde %1.02-1.47 aralığında değiştiği gözlemlenmiştir. Bulgular incelendiğinde çay:su oranının; demleme sıcaklığı ve süresinin örneklerin çay kreması miktarları üzerinde istatistiksel olarak önemli ( $p<0.05$ ) etkisinin olduğu; tüm uygulama koşullarında tannaz enzimi uygulanan çay ekstraktlarının krema miktarlarında kontrol örneklerine göre azalmalar meydana geldiği ve enzim uygulanan ve uygulanmayan örneklerin krema miktarları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak da önemli ( $p<0.05$ ) olduğu saptanmıştır. 90°C, 10:100 çay:su oranı ve 10 dakikalık ekstraksiyon koşullarında enzim uygulaması yapılmış örneklerde krema oluşumunun en az olduğu belirlenmiştir.

Demleme sıcaklık ve süreleri arttıkça ekstraktların krema miktarlarında artış meydana geldiği ve ekstraktların krema miktarları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak da önemli ( $p<0.05$ ) olduğu belirlenmiştir.



Şekil 2. Siyah çay ekstraktlarının krema miktarı (%)

Liang ve Xu [28], siyah çay ekstraksiyonunda sıcaklığın krema oluşumu üzerine etkisini inceledikleri çalışmada; 4.3 g/L çay:su oranında 20 °C’de yapılan ekstraksiyonda krema oluşumu gözlemlenmezken; 30, 50, 70 ve 90 °C’de yapılan ekstraksiyonda oluşan krema miktarları sırasıyla 0.04, 0.15, 1.02 ve 1.18 g/L olarak belirtilmiştir. Chandini ve ark. [25], 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 çay kreması miktarını 1:10 çay su oranı için %2.36 olarak belirtirken 1:20.1:40 ve 1:60 çay: su oranları için sırasıyla %1.97, %1.78 ve % 1.52 olarak bildirmişlerdir. Chandini ve ark. [12], Hindistan’dan temin edilen CTC-siyah çayın kullanıldığı ekstraksiyonda kaliteyi artırmak için enzim uygulamasının çay krema oluşumu üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında, kontrol örneğinde krema miktarı  $1.86\pm 0.52$ , farklı konsantrasyonlarda (10 ve 20 U/g-siyah çay) tannaz ilave edilmiş örnekler için krema miktarı sırasıyla  $0.65\pm 0.63$  ve  $0.64\pm 0.54$  olarak, aynı örneklerin santrifüj edilmiş (5600 g ve 20 dakika) kontrol örneğinde krema miktarı  $0.085\pm 0.02$  tannaz ilave edilmiş örneklerde 10 ve 20 U/g-siyah çay için sırasıyla krema miktarı  $0.067\pm 0.031$  ve

$0.052 \pm 0.041$  olarak belirlemişlerdir. Aynı örneklerin  $5^{\circ}\text{C}$  de 1 hafta süre depolanması sonrasında kontrol örneği için krema miktarı  $0.265 \pm 0.021$  olarak bulunurken, tannaz ilave edilmiş örneklerde 10 ve 20 U/g-siyah çay için sırasıyla krema miktarı  $0.079 \pm 0.011$  ve  $0.065 \pm 0.032$  olarak belirlenmiştir. Raghuwanshi ve ark. [29], *Penicillium Charlesii*' den elde ettikleri tannaz enziminin CTC ve orthodoks yöntem ile elde edilen Kangra siyah çay kullanarak ürettikleri çay ekstraktlarının krema miktarına etkisini inceledikleri çalışmada 5:100 çay:su oranında  $85^{\circ}\text{C}$  de 20 dakika demleme ile elde ettikleri ekstraktlarda; örneklerin krema miktarı CTC ve orthodoks yöntemiyle elde edilen siyah çay ekstraktlarına ait kontrol örneklerinde sırasıyla 0.520 ve 0.390 g/100 ml olarak belirlenirken; farklı dozajlarda ( $0.05, 0.1, 0.15, 0.175, 0.2$ ) tannaz enzimi uygulanmış yukarıda sözü edilen siyah çay ekstraktlarında krema miktarları sırasıyla 0.081-0.430 ve 0.076-0.210 g/100 ml arasında değişim göstermiştir. Balcı ve ark. [30], siyah çay atıklarında krema miktarının soğutma süresine bağlı olarak 0.71-1.60 g/100 ml aralığında değiştiğini bildirmiştir.

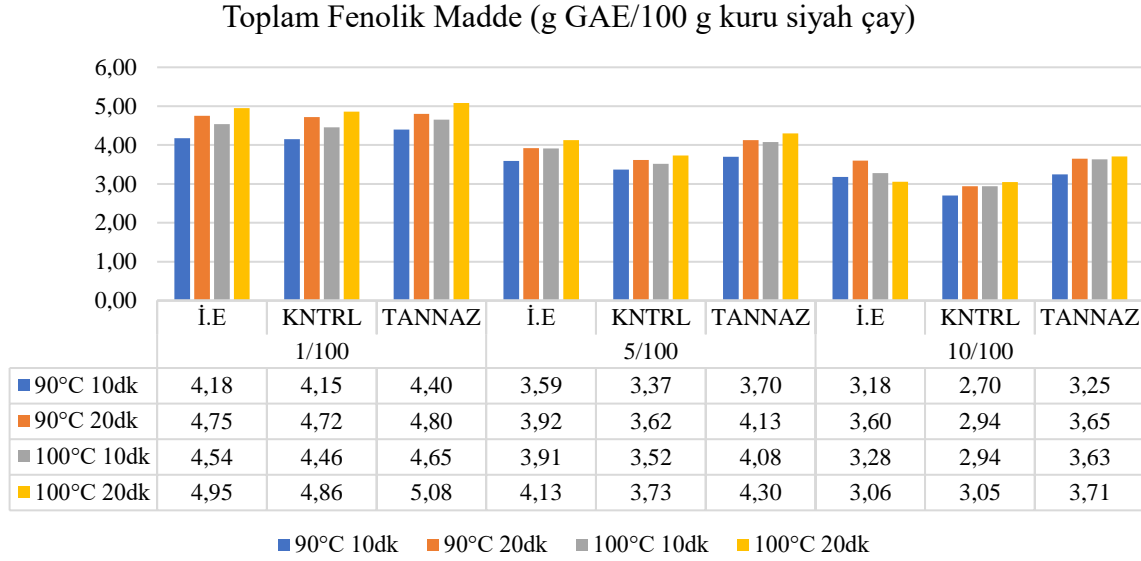
Tannaz enzimi ilavesinin krema oluşumunu azaltması bakımından değerlendirildiğinde, çalışmada elde edilen bulguların literatürde yapılan diğer çalışmalardaki bulgularla benzerlik gösterdiği görülmektedir.

### 3.3. Siyah Çay Ekstraktlarına Ait Toplam Fenolik Madde Miktarları

Çalışmada farklı çay:su oranları, demleme sıcaklık ve süreleri kullanılması ve tannaz enzimi ilave edilmesiyle elde edilen siyah çay ekstraktlarının toplam fenolik madde değerleri Şekil 3'de verilmiştir. Yapılan çalışmada en yüksek toplam fenolik madde miktarı klasik ekstraksiyon yönteminde 1:100 çay:su oranında,  $100^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dakikalık demleme koşullarında 5.08 g GAE/100 g kuru siyah çay değeri ile tannaz enzimi uygulanmış örneklerde elde edilmiştir. Bulgular incelendiğinde demleme sıcaklığı ve 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 işleminde yüksek sıcaklıklarda çalışmak çözünen maddenin çözücüye geçişini hızlandırır. Bu durumda çay yapraklarının hücre duvarları çözücüye ve bileşenlere daha geçirgen hale gelir ve böylece çay kateşinlerinin çözünürlük ve difüzyon katsayıları artar [33,34]. Siyah çaydaki polifenollerin okside formda ve daha yüksek bir polimerleşme derecesine sahip olmalarından dolayı, düşük sıcaklıkta iyi bir ekstraksiyon sağlanamamasına neden olduğu düşünülmektedir.

Ekstraksiyon işlemindeki çay oranının artması ile tüm demleme sıcaklık ve 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 3.** Siyah çay ekstraktlarının toplam fenolik madde değerleri (g GAE/100 g kuru siyah çay)

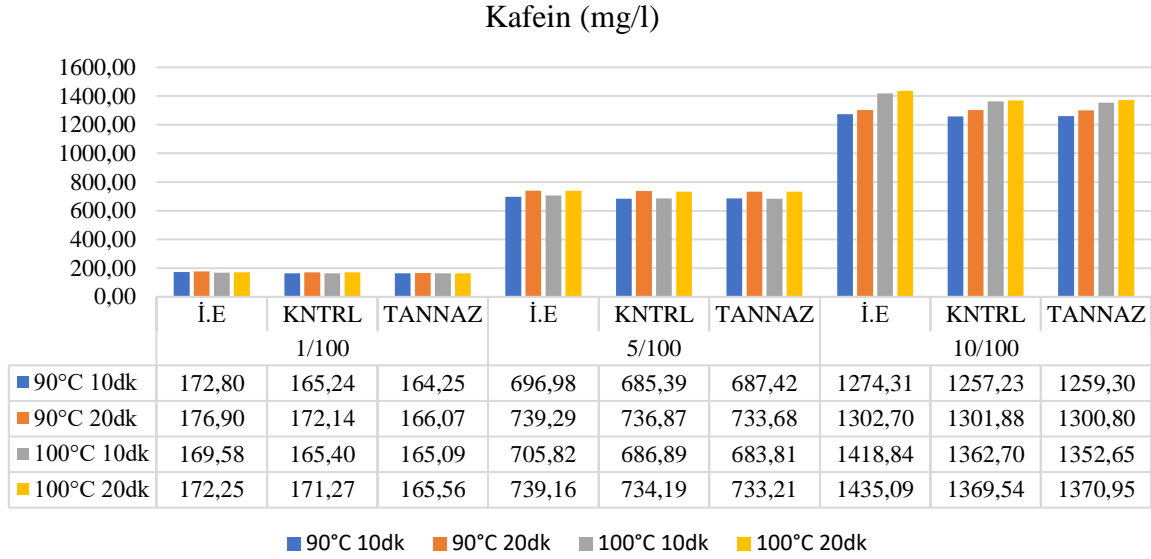
Rusaczonk ve ark. [31], yaptıkları çalışmada 1:100 çay:su oranında kaynama sıcaklığındaki su ile 5 dakikalık demleme sonucunda siyah çayda toplam fenolik madde miktarını 112-151 mg GAE/g olarak belirtmişlerdir. Hanay [32], 5. nevi Türk siyah çaylarında 2.83:250 çay:su oranı kullanarak 90°C de 20 dakikalık demleme sonunda ekstraktın toplam fenolik madde miktarını  $38.37 \pm 0.75$  mg/g olarak bulduğunu belirtirken, aynı sürede 100°C demleme sonucunda  $60.97 \pm 1.36$  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.

### 3.4. Siyah Çay Ekstraktlarının Kafein ve Kateşin Miktarları

Çalışmada farklı çay:su oranları, demleme sıcaklık ve süreleri kullanılması ve tannaz enzimi ilave edilmesiyle elde edilen siyah çay ekstraktlarının kafein ve kateşin değerleri Şekil 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 'da verilmiştir. Klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ilk ekstraktlarda kafein miktarı 169.58-1435.09 mg/l aralığında değişirken, enzim uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) örneklerde sırasıyla 164.25-1370.95 mg/l ve 165.24-1369.54 mg/l olarak belirlenmiştir (Şekil 4).

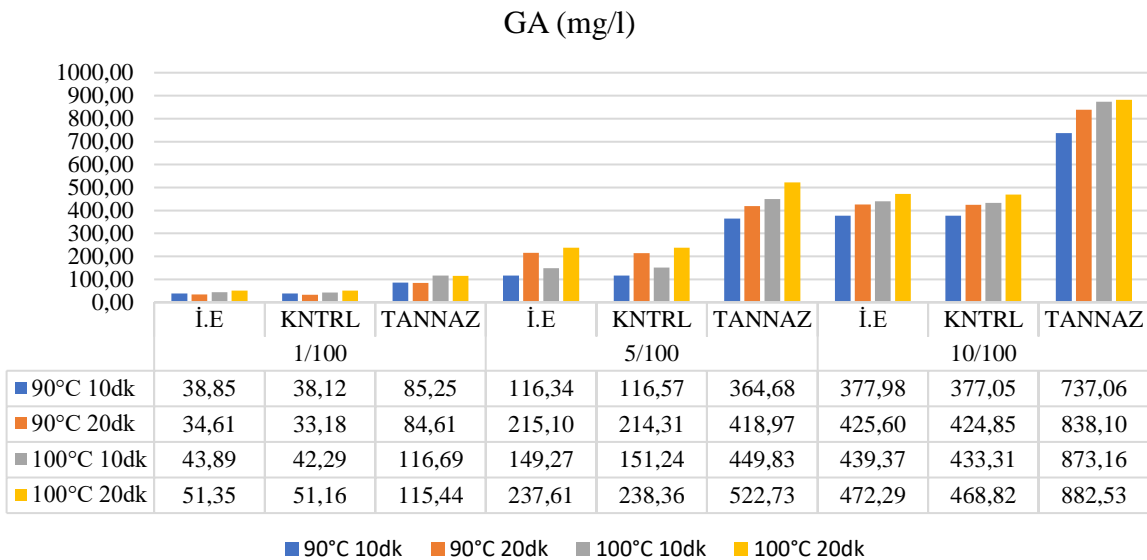




**Şekil 4.** Siyah çay ekstraktlarının kafein miktarı (mg/l)

Bulgular incelendiğinde çay:su oranının, demleme sıcaklığı ve süresinin örneklerin kafein miktarı üzerinde istatistiksel olarak önemli ( $p < 0.05$ ) etkisinin olduğu; çay:su oranı, sıcaklık 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. Çay:su oranlarının 5:100' den 10:100'e çıkarılmasıyla ekstraktların kafein içeriklerinde yaklaşık 1.5 katından fazla artış meydana geldiği görülmektedir. Bu bağlamda siyah çay ekstraksiyonunda çay:su oranının yüksek tutulmasının kafein veriminde azalmaya neden olduğu belirtilebilir.

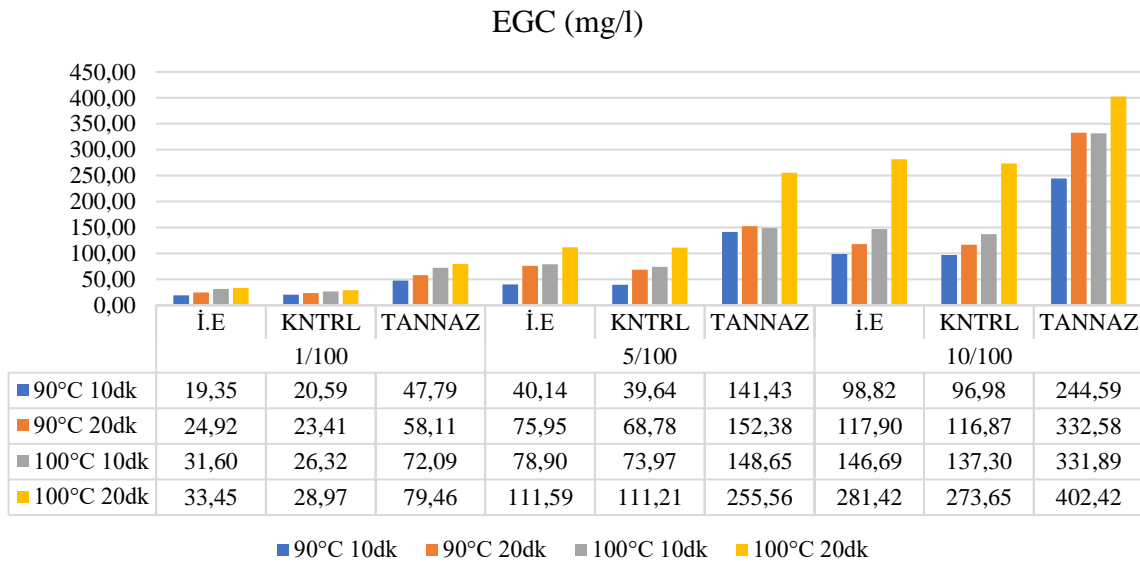
Klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ilk ekstraktlarda GA miktarı 34.61-472.29 mg/l aralığında değişirken, enzim uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) örneklerde sırasıyla 84.61-882.53 mg/l ve 33.18-468.82 mg/l olarak belirlenmiştir (Şekil 5).



**Şekil 5.** Siyah çay ekstraktlarının Gallik Asit (GA) miktarı (mg/l)

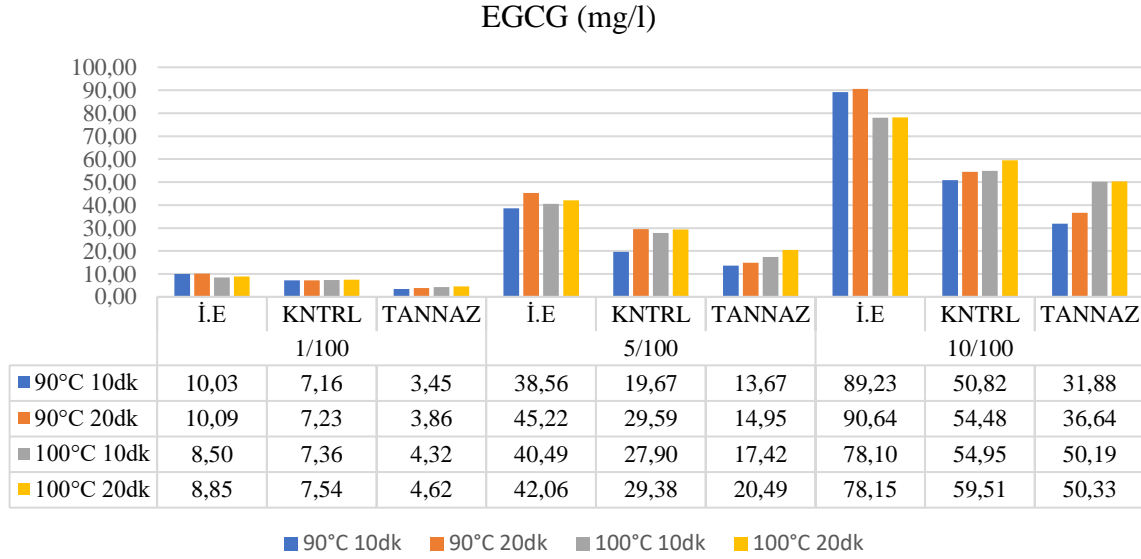
Bulgular incelendiğinde çay:su oranının, demleme sıcaklığı ve süresinin örneklerin GA değerleri üzerinde istatistiksel olarak da önemli ( $p<0.05$ ) bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Hem çay:su oranlarının değişmesi ile hem de demleme sıcaklık ve sürelerinin artışına bağlı olarak ekstraktların GA miktarlarında genellikle artışlar meydana geldiği, örneklerin GA miktarları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak da önemli ( $p<0.05$ ) olduğu görülmüştür. Tüm demleme sıcaklık ve sürelerinde çay ekstraktlarına tannaz enzimi 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 19.35-281.42 mg/l aralığında değişirken, enzim uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) örneklerde sırasıyla 47.79-402.42 mg/l ve 20.59-273.65 mg/l olarak belirlenmiştir (Şekil 6). Bulgular incelendiğinde, çay:su oranının ve demleme sıcaklığının örneklerin EGC değerleri üzerinde istatistiksel olarak da önemli ( $p<0.05$ ) bir etkiye sahip olduğu; çay:su oranı ve sıcaklık arttıkça EGC miktarında artış olduğu gözlemlenmiştir. Tüm demleme sıcaklık ve sürelerinde çay ekstraktlarına tannaz enzimi 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. Enzim uygulanan örneklerin EGC miktarlarındaki artışa EGCG kondense kateşininin, tannaz enzimi ile GA ve EGC ye hidroliz olmasının sebep olduğu düşünülmektedir.



**Şekil 6.** Siyah çay ekstraktlarının epigallokateşin (EGC) miktarı (mg/l)

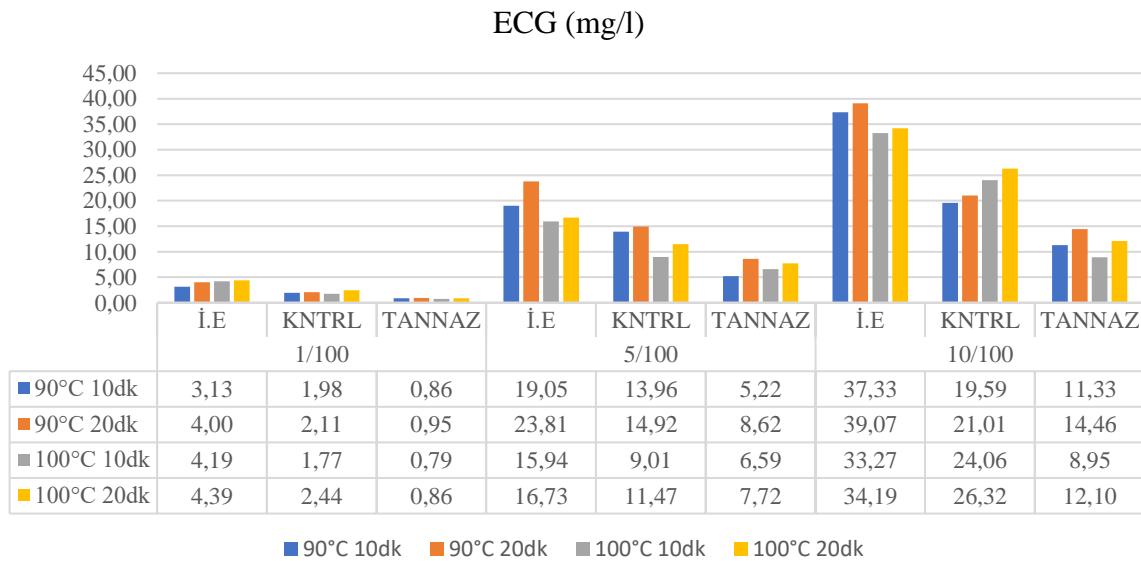
Klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ilk ekstraktlarda EGCG miktarı 8.50-90.64 mg/l aralığında değişirken, enzim uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) örneklerde sırasıyla 3.45-50.33 mg/l ve 7.16-59.51 mg/l olarak belirlenmiştir (Şekil 7).



**Şekil 7.** Siyah çay ekstraktlarının epigallokateşingallat (EGCG) miktarı (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 sıcaklık ve sürelerinin artışına 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, demleme sıcaklık ve sürelerinde çay ekstraktlarına tannaz enzimi 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.

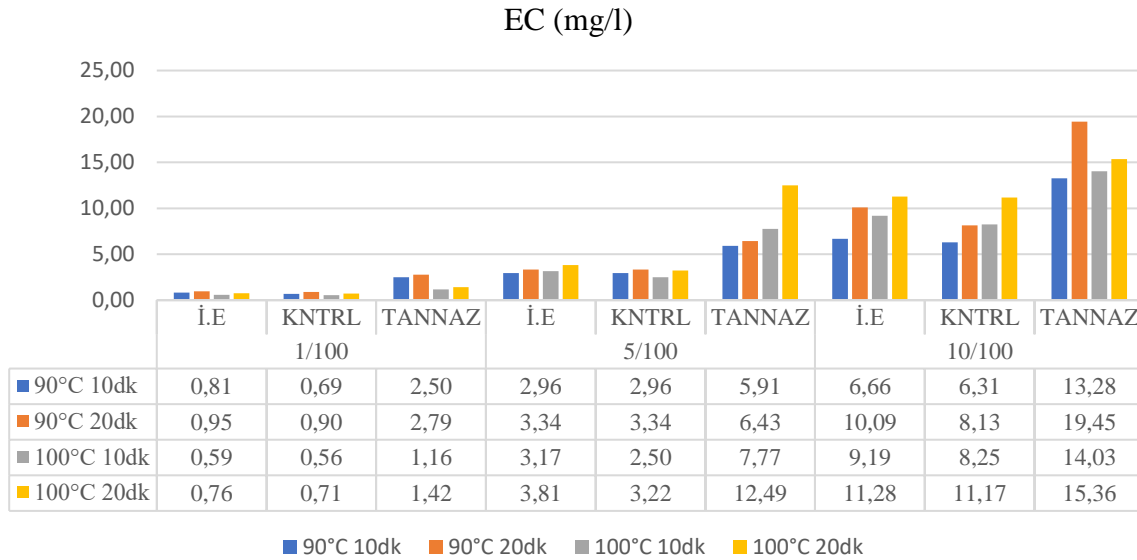
Klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ilk ekstraktlarda ECG miktarı 3.13-39.07 mg/l aralığında değişirken, enzim uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) örneklerde sırasıyla 0.79-14.46 mg/l ve 1.77-26.32 mg/l olarak belirlenmiştir (Şekil 8).



**Şekil 8.** Siyah çay ekstraktlarının ECG miktarı (mg/l)

Hem tüm çay:su konsatrasyonlarında hem de tüm demleme sıcaklık ve 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 konsatrasyonları, demleme sıcaklık ve 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.

Klasik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ilk ekstraktlarda EC miktarı 0.59-11.28 mg/l aralığında değişirken, enzim uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) örneklerde sırasıyla 1.16-19.45 mg/l ve 0.56-11.17 mg/l olarak belirlenmiştir (Şekil 9). Hem çay:su oranlarının değişmesi ile hem de demleme sıcaklık ve 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 sıcaklık ve sürelerinde çay ekstraktlarına tannaz enzimi 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 enzimi ile GA ve EC ye hidroliz olmasının sebep olabileceği düşünülmektedir.



**Şekil 9.** Siyah çay ekstraktlarının epikateşin (EC) miktarı (mg/l)

Raghuwanshi ve ark. [29], *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. orthodoks yöntemi ile üretilen çay ekstraktı kontrol grubunda kafein miktarı 16.60 mg/g çay, enzim ilave edilmiş örneklerde 1.40 mg/g çay, kontrol grubunda ve enzim uygulanmış örneklerde GA

miktarı 11.60 mg/g çay ve 119.4 mg/g çay, kontrol grubunda ve enzim uygulanmış örneklerde EGC miktarı sırasıyla 12.30 mg/g çay ve 26.00 mg/g çay, kontrol grubunda ve enzim uygulanmış örneklerde EGCG miktarını 16.90 mg/g çay ve 2.02 mg/g çay, kontrol grubunda ve enzim uygulanmış örneklerde ise ECG miktarını 13.6 mg/g çay ve 2.72 mg/g çay, kontrol grubunda ve enzim uygulanmış örneklerde EC miktarını 5.23 mg/g çay ve 16.11 mg/g çay olarak belirtmişlerdir.

Carlioni ve ark. [35], 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 [32], 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, EGC 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, EGC 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 bulunduğunu belirtmiştir.

Chandini ve ark. [25], 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. [12], 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.

Erge ve Atalay [36], beyaz, yeşil ve siyah çayda kafein içeriğinin ve bazı fenolik bileşiklerin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada 100°C de su ile yapılan ekstraksiyon işlemi sonucu siyah çayda kafein miktarını 22.3 mg/g, gallik asit içeriğini 2.4-2.6 mg/g olarak belirtmişlerdir.

Carlioni ve ark. [35], 0.5:20 çay:su oranı ile 90°C de 7 dakika demleme sonucunda CTC siyah çayda GA içeriğini 0.045±0.004 mg/ml; orthodoks yöntemi ile işlenen siyah çayda 0.081±0.006 mg/ml olarak belirlediklerini belirtmişlerdir.

Lantano ve ark. [37], Orange Pokoe Flowery siyah çay kullanarak 12 g/L çay:su oranında 90°C de 3 dk.'lık demleme ile elde ettikleri ekstratın GA miktarını 3.62±0.15 mg/g çay, EGCG miktarını 0.43±0.01 mg/g çay olarak belirtmişlerdir.

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 Çay-kur işletmesine ait Güneysu-Ulucami çay fabrikası müdürlüğünden temin edilen siyah çay örneklerine klasik ekstraksiyon yöntemi ile, farklı demleme sıcaklık (90 ve 100°C) ve süreleri (10 ve 20 dakika), çay:su oranları (1:100; 5:100; 10:100) kullanılarak elde edilen ekstraktlara tannaz enzimi uygulanmıştır. Çalışmada elde edilen ekstraktlarda bulanıklık değerleri ile toplam fenolik madde, çay kreması, kafein ve kateşinlerin miktarları belirlenmiştir.

Çalışmada elde edilen bulguların bir arada değerlendirilmesiyle soğuk çay üretiminde en önemli problemlerden birisi olan krema oluşumunun azaltılmasında tannaz enzimi uygulamasının önemli katkılar sağladığı belirlenmiştir. Bununla birlikte tannaz enzimi uygulamasıyla krema oluşumunda azalmalar sağlanarak çay ekstraktlarının fonksiyonel bileşenleri olan kateşinler başta olmak üzere fenolik maddelerin çay ekstraktında kalması sayesinde fonksiyonel özellikleri daha yüksek ürünler üretilebileceği görülmektedir. Ayrıca, çalışmada elde edilen bulguların, bundan sonra konuya ilişkin olarak yapılacak daha kapsamlı çalışmalara başlangıç noktası oluşturacak ve ilgili endüstri kuruluşlarına yol gösterici nitelikte olduğu düşünülmektedir.

#### 5. Teşekkür

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

#### 6. Kaynaklar

- [1] Miao S, Wei Y, Chen J, Wei X (2022). Extraction methods, physiological activities and high value applications of tea residue and its active components: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-19. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2099343>
- [2] Zhang H, Qi R, Mine Y (2019). The impact of oolong and black tea polyphenols on human health. *Food Bioscience*, 29, 55-61. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.03.009>
- [3] Lu M, Chu S, Yan L, Chen C (2009). Effect of tannase treatment on protein-tannin aggregation and sensory attributes of green tea infusion. *Lwt - Food Science And Technology*, 42(1), 338–342. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.05.015>
- [4] Abudureheman B, Yu X, Fang D, Zhang H (2022). Enzymatic Oxidation of Tea Catechins and Its Mechanism. *Molecules*, 27, 942. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27030942>
- [5] Labbé D, Tremblay A, Bazinet L (2006). Effect of brewing temperature and duration on green tea catechin solubilization: basis for production of EGC and EGCG-enriched fractions. *Separation And Purification Technology*, 49(1),1–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.07.038>

- [6] Yang D, Hwangb L S, Linc J (2007). Effects of different steeping methods and storage on caffeine, catechins and gallic acid in bag tea infusions. *Journal Of Chromatography A*, 1156, 312–320. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.088>
- [7] Altan A (2010). Özel Gıdalar Teknolojisi. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No:78, 251s, Adana.
- [8] Someswararao C, Srivastav PP (2012). A novel technology for production of instant tea powder from the existing black tea manufacturing process. *Innovative Food Science And Emerging Technologies*, 16,143–147. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.05.005>
- [9] Chao YC, Chiang BH (1999a). Cream formation in a semifermented tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,79, 1767–1774. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199910\)79:13<1767::AID-JSFA433>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199910)79:13<1767::AID-JSFA433>3.0.CO;2-8)
- [10] Jobstl E, Fairclough JPA, Davies AP, Williamson MP (2005). Creaming in black tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7997-8002. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0506479>
- [11] Chao YC, Chiang BH (1999b). The roles of catechins and caffeine in cream formation in a semi-fermented tea. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 79(12), 1687–1690. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199909\)79:12<1687::AID-JSFA422>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199909)79:12<1687::AID-JSFA422>3.0.CO;2-L)
- [12] 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.078>
- [13] Xu Y Q, Chen S Q, Yuan H B, Tang P, Yin J F (2012). Analysis of cream formation in green tea concentrates with different solid concentrations. *Journal Of Food Science And Technology*, 49(3), 362-367. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0281-8>
- [14] Lekha P K, Lonsane B K (1997). Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Advances İn Applied Microbiology*, 44, 216-260.
- [15] Belmares R, Contreras-Esquivel J C, Rodríguez-Herrera R, Coronel A R, Aguilar, C N (2004). Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. *LWT-Food Science and Technology*, 37(8), 857-864. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.04.002>
- [16] Battestin V, Macedo GA, De Freitas VAP (2008). Hydrolysis of epigallocatechin gallate using a tannase from *Paecilomyces Variotii*. *Food Chemistry*, 108(1), 228–233. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.068>
- [17] Natarajan K (2009). Tannase : a tool for instantaneous tea. *Current Biotica*, 3(1), 96–103.
- [18] Sariözlü 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.
- [19] Ni H, Chen F, Jiang Z D, Cai M Y, Yang Y F, Xiao A F, Cai H N (2015). Biotransformation of tea catechins using *Aspergillus Niger* Tannase prepared by solid state fermentation on tea by product. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 1206-1213. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.010>
- [20] Cemeroglu, B., 2010. Gıda Analizleri Genişletilmiş 2. Baskı. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, No:34, Bizim Grup Basımevi, Ankara.
- [21] Nagalakshmi S, Ramaswamy M S, Natarajan C P, Seshadri R (1984). The role of added carbohydrates in tea cream stabilization. *Food Chemistry*, 13(1),69–77.
- [22] 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>
- [23] 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. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00589.x>

- [24] Chandini S K, Rao L J, Subramanian R (2013). Membrane clarification of black tea extracts. *Food and Bioprocess Technology*, 6(8),1926–1943. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0847-0>
- [25] 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. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02576.x>
- [26] Boadi D K, Neufeld R J (2001). Encapsulation of tannase for the hydrolysis of tea tannins. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(7–8),590–595. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00295-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00295-2)
- [27] Polat A, Kalcıoğlu Z, Müezzinoğlu N (2022). Effect of infusion time on black tea quality, mineral content and sensory properties prepared using traditional Turkish infusion method. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 29, 100559. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2022.100559>
- [28] Liang Y, Xu Y (2003). Effect of extraction temperature on cream and extractability of black tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *International Journal Of Food Science And Technology*, 38(1), 37-45. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2003.00631.x>
- [29] 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. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2012.00721.x>
- [30] Balcı Torun F, Özdemir K S, Mavuş R, Torun M (2021). Siyah çay üretim atıklarından konsantre çay ekstraktı üretiminde krema oluşum koşullarının ve bileşiminin belirlenmesi. *Gıda*, 46 (2) , 339-350. DOI: <https://doi.org/10.15237/gida.GD20145>
- [31] Rusaczonok 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.
- [32] 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.
- [33] Wingard M R, Phillips R C (1951). Solvent extraction IV. The effect of temperature on extraction rate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 28(4), 149-152. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF0261206>
- [34] 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. DOI: <https://doi.org/10.1002/jssc.201000863>
- [35] Carloni P, Tiano L, Padella L, Bacchetti T, Customo 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.057>
- [36] Erge H S, Atalay D (2016). Beyaz, yeşil ve siyah çayda kafein içeriğinin ve bazı fenolik bileşiklerin belirlenmesi. Türkiye 12. Gıda Kongresi, 05-07 Ekim 2016, Trakya Üniversitesi, Edirne.
- [37] Lantano C, Rinaldi M, Cavazza A, Barbanti D, Corradini C (2015). Effects of alternative steeping methods on composition, antioxidant property and colour of green, black and oolong tea infusions. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 8276-8283. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1971-4>