

Çay Germplazmlarından Üstün kaliteli Klonları Tanımlamak İçin Güvenilir Bir Teknik

S. Joseph Lopez , Jibu Thomas, P.K. Pius, R. Raj Kumar, N. Muraleedharan
UPASI Çay Araştırma Kurumu, Çay Araştırma Enstitüsü,
Nirar Dam B.P.O., Valparai 642 127, Coimbatore Bölgesi, TN, Hindistan. Food Chemistry 91
(2005) 771-778

Özet

Güney Hindistan'ın önde gelen çay germplazmlarının enzim aktiviteleri ve substrat düzeylerindeki varyasyonlar incelenmiştir. Polifenollerin, kateşinlerin (substrat) ve polifenol oksidazın (PPO) içeriğinde görülen değişimler, mamul siyah çay kalitesini etkiler. PPO enzimi çay sürgünlerinde bulunur ve oksijenin mevcudiyetinde theaflavin formlarına kadar kateşinler arasındaki reaksiyonları katalizler. Başlıca kateşinler ; epikateşin (EC), epigallo kateşin gallat (EGCG), epikateşin gallat (ECG) ve epigallo kateşin (EGC) oksidasyon işlemi süresince theaflavinler (TF), thearubiginler (TR) ve yüksek polimerize maddeler (HPS) gibi kalite bileşeni formlarına kadar PPO ile reaksiyonlar oluştururlar. Siyah çayda ki theaflavinler ile basit theaflavin, theaflavin monogallat (TFMG), theaflavin digallat (TFDG) gibi fraksiyonları ve deme renk veren TR ve yüksek polimerize maddeler gibi dem karakteristiklerinden sorumlu olan gerekli kalite bileşenleridir. Kıvrılmış yaprakların oksidasyonu, çay imalatının farklı aşamaları süresince devam ederken PPO aktivitesinde, polifenol ve kateşin içeriklerinde bir azalma gözlemlenmiştir. Veriler, oksidasyon reaksiyonunun, oksidasyonun başlangıç aşamaları süresince daha hızlı olduğunu ortaya koymuştur. Bu periyot süresince, oksijen tüketimi en yüksekti ve ardından azalmıştır. Çay klonlarının kalite potansiyelini karakterize etmek için (PPO) enzim ve onun substratı (kateşinler) arasındaki oran kullanılmıştır. Enzim substrat oranına dayalı olarak klon kalite ortalaması ve orta, yüksek gibi öne çıkan çay klonlarını kategorize etmek için bir deneme yapılmıştır. Kateşin formları ve PPO arasındaki oranın göstergesi olan farklı çay klonlarının theaflavin (oksidasyon ürünü) içeriği siyah çay kalitesini belirleyen önemli bir kriterdir. Sonuçlar, orta kaliteli (SA-6) ve yüksek kaliteli (CR-6017) olarak bilinen standart klonlar ile karşılaştırılarak elde edildi. Çalışmada ortaya konulan enzim substrat oranı, mevcut çay germplazmlarından üstün kaliteli klonları tanımlamak için kullanılabilir.

Takdim

Çay polifenolleri, kateşinleri ve polifenol oksidaz'ı (PPO) gibi biyokimyasal bileşenler doğası gereği siyah çayın kalitesiyle ilişkilidir. Son yıllarda, biyokimyasal bileşenler ve oksidasyon (fermantasyon) süresince meydana gelen değişimler üzerindeki bilgide belirgin bir biçimde artış olmuştur. Biyokimyasal analizler genel olarak kendine özgü aroması ile siyah çay üretmek için toplanan ve işlenen genç ürün sürgünleri düzeyi ile sınırlandırılmıştı (Millin & Rustridge).

Kesme, yırtma ve bükme (CTC) tipi siyah çay imalatı; soldurma, CTC, oksidasyon ve kurutmayı kapsar. Soldurma süresince nem içeriğinde bir azalma ve substrat ile birlikte enzim düzeylerinde hafif bir çoğalma dikkat çeker. Mamul çayın tüm kalitesi ve tadı, yaprakların soldurulması süresince meydana gelen biyokimyasal bileşenlerdeki değişimlere ve nem içeriğine bağlıdır. Soldurmadan sonra yapraklar, onları parçalara ayıran "rotornave" içerisin den geçirilir. Parçalanmış yapraklar sonra, birbirine ters yönde dönen paslanmaz çelikte yüzeyleri pürüzlü tamburlar (CTC) arasında 4 kez işlenir. Oksidasyon süresince, siyah çayın karakteristik tadı ve kalite bileşenlerinin oluşumuna yol açan önemli biyokimyasal değişimler meydana gelir. Bu, kıvrılan (parçalanmış) yaprakların (dhool) son biyokimyasal bileşenlerinin; zaman, oksijen düzeyi, nem ve sıcaklık gibi faktörler yoluyla etkilendiği kritik bir aşamadır. Yaprakların optimal oksidasyonundan sonra 10-20 dakika süreyle 120 °C'de kuruması sağlanır. Bu aşamada, enzim aktivitesi durdurulur ve nemin bir alt limite kadar kaldırılmasıyla sonuçlanır.

Oksidasyon süresince, oksijenin mevcudiyetinde başlıca kateşinler ve onların epikateşin (EC), epigallo kateşin gallat (EGCG), epikateşin gallat (ECG) ve epigallo kateşin (EGC) gibi fraksiyonları olan fenolik bileşikler ile PPO etkileşimleri, o-quinon'ların iki molekülü arasındaki kondensasyon reaksiyonlarının bir ürünü olan altın sarısı theaflavinlerin (theaflavin, theaflavin-3 gallat , theaflavin-3'galat ve theaflavin-3-3' gallat) gelişimiyle sonuçlanır (Owuor & obanda 1998; Madanhire, Whittle & Khumalo,1996). Potansiyel

taze çay yapraklarından kalite bileşenlerinin oluşumunu da içine alan mevcut substratların, ürünlere kadar tamamen dönüşümleri için enzimler gereklidir. PPO, daha sonra kalite bileşenlerine dönüşen o-quinon'lara kadar kateşinlerin oksidasyon başlangıcında rol oynayan epidermal hücrelerdeki kloroplast ile birlikte bulunur (Wickramasinge, Roberts & Perera,1967). Polifenoller ve kateşinler çoğunlukla yaprakların palizat hücreleri ve vakuollerinde yerleşiktir ler (Mahanta, 1988). Soldurma süresince, yaprakların nem içeriği yaklaşık %60'a kadar düşer. CTC ve oksidasyon süresince çay yapraklarının bozulmamış hücrelerinde yırtılma meydana gelir ve substratlar (polifenoller ve kateşinler) mevcut enzim ile temas kurar. Bu, siyah çayın kalite bileşenlerinin oluşumuyla sonuçlanır (Selvendran& King, 1976). Siyah çay kalitesini biyokimyasal bileşenler etkilediğinden dolayı, siyah çay üretiminden önce çay yapraklarının biyobileşenlerini kullanarak üstün kaliteli klonları tanımlamak için bu çalışmayı yaptık. **Enzim (PPO) / substrat (kateşin) oranının, kalite potansiyelini belirlemede zorunlu bir görev üstlendiğini rapor ettik.** Kalite potansiyellerine göre çay klonlarını kategorize etmek için kullandığımız bu yöntemin yanı sıra, **CR-6017 (üstün kaliteli)** ve **SA-6 (orta kaliteli)** gibi iyi tanınan seçme standart çayları da karşılaştırma için kullandık. Üstün kalite karakterleri için çok sayıdaki fidan germplazmının hızlı ve sürekli bir şekilde elenmesi/ayrılması için çay ıslah çalışmalarını kısaltacak tekniğinde geliştirilmiş olduğu kanısındayız.

2. Materyal ve Metot

2.1 Materyal

Biyokimyasal tespitler ve enzim analizi için iki yaprak ve bir tomurcuk kullanılmıştır. Örnekler, geniş bir genetik arka plana sahip olan MSL yukarısında 1050 m'de yerleşik UPASI TRF deneme çiftliğinden bu araştırma için toplandı.

2.2 Biyokimyasal tespitler

Taze çay yaprağı içerisindeki toplam polifenol ve kateşin belirlenmiştir. Toplam polifenol ve kateşinlerin belirlenmesi için çay sürgünlerinin etanol ekstraktları kullanılmıştır. Toplam polifenol, sodyum karbonat içeren Folin penol ciocalteu ayracı kullanılarak belirlenmiştir. Mavi renk gelişim absorbansı 700 nm'de ölçümlenmiştir (Dev Chouldhury & Goswami,1985). Toplam kateşin, 500 nm'de ki absorbans ölçümlenerek asitlendirilmiş vanilin ayracı kullanılarak belirlenmiştir. Standart olarak, (+)kateşin kullanılmıştır (Swan & Hillis,1959). Toplam polifenol ve kateşinler, kuru madde esaslı üzerinden % olarak ifade edilmiştir. Taze çay yapraklarındaki kateşin fraksiyonları, ters faz HPLC sistemi yoluyla analiz edilmiştir. Analizler için Luna 5µM Phenyl Hexyl kolon kullanılmıştır. Referans standartlar olarakta, Sigma-Aldrich, USA'dan temin edilen özgün ve sertifikalı flavanoller kullanılmıştır.

2.3 Polifenol oksidaz'ın ölçülmesi

PPO, Clark tip bir oksijen elektrotu (Model 290A;ORION Inc.,USA) kullanılarak, pyrocatechol'un oksidasyonuna karşı çekilen oksijenin ölçülmesine dayalı olarak tespit edilmiştir. Farklı bir yöntem belirtilmedikçe Molla (1992)'nin metodu modifiye edilerek 10 mL'lik bir son hacim içerisinde elektrot odası; pH 6.8'lik 4.5 mL 100 mM sodyum sülfat tamponu ve 5 mL 100 mM pyrocatechol içerir. Sistem dengeye getirildikten sonra kapaklı kap içerisine küçük bir delikten geçirilmek suretiyle 500 µL aliquat enjekte edilir.

2.4 Siyah çayın üretimi

Çay sürgünleri (iki yaprak ve bir tomurcuk) hasat edilir edilmez UPASI TRF'de ki minyatür çay fabrikasına getirilmiş, ağ tepsiler üzerine yayılmış ve taze ağırlıklarında %25-30'luk bir azalma meydana gelene kadar 16 saat süreyle ortam havası geçirilerek soldurulmuş tur. Soldurulan sürgünler, 4 kez bir CTC makinesinden geçirilmiştir. Parçalanmış yapraklar, tepsiler içerisine serilip 20 °C'de optimum oksidasyon süresi kadar ortam sıcaklığındaki bir kabin içerisine yerleştirilmiştir. Okside olmuş dhool, 20 dakika süreyle 107 °C'de ki akışkan yataklı bir mini kurutucuda kurutulup, analiz zamanına kadar polythene paketler içinde ambalajlanarak depolanmıştır.

2.5 Yüksek performanslı likit kromatografi analizleri

Kateşin fraksiyonları için, kurutulmuş 2 gr taze çay yaprağı 10 dakika süreyle 70 °C'de %70'lik 10 mL metanol ile ekstrakte edildi. Ekstrakt 10 dakika süreyle 6000 rpm'de santrifüjlendi ve %70'lik 10 mL metanol'ün üzerinde oluşan süpernatant (düşük yoğunluklu sıvı tabaka) kaldırıldıktan sonra ekstrakt, 0.2 µ gözenekli bir filtreden geçirilerek filtre dildikten sonra HPLC'ye (HP 1100 serisi) enjekte edildi. Kromatografik koşullar aşağıdaki gibidir (ISO/CD , 14052 – 2):

Enjeksiyon hacmi : 10 µL

Kolon : Phenomenex LUNA 5 µ Phenyl-Hexyl 250x4.60 mm

Kolon sıcaklığı : 35 oC

Mobil fazlar: Solvent A: Asetonitril / Asetik asit / Deiyonize su (18:4:178 , v:v)

Solvent B: Asetonitril / Deiyonize su (160:40 , v:v)

Akış hızı : 1 mL/dakika

Theaflavin fraksiyonları içinde, 2 gr siyah çay 15 dakika süreyle 100 mL deiyonize su ile ekstrakte edilmiş, ekstrakt 10 dakika süreyle 6000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Ekstrakt, 0.2 µ membran filtreden geçirildikten sonra HPLC'ye (HP 1100 serisi) enjekte edilmiştir. Kromatografik koşullar aşağıdaki gibidir (Bailey, Mc Dawell & Nursten,1990):

Enjeksiyon hacmi : 20 µL

Kolon : HP Hypersil ODS 5µm 2.1x200 mm

Kolon sıcaklığı : Oda sıcaklığı

Mobil fazlar: Solvent A: %100 Asetonitril

Solvent B: Asetonitril / Asetik asit (196:4 , v:v)

Akış hızı : 1,2 mL/dakika

3. Sonuçlar ve Tartışma

3.1 Klon biyobileşenlerinde ki farklılıklar

Taze çay yaprakları, başlıca kateşinlerle polifenollerini yüksek düzeyde içerirler. Önceden yapılmış bazı çalışmalarda kateşin düzeyinin siyah çay kalitesi ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, bireysel kateşin miktarlarını ölçümlemek de gereklidir ki onlar oluşan theaflavin miktarı ile ilişkilidir. **Taze yaprak toplama standardı (2/3 yaprak ve bir tomurcuk) ve toplama aralığı üretilen çayın biyokimyasal bileşimini etkileyen bir diğer ölçüttür.** Önde gelen çay klonlarındaki substrat (polifenoller ve kateşinler) ve enzim düzeylerinde ki farklılıklar Tablo 1'de listelenmiştir. Klonların çoğunda substrat düzeyleri hemen hemen benzerdir. UPASI-12 en yüksek polifenol içeriğine sahipken (%30.31) , UPASI-20 en düşük olanıdır (%25.54). Diğer taraftan, kateşin içeriği UPASI-10'da en yüksekken (%21.35), UPASI-5'de en düşüktü (%17.31). Kateşinler ve fraksiyonları PPO'nun mevcudiyetinde oksidasyon süresince enzimatik oksidasyona katılırlar ve böylece theaflavinler gibi siyah çayın kalite bileşenlerinin üretilmesine neden olurlar. **En yüksek ECGC miktarı (242.36 ppm) UPASI-17'de kayıtlıdır ki bu, TF'ye katkı sağlayan en önemli fraksiyondur.**

Tablo 1: Klonların enzim ve substrat düzeyleri

Clone	Polyphenol (%)	Catechin (%)	PPO activity ^a
<i>UPASI released clones</i>			
UPASI-1	28.97	19.97	14.07
UPASI-2	27.81	18.94	14.37
UPASI-3	30.13	21.02	20.56
UPASI-4	26.65	20.65	17.13
UPASI-5	29.01	17.31	13.01
UPASI-6	28.09	20.29	13.93
UPASI-7	28.53	18.05	15.43
UPASI-8	25.84	18.13	14.22
UPASI-9	30.21	20.40	19.25
UPASI-10	27.23	21.35	18.62
UPASI-11	27.27	20.46	16.05
UPASI-12	30.31	19.20	17.95
UPASI-13	25.72	18.16	13.90
UPASI-14	29.04	19.68	17.92
UPASI-15	29.37	20.35	19.07
UPASI-16	25.83	18.38	14.74
UPASI-17	29.01	19.88	18.97
UPASI-18	26.73	20.73	13.81
UPASI-19	26.96	17.39	13.42
UPASI-20	25.54	19.83	17.12
UPASI-21	26.91	18.97	13.36
UPASI-22	29.59	20.79	20.25
UPASI-24	26.08	21.18	14.91
UPASI-25	26.41	19.77	14.79
UPASI-26	27.15	20.34	15.39
UPASI-27	28.65	19.16	14.82
<i>Estate selections</i>			
CR 6017	28.24	20.48	19.29
SA-6	26.97	19.81	10.13
SE	1.18	0.46	1.36
C.D. at $P = 0.05$:	3.28	1.28	3.78

^a: μmol oksijen/dakika/taze ağırlık gr

ECG, UPASI-14'de yüksekken, EGC ise UPASI-7'de daha yüksekti (Tablo 2). Belirli iklimik faktörlerin çay sürgünlerindeki kateşinlerin biyosentezini etkilediği ayrıca tespit edilmiştir. Sürgün bileşenleri arasındaki farklılıkları inceleyen **Thanaraj ve Seshadri (1990)**, **normal yaprakların kaba yapraklar ve internot'lardan daha yüksek substrat içerdiğini ve en yüksek polifenol ve kateşin içeriğinin tomurcukta olduğunu rapor etmiştir**. Theaflavinlerin her oluşumunda, EGC'den EC, ECG ve EGCG'e kadar başlıca kateşin fraksiyonlarının kombinasyonları sorumludur.

Tablo 2: Farklı çay varyetelerindeki kateşin fraksiyonları

Clone	S. Cat. ^b	Catechin fractions ^a			
		EGC ^b	EC ^b	EGCG ^b	ECG ^b
UPASI-1	45.78	33.23	135.4	204.15	21.36
UPASI-2	35.49	95.28	99.10	201.69	21.94
UPASI-3	26.04	88.18	71.95	212.99	14.76
UPASI-4	31.25	75.62	59.02	156.37	14.65
UPASI-5	114.35	49.35	49.37	146.82	18.16
UPASI-6	78.03	97.02	80.33	152.01	14.94
UPASI-7	29.4	148.56	100.97	211.36	22.06
UPASI-8	27.32	76.82	74.74	157.12	14.87
UPASI-9	77.7	121.69	32.03	100.17	11.00
UPASI-10	145.29	84.67	40.98	189.33	14.25
UPASI-11	64.37	110.36	38.21	114.39	21.39
UPASI-12	161.27	85.05	60.53	111.06	13.89
UPASI-13	38.9	86.35	56.21	128.73	15.99
UPASI-14	207.72	123.6	73.57	181.58	24.49
UPASI-15	230.59	69.8	65.10	197.46	13.37
UPASI-16	61.35	76.19	72.32	122.8	23.64
UPASI-17	194.18	114.84	70.80	242.36	17.49
UPASI-18	112.05	120.88	42.39	128.31	21.36
UPASI-19	49.58	86.22	66.74	138.58	17.58
UPASI-20	83.26	68.46	73.64	145.69	16.34
UPASI-21	128.49	59.07	58.9	173.67	21.06
UPASI-22	198.26	116.35	86.64	205.64	19.46
UPASI-24	32.99	59.87	73.69	109.57	13.59
UPASI-25	86.24	76.21	49.28	113.67	17.85
UPASI-26	97.83	46.29	47.61	154.39	20.85
UPASI-27	135.08	94.51	56.38	156.27	15.28
CR 6017	215.35	80.68	94.36	225.64	16.14
SA-6	52.89	97.43	77.23	126.35	13.27

EGC, epigallo catechin; EC, epicatechin; EGCG, epigallo catechin gallate.

^a S. Cat., simple catechin; ECG, epicatechin gallate.

^b Unit: ppm.

3.2 Oksidasyon süresince yeşil çay yapraklarının polifenol oksidaz aktivitesi

PPO, çay oksidasyonunda işlevsel en önemli enzimdir, çay oksidasyonu süresince ilk kritik reaksiyonu katalizler. Orthodifenol'ler, quinone formuna kadar okside olur ve ardından kendiliğinden daha kompleks oksidasyon ürünlerine dönüşürler. En yüksek PPO aktivitesi UPASI-3'de tespit edilmişken (20.6 µmol oksijen tüketimi/dakika/taze ağırlık gr), en düşük aktivitede UPASI-5'de kayıt dirmiştir (13.0 µmol oksijen tüketimi/dakika/taze ağırlık gr) (Tablo 1). **PPO, ürün sürgünlerinde ters bir eğilim gösterir; yapraklarla karşılaştırıldığında internot'lar daha yüksek PPO aktivitesi gösterir.** Soldurma süresince PPO aktivitesinde gözlemlenen değişimler genelde sıcaklık ve zaman sürecine bağlıdır (Sanders,1972).

3.3 Çay işleme süresince substrat düzeyindeki değişim

Oksidasyon süresince kateşin ve polifenol içeriğinde tedricen bir azalma gözlemlenmiştir (Şekil 1). Çay oksidasyonu süresince, türeyen ürünlerin (theaflavin) gelişimi için tüketilen oksijen miktarı ayrıca kritik bir rol oynar. Siyah çayda ki theaflavin ve fraksiyonları (Tablo 3'de); tat, sertlik, canlılık, burukluk ve renk gibi dem karakteristiklerinden sorumlu olan temel kalite bileşenleridir (Wickramasinge et al.,1967). Burada ayrıca, TF fraksiyonları nın siyah çaya etkilerinden türetilmiş (DGETF) theaflavin eşdeğeri digallat'lar da rapor edilmiştir (Sarma,1999).

Tablo:3 Farklı çay klonlarındaki TF fraksiyonlarının oransal dağılımı

Clone	STF	TF 3 gallate	TF3' gallate	TF3-3' gallate	DGETF ^a
UPASI-1	3.26	56.38	2.97	37.39	0.47
UPASI-2	2.61	54.97	3.52	38.90	0.58
UPASI-3	3.01	52.96	2.75	41.28	0.87
UPASI-4	2.86	59.34	3.64	34.16	0.64
UPASI-5	2.68	53.69	3.42	40.21	0.48
UPASI-6	3.05	62.14	3.56	31.25	0.68
UPASI-7	3.12	53.14	2.89	40.85	0.59
UPASI-8	3.28	51.97	3.65	41.10	0.58
UPASI-9	2.68	59.54	2.48	35.30	0.75
UPASI-10	3.56	61.58	3.64	31.22	0.71
UPASI-11	2.58	55.87	2.78	38.77	0.64
UPASI-12	3.64	58.64	3.91	33.81	0.74
UPASI-13	2.08	52.97	2.58	42.37	0.55
UPASI-14	2.15	60.58	2.46	34.81	0.69
UPASI-15	3.64	54.69	2.57	39.10	0.79
UPASI-16	2.05	56.31	3.26	38.38	0.59
UPASI-17	2.64	61.99	3.48	31.89	0.82
UPASI-18	3.47	52.36	2.58	41.59	0.70
UPASI-19	3.64	55.97	3.97	36.42	0.64
UPASI-20	3.29	51.78	2.64	42.29	0.59
UPASI-21	2.56	53.67	3.85	39.92	0.54
UPASI-22	3.24	51.68	2.49	42.59	0.80
UPASI-24	2.69	59.41	2.47	35.43	0.57
UPASI-25	3.57	61.64	3.62	31.17	0.67
UPASI-26	2.75	49.76	3.19	44.3	0.49
UPASI-27	3.19	52.38	3.28	41.15	0.53
CR 6017	2.91	51.62	2.86	42.61	0.76
SA-6	3.52	61.24	2.74	32.5	0.41

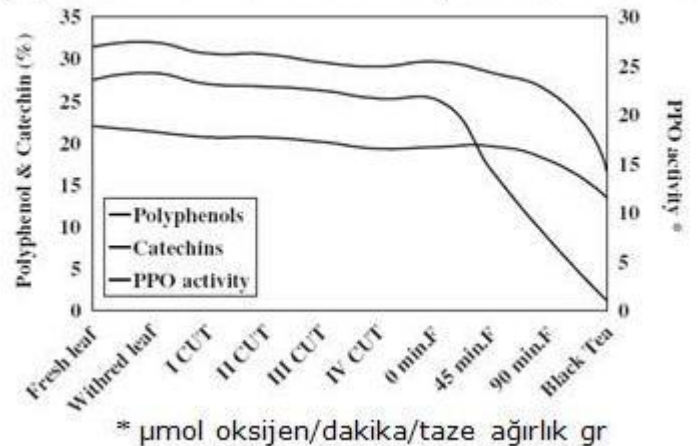
^a DGETF, digallate equivalent of theaflavin.

3.4 Çay imalatı süresince theaflavinlerin oluşumu

Veriler oksidasyonun başlangıç aşaması süresince, oksidasyon reaksiyonunun en hızlı olduğunu ortaya koymuştur. Katesinlerin enzimatik oksidasyonuna bağlı olarak kıyılmış (CTC işleme gören) çay yapraklarında hızlı bir oksijen çekişi gözlenir (Rzepecki & Waite, 1989). Maksimum oksijen çekiminin gerçekleştiği zaman, dhool parçalarının optimum oksidasyona uğradıkları zamandır.

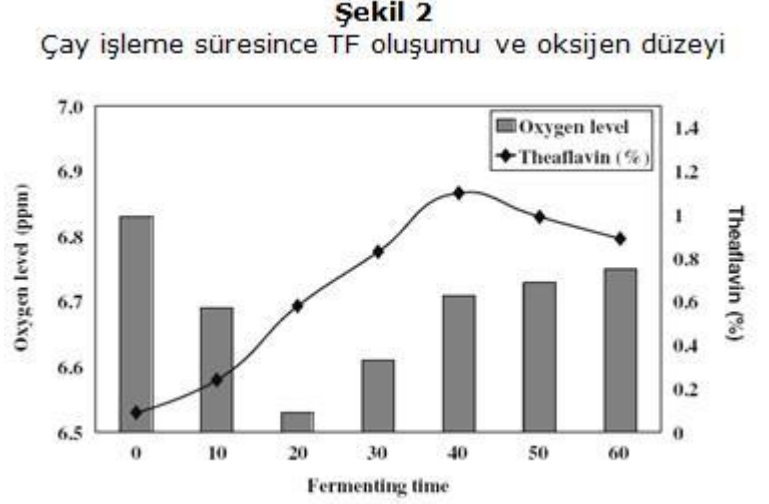
Uzun süren oksidasyon siyah çayın kalite kaybıyla sonuçlanmış olup optimum oksidasyon zamanında TF ve o-quinon'ların gözlemlenmiş ve oluşan dhool'e aşırı oksidasyon veya yetersiz oksidasyon uygulanmışsa kalitede bir azalma görülmüş tür (Mahanta & Hazarika,1985). PPO aktivitesi en iyi, oksidasyon süresince oluşan TF ile anlaşılır. PPO aktivite etkinliğine bağlı olarak internot'lar da ki TF'nin yapraklardan daha yüksek olduğu da tespit edilmiştir (Thanaraj & Seshadri,1990).

Şekil 1
Çay işleme süresince substart düzeyi ve enzim aktivitesi



Mamul çaydaki TF içeriğini arttırmak için maksimum TF oluşum periyodunu tespit etmek amacıyla oksidasyonu optimize edecek siyah çay üretim denemeleri yapmak gereklidir (Cloughley,1980). TF fraksiyonlarının oranı ve miktarı, oksidasyon zamanına bağlı olarak değişen oranlardır.

Her bir TF fraksiyonu, farklı oksidasyon zamanlarında maksimuma ulaşır. Uzun süren oksidasyon theaflavin monogallat (TFMG) ve theaflavin digallat (TFDG)'in oluşumunu artırırken kısa oksidasyon süresi theaflavin ve TFDG oluşumunu teşvik eder. Okside olan dhool'lerde ki PPO aktivitesi, substratların kullanılabilirliği, oksijenin miktarı, pH ve sıcaklık gibi faktörler tarafından etkilenir (Roberts,1962). PPO aktivitesinin ölçülmesiyle çay imalatının farklı aşamaların da enzim aktivitesinde tedrici bir azalma görülmüştür (Şekil 1). Theaflavin oluşumu, siyah çay üretimi süresince maksimum oksijen tüketimi ile örtüşmektedir (Şekil 2).



3.5 Enzim substrat oranı kullanılarak üstün kaliteli klonların seçimi

Büyük miktarlardaki çay germplazmından üstün kaliteli klonların ayıklanması zaman alıcı ve usandırıcı bir iştir. Her bir toplama periyodu boyunca her bir ocaktan alınacak sadece 100–200 gr taze yaprakla tek tek ocaklardan siyah çay üretmek oldukça güç bir siyah çay üretimi demektir. Veriler, yeşil yaprakların biyokimyasal bileşenlerinin siyah çayın kalitesini belirlediğini ortaya koyduğundan dolayı bu güçlüklerin üstesinden gelmek amacıyla ocakların kalite potansiyelini tespit etmek için güvenilir parametreler olarak yeşil yapraklardaki biyokimyasal bileşenlerin kullanımı geliştirilmiştir.

Kalite bileşenlerinin oluşumuna önemli katkı sağlayan faktörlerden olan kateşin PPO arasındaki oran, klonlar arasında karşılaştırıldığında; UPASI-3, UPASI-9, UPASI-12, UPASI-15 ve UPASI-22'de en yüksek olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4). Magoma, Wachira, Obanda, Lmbuga ve Agong (2000), çay bitkilerindeki kateşin içeriğinin kaliteli klonları tanımlamak için güvenilir bir parametre olarak kullanılabileceğini rapor etmiştir. Siyah çayın kalitesi, çay sürgünlerindeki; toplam polifenol içeriği, kateşinler ve enzim aktivitesine bağlıdır (Roberts & Wood,1950 ; Moyar & Harel,1991; Biswas, Biswas & Sarkar, 1971).

Tablo 4: Enzim substrat oranına göre klonların sınıflandırılması

High quality	<i>E/S</i> ratio ^a	Moderate quality	<i>E/S</i> ratio ^a	Average quality	<i>E/S</i> ratio ^a
UPASI-3	0.978	UPASI-7	0.855	UPASI-26	0.757
UPASI-22	0.974	UPASI-4	0.830	UPASI-5	0.752
UPASI-17	0.954	UPASI-16	0.802	UPASI-25	0.748
UPASI-9	0.944	UPASI-8	0.784	UPASI-1	0.705
UPASI-15	0.937	UPASI-11	0.784	UPASI-21	0.704
UPASI-12	0.935	UPASI-27	0.773	UPASI-24	0.704
UPASI-14	0.911	UPASI-19	0.772	UPASI-6	0.687
UPASI-10	0.872	UPASI-13	0.765	UPASI-18	0.666
UPASI-20	0.863	UPASI-2	0.759		

^a :enzim / substrat oranı (PPO/kateşinler)

Yüksek ve düşük kaliteli klonların dikkate alındığı bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, Thanaraj ve Seshadri (1990)'nin önceki bulguları ile uyum içerisindedir.

PPO ve kateşin arasındaki oranı gösterdiğinden dolayı farklı çay klonlarının theaflavin (kateşinlerden türeyen ve dem karakteristiklerini belirleyen) içeriği önemli bir kriterdir (Tablo 5) ki o, Ramakrishnan, Rajkumar, Marumithu ve Joseph Lopez (2002) tarafından daha önce rapor edildiği üzere polifenoller ve kateşinler arasındaki orandan daha fazla çay kalitesini belirler.

Klonları göz ününe seren, siyah çayın kalite analizlerinde en yüksek TF düzeyini gösterenlerde enzim substrat oranı en yüksek olarak kayıt edilmiştir (ki bundan sonra hibridizasyon metotları denenmiştir). Sonuçlar siyah çay kalitesi ile enzim substrat oranının direk bir ilişki içerisinde olduğunu göstermesi açısından yüksek kaliteli (CR-6017) ve orta kaliteli (SA-6) standart klonları ile karşılaştırılmıştır. Tüm klonlarda, TF içeriğindeki artış ile enzim substrat oranındaki artış arasında gözlenen bu güçlü ilişki ;

%1'lik istatistiksel olasılıkta, katsayı değeri (r: 0.95) önemli derecede yüksek bulunmuştur (Şekil 3). UPASI çay klonları enzim substrat oranları esas alınarak yüksek orta ve kalite ortalamasına göre kategorize edilmiş ve aynı prosedür, kalite derecesi önceden tahmin edilemeyen tanımlanmamış çay germplazmalarının (hibridizasyon sonrası) büyük miktarlar daki döllerini ayırt etmek için güvenilir bir parametre olarak kullanılabilir.

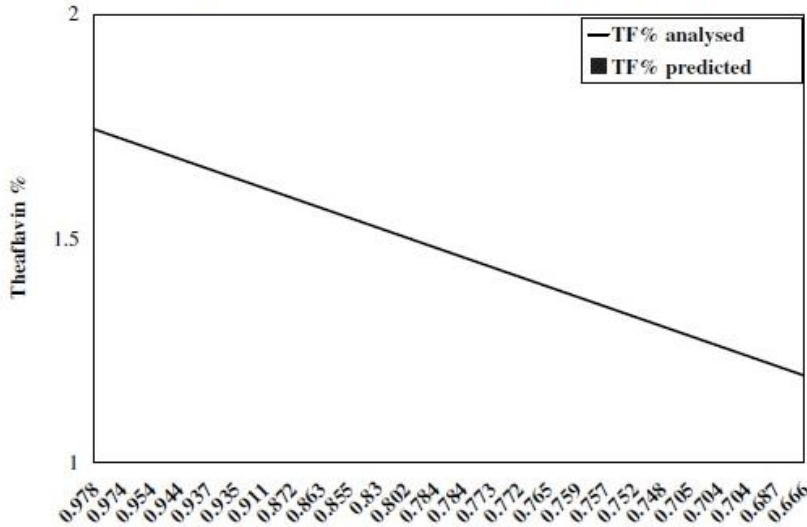
Tablo 5

Çay klonlarının theaflavin içeriklerinin analiz edilmiş ve önceden tahmin edilmiş içerikleri

Clones	TF% analysed	TF% predicted
UPASI-1	1.22	1.25
UPASI-2	1.36	1.36
UPASI-3	1.87	1.79
UPASI-4	1.43	1.50
UPASI-5	1.21	1.34
UPASI-6	1.25	1.22
UPASI-7	1.51	1.55
UPASI-8	1.44	1.41
UPASI-9	1.69	1.72
UPASI-10	1.55	1.58
UPASI-11	1.47	1.41
UPASI-12	1.65	1.70
UPASI-13	1.43	1.37
UPASI-14	1.59	1.65
UPASI-15	1.73	1.71
UPASI-16	1.49	1.44
UPASI-17	1.71	1.74
UPASI-18	1.26	1.18
UPASI-19	1.47	1.38
UPASI-20	1.52	1.56
UPASI-21	1.27	1.25
UPASI-22	1.67	1.78
UPASI-24	1.31	1.25
UPASI-25	1.29	1.34
UPASI-26	1.37	1.35
UPASI-27	1.44	1.39
CR 6017	1.69	1.72
SA 6	0.75	0.87

Şekil 3

Enzim substrat oranı ile analiz edilen ve tahmin edilmiş TF içeriği arasındaki ilişki



Enzyme substrate ratio

$$y=a+bx, a=-0.13, b=1.96, r=0.955$$

y: theaflavin içeriği

x: enzim substrat oranı

regresyon sabitler : a (-0.13) ve b (1.96) olmak üzere, y = a + bx regresyon denkleminde uygundur.

Teşekkür: Araştırmacılar ilk olarak bu çalışmaya sundukları istikrarlı destekleri için UPASI Çay Araştırma Kurumu Yöneticisine teşekkür ederler. Aynı şekilde, IX. 5 yıllık proje programı kapsamında sağlanan finansal destek içinde Hindistan Hükümeti Çay Kuruluna teşekkür ederiz.

Kaynak: S. Joseph Lopez , Jibu Thomas, P.K. Pius, R. Raj Kumar, N. Muraleedharan. 2005. [A reliable technique to identify superior quality clones from tea germplasm](#). Food Chemistry 91 (2005) 771–778UPASI Tea Research Foundation, Tea Research Institute, Nirar Dam B.P.O., Valparai 642 127, Coimbatore District, TN, India.

Tercüme: Kamil Engin İSLAMOĞLU, Ziraat Mühendisi, [E-Mail](#)