

2222

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

KİMYA PROGRAMI

TÜRK ÇAYLARINDAKİ POLİFENOLLERİN ANALİZİ

Kimyager Miraç OCAK

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

"Yüksek Lisans (Kimya)"

Unvanının Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 29.05.1992

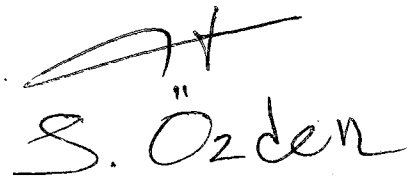
Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 17.06.1992


Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr. Oktay TORUL

Jüri Üyesi : Prof.Dr. Seçkin ÖZDEN

Jüri Üyesi : Yrd.Doç.Dr. Mehmet TÜFEKÇİ

Enstitü Müdürü : Doç.Dr. Temel SAVAŞKAN







MAYIS - 1992

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın konusunu belirleyen değerli hocam ve tez danışmanım Yrd.Doç.Dr. Oktay TORUL'a, çalışmalarım sırasında bana her türlü yardımda bulunan sevgili hocam, Fatih Eğitim Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Seçkin ÖZDEN'e, literatür konusunda bana her türlü imkânı sağlayan kıymetli hocam, Fatih Eğitim Fakültesi Dekan Yardımcısı Yard.Doç. Dr. Mehmet TÜFEKÇİ'ye, laboratuvar çalışmalarında ve spektrumların alınmasında yardımcı olan değerli arkadaşım, Fatih Eğitim Fakültesi Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü Arş.Gör. Mustafa Küçükislâmoğlu'na teşekkür ederim.

Ayrıca, bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu 89.11.002.5 kodlu projesi uyarınca desteklenmiştir. Bana bu desteği sağlayan Araştırma Fonu'nun değerli yetkililerine teşekkürlerimi sunarım.

MAYIS 1992

Miraç OCAK

ÖZET.....	V
SUMMARY.....	VI
BÖLÜM I. ÇAY BİTKİSİ VE YAPRAĞI.....	1
1.1. Çay Bitkisi.....	1
1.2. Çay Yaprığı.....	1
1.3. Çay Yaprığının Kimyasal ve Biyokimyasal Kapsamı.....	2
1.3.1. Enzimler.....	2
1.3.2. Polifenoller.....	4
1.3.3. Alkaloidler.....	8
1.3.4. Azotlu Bileşikler.....	10
1.3.5. Karbohidratlar.....	12
1.3.6. Klorofil ve Öteki Pigmentler.....	13
1.3.7. Vitaminler.....	13
1.3.8. Anorganik Maddeler.....	14
1.3.9. Uçucu Maddeler.....	14
1.4. Çay Yaprığının Kapsamına Etki Eden Etmenler.....	15
1.4.1. Bitkisel Etmenler.....	16
1.4.2. Çevresel Etmenler.....	16
1.4.3. Kültürel Etmenler.....	17
1.5. İşleme Öncesi Çay Yaprığına Yapılan Zarar.....	18
1.5.1. Hasatta ve Hasat Sonrası Yapılan Zarar.....	18
1.5.2. Taşımada Oluşan Zarar.....	19
1.5.3. Sıcaklığın Yükselmesi Sonucu Oluşan Zarar.....	19

BÖLÜM II. ÇAYIN BİYOKİMYASI VE İŞLENMESİ.....	20
2.1. Siyah Çay.....	21
2.1.1. Soldurma.....	21
2.1.2. Kıvrırma.....	21
2.1.3. Fermentasyon (Oksidasyon).....	22
2.1.4. Kurutma.....	33
2.1.5. Çayın Sınıflandırılması ve Derecelendirilmesi.	36
2.1.6. Çayın Depolanması ve Paketlenmesi.....	37
BÖLÜM III. KULLANILAN YÖNTEMLER.....	39
3.1. Kromatografik Ayırma ve Tayinler.....	39
3.2. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC).....	41
3.2.1. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi (Prep. TLC).....	43
3.3. Gaz Kromatografisi.....	44
3.3.1. Nitel Analiz.....	45
3.3.2. Nicel Analiz.....	46
3.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi(HPLC).....	47
3.4.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Cihazı.....	47
3.4.2. Örnek Hazırlanması.....	48
3.4.3. Nitel Analiz.....	48
3.4.4. Nicel Analiz.....	49
BÖLÜM IV. DENEYSEL KISIM.....	50
4.1. Nem Tayini.....	50
4.2. Toplam Polifenol Tayini.....	51
4.3. Gaz Kromatografisi (GLC) ile Yapılan Çalışmalar.....	53
4.4. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Yapılan Çalışmalar.....	53

4.5. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Kersetin, Kamferol ve Mirisetin Aranması.....	54
4.6. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) İle Yapılan Çalışmalar.....	55
BÖLÜM V. ANALİZ NETİCELERİ.....	56
BÖLÜM VI. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	62
BÖLÜM VII. KAYNAKLAR.....	63



ÖZET

Türkiye, Avrupa ülkeleri arasında tek ve önemli bir çay üreticisidir. Gerek Avrupa topluluğu ülkeleri, gerekse diğer bazı ülkeler çay ihtiyaçlarını ithalât yoluyla karşılamaktadırlar. Bu nedenle, dünya çay piyasasında bir yere sahip olmak için Türkiyenin çay üretimi ve kalitesi diğer ülkelerden daha iyi olmalıdır.

Ülkemizdeki çay tüketimi, üretiminden daha azdır. Dolayısıyla ihtiyaç fazlası çay depolanmaktadır. Depolanmış çayın ihraç edilememesinin tek nedeni kalitesinin düşük olmasıdır. Yaş çay yapraklarında bulunan flavanollerin enzim kataliziyle oksidasyonu sonucu oluşan theaflavinler siyah çayın kalitesini önemli ölçüde etkilerler. Dolayısıyla, siyah çaydaki TF'lerin miktarı flavanollerin cins ve miktarına önemli ölçüde bağlıdır. Türkiye'nin çay üretim teknolojisi uluslararası standartlara uygundur. Fermentasyon işlemi, TF'lerin maksimum derecede oluştuğu şartlarda yapıldığından, Türkiye'nin siyah çayındaki TF'lerin düşük olması sadece teknolojiye değil yaş çay yapraklarındaki flavanollerin cins ve miktarlarına bağlıdır.

Bu çalışmanın amacı, yaş çay yapraklarındaki TF'lerin oluşumunu sağlayan polifenollerin tayinidir.

SUMMARY

Turkey is only and an important tea producer among Europe countries. Whether Europe Economic Community countries or many other countries have been imported own tea necessities. Because of this, tea production of Turkey must be better than the other countries for having a place in the world tea market.

Tea consumption in Turkey is lower than tea production. Thus, the rest tea has been stored. As a result of storing, quality of tea has been decreased and has not been exported.

Theaflavins are formed by the oxidation reaction with enzym catalysis of flavanols in the green tea leaves effect mainly quality of black tea. Hence, the amount of theaflavins in the black tea depend on a good deal the amount and kind of flavanols in the green tea leaves. Tea production technology in Turkey is due to the international standarts. Since fermentation process has been made in conditions that is formed in maximum level of theaflavins, the low amount of theaflavins in black tea of Turkey deal with the amount and kind of flavanols in green tea leaves but not technology.

The aim of the study is to determine the polyphenols in Turkish tea.

BÖLÜM I. ÇAY BİTKİSİ VE YAPRAĞI

1.1. Çay Bitkisi

Çay bitkisi botanikte Angiospermea çiçek açanlar bölümünden, Dicotyledonea sınıfından ve Theaceae ya da Camellia familyasındandır. Botanikçiler tarafından çay bitkisinin kabul edilen adı Camellia sinensis'dir.

Çay bitkisi doğada büyüme bırakıldığı zaman bir ağaç görünümünü alır. Gelişme yüksekliği çeşitler (varyeteler) arasında büyük farklılık gösterir. Çay bitkisi, yaprağını dökmeyen bir bitkidir. Yeterli düzeyde sıcaklık ve nem bulunduğu yerlerde yıl boyu sürgün oluşumu sürer. Yılın mevsimleri arasında sıcaklık ve nem farklılığının bulunduğu yerlerde, örneğin ülkemizde çay bitkisinde sürgün kesintili şekilde oluşur. Yıl boyu sürgün oluşumuna uygun olmayan yerlerde, soğuk mevsimde sürgün oluşumu duraklar, yaprak ve tomurcuklarda gelişme olmaz. Bir başka deyişle soğuk mevsimde çay bitkisi dinlenme dönemine girer.

1.2. Çay Yaprağı

İçtiğimiz çay, çay bitkisinin yeşil körpe yapraklarının işlenmesiyle elde edilir. O nedenle nitelikli çay üretimi, yeşil çay yaprağına bağlıdır. Genel kural olarak çay üretimi için sürgün ucundan koparılmış iki yaprak ve bir tomurcuğun kullanılması istenir. Buna neden çeşitli maddelerin genç yapraklarda ve tomurcukta toplanmış olmasıdır.

1.3. ay Yaprakının Kimyasal ve Biyokimyasal Kapsamı

ay yaprakının çok karmaşık olan kimyasal ve biyokimyasal kapsamı üzerindeki çalışmalar bir yzyıldan fazla zamandan beri sürmektedir. Kağıt, kolon, ince tabaka, gaz-sıvı kromatografileri, spektrofotometri, izotoplarla etkileme vb. yöntemlerin uygulanması yeni bilgilerin sağlanmasına imkan vermiştir. Özellikle enzimler, kateşinler, karotenoidler, uçucu maddeler vb. üzerinde ayrıntılı bilgi sahibi olunmuştur.

ay bitkisi yaprakının kimyasal ve biyokimyasal kapsamı nitelikli çay üretimi için büyük önem taşır. En gelişmiş ve duyarlı işleme yöntemleri uygulansa bile niteliksiz ve içeriğı uygun bulunmayan yapraklardan nitelikli çay üretilmesi imkânsızdır.

ay bitkisinin tomurcuğunda, genç ve yaşlı yaprakları ile değişik organlarında bulunan maddeler ve miktarları farklıdır. ay üretiminde kullanılan genç çay yaprakları ile tomurcuğunda polifenoller, aminoasitler ve kafein en yüksek düzeyde bulunmaktadır.

1.3.1. Enzimler

Yaşayan her hücrede yüzlerce, binlerce kimyasal tepkime cereyan eder. Tepkimelerin düzenli bir şekilde sürmesi hücrede bulunan ve enzim adı verilen karmaşık bileşiklerin yardımıyla olur. Enzimlerin etkisi sonucu karmaşık durumdaki moleküller basit moleküllere parçalanır.

Günümüzde tüm araştırmacılar tarafından benimsenmiş bir tanıma henüz sahip olmamakla beraber enzimlerin "yaşayan hücrelerde oluşan organik katalizörler" şeklindeki tanımı yaygın bir şekilde kabul edilmiştir.

ay bitkisinin genç yaprak ve sürgünlerinde bulunan enzimler

çaya işleme aşamasında, ileri derecede biyokimyasal dönüşümler oluşturarak, çayın karakteristik tad ve koku kazanmasına neden olurlar. Bir başka deyişle değişik tip ve nitelikteki siyah çayın üretilmesi genç çay yaprakları ile tomurcuğunda bulunan enzimler sayesinde olur. Siyah çayın üretilmesinde özellikle yükseltgenme (oksitlenme) enzimleri görev yaparlar. Çayda bulunan polifenollerin havada yükseltgenmeleri, uygun enzimlerin bulunmaması durumunda olağan üstü yavaş cereyan eder. Özel olarak değişik tip ve nitelikte üretilen siyah çay, farklı biçim ve zamanda uygulanan enzimatik yükseltgenmelerin bir ürünüdür. Çay bitkisi yaprağında bulunan ve siyah çaya işlemede önemli görev yapan enzimler şunlardır:

1. **Polifenol Oksidaz Enzimi:** Çay yaprağında bulunan polifenol oksidaz enzimi (O-diphenol: O₂ oksidoredüktaz) siyah çaya işlemede en önemli görevi yapar. Çay bitkisinin genç ve yaşlı yapraklarında polifenol oksidaz enziminin aktivitesi farklıdır. Olgun çay yapraklarında polifenol oksidaz aktivitesinin genç çay yapraklarına göre %70 daha az olduğu bulunmuştur. Polifenol oksidaz aktivitesi mevsimlere bağlı olarak değiştiği gibi siyah çaya işleme aşamalarında da önemli düzeylerde değişiklik gösterir. Örneğin siyah çaya işlemenin başlangıç aşamaları olan soldurma ve kıvrma esnasında enzim aktivitesi fazla iken, fermentasyon esnasında giderek azalmaktadır. Siyah çaya işlemenin başlangıç aşamalarında enzim sentezi nedeniyle aktivite yükselirken, fermentasyon esnasında polifenollerin oksidasyon ürünlerinin enzim proteinleriyle çözünmez bileşikleri oluşturması enzim aktivitesini azaltmaktadır.

2. **Peroksidaz Enzimi:** Çay yaprağında bulunan peroksidaz enziminin siyah çaya işleme esnasında işlevleri üzerinde henüz ayrıntılı bilgi elde edilememiştir.

3. **5-Dehidroshikimat Redüktaz Enzimi:** Bu enzimin aktivitesi olgun çay yapraklarına göre genç sürgünlerde daha fazladır.

4. Fenilalanin Amonyak Liyaz Enzimi: Kateşin kapsamı ile aktivitesini olumlu yönde etkileyen bu enzim, polifenollerin biyosentezinde önemli görev yapmaktadır.

5. Peptidaz Enzimi: Bu enzim siyah çaya işleminin soldurma aşamasında proteinlerin amino asitlerine parçalanmasında görev yapmaktadır.

6. Leusin- α -ketoglutarat Transaminaz Enzimi: Bu enzim çaya koku veren uçucu bileşiklerin biyosentezinde görev yapmaktadır.

7. Klorofilaz Enzimi: Enzim aktivitesi çay yaprağının klorofil kapsamı ile ters orantılıdır. Siyah çaya işleme anında fiofitinin fioforbide olan oranının belirlenmesinde önemli rol oynar.

8. Pektin Metilesteraz Enzimi: Bu enzim pektinin dimetilizasyonu sonucunda pektik asidi oluşturmakta ve pektik asitde oksijenin difüzyonunu engelleyerek ortamda oluşturduğu bir jel ile yükseltgenme (oksidasyon) tepkimelerini olumsuz yönde etkilemektedir.

9. Alkol Dehidrogenaz (ADH^+) Enzimi: Çayın aroma oluşumunda görev yapan bir enzimdir.

1.3.2. Polifenoller

Polifenoller çay yapraklarının en önemli bileşikleri olup çaya işlemede bir seri kimyasal değişikliklere uğrayarak çayın özellik kazanmasında temel rolü oynarlar. Çay bitkisinde bulunan polifenoller gallik asit ve kateşinin türevleridir. Gallik asidin en iyi bilinen türevlerinin tanenler olması nedeniyle çayda bulunan polifenollerin bir büyük bölümü uzun süre tanenler olarak sınıflandırılmıştır. Çayda bulunan polifenollerin hiç birinin tanen özelliğine sahip olmaması nedeniyle yanlış olarak yapılan bu sınıflandırma son yıllarda geçerliliğini yitirmiştir. Alkoller gibi geniş bir grubu oluşturan polifenollerde gerek özellikleri yönünden ve gerekse türevleri yönünden önemli derecede farklılık gösterirler.

Önemi nedeniyle genç çay yapraklarında bulunan polifenolik bileşikler üzerinde geniş şekilde çalışılmıştır. Genç çay yaprağı ile tomurcuğunda bulunan polifenolik bileşikler genelde 4 ana grup altında toplanmaktadır. Bunlar: 1. Flavanoller (önceleri kateşinler olarak isimlendirilmiştir), 2. Flavonoller ve Flavonol glikozidler, 3. Flavonlar ve 4. Asitler ve Depsitlerdir. Çayın işlenmesinde büyük önem taşıyan flavanolleri, kateşinler ve gallokateşinler ile bunların galleratları oluşturmaktadır. Genelde genç çay yaprakları ile tomurcuğunda sıra ile en fazla epigallokateşingallat (EGCG), epigallokateşin (EGC) ve epikateşin gallat (ECG) bulunmaktadır. Bunların kimyasal formülleri şekil 1.3.2.1. de verilmiştir.

Siyah çayın işlenmesi anında flavanoller, polifenol oksidaz enzimi ile yükseltgenerek (oksitlenerek) siyah çayın renk dahil çeşitli özelliklerini kazanmasına neden olur. Öte yandan yeşil çay üretiminde polifenol oksidaz enzimi sıcak buharla yada kuru sıcaklıkla parçalanarak flavanollerin yükseltgenmeleri engellenir. O nedenle siyah çay ile yeşil çayın en önemli farklılığı üretilen çayda bulunan polifenollerin nitelik ve niceliklerindeki ayırımdan kaynaklanır.

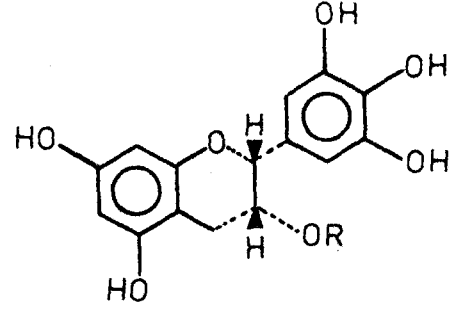
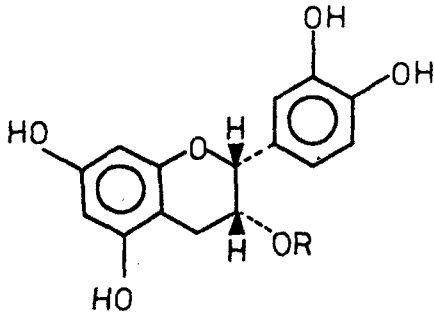
Çay bitkisinde genç yapraktan yaşlıya doğru gidildikçe polifenollerin miktarı azalır. Nitelikli çay üretimi için körpe çay yaprakları ve tomurcuğun kullanılmasının temel nedeni de bu olgudur. Çay yaprağında polifenollerin nerede biyosentezlendiği kesin olarak bilinmemektedir. Polifenollerin yaprakların polisad hücrelerinde bulunduğu belirlenmiş ve bu bulgu elektron mikroskopla yapılan çalışmalarla da ispatlanmıştır.

Flavonoller ve flavonol glikozitler çay bitkisinde az miktarda bulunur. Çay bitkisinin değişik organlarında bulunan flavonollerin farklı olduğu belirlenmiştir. Siyah çayı işleme aşamalarında flavonol kapsamı giderek azalır. Siyah çayın flavonol kapsamı yeşil çay yaprağına göre %15-25 oranında daha azdır.

Tablo 1.3.2.1. Genç Çay Yaprakları ile Tomurcuğunda
Bulunan Polifenolik Bileşikler.

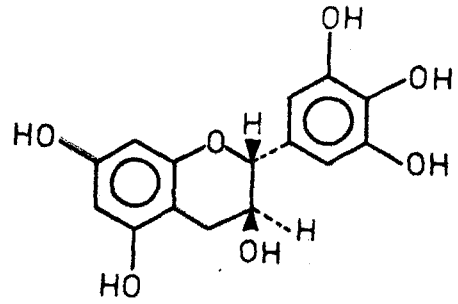
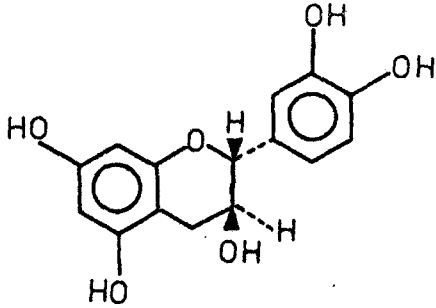
	Miktarı, % (Kuru Madde)
Flavanoller	
(-) Epikateşin (EC)	1-3
(-) Epikateşin gallat (ECG)	3-6
(-) Epikateşin digallat	---
(-) Epigallokateşin (EGC)	3-6
(-) Epigallokateşin gallat (EGCG)	9-13
(-) Epigallokateşin digallat	---
(+) Kateşin(C)	1-2
(+) Gallokateşin(GC)	3-4
Flavonoller ve Flavonol Glikozidler	
Quersetin	---
Kaemferol	---
Quersetin-3-ramnoglikozid	---
Kaemferol-3-ramnoglikozid	---
Quersetin-3-ramnodiglikozid	---
Mirisetin-3-glikozid	---
Flavonlar	
Vitexin	---
6.8-di-C-glikozil apigenin	---
Leukoantosiyeninler	---
Asitler ve Depsitler	
Gallikasit	~5
Klorogenik asitler	---
p-Kumarilkuinik asitler	---
Theogallin	---
Ellagik asit	---
Total Polifenoller	25-35

Genç çay yaprakları ile tomurcuğunda bulunan ve miktarları Tablo 1.3.2.1.' de verilmiş olan polifenolik bileşiklerden bazılarının açık formülleri aşağıda gösterilmiştir.



- (-) Epikateşin R=H
 (-) Epikateşin gallat
 R=3,4,5-trihidroksibenzoil

- (-) Epigallokateşin R=H
 (-) Epigallokateşin gallat
 R=3,4,5-trihidroksibenzoil



(+) Kateşin

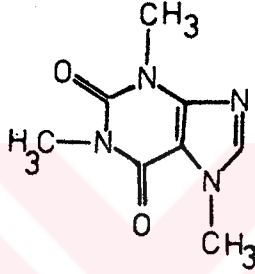
(+) Gallokateşin

Şekil 1.3.2.1. Flavanoller (Kateşinler)

1.3.3. Alkaloidler

Çayın aranan bir içecek olmasının bir önemli nedeni de içerdiği alkaloid maddeleridir. Alkaloid madde olarak bilinen kafein, teobromin ve teofilin purin türevleridir. Purin ise nükleoproteinlerin en önemli yapı taşıdır.

Çay yapraklarından izole edilen saf kafein ($C_8H_{10}N_4O_2$), tadı acı kristal halde bir maddedir. Çay bitkisinin değişik yapraklarında bulunan kafein miktarları Tablo 1.3.3.1.' de verilmiştir.



Kafein

Tablo 1.3.3.1. Çay Bitkisinin Değişik Yapraklarında Bulunan Kafein Miktarı.

Yapraklar	Kafein, % (Kuru Maddede)
1.Yaprak	3.39
2.Yaprak	4.20
3.Yaprak	3.40
4.Yaprak	2.10
5.Yaprak	1.70
Yaşlı yaprak	0.79
Sap	0.36

Türk çaylarındaki kafein kapsamı %3.1-3.8 arasında değişir. O nedenle kuru madde ilkesine göre siyah çayın kafein miktarı yeşil çay yaprağının kafein miktarından yüksektir.

Çay bitkisinden kafein nükleik asitlerin parçalanması sonucu oluşmakta ve bu parçalanma, soldurma aşamasında da sürdüğü için siyah çayın kafein kapsamı yeşil çaya göre daha fazladır.

Çayın insanlarda yorgunluk giderici, canlılık verici etkisi, içerdiği kafein ile yakından ilgilidir. Bugünkü bilgilerimize göre kahve gibi çay da kafein içermektedir. Bir bardak çayın kafein içeriği eşit miktardaki kahvenin içeriğinden yaklaşık %50 daha azdır. Kuru çay %1-5 oranında kafein içerir.

Normal şekilde yapılan demleme ile çayda bulunan kafeinin yaklaşık %80'i deme geçer. Buna göre 5-6 bardak çay içen bir kimse ortalama 300 mg kafein alıyor demektir. Bu miktar, İngiliz Eczacılık Kodeksi'nce kabul edilen (600 mg saf kafein) günlük dozun yarısından azdır. Ancak kafeinin özel fizikokimyasal durumu nedeniyle çay içildiği zaman vücudun kafeine karşı direnci daha fazla olmakta, tolerans sınırı yükselmektedir. Kafein ve kafeinden oluşan metabolik maddeler de vücutta birikmemektedir. Anılan metabolik maddeler dimetile olmuş ve okside halde buldukları için vücuttan ifrazat yoluyla metil ürikasit şeklinde atılmaktadır.

İnsan sağlığı üzerine kafeinin etkileri geniş şekilde araştırılmıştır. Kafein, beyin dahil vücuttaki kılcal damarların önemli derece genişlemesine neden olur. Özellikle beyindeki kılcal damarların genişlemesi ise kan hareketinin hızlanmasına, insanların canlılık kazanmasına ve yorgunluğu atmalarına yol açar.

Çayın mide fizyolojisine, özellikle asidik mide sularının salgılanması üzerine ilişkin araştırmalar ilginç olduğu kadar önemli sonuçlar vermiştir. Yıllardan beri dünyadaki çay tiryakileri, çayın mideyi rahatlatıcı etki yaptığını, midede asitlik yarattığını, gaz üretmediğini ve hazımsızlığa da neden olmadığını açıklamışlardır. Bu açıklamanın, zamanımızdaki modern tıp araştırma bulgularıyla da uyum içerisinde olduğu, çayın mide salgıları üzerine bir bardak sıcak su

ile bir bardak çayın eşit etki yaptığını göstermiştir.

Saf kafein çözeltisinin mide salgılarını çoğalttığı kesin bir şekilde bilindiğine göre belirli bir miktar kafein içeren çayın olumlu etkileri nasıl açıklanabilir? Kafeinin olumsuz etkilerinin çayda olumlu şekle dönüşmesi gerçekten ilginçtir. Çay içerisinde bulunan ve thearubigin adı verilen bileşikler kafein ile tepkimeye girerek mide üzerine kafeinin olumsuz etkilerini önlemektedir. Midenin asit ortamında, anılan tepkime geçerliliğini sürdürmektedir. Ancak alkali bir ortamın oluşması yada bir anda alkali tepkimeli bir madde ile karşılaşılması kafeinin bileşikten bağımsız şekle dönüşerek kana geçmesine ve insan vücudu üzerine belirtilen olumlu etkilerini gerçekleştirmesine neden olmaktadır.

1.3.4. Azotlu Bileşikler

Bitkilerde "N" kapsayan organik bileşiklerin başında proteinler gelir. Proteinler genellikle %16 civarında N içerir ve bitkilerde bulunan proteinin hesaplanmasında ise belirlenen N miktarı belli bir faktör ile çarpılır.

Çay yapraklarında azot miktarı göreceli olarak durağandır. "N" kapsamı %4.5 civarındadır. Çay yapraklarında azot miktarı %2.5'un altına düştüğünde şiddetli azot noksanlığı ortaya çıkar.

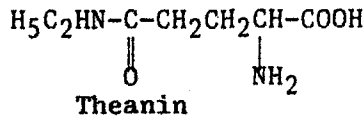
Ülkemizde çay tarımının yapıldığı Doğu Karadeniz yöresini en iyi şekilde temsil edebilecek durumda olan 30 üretici çay bahçesinden üç sürgün döneminde alınan yaprak örneklerinde "N" miktarları kuru madde üzerinden %3.1 ile %5.2 arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Çay bitkisinde bulunan N'in 1/4'ü kafeine ve 3/4'ü de proteine bağlıdır. Çay bitkisinde proteinlerin yapı taşı olarak önem taşırlar. Eğer çay bitkisi yüksek oranda protein içeriyorsa işleme sırasında protein ile polifenoller arasındaki tepkime sonucu suda çözünmeyen

bileşikler oluşur. Bu durum siyah çayın niteliksiz olmasına neden olur. Japonya'da çay üreticileri çoğunlukla çaylıklarını gölgelik yerlerde kurmuşlardır. O nedenle Japonya'da çay bitkisinin protein kapsamı yüksek, polifenol kapsamı düşüktür. Bu olgunun üretilen yeşil çayın niteliği üzerine olumsuz etki yapmadığı çay tadımcıları tarafından ifade edilmiştir.

Çay bitkisinde tomurcuktan başlayarak aşağıya doğru inildikçe yapraklarda toplam protein kapsamı azalmaktadır. Tomurcukta toplam protein %29.1, 1.yaprakta %26.1, 2.yaprakta %26.0 ve 3. yaprakta %24.9 olarak bulunmuştur. Bu arada vejetasyon başında çay bitkisinin protein kapsamı vejetasyon döneminin sonuna göre önemli derecede daha yüksektir.

Siyah çayda aspartik asit, lösin, glutamik asit, fenilalanin, valin, alanin, serin, asparagin, tirozin, arginin, histidin, lisin ve prolin gibi amino asitlerin bulunduğu tesbit edilmiştir. Çay yapraklarında yukarıda adları yazılı amino asitlere ek olarak izolösin, treonin, glutamin, β -alanin, α -aminobütirik asit ve triptofan adlı amino asitleri belirlenmiştir. Bunlara ek olarak çay bitkisine özgü bir amino asit olan "Theanin" izole edilmiştir. Aşağıda formülü yazılı olan bu amino asidin çay bitkisinin değişik organlarındaki miktarı farklıdır (Tablo 1.3.4.1.).



Tablo 1.3.4.1. Çay Bitkisinin Değişik Organlarında Theanin'in Dağılımı, K.M.de %

	Theanin Miktarı
Tomurcuk	0.55
1.Yaprak	0.31
2.Yaprak	0.42
3.Yaprak	0.58
Sap	2.10

Siyah çayda koku oluşumunda amino asitlerinin önemli olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılara göre amino asitlerle polifenoller, polifenol oksidaz enzimi aracılığıyla tepkimeye girerek aldehitleri ya da benzeri ürünleri oluşturmakta ve bu siyah çayın koku kazanmasına neden olmaktadır.

1.3.5. Karbohidratlar

Öteki bitkiler gibi çay bitkisinde basit şekerlerden kompleks polisakkaritlere -seluloza ve hemiseluloza- değin tüm şekerleri içerir. Genç çay yapraklarında karbohidratların gelişme mevsimi içerisinde aylara göre dağılımı incelendiğinde (Tablo 1.3.5.1) sakkaroz miktarının glikoz ve früktoz miktarlarından daha yüksek bulunduğu ve ay içerisindeki dağılımının da farklı olduğu görülmektedir.

Yeşil çay yaprağının çaya işlenmesi sırasında sakkaroz miktarı azalır. Buna karşın siyah çayda glikoz ve früktoz gibi monosakkaritlerin miktarı artar. Kimyaca saf glikoz yada früktoz çözeltilerinin yüksek sıcaklıkta ısıtılmaları durumunda karamel aroması verdiği bilinmektedir. Çaya işlemedeki kurutma sırasında da özdeş bir koku hissedilir. O nedenle basit karbohidratların çayın aromasına olumlu yönde etki yaptığı varsayılır.

Tablo 1.3.5.1. Körpe Çay Yaprağında Karbohidratların Gelişme Mevsimi İçerisinde Dağılımı, K.M.de%

Karbohidratlar	Aylar		
	Temmuz	Ağustos	Eylül
Sakkaroz	0.43	0.48	0.34
Glikoz	0.28	0.15	0.15
Früktoz	0.15	0.15	0.17
Toplam Şeker	0.86	0.78	0.66

1.3.6. Klorofil ve Öteki Pigmentler

Çay bitkisi, öteki bitkiler gibi, karoten ve ksantofil ile birlikte klorofil de içerir. Çay bitkisi, yaz aylarına göre ilkbaharda daha fazla klorofile sahiptir. Yaşlı yaprakların klorofil kapsamları genç yapraklarınkine oranla yüksektir.

Çaya işleme sırasında yeşil yaprakta bulunan pigmentlerin önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Çay yaprağında bulunan karoten miktarı da siyah çaya işleme aşamasında önemli derecede azalır.

1.3.7. Vitaminler

Çayın fizyolojik etkinliği, büyük ölçüde çay bitkisinde ve çayda bulunan vitaminlerden ileri gelir. Yeşil çay yapraklarında ve yeşil çayda vitamin C'nin bulunduğu ilk kez Japon araştırmacılar tarafından bulunmuştur. Gürcistan'da yetiştirilen çay bitkisinin yeşil yapraklarında vitamin C miktarının, limon yada portakal suyunda bulunan vitamin C miktarından 3-5 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir.

Siyah çaya işleme aşamasında askorbik asit (C vitamini) büyük ölçüde kaybolur. Özellikle kaybolma fermentasyon ve fırınlama aşamalarında ortaya çıkar. Yeşil çaya işleme aşamasında çayda bulunan C vitamini göreceli olarak daha az yiter. Yeşil çay siyah çaya oranla 10 kat daha fazla C vitamini içerir.

Siyah çaya işlemede askorbik asidin biyokimyasal öneme sahip olduğu öne sürülmüştür. Askorbik asit, polifenol oksidaz + kateşin sistemi içerisinde yükseltgenme -indirgenme tepkimelerinde önemli görevlere sahiptir.

Çay bitkisinde C vitamini yanında çeşitli vitaminlerin bulunduğu da belirlenmiştir. Çay kateşinlerinde fazla miktarda P vitamini aktivitesinin bulunduğu belirlenmiştir. P vitamini aktivitesinin çay bitkisinin flavonol içeriği ile yakından ilgili olduğu bulunmuştur.

1.3.8. Anorganik Maddeler

Mineral maddeler çay bitkisinin gelişmesinde olduğu kadar bitki- de fizyolojik, kimyasal ve biyokimyasal görevlerin yerine getirilme- sinde de önemli görev yaparlar. Çay bitkisinde bulunan anorganik maddelerin kimileri az kimileride çok az çözünür. Çay içenler için suda çözünebilme derecesine göre anorganik maddeler önem kazanır. Çünkü suda çözünen anorganik maddeler, çayın demlenmesi anında kolay- ca deme geçebilir.

Çayın niteliği ile içerdiği kül miktarı arasında ilişki olduğu öne sürülmüştür. Kimi araştırmacılara göre yüksek nitelikli çayın kül miktarı düşük nitelikli çaya oranla daha azdır. Çay bitkisi yaprağın- da fosfor organik ve inorganik bileşikler halinde bulunur ve proteinlerde, nükleoproteinlerde ve öteki fizyolojik yönden önem ta- taşıyan bileşiklerde yer alır. Bitkide karbohidratların parçalanma- rında, hücrelerde oluşan enerjinin taşınmasında görev yapan fosfor nitelikli çay üretiminde de olumlu etki yapar. Yeteri kadar fosfor i- çeren çay yapraklarında polifenollerin fazla olduğu görülmüştür.

Çay bitkisi, azot ve potasyuma oranla daha az miktarda fosfor i- çerir. Çay bitkisinin genç organ ve yapraklarının fosfor kapsamı yaşlı organ ve yapraklarının fosfor kapsamına oranla göreceli ola- rak daha yüksektir.

1.3.9. Uçucu Maddeler

Tad ve koku (aroma) çayın niteliğini belirleyen öğeler arasında yer alır. Çay tadının çay yaprağında bulunan polifenollere ve kokusu- nun da uçucu yağlara dayandığına genellikle inanılmıştır. Her ne kadar uçucu yağlar çayın kokusu için temel madde olarak kabul edilir- se de gerçekte bunlar, koku kompleksinin temel öğesini oluştururlar.

Sıcak bir çözeltili ortamında çay polifenolleri ile çeşitli amino asitleri değişik koku oluşturlar.

Çay polifenolleri ve amino asitlerinden fenil alanin gül kokusuna, glutamik asit ya da alanin çiçek kokusuna, triptofan ve triosin hoş olmayan bir kokuya ve norleusin ise sarımsak kokusuna benzer bir kokuyu oluşturlar. Çay polifenolleri tarafından amino asitlerinin yükseltgenmeleri sonucu koku verici madde olarak aldehyitlerin oluşmasıyla koku ortaya çıkar. İlginç olan nokta, çayın uçucu yağına özgü kokuyu oluşturabilen herhangi bir esterinin bu güne değin izole edilememiş olmasıdır.

Çayın kokusu tek bir etmenin etkisi ile değil karmaşık pek çok etmenin etkisi altında oluşmaktadır. Çeşitli etmenler arasında çay bitkisinin yetiştiği yerin, iklimin, çay bitkisinin genetik yapısının, uygulanan gübrenin cins ve miktarının çay bitkisinde koku maddelerinin oluşması üzerindeki etkileri önemli düzeydedir. Yeşil çay bitkisinin kokusu işlenmiş çayın kokusundan farklıdır. Değişik kökenli siyah çayların kokuları da farklıdır. Kökeni ne olursa olsun çaylarda uçucu maddelerin miktarları birbirine çok yakındır. Ancak uçucu maddelerin bileşimlerindeki farklılık değişik kökenli çayların kokularında farklılığa sebep olmaktadır.

1.4. Çay Yaprağının Kapsamına Etki Eden Etmenler

Bu etmenlerin başında çay bitkisinin çeşidi gelir. Çevre koşulları ile uygulanan kültür önlemlerinin etkileri de büyük önem taşır. Çeşit olarak en üstün niteliklere de sahip olsa çay bitkisi yetiştirildiği ortama uyum sağlayamamışsa, ihtiyaç duyduğu koşullar sağlanamamış ve gerekli kültürel önlemler alınamamışsa nitelikli çay yaprağının elde edilmesi imkansızdır.

Yeşil çay yaprağının kimyasal ve biyokimyasal kapsamı üzerine etki eden etmenler üç grup altında toplanarak incelenebilir.

Bunlar: 1. Bitkisel etmenler, 2. Çevresel etmenler, 3. Kültürel etmenlerdir.

1.4.1. Bitkisel Etmenler

Çay bitkisi; 1. Çin çayı, 2. Assam çayı ve 3. Kamboçya çayı olmak üzere başlıca üç çeşide sahiptir. Bu üç çay çeşidinin yerel isim verilmiş tipleri ve melezleri de bulunmaktadır. Tohumdan yetiştirilen çaylıklarda bir ocaktan toplanan yaprağın görünümü ve kapsamı diğer bir ocaktan toplanan yaprağın görünüm ve kapsamından farklı olabilmektedir.

Assam çay bitkisi yapraklarının polifenol ve kafein kapsamı Çin çay bitkisinin yapraklarına göre daha yüksektir. Assam'da aynı koşullarda yetiştirilen Çin ve Assam çay bitkisi yapraklarında sıra ile polifenol kapsamı %28.1 ve %34.4, kafein kapsamı ise %3.5 ve %4.5 olarak belirlenmiştir. Genelde değişik çay bitkisi çeşitlerinden toplanan yapraklar temelde aynı maddeleri içerirler. Ancak bu maddelerin miktarları farklıdır.

1.4.2. Çevresel Etmenler

Çevre etmenleri denildiğinde öncelikle akla iklim ve toprak gelir.

İklimin Etkisi: İklim şartlarından söz edildiğinde sıcaklık, bağıl nem, yağış ve yağışın yıl içinde dağılımı, güneşlenme durumu, açık ve bulutlu günlerle, donlu gün sayısı akla gelir. Gelişme için sıcaklık ve nem ile diğer iklim etmenlerinin uygun olduğu çoğu tropik yörelerde çay bitkisinden yıl boyunca çay yaprağı toplanabilir.

Toprağın Etkisi: Çay bitkisi kumdan kile değin değışen yapıdaki asidik topraklarda yetişebilir. Çin çayı öteki çay çeşitlerine göre dik yamaçlardaki yoksul topraklarda daha iyi gelişme göstermektedir.

Doğu Karadeniz yöremizde çay genellikle kırmızı renkli topraklar (Krasnozemler) ile sarı topraklarda (Geltozemler) yetiştirilmektedir. Genelde çay bitkisi, pH'sı 4.5-6 arasında değışen topraklarda optimum gelişme gösterir. Toprak pH'sı asit yada alkali yöne doğru değıştikçe, çay bitkisinde gelişme olumsuz yönde etkilenir.

1.4.3. Kültürel Etmenler

Hasat: Çay bitkisinde hasat kültürel etmenlerin en önemlileri arasında yer alır. Çaya işlenmeye uygunluğu yönünden genç ve körpe çay yaprağı ile tomurcuğunun toplanması esastır. Genel bir kural olarak iki yaprak bir tomurcuğun toplanması istenmekte ve bunun çaya işleme yönünden ideal olduğu söylenmektedir. Kimi durumlarda üç yaprak bir tomurcuk da başarılı bir şekilde çaya işlemede kullanılabilir. Kabul edilmesi ve dikkat edilmesi gereken kural çayın işlenmesine uygun taze ve körpe yapraklarla tomurcuğun hasat edilmesidir.

Hasatta dikkat edilecek bir önemli nokta da hasat sonrası ocakta yeterli miktarda olgun yaprağın bırakılması ve bir sonraki hasat için bitkinin ihtiyaç duyduğu gücü bulabilmesidir.

Budama: Çay bitkisinde budama iki ana amaca yönelik olarak yapılır. Bunlar: 1. Şekil Budaması ve 2. Ürün Budamasıdır. Şekil budaması üç yaşını doldurmuş ve dört yaşına girmiş çay fidanlarına uygulanır. Çay fidanını dallandırıp ocak haline dönüştürmeye hizmet eder. Ülkemizde şekil budaması Kasım-Aralık yada Mart-Nisan aylarında yapılır.

Çay bitkisinden elde edilen yaprak ürün miktarının azalmaya başladığı andaki budamaya ürün budaması denir. Ürün budaması belli zaman

aralıklarıyla sürdürülür. Bu süre kimi çaylıklarda üç yıl, kimi çaylıklarda ise daha uzundur.

Gübreleme: Çayın gübrenmesi ürün miktarını olumlu yönde etkilediği gibi, ürünün kapsamı üzerinede olumlu etki yapar. Ancak toprağa gübre olarak verilen bitki besin maddeleri miktarının uygunluğu yanında bitki besin maddeleri arasındaki dengeninde uyum içerisinde olması esastır. Üretilen çayın niteliği üzerine gübrelemenin etkisi çoğu kez tadımcılar tarafından net olarak ifade edilememektedir.

Gölgeleme: Parlak güneş ışınlarının doğrudan çay bitkisine gelmesi kimi zaman zararlı olabilmektedir. O nedenle çay bitkisinde gölgeleme, geniş şekilde araştırılmıştır. Gölgeleme ağaçları özellikle çay fidanlarının üretildiği alanlarda istenmekte ve önemli derecede yarar sağlanmaktadır.

1.5. İşleme Öncesi Çay Yaprağına Yapılan Zarar

Çayın hammaddesi olan yeşil çay yaprağına tarladan başlayarak fabrikaya getirilip soldurmaya alınıncaya kadar her türlü özenin gösterilmesi gerekir. Soldurma işleminden önceki herhangi bir aşamada yeşil çay yaprağının zedelenmesi, fabrikasyondaki tüm işlemler en üst düzeyde yerine getirilmiş olsa bile, üretilecek çayın niteliksiz olmasına yol açar. O nedenle yeşil çay yaprağının özenle toplanması ve en kısa süre içerisinde usulüne uygun olarak fabrikaya taşınması büyük önem taşır.

1.5.1. Hasatta ve Hasat Sonrasında Yapılan Zarar

Yeşil çay hasadında en iyi yöntem elle hasattır. Hasat anında çay yaprakları ile tomurcuğun kırılıp kıvrılarak zedelenmemesine özen gösterilmelidir.

Topraktan sonra fabrikaya teslim edilinceye değin yeşil çay yaprağının toprakla, kumla, kimyasal gübrelerle, yağla vb. materyallerle bulaşıp kirlenmesi kesinlikle önlenmelidir.

Hasat edilen yeşil çay yaprağı sıkıştırılmadan büyük sepetlere doldurulmalı ve fabrikaya bu şekilde taşınmalıdır. Son yıllarda diğer ülkelerde plastikten yapılmış özel taşıma kapları bu amaçla kullanılmakta ve çay yaprağının olabildiğince az zarar görmesi sağlanmaktadır.

1.5.2. Taşımada Oluşan Zarar

Hasat edilen yeşil çay yaprağı taşımada zarar oluşturulmadan en kısa süre içerisinde fabrikaya ulaştırılmalıdır. Taşımada, uygulanan ve uygulanabilecek durumda olan çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Hasat edilen çay yaprağının, sıkıştırılmadan konuldukları büyük sepetler içerisinde yada özel olarak plastikten yapılmış kaplar ve torbalar içerisinde taşınması en doğru yoldur. Kamyonlara yüklenen yeşil çay yaprağına taşıma süresince önemli zararlar oluşur. Kamyonda oluşan sıkışma, kırılma ve basınç nedeniyle çay yapraklarının önemli bir bölümü fabrikaya teslim öncesi zarar görür. Bu olgu da üretilecek çayın niteliğini olumsuz şekilde etkiler.

1.5.3. Sıcaklığın Yükselmesi Sonucu Oluşan Zarar

Fabrikaya getirilen yeşil çay yaprağı zaman geçirilmeden soldurmaya alınmalıdır. Soldurma ncesi yeşil çay yaprağının fabrikada yığın halinde bekletilmesine kesinlikle izin verilmemelidir. Kırılıp kıvrılarak yada başka şekilde zedelenmiş çay yapraklarında yüksek sıcaklık sonucu oluşan kızarmanın yaygınlığı ve zararı daha büyüktür.

BÖLÜM II.ÇAYIN BİYOKİMYASI VE İŞLENMESİ

Çayın işlenmesinde cereyan eden biyokimyasal olaylar kilit role sahiptir. Yeşil çay yaprağından değişik çeşit ve nitelikteki çayların üretilmesi temelde oksidasyon tepkimelerine dayanır. İşleme sürecinde oluşan biyokimyasal değişimler üretilen çaya özgü tad, koku, renk, aroma vb. özelliklerin ortaya çıkmasına neden olur. Çayın işlenmesinde temel amaç, yeşilçay yaprağında bulunan ve çayın niteliğine olumlu etki yapan maddelerin yitirilmeden ve bozulmadan işlenen çaya geçmesini sağlamak, olumsuz etki yapabilecek maddeleri zararsız şekle dönüştürmek yada yok etmektir.

İşlenen çayın niteliği, başta yeşil çay yaprağı olmak üzere uygulanan teknolojiyle de yakından ilgilidir. Bir başka deyişle çay, bahçede yapılır. En ileri teknoloji bile niteliksiz çay yaprağını nitelikli çaya dönüştüremez. Nitelikli çay yaprağı üretimine etki yapan çok çeşitli etmenleri üç ana grup altında toplamak mümkündür. Bunlar: 1. Biyolojik Etmenler, 2. Coğrafik Etmenler ve 3. Agroteknik Etmenlerdir. Biyolojik etmenler denildiği zaman genelde değişik çay çeşitleri, coğrafik etmenler denildiği zaman başta iklim ve toprak olmak üzere çevre koşulları, agroteknik etmenler denildiği zaman ise çay bitkisinin yetiştirilmesinden hasadına değin uygulanan tüm tarımsal teknoloji akla gelir.

Değişik işleme teknikleri kullanılmak suretiyle yeşil çay yaprağından özellikleri farklı çaylar üretilmektedir. Dünyada en çok iki çeşit çay bilinmekte, üretilmekte ve tüketilmektedir. Bunlar: 1. Siyah çay ve 2. Yeşil çaydır.

2.1. Siyah ay

Siyah ay, genç ve körpe çay yaprakları ile tomurcuğunun soldurma, kıvrırma, fermentasyon ve kurutma işlemlerine tabi tutulması suretiyle üretilir. Sınıflandırılıp paketlenildikten sonra çay tüketicie sunulur. Siyah ayın üretilmesindeki temel işlemler aşağıda belirtilmiştir.

2.1.1. Soldurma

Ortodoks yönteminde siyah çay üretiminin zorunlu ilk işlemleri soldurmadır. Soldurmanın amacı kısmi kurutma ile suyu buharlaştırılarak azaltılan çay yaprağını fiziksel olarak kıvrırma işlemleri için uygun Şekle dönüştürmektir. Soldurulmuş ve dolayısıyla suyu azaltılmış çay yapraklarında biyokimyasal değişiklikler en yüksek düzeyde cereyan eder. Taze ay yaprağı, koşullarada bağlı olarak, %70-83 arasında değişen miktarlarda su içerir.

Solmuş ay yapraklarında su miktarının azalması nedeniyle hücre öz suyunun yoğunluğu artarken yaprağın kırılmaksızın ağır ağır kıvrılıp bükülmesini ve aynı zamanda hücre öz suyunun yapraktan dışarı çıkmasını kolaylaştıran fiziksel bir ortam oluşur. Soldurularak ay yaprağından suyun azaltılması, kurutma işlemlerinde maliyeti dşrdği için ayrıca büyük yarar sağlar.

2.1.2. Kıvrırma

Siyah ay üretiminde ikinci önemli adım kıvrırmadır. Kıvrırmanın temel amacı, bitki öz suyunu hücrelerden dışarı çıkarmak ve bunu kırılmadan kıvrılan çay yapraklarına bulaştırmaktır. Yüzyıllar ncesi avuç içinde yapılan bu işlem, mekanize edilerek günümüzdeki uygulama Őekli sağlanmıştır.

2.1.3. Fermentasyon (Oksidasyon)

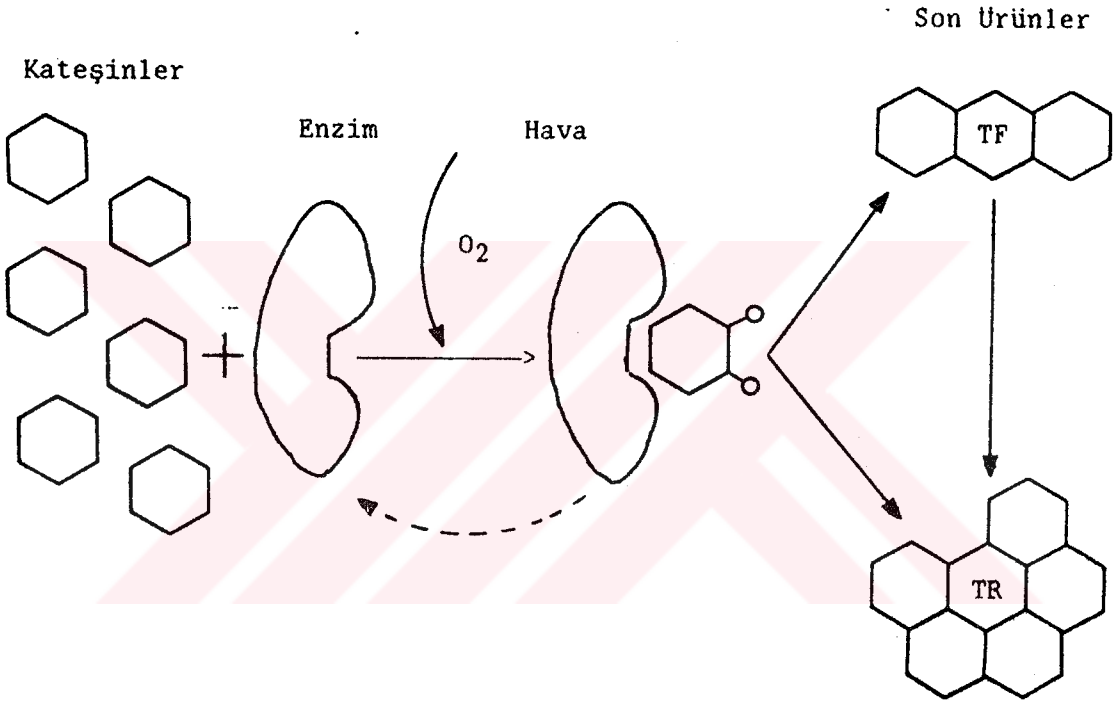
Siyah çay başlıca özelliklerini fermentasyon süresince kazanır. En basit ve en ucuz bir işlem olan fermentasyon, kıvrırma işleminden sonra 5-7.5 cm kalınlıkta serilen çay yapraklarının, nemi ve sıcaklığı ayarlanmış odalarda 40 dakika ile 3 saat arasında değişen sürelerde bırakılmasıyla gerçekleştirilir.

Çayın işlenmesinde fermentasyon sözcüğü temelde yanlış kullanılmış bir sözcüktür. Çünkü işlem sürecinde mikroorganizmaları gerektiren ve mikroorganizmaların neden olduğu bir değişim söz konusu değildir. Enzimlerin yardımıyla kimyasal olarak bir seri yükseltgenme tepkimeleri gerçekleşir. Çay polifenolleri uygun sıcaklık ve nemin bulunması halinde, enzimlerle yükseltgenerek bir seri değişikliklere uğrar.

Yeşil çay yaprağı hücrelerinde ayrı ayrı yerlerde buldukları için enzimlerle polifenoller arasında doğrudan bir etkileşim söz konusu değildir. Enzimler, çay yapraklarında epidermis hücrelerin sitoplazmaları içerisindeki kloroplastlarda bulunur. Soldurmadan sonra uygulanan kıvrırma işlemi anında yaprak hücrelerinin ezilip parçalanmaları sonunda açığa çıkan hücre öz suyundaki polifenollerle enzimler oksijen karşısında tepkimeye girerek fermentasyon adı verilen yükseltgenmenin gerçekleşmesine neden olurlar.

Polifenollerden flavanollerin (kateşinlerin) polifenol oksidaz enzimiyle tepkime mekanizması ile yükseltgenme ürünlerinin şematik görünümü Şekil 2.1.3.1.' de gösterilmiştir. Polifenol oksidaz enzimi oksijen vererek etki yaptığı kateşinin yükseltgenmesine neden olur. ($RO + 1/2 O_2 \rightarrow RO_2$). Şekil 3.1.3.1.'den görüldüğü gibi polifenol oksidaz enziminin üzerinde etki yaptığı çay kateşinlerinin büyüklüklerine uyan etkin yöreler bulunmaktadır. Bu etkin yörelere giren kateşinlerle polifenol oksidaz enzimi önce bir ara ürün oluşturur. Daha

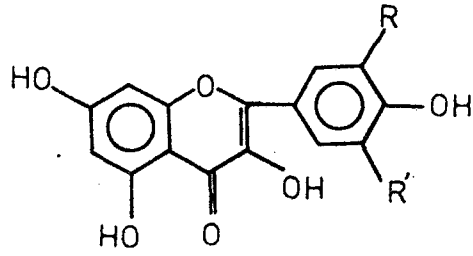
sonra enzim, kateşinlere oksijen (O_2) vererek değişik son ürünlerin oluşmasını sağlar. Polifenol oksidaz enzimi ile kateşinlerin Şekil 2.1.3.1.' de şematik olarak gösterilen tepkimeler sonunda siyah çayın niteliği üzerine önemli etkiler yapan maddeler oluşur. Theaflavinler (TF) ve thearubiginler (TR) yukarıda açıklanan tepkimeler sonucu oluşan en önemli iki pigmenttir.



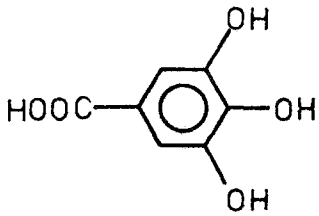
Şekil 2.1.3.1. Flavanollerin (kateşinlerin) Yükseltgenmeleriyle Fermentasyon Ürünlerinin Oluşmasının Şematik Görünümü

Fermentasyon anında cereyan eden tepkimelerle bunların etkileri üzerinde aşağıda ayrıntılı bilgi verilmiştir.

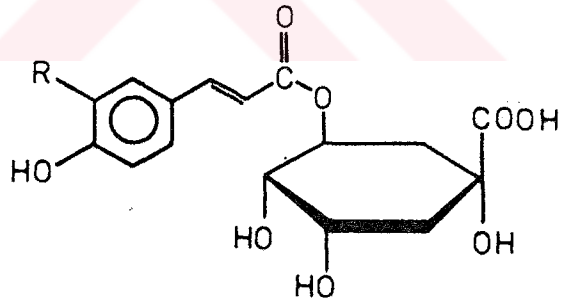
(a) Fermentasyon anında polifenolik bileşiklerin değişimi: Siyah çayın işlenmesinde fermentasyon anındaki en önemli değişme polifenolik bileşiklerde olur.



Kaemferol; $R=R'=H$
 Quersitin; $R=OH, R'=H$
 Mirisetin; $R=R'=OH$



Gallik asit



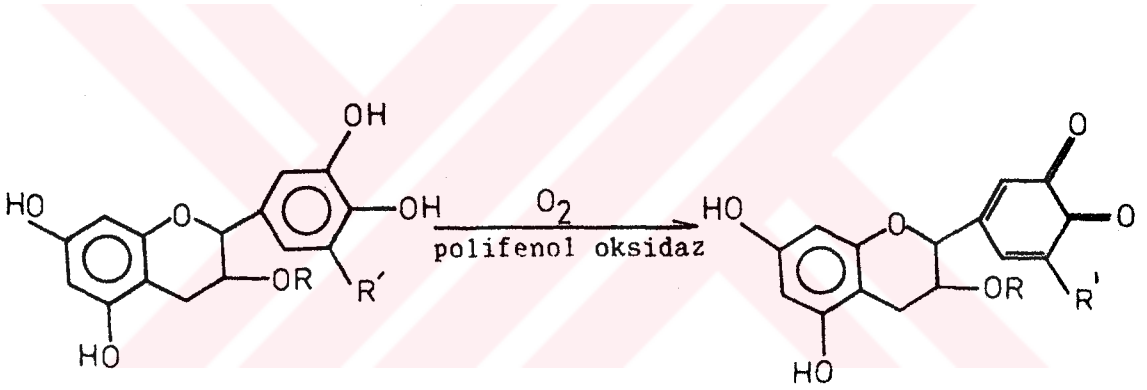
Klorogenik asit; $R=OH$
 p-Kumarilkuinik asit; $R=H$

Şekil 2.1.3.2. Flavonoller

Polifenolik bileşikler içerisinde özellikle flavanoller (kateşinler) polifenol oksidaz enzimiyle yükseltgenir. Renksiz olan flavanoller anılan tepkimeler sonucu portakal-sarıdan kırmızı kahverengine değin değışen renklerdeki karmaşık bileşiklere dönüşürler. Bu arada çok sayıda uçucu bileşikler oluşur. Çayın demi renk, kuvvet ve nitelik kazanırken siyah çaya özgü aroma oluşur. Çay yaprağının yeşil rengi bakırmısl kırmızıya dönüşürken aşırı buruk tadı ve otsu kokusu yiter, sonuçta amber kokulu hoş bir içecek elde edilir.

1. Flavanollerin yükseltgenmesi ve theaflavinlerin (TF) oluşumu:

Çayın fermentasyonunda ilk aşamada, flavanoller, polifenol oksidaz enzimi yardımıyla oksijen alarak yükseltgenir ve aşağıdaki formülde gösterildiğı gibi quinonlar oluşur.



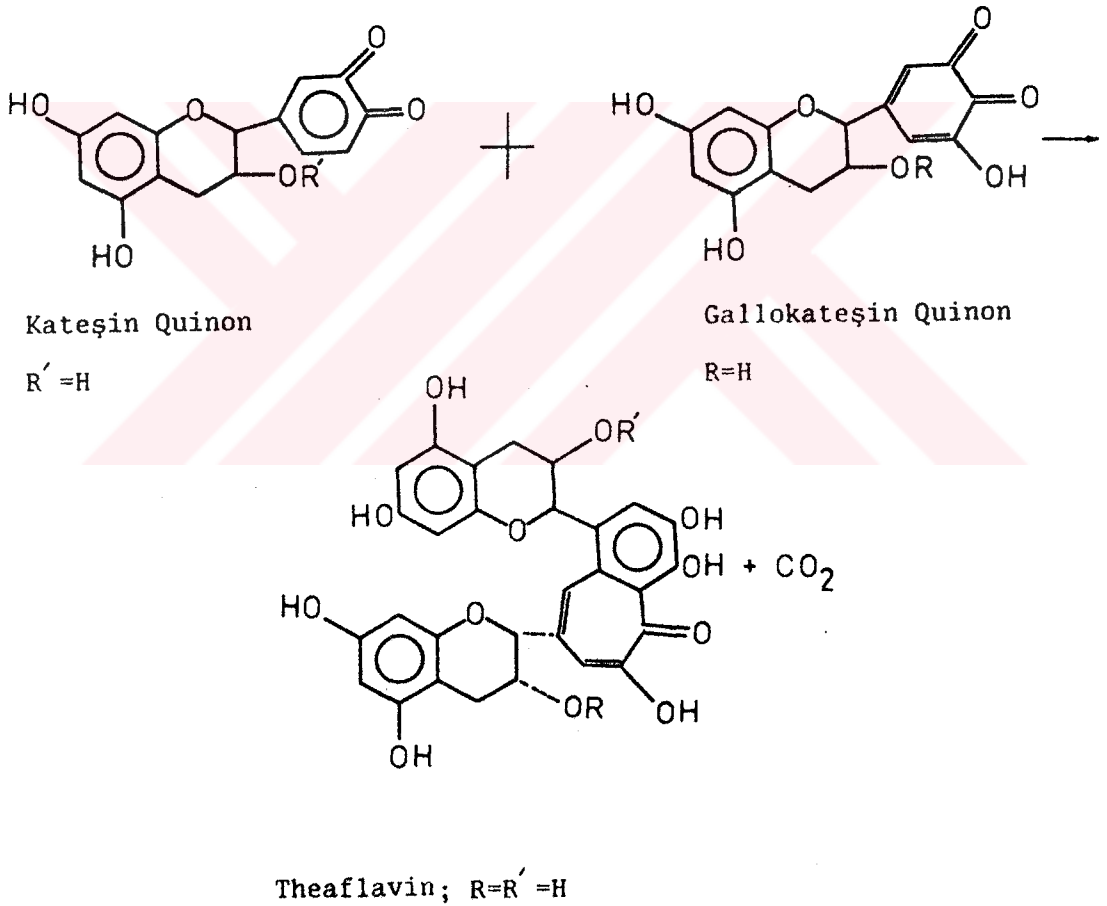
Şekil 2.1.3.3. R=H yada 3,4,5-trihidroksibenzoil

R'=H yada OH

Flavanoller içerisinde gallokateşin, epigallokateşin ve epigallokateşingallat anılan tepkimeyi daha çok gösterir. Yükseltgenmenin bu ilk aşamasında oluşan quinonlar yüksek düzeyde reaktif maddelerdir. Bu nedenle, ilk aşamada oluşan quinonlar fermentasyonda daha sonraki tepkimelerin hızla cereyan etmesini sağlarlar.

Açık formülleri Şekil 1.3.2.1.' de gösterilen epikateşinden, epikateşingallattan ve kateşinden oluşan quinonlar, epigallokateşinden, epigallokateşingallattan ve gallokateşinden meydana gelen quinonlarla tepkimeye girerek aşağıdaki formülde gösterildiği gibi theaflavin (TF) adı verilen bileşikleri oluştururlar.

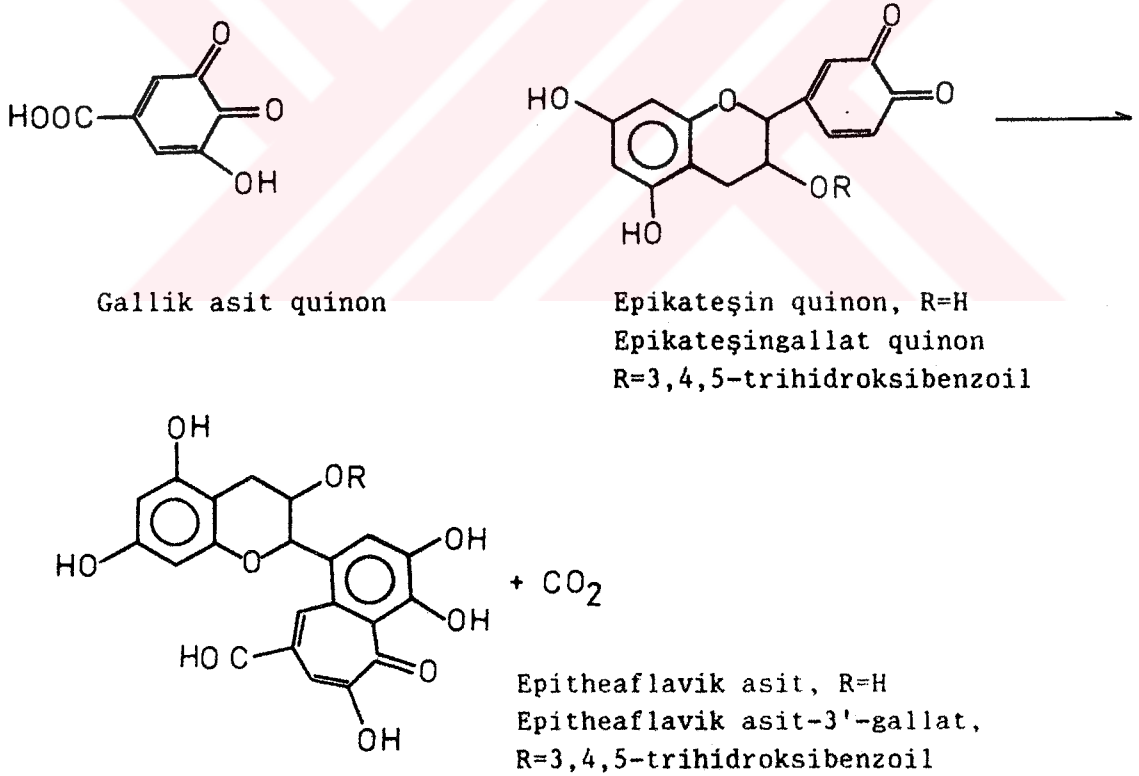
Fermentasyon anında oluşan ve içtiğimiz çayın niteliği üzerine birinci derecede etkili olan theaflavinlerin izole edilerek yapılarının belirlenmesi ve açıklığa kavuşturulması üzerinde değişik araştırmacılar çalışmışlardır.



Şekil 2.1.3.4. Theaflavinler

Theaflavinler çözeltili halinde parlak portakal-kırmızı bir renk gösterirler. Çay deminin niteliği üzerinde olduğu kadar parlaklığı üzerinde de önemli etkiye sahiptirler. Siyah çayın kuru maddesinde toplam TF konsantrasyonu %0.3 ile %1.8 arasında değişir. Fermentasyon süresinin normalin üzerinde uzaması halinde TF miktarının azaldığı görülmüştür. Yapılan araştırmalar çay yapraklarında ve tomurcuğunda bulunan flavanollerin yaklaşık %10'unun, siyah çayın fermentasyonu anında theaflavinlere dönüştüğünü göstermiştir.

2. Theaflavik Asitler: Polifenol oksidaz enzimiyle doğrudan yükseltgenmemesine karşın gallikasit, flavanollerin yükseltgenme ürünleriyle tepkimeye girerek gallikasit quinon bileşiğine dönüşür. Epikateşinin, epikateşingallatın ve kateşinin quinonları ile gallikasit quinon bileşiği tepkimeye girdikleri zaman aşağıdaki formülde gösterildiği gibi theaflavik asitler oluşur.

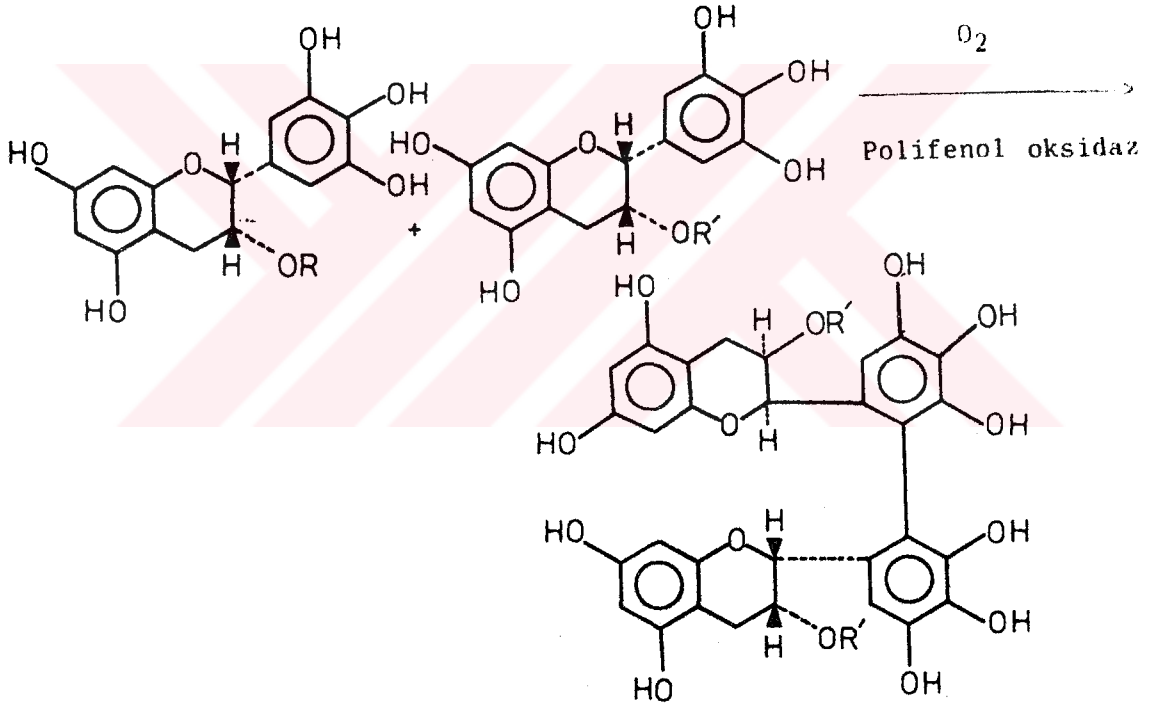


Şekil 2.1.3.5.Theaflavik Asitler

Theaflavik asitler parlak kırmızı ve asidik özelliğe sahip bileşikler olup siyah çayda çok az miktarlarda bulunurlar. Bu olgu theaflavik asitlerin yüksek düzeyde reaktif madde olmalarına dayanılarak açıklanmıştır.

3. Bisflavanoller: Epigallokateşin ile epigallokateşin gallatın polifenol oksidaz enzimi yardımıyla tepkimeye girerek yükseltgenmeleri sonunda aşağıdaki formülde gösterildiği gibi bisflavanoller oluşur.

Siyah çay içerisinde bisflavanoller çok az miktarda bulunur. Bisflavanoller de yüksek reaktif maddelerdir.



Bisflavanol A; R=R' 3,4,5-trihidroksibenzoil

Bisflavanol B; R=3,4,5-trihidroksibenzoil

Bisflavanol C; R=R'=H

Şekil 2.1.3.6. Bisflavanoller

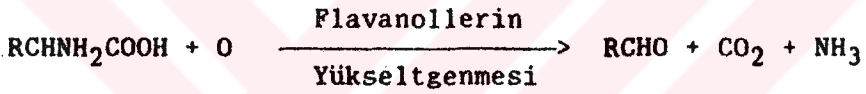
4. Thearubiginler(TR): Siyah çayın işlenmesi anında çay flavanollerinin yaklaşık %15'i değişmeden kalırken, yaklaşık %10'u theaflavine(TF), theaflavanik aside ve bisflavanole dönüşür. Flavanollerin geriye kalan yaklaşık %75'i ise thearubigin(TR) adı verilen, yapısı karmaşık olan ve tam olarak izole edilemeyen maddelere ayrılır. Kırmızı-kahverengi olan thearubiginlerin kimyasal yapılarıyla ilgili çalışmalar günümüzde de sürmekte olup henüz aydınlığa kavuşturulamamış pek çok nokta bulunmaktadır.

Thearubiginler çay deminin rengi, kuvveti üzerine olduğu gibi çayın damak tadı üzerine de önemli ve olumlu etkiler yaparlar. Fermentasyon süresi ve sıcaklık, oluşan theaflavin(TF) ve thearubigin (TR) miktarları üzerine önemli etki yapar. Düşük sıcaklıklarda daha çok theaflavin oluşur. Fermentasyonun başlangıcında yüksek olan theaflavin miktarı giderek azalır. Buna karşın fermentasyonun başında az olan thearubiginlerin miktarı ise giderek artar. Bununla ilgili olarak çay deminin özelliklerinde de değişiklik görülür. Örneğin fermentasyonun başlangıcında demin burukluğu ve parlaklığı yüksek iken theaflavinlerin miktarlarına paralel olarak fermentasyon süresinin uzaması durumunda demin burukluğu ve parlaklığı azalır. Fermentasyonun sonuna doğru artan thearubiginlerin miktarlarına paralel olarak çay deminin kuvveti de artar.

(b) Fermentasyon Anında Çay Aromasının Oluşumu: Aroma, siyah çayın tüketici tarafından aranmasında ve pazarda yüksek fiyatla satılmasında en önemli etmenlerden biridir. Aromalı çaylar uluslararası pazarlarda normaline göre 2-3 kat daha fazla fiyatla satılabilmektedir.

Yapılan çalışmalar siyah çayda aromanın fermentasyon anında oluştuğunu göstermiştir. Siyah çaya işlemenin değişik aşamalarında aroma bileşiklerinin oluşumu üzerine yapılan çalışmalarda bu bileşiklerin büyük bölümünün fermentasyon anında oluştuğu bulunmuştur.

Çayda aromayı oluşturan uçucu bileşiklerin sentezi ile ilgili başlıca iki mekanizma önerilmiştir. Bu iki mekanizmadan birine göre: Aroma bileşikleri, çay flavanollerinin polifenol oksidas enzimi ile yükseltgenmesi sürecinde oluşmaktadır. Diğer mekanizmaya göre: Çayda aroma bileşikleri doğrudan biyosentetik tepkimeler sonucu oluşmaktadır. En çok kabul gören ilk mekanizmaya göre: Fermentasyon anında polifenoloksidaz enzimi ile flavanoller yükseltgenirken özellikle amino asitlerinin, karotenoidlerin ve doymamış yağ asitlerinin de yükseltgenmesiyle aroma bileşikleri oluşmaktadır. Örneğin flavanollerin yükseltgenmeleri anında aminoasitler, aşağıdaki formülde gösterildiği gibi, karbonil bileşiklerine dönüşerek aroma bileşiklerinin oluşmasına yol açarlar.



(c) Fermentasyona Etki Eden Faktörler: Soldurulmuş çay yapraklarının kıvrırma işlemi anında, ezilip parçalanan hücrelerden dışarı çıkan hücre özsuğu çay yaprağı parçacıklarının üzerine ince bir tabaka halinde bulaşır (Şekil 3.1.3.7.). Polifenollerle karışan enzimler yardımcı oldukları yükseltgenme ile bir seri değişmelere neden olurlar.

Siyah çayın işlenmesinde ideal bir fermentasyon yöntemi bulunmamıştır. Bunun en önemli nedeni çok çeşitli etmenlerin fermentasyona etki yapmasıdır.

Aşağıda fermentasyona etki eden etmenler üzerinde ayrıntılı bilgi sunulmuştur:

1. **Fermentasyon Süresi:** Fermentasyon süresi hoş gidecek bir çayın deminin elde edilmesine yetecek kadar uzun olmalıdır. Sürenin

gereğinden fazla uzunluğu yada kısalığı olumsuz etkilere yol açtığı için istenmez. Fermente olmamış çay yaprağından hazırlanan dem, yeşil renkli ve hamdır. Bu özelliğın ifade edilmesinde bazen "madeni" sözcüğü de kullanılır. Süre uzadıkça önemli değişiklikler oluşur. Fermentasyonda belli bir süreye değin çay deminin kuvveti, rengi, niteliği ve burukluğu artar.

İsteğe uygun siyah çay üretiminde fermentasyon süresi dikkatle kontrol edilir. Fermentasyon süresi uzatıldığında çay deminde fazla renk ve daha az nitelik, süre kısaltıldığında daha az renk ve daha fazla nitelik oluşur. Bu durum, çayda TF ve TR kapsamlarının uygun oranlarda bulunmasıyla yakından ilgilidir. Çayın TR kapsamının artması, TF' nin etkisini göstermesine engel olarak çay deminin zayıf ve niteliksiz olmasına yol açar.

Çayın işlenmesinde kıvrırma dahil fermentasyon süresi genelde 3.5 ila 4 saat arasında değişir. Assam'da yapılan bir araştırmada 26.7 °C de ve 6 - 15 saatlik bir fermentasyon süresinde üstün nitelikli siyah çay üretildiği belirtilmektedir.

2. Sıcaklık: Fermentasyonda cereyan eden yükseltgenme tepkimeleeri, enzim aktivitesiyle ve enzim aktivitesi de sıcaklıkla yakından ilgilidir. Çayın fermentasyonunda önemli ölçüde görev yapan polifenol oksidaz enzim aktivitesi ile sıcaklık arasındaki ilişki araştırılmış, 35°C'de yapılan fermentasyon anında süre ile ilgili olarak polifenol oksidaz enzim aktivitesinin hızla azaldığı bulunmuştur. Enzimler, 54°C'de yada daha yüksek sıcaklık derecelerinde polifenolleri denatüre olduğu için, aktivitelerini yitirerek görev yapamaz şekle dönüşürler.

3. Çay Yapraklarının Serilme Kalınlığı ve Yoğunluğu: Serilme kalınlığına bağlı olarak çay yapraklarında sıcaklık yükselir. Sıcaklık yükselmesinde başta nisbi nem olmak üzere fermentasyon şartlarının önemli etkisi hiç unutulmamalıdır. Alt tabakalardaki çay yapraklarına

havanın ulaşabilmesi için serme kalınlığının 7.5 cm'den fazla olmamasına dikkat edilmelidir.

4. Oksijen (O_2) Konsantrasyonu: Çay yaprağı parçacığının üzerini ince bir tabaka halinde kaplayan hücre öz suyunda bulunan polifenollerin polifenol oksidaz enzimi yardımıyla yükseltgenmesi ve TF oluşması için bol miktarda O_2 'e ihtiyaç vardır. Nitekim oksijen gazı ile zenginleştirilmiş havanın kullanılması halinde fermentasyon sonucu çayda daha fazla TF oluştuğu bulunmuştur.

5. Fermentasyon Odası ve Koşulları: Fermentasyon odasının sıcaklığı kadar nem durumu da fermentasyon için önemlidir. Fermentasyon sırasında gün ışığının çayın görünümüne olumsuz etki yapabileceği düşünülerek geçmişte fermentasyon odalarında kırmızı, yeşil ve mavi camlar kullanılmıştır. Doğrudan gelen normal gün ışığının olumsuz etki yapmadığının anlaşılması üzerine fermentasyon odasında renkli cam uygulamasına son verilmiştir.

Önceleri çay yaprakları tahta yada beton bir zemin üzerine 7.5 cm kalınlığında serilmiştir. Havanın alt kısımlara az nüfuz etmesi, fermentasyonun düzenli olmaması ve zeminin temiz tutulmasındaki güçlükler nedeniyle bu uygulamaya da son verilmiştir. Daha sonraları temizleme kolaylığı, yerden tasarruf sağlama vb. nedenlerle galvanizli sac, alüminyum tepsilerin kullanılmasının bir sonucu olarak siyah çayda önemli derecede alüminyum bulaşması olmuştur.

Geçen süre içinde bilgi birikiminden ve gelişen teknikten yararlanılarak fermentasyon uygulamasında değişiklikler yapılmıştır. Modern yöntemlere göre delik genişlikleri 6mm olan eleklerle alt kısımları kaplı olan fermentasyon arabaları yeknesak bir şekilde ve aynı kalınlıkta yüklenirler. Arabaların üst kısmında 5 cm kadar bir boşluk bırakılır. Fermentasyon tünelineki hava sıcaklığı 24-28 °C arasında ve fermentasyon odasının bağıl nemi de % 90 civarında tutulur.

6. Fermentasyona Etki Eden Öteki Faktörler: Çay yapraklarının çeşidi, körpe yada kart oluşu, toplanma standardı, çay ocağının bu danma yaşı, gelişme şartları vb. etmenler fermentasyon süresi ile sonuçları üzerine önemli etki yapar. Genç çay bahçelerinden toplanan yapraklar, yaşlı çay bahçelerinden toplananlara göre daha kısa sürede fermentasyona uğrar. Deniz seviyesine yakın yada deniz seviyesinden yükseklerdeki çaylıklardan alınan çay yapraklarının, farklı iklimlere sahip yörelerden toplanan çay yapraklarının, değişik sürgünlerin ve hatta sürgün üzerindeki farklı yaprakların fermente olma durumları farklıdır. Fermentasyon üzerinde çay yapraklarının soldurma ve kıvrırma durumları da önemli etki yapar. Kıvrırma işleminden sonra elekten geçirilen çay yaprakları tasnif edilir ve her gurup ayrı ayrı fermente edilir.

(d) Fermentasyonun Tamamlanıp Tamamlanmadığının Belirlenmesi: Çay yapraklarında oluşan aromaya ve renk değişikliklerine bakılarak fermentasyonun durumu üzerinde karar verilmesi, yaygın bir şekilde uygulanan bir yöntem olmuştur. Çay yapraklarında sıcaklığın düşmeye başlaması fermentasyonun tamamlanmış olduğuna bir işaret olarak kabul edilmektedir. Fermentasyonun tamamlanıp tamamlanmadığını en iyi ve en doğru şekilde theaflavin(TF) ve thearubigin(TR) belirlemeleriyle yapılmaktadır.

Siyah çayın işlenmesi anında çay yapraklarında hücrelerin ezilip parçalanmalarındaki etkinliklerin belirlenmesinde yine TF ve TR belirlemelerinden büyük ölçüde yararlanılmaktadır.

2.1.4. Kurutma

Kurutmanın amacı, çay yaprağının nem kapsamını belli bir düzeye indirerek fermentasyonu durdurmak, kazanılan özelliklerin ve oluşan maddelerin korunabileceği ortamı hazırlayıp siyah çayı depolanabilen,

paketlenebilir ve taşınabilir duruma sokmaktır. Bu nedenle kurutma, yeşil çay yaprağının siyah çaya işlenmesinde en kritik işlem olarak kabul edilir. Fermentasyon tamamlandığı zaman nem kapsamı yaklaşık %45-50 olan çay yaprağı kurutularak siyah çaya dönüştüğünde %3 civarında nem içerir. Fırına giren havanın sıcaklığı 87-99°C arasında ve çıkan havanın sıcaklığıda 50-55°C arasında değişir. Kurutma işlemi 20-25 dakika arasında tamamlanır.

(a) Kurutmada Önemli Fiziksel ve Kimyasal Değişiklikler: Kurutma anında buharlaşarak yiten su nedeniyle soldurulmuş çay yaprağının ağırlığı yarıdan daha fazla azalır. Kahverengi yada bakırimsı-kırmızı rengini yitiren fermente olmuş çay yaprakları siyah çaya dönüşür. Bu olgu klorofilin feofitine ve feoforbide dönüşmesi ile ilgilidir. Bu dönüşüm çay yaprağının sahip olduğu asidik koşullarda ve yüksek sıcaklıkta gerçekleşir. Dondurarak kurutma yada fermente olmuş çay yaprağı pH'sını yükseltme durumunda ticari değeri düşük koyu kahverengi çayın üretildiği anlaşılmıştır.

Polifenol oksidaz enzimi dahil öteki tüm enzimler kurutma anında tüm aktivitelerini yitirirler. Bu nedenle siyah çayda biyokimyasal tepkimeler durur. Fermente olmuş çay yaprağındaki polifenollerin yüksek kurutma sıcaklığında proteinlerle birleşmeleri sonucunda buruk tad azalır. Kurutma öncesi çay yaprağında acı ve metalik olan tad yiter ve yerine hoş bir tad oluşur. Şekerler yanarak karamelize olurken çay yaprağında değişikliğe uğramadan kalmış kateşinler, epimerizasyon adı verilen yavaş bir yapı değişikliğine uğrar.

Kurutma öncesi çeşitli nedenlerle çay yaprağına bulaşmış bulunan bakteri ve mantarlar yüksek sıcaklıkta yaşamlarını tamamen yitirirler. Bu nedenle siyah çayda mikroorganizma faaliyeti görülmez.

(b) Çayın Kurutulmasından Sonra Dikkat Edilecek Hususlar: Kurutma fırınından çıkarılan ve sıcaklığı fırın sıcaklığına yakın olan çay, zaman yitirmeden soğutulmalıdır. Fırından çıkarıldıktan sonra

soğutulmadan ambarlanan çay pişmiş bir karakter kazanırken azda olsa niteliğini yitirir. Kurutma fırınından çıkan çay yaklaşık %3 nem içerir. Soğutma anında çay, azda olsa bir miktar nem absorbe eder. Bu aşamada kazanılan nem miktarının yüksek olmamasına dikkat edilmesi büyük ölçüde önem taşır. Bunun için çayın soğutulma işlemi olabildiğince kısa sürede gerçekleştirilmelidir.

Fırından çıkarıldıktan hemen sonra derecelendirilip sınıflandırılan çay, grimsi bir renk alır ve dış kısımları gevrek olan çay parçacıkları kolaylıkla kırılır. Bu nedenle sınıflandırmadan önce çayın, tüm parçacıklarının homojen bir şekilde ve aynı miktarda nem içerecek şekilde soğutulması büyük önem taşır.

(c) Kurutma Sonrası Oluşan Değişiklikler: Fermentasyonda görev yapan enzimler kurutma aşamasında etkisiz hale gelir. Sıcaklığa dayanıklı peroksidaz enziminin, fermentasyon anında gösterdiği aktivitesinin %1.5'ünü kuru çay içerisinde de gösterdiği belirtilmiştir.

Gözlem ve deneyimler fırından çıkarılan kuru çayın belli bir süre içerisinde olgunlaştığını, çayda demin sertliğini ve yumuşaklık kazandığını göstermiştir. Bu durum, iyi ve uygun şekilde yapılan bir kurutma sonrası 2 yada 3 haftadan başlayarak bazen üç aya kadar uzanan bir süre içerisinde ileri fermentasyon işleminin tamamlanmasıyla gerçekleşir. Normalin üzerinde nem içeren yada fazla miktarda nem absorbe etmiş bulunan kuru çayda ileri fermentasyonun çok ileri bir şekilde gerçekleşmesi nedeniyle çay kısa sürede erken olgunluğa erişir. İçerdiği nem miktarına bağlı olarak çayın bozulma hızı artar. Depolama süresi uzadıkça bu durum çok daha açık bir şekilde ortaya çıkar. Böyle durumlarda çay tekrar kurutulmak suretiyle zararlanma derecesi azaltılır. Tamamıyla kurutulan çaylarda biyokimyasal değişiklikler kuramsal olarak durur. Kurutma işleminden çıkan çay havadan nem kapar. Kuru çay piyasaya verilmeden önce fazla nem içeriyorsa tekrar kurutulması gerekir. Bu tekrar kurutma işlemi kuru çayın kalitesine zarar verebilir.

2.1.5. Çayın Sınıflandırılması ve Derecelendirilmesi

(a) Çayın Sınıflandırılması: Geniş anlamda çay 1. Fermente olmamış çay - Yeşil Çay, 2. Fermente olmuş çay - Siyah Çay, 3. Yarı fermente olmuş çay - Oolong Çay, 4. Tablet Çay, 5. Konsantre Çay, 6. Özçay (Instant tea), 7. Sider Çay, 8. Pikled Çay, 9. Daldırma Çay vb. şeklinde sınıflandırılabilir. Bunların arasında en fazla üretilen ve tüketilen siyah çaydır. Bunu yeşil çay izler.

Üretildikleri ülkelere göre de çay sınıflandırılmaktadır. Örneğin siyah çay: Hindistan çayı, Seylan çayı, Türk çayı vb. şeklinde sınıflandırılır. Çayın işleme tekniğinin dikkate alınmasıyla yapılan sınıflandırma son yıllarda giderek yaygınlaşmaktadır.

(b) Çayın Derecelendirilmesi: Çayın derecelendirilmesi, kuru çayda bulunan değişik boyutlardaki çay parçacıklarının fiziksel olarak ayırt edilmesi işlemine dayanır. Bunun için mekanik olarak hareket eden delik genişlikleri farklı elekler kullanılır. Günümüzde çay, eleklerin delik genişlikleri esas alınarak derecelendirilmektedir. Çayın niteliği üzerinde de bilgi vermeye yarayan derece isimlerinin kökeni, Çin'deki çay fabrikaları ile bunların ayırma ve eleme sistemlerinde uygulanan sözcüklere dayanmaktadır.

Çayın derecelendirilmesinde genelde kabul görmüş somut ve tek bir sistem yoktur. Bu nedenle üretici ülkeler arasında çayın derecelendirilmesi yönünden bir birlik yoktur. Çayların derecelendirilmesinde yaş çay yaprağının toplama standardı önemli bir etmendir. Çay bitkisinin çeşidi, yetiştirildiği yerin deniz seviyesinden yüksekliği vb. şartlarda renk ve öteki özellikler yönünden çayın derecelendirilmesine etki yapar.

Çayın derecelendirilmesinde bir başka etmen de soldurmadır. Fazla solmuş çay yaprağı, kıvrırma makinalarında yeterince bükülmez ve kırılır. Kıvrırma, çaydaki parça büyüklüklerini temelde etkilemek

suretiyle çayın derecelendirilmesi ve derece randımanı üzerine etki yapar.

Çay fabrikalarında, önemi nedeniyle derecelendirme odası, iyi ı-şıklandırılmış, iyi havalandırılmış, yeteri kadar geniş ve temiz olmalıdır.

2.1.6. Çayın Depolanması ve Paketlenmesi

Tüketiciye ulaşınca kadar çay depolama süreci içerisinde, koşullarada bağlı olarak, çayda bir takım biyokimyasal ve kimyasal de-ğişiklikler oluşur. Fırından çıktığı zaman %3 civarında nem içeren ve higroskopik bir özellik kazanmış bulunan çay çevreden hızla nem absorbe eder. Kurutma fırınından çıkarılan siyah çayın demi ham yada olgunlaşmamış bir tada sahiptir. Uygun koşullar altında bir kaç hafta depoda saklanması halinde çay deminin ham olan tadının yerini yumuşak bir tad ve hoş bir koku alır.

Çayın özelliklerini yitirmesi üzerine sadece nem kapsamının yük-sek olması değil ortam sıcaklığının yüksekliği ile gereğinden fazla havanın bulunması da önemli derecede etki yapar. İyi soldurulmuş yap-raklardan işlenen çayların özellikleri daha kalıcı olup kolay yitmez.

Depoya konulacak çayın: 1. Olabildiğince az nem içermesine, 2. Fırında kurutmanın uygun şekilde gerçekleştirilmesine ve çayda kabuk bağlamanın oluşmamasına ve 3. Fırından çıktıktan sonra çayın normalin üzerinde fazla nem absorbe etmemiş olmasına özellikle dikkat edilme-lidir.

Depoda saklanan çayın nem absorpsiyonu üzerine aşağıdaki faktör-ler ayrı ayrı yada birlikte etki yaparlar. Bunlar:

1. Çayın depoya konulduğu andaki nem kapsamı,
2. Çayın depoda bulundurulma süresi,
3. Deponun açılma sayısı,

4. Deponun büyüklüğü ve depolanan çayın miktarı,
5. Depoya konulan çayın küçük yada büyük parçacıklı olması,
6. Deponun inşa biçimi ve yalıtım durumu,
7. Çayın depoda bulundurulduğu süre ile paketleme anında genel hava koşullarıdır.

Paketleme öncesi değişik dereceli çayların belli oranları standartlara uygun şekilde harman edilir. Paketleme öncesi çayların nem kapsamları belirlenmelidir. Nem kapsamı normalin üzerinde olan çaylar son olarak bir daha kurutmaya tabi tutulur. Son kurutma ile çayın nem kapsamı %3-5'e düşürülür. Çayların nem kapsamlarının yükselmesini engellemeye ilişkin önlemler uygun şekilde bir paketleme ile tamamlanmalıdır.

Çay, genellikle paketleme makinalarında ve gerektiğinde elle paketlenir. Çay paketlerinin içine nem geçirmeyen ve kokusu çaya bulaşmayan ince bir örtü yerleştirilmelidir(1).

BÖLÜM III. KULLANILAN YÖNTEMLER

3.1. Kromatografik Ayırma ve Tayinler

Kromatografi, kimyasal bir karışımı oluşturan farklı yapıdaki maddelerin biri sabit faz, diğeri hareketli faz olmak üzere birbiri ile karışmayan iki faz arasındaki dağılım dengelerine dayanarak yapılan bir ayırma, saflaştırma ve teşhis işlemidir.

İlk uygulamalar 1850 yıllarına dayanır. Fakat 1906-1907 yıllarına kadar fazla bir gelişme göstermemiştir. 1907 de Rus botanikçisi Tswett bitki boyar maddelerini , özellikle yaprak ekstresini $CaCO_3$ ile doldurduğu bir kolona tatbik etmiş ve üzerinden organik bir çözücü geçirdiğinde yaprak boyar maddelerinin bantlar halinde ayrıldığını görmüştür.

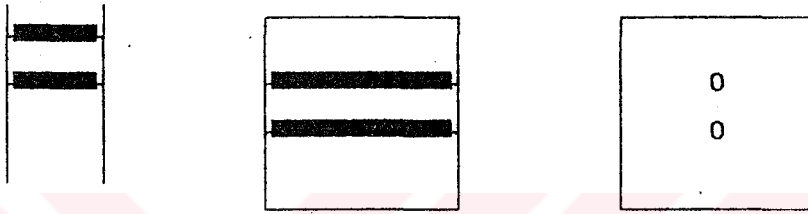
Bugün kromatografi, karışımların ayrılmasında, saflaştırılmasında ve tanınmalarında en çok kullanılan yöntemlerden birisidir. Hatta fiziksel ve kimyasal özellikleri birbirine çok yakın bileşiklerden oluşan bir karışımı destilasyon, kristalizasyon gibi yöntemlerle ayırmak zorken ve hatta imkansız iken kromatografi ile kısa sürede ayırmak mümkündür.

Adsorbsiyon kromatografisinde sabit faz çok ince taneciklerden oluşmuş, toz görünümünde bir katıdır. Dağılım kromatografisinde geniş bir yüzey alan sağlamak üzere katı destek (adsorban) taneciklerine emdirilmiş bir sıvıdır. Hareketli faz ise, sabit fazla doldurulmuş kolondan inceleyeceğimiz karışımı geçiren, sıvı ya da gaz olabilir.

Kromatografi, uygulama biçimine göre; Kağıt, Kolon, İnce Tabaka, Gaz ve Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi olarak sınıflandırıldığı

gibi, ayırmanın dayandığı kuvvetlere göre; adsorbsiyon, partiyon (Dağılma), iyon değiştirme (Jel Filtrasyon) kromatografisi olarak, metoda göre yapılan ayırmalar ise; inen, çıkan, hem inen hem çıkan, tek yönlü ve çift yönlü kromatografi olarak sınıflandırılır.

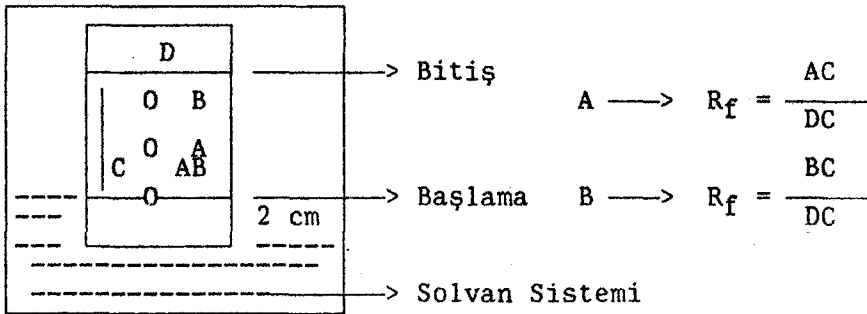
Kromatografik ayırmalarda karışım içindeki maddelerin sabit faz üzerinde değişik gç etmelerine göre maddeler sütun kromatografisinde halkalar halinde kağıt ve ince tabaka kromatografilerinde leke veya bantlar halinde ayrılırlar.



Şekil 3.1.1. Leke ve Bantların Ayrılması

Kromatografik ayırma işlemlerinde sabit faz ve hareketli fazın seçimi önemlidir. Ayrıca uygun sıcaklığın seçimi, ayrılması istenen örneğin cinsi, sabit fazın bulunduğu ortamın hareketli faz buharları ile doygunluğu gibi etkenler ayırma işlemini etkiler.

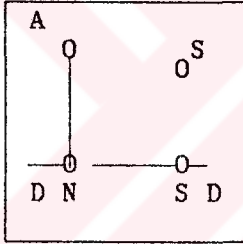
Kağıt ve ince tabaka kromatografisi ile yapılan kromatografik ayırmalarda, R_f değeri diye adlandırılan bir terim vardır.



Şekil 3.1.2. R_f Değerinin Bulunuşu

Bu R_f değerleri kromatogram üzerinde o maddenin göç hızını gösterir. Eğer madde çözücü ile ilerlerse $R_f=1$, tatbik noktasında kalırsa $R_f=0$ olur. Yine R_f değeri ayırmalarda kâğıt ve ince tabakanın büyüklüğüne bağlı olmaksızın 1'den küçüktür. R_f belirli koşullarda bir bileşiğin fiziksel bir sabitidir. Fakat mutlak bir R_f değeri verilemez. Bunun için, eğer bir maddeyi teşhis amacıyla kromatografi ediyorsak, tahmin edilen şahit madde ile aynı koşullarda karşılaştırma yapmak gerekir.

Dış etkileri ortadan kaldırmak için standart kullanılarak bulunan R_f değerleri R_{st} ile gösterilir. Buna göre R_{st} değeri ayırma sonucu elde edilen lekenin orta noktasının tatbik noktasına olan uzaklığının aynı kromatogramda standart maddeye ait olan lekenin tatbik noktasına olan uzaklığına oranıdır.



$$R_{st} = \frac{AD}{SD}$$

Şekil 3.1.3. R_{st} Değerinin Hesaplanması

3.2. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

Dayandığı prensip hem partiyon hem de adsorbsiyondur. Bunda da iki faz vardır (1.Sabit faz, 2.Hareketli faz). Sabit faz bir adsorban olup ince bir plaka üzerine (cam, plastik veya Al plaka olabılır) yayılır. Ayrılması istenilen madde karışımı bir çözücüde çözümlenerek noktalar halinde damlatılır. 1969 yılında yapılan bir çalışmada TLC ile çaydaki polifenollerin ayrılması ve belirlenmesi sağlanmıştır(2).

Sabit fazın hazırlanması: İnce tabaka plakaları piyasada hazır olarak satıldığı gibi laboratuarda da hazırlanabilir. Laboratuarlarda kullanılan cam plakların boyutları 5x20, 10x20 ve 20x20cm dir. Fakat çok ufak olarak bu işlemler lam'lar üzerinde de yapılabilir.

Plakların hazırlanması: 20x20 cm boyutlarında ve 0.5 mm kalınlığında 5 tane plak hazırlamak için genellikle 25 g adsorban gereklidir. Bunun iki misli kadar su konulur. Fakat su birden konulmaz. Önce 25 ml su ilâve edilir. İçerik süspansiyon haline geldikten sonra 25 ml daha su ilâve edilip tekrar karıştırılır. Daha sonra yayıcı hazneye dökülüp sabit faz plağa yayılır. Tüm bu işlemler 2 dakika içinde olmalıdır. Ayrıca kullanılan plaklar son derece temiz olmalıdır. Çekme işlemi yapıldıktan sonra plaklar oda sıcaklığında biraz bekletilir. Daha sonra etüvde 105-110 °C de 1-2 saat tutulur.

Kalitatif amaçlı çalışmalar için sabit faz en az 0.25 mm olmalıdır. Preparatif çalışmalarda bu kalınlık daha da artar. Eğer plaka üzerine selüloz çekilecekse su miktarı daha da artar. Aşağı yukarı 15 g selüloz için 60-90 ml su gerekebilir.

Hareketli Faz: Bir veya bir kaç çözücünden ibaret olabilir. Çözücüler analitik saflıkta olmalıdırlar. Eğer hareketli faz bir kaç çözücü karışımı ise toplam hacim 100 olacak şekilde belirtilirler.

Adsorbsiyon kromatografisinde çözücüler elüsyon kuvvetlerine göre elüotropik seri diye adlandırılan bir seride toplanmıştır. Çözücünün elüsyon kuvveti polaritesi ile artar. Örneğin metanol polar bir çözücü olması nedeniyle kuvvetli elüsyon etkisine sahiptir. Fakat hegzan zayıf bir elüsyon etkisine sahiptir.

Çözücülerin polaritesi hakkında dielektrik sabitleri bir ölçüdür. Bir çözücünün dielektrik sabiti ne kadar yüksekse okadar polarıdır. Dielektrik sabitlerine göre çözücülerin sırası; Petroleteri(1), n-hegzan, heptan, sikloheksan, CCl₄, toluen, benzen, CHCl₃, nitrometan, eter, C₂H₅COOH, piridin, THF, aseton, C₂H₅OH, CH₃COOH, CH₃OH(34), su(80) şeklindedir.

Örneklerin plakta görülebilmesi için en az % 0.1 veya % 1 lik çözeltisi olmalıdır. Bundan 1-10 µl civarında damlatılır. Örneklerin yeri plağın yan kenarından en az 1 cm alt kenarından ise 1.5 cm olacak şekilde işaretlenir. Yine örneklerin uygulanmasında kapiler cam borular kullanılır. Fakat kantitatif çalışmalarda 10 µl'lik mikro pipetlerde kullanılır. Bu yöntemde de lekelerin fazla yayılmamasına dikkat edilir. Yani en fazla lekelerin çapı 5.5 mm olmalıdır.

Yürütme işlemi: Madde veya maddeler karışımının adsorbe ettirildiği kağıt veya tabakada hareketli fazın yürütülmesi işlemidir. Normal bir yürütmede başlama ve bitiş arasındaki mesafe 10 cm dir. İşlem ne kadar uzun sürerse ayırma o kadar iyi olur. Yürütme işlemi çeşitli şekillerde yapılabilir.

Lekelerin incelenmesi: Kromatogram üzerinde ayrılan lekeler eğer renkli ise gün ışığında görülür. Eğer maddeler renksiz ise UV bölgede kendileri absorpsiyon yapabilir. Ya da kısa veya uzun dalga boylu UV ışınlarına tutulduklarında floresans gösteriyorlarsa lekelerin yerini tesbit etmek kolaydır. Bunun için adsorbantı floresans veren bir madde ilave edilmelidir. Örneğin: Slikagel HF₂₅₄ floresans verebilen bir adsorbandır. Bu tip floresanlar içeren adsorbanlar üzerinde zemin yeşil görülür ve lekeler farklı renklerde görülür.

UV ışık altında görülmeyen lekeler kimyasal yolla belirgin hale getirilir. Bunun için de renk reaktifleri kullanılır. Belirteç seçiminde yine maddelerin yapısı göz önüne alınır. Bu belirteçlere örnek olarak, aminoasitler için ninhidrin, azotlu yapılar için ninhidrin, dragendorf, fenoller için FeCl₃, organik bileşikler için kromik asit çözeltisi (yakmak için) kullanılır.

3.2.1. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi (Prep.TLC)

Bu yöntemde kalın olarak çekilmiş bir adsorbant plağına maddeler karışımının belirli konsantrasyondaki çözeltisi bir çizgi halinde

tatbik edilir. 1987 de Oolong çayından bu yöntemle dört yeni flavanolun izolasyonu yapıldı(3).

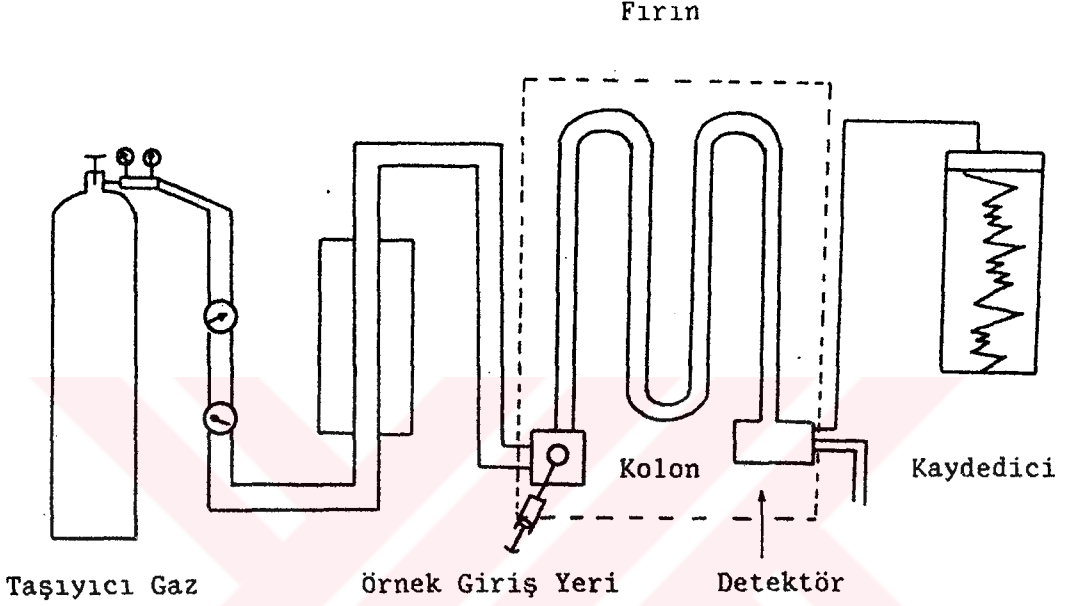
Plakaların Hazırlanışı: Yine piyasada hazır olarak preparatif plaklar vardır. Fakat laboratuarda 0.5-1 mm kalınlığında plaklar hazırlanabilir. Tatbik edilen madde miktarı da 10-50 mg arasındadır. 20x20cm lik bir plak için aşağı yukarı 20 g kadar adsorban kullanılmaktadır. Plaklar son derece temiz olmalıdır. Burada uygulanan yöntem çıkan usuldür. Bazan iyi bir ayırma için aynı solvan sistemine bir kaç kez konulabilir.

3.3. Gaz Kromatografisi

1941 yılında MARTIN ve SYNGE tarafından kromatografide hareketli faz olarak gaz kullanılabileceğinin ileri sürülmesi üzerine, 1952 yılında MARTIN ve JAMES'in çalışmaları sonucunda Gaz Kromatografisi cihazı geliştirilmiştir. Bu cihaz yardımıyla karışımlardaki kaynama noktası çok yakın olan bir çok maddenin ayrılması mümkün olmaktadır. Ancak maddenin uçucu olması ve buharlaştığı sıcaklık derecesinde bozunmaması gerekir. 1981 yılında GLC ile yeşil çayın bileşenleri aydınlatılmıştır(4). 1969 yılında çay flavanolleri trimetilsilil türevleri haline getirilerek GLC ile tayin edilmiştir(5).

Hareketli fazın gaz olduğu bu kromatografi, sabit fazın katı ya da sıvı oluşuna göre Gaz-Sıvı ve Gaz-Katı olmak üzere iki kısma ayrılır. Gaz-Sıvı kromatografisinde, bir karışımda bulunan maddeler bir sıvı faz üzerinde gazların çözünürlük farkları nedeniyle belirli bir sıcaklıkta taşıyıcı gaz akış hızında ayrılırlar. Gaz-Katı kromatografisinde ise karışımdaki maddeler katı faz üzerinde ve belirli sıcaklıklarda adsorpsiyon - desorpsiyon dengesine bağlı olarak ayrılmaktadır.

Gaz Kromatografisinde hareketli fazı teşkil eden taşıyıcı gaz inert, kuru, saf, kullanılan dedektör için elverişli ve madde diffüzyonunu azaltacak özelliklerde olmalıdır. Taşıyıcı gaz olarak en çok helyum, azot, hidrojen ve argon kullanılır.



Şekil 3.3.1. Gaz Kromatografisi Sistemi

Gaz Kromatografisinin klasik kromatografik yöntemlerden ayrılan bir diğer özelliği de sistemde kolonda ayrılan ve farklı zamanlarda taşıyıcı gaz ile sürüklenen bileşiklerin çeşitli özelliklerinden yararlanılarak tayin edilmelerini sağlayan dedektörlerin bulunmasıdır. Detektörün verdiği sinyaller bir kaydedicide kaydedilerek karışımın bileşimini gösteren bir kromatogram elde edilir ve her bir bileşen simetrik bir Gauss eğrisi "pik" ile karakterize edilir.

3.3.1. Nitel Analiz

Gaz Kromatografisinde nitel analiz için en çok kullanılan yöntemlerden birisi, bilinen bir maddenin alıkonma zamanı ya da hacminin

karışımdaki bir pikin alıkonma süresi ya da hacmi ile karşılaştırılmasıdır. Her bileşik, belirli şartlarda belli bir alıkonma süresine sahiptir. Bu nedenle önce standart madde kolona enjekte edilir ve ayrılan piklerin alıkonma zamanları ölçülerek standart ile karşılaştırılır. Ayrılan maddelerin kesin teşhisini yapabilmek için son yıllarda Gaz Kromatografisi cihazı diğer analitik tekniklerle örneğin İnfrared Spektrofotometresi (GC-IR) ve Kütle Spektrometresi (GC-MS) ile birleştirilmiştir.

3.3.2. Nicel Analiz

Gaz Kromatografisi ile elde edilen piklerin alanı, madde miktarının doğrusal bir fonksiyonu olduğundan nicel analizde pik alanlarında yararlanılır. Bilinen standart maddenin değişik konsantrasyonlarına karşı gelen pik alanları kullanılarak bir grafik çizilir. Örnekteki maddelerin pik alanı ölçülerek, miktarı kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak bulunabilir. Daha hassas olan yöntem ise, iç standart yöntemidir. Önce eşit miktarlarda nümune ve standart beraberce enjekte edilir ve alanlarının oranı bulunur. Daha sonra bilinen miktarda standart, miktarı bilinmeyen nümune ile beraber enjekte edilerek pik alanlarının oranı tespit edilir. İç standart olarak kullanılan maddenin, miktarı tayin edilecek maddeye yapıca benzemesi, maddeye yakın fakat ayrı bir pik vermesi gerekmektedir.

$$\% \text{ Miktar} = \frac{F \cdot A_x \cdot P_s}{A_s \cdot P_x} \cdot 100$$

A_x: Miktarı tayin edilecek madde pikinin alanı

A_s: İç standartın pik alanı

P_x: Miktarı tayin edilecek maddenin ağırlığı

P_s: Örneğe ilave edilen iç standartın ağırlığı

$$F : \text{Faktör} = \frac{A_S \cdot P_R}{P_S \cdot A_R}$$

(P_R ve A_R , tayini yapılacak maddenin referans standartının ağırlığı)

Pik alanları değişik yöntemlerle bulunabilir.

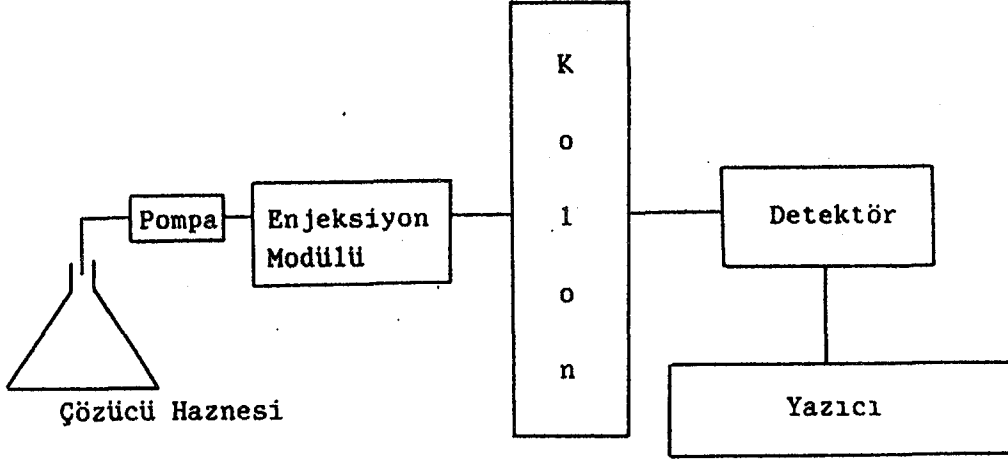
1. Kesip tartmak,
2. Üçgene tamamlayıp, üçgenin alanını hesaplamak,
3. Planimetre ile ölçmek,
4. Elektronik integratörler kullanmak suretiyle pik alanları ölçülebilmektedir(6).

3.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC ile bir maddenin analizini yapmak için önce uygun bir çözücü ve akış hızı ayarlanır. Sonra örnekten küçük bir miktar kolona enjekte edilir. Örnek bileşenleri hareketli fazı oluşturan çözücü sistemi tarafından kolonda sürüklenir. Maddelerin kolonda sürüklenme hızına, çözücünün akış hızı, kolonun uzunluğu, sabit fazın yüzde miktarı ve polaritesi etki eder. Maddeler kolondan, az yada çok tutulmasına bağlı olarak ayrı ayrı zamanlarda çıkarlar. Bu maddeler detektör tarafından belirlendikten sonra yazıcı bir sistem aracılığı ile simetrik Gauss pikleri halinde kağıda geçirilir. Böylece elde edilen grafiğe Sıvı Kromatografisi Kromatogramı adı verilir.

3.4.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Cihazı

HPLC cihazı, çözücü haznesi, pompa sistemi, örnek verme bölümü (enjektör), ayırımın olduğu kolon, her madde için farklı sinyal veren detektör ve detektör sinyallerinin kaydedildiği bir yazıcıdan oluşmaktadır.



Şekil 3.4.1.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Cihazı

3.4.2. Örnek Hazırlanması

Örnek çözeltisi tanecik içermemelidir. Eğer tanecikler varsa, enjektör ve kolon tıkanır. Gözenek büyüklüğü çok küçük olan filtrelerden süzülür. Organik çözücü kullanılıyorsa 0.45 μ 'luk bir teflon filtre, sulu sistem kullanılıyorsa 0.45 μ 'luk selüloz asetat filtre kullanılır. Bu filtreden geçirmek suretiyle 0.5 μ 'dan büyük olan partiküller tutulur. Biyolojik örnekleri süzmek için membran filtreler kullanılır.

Örnek temizleme kiti, 10 ml'lik içerisinde filtre bulunan bir şırıngadır.

3.4.3. Nitel Analiz

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisinde ayrılan piklerin tanınması ve kantitatif analizi Gaz Kromatografisinde olduğu gibidir.

1977 yılında, HPLC ile hidroliz olabilen tanenler ve polifenollerin analizi yapılmıştır(7). 1983'de siyah çaydaki TF ve TR ler HPLC ile analiz edilmiştir(8). 1987'de çaydaki TF'lerin oksidasyonunda

epikateşinin etkisi HPLC ile belirlenmiş(9), başka bir çalışmada da hidroliz olabilen bazı tanenlerin analizi yapılmıştır(10). 1988'de HPLC ile kateşinlerin kimyasal reaksiyonları incelenmiştir(11). 1990'da HPLC ile iki özel çayın kimyasal yapısı aydınlatılmış(12), ayrı bir çalışmada da siyah çaydaki flavanol glikozitleri çalışılmıştır (13).

3.4.4. Nicel Analiz

Önce eşit miktarda örnek ve standart beraberce enjekte edilir ve alanlarının oranı tesbit edilir. Daha sonra bilinen miktar standart ile bilinmeyen miktarda örnek beraberce enjekte edilir ve alanların oranı tesbit edilir. Pik alanlarını ölçmek için değişik yöntemlerden yararlanılır.

Kesip tartma

Üçgene tamamlama

Planimetre ile ölçme

Elektronik integratörler yardımıyla pik alanı tesbit edilir(14).

BÖLÜM IV. DENEYSEL KISIM

Bu çalışma, K.T.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Lisansüstü Laboratuvarı ve Fatih Eğitim Fakültesi, Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. 10 cins çay yaprağı (2.5 yaprak) örnekleri, Rize Çay Enstitüsü Müdürlüğü Araştırma Fidanlığı'ndan temin edilmiştir. Yapraklar koparıldıktan sonra Dewar kabındaki sıvı azot içerisine atılarak dondurulmuştur. Laboratuvara donmuş halde getirilen örnekler agat havanda dövülerek parçalandıktan sonra gerekli analizlere geçilmiştir.

Bu çalışmada, Packard 427 Model Gaz Kromatografisi, Shimadzu LC-9A Model HPLC cihazları kullanılmıştır.

4.1. Nem Tayini

Çay 100°C de açıkta ısıtıldığında ağırlığındaki kayıp, rutubet olarak tanımlanır. Diğer uçucu maddelerden oluşan az miktardaki kayıplar pratikte önemli değildir. Kullanılan metod çayın 103°C de açıkta ısıtıldığında ağırlığında oluşacak kaybın hesaplanmasıdır. Bunun için deney numunesi bir etüvde 103±2 °C de değişmez ağırlığa erişinceye kadar tutulur.

Deneyin Yapılışı: Alınan çay yaprağı numunesi, iyice parçalanır. Hazırlanan bu numunedan yaklaşık 4g. (0.001g hassasiyette) petri kabı içerisine tartılır. Petri kabı ve içerisindeki numune, kapağı açılmış ve yanına konulmuş olarak, etüvde 103±2°C de 6 saat süre ile tutulur. Kapağı kapatılıp desikatörde soğutulur ve tartılır. Bu işlemler, birbirini izleyen iki tartım arasındaki fark 0.005 g'ı aşmayınca kadar

tekrarlanır. Genellikle etüvde 103 ± 2 °C de 16 saatlik bir kurutma süresi aynı sonuçları verir.

Sonuçlar şu bağıntıdan hesaplanır.

$$\% \text{ Nem} = \frac{M_0 - M_1}{M_0} \times 100$$

Burada; M_0 : örneğin ilk ağırlığı (g)

M_1 : Kuru örneğin ağırlığı (g)

4.2. Toplam Polifenol Tayini

Alınan çay nümunesi saf su ile su banyosunda belirli bir süre bekletilip süzildükten sonra alınan ekstraktın indigo Karmen indikatörliğünde ayarlı KMnO_4 ile titrasyonu esasına dayanır.

Reaktiflerin Hazırlanması

indigo Karmen indikatörü: 0.15 g indigo Karmen 5 ml der. H_2SO_4 ' de çözülüp saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

0.04N KMnO_4 Çözeltisinin Hazırlanması: 0.64 g KMnO_4 tartılıp 1lt'lik balonda 500 ml saf su ile çözüldü. Çözelti kaynayınca kadar ısıtıldı, bir gün bekletildi. Bu zaman esnasında oluşan MnO_2 parçacıkları cam pamuğu ile 500 ml'lik balon jöjeye süzülerek temizlendi. Çözelti ağzı kapalı olarak karanlık yerde saklandı.

0.04N KMnO_4 Çözeltisinin Ayarlanması: KMnO_4 çözeltisinin ayarlanması için primer standart olarak $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ kullanıldı. $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ önce 2 saat süre ile 105°C de etüvde kurutuldu. Kurutulmuş olan $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ '

den 0.0001 g hassasiyette 0.1 g civarında tartımlar alındı. 150-200 ml saf su ile çözüldü ve 3M H₂SO₄ ilâve edildi. 0.04N KMnO₄ çözeltisi bir bürete kondu. Okzalatlı çözeltiye küçük bir parça MnSO₄ kristali atıldı (katalizör olarak) ve titrasyona başlandı. Damlatılan KMnO₄ çözeltisinin rengi 30 saniye içinde kaybolmayıncaya kadar titrasyona devam edildi.

$$N = \frac{g}{ml \times meq} \quad \text{formülünden KMnO}_4 \text{'ün normalitesi hesaplandı.}$$

$$N = 0.0407 \text{ olarak bulundu.}$$

Deneyin Yapılışı: Parçalanmış yapraklardan 2.500 g'lık tartım alınıp 100 ml'lik erlene aktarıldı. Üzerine 75-80 ml kaynar saf su ilâve edilip su banyosu üzerinde 45 dakika bekletildi. Soğutulduktan sonra trompta süzüldü ve hacmi balon jojede 100 ml' ye tamamlandı.

10 ml ekstrakt alınıp 185 ml saf su ilâve edildi. 5 ml indigo Karmen indikatörü ilâve edildi. Renk laciveritten parlak sarıya dönünceye kadar 0.0407N KMnO₄ çözeltisi ile titre edildi. Aynı şekilde bir kör deneme yapıldı. Aradaki sarfiyat farkı kaydedildi.

Sonuçlar şu bağıntıdan hesaplandı:

$$\% \text{ Toplam Polifenol} = \frac{\text{Net Sarfiyat} \times 0.0407N \times 0.04157}{\text{Kuru Madde (g)}} \times \frac{100}{10} \times 100$$

4.3. Gaz Kromatografisi (GLC) ile Yapılan Çalışmalar

Yaş çay nümunesi su ile ezilip etilasetat fazına alınır. Etilasetat uçurulur. Piridinde çözülür. Trimetilklorosilan türevi yapılarak analize hazırlanır.

Deneyin Yapılışı: Yaklaşık 1 g. yaş çay nümunesi hassas olarak tartıldı. Ağat havanda 1 ml su ile iyice bulamaç haline getirildi. Toplam hacim 25 ml olacak şekilde su ile havandan ayırma hunisine aktarıldı. Önce 100 ml sonra her seferinde 50 ml olmak üzere 3 kez etilasetatla ekstrakte edilip 250 ml'lik erlene alınarak kurutulmuş Na_2SO_4 (2-3 spatül) katılıp çalkalandı. Çözelti tam berraklaşınca 500 ml'lik balona siyah banttın süzülür. 30°C nin altında evaporatörde buharlaştırıldı. Taze destillenmiş ve kurutulmuş 2.5 ml piridin ile çözüldü ve piridinle 25 ml'ye tamamlandı. Bundan 2 ml alındı. 2 ml N.O -bis-(trimetilsilil)asetamid ve 0.5 ml trimetilklorosilan katıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. 5 µl enjekte edilerek gaz kromatogramı alındı.

Aynı şartlarda kateşin ve epikateşin standartlarında enjekte edildi. Alıkonma zamanlarından nümunedeki yerleri belirlendi.

4.4. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Yapılan Çalışmalar

Yaş çay nümunesi öğütülerek parçalanır. Metanol ile ekstrakte edilir. Çözücü evaporatörde uçurulur. Elde edilen nümune bir miktar metanolde çözülerek 20 x 20 cm lik cam plağa tatbik edilir.

Püskürtülen Reaktifin Hazırlanışı: 1 g benzidin 3 ml derişik HCl çözeltisinde çözüldü. 200 ml'ye saf su ile tamamlandı. 100 ml %10'luk sodyum nitrit çözeltisi soğukta karıştırılarak hazırlandı.

Deneyin Yapılışı: Yaş çay nümunesi öğütüldü. 50 ml metanol ile ayırma hunisinde çalkalanarak ekstrakte edildi. Aynı işlem 3 kez tekrarlandı. Toplam ekstrakt evaporatörde 30°C de kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Az miktarda metanol ilâve edilerek çözüldü. 0.5 mm kalınlığında slika jel kaplı 20 x 20 cm lik cam plaklar hazırlanıp 105°C de etüvde 2 saat aktive edildi. Kloroform: metanol: su (73:24:3) karışımından 100 ml tanka konuldu. Tankın çözücü buharları ile doyunlaşması için 1-2 saat beklendi.

Nümune, kapiler boru ile bant halinde , kateşin ve epikateşin standartları da yanına noktalar halinde, iki ayrı plağa tatbik edildi. Plaklar çözücü buharlarıyla doyun hale gelen tanka kondu. Çözücü yaklaşık olarak 18 cm kadar yükseldiğinde plaklar tanktan çıkarıldı. Havada kurutuldu. Plaklardan bir tanesine diazotize benzidin reaktifi püskürtülerek polifenoller için spesifik olan pembe kırmızı renk görüldü.

Aynı şekilde hazırlanan plaklardan diğeri üzerindeki standartlara karşılık gelen bantlar kazınarak alındı. Metanol ile ekstrakte edildi. Süzülerek HPLC ile analiz için ayrıldı.

4.5. Çayda İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile Kersetin, Mirisetin ve Kamferol Aranması

Yaş çay yaprağı asit ile hidroliz edilerek İnce Tabakaya tatbik edilir.

Deneyin Yapılışı: 10 g Yaş çay nümunesi 100 ml % 4'lük HCl çözeltisi ile 2 saat geri soğutucu altında ısıtılarak hidroliz edildi. Çözelti süzüldü. Süzüntü 100 ml etil asetatla ayırma hunisinde ekstrakte edildi. Ekstrakt evaporatörde 50°C de uçurularak deriştirildi. İncetabakaya kersetin, mirisetin ve kamferol standartları yanında nümune tatbik edildi. Plak, kloroform:metanol:su (73:24:3) çözücüsü

ile doygun hale gelmiş olan tanka yerleştirildi. Çözücü yaklaşık olarak 18 cm yükseldiğinde plak tanktan çıkarıldı ve lekelerin yerleri çıplak gözle görülebildiği gibi NH₃ buharlarına tutulduğu zaman daha net bir şekilde tesbit edilerek R_f değerleri hesaplandı.

4.6. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Yapılan Çalışmalar

İnce tabaka ile ön saflaştırma yaptığımız nümune alınarak HPLC cihazına enjekte edildi.

Deneyin Yapılışı: İnce Tabaka Kromatografisi ile ön saflaştırması yapılmış olan çay nümunesinden 2 µl. HPLC cihazına enjekte edildi. Hareketli faz olarak A: asetik asit/metanol/su (1:1:98) ve B: asetik asit/metanol/dimetilamin/su (1:1:50:48) çözücüleri hazırlanarak gradient çalışma programı yapıldı. %5 B'den %35 B'ye 35 dakikada gradient olarak çalışıldı.

Kateşin, epikateşin ve kafein standartları metanolde çözülerek aynı çalışma programında ayrı ayrı nümuneye katıldı ve alete enjekte edildi. Orjinal örnekteki piklerin pik alanlarının artması ile kateşin, epikateşin ve kafeinin yerleri belirlendi.

BÖLÜM V. ANALİZ NETİCELERİ

Aylara göre analizini yaptığımız çaylarda bulunan nem miktarları Tablo 5.1.'de , toplam polifenol miktarları ise Tablo 5.2'de verilmiştir.

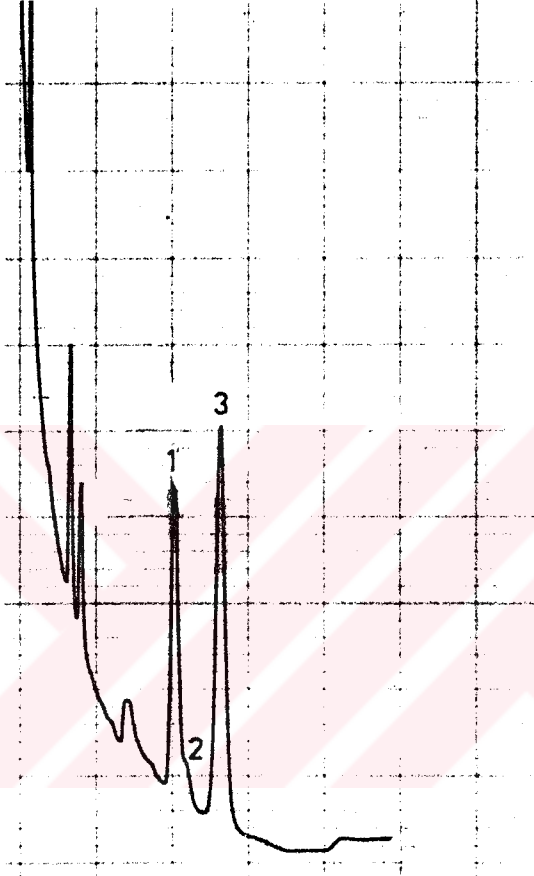
Tablo 5.1. Değişik Cins Yaş Çay Nümunelerinde Aylara Göre Bulunan % Nem Miktarları

Çayın Cinsi	Mayıs	Temmuz	Eylül
Fener 3	76.35	75.14	77.12
Gündoğdu 3	76.36	76.58	77.07
Pazar 20	75.00	74.42	73.64
Kömürcüler 1	76.85	76.00	73.14
Muradiye 10	75.75	74.18	78.21
Tuğlalı 10	74.35	77.42	77.23
Derepazarı 7	76.44	78.18	74.10
Hamzabey 1	75.89	76.41	76.31
Çiftekavak	76.88	76.88	76.44
Hayrat 1	74.98	75.31	73.46

**Tablo 5.2. Değişik Cins Yaş Çay Nümunelerinde Aylara Göre
Bulunan % Toplam Polifenol Miktarı
(Kuru Madde Üzerinden)**

Çayın Cinsi	Mayıs	Temmuz	Eylül
Fener 3	13.68	18.54	13.80
Gündoğdu 3	12.07	14.08	13.64
Pazar 20	14.23	14.93	14.42
Kömürcüler 1	19.69	14.23	17.75
Muradiye 10	15.93	18.17	16.21
Tuğlalı 10	12.05	16.17	13.42
Derepazarı 7	17.24	19.18	17.68
Hamzabey 1	10.38	14.49	13.23
Çiftekavak	15.83	17.64	16.41
Hayrat 1	15.63	17.22	15.84

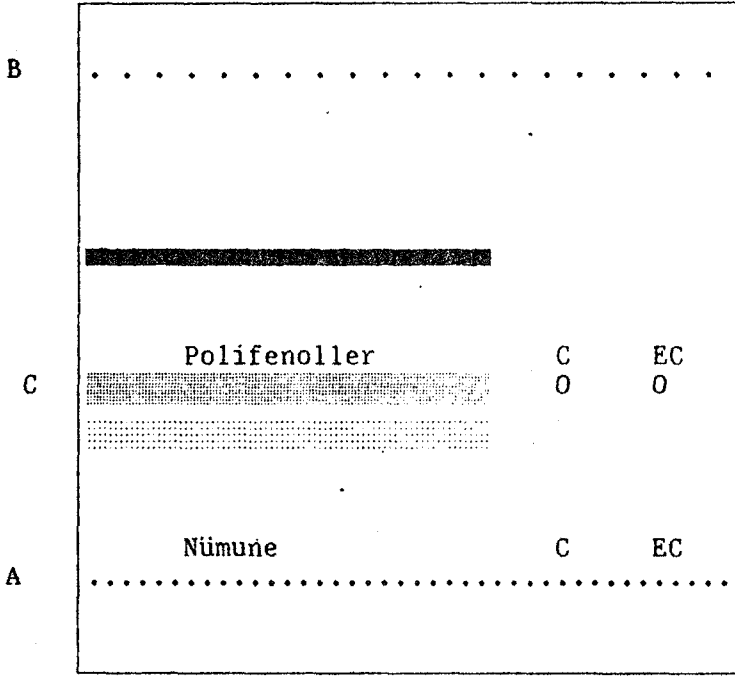
Gaz Kromatografisi ile elde edilen kromatogram ve çalışma şartları Şekil 5.1 de verilmiştir. Buna göre 1 nolu pik epikateşin, 2 nolu pik kateşin ve 3 nolu pik epigallokateşin olduğu tesbit edilmiştir.



Şekil 5.1. Gaz Kromatogramı

1. Epikateşin, 2. Kateşin, 3. Epigallokateşin

Kolon Boyutları : 5ft x 4mm ID
Kolon Dolgu Maddesi : %3 OV-1 metil slikon
CQ 100/120 mesh
Enjektör Sıcaklığı : 300°C
Kolon Sıcaklığı : 270°C izotermal
Taşıyıcı Gaz : Azot
Gaz Akış Hızı : 60ml/dakika
Detektör : Alev İyonizasyon
Kağıt Hızı : 5 mm/dakika



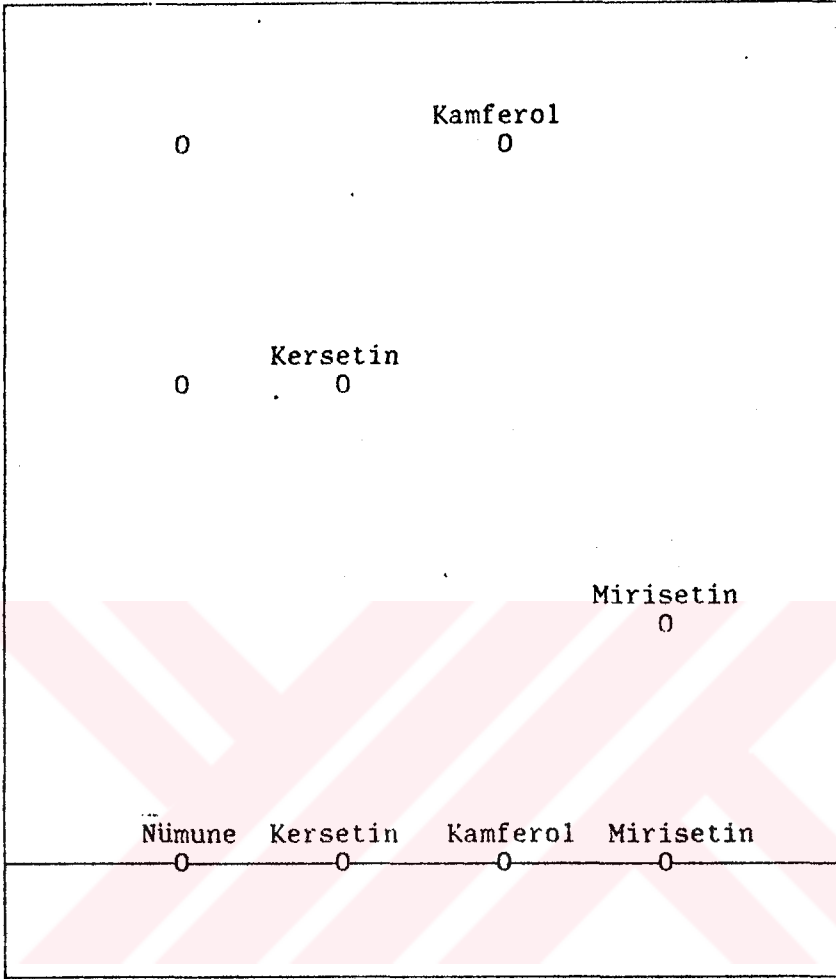
Şekil 5.2. İnce Tabakada Polifenollerin Diazotize Benzidin Belirteci ile Belirlenmesi ve R_f Değerlerinin Hesaplanması

Çözücü sistemi: Kloroform:metanol:su (73:24:3)

Kateşin için $R_f = 0.32$

Epikateşin için $R_f = 0.31$

Çaydaki polifenoller için $R_f = 0.32$ bulunmuştur.



Şekil 5.3. İnce Tabaka kromatogramı

(Kersetin, Kamferol ve Mirisetin Aranması)

Çözücü sistemi: Kloroform:metanol:su (73:24:3)

Mirisetin için $R_f = 0.1353$

Kamferol için $R_f = 0.6823$

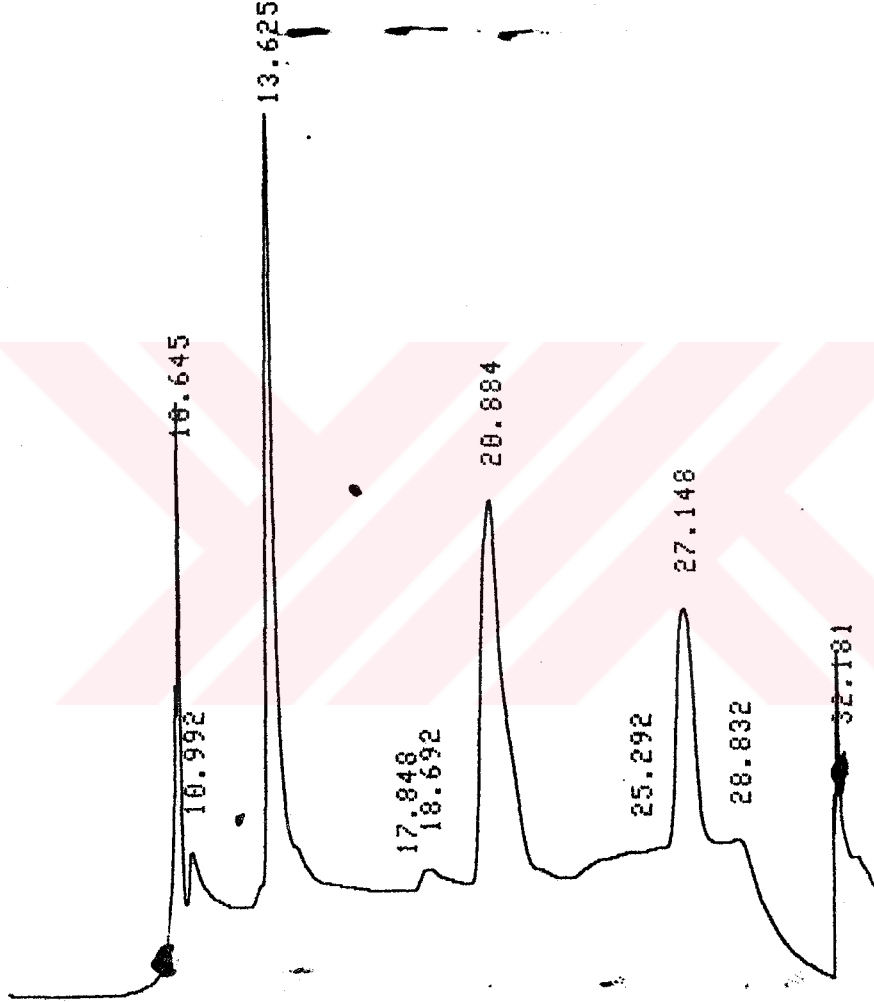
Kersetin için $R_f = 0.3352$

Nümunedeki 1. lekenin R_f değeri = 0.6764

2. lekenin R_f değeri = 0.3412

Bu R_f değerleri nümune kersetin ve kamferol'ün varlığını gösterir.

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisiyle elde edilen kromatogram ve çalışma şartları Şekil 5.3.'de verilmiştir. Elimizdeki standartlardan ve literatür değerlerinden yararlanılarak bulduğumuz polifenoller; Epigallokateşin, kateşin, epikateşin ve epigallokateşin gallattır. Ancak epigallokateşin piki ile kafein piki tam olarak ayrılamamıştır.



Şekil 5.4: Polifenollerin HPLC Kromatogramı

10.645: Kafein ve Epigallokateşin, 10.992: kateşin,
13.625: epikateşin, ve 20.884: epigallokateşingallat

Enjeksiyon Hacmi : 10µl
Kolon : µ-Bondapak C 18, 3,9 x 300mm
Kolon Sıcaklığı : 30°C
Hareketli Faz : A : Asetikasit/ Metanol/ Su (1:1:98)
B : Asetikasit/Metanol/Dimetilamin/Su
(1:1:50:48)

BÖLÜM VI. TARTIŞMA VE SONUÇ

1991 yılı Mayıs, Temmuz ve Eylül aylarında alınan değişik cins çaylardaki nem miktarı aylara göre ortalama olarak sırasıyla % 75.83, %76.11 ve %75.73 bulunmuştur. Büyük bir farklılık olmamakla birlikte Temmuz ayı nem miktarı diğerlerinden biraz daha fazladır. Çay cinsleri arasındaki % nem miktarı farkı çok azdır. Bunun sebebi farklı çay cinslerinin hepsinin aynı bahçede ve aynı şartlar altında yetişmesi ile açıklanabilir.

Mayıs, Temmuz ve Eylül aylarında, çay yaprağında toplam polifenol miktarları ortalama olarak sırasıyla %14.81, %16.55 ve %15.41 olarak bulunmuştur. Sonuçlar kuru madde üzerinden hesaplanmıştır. Toplam polifenol miktarlarında, değişik çay çeşitleri arasında farklılıklar vardır. Mayıs ayında %19.69 ile en yüksek miktar Kömürcüler 1'de bulunmuş, en düşük miktar ise %10.38 ile Hamzabey 1 çayındadır. Temmuz ayı sonuçlarına göre en yüksek miktar %19.18 ile Derepazarı 7 çayında ve en düşük miktar %14.08 ile Gündoğdu 3 çayında bulunmuştur. Eylül ayı sonuçlarına göre en yüksek %17.68 ile Derepazarı 7 çayında, en düşük miktar ise %13.42 ile Tuğlalı 10 çayında bulunmuştur.

Temmuz ayında bulunan toplam polifenol miktarı genel olarak diğer ayların ortalama değerlerinden daha fazladır. Bu sonuçlardan da görülebileceği gibi aynı toprakta ve aynı şartlarda yetişmiş olmalarına rağmen değişik cins çayların içerdiği toplam polifenol miktarları farklı olduğu gibi, aydan aya da değişmektedir.

Yaş çay yapraklarında ortalama olarak toplam polifenol miktarı, kuru maddede % 18-32 arasında verilmiştir(2). Analizini yaptığımız çaylardaki polifenol miktarları bu değerlerin altında bulunmuştur.

Bu yüzden siyah Türk çaylarında, su ekstraktı ve theaflavin miktarı Dünya Standartları'nın (ISO:3720) genel olarak altında kalmaktadır.

İnce Tabaka ile yapılan çalışmalarda, İnce Tabakada yürütülen çay ekstraktına diazotize benzidin belirteci püskürtüldü ve polifenollerin R_f değerleri 0.32 bulunmuştur. Ayrıca ince tabaka ile yapılan Kersetin, mirisetin ve kamferol aranmasında bulunan lekelerin R_f değerleri hesaplanmış ve araştırılan çaylarda kersetin ile kamferol'ün varlığı tesbit edilmiştir.

Gaz Kromatografisi ile yapılan analizlerde incelediğimiz çay örneklerinde epikateşin ile epigallokateşin fazla miktarlarda, kateşin ise çok az miktarda bulunduğu tesbit edilmiştir. Diğer polifenollerin Gaz Kromatogramında bulunamamasının sebebi, bunların silan türevlerinin hidroliz olması ile açıklanabilmektedir.

İnce Tabaka ile ön ayırmadan sonra HPLC ile yapılan kalitatif analizde, incelenen çay yapraklarında epigallokateşin, kateşin, epikateşin, epigallokateşin gallat polifenollerinin varlığı tesbit edilmiştir. Bunların İnce Tabakadan kazınıp alınmaları nedeniyle tam bir kantitatif analizleri yapılamamıştır.

KAYNAKLAR

1. Kacar, B., Çayın Biyokimyası ve İşleme Teknolojisi, Çay-Kur Yayını No.6., Ankara, 1987
2. Forrest, G. I., and Bendall, D. S., Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis, Vol. 18, (1988) .455-513
3. Fumio, H., Ichiro, N., and Itsuo, N., Chem. Pharm. Bull, 35(2).. (1987) .611-616
4. Kenji, Y., and Takayuki, S., J. Agric. Food hem., 29., (1981) .366-370
5. Albert, R.P., Harold, N.G., Seymour, G., Howard, M., and Jorge, G. G., Analytical Chemistry, Vol 41, No.2, February (1969) .298-302
6. Şener, B., Orbey, M.T., ve Temizer, A., Modern Analiz Yöntemleri Ankara, 1986
7. Takuo, O., Kazuko, M. K. S., and Tsutomu, H., Chrom. 11. (1977) .313-320
8. Alastair, R. and Derek, S. B., Phytochemistry, 22. No. 4 (1983) .883-887
9. Krishan, L. B., Toyomasa, A., Tojiro, T., and Kenjiro, I., Agric. Biol. Chem, 51(7) (1987) .1767-1772
10. Tsutomu, H., Takashi, V. and Takuo, O., Chrom 20 063 (1987) .284-295
11. Treutter, D. Chrom 21 (1988) .233
12. Liang, Y. R., Liu, Z. S., Xu, Y. R., and Hu, Y. L., J. Sci.-Food Agric 53, (1990) .541-548
13. Ian, M. D., Richard, G. B. and George, H., J. Sci. Food-Agric 53, (1990) .411-414
14. Şener, B. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ve Farmasötik Alandaki Uygulamaları A.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Kürsüsü, Ankara, 1977.

ÖZGEÇMİŞ

1963 yılında Trabzon'un Akçaabat ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Akçaabat'ta tamamladı. 1986 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden Kimyager ünvanı ile mezun oldu. Üç ay kadar özel bir ilaç fabrikasının kalite kontrol laboratuvarında çalıştı. Bir yıl Afyon'un Çay ilçesi Endüstri Meslek Lisesinde öğretmenlik yaptı. Halen Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.