



**T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SOLDURMA SÜRESİNE GÖRE ÇAY BİTKİSİNDE (*Camellia
sinensis*) ENZİM AKTİVİTELERİNİN DEĞİŞİMİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

Ahmet GÖKKAYA

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Şule GÜZEL İZMİRLİ**

**RİZE
2025**

KABUL VE ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında, Dr. Öğr. Üyesi Şule GÜZEL İZMİRLİ danışmanlığında, Ahmet GÖKKAYA tarafından hazırlanan *Soldurma Süresine Göre Çay Bitkisinde (Camellia sinensis) Enzim Aktivitelerinin Değişimi* adlı bu tez çalışması, 19/08/2025 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliğiyle/~~oy çokluğuyla~~ başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	Ünvanı, Adı SOYADI	İmza
Başkan	: Dr. Öğr. Üyesi Şule GÜZEL İZMİRLİ	
Üye	: Prof. Dr. Özlem FAİZ	
Üye	: Prof. Dr. Neslihan SARUHAN GÜLER	

ETİK BEYAN

Biyoloji Tezli Yüksek Lisans Programından mezun olmak üzere teslim ettiğim “Soldurma Süresine Göre Çay Bitkisinde (*Camellia sinensis*) Enzim Aktivitelerinin Değişimi” adlı tezim, bilim ve araştırma etiği prensiplerine riayet edilerek tarafımdan yazılmıştır.

Tez çalışmamda, başka kaynaklardan aktarılan bütün bilgi ve alıntılar, Enstitünüz Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak açıkça gösterilmiştir. Kaynağı gösterilenler dışında kalan bütün bilgiler uygun araştırma yöntemi kullanılarak tarafımdan edinilmiş ve esere bu şekilde yansıtılmıştır. Şahsıma ait olmayan hiçbir bilgi, kasıt veya kusurlar, şahsıma aitmiş gibi gösterilmemiştir. İnternet kaynakları dâhil, sahibine/kaynağına atıf yapılmaksızın hiçbir bilgi kullanılmamıştır. Aksinin ortaya çıkması halinde doğacak bütün hukuki, idari, akademik ve etik sorumluluk tarafıma ait olacaktır. Eserin tesliminden sonra herhangi bir zamanda, bilim etiğine aykırılık tespit edilmesi ve / veya eserimle ilgili intihal veya intihal şeklinde anlaşılabilecek bir durumun ortaya çıkması halinde; Üniversiteniz ve eğitim kadronuzun hiçbir şekilde sorumlu tutulmayacağını hür irademle kabul, beyan ve taahhüt ederim.

19/08/2025

Ahmet GÖKKAYA

ÖN SÖZ

“Soldurma Süresine Göre Çay Bitkisinde (*Camellia sinensis*) Enzim Aktivitelerinin Değişimi” konulu bu çalışma, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Lisans eğitimime başladığım ilk günden itibaren bilgi ve deneyimlerini benimle cömertçe paylaşan, akademik hayatımdaki yol göstericim değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Şule Güzel İzmirli’ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen ve laboratuvarını her zaman açan değerli hocam Prof. Dr. Özlem Faiz’e teşekkür ederim. Tez jüri üyeliğini kabul ederek bizleri onurlandıran sayın Prof. Dr. Neslihan Saruhan Güler hocama teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimimin ilk yılında projesinde bursiyer olarak yer aldığım ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim sayın hocam Doç. Dr. Ersan Bektaş’a şükranlarımı sunarım.

Arazi çalışmaları ve deneylerimin her aşamasında yanımda olan, manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli arkadaşım Hatice Hale Tatlı’ya teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan tüm hocalarıma ayrı ayrı teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her koşulda yanımda olan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

“Bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü birimince desteklenmiştir. Proje Numarası: FYL-2024-1605” (“This work was supported by the Research Fund of Recep Tayyip Erdogan University. Project Number: FYL-2024-1605”)

Ahmet GÖKKAYA
RİZE/2025

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	I
ETİK BEYAN	II
ÖN SÖZ	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
KISALTMALAR	VIII
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	XI
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	9
1.1. Enzimler	9
1.1.1. Enzimlerin Genel Özellikleri.....	9
1.1.2. Enzimlerin Sınıflandırılması	9
1.1.2.1 Proteazlar (Peptidazlar)	11
1.1.2.2 Polifenol Oksidazlar (Katekolazlar)	14
1.1.2.3. Alkol Dehidrogenazlar (Etanol Dehidrogenazlar).....	17
1.2. <i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Kuntze	18
1.3. Çay İşleme Teknolojisi.....	19
1.3.1. Soldurma	20
1.4. Literatür Özeti	22
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	31
2.1. Örneklerin Temini ve Analize Hazır Hale Getirilmesi.....	31
2.2. Laboratuvar Analizleri	31
2.2.1. Enzim Ekstraktının Hazırlanması.....	31
2.2.2. Protein Analizi.....	31
2.2.2.1. Protein Standart Grafiğinin Hazırlanması	32
2.2.2.2. Protein Miktarının Ölçülmesi	32
2.2.3. Peptidaz Analizi	33
2.2.3.1. Tirozin Standart Grafiğinin Hazırlanması	33

2.2.3.2. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi.....	33
2.2.4. Polifenol Oksidaz Analizi	34
2.2.4.1. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi.....	34
2.2.5. Alkol Dehidrogenaz Analizi.....	34
2.2.5.1. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi.....	34
2.3. İstatistiksel Analiz	35
3. BULGULAR.....	36
3.1. Ali Rıza Erten Klonunun Enzim Aktiviteleri	36
3.1.1. Farklı Soldurma Sürelerine Göre ADH Aktivitesi	36
3.1.2. Farklı Soldurma Sürelerine Göre Peptidaz Aktivitesi.....	37
3.1.3. Farklı Soldurma Sürelerine Göre PPO Aktivitesi	39
3.2. Zihni Derin Klonunun Enzim Aktiviteleri	40
3.2.1. Farklı Soldurma Sürelerine Göre ADH Aktivitesi	40
3.2.2. Farklı Soldurma Sürelerine Göre Peptidaz Aktivitesi	42
3.2.3. Farklı Soldurma Sürelerine Göre PPO Aktivitesi	43
3.3. Klonlara Göre Enzim Aktiviteleri	44
3.4. Korelasyon Analiz Sonuçları	50
3.4.1. Ali Rıza Erten Klonunun Korelasyon Sonuçları	50
3.4.2. Zihni Derin Klonunun Korelasyon Sonuçları	50
3.4.3. Klonların Korelasyon Sonuçları	51
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	53
KAYNAKÇA	69

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Anabilim Dalı : Biyoloji
Tez Türü : Yüksek Lisans Tezi
Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Şule GÜZEL İZMİRLİ
Hazırlayan : Ahmet GÖKKAYA
Yıl : 2025
Sayfa Sayısı : 86

ÖZET

**SOLDURMA SÜRESİNE GÖRE ÇAY BİTKİSİNDE (*Camellia sinensis*)
ENZİM AKTİVİTELERİNİN DEĞİŞİMİ**

Soldurma, çay işlemede ilk adımdır ve nihai ürün kalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Yeşil çay yaprağının soldurulması ve bir sonraki işleme aşamasına (kıvırma) hazırlanması sırasında, yaprağın nem içeriğindeki azalmaya ürün kalitesinde özellikle aromasında önemli rol oynayan biyokimyasal etkileşimlerin ortaya çıkması eşlik eder. Soldurma işlemindeki önemli biyokimyasal olaylardan birisi de enzim aktivitelerinin değişimidir. Çay yaprağındaki enzimler çaya tat, koku ve renk gibi özellikler katmaktadır. Taze yaprakların solma süresi, çayın lezzet kalitesinin istikrarını etkileyen önemli bir faktördür. Çayın aroma, tat ve renk gibi kalite özelliklerini belirlemede etkili olan alkoldehidrogenaz (ADH), peptidaz ve polifenol oksidaz (PPO) aktivitesi üzerine doğal soldurma yöntemi ile farklı soldurma sürelerinin etkisi hala belirsizdir. Bu çalışma, Atatürk Çay ve Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü çay fidanlıklarında kontrollü bir şekilde yetiştirilen Ali Rıza Erten ve Zihni Derin klonlarının ADH, peptidaz ve PPO aktiviteleri üzerine farklı soldurma sürelerinin (0, 16, 17, 18, 19, 20 ve 24 saat) etkisini ortaya çıkarmayı amaçlayan ilk çalışmadır. Yapılan bu çalışmada, en yüksek peptidaz aktivitesi her iki klonunda 24 saatlik, en düşük aktivite ise Ali Rıza Erten klonunda 17 saatlik, Zihni Derin klonunda ise 19 saatlik soldurulan çay örneklerinde belirlenmiştir. ADH aktivitesi Ali Rıza Erten klonunda en yüksek aktiviteyi 18 saatlik, Zihni Derin klonunda ise 20 saatlik soldurmada vermiştir. En düşük aktivite ise Ali Rıza Erten ve Zihni Derin klonları için sırasıyla 20 saat ve 0 saatte (kontrol grubu) tespit edilmiştir. PPO için en yüksek aktiviteler Ali Rıza Erten ve Zihni Derin klonlarında sırasıyla 16 ve 18 saat soldurulan örneklerde, en düşük aktiviteleri ise her iki klonun 0 saat örneklerinde belirlenmiştir. Her iki klonun soldurma sürelerine göre en yüksek peptidaz aktivitesi (24 saatte) hariç klonlara uygulanan farklı soldurma sürelerinin enzim aktivitelerini etkilediği ve her soldurma süresinde farklı aktivitenin olduğu tespit edilmiştir. Tüm klonların enzim aktivitelerine bakıldığında, en yüksek ADH ve PPO aktiviteleri 18 saatlik, en yüksek peptidaz aktivitesi ise 24 saatlik soldurulan örneklerde tespit edilmiştir. Zihni Derin klonunun enzim aktivitelerinin Ali Rıza Erten klonunun enzim aktivitelerinden daha yüksek olduğu, klonlar ile ADH aktivitesi arasında pozitif yönde zayıf ve anlamsız, peptidaz arasında pozitif yönde orta ve anlamlı, PPO arasında ise pozitif yönde yüksek seviyede anlamlı ilişkinin olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, ADH, PPO ve peptidaz aktiviteleri ile klonlar arasındaki ilişkilerin, çayın aroma, tat, umami ve renk gibi kalite özelliklerini belirlemede klonlar arası farklılıkları ortaya koyarak seleksiyon ve özgün klon geliştirme çalışmalarına katkı sağlayabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Çay, *Camellia sinensis*, soldurma süresi, enzim, PPO, ADH, peptidaz

Recep Tayyip Erdogan University Institute of Graduate Studies

Department : Biology

Thesis Type : Master Thesis

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Şule GÜZEL İZMİRLİ

Author : Ahmet GÖKKAYA

Year : 2025

Pages : 86

ABSTRACT

CHANGES IN ENZYME ACTIVITIES IN THE TEA PLANT (*Camellia sinensis*) ACCORDING TO WITHERING TIME

Withering is the first step in tea processing and has a significant impact on the final product quality. During the withering of green tea leaves and their preparation for the subsequent processing step (rolling), the reduction in leaf moisture content is accompanied by biochemical interactions that play a critical role in determining product quality, particularly its aroma. One of the major biochemical events during withering is the change in enzyme activities. Enzymes in tea leaves contribute to the taste, aroma, and color of tea. The withering time of fresh leaves is an important factor affecting the consistency of tea flavor quality. However, the effects of different natural withering durations on the activity of alcohol dehydrogenase (ADH), peptidase, and polyphenol oxidase (PPO)—enzymes that play a critical role in determining tea quality characteristics such as aroma, taste, and colour—remain unclear. This study represents the first attempt to investigate the effects of different withering durations (0, 16, 17, 18, 19, 20, and 24 hours) on ADH, peptidase, and PPO activities in the Ali Rıza Erten and Zihni Derin tea clones, which were cultivated under controlled conditions in the tea nurseries of the Atatürk Tea and Horticultural Research Institute. The highest peptidase activity in both clones was observed in samples with 24 hours of withering, whereas the lowest activity was detected in the 17-hour withered sample of the Ali Rıza Erten clone and the 19-hour withered sample of the Zihni Derin clone. The highest ADH activity was observed at 18 hours for the Ali Rıza Erten clone and at 20 hours for the Zihni Derin clone. Conversely, the lowest ADH activities were recorded at 20 hours and 0 hours (control group) for the Ali Rıza Erten and Zihni Derin clones, respectively. For PPO, the highest enzyme activity was detected in the 16-hour (Ali Rıza Erten) and 18-hour (Zihni Derin) samples, while the lowest activity was found in the 0-hour (control) samples of both clones. Except for the highest peptidase activity observed at 24 hours, it was found that different withering durations affected the enzyme activities in both clones, with each duration exhibiting a distinct level of enzyme activity. When evaluating the enzyme activities of both clones overall, the highest ADH and PPO activities were detected in samples with 18 hours of withering, while the highest peptidase activity was observed in the 24-hour samples. The enzyme activities of the Zihni Derin clone were found to be higher than those of the Ali Rıza Erten clone. A weak and non-significant positive correlation was found between the clones and ADH activity, a moderate and significant positive correlation with peptidase activity, and a strong and highly significant positive correlation with PPO activity. These findings suggest that the relationships between ADH, PPO, and peptidase activities and the clones may reveal clonal differences in key tea quality traits such as aroma, taste, umami, and colour, thereby contributing to selection and the development of unique tea clones.

Keywords: Tea, *Camellia sinensis*, withering time, enzyme, PPO, ADH, peptidase

KISALTMALAR

ADH	:	Alkol Dehidrogenaz
BSA	:	Bovine Serum Albumin
CTC	:	Crush, Tear, Curl
dk	:	Dakika
EC	:	Enzyme Commission
FAD	:	Flavin Adenin Dinükleotid
gr	:	Gram
M	:	Molar
mg	:	Miligram
mL	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
NAD ⁺	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADP	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
nm	:	Nanometre
OD	:	Optic Density
PAL	:	Fenilalanin Amonyum Liyaz
PEG	:	Polietilen Glikol
POD	:	Peroksidaz
pH	:	Power of Hydrogen
PPO	:	Polifenol Oksidaz
RNA	:	Ribonükleik Asid
rpm	:	Rotations per minute
U	:	Ünite
µL	:	Mikrolitre

% : Yüzde
°C : Santigrat



TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Protein standart grafiğinin hazırlanması aşamasında kullanılan çözelti ve miktarları.....	32
Tablo 2. Protein miktarının ölçülmesi aşamasında kullanılan çözelti ve miktarları .	33
Tablo 3. Soldurma sürelerine göre ADH aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)	36
Tablo 4. Soldurma sürelerine göre peptidaz aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)	38
Tablo 5. Soldurma sürelerine göre PPO aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)	39
Tablo 6. Soldurma sürelerine göre ADH aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)	41
Tablo 7. Soldurma sürelerine göre peptidaz aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)	42
Tablo 8. Soldurma sürelerine göre PPO aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)	43
Tablo 9. Soldurma sürelerine göre klonların ADH aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)	45
Tablo 10. Soldurma sürelerine göre klonların peptidaz aktivite değerleri (U/g taze ağırlık).....	45
Tablo 11. Soldurma sürelerine göre klonların PPO aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)	46
Tablo 12. Klonlara göre enzim aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)	48
Tablo 13. Klonlara göre enzim aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)	49
Tablo 14. Klonlara göre enzim aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Ali Rıza Erten klonu ADH spesifik aktivitesi	37
Şekil 2. Ali Rıza Erten klonu peptidaz spesifik aktivitesi	38
Şekil 3. Ali Rıza Erten klonu PPO spesifik aktivitesi.....	40
Şekil 4. Zihni Derin klonu ADH spesifik aktivitesi.....	41
Şekil 5. Zihni Derin klonu peptidaz spesifik aktivitesi	43
Şekil 6. Zihni Derin klonu PPO spesifik aktivitesi.....	44
Şekil 7. Soldurma sürelerine göre klonların ADH aktivite değerleri	46
Şekil 8. Soldurma sürelerine göre klonların peptidaz aktivite değerleri	47
Şekil 9. Soldurma sürelerine göre klonların PPO aktivite değerleri.....	48
Şekil 10. Klonların ortalama enzim aktivitesi değerleri	49
Şekil 11. Ali Rıza Erten klonunun korelasyon sonuçları	50
Şekil 12. Zihni Derin klonunun korelasyon sonuçları	51
Şekil 13. Klonların korelasyon sonuçları	52

GİRİŞ

Camellia sinensis (L.) O. Kuntze halk arasında çay olarak bilinir ve sudan sonra dünyada ikinci sırada en çok tüketilen içecek olması nedeni ile ekonomik değeri oldukça fazladır. Türkiye’de de sudan sonra en çok tüketilen içecek olması ve sadece Doğu Karadeniz Bölgesinde yetişmesi, tarımının yapılması ve de bölge halkının temel geçim kaynağı olması nedeniyle son derece önem arz etmektedir. Antimutajenik, antikanserojen ve antioksidatif etkilerinden dolayı çay içmenin insan sağlığına yararlı olduğu sıkça rapor edilmiştir (Yamamoto vd., 1997). Birçok sağlık probleminin tedavisinde ve korunmasında çayın tıbbi değeri gittikçe daha da yaygın hale gelmektedir (Naithani ve Kakar, 2005). Çay, insan sağlığı için gerekli olan flavonoid, mineral ve iz elementleri içermektedir. Mevcut çalışmalar, çayın spesifik antioksidanlar ve ağız, pankreas ve prostat kanseri gibi bazı kanser türleri ile felç ve kalp hastalıkları riskini azaltan sağlık destekleyici bileşikler içerdiğini göstermektedir (Khan ve Muhtar, 2007). Siyah çay, bitkinin farklı varyetelerinden elde edilen yaprakların çeşitli işleme süreçlerinden geçirilmesiyle üretilmektedir. Çayın dünya genelinde yaygın olarak tercih edilmesinin başlıca nedeni, içerdiği zengin aroma ve tat unsurları ile sağlığa olan olumlu etkileridir (Lin vd., 2003). Polifenoller açısından oldukça yüksek bir bileşime sahip olan çay; antidiyabetik, antimikrobiyal (Koech vd., 2013), antioksidan (Karori vd., 2007; Kerio vd., 2013) ve yaşlanmayı geciktirici özellikleriyle (Khan ve Muhtar, 2007) dikkat çeken pek çok farmakolojik etki göstermektedir.

Çay bitkisi, dünya üzerinde Kuzey Yarımküre’de yaklaşık 42° enleminden başlayarak Güney Yarımküre’de 27° enlemine kadar uzanan kuşakta yetiştirilmektedir. Çayın yoğun biçimde yetiştirildiği ve üretimin en fazla gerçekleştirildiği ülkelerin başında Çin ve Hindistan gelmektedir. Çay tarımı yapılan yaklaşık 50 ülke arasında, en geniş plantasyon alanına sahip ülke Çin’dir ve dünya genelindeki toplam çay üretim alanlarının yarısından fazlası bu ülkeye aittir. Çin’i sırasıyla Hindistan, Kenya, Sri Lanka, Türkiye, İran, Vietnam ve Endonezya takip etmektedir (FAO, 2024).

Çay tüketiminin Çin’de yaklaşık 3000 yıllık bir geçmişi olduğu bilinmektedir. Çayın Avrupa’da ve ülkemizde tanınıp tüketilmeye başlanması M.S. 17. ve 18. yüzyıllarda olmuştur (Peterson vd., 2004). Çay, işleme yöntemleri ve kültürel önemi doğrultusunda farklı türleriyle dünya genelinde yaygın olarak tüketilen bir içecek olup, başlıca yeşil, siyah, oolong, beyaz, sarı ve pu-erh olmak üzere çeşitli kategorilere ayrılmaktadır; bu türler, yetiştirme uygulamaları, çevresel koşullar ve işleme tekniklerindeki farklılıklardan kaynaklanan özgün tat profilleri ve sağlık faydaları sunmaktadır. Yeşil çay, fermente edilmemiş yapısıyla yüksek antioksidan, özellikle kateşin içeriğiyle bilinirken (Zohora ve Arefin, 2022; Mozumder vd., 2025) siyah çay tamamen fermente edilerek güçlü bir lezzet ve yüksek kafein seviyesine sahip olup Hindistan, Sri Lanka ve Kenya gibi bölgelerde yoğun tüketilmektedir (Zohora & Arefin, 2022; Hazarika vd.,2024). Oolong çayı, kısmen fermente edilmiş yapısıyla yeşil ve siyah çay arasında bir lezzet profili sunmakta ve başta Çin ile Tayvan olmak üzere üretilmektedir (Hilal, 2017; Mozumder vd., 2025). Beyaz çay, genç yaprak ve tomurcuklardan minimum işlemle elde edilerek nazik bir tada sahip olup özellikle Çin’de yetiştirilmektedir (Gascoyne vd., 2011). Nadir bulunan sarı çay ise yavaşı fermentasyon süreci sonucunda yumuşak bir tat kazanmaktadır (Mozumder vd., 2025) pu-erh çayı ise yaşlandırılabilir ve fermente bir yapıya sahip olup Dünya çapında sağlık yararlarıyla tanınmakta ve Çin’in Yunnan bölgesinden köken almaktadır (Hilal, 2017; Mozumder vd.,2025). Tüm bu çeşitler, hem sağlık açısından sundukları faydalar hem de kültürel değerleri sebebiyle önem taşıırken, çay endüstrisi düşük piyasa fiyatları ve yüksek üretim maliyetleri gibi ekonomik zorluklarla karşılaşmakta; bu durum, üreticilerin ürün çeşitlendirme ve katma değer artırıcı stratejiler geliştirmesine yol açmaktadır (Hazarika vd., 2024).

Türkiye’de çay yetiştiriciliğine yönelik ilk denemeler 1888 ile 1892 yılları arasında Bursa’da gerçekleştirilmiştir. Ancak bölgedeki iklim ve ekolojik koşulların çay tarımı için elverişli olmaması nedeniyle bu girişimlerden olumlu sonuç alınamamıştır. Sonraki yıllarda Rize’de yapılan araştırmalar, bölgenin çay yetiştiriciliğine uygun olduğunu ortaya koymuş ve olumlu sonuçlar elde edilmesinin ardından çay üretimi Rize başta olmak üzere çevre illerde de başlamıştır (Fisunoğlu ve Besler, 2008). Ticari öneme sahip Assam, Kamboçya ve Çin çay türleri, morfolojik ve ekolojik özellikleri açısından hem benzerlikler hem de farklılıklar sergilemektedir. Bu

farklılıklar, türlerin genetik kökenleri ve farklı çevresel koşullara uyum süreçlerinden kaynaklanmakta olup, büyüme özellikleri ve yetiştiricilik yöntemleri üzerinde doğrudan belirleyici olmaktadır (Wachira vd., 2013; Rawal vd., 2020).

Çay bitkisi, yüksek yağış gereksinimi nedeniyle yıllık ortalama 1200 mm'nin üzerinde yağış alan bölgelerde yetiştirilmektedir. Verimli üretim için genellikle yılda 1800 mm, ayda ise yaklaşık 150 mm yağışın görüldüğü alanlar tercih edilmektedir (Carr ve Stephens, 1992). Ekvatora yakın sıcak iklimlerde çay hasadı yıl boyunca belirli aralıklarla yapılabilirken, ekvatorundan uzaklaştıkça hasat dönemleri belli aylarla sınırlı kalmaktadır (Eden, 1976). Türkiye'nin Doğu Karadeniz Bölgesi'nde ise çay sürgünleri genellikle Mayıs ayının ilk yarısında toplanmaya başlanmakta ve bu süreç Ekim ayının sonuna kadar devam etmektedir (Mahmutoğlu, 1994). Ülkemizde yılda üç kez çay hasadı yapılmakta, ancak bölgenin iklim koşulları nedeniyle tarlalar yaklaşık altı ay boyunca nadasa bırakılmaktadır. Bazı yıllarda sıcaklıkların erken yükselmesi, sürgün döneminin öne çekilmesine yol açmakta ve bu gibi durumlarda dördüncü bir hasat dönemi de gerçekleşebilmektedir.

Dünya genelindeki çay üretiminin yaklaşık %58'i siyah çaydan, %30'u yeşil çaydan oluşurken, kalan %12'lik kısmı ise oolong, beyaz, hazır çay ve diğer çay ürünleri oluşturmaktadır. Çay çeşitliliği oldukça fazla olmasına rağmen, siyah ve yeşil çay üretimi dünya çay ticaretinde en büyük payı elinde bulundurmaktadır (Yazıcı, 2021).

Dünya çay üretiminde beşinci sırada yer alan Türkiye'de, çay geleneksel ihraç ürünleri arasında önemli bir konuma sahiptir ve Doğu Karadeniz Bölgesi'nin bitkisel üretiminde büyük bir paya sahiptir. Gürcistan sınırından başlayarak Trabzon'un Araklı-Karadere hattına kadar uzanan Karadeniz kıyı şeridi ile yer yer 30 km iç kesimlere giren ve yaklaşık 1000 metre rakıma ulaşan yamaçlar, çay tarımı için en uygun alanlar olarak değerlendirilmekte ve bu bölge birinci sınıf çay yetiştiricilik kuşağı olarak tanımlanmaktadır. Araklı-Karadere'den başlayarak Ordu'nun Fatsa ilçesine kadar uzanan alan ise ikinci sınıf çay bölgesi olarak kabul edilmektedir (Yabancı, 2008). Ülkemizde 1930'lu yıllarda başlayan çay tarımı günümüzde toplam 791.984 dekar alanda sürdürülmektedir. Bu alanların 530.805 dekarı Rize'de, 152.540 dekarı Trabzon'da, 91.928 dekarı Artvin'de, 16.644 dekarı Giresun'da ve 67 dekarı Ordu'da bulunmaktadır (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2024).

Çay bitkisi, yetiştiriciliği ve kalitesi için çok önemli klonal çeşitlilik sergiler. Çay bitkilerinin farklı klonları, çay üretimini ve kalitesini optimize etmek için genetik, morfolojik ve kimyasal özelliklerine göre geliştirilir ve seçilir. Bu çeşitlilik, üreme ve yetiştirme stratejileri için gerekli olan klonların genetik varyasyonunda, morfolojik özelliklerinde ve kimyasal profillerinde belirgindir (Mishra vd., 2009).

Çay klonlarının morfolojik çalışmaları, gövde uzunluğu, yaprak boyutu ve çiçek özellikleri gibi özelliklerde farklılıklar gösterir. Bu özellikler, belirli çevresel koşullar ve çay türleri için klonları tanımlamak ve seçmek için çok önemlidir (Aaqil vd., 2023). Çay klonları arasındaki çeşitlilik, üreme ve yetiştirme açısından faydalı olsa da çay kalitesinde tutarlılığın korunmasında bazı zorluklar ortaya çıkarır. Gelişmiş moleküler ve teknolojik araçların kullanımı, bu çeşitliliğin daha iyi anlaşılmasına ve yönetilmesine olanak sağlayarak yüksek kaliteli çay üretimine katkıda bulunabilir (Aaqil vd., 2023).

Çay bitkilerindeki farklı klonların enzim aktivitesi üzerindeki etkisi oldukça önemlidir; çünkü farklı klonlar, çayın genel kalitesini ve özelliklerini belirleyen çeşitli biyokimyasal profiller ve enzim ekspresyonları sergiler. Yapılan araştırmalar, bazı çay klonlarının çay kalitesi ve lezzetini artırabilecek şekilde, belirli anahtar enzimler ve metabolitleri daha yüksek seviyelerde içerdiğini ortaya koymaktadır (Sathyanathan vd., 2015).

Çay bitkilerindeki enzimatik aktivite büyük ölçüde genetik faktörler tarafından belirlenirken, çevresel koşullar ve stres tepkileri de önemli roller oynamaktadır. Farklı klonlar, bu faktörlere benzersiz adaptasyonlar sergileyebilir, bu da çeşitli enzim aktiviteleri ve sonuç olarak çay kalitesi ve özelliklerinde farklılıklara neden olabilir. Bu varyasyonları anlamak, belirli nitelikler ve stres dirençleri için çay klonlarının seçilmesine ve yetiştirilmesine yardımcı olabilir (Sathyanathan vd., 2015).

Günümüzde geleneksel yöntemlerle üretilen siyah, yeşil, oolong ve beyaz çay çeşitlerinin yanı sıra, modern teknolojilerin kullanılmasıyla geliştirilen yeni çay türleri ve çay yan ürünleri de uluslararası çay ticaretinde giderek daha fazla yer edinmektedir. Gündelik yaşam tarzındaki değişimler, içecek sektöründeki rekabetçi pazar koşulları ve çay tüketmeyen bireyleri de hedefleyen stratejiler doğrultusunda üretilen yenilikçi çay ürünleri ile çaydan elde edilen katma değerli ürünler, küresel pazarda geniş bir alıcı kitlesi bulmaktadır. 1960'lı yıllara kadar çay ticaretinde büyük oranda dökme çay

pazarlanırken, günümüzde paketlenmiş çay, demlik ve fincan tipi poşet çaylar, granül çay, preslenmiş çay, aromalı çay, kafeinsiz çay, hazır çözünebilir çay ve soğuk çay gibi farklı ürünlerle hem ürün çeşitliliğinde hem de tüketim alışkanlıklarında önemli bir dönüşüm yaşanmaktadır. Öte yandan, Türkiye’de üretilen çayın büyük bir kısmı iç pazarda tüketilmekte olup, ihracat oranları kalite farklılıkları ve yüksek maliyetler nedeniyle sınırlı kalmaktadır. Türkiye’nin en önemli çay ihracat ürününü ise dökme siyah çay oluşturmaktadır (Yazıcı, 2021).

Çayın bileşimi, hasat zamanı ve uygulanan işleme yöntemlerine bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Çay işleme süreci, temel olarak yaprak hücrelerinin yapısının bozulması ve yaprak içindeki polifenoller ile enzimlerin etkileşime girmesi prensibine dayanmaktadır. Bu etkileşim sonucunda, oksijen varlığında gerçekleşen bir dizi biyokimyasal ve kimyasal reaksiyon aracılığıyla çay, kendine özgü karakteristik özelliklerini kazanmaktadır (URL-1, 2022).

Çay bitkisinin genç yaprak ve sürgünlerinde bulunan enzimler (polifenol oksidaz, peroksidaz, pektinaz, alkoldehidrogenaz, transaminaz ve peptidaz), işleme sürecinde önemli biyokimyasal dönüşümlere yol açarak çayın kendine özgü tat ve aromasını oluşturur. Başka bir ifadeyle, farklı tip ve özellikte siyah çayların üretimi, genç yaprak ve tomurcuklarda bulunan bu enzimler sayesinde mümkün olmaktadır (Kacar, 2010). Siyah çay üretiminde özellikle oksidatif enzimler kritik rol oynar. Çaydaki polifenollerin oksijenli koşullarda oksidasyon hızı, uygun enzimlerin varlığına bağlıdır. Oksidasyon sürecine pek çok enzim katılsa da, temel olarak aktif merkezinde bakır içeren prostetik gruplara sahip enzimler bu sürecin ana aracısıdır. Farklı tip ve özellikte siyah çayların ortaya çıkışı ise, değişik zaman ve biçimlerde uygulanan enzimatik oksidasyon süreçlerinin bir sonucudur (Safi, 2018).

Çay filizleri, soldurma, kıvrırma, oksidasyon ve kurutma süreçlerinden geçirildikten sonra sıcak suda demlenerek karakteristik aromasıyla tüketilmektedir. Bu temel işlemler üzerinde yapılan bazı değişikliklerle, farklı özelliklere sahip çay ürünleri de elde edilebilmektedir. Mamul çaylar, üretim yöntemlerine bağlı olarak üç ana grupta sınıflandırılır: okside edilmemiş çaylar (yeşil ve beyaz çay), kısmen okside çaylar (oolong çay) ve tam okside çaylar (siyah çay). Türkiye’de ise en çok tercih edilen çay türü siyah çaydır (Çalıkoğlu ve Bayrak, 2009).

Türk Gıda Kodeksi Çay Tebliği (Tebliğ No: 2015/30) uyarınca siyah çay, “*Camellia sinensis*” türünün çeşitli çeşitlerinin genç sürgünlerinden; tepe tomurcuğu ve onu takip eden taze yapraklar ile taze tek yaprak, taze iki yaprak ve taze üç yapraklı sürgünler ve bunları birbirine bağlayan taze sap kısımlarının soldurma, kıvrırma, parçalama, oksidasyon ve kurutma gibi üretim işlemlerinden geçirilmesiyle elde edilen ürün olarak tanımlanmaktadır (Elmas ve Gezer, 2019).

Çayın üretim sürecine bakıldığında, ilk olarak hasat edilen yapraklar tepsiler veya kurutma odalarındaki raflarda soldurulmaktadır. Bu aşama aynı zamanda yaprakların dehidratasyonunu da kapsamaktadır; taze yaprakların nem oranı yaklaşık %75’ten %55-65’e düşer ve yapraklar yumuşamaya başlar. Soldurma işlemi, yaprakları bir sonraki kıvrırma aşamasına hazır hâle getirir ve fermentasyon için uygun bir ortam oluşturur. Bu süreçte aroma gelişimi ve enzim aktivitesi başlar. Ardından soldurulmuş yapraklar kıvrılır ve fermentasyon süreci başlatılır. Kıvrılan yapraklar makinelerde küçük parçalar hâline getirilir. Çayın çeşitliliğini belirleyen kritik aşama olan fermentasyon sırasında, buhar ısısı uygulanarak 2-3 saat içinde fermentasyon tamamlanır. Fermentasyonu durdurmak amacıyla yapraklar kurutularak nem oranı belirli bir seviyeye düşürülür. Son olarak, hazırlanan yapraklar özelliklerine göre ayrılır ve uygun koşullarda paketlenir (Belitz vd., 2009).

Siyah çay üretimi, yaş çayın elde edilmesinin ardından genel olarak beş aşamada gerçekleşmektedir: soldurma, kıvrırma, oksidasyon, kurutma ve tasnif (Nas ve Öksüz, 1987). Bu aşamalar, çayın kalite özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Üretim süreci boyunca çeşitli enzimler aktif rol oynar. Primer polifenollerin oksidasyonunda tat ve rengin oluşumunu sağlayan polifenol oksidaz; pektinlerin parçalanmasında pektinaz; bazı alkollerin oluşumu ve aroma gelişiminde alkoldehidrogenaz; terpenlerin sentezi ve aminoasit dönüşümlerinde transaminaz; proteinlerin aminoasitlere parçalanmasında ise peptidaz görev yapmaktadır (Altan, 2001).

Soldurmanın temel amacı, yapraktaki suyun bir kısmını uzaklaştırarak kısmi kurutma yoluyla çay yaprağına esneklik kazandırmak ve böylece fiziksel olarak kıvrırma işlemine uygun hâle getirmektir. Bu süreç, hücre membranının geçirgenliğinin artması ve polifenoller, enzimler ile oksijenin etkin bir şekilde etkileşime girmesiyle gerçekleşir (Çalıkoğlu ve Bayrak, 2009). Soldurma sırasında yaprakta yalnızca fiziksel

değil, aynı zamanda kimyasal değişiklikler de meydana gelir. Bu değişiklikler; aminoasit, basit şeker ve kafein miktarlarında artış; karotenoid, klorofil ve lipit içeriklerinde azalma; kateşin miktarı ve polifenol oksidaz aktivitesinde düşüş şeklinde gözlemlenmektedir (Roberts ve Sanderson, 1966). Soldurma sürecinde kafein miktarındaki artış, çayın tadını ve burukluğunu olumlu yönde etkiler ve bu artışın aminoasit miktarındaki yükselme ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (Sanderson ve Selvendran, 1965).

Proteazlar (proteinazlar veya peptidazlar), proteinlerdeki amino asitleri birbirine bağlayan peptid bağlarını hidrolizleyerek protein katabolizmasını sağlayan enzimlerdir (Alici ve Arabaci, 2018). Tüm canlı sistemlerde bulunan ve hücre gelişimi ile değişimi için gerekli olan proteazlar, hem hücre içinde hem de hücre dışında işlev göstermektedir (Rao vd., 1998). Peptidazlar, tüm canlı organizmalar için temel öneme sahip olduklarından, bitkilerden, hayvanlardan ve mikroorganizmalardan elde edilebilmektedir (Heutinck vd., 2010).

Polifenol oksidaz (PPO), bitkilerde yaygın olarak bulunan ve hem fizyolojik hem de savunmaya yönelik süreçlerde kritik işlevlere sahip olan bakır içeren bir enzimdir. Bu enzim, fenolik bileşiklerin kinonlara oksidasyonunu katalize ederek bitki dokularında enzimatik esmerleşmeye neden olur; bu durum, özellikle hasat sonrası kalite kayıpları açısından gıda endüstrisinde önemli bir sorun teşkil etmektedir (Gandhi vd., 2018; Zhang, 2023). Öte yandan, PPO bitkinin biyotik stres etmenlerine özellikle patojen ve zararlılara karşı geliştirdiği savunma mekanizmalarında da rol oynamaktadır. Enzim aktivitesi hem moleküler yapısal özelliklerine hem de çevresel koşullara bağlı olarak değişkenlik gösterebilmekte olup, bu bağlamda PPO'nun düzenlenmesi güncel araştırmaların odağında yer almaktadır (Constabel ve Barbehenn, 2008). PPO'nun moleküler ve biyokimyasal özelliklerini anlamak, etkili kontrol stratejileri geliştirmek için çok önemlidir (Gandhi vd., 2018).

Alkol dehidrogenaz (ADH) enzimleri, bitki metabolizmasında özellikle aldehitlerin alkollere ve alkollerin aldehitlere dönüşümünde önemli roller üstlenir. Bu enzimler, anaerobik koşullara yanıt, stres yönetimi ve uçucu bileşiklerin biyosentezi gibi çeşitli fizyolojik süreçler için hayati öneme sahiptir (Tesnière ve Verriès, 2001; Liu vd., 2022). ADH aktivitesi; soğuk, yaralanma ve patojen istilası gibi abiyotik stres etmenleri altında artış göstererek, stres adaptasyonundaki rolünü ortaya koymaktadır

(Tesnière ve Verriès, 2001; Liu vd., 2022a). Örneğin çay bitkilerinde, belirli ADH genlerinin, simüle edilmiş böcek istilasına yanıt olarak ifade düzeyleri artmış ve bu durum, söz konusu genlerin biyotik stres tepkilerindeki rollerine dikkat çekmiştir (Liu vd., 2022). ADH'ler, bitki aroması ve lezzeti açısından önemli olan (Z)-3-heksenalın (Z)-3-heksenole dönüştürülmesi gibi altı karbonlu uçucu bileşiklerin biyosentezinde rol oynamaktadır (Liu vd., 2022b). Son dönem araştırmalar, ADH'lerin katalitik yelpazesinin genişlediğini ve kanonik olmayan indirgemeler de dahil olmak üzere bitki metabolizmasında çeşitli kimyasal reaksiyonlara olanak sağladığını ortaya koymaktadır (Langley vd., 2022; Pearce ve Simokhin, 2022). ADH'ler öncelikle anaerobik metabolizma ve stres tepkilerindeki rolleri ile tanınırken, biyosentez ve metabolik çeşitlendirmedeki genişleyen işlevleri, bitki fizyolojisine katkılarının karmaşıklığını göstermektedir. Bu, çeşitli bitki türlerinde ADH işlevlerinin genişliğini tam olarak anlamak için daha fazla araştırmaya duyulan ihtiyacı vurgulamaktadır.

Soldurmanın süresi, sıcaklığı ve bağıl nemi nihai ürünün kalitesi üzerinde önemli etkilere sahiptir (Obanda vd., 2004). Çayın kalitesini kimyasal analizlerle değerlendirmek için birçok girişimde bulunulmuştur. Çay yapraklarının amino asitleri ve mineral bileşenleri, jeolojik konum, gübre kullanımı, sulama suyu ve iklim koşulları gibi çeşitli faktörlerden ve daha da önemlisi çay yapraklarının işlenmesi ve paketlenmesinden etkilenir (Hussain vd., 2006).

Bu çalışmada, farklı soldurma sürelerinin siyah çay yapraklarındaki ADH, peptidaz ve PPO enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Literatürde çayın aroma ve sağlık bileşenleri üzerine pek çok çalışma bulunmasına rağmen, farklı soldurma sürelerinin bu üç kritik enzim aktivitesine etkilerini sistematik olarak karşılaştıran araştırmalar sınırlıdır. Bu nedenle, çalışmamız hem ADH, peptidaz ve PPO aktivitelerinin soldurma süresine bağlı değişimini ortaya koymayı hem de bu değişimlerin siyah çayın aroma ve kalite özellikleriyle ilişkisini değerlendirmeyi hedeflemektedir. Böylece, çay üretiminde optimal soldurma sürelerinin belirlenmesine ve ürün kalitesinin artırılmasına katkı sağlanması amaçlanmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Enzimler

1.1.1. Enzimlerin Genel Özellikleri

Enzimler, hücrelerde gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen moleküller olup, az sayıdaki katalitik RNA molekülü (ribozim) dışında, çoğunlukla protein yapısındadır. Protein yapısında olmaları nedeniyle, amino asit dizilimleri enzimlerin özgün konformasyonlarını kazanmalarında ve üç boyutlu yapılarının oluşmasında belirleyici rol oynar. Bu üç boyutlu yapı, enzimlerin katalitik aktiviteleri ile substratlarına karşı gösterdikleri özgüllüğün temelini oluşturur (Onat vd., 2002).

Enzimlerle etkileşime giren kimyasal moleküller 'substrat' olarak adlandırılır. Enzimatik bir reaksiyonun temel unsurlarını enzim ve substrat oluşturur. Reaksiyon, enzimin substrata bağlanarak geçici bir enzim-substrat kompleksi oluşturmasıyla başlar (Temizkan vd., 2008). Reaksiyon hızı; substrat ve enzim derişimi, ortam sıcaklığı, iyonik şiddet, pH düzeyi ile aktivatör veya inhibitör maddelerin varlığı gibi çeşitli faktörlerden etkilenir. Enzimler, katalizledikleri reaksiyon sırasında geçici yapısal değişikliklere uğrasa da, reaksiyonun sonunda özgün yapılarına geri dönerler. Bu özellikleri sayesinde tek bir enzim molekülü, çok sayıda substrat molekülünün ürüne dönüşmesini sağlayabilir (Yazıcı, 2012).

Canlılarda hayati öneme sahip biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen enzimler, günümüzde çeşitli endüstriyel ve bilimsel amaçlarla yaygın şekilde kullanılmaktadır. Enzimler; gıda üretimi, temizlik ürünleri ve tıbbi uygulamalar gibi pek çok farklı alanda etkin rol oynamaktadır. İn vitro koşullarda da aktif kalabilmeleri, kimyasal katalizörlere kıyasla daha yüksek katalitik verimlilik göstermeleri, büyük miktarlarda üretilibilmeleri ve genellikle alerjik ya da toksik etki oluşturmamaları, enzimlerin bu denli geniş kullanım alanına sahip olmasının başlıca nedenlerindendir (Cheetham, 1995).

1.1.2. Enzimlerin Sınıflandırılması

Çok sayıda enzimin keşfiyle birlikte, bu moleküllerin tutarlı ve anlamlı bir şekilde adlandırılabilmesi için sistematik bir isimlendirme ihtiyacı doğmuştur. Günümüze kadar tanımlanmış iki bini aşkın enzim, genellikle katalizledikleri

reaksiyonlara ya da substratlarına atıfla, adlarının sonuna '-az' eki getirilerek adlandırılmıştır. Ancak bu tür isimlendirmelerin çoğu zaman enzimlerin fonksiyonları hakkında yeterli bilgi sunmadığı anlaşılmıştır. Bu nedenle, Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından her enzime özgü dört basamaklı bir sınıflandırma sistemi geliştirilmiştir. Bu sistemde yer alan ilk rakam enzimin ait olduğu ana sınıfı, ikinci rakam alt sınıfı, üçüncü rakam alt-alt sınıfı, dördüncü rakam ise ilk üç basamağı aynı olan enzimler arasındaki sıra numarasını belirtmektedir (Uçkaya, 2015). IUBMB (1984) tarafından enzimler altı ana sınıfa ayrılmaktadırlar. Bunlar;

Oksidoredüktazlar:

Bu enzim sınıfı, iki substrat arasında gerçekleşen oksidasyon-redüksiyon (redoks) reaksiyonlarını katalizler. Dehidrogenazlar, oksidazlar, redüktazlar ve oksijenazlar gibi daha önce geleneksel adlarla tanımlanmış birçok enzim bu gruba dahildir. Oksidoredüktazlar; CH-OH, CH-NH₂, C=O ve C=C gibi fonksiyonel gruplar üzerine etki eder ve etkiledikleri grup tipine göre alt sınıflara ayrılırlar. Bu enzimler, biyolojik sistemlerde enerji dönüşüm süreçlerinin temelini oluşturan redoks tepkimelerinde önemli bir rol oynar.

Transferazlar:

Transferazlar, aldehit, keton, açıl, fosfat ve kükürt gibi kimyasal grupların bir molekülden diğerine transferini katalizleyen enzimlerdir. Bu enzimler; metil, formil, hidroksimetil, açıl, glikozil, fosfat, amin ve kükürtlü grupların taşınmasını sağlayarak metabolik reaksiyonların düzenlenmesinde görev alırlar. Aktardıkları gruba bağlı olarak metiltransferazlar, aminotransferazlar gibi alt sınıflara ayrılırlar. Örneğin, fosforil grubunun transferini gerçekleştiren “kinaz” enzimleri bu gruba dahildir.

Hidrolazlar:

Suyun katıldığı parçalanma ve kondenzasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Ester, glikozil, eter, peptid, asit, anhidritlerin C-C, C-Halojen, ve P-N bağlarına etki ederek bu bileşikleri hidrolizler ve etki ettikleri bağ tipine göre alt sınıflara ayrılırlar. Örnekler: lipazlar, fosfatazlar, amilazlar, glikozidazlar, nükleosidazlar, peptidazlar (proteazlar), amidazlar gibi anılan enzimler bu gruba dahildir.

- Proteazlar: Poliipeptid ve protein zincirlerinin hidrolizlerini katalizler.
- Esterazlar ve Lipazlar: Ester ve lipidleri alkole hidroliz ederler.
- Amidazlar: Çeşitli amid ve peptid bağlarını hidrolizler.
- Karbohidrazlar: Glukoz ya da glukoz ile alkoller arasındaki glikozit bağlarını hidrolizler.

- Fosfatazlar: Fosforik asit – ester ve anhidritlerini hidroliz ederler.

Liyazlar:

Çift bağ oluşumunu (hidrolitik olmayan yoldan) ve çift bağa katılma reaksiyonlarını katalizlerler. Etkiledikleri substrattan ya kimyasal bir grubu ayırır ya da ilave ederler. Önemli örnekler, dekarboksilazlar, aldolazlar, dehidratazlar (fumaraz, akonitaz), karboksilazlar, amonyak-liyazlardır.

İzomerazlar:

Geometrik, optik veya yapısal izomerlerin birbirine dönüştürülmesini katalizleyen enzimlerdir. Mutaz, rasemaz ve epimeraz özel adlarıyla anılan enzimler bu gruptandır.

Ligazlar:

ATP ve GTP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinden fosfat bağının kopması sonucu ortaya çıkan enerji yardımıyla iki molekülün bağlanması reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir; aminoasitleri aktive eden enzimler, piruvat-karboksilazlar, açılaz CoA-sentazlardır.

Enzimler salgılanma şekillerine göre ise hücre içi enzimler (intraselüller) ve hücre dışı (ekstraselüller) enzimler olmak üzere iki ana sınıfa ayrılırlar. Hücre içi enzimler sitoplazmaya dağılmış olarak bulunan ribozomlarda sentezlenirler ve düşük moleküler ağırlığa sahip substratlar üzerinde etkilidirler. Hücre dışı enzimler ise besiyeri ve hücre duvarının dışı ile bağlantı halindedirler. Çoğu değişken hücre içi enzimlerin aksine hücre dışı enzimlerin stabilitesi yüksek olup çevre koşullarında aktivitelerini uzun süre koruyabilirler. Önemli ekstraselüler enzimlerin hemen hepsi, yüksek moleküler ağırlığa sahip substratları parçalayan hidrolazlardır (Yazıcı, 2012).

1.1.2.1 Proteazlar (Peptidazlar)

Proteinler, tüm canlı organizmalar için temel bileşenlerdir ve hemen tüm hücresel işlevlerde görev alırlar. Protein sentezinin yanı sıra proteinlerin yıkımı da

kritik öneme sahiptir; çünkü işlevsiz veya hasarlı proteinlerin geri dönüşümü, yeni proteinlerin sentezi için gerekli amino asitlerin serbest bırakılmasını sağlar. Proteazlar (proteinazlar veya peptidazlar), proteinlerdeki amino asitleri birbirine bağlayan peptid bağlarını hidrolizleyerek protein katabolizmasını gerçekleştiren enzimlerdir. Bu enzimler, proteinlerdeki peptid bağlarını farklı bölgelerde hidrolizleyebilir: iç bölgelerdeki bağları parçalayabilen endopeptidazlar, N-terminal uçtaki bağları hedefleyen aminopeptidazlar ve C-terminal uçtaki bağları hidrolize eden karboksipeptidazlar gibi. Peptid karbonil grubuna yapılan saldırı sonucunda peptid bağının hidrolizine proteoliz denir ve proteoliz (proteolitik aktivite), biyolojik sistemlerdeki en önemli katalitik reaksiyonlardan biri olarak kabul edilir (Alıcı ve Arabacı, 2018).

Peptidazlar, enzimler arasında karmaşık bir grubu temsil eder ve oldukça çeşitli fizyokimyasal ve katalitik özelliklere sahiptirler. Tüm canlı sistemlerde bulunan ve hücrenin gelişimi ile değişimi için gerekli olan peptidazlar, hem hücre içinde hem de hücre dışında aktif olarak işlev gösterirler. Ekstrasellüler peptidazların temel rolü, besinlerdeki polimerleri parçalayan diğer ekstrasellüler enzimlerle benzerdir; bu enzimler büyük polipeptid veya proteinleri, hücreler tarafından alınabilecek daha küçük birimlere hidroliz eder. İntrasellüler peptidazlar ise protein salınımı, zimojen aktivasyonu, otoliz ve spor germinasyonu gibi biyolojik süreçlerde kritik işlevler üstlenir (Rao vd., 1998).

IUBMB (1984) tarafından hidrolazlar grubuna (No:3) dahil olan proteazlar peptid bağlarının hidrolizini gerçekleştiren 4. alt grup olarak sınıflanmıştır ve bu enzimler için peptidazlar (EC 3.4) teriminin kullanılması önerilmiştir. Yaygın olarak kullanılan proteaz terimi peptidazla eş anlamlıdır. Ayrıca proteinaz terimi de endopeptidazlar için kullanılmaktadır (Salleh vd., 2006). Buna karşın proteazların sahip oldukları geniş etki ve yapı çeşitlilikleri nedeniyle enzimlerin sınıflandırıldığı genel sistem ile sınıflandırılmaları zordur.

Peptidazlar, genellikle protein substratlarında etkin oldukları bölgelere göre endopeptidazlar ve ekzopeptidazlar olarak sınıflandırılırlar. Ayrıca, katalitik mekanizmalarına bağlı olarak serin proteazlar, aspartik proteazlar, sistein proteazlar ve metalloproteazlar şeklinde gruplandırılabilirler. Bunun yanı sıra, optimal aktivite gösterdikleri pH aralıklarına göre asidik, nötral ve alkalen proteazlar olarak da

kategorize edilmektedirler (Barrett, 1994; Rao vd., 1998).

Enzimler, günümüzde hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar da dahil olmak üzere tüm canlı hücrelerden elde edilebilmektedir (Polaina ve Maccabe, 2007). Proteazlar, canlı organizmaların çeşitli fizyolojik işlevlerini yerine getirebilmesi için gerekli olduğundan, çok çeşitli kaynaklarda bulunur. Bu enzimler, protein substratlarını parçalayarak prokaryotik ve ökaryotik hücrelerdeki hücresel reaksiyonları düzenler ve metabolik ile fizyolojik süreçlerde önemli roller üstlenirler (Heutinck vd., 2010).

Bitki proteazları, bitki fizyolojisi ve gelişiminin birçok yönünde önemli işlevler üstlenir. Protein döngüsü, hatalı katlanmış proteinlerin parçalanması, yaşlanma ve ubiquitin/proteazom yolu gibi süreçlerde kritik roller oynarlar (González-Rábade vd., 2011). Çoğu organizmada büyüme ve gelişme, protein sentezi ve organel biyogenezi ile proteoliz ve organel döngüsü arasındaki dengenin bir sonucu olarak gerçekleşir. Bitkilerde ise çimlenme, farklılaşma, morfogenez, yaşlanma ve programlanmış hücre ölümü gibi gelişim aşamalarına bağlı protein yıkım süreçleri bilinmektedir. Ayrıca, bazı durumlarda proteolizin, reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif stresle ilişkili olabileceğini gösteren çalışmalar giderek artmaktadır (Palma vd., 2002).

Bitkisel kaynaklı proteazlar, aktif merkezlerinde bulunan sülfidril grupları sayesinde kendilerine özgü özellikler gösterirler; bu gruplar aynı zamanda enzim aktivitelerinden de sorumludur (Polaina ve Maccabe, 2007). Bitkilerden elde edilen proteolitik enzimler, geniş bir pH ve sıcaklık aralığında etkin olabildikleri için oldukça ilgi çekicidir. Proteinlerin proteazlar tarafından parçalanmasını içeren bazı endüstriyel uygulamalarda, bu enzimlerin bir kısmı bitkilerden elde edilmektedir (González-Rábade vd., 2011). Bununla birlikte, bitkilerin proteaz kaynağı olarak kullanımı, tarıma elverişli arazilerin varlığı, iklim koşullarının uygunluğu gibi çeşitli faktörlere bağlıdır ve bitkilerden proteaz üretimi zaman alıcı bir süreçtir (Rani vd., 2012).

Bitkilerden elde edilen proteazların çoğu, aynı enzim grubuna aittir ve özellikle tropikal bitkilerden izole edilmektedir. Proteazlar, Asteraceae, Caricaceae, Moraceae, Asclepiadaceae, Apocynaceae ve Euphorbiaceae gibi çeşitli bitki ailelerinin latekslerinden tanımlanmış ve incelenmiştir. Çoğu bitki kaynaklı proteaz, sistein proteazlar olarak sınıflandırılırken, daha nadiren aspartik proteazlar şeklinde bulunur (González-Rábade vd., 2011). Papaya (*Carica papaya*), ananas (*Ananas sativa*), bazı

Ficus türleri (*F. carica*, *F. glabrata*), enginar (*Cynara cardunculus*) ve soya fasulyesi (*Glycine hispida*) gibi bitkilerden saflaştırılan proteazlar, bitkilerden elde edilen proteazlara örnek olarak verilebilir (Ward, 1985). Ayrıca, çay bitkisinde peptidaz aktivitesi özellikle sürgün uçlarında saptanmıştır.

Çay yapraklarının kuru ağırlığının yaklaşık %15-25'ini proteinler oluşturur. Bu proteinlerin büyük bir kısmı suda çözünmez. Soldurma sırasında, peptidazlar proteinleri parçalayarak aminoasitlere dönüştürür ve ortaya çıkan serbest aminoasitler siyah çayın aromasını etkiler. Çay yapraklarındaki toplam azot miktarı, proteinler, aminoasitler ve kafein kaynaklı olup, yaprağın yaşı, çeşidi, toprak ve iklim koşulları ile uygulanan kültürel tedbirlere bağlı olarak değişiklik gösterir. Azot oranı %4,1'in altına düştüğünde bitkide azot eksikliğine bağlı olarak verim ve kalite kayıpları gözlemlenebilir. Aminoasitler ve proteinler, çay deminin doygunluğunu artırmakla kalmayıp, polifenollerle oluşturdukları kompleksler aracılığıyla siyah çayın tadını da olumlu yönde etkiler (Safi, 2018).

Çaydaki protein kaynaklı bileşiklerin yaklaşık üçte birinin çay demine geçebildiği belirlenmiştir. Yaprakların taze veya kurutulmuş olması, aminoasit içeriklerini etkiler; özellikle taze ve genç yapraklar daha yüksek miktarda serbest aminoasit bulundurur. Türk çaylarının toplam azot içeriğinin kuru madde bazında %4,0–4,6 arasında değiştiği saptanmıştır (Safi, 2018).

1.1.2.2 Polifenol Oksidazlar (Katekolazlar)

PPO, IUBMB (1984) tarafından 1. sınıf enzimler olan oksidoredüktazlar grubuna dahil edilmiş ve EC 1.10.3.x numaralı alt grup altında sınıflandırılmıştır. Bu enzimler, o-difenolleri okside ederek o-kinonları oluşturur ve bu reaksiyon sırasında moleküler oksijen kullanır (Yoruk ve Marshall, 2003). PPO terimi çoğunlukla iki ana enzim tipini kapsar: katekol oksidazlar (EC 1.10.3.1) ve lakkazlar (EC 1.10.3.2), her ikisi de fenolik bileşiklerin oksidasyonuna aracılık eder (Mayer, 2006).

PPO, bitkilerde yaralanma, patojen saldırısı veya stres koşulları gibi durumlarda fenolik maddeleri oksitleyerek enzimatik kararma reaksiyonuna neden olur. Bu reaksiyon savunma amacı taşıdığı kadar, tarım ve gıda endüstrisinde kalite kaybına da yol açar (Queiroz vd., 2008).

Literatürde PPO enzimlerinin hem mekanizmaları hem de yapısal özellikleri geniş ölçekte araştırılmış olsa da, bu enzimlerin kofaktör kullanımı (genellikle bakır iyonları), substrat spesifikliği ve hücresel lokalizasyonları türden türe önemli değişiklikler gösterir (Klabunde vd., 1998). Bu yapısal ve işlevsel çeşitlilik, PPO enzimlerinin tekil bir model altında sınıflandırılmasını zorlaştırmaktadır.

Ayrıca PPO'ların bazı mikroorganizmalarda ve hayvan dokularında da bulunduğu rapor edilmiştir; ancak en yüksek aktivite ve biyolojik önemleri, bitkisel sistemlerde görülmektedir (Sullivan, 2015).

PPO, Uluslararası Biyokimya ve IUBMB altında fenolik bileşiklerin kinonlara oksidasyonunu katalize eden bakır içeren bir enzim olarak sınıflandırılır. Bu sınıflandırma, substrat özgüllükleri ve reaksiyon mekanizmaları ile ayırt edilen lakazlar ve katekol oksidazlar dahil olmak üzere çeşitli PPO türlerini kapsar (Jukanti, 2017). Lakazlar (EC 1.10.3.2); monofenollerden ziyade polifenoller üzerinde etkili olan çok çeşitli fenolik substratları oksitler (Ishigami vd., 1988). Katekol oksidazlar (EC 1.10.3.1); monofenollerin o-difenollere ve ardından o-difenollerin o-kinonlara dönüşümünü katalize ederek hem kresolaz hem de katekolaz aktivitelerini gösterir (Jukanti, 2017).

PPO'lar tipik olarak monomerler ve trimerler gibi değişen moleküler ağırlıklara ve yapısal formlara sahip iki nükleer bakır içeren metaloproteinlerdir (Ishigami vd., 1988; Kumar, 2015). Enzimin aktivitesi, işlevini artırabilen veya engelleyebilen çeşitli metal iyonlarından etkilenebilir (Kumar, 2015).

PPO'lar gıda işlemede önemli roller oynar ve ürün kalitesini ve tüketici kabulünü etkileyen enzimatik esmerleşmeye katkıda bulunur (Yılmaz ve Elmacı, 2018). Ayrıca hastalıkların tedavisi ve fenolik kirleticilerin atık sudan uzaklaştırılması gibi tıbbi ve çevresel uygulamalarda da kullanılırlar (Kamal-Alahmad vd., 2015).

PPO'lar, bitki aleminde bulunan ve öncelikle orto-difenollerin orto-kinonlara oksidasyonunu katalize etmedeki rolleriyle bilinen ve bu da hasarlı dokularda istenmeyen esmerleşmeye yol açan çeşitli bir enzim grubudur. Bunun ötesinde, PPO'lar bitki biyolojisindeki çok yönlü rollerini sergileyen çeşitli fizyolojik ve savunma mekanizmalarında rol oynarlar (Tran vd., 2012).

Öncelikle PPO'lar, yaralanma veya patojen saldırısı ile indüklenen bitki savunması ile ilişkilidir. Kesin mekanizmalar araştırılmaya devam etmesine rağmen, otçullara ve patojenlere karşı dirençte katkıda bulunurlar (Constabel ve Barbehenn, 2008). Bazı PPO'lar ayrıca özel metabolitlerin biyosentezinde rol oynar ve bu da onların sadece savunmanın ötesinde önemlerini gösterir (Sullivan, 2015).

PPO'ların neden olduğu enzimatik esmerleşme, tarımsal üretim ve gıda işlemede önemli zorluklar oluşturur (Zhang, 2023). Devam eden araştırmalar, PPO'ların aktivasyon mekanizmalarını aydınlatmayı ve esmerleşmeyi azaltmak için aktivitelerini engelleme yöntemlerini keşfetmeyi amaçlamaktadır (Zhang, 2023). PPO'lar bitki savunması ve metabolizması için çok önemli olsa da, esmerleşme etkileri tarımdaki faydalarını karmaşıklıştırarak, faydalı ve zararlı rolleri hakkında dengeli araştırma ihtiyacını vurgulamaktadır.

PPO, çay üretiminde özellikle siyah çayın lezzetini ve rengini belirleyen teaflavinlerin oluşumunda kritik bir enzimdir. PPO aktivitesi, enzim formuna (çözünür veya zar bağlı) ve çay çeşidine bağlı olarak değişir ve bu durum nihai ürünün kalitesini etkiler (Liu vd., 2022). Enzim, fenolik bileşiklerin oksidasyonunu katalize ederek, siyah çayın duyuusal özelliklerinin oluşumunda önemli rol oynayan teaflavinlerin sentezini sağlar (Jie vd., 2017).

Çay yapraklarında çözünür (SpPo) ve zara bağlı (mPPO) iki PPO formu tanımlanmıştır. Her iki form da difenollere karşı yüksek aktivite sergilerken, mPPO asidik koşullarda daha fazla stabilite gösterir (Liu vd., 2022). PPO, zara bağlı formun çözünür forma kıyasla substrat inhibisyonuna daha dirençli olduğunu gösteren çalışmalarla çay polifenollerinin teaflavinlere dönüştürülmesini katalize eder (Liu vd., 2022).

Çin'de yapılan bir çalışmada, farklı çay çeşitlerinin üretilen çayın duyuusal özelliklerini etkileyebilecek düzeyde değişen PPO aktivitesi sergilediği bildirilmiştir. Bu kapsamda, Taoyuandaye çeşidinin, Bixiangzao çeşidine kıyasla daha yüksek PPO aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Huang vd., 2021).

Enzim aktivitesi; substratlara olan afinitesi ve aktivite düzeyi izoenzimlere bağlı olarak değişmekte olup, sıcaklık ve pH gibi çevresel faktörlerden de etkilenmektedir (Jie vd., 2017). Bu enzim aktivitesi, teaflavin üretimini artırmak ve genel çay kalitesini iyileştirmek amacıyla rekombinant teknolojiler aracılığıyla

optimize edilebilmektedir (Zeng vd., 2024).

1.1.2.3. Alkol Dehidrogenazlar (Etanol Dehidrogenazlar)

IUBMB tarafından belirlenen EC sistemine göre ADH, oksidoredüktazlar sınıfının bir üyesi olarak EC 1.1.1.1 numarasıyla tanımlanmıştır. Bu grup, primer ve sekonder alkoller karşılık gelen aldehit veya ketonlara oksidize eden enzimleri içerir ve $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ gibi koenzimlere bağımlıdır (Cornish-Bowden, 2014).

ADH enzimleri, canlı organizmalarda etanol metabolizmasında, ayrıca endojen metabolitlerin (örneğin retinol) dönüşümünde görev yapar. İnsanlarda özellikle karaciğerdeki ADH izoenzimleri, etanolü asetaldehite dönüştürerek detoksifikasyon sürecinde merkezi bir rol oynar (Kubiak-Tomaszewska vd., 2020).

Bu enzimler çoğunlukla çinko içeren metalloenzimlerdir ve çeşitli canlı türlerinde farklı sınıflandırmalara sahip izoformları mevcuttur. Örneğin insanlarda 7'den fazla farklı ADH geni tanımlanmıştır ve bu gen ürünleri substrat spesifikliği, kofaktör bağımlılığı ve doku dağılımı açısından farklılık gösterir (McDonald ve Tipton, 2014). Yapısal düzeyde ADH enzimleri genellikle homodimerik veya heterodimerik yapıdadır.

ADH'lar, biyoteknoloji ve çevre mühendisliği uygulamalarında da değerlidir. Özellikle mikrobiyal ADH enzimleri, biyoyakıt üretimi ve biyoremediasyon gibi endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır (Karigar ve Rao, 2011).

Tüm bu yönleriyle, ADH enzimleri hem biyolojik fonksiyon hem de uygulamalı biyoteknoloji açısından çok yönlü ve kompleks yapılardır. Ancak farklı organizmalarda izoenzimlerin çeşitliliği ve substrat farkları, bu enzimlerin tek bir sistem altında sınıflandırılmasını zorlaştırmaktadır (McDonald ve Tipton, 2023).

ADH, bitki metabolizmasında özellikle aldehitlerin alkollere ve alkollerin aldehitlere dönüşümünde merkezi bir rol üstlenmektedir. Son dönemde yapılan çalışmalar, ADH'nin katalitik işlevlerine ilişkin anlayışı derinleştirmiş ve bu enzimin yalnızca geleneksel görevleriyle sınırlı kalmayıp çeşitli biyokimyasal yollara da katıldığını ortaya koymuştur. Bu kapsamda, ADH'nin özellikle stres koşullarında toksik aldehitlerin detoksifikasyonu ve anaerobik metabolizmanın sürdürülmesi gibi süreçlerde önemli katkılar sağladığı belirlenmiştir (Langley vd., 2022; Pearce ve Simokhin, 2022).

ADH aktivitesi, anaerobik koşullara yanıt olarak önemli ölçüde yukarı regüle edilir ve oksijen yoksunluğu sırasında enerji üretimi için hayati önem taşıyan asetaldehitin etanole dönüştürölmesini kolaylaştırır (Tesnière ve Verriès, 2001).

ADH, siyah çay üretiminde özellikle uçucu bileşiklerin biyosentezi ve ürünün genel kalitesinin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. ADH, aldehitlerin alkolere indirgenmesini katalize ederek çayın aroma ve lezzet profili üzerinde doğrudan etkili olmaktadır (Liu vd., 2022).

ADH aktivitesi, katalitik verimliliğini artırdığı bilinen çay saponinlerinin varlığından etkilenmektedir (Yuan vd., 2018). Ayrıca, ADH ile peroksidazlar ve polifenol oksidazlar gibi diğerk oksidatif enzimler arasındaki etkileşim, siyah çayın karakteristik aroma ve renk oluşumunu belirleyen oksidasyon süreçleri açısından kritik öneme sahiptir (Verloop vd., 2016; Zhang vd., 2020). ADH gen ekspresyon düzeylerinin istenen lezzet profilleriyle ilişkili olması, bu enzimin çay kalitesini iyileştirmeye yönelik ıslah programlarında potansiyel bir hedef haline gelmesini sağlamaktadır (Zhang vd., 2020).

Buna ek olarak, saponin uygulaması yoluyla ADH aktivitesinin optimize edilmesi, içime hazır siyah çay ürünlerinin genel kalitesinin artırılmasına katkı sunabilir (Yuan vd., 2018). Öte yandan, ADH'nin lezzet gelişimine olumlu katkı sağlamasına rağmen, bu enzim ile diğerk oksidatif enzimler arasındaki dengenin bozulması ya da aşırı aktivite göstermesi, istenmeyen aroma bileşiklerinin oluşumuna yol açabilir. Bu durum, çay işleme sürecinde enzimatik aktivitelerin dikkatle izlenmesi ve kontrol edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır (Yuan vd., 2018).

1.2. *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze

Çay (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), Ericales takımı Theaceae familyası, *Camellia* cinsine ait değerli bir kültür bitkisidir (Weisburger, 1997). 9 metreye kadar boylanabilen çalı veya küçük ağaçtır. Yapraklar kısa saplı, eliptikten dar eliptiğek kadar, dişli, dişler ise sivri ile yuvarlak arası, içe doğru kıvrık ve siyah uçlu, derimsidir. Yaprak ilk çıktığında alt yüzeyinde ince uzun yumuşak tüylü olup daha sonra tüysüz hale bürünür. Çiçekler 1-3 adet yaprak koltuğunda ve sarkık durumdadır. Sepaller 5-6 adet, eşit olmayan çok geniş ve 3-5 mm büyüklüğündedir. Petaller 7-8 adet, tabanda stamenlerle birleşik 15-20 mm büyüklüğünde beyaz renklidir. 3 kokuslu meyvenin her

birinde 1-2 adet tohum bulunur, koyu kahverengi renkli ve siğilciktir (Uzun, 2013). Çay bitkisinde 2-3 sıralı yan kökler ve güçlü bir ana kök bulunur. Saçak kökler gelişimin üçüncü yılında oluşmaya başlar. Köklerin hücrelerinde bol miktarda nişasta bulunur (Kaçar, 1984). Çay çok yıllık bir bitki olup ömrü 100 yıl kadardır ve her dem yeşil kalan bitkidir.

Çay bitkisinin anavatanı, genel kabul gören görüşe göre Güney ve Güneydoğu Asya'dır. Bu bitki, özellikle Güneydoğu Asya'nın yaklaşık 30° kuzey enleminin güneyinde kalan bölgelerinde doğal olarak yayılım göstermektedir (Nathaniel, 2008). Yabani çay türlerinin, Çin'in Yunnan bölgesi ile Hindistan'ın Assam eyaleti arasında yer alan dağlık kuşakta doğal olarak yetiştiği düşünülmektedir; ancak bu coğrafi kökenin kesinliği konusunda bilim dünyasında ortak bir görüş birliği bulunmamaktadır (Hasimoto, 2001). Son yıllarda yapılan genetik çalışmalar, kültüre alınmış çay türlerinin tek bir merkezden değil, birden fazla bağımsız genetik havzadan evrimleşmiş olabileceğini göstermektedir (Zhang vd., 2018a). Arkeolojik veriler ise çay bitkisinin yaklaşık altı bin yıl önce hem Çin'de hem de Hindistan'ın kuzeydoğusunda, özellikle Assam bölgesinde varlık gösterdiğine işaret etmektedir. Zamanla bu bitkinin kullanımı Asya kıtasından Japonya'ya, oradan da Avrupa'ya – özellikle Büyük Britanya'ya – ve nihayetinde dünya geneline yayılmıştır (Lanjekar, 2022). Yurdumuzda 3 varyete ile temsil edilir. Bunlar; Çin çayı olarak bilinen *C. sinensis* var. *sinensis* (L.) O. Kuntze, Assam çayı olarak bilinen *C. sinensis* var. *assamica* (J. W. Masters) Kitamura ve Kamboçya çayı olarak bilinen *C. sinensis* var. *lasiocalyx* (G. Watt) A. P. Das & C. Ghosh'dir (Saklı ve Abanoz, 2024). Ülkemizde %95'den daha fazla bir oranla *C. sinensis* var. *sinensis* varyetesi hakimdir.

1.3. Çay İşleme Teknolojisi

Çayın işlenmesindeki temel hedef, yaş çay yaprağında bulunan ve çayın kalitesini olumlu yönde etkileyen bileşenlerin kaybolmadan ve bozulmadan kuru çaya aktarılmasını sağlamaktır; ayrıca olumsuz etkisi olabilecek maddeleri zararsız hâle getirmek veya yok etmek de amaçlanır. Geleneksel çay üretiminde çay filizi, soldurma, kıvrırma, oksidasyon ve kurutma aşamalarından geçirilir. Bu işlemlerin temel amacı, çay yaprağındaki damarlar içinde bulunan özütün yaprak yüzeyine dağılmasını ve kurumasını sağlamaktır. Çayın aromasının oluşumu, bitki türü, coğrafi konum, iklim

ve üretim koşullarına bağlı olarak değişen karmaşık bir süreçtir. Özellikle soldurma ve fermentasyon aşamaları, aroma bileşiklerinin oluşumunu büyük ölçüde etkiler. Günümüzde çay aroması, ürünün fiyatını belirleyen önemli kalite kriterlerinden biri olarak değerlendirilmektedir (Çalikoğlu ve Bayrak, 2009).

Ortodoks ve CTC yöntemleri, dünya genelinde en yaygın bilinen iki çay işleme yöntemidir. Siyah çayın büyük bir kısmı Ortodoks yöntemiyle üretilmektedir. Bu yöntemde çay yaprakları, kıvrırma ve sınıflandırma aşamalarında daha özenli bir şekilde işlenir; yapraklar parçalanmadan ve yapısal bütünlük korunarak şekillendirilir, böylece çayın aroma ve kalite özellikleri muhafaza edilir. Türkiye’de ise Ortodoks ve CTC yöntemlerinin yanı sıra, Çaykur tarafından geliştirilen ve kendi adıyla anılan Çaykur yöntemi de kullanılmaktadır. Bu üç yöntem arasındaki temel fark, kıvrırma ve sınıflandırma aşamalarında ortaya çıkar. CTC yönteminde kıvrırma sırasında yaprakları parçalayan, yırtan ve büken makineler (CTC makineleri) kullanılırken, Çaykur yönteminde rotorvan adı verilen bir makine tercih edilmektedir. Rotorvan yöntemi, standartlara göre toplanmamış, kart ve iri çay yapraklarını, et kıyma makinesine benzer bir mekanizma ile işler; bu makineye rotorvan denir (Özdemir, 1992).

Soldurma aşamasının temel amacı, ürün yapısındaki suyun bir kısmını uzaklaştırarak yapının kırılganlığını azaltmak ve sonraki işlemlerde yaprakların kırılmasını önlemektir. İkinci aşama olan kıvrırma sırasında, bitki hücrelerindeki sıvılar açığa çıkar ve oksidasyon için gerekli enzimlerin aktif hâle gelmesi sağlanır (Kaçar, 2010). Kıvrırma işlemi, oksidasyonun başlamasına zemin hazırlar (Bokuchava ve Skobeleva, 1969). Çay üretiminde kritik aşamalardan biri olan oksidasyonda, polifenol oksidaz aktivitesi sayesinde polifenoller, enzimler ve oksijen etkileşime girerek çayın aromasını oluşturur (Çalikoğlu ve Bayrak, 2009). Oksidasyonun ardından yapılan kurutma işleminde, enzimatik reaksiyonlar durdurulur, yapraktaki su uzaklaştırılır ve çay taşınabilir, depolanabilir hâle getirilir. Son aşama olan tasnifte ise yapraktaki lifler ayrılır, çay partikülleri boyutlarına göre sınıflandırılır ve tüketime uygun hâle getirilir (Kaçar, 2010).

1.3.1. Soldurma

Soldurma, kuru çay üretim sürecinin ilk aşamasını oluşturur ve temel amacı, yaş çay yaprağının kıvrırma işlemi için gerekli elastik yapıyı kazanmasını sağlamaktır.

Bu aşamada yapraklardaki sıvının bir kısmı uzaklaştırılır; taze yapraklar %70-80 su içerirken, soldurulmuş yapraklarda bu oran yaklaşık %50-55'e düşer (Sluijsmans, 1978). Yetersiz soldurma durumunda yaprak elastikiyetini kaybeder, kıvrırma işlemi tam olarak gerçekleşmez ve damarlardaki sıvı yüzeye çıkamaz. Sonuçta elde edilen kuru çayın rengi koyu siyah ve yüzeyi sert olur; içildiğinde metalik ve ot benzeri bir tat oluşturur. Aşırı soldurulmuş yapraklarda ise damarlardaki sıvı tamamen kaybolduğundan, kıvrırma işlemi gerçekleşmez ve kuru çayda verim kaybı görülür. Bu durumda çay, iki renkli olabilir: siyah renk normal soldurulmuş çayı, kahverengi aşırı soldurulmuş çayı ve yeşil tamamen kurumuş çayı temsil eder. Soldurma aşaması sırasında kafein miktarı artar; bu artış aminoasit miktarındaki yükselmeye ilişkilendirilmiştir (Sanderson ve Selvendran, 1965). Kafeinin bir kısmının ribonükleik asitten kaynaklandığı bilinmektedir. Ayrıca, soldurma sırasında çaydaki ribonükleik asidin bir kısmı kafeine dönüşür ve bir kısmı tanen (polifenol) ile birleşerek kafein-tannat bileşiğini oluşturur. Kafein-tannat, çayın buruk tadının oluşmasında önemli bir rol oynar (Altan, 1997).

Soldurma, siyah çay üretiminde kritik bir aşamayı teşkil eder ve nihai ürünün kalitesi ile lezzetini önemli ölçüde belirler. Bu süreç, çay yapraklarının nem içeriğinin azaltılmasını kapsar ve farklı yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Her bir yöntem, elde edilen ürünün kimyasal bileşimini ve duyuşal özelliklerini doğrudan etkiler. Soldurma uygulamaları arasında fiziksel ve kimyasal tekniklerin yanı sıra doğal ortamda, sıcak hava ile ya da kırmızı ışık altında gerçekleştirilen yöntemler yer almaktadır (Deb ve Pou, 2016).

Fiziksel ve kimyasal soldurma, siyah çay üretiminde önemli rol oynayan iki temel süreçtir. Fiziksel soldurma, çay yapraklarındaki nem içeriğinin %70-80 seviyelerinden %60-70'e kadar azaltılmasını içerir; bu durum yaprakların sarkmasına ve sonraki işlemler için gerekli olan özsu konsantrasyonunun artmasına neden olur (Deb ve Pou, 2016). Kimyasal soldurma ise, karmaşık bileşiklerin daha basit formlara parçalanmasını kolaylaştırır; artan enzimatik aktivite ve uçucu bileşik oluşumu sayesinde çayın aroma ve lezzet özelliklerini geliştirir (Deb ve Pou, 2016). Bu bağlamda, soldurma işlemi farklı yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Doğal soldurma, çevresel koşullardan yararlanarak gerçekleştirilir ve lezzet bileşiklerinin oluşumunu önemli ölçüde etkiler (Huang vd., 2023). Sıcak hava ile yapılan soldurma, uçucu

bileşiklerin ve kateşin seviyelerinin artışına katkıda bulunarak lezzet zenginliğini artırırken (Huang vd., 2023), kırmızı ışık altında uygulanan soldurma yöntemi ise acılığı azaltmakta ve amino asitler ile teaflavinlerin miktarını artırarak çayın tat kalitesini iyileştirmektedir (Li vd., 2021)

Siyah çay üretiminde doğal soldurma yöntemi, nihai ürünün lezzet ve kalitesini önemli ölçüde etkileyen kritik bir aşamadır. Bu yöntem, taze çay yapraklarının ortam koşullarında kademeli olarak nem kaybetmesine olanak tanıyarak, lezzet gelişimini destekleyen enzimatik reaksiyonları teşvik eder. Doğal soldurma süreci, taze toplanan yaprakların kontrollü çevresel koşullarda bekletilmesiyle nemin yavaşça buharlaşmasını sağlar; bu da polifenollerin oksidasyonunu kolaylaştırarak teaflavinler ve tearubiginler gibi çayın renk ve lezzet özelliklerine katkı sağlayan bileşiklerin oluşumunu destekler (Yuan vd., 2018). Ayrıca, bu yöntem aroma bileşiklerinin biyosentezinden sorumlu genlerin ekspresyonunu etkileyerek çayın genel lezzet profilini iyileştirir (Huang vd., 2023). Umami tadının oluşumunda önemli rol oynayan protein içermeyen amino asitlerden teaninin birikimi de doğal soldurma ile teşvik edilmektedir (Huang vd., 2023). Mekanik ya da ısıyla gerçekleştirilen diğer soldurma yöntemlerinden farklı olarak, doğal soldurma çayın doğal bileşimini ve saflığını korur, aşırı fermantasyonu önleyerek daha otantik ve dengeli bir tat elde edilmesini sağlar (Nan, 2017; Yuan vd., 2018).

1.4. Literatür Özeti

Soldurma, taze yaprakların toplanmasından belirli işleme adımlarına kadar uzanan prosedürler de dahil olmak üzere her türlü çayın işlenmesinde kritik bir prosedürdür. İşlem, zamana ve iç değişikliklere bağlı olarak kabaca yayma ve soldurma olarak ikiye ayrılır. Yayma işlemi daha kısa sürer, genellikle birkaç saat sürer ve çay yaprakları lapalaşana ve yüzey sonraki işlemler için yeterince siyah olana kadar yalnızca su dağılımıyla ilişkili fiziksel değişiklikler meydana gelir. Yeşil, sarı ve koyu çayların yayılma süreleri sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir. Soldurma işlemi daha uzun sürer çünkü su dağılımını ve taze yapraklardaki enzimlerin neden olduğu kimyasal değişiklikleri içerir. Sürekli su kaybı ve hücre geçirgenliği arttıkça, yapraklar giderek daha yumuşak ve koyu hale gelir ve taze yapraklardaki enzimlerin aktivitesini ayarlar. Soldurma işlemi sırasında, PPO gibi enzimler tarafından katalize edilen

polisakkaritlerin, proteinlerin ve glikozitlerin hidrolizi, çözünür şekerler, amino asitler ve aroma bileşikleri üretir. Bunlar, ikincil metabolizma için enerji ve temel maddeler sağlar ve sinerjik olarak çay aroma kalitesinin oluşumunu destekler (Wu vd., 2019).

PPO'nun çay ürünlerinin duyu kalitesini optimize etmede ve hasat sonrası ve üretim sırasında çayın fonksiyonel bileşenlerinin üretimini teşvik etmedeki kritik rolü araştırmacıların dikkatini çekmiştir. PPO'nun patojen istilasına ve zararlıların hayatta kalmasına karşı savunmada rol oynadığı ve çay bitkilerinde büyüme evreleri boyunca doğuştan ve adaptif bağışıklık sağladığı bildirilmiştir (Yang vd., 2013; Liao vd., 2019). Buna karşılık, bazı zararlılar, hasat sonrası çayda yalnızca renk ve tat gibi duyu nitelikleri değil, aynı zamanda anti-enflamatuar, antioksidan ve diğer farmakolojik özellikleri de olan fonksiyonel bileşenlerin konsantrasyonunu artırmak için PPO'yu önemli ölçüde aktive edebilir ve böylece çayın duyu kalitesini ve ticari kullanımını artırır (Sang vd., 2011). Çay ürünleri, üretim süreçleri boyunca PPO aktivitesine göre oksitlenmemiş yeşil çay, yarı oksitlenmiş oolong çayı, beyaz çay ve sarı çay, tamamen oksitlenmiş siyah çay ve fermente koyu çay olmak üzere altı kategoriye ayrılır. Toplam polifenollerdeki azalma eğilimi, yeşil çay kateşinlerinin siyah çay pigmentlerine dönüşümünden kaynaklanmaktadır (Tanaka ve Kouno, 2003). Kateşinler, yeşil çaydaki en zengin polifenollerdir, yaprak mezofil hücrelerinde bulunur ve çay demlenmesine acılık ve burukluk verir (Ye vd., 2018; Dai vd., 2019). Siyah çay işleme boyunca, özellikle soldurma aşamasında, endojen enzimler (peroksidaz ve polifenol oksidaz), kateşinlerin (monomerler) dimerik bileşiklere (theaflavinler) oksidasyonu ve dimerizasyonu için tetiklenir.

Nem içeriği, ortam pH'sı, bağıl nem, sıcaklık ve solma süresi taze yapraklardaki PPO aktivitesini etkiler (Deb ve Pou, 2016; Guo vd., 2021). Taze yaprakların nem içeriği yaklaşık %75'tir ve soldurma işlemi, soldurma derecesine bağlı olarak oolong, siyah ve beyaz çaylarda bu oranı sırasıyla yaklaşık %30, %40 ve %60'a düşürür (Ölmez ve Yılmaz, 2010). Taze çay yapraklarında PPO aktivitesi için ideal pH aralığı 5,0-6,5'tir; 3,5 pH değerinde PPO aktivitesi önemli ölçüde engellenmiştir (Guo vd., 2021). Soldurma, ortam pH'sını düşüren ve enzimin optimum şekilde çalışmasını engelleyen organik asitler oluşturmakla kalmaz (Chen vd., 2019); su stresi ve protein bozulması, taze yapraklardaki PPO aktivitesinin azalmasına da neden olur. Ancak, yeterli su koşullarına maruz kaldıktan sonra PPO aktivitesinin normale dönmesi, PPO

aktivitesinin taze yaprakların su içeriğiyle doğrudan ilişkili olduğunu gösterir (Ullah ve Roy, 1982).

Buna karşılık, aynı zaman koşulları altında, soldurma sıcaklığı ne kadar yüksekse, PPO aktivitesi o kadar yüksektir (Zhou vd., 2020a). Ancak, soldurma sıcaklığı 38°C'yi aştığında PPO aktivitesi inhibe olur (Deb ve Pou, 2016; Ntezimana vd., 2021). Oda sıcaklığındaki işleme kıyasla, düşük sıcaklıkta soldurma, flavanol üretiminde rol oynayan genlerin ekspresyonunu korurken PPO aktivitesini geciktirebilir ve baskılayabilir, dolayısıyla genç yapraklardaki polifenollerin oksidasyonunu azaltabilir (Yu vd., 2020a). Endüstriyel üretimde, araştırmacılar çay yapraklarının 4°C sıcaklıkta ve %90 bağıl nemde uzun süreli soldurulmasının çay yapraklarında daha az PPO aktivitesi kaybına yol açtığını ve soğuk depolama soldurması ile geleneksel soldurma arasında nihai ürün kalitesinde önemli bir fark olmadığını gözlemlemişlerdir. Bu durum, kötü depolama koşulları ve yüksek hammadde kayıplarından kaynaklanan hasat sonrası kayıpları önlemeye yardımcı olabileceği gibi, üretim döngüsünü de uzatarak çay endüstrisi için faydalı olabilir (Ölmez ve Yılmaz, 2010; Zhang vd., 2019). Yukarıda belirtilen bulgulara göre, yeşil çay için optimum yayılma parametreleri genel olarak %70 nem, 25°C sıcaklık ve 8 saattir (Ren vd., 2020). %60 nem, 28°C sıcaklık ve $8 \pm 0,5$ saatlik soldurma süresi, yüksek kaliteli siyah çay işlemek için en uygun koşullardır ve siyah çayın kokusunu, tadını ve diğer özelliklerini önemli ölçüde iyileştirir (Tomlins ve Mashigaidze, 1997; Ntezimana vd., 2021). Beyaz çay kalitesi, uzun süreli soldurma sırasında taze yaprak kalıntılarının kendiliğinden oksidasyonu ile belirlenir ve bu durum PPO aktivitesini ne destekler ne de engeller (Yang vd., 2018). Bu nedenle, PPO aktivitesi ile kademeli ve hafif oksidasyon arasında bir denge sağlamak ve böylece tarımsal kalkınmaya fayda sağlamak ve beyaz çayın kalitesini korumak için soldurma işlemi boyunca PPO aktivitesinin kontrol edilmesi gerekir. Bu nedenle, çay ürünlerinin kalitesini korumak amacıyla soldurma işlemi boyunca PPO aktivitesi kontrol edilmelidir. Çayın sağlık yararları ve duyu kalitesi, bu süreçte PPO aktivitesinin düzenlenmesiyle önemli ölçüde artırılabilir. Böylece, tüketicilere günlük sağlık bakımı için daha çeşitli ve kaliteli ürünler sunulabilir.

Çayın uçucu bileşenleri metabolik kökenlerine göre dört ana sınıfa ayrılabilir: yağ asidi türevleri, fenilpropanoidler/benzenoidler, terpenoidler ve norisoprenoidler

(Yang vd.,2013; Fu vd., 2017). Bu sınıflar arasında yağ asidi türevleri, hasat sonrası süreçte çay aromasını belirlemede hayati bir rol oynar.

Önemli bir nakit ürünü olan çay bitkisi, hasat sonrası süreçte ışık, ısı ve yaralanma stresleriyle karşı karşıya kalır (Cho vd., 2007; Gui vd., 2015). Hekzanal, cis-3-hekzenal, hekzanol ve cis-3-hekzenol dahil olmak üzere C₆ bileşikler, uzun zincirli doymamış yağ asitlerinden (örneğin, linolenik asit ve linoleik asit) türetilen uçucu bileşiklerdir. Üç enzim olan LOX (lipoksigenaz, EC 1.13.11.12), HPL (hidroperoksit liyaz, EC 4.1.2.-), ADH (alkol dehidrogenaz, EC 1.1.1.1) ve LOX-HPL yolundaki bir izomerizasyon faktörü, çay yapraklarındaki uçucu C₆ bileşiklerinin biyosentezinden sorumludur. Bunlar arasında, yüksek bitkilerin kısa zincirli alkol metabolizmasında rol oynayan çinko içeren bir enzim olan ADH, biyotik ve abiyotik stres altında aktive olur (Kagi ve Vallee, 1960; Heinstra vd., 1989; Mangolin vd., 1994). ADH aktivasyonunun ardından, C₆-aldehitler, oksijen eksikliği koşullarında, anaerobik koşulların bir göstergesi olarak kabul edilen ADH'nin enzimatik etkisiyle C₆-alkollere indirgenir (Francis vd., 1974; Sekiya, vd., 1984). C₆-aldehitler ve C₆-alkoller, yalnızca bitki savunma bileşikleri değil, aynı zamanda çay aromasının önemli öncülleri olan yeşil yaprak uçucularının temel bileşenleridir (Mu vd., 2014; Ono vd., 2016). Dolayısıyla, ADH'nin aktivitesi ve ilgili genlerinin ekspresyonu, hasat sonrası süreçte çay kalitesinin gelişimi için temeldir.

38 °C'nin üzerindeki siyah çay soldurma sıcaklığı, yaprak hücre matrisinin erken hasar görmesi nedeniyle enzimatik aktiviteyi etkilerken, daha düşük bir sıcaklık kateşinlerin theaflavinlere (TF) dönüşümünü engeller (Deb ve Pou, 2016). Önceki araştırmalar, soldurulmuş yapraklardaki %60 nem oranının kalite puanları ve siyah çay aktivitesi için ideal olduğunu ortaya koymuştur (Zhou vd., 2020b). Soldurma sırasındaki bağıl nemin amino asitler, çözünür şekerler ve polifenoller üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu ve %55 ve %65 bağıl nemin siyah çayın aroma ve tat kalitesini artırabileceği bildirilmiştir (Zhou vd., 2020b).

Aslında, önceki çalışmalar, biyolojik makromoleküllerin hidrolizinin soldurma işlemi sırasında hayati bir kimyasal reaksiyon olduğunu göstermiştir (Wu, vd., 2019). Polisakkaritler ve proteinler, hidrolitik enzimler altında hidrolize edilir ve bu da sırasıyla çözünür şeker ve amino asit içeriğini artırarak siyah çay aroma kalitesinin gelişimine sinerjik olarak katkıda bulunur (Deb ve Pou, 2016; Wu, vd., 2019).

Glikozidik olarak bağlı uçucu maddeler de geraniol ve linalool gibi siyah çayın ilişkili aroma kalitesi bileşiklerinin oluşumunu desteklemek için glikozidaz varlığında bir hidroliz işlemine tabi tutulur (Zheng vd., 2016). Ek olarak, kateşinler gibi k moleküllerin izomerizasyon reaksiyonu da siyah çayın kalitesini iyileştirmek için faydalıdır (Obanda vd., 2001). Soldurma süresi, işleme sırasında siyah çay metabolitlerini etkileyen faktörlerden biridir. Ancak, siyah çay kalitesi, kimyasal değişiklikler ve besin özellikleri üzerindeki etkisi hala belirsizdir.

Amino asitlerin artan eğilimi, protein moleküllerinin peptidaz tarafından basit amino asitlere parçalanmasından kaynaklanmaktadır; siyah çayın solması sırasında protein, toplam içeriğinin yaklaşık %1,2'si oranında azalmıştır (Tomlins ve Mashigaidze, 1997). Serbest amino asitlerin metabolizması, siyah çayın kalitesi ve lezzetinde kritik bir rol oynar. Amino asitlerin göreceli içeriğindeki artış, soldurma sırasındaki protein bozunma hızına bağlıdır (Wang vd., 2019). Aromatik amino asitler, yani L-fenilalanin, L-triptofan ve L-tirozin, soldurma sırasında pentoz fosfat yoluyla korizat (nclleri) sentezi nedeniyle artmıştır (Yu vd., 2020a). Çayda nispeten bol bulunan bir amino asit olan glutamin, soldurma süresinin artmasıyla azalır; bunun nedeni muhtemelen teanin sentezinde etilamin oluşumuna katkıda bulunmasıdır (Yu vd., 2020). Bu nedenle, glutaminden sentezlenen glutamat ve Gamma-Aminobütirik Asit (GABA), GABA'nın göreceli içeriğinde bir artışa neden olabilir (Bak vd., 2006). Ek olarak, soldurma sırasında klorofil pigmentindeki azalma glutamat içeriğini azaltır (Yu, vd., 2019).

ay bitkisinde peptidaz aktivitesi özellikle sürgün uçlarında gözlemlenmiştir. Bu aktivite, çay bitkisinin farklı çeşitlerinde değişiklik göstermektedir. Soldurma aşaması sırasında peptidazlar, proteinlerin amino asitlere parçalanmasında önemli bir rol oynamaktadır (Sanderson ve Roberts, 1964).

ay bitkilerinde PPO aktivitesi, siyah çay üretiminin temel aşamalarından biri olan solma sürecinde belirgin şekilde değişime uğramaktadır. Araştırmalar, solma sırasında meydana gelen kısmi su kaybının PPO seviyelerinde bir düşüşe yol açtığını; ancak yapraklarda mevcut olan substratların oksidasyonu için hl yeterli düzeyde enzim aktivitesinin korunduğunu ortaya koymuştur (Ullah ve Roy, 1982).

PPO aktivitesi, çevresel etkenlere karşı oldukça hassastır ve özellikle sıcaklık ile mevsimsel değişkenlikten etkilenmektedir. İlkbahar aylarına kıyasla yaz aylarında

daha yüksek PPO aktivitesi gözlemlenmiştir; bunun da çayın kimyasal bileşimi ve kalitesi üzerinde doğrudan etkili olduğu bildirilmiştir (Takeo, 1966). Solma işlemi, kıvırma gibi mekanik işlemlerle birleştirildiğinde ise PPO aktivitesinde kayda değer bir artış meydana gelmektedir (Takeo, 1966).

Her ne kadar PPO aktivitesi solma sürecinde azalma eğilimi gösterse de rehidrasyon sonrasında eski düzeyine ulaşabilmektedir (Ullah ve Roy, 1982). Öte yandan, yüksek sıcaklıklara maruz kalınan solma koşulları, enzim aktivitesini hızlandırmakta; yaz aylarında artan bu aktivite düzeyi, üretilen çayın kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir (Takeo, 1966).

Çay bitkilerinde solma işlemi sırasında ADH aktivitesi, çayda lezzet ve aroma gelişimi için çok önemlidir. Çay üretiminde önemli bir adım olan solma, uçucu bileşiklerin, özellikle çayın aromatik profili için gerekli olan C6-alkollerin dönüşümüne katkıda bulunan enzimatik aktiviteleri etkiler. ADH aktivitesi solma aşamasında önemli ölçüde artar ve C6-aldehitlerin aroma gelişimi için hayati önem taşıyan C6-alkollere dönüştürülmesini kolaylaştırır (Zhou vd., 2020b).

Solma işlemi, kateşinlerde bir azalmaya ve çözünür şekerler ve amino asitlerde bir artışa yol açarak çayın genel lezzet profilini artırır (Li vd., 2024). Solma sürecinde proteinlerin ve diğer metabolitlerin parçalanması, içeceğin renk canlılığı ve damakta bıraktığı dolgunluk gibi arzu edilen niteliklerin gelişimine de katkıda bulunur (Ullah vd., 1984; Wu vd., 2018). Serbest amino asit içerikleri çay kalite güvencesi için önemli bir kriter olarak kabul edilir ve tat ve renk açısından genel kaliteye katkıda bulunur (Yao vd., 2006).

Solma sırasında ADH aktivitesindeki artış lezzet geliştirme için faydalı olsa da, aşırı solma diğer bileşiklerde istenmeyen değişikliklere yol açabilir ve potansiyel olarak çayın genel kalitesini etkileyebilir. Solma koşullarının dengelenmesi, hem ADH aktivitesini hem de diğer anahtar metabolitlerin korunmasını optimize etmek için esastır (Qi vd., 2024).

Çay üretiminde kullanılan soldurma teknelerinin tasarımı ve işlevsel parametreleri üzerine çeşitli araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Singh vd. (2012), özelleştirilmiş bir soldurma teknesi kullanarak amino asit düzeyi, PPO ve POD enzim aktiviteleri ile nem içeriği gibi bazı biyokimyasal ve fiziksel parametrelerde soldurma süreci boyunca meydana gelen değişimleri incelemiştir. Deneysel süreçte hava hızı,

sıcaklık ve nem gibi çevresel faktörler kontrollü şekilde ayarlanmıştır. Elde edilen bulgular, özelleştirilmiş sistemlerde gerçekleştirilen kontrollü soldurma işleminin, doğal soldurma yöntemine kıyasla hedeflenen biyokimyasal ve fiziksel özelliklere daha kısa sürede ulaşılmasını sağladığını ortaya koymuştur.

Soldurmanın siyah çay kalitesi üzerindeki belirleyici rolünü göz önünde bulundurarak, bazı araştırmacılar siyah çayın kalitesini iyileştirmek için bu aşamayı araştırmışlardır. Muthumani ve Kumar (2007) tarafından yapılan bir araştırmada, dondurma-soldurma tekniği kullanılarak soldurma süresi kısaltılmıştır. Soldurulan yaprakların kalitesi, geleneksel yöntemlerle soldurulanlara göre daha yüksek bulunmuştur. Baruah vd. (2012) soldurma sırasında nem kaybının ve sıcaklığın teaflavinler, (TF) tearubiginler (TR) ve uçucu aromalı bileşenlerin oluşumu üzerindeki etkisini incelemiştir.

Sabhapondit vd. (2014) solmuş yaprağın farklı nem içeriğinin PPO ve POD oksidatif enzimlerin aktivitesi ve teaflavin ve tearubigin oluşumu üzerindeki etkisini görmek için bir çalışma yapmışlardır. Kalidass vd. (2019) CTC (kes, kopar, kıvrır) siyah çay üretiminde soldurma sürecinde meydana gelen biyokimyasal değişiklikleri incelemişlerdir. Nasir vd. (2015) beş farklı klon ve beş farklı soldurma süresi belirleyerek siyah çayın kalitesini araştırmışlardır.

Owuor ve Obanda (1996) siyah çay kalitesi üzerine soldurma sıcaklığının etkisini araştırmışlardır. Aftab vd. (2015) farklı soldurma zamanlamasının siyah çayın polifenoller ve kafein içerikleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Bunun için iki farklı ayda (Temmuz ve Ağustos) ve farklı soldurma aralıklarında (21, 22, 23 ve 24 saat) teaflavin ve polifenollerdeki değişiklikleri gözlemlemişlerdir. Too vd. (2015) güneş ışığı ve soldurma etkisine göre çay sürgünlerinin farklı bölümlerinde teanın düzeylerini belirlemeyi amaçlamışlardır.

Önceki araştırmalar, solmuş yaprakların %60 nem içeriğinin kalite puanları ve siyah çay aktivitesi için optimal görüldüğünü ortaya çıkarmıştır (Zhou vd., 2020b). Soldurma sırasındaki bağıl nemin amino asitler, çözünür şekerler ve polifenoller üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu ve %55 ve %65 bağıl nemin siyah çayın aromasını ve tat kalitesini artırabileceği bildirilmiştir (Qiu vd., 2014).

Omiadze vd. (2014), siyah çay üretimi sırasında soldurma aşamasındaki biyokimyasal süreçleri incelemiştir. Ye vd. (2018), yeşil çayda soldurma sırasında

amino asit, kateşin, kafein ve gallik asitte dinamik değişiklikleri incelemişlerdir. Ye vd. (2020), soldurmanın solmuş çay yapraklarının temel fiziksel özellikleri (elastikiyet, plastisite, esneklik) ve Kongou siyah ayının duyuşal kalitesi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Soheili-Fard vd. (2015) soldurma işleminin siyah çayın duyuşal özelliklerine etkisini tespit etmişlerdir.

ay yapraklarının kuru ağırlılığının yaklaşık %15-25'ini proteinler oluşturur. Bu proteinlerin büyük bir kısmı suda çözünmez niteliktedir. Soldurma sırasında peptidaz enzimleri, proteinleri parçalayarak aminoasitlere dönüştürür ve oluşan serbest aminoasitler siyah çayın aromasını etkiler. ay yapraklarındaki toplam azot miktarı, proteinler, aminoasitler ve kafein kaynaklı olup, yaprağın yaşı, çeşidi, toprak ve iklim koşulları ile uygulanan kültürel tedbirlere bağlı olarak değişiklik gösterir. Azot oranı %4,1'in altına düştüğünde bitkide azot eksikliğine bağlı olarak verim ve kalite düşüşleri gözlemlenebilir. Aminoasitler ve proteinler, çay deminin doyuşunluğunu artırmanın yanı sıra, polifenollerle oluşturdukları kompleksler aracılığıyla siyah çayın tadını da olumlu yönde etkilemektedir (Safi, 2018).

Emdadi vd. (2009) yapmış oldukları çalışmalarında çay yapraklarının soldurma süresinin ve fermantasyon koşullarının siyah çay kalite parametreleri üzerindeki etkisini incelemek için bir yanıt yüzeyi metodolojisi olan merkezi kompozit tasarım tekniğini kullanmışlar ve soldurma süreleri olarak 10-15-20 saati denemişlerdir. Teaflavin oluşumunun en yüksek seviyelerinin soldurma süresi yaklaşık 19-20 saat ve fermantasyon süresi ise yaklaşık 25-30 dakika olduğu zamanda tespit edilmiştir.

Soldurma süreleri, siyah çay üretimi sırasında çay yapraklarının toplam serbest amino asitlerini ve mineral içeriğini etkiler (Jabeen vd., 2019). Siyah ay üretiminde soldurma zaman alıcı bir aşamadır (Owuor ve Orchard, 1991). Zaman, sıcaklık ve bağlı nem gibi uygun soldurma koşulları, iklime, üretim bölgesine ve kullanılan üretim sürecinin türüne bağlı olarak değişebilir (Tomlins ve Mashingaidze, 1997). Uygun bir soldurma süresi, alkoller, esterler, aldehitler ve ketonların yanı sıra az sayıda asit, fenol ve hidrokarbon dahil olmak üzere çoğu uçucu bileşenin konsantrasyonlarını artırabilir (Zhou vd., 2020b).

Ntezimana vd. (2021) farklı soldurma sürelerinin (4, 8, 10 ve 12 saat) siyah çayın duyuşal niteliklerini, kimyasal bileşenlerini ve besin özelliklerini etkilediğini ifade etmişlerdir. Genel sonuçları değerlendirdiklerinde ise 8 ila 10 saat arası soldurma

süresinin siyah çay kalitesini ve besin özelliklerini iyileştirebileceğini belirtmişlerdir.

Soldurma, siyah çayın kalitesini artırmak ve kendine özgü aromasını oluşturmak için gerekli bir işlemdir. Çay yapraklarının nem içeriği, soldurma derecesinin önemli bir göstergesidir (Huang vd., 2023). Belirli bir soldurma süresi olmamakla birlikte, genellikle 14-18 saat optimum süre olarak kabul edilir. Çay sürgünlerinin düzgün ve dengeli bir şekilde soldurulması, büyük ölçüde toplama, elleçleme, taşıma, çevre koşulları, süre ve sıcaklığa bağlıdır. Bu nedenle, yüksek kaliteli çay tüketimini sağlamak için soldurma aşaması dikkatlice izlenmelidir (Deb ve Pou, 2016). Mevcut literatür incelendiğinde, siyah çayın kalitesi üzerine soldurma süreçlerine ilişkin pek çok çalışmanın bulunduğu; ancak bu süreçlerin enzim aktiviteleri üzerindeki etkilerini inceleyen araştırmaların sınırlı sayıda olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, literatürde doğal soldurma yöntemi ile farklı soldurma sürelerinin çay bitkisindeki ADH, peptidaz ve PPO aktiviteleri üzerindeki etkilerini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışma, doğal soldurma yöntemi ile farklı soldurma sürelerinin siyah çayın renk, tat ve aroma gibi kalite parametrelerini etkileyen ADH, peptidaz ve PPO aktivitelerinde meydana gelen değişimleri iki farklı çay klonunda (Ali Rıza Erten ve Zihni Derin) analiz ederek ortaya koymayı amaçlayan ilk araştırmadır. Bu temel amaç doğrultusunda, Çaykur Atatürk Çay ve Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğünün çay fidanlıklarında kontrollü koşullar altında yetiştirilen Ali Rıza Erten ve Zihni Derin klonları seçilmiş, farklı soldurma sürelerine göre enzim aktiviteleri belirlenmiş ve her iki klonda çay kalitesine yönelik enzim aktivitesi değişimleri tespit edilmiştir. Bulgular, literatürdeki veriler ışığında tartışılarak değerlendirilmiştir. Bu çalışma, siyah çayın kalite özelliklerini iyileştirmek için soldurma konusunda teorik bir temel sunmaktadır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Örneklerin Temini ve Analize Hazır Hale Getirilmesi

Atatürk Çay ve Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü'nün çay fidanlıklarında kontrollü bir şekilde yetiştirilen Ali Rıza Erten ve Zihni Derin çay klonlarının (*Camellia sinensis* L.) taze yaprakları geleneksel Türk çayı hasat standardına (bir tomurcuk ve 2 yaprak) göre 2023 yılının ikinci sürgün döneminde toplandı. Her bir klona ait toplanan taze çay yaprakları gölgeli ve havadar bir ortamda ince bir tabaka halinde temiz bezler üzerine serildi ve doğal soldurma yöntemi ile işlendi. Yapraklar direkt güneş ışığından korunarak, gölge ve hava akımı olan bir ortamda doğal olarak 16, 17, 18, 19, 20 ve 24 saat boyunca solduruldu. Eşit soldurmayı sağlamak için yapraklar ara sıra nazikçe karıştırıldı. Kontrol örnekleri taze yaprak olarak (0 saat) muhafaza edildi. Her uygulama için üç tekrar gerçekleştirildi.

2.2. Laboratuvar Analizleri

2.2.1. Enzim Ekstraktının Hazırlanması

25 gram (gr) çay, sıvı azot ile parçalandıktan sonra üzerine 100 mililitre (mL) polietilen glikol (PEG) eklendi ve karıştırıldı. Karışım 50 mL falcon tüplere doldurulduktan sonra hassas terazide tartıldı ve ağırlıkları eşitlendi. 4 °C'de 10,000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pellet atıldı ve süpernatant ham enzim ekstraktı olarak kullanıldı.

2.2.2. Protein Analizi

Protein konsantrasyonu, Coomassie Blue G-250 kullanılarak Bradford metoduna göre tayin edildi (Bradford, 1976). Coomassie Brilliant Blue G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır.

Bradford Ayıracı: 50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 önce 25 ml %95'lik etanolde çözüldükten sonra bu çözeltiye 50 mL %85'lik fosforik asit ilave edildi. Manyetik karıştırıcıda karıştırılırken üzerine biraz saf su eklendi ve iyice çözüldükten sonra çözeltinin son hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan Coomassie Brilliant Blue G-250 şişeye doldurulmadan önce filtre kâğıdı ile iki kez süzüldü.

BSA (Bovin Serum Albumin): 1 mg BSA tartıldı ve 1000 mikrolitre (μL) saf su içerisinde vortekslenerek karıştırıldı ve son hacmi 1/1 olan çözelti elde edildi. Hazırlanan 1/1 BSA çözeltisinden 1 mL'lik eppendorfa 250 μL alınarak üzerine 750 μL saf su eklendi ve 250 μL / 1 mL oranında BSA çözeltisi hazırlandı ve deneyde stok çözelti olarak kullanıldı.

2.2.2.1. Protein Standart Grafiğinin Hazırlanması

Eppendorf içine ilk önce saf su, daha sonra BSA, daha sonra ise Coomassie Brilliant Blue G-250 eklendi (Tablo 1). Coomassie Brilliant Blue G-250 eklendikten sonra vorteksleme işlemi yapıldı. Vortekslenen örnekler 5 dakika karanlıkta bekletildi ve bu sürenin bitiminde 595 nanometrede (nm) absorbans değerleri okundu. Elde edilen absorbans değerlerinden standart grafiği çizildi. Çizilen bu grafiğin eğiminden yararlanılarak enzim örneklerinin protein miktarları hesaplandı (Türkhan vd., 2018).

Tablo 1. Protein standart grafiğinin hazırlanması aşamasında kullanılan çözelti ve miktarları

	K1	K2	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Son derişim ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	0	0	5	10	20	40	60	80	100
250 μL /1mL BSA	0	0	4	8	16	32	48	64	80
Saf su (μL)	200	200	196	192	184	168	152	136	120
Coomassie Brilliant Blue G-250 (μL)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

K: Kör; S: Standart

2.2.2.2. Protein Miktarının Ölçülmesi

Eppendorf içine ilk önce saf su, daha sonra enzim ekstraktı, daha sonra ise Coomassie Brilliant Blue G-250 eklendi (Tablo 2). Coomassie Brilliant Blue G-250 eklendikten sonra vorteksleme işlemi yapıldı. Vortekslenen örnekler 5 dakika karanlıkta bekletildi ve bu sürenin bitiminde 595 nm'de absorbans değerleri köre karşı okundu (Türkhan vd., 2018).

Tablo 2. Protein miktarının ölçülmesi aşamasında kullanılan çözelti ve miktarları

	K1	K2	Ö1
Son derişim (µL/mL)	0	0	5
250µL/1mL BSA	0	0	4
Saf su (µL)	200	200	196
Coomassie Brilliant Blue G-250 (µL)	1000	1000	1000

K: Kör; Ö: Örnek

Hesaplama: Protein (mg/mL) = (Absorbans (660) /Eğim) x (Seyreltme faktörü) /1000

2.2.3. Peptidaz Analizi

2.2.3.1. Tirozin Standart Grafiğinin Hazırlanması

1,1 milimolar (mM) L-tirozin çözeltisinden farklı miktarlarda (10-50 µL) alınarak tüpe toplam hacim 250 µL olacak şekilde saf su eklendi. Daha sonra 625 µL (500 mM) sodyum karbonat (Na₂CO₃) çözeltisi ve 100 µL Folin & Ciocalteu's fenol reaktif çözeltisinden tüpe konuldu. Hazırlanan tüpler 37 °C sıcaklıkta 30 dakika inkübasyona bırakılarak 660 nm'de absorbansı ölçüldü. Elde edilen absorbans değerlerinden standart grafiği çizildi.

2.2.3.2. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Enzim aktivitesi ölçümleri için Cupp-Enyard (2008) yöntemi kullanıldı. 20 µL enzim ekstraktı ve 1000 µL substrat (%0,65 (ağırlık/hacim (w/v))'lik kazein çözeltisi) karıştırılarak A1 çözeltisi hazırlandı ve 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Hazırlanan A1 çözeltisinden 250 µL ependorfa konularak üzerine 110 mM %1'lik 500 µL TCA (trikloroasetik asit) çözeltisi eklendi ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler 14,000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant başka bir ependorfa alındı ve üzerine 625 µL Na₂CO₃ (500 mM) eklendi ve 1-2 dakika bekletildi. Son olarak ependorflara 100 µL Folin & Ciocalteu's fenol çözeltisi eklendi ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Süre bitiminde oluşan mavi rengin şiddeti 660 nm'de köre karşı absorbansın ölçülmesi ile belirlendi. Enzim aktivitesi önceden

oluşturulmuş tirozin standart grafiğinin eğimi kullanılarak aşağıda verilen formül ile hesaplandı.

$$\text{Enzim Aktivitesi (U mL}^{-1} \text{ dk}^{-1}) = \frac{\frac{OD_{660}}{E_{gim}} \times \text{Reaksiyon Hacmi (mL)} \times \text{Seyreltme Faktörü}}{\text{Enzim Çözeltilisinin Hacmi (mL)} \times \text{Reaksiyon Süresi (dk)}}$$

Bir birim proteaz aktivitesi (1 U); reaksiyon koşullarında dk'da 1 µg tirozin üretebilmek için gerekli olan enzim miktarı olarak tanımlandı. Tüm enzim aktiviteleri protein bazında verildi.

2.2.4. Polifenol Oksidaz Analizi

2.2.4.1. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

PPO aktivitesi, spektrofotometrik olarak L-tirosin için 496 nm'de absorbanstaki artışın ölçülmesiyle belirlendi (Espin vd., 1995). Enzim aktivitesi bakılırken, 5 µL enzim, 20 µL substrat (5 mM), 100 µL sodyum fosfat tamponu (50 mM) çözeltisi ilave edilerek reaksiyon karışımının son hacmi 125 µL olacak şekilde hazırlandı. Enzim çözeltisinin konulmadığı reaksiyon karışımı da kör olarak kullanıldı. Bir ünite PPO aktivitesi; 1 mL reaksiyon karışımında bir dakikadaki 0,000125 absorbans artışına neden olan enzim miktarı olarak belirlendi. PPO'nun spesifik aktivitesi, miligram protein başına enzim aktivitesi olarak hesaplandı (Kolcuoğlu, 2012; Türkhan vd., 2018)

2.2.5. Alkol Dehidrogenaz Analizi

2.2.5.1. Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

Enzim aktivitesi tayini için örnekler 10 ml fosfat tamponu (0,5 molar (M), pH=7,0) ile homojenize edilip, +4°C'de 3000 devir/dakika'da 15 dakika santrifüj edildi (Smith vd., 1971). Supernatanttan 0,2 ml alınıp üzerine nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) (2,5 mM) ve etil alkol (10 mM) çözeltisinden oluşan reaksiyon karışımı eklenerek 25°C'de, 340 nm'de spektrofotometrede dakikadaki absorbans değişimi ölçüldü. Enzim aktivitesi, dakikadaki optik dansite değişimi olarak Delta optik yoğunluk (DOD) 340/g enzim/dakika ifade edildi (Smith vd., 1971).

2.3. İstatistiksel Analiz

Çalışmada tüm verilerin istatistiksel analizleri R programı, RStudio versiyon 4.5.1 kullanılarak yapıldı (R Core Team, 2024; RStudio Team, 2024). Verilerin normal dağılımdan önemli ölçüde sapıp sapmadığını belirlemek için Shapiro-Wilk normallik testi kullanıldı. Normal dağılımın ardından analizler parametrik yöntemlerle gerçekleştirildi. Klonlar, enzimler ve farklı soldurma süreleri arasındaki karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapıldı; gruplar arasında anlamlı fark bulunan analizlerde farkın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek üzere Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Ayrıca, enzim aktiviteleri ile soldurma süreleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla Pearson korelasyon analizi gerçekleştirildi. Korelasyon analizleri sonucunda elde edilen veriler korelasyon katsayısı (r) ve anlamlılık düzeyi (P) ile raporlanmış; sonuçlar ggcorrplot, corrplot ve ggpubr gibi R paketleri kullanılarak ısı haritası (heatmap) biçiminde görselleştirildi (Kassambara, 2020; Kassambara, 2023; Wei ve Simko, 2021). Verilerin düzenlenmesinde ve analiz sürecinin yürütülmesinde readxl, dplyr ve ggplot2 gibi temel R paketlerinden de yararlanıldı (Wickham ve Bryan, 2023; Wickham, 2016; Wickham vd., 2023). Tüm bu analizler sonucunda, her bir klon ve enzim için farklı soldurma sürelerine verilen biyokimyasal tepkiler karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

3. BULGULAR

3.1. Ali Rıza Erten Klonunun Enzim Aktiviteleri

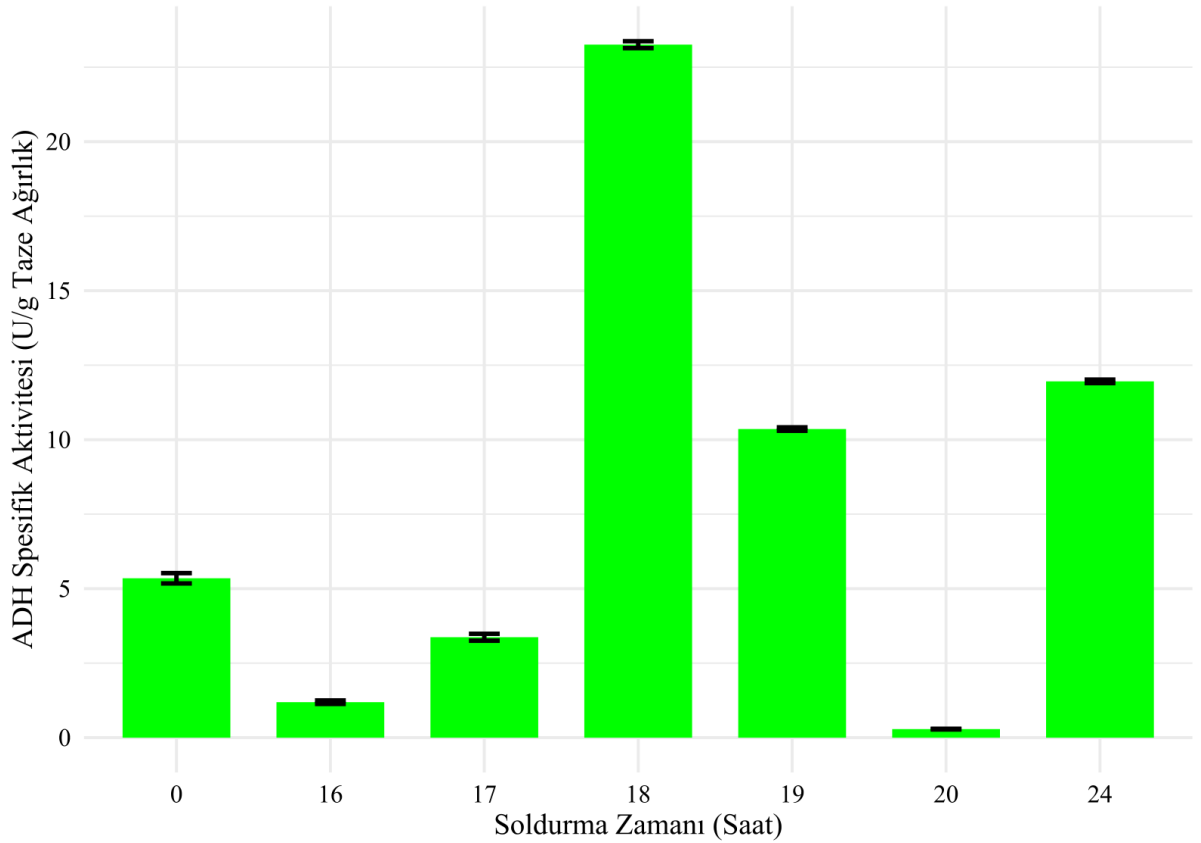
3.1.1. Farklı Soldurma Sürelerine Göre ADH Aktivitesi

ADH aktivitesi üzerine farklı soldurma sürelerinin etkisi Tablo 3’de verilmiştir. Soldurma sürelerine göre ADH aktiviteleri One-Way Anova testi ile değerlendirildiğinde istatistiksel olarak $P < 0,001$ seviyesinde önemli farklılıklar göstermiştir (Tablo 3). En yüksek ADH aktivitesi 18 saatlik soldurmada, en düşük aktivite ise 20 saatlik soldurmada gözlenmiştir (Şekil 1.).

Tablo 3. Soldurma sürelerine göre ADH aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)

Soldurma Süreleri	Ortalama	Standart Hata	Minimum	Maksimum
0 saat	5,34d	0,17	5,05	5,65
16 saat	1,19f	0,05	1,09	1,29
17 saat	3,37e	0,11	3,17	3,57
18 saat	23,26a	0,11	23,06	23,46
19 saat	10,36c	0,05	10,26	10,46
20 saat	0,28g	0,01	0,27	0,31
24 saat	11,96b	0,05	11,86	12,06
Genel	7,97	1,67	0,27	23,46

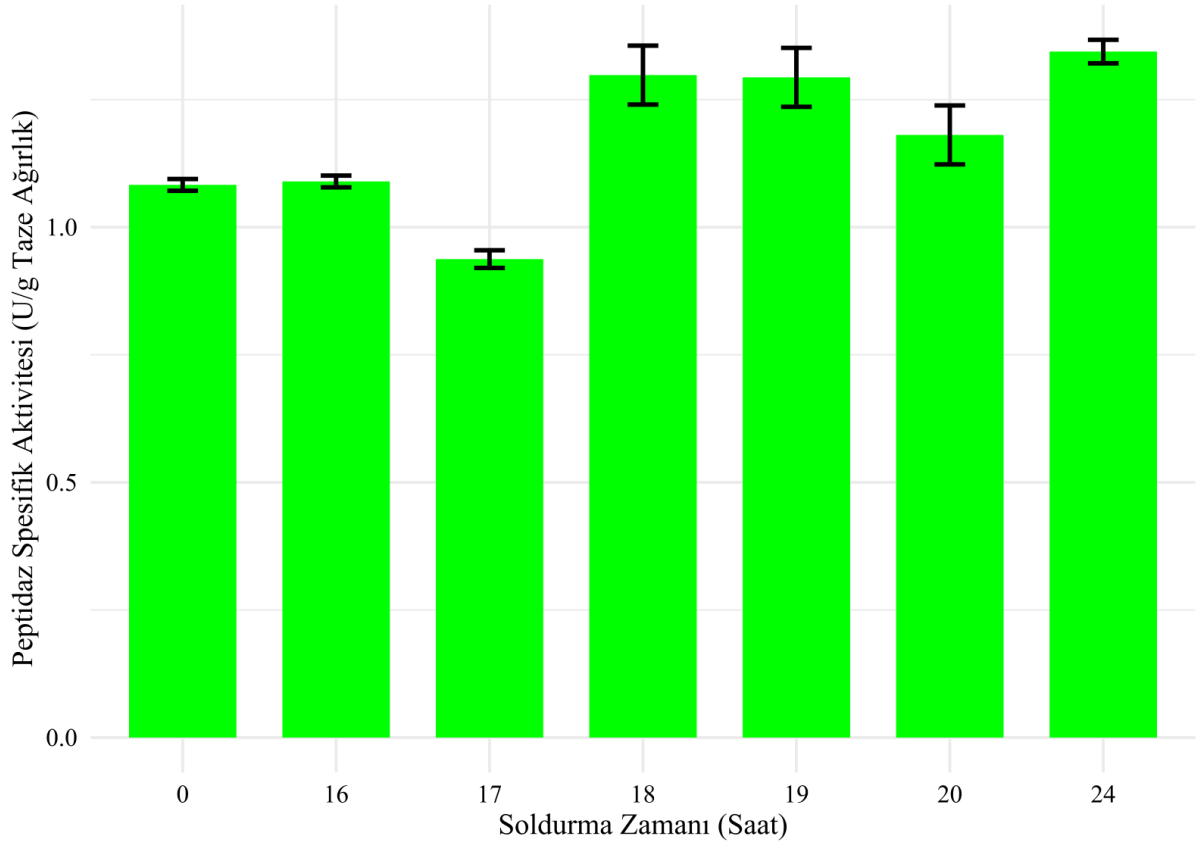
Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar Tukey HSD testine göre anlamlı derecede farklıdır ($P < 0,05$).



Şekil 1. Ali Rıza Erten klonu ADH spesifik aktivitesi

3.1.2. Farklı Soldurma Sürelerine Göre Peptidaz Aktivitesi

Peptidaz aktivitesi üzerine farklı soldurma sürelerinin etkisi Tablo 4’de verilmiştir. Soldurma sürelerine göre peptidaz aktiviteleri One-Way Anova testi ile değerlendirildiğinde istatistiksel olarak $P < 0,001$ seviyesinde önemli farklılıklar göstermiştir (Tablo 4). En yüksek peptidaz aktivitesi 24 saatlik soldurmada, en düşük aktivite ise 17 saatlik soldurmada gözlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Ali Rıza Erten klonu peptidaz spesifik aktivitesi

Tablo 4. Soldurma sürelerine göre peptidaz aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)

Soldurma Süreleri	Ortalama	Standart Hata	Minimum	Maksimum
0 saat	1,08bc	0,01	1,06	1,10
16 saat	1,09bc	0,01	1,07	1,11
17 saat	0,94c	0,02	0,91	0,97
18 saat	1,30a	0,06	1,20	1,40
19 saat	1,29a	0,06	1,19	1,39
20 saat	1,18ab	0,06	1,08	1,28
24 saat	1,34a	0,02	1,30	1,38
Genel	1,18	0,03	0,91	1,40

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar Tukey HSD testine göre anlamlı derecede farklıdır ($P < 0,05$).

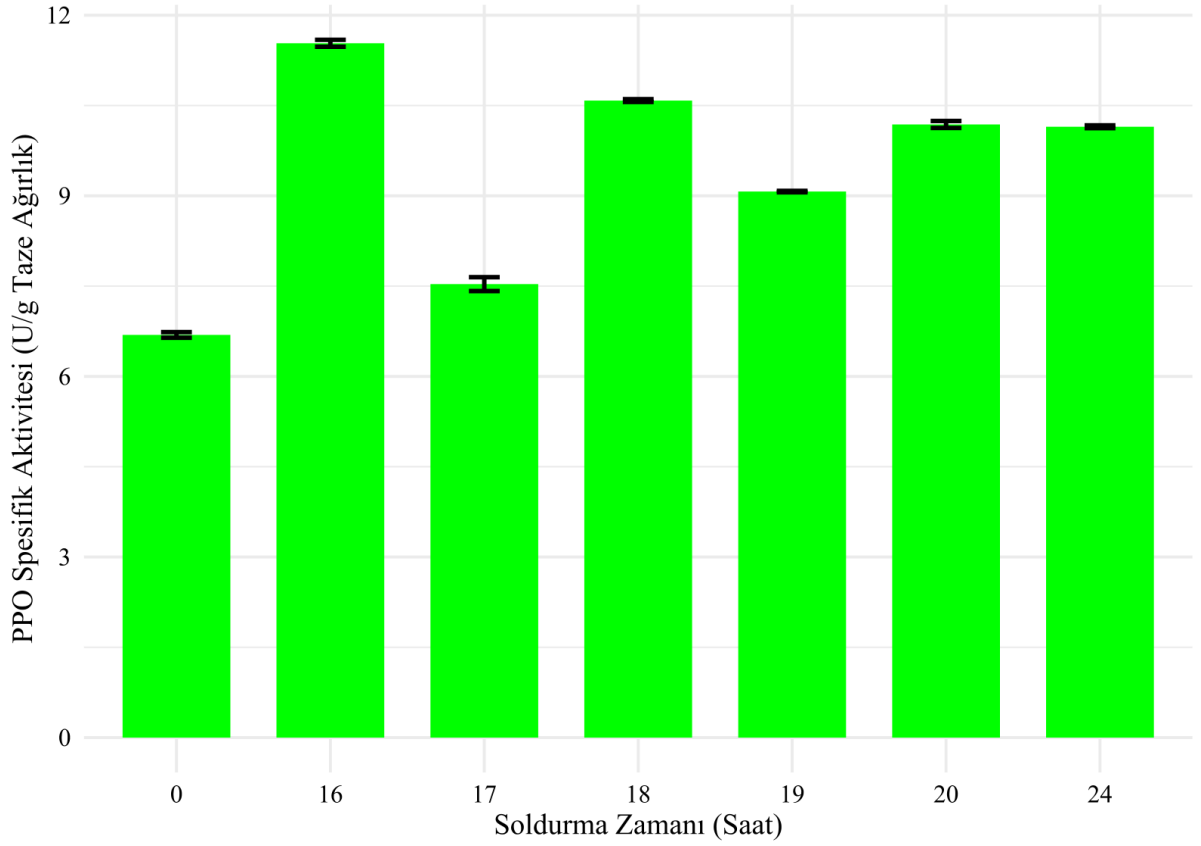
3.1.3. Farklı Soldurma Sürelerine Göre PPO Aktivitesi

PPO aktivitesi üzerine farklı soldurma sürelerinin etkisi Tablo 5’te verilmiştir. Soldurma sürelerine göre PPO aktiviteleri One-Way Anova testi ile değerlendirildiğinde istatistiksel olarak $P < 0,001$ seviyesinde önemli farklılıklar göstermiştir (Tablo 5). En yüksek PPO aktivitesi 16 saatlik soldurmada, en düşük aktivite ise 0 saatlik kontrol grubunda gözlenmiştir (Şekil 3).

Tablo 5. Soldurma sürelerine göre PPO aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)

Soldurma Süreleri	Ortalama	Standart Hata	Minimum	Maksimum
0 saat	6,69f	0,04	6,61	6,77
16 saat	11,53a	0,05	11,43	11,63
17 saat	7,53e	0,11	7,33	7,73
18 saat	10,58b	0,02	10,54	10,62
19 saat	9,07d	0,01	9,05	9,09
20 saat	10,19c	0,06	10,09	10,29
24 saat	10,14c	0,02	10,11	10,19
Genel	9,39	0,36	6,61	11,63

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar Tukey HSD testine göre anlamlı derecede farklıdır ($P < 0,05$).



Şekil 3. Ali Rıza Erten klonu PPO spesifik aktivitesi

3.2. Zihni Derin Klonunun Enzim Aktiviteleri

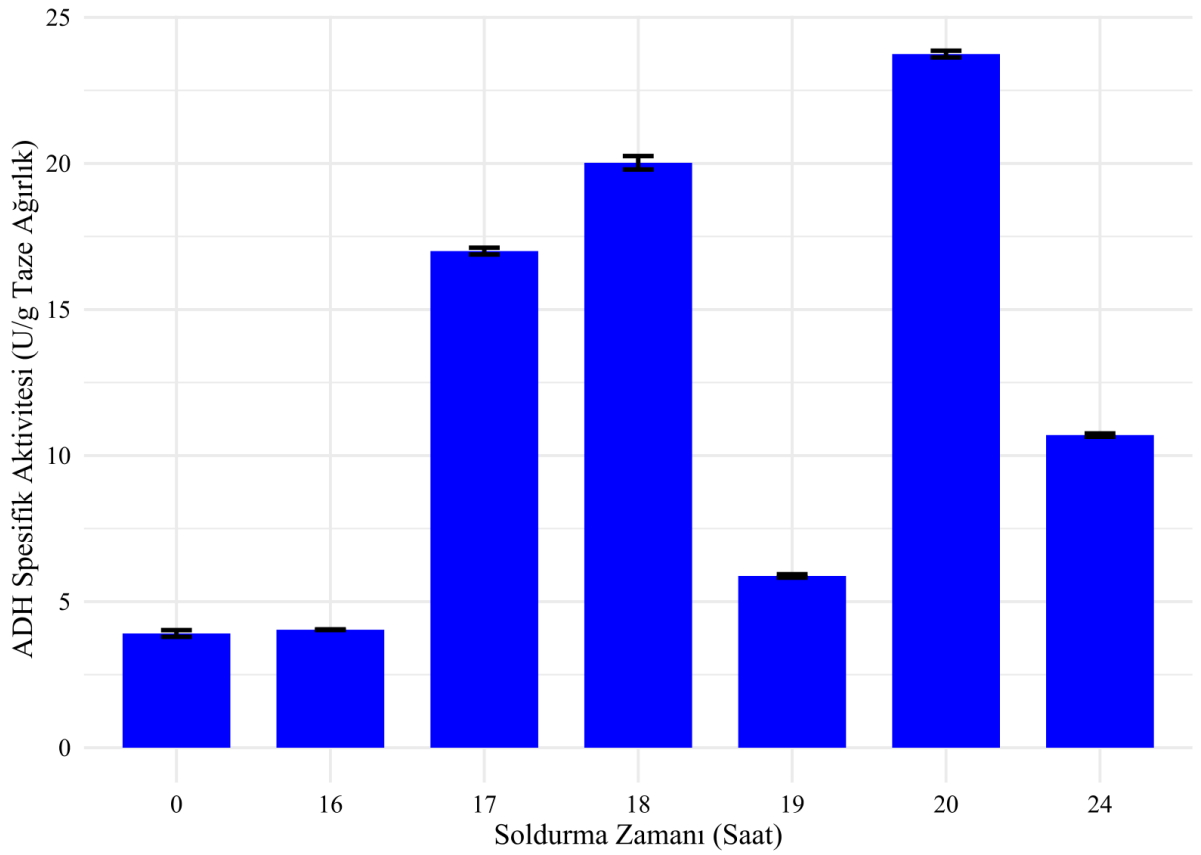
3.2.1. Farklı Soldurma Sürelerine Göre ADH Aktivitesi

ADH aktivitesi üzerine farklı soldurma sürelerinin etkisi Tablo 6’da verilmiştir. Soldurma sürelerine göre ADH aktiviteleri One-Way Anova testi ile değerlendirildiğinde istatistiksel olarak $P < 0,001$ seviyesinde önemli farklılıklar göstermiştir (Tablo 6). En yüksek ADH aktivitesi 20 saatlik soldurmada, en düşük aktivite ise 0 saatlik kontrol grubunda gözlenmiştir (Şekil 4).

Tablo 6. Soldurma sürelerine göre ADH aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)

Soldurma Süreleri	Ortalama	Standart Hata	Minimum	Maksimum
0 saat	3,91f	0,11	3,71	4,11
16 saat	4,03f	0,01	4,02	4,06
17 saat	16,99c	0,11	16,80	17,20
18 saat	20,02b	0,23	19,62	20,42
19 saat	5,87e	0,06	5,78	5,98
20 saat	23,74a	0,11	23,54	23,94
24 saat	10,70d	0,06	10,60	10,80
Genel	12,18	1,68	3,71	23,94

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar Tukey HSD testine göre anlamlı derecede farklıdır ($P < 0,05$).



Şekil 4. Zihni Derin klonu ADH spesifik aktivitesi

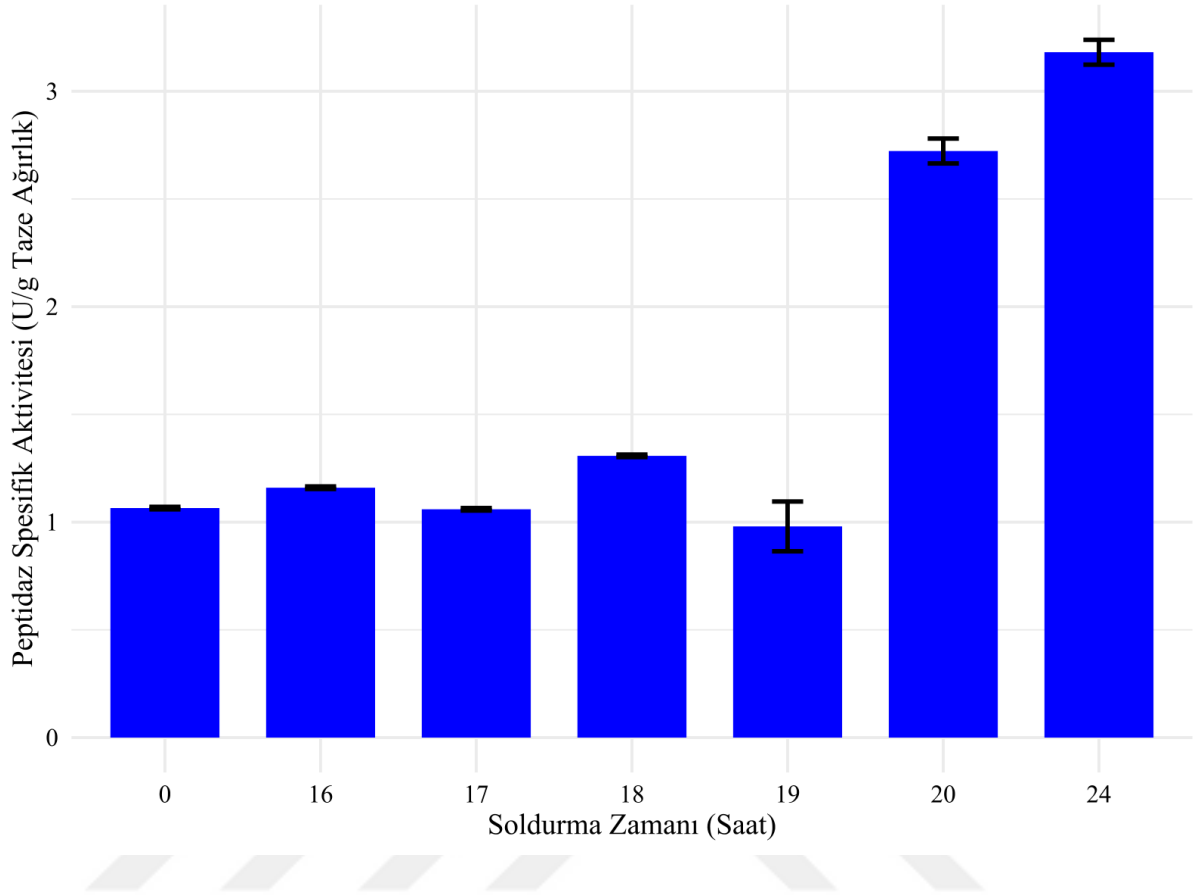
3.2.2. Farklı Soldurma Sürelerine Göre Peptidaz Aktivitesi

Peptidaz aktivitesi üzerine farklı soldurma sürelerinin etkisi Tablo 7’de verilmiştir. Soldurma sürelerine göre peptidaz aktiviteleri One-Way Anova testi ile değerlendirildiğinde istatistiksel olarak $P < 0,001$ seviyesinde önemli farklılıklar göstermiştir (Tablo 7). En yüksek peptidaz aktivitesi 24 saatlik soldurmada, en düşük aktivite ise 19 saatlik soldurmada gözlenmiştir (Şekil 5).

Tablo 7. Soldurma sürelerine göre peptidaz aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)

Soldurma Süreleri	Ortalama	Standart Hata	Minimum	Maksimum
0 saat	1,06cd	0,005	1,06	1,08
16 saat	1,16cd	0,005	1,15	1,17
17 saat	1,06cd	0,005	1,05	1,07
18 saat	1,30c	0,005	1,30	1,32
19 saat	0,98d	0,11	0,78	1,18
20 saat	2,72b	0,05	2,62	2,82
24 saat	3,18a	0,05	3,08	3,28
Genel	1,64	0,19	0,78	3,28

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar Tukey HSD testine göre anlamlı derecede farklıdır ($P < 0,05$).



Şekil 5. Zihni Derin klonu peptidaz spesifik aktivitesi

3.2.3. Farklı Soldurma Sürelerine Göre PPO Aktivitesi

PPO aktivitesi üzerine farklı soldurma sürelerinin etkisi Tablo 8’de verilmiştir. Soldurma sürelerine göre PPO aktiviteleri One-Way Anova testi ile değerlendirildiğinde istatistiksel olarak $P < 0,001$ seviyesinde önemli farklılıklar göstermiştir (Tablo 8). En yüksek PPO aktivitesi 18 saatlik soldurmada, en düşük aktivite ise 0 saatlik kontrol grubunda gözlenmiştir (Şekil 6).

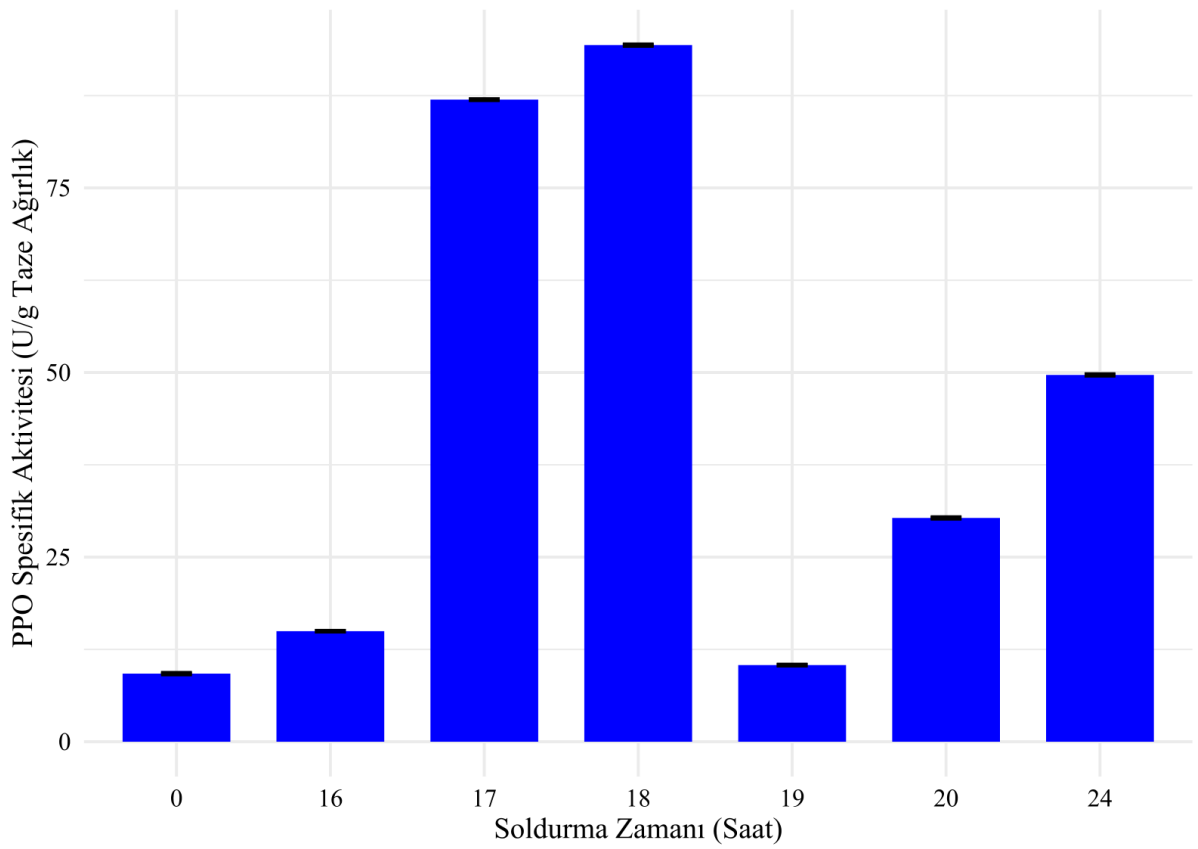
Tablo 8. Soldurma sürelerine göre PPO aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)

Soldurma Süreleri	Ortalama	Standart Hata	Minimum	Maksimum
0 saat	9,22g	0,05	9,12	9,32
16 saat	14,96e	0,005	14,96	14,98
17 saat	86,95b	0,005	86,95	86,97
18 saat	94,33a	0,05	94,24	94,44

Tablo 8 (Devam). Soldurma sürelerine göre PPO aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)

19 saat	10,37f	0,005	10,37	10,39
20 saat	30,30d	0,05	30,20	30,40
24 saat	49,67c	0,05	49,57	49,77
Genel	42,26	7,44	9,12	94,44

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar Tukey HSD testine göre anlamlı derecede farklıdır ($P < 0,05$).



Şekil 6. Zihni Derin klonu PPO spesifik aktivitesi

3.3. Klonlara Göre Enzim Aktiviteleri

Her iki klonun ADH, peptidaz ve PPO aktiviteleri üzerine soldurma sürelerinin etkisi Tablo 9-11’de verilmiştir. Soldurma sürelerine göre enzim aktiviteleri One-Way Anova testi ile değerlendirildiğinde istatistiksel olarak ADH ve peptidaz aktiviteleri $P < 0,001$, PPO aktivitesi ise $P=0,019$ seviyesinde önemli farklılıklar göstermiştir (Tablo

9-11). En yüksek ADH ve PPO aktiviteleri 18 saatlik soldurmada, en yüksek peptidaz aktivitesi ise 24 saatlik soldurmada gözlenmiştir. En düşük ADH, peptidaz ve PPO aktiviteleri sırasıyla 16 saat, 17 saat ve 0 saatte tespit edilmiştir (Şekil 7-9).

Tablo 9. Soldurma sürelerine göre klonların ADH aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)

Soldurma Süreleri	Ortalama	Standart Hata	Minimum	Maksimum
0 saat	4,62b	0,33	3,71	5,65
16 saat	2,61b	0,63	1,09	4,06
17 saat	10,18b	3,04	3,17	17,20
18 saat	21,63a	0,73	19,62	23,46
19 saat	8,11b	1,00	5,78	10,46
20 saat	12,03ab	5,24	0,27	23,94
24 saat	11,32ab	0,28	10,60	12,06
Genel	10,07	1,21	0,27	23,94

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar Tukey HSD testine göre anlamlı derecede farklıdır ($P < 0,05$).

Tablo 10. Soldurma sürelerine göre klonların peptidaz aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)

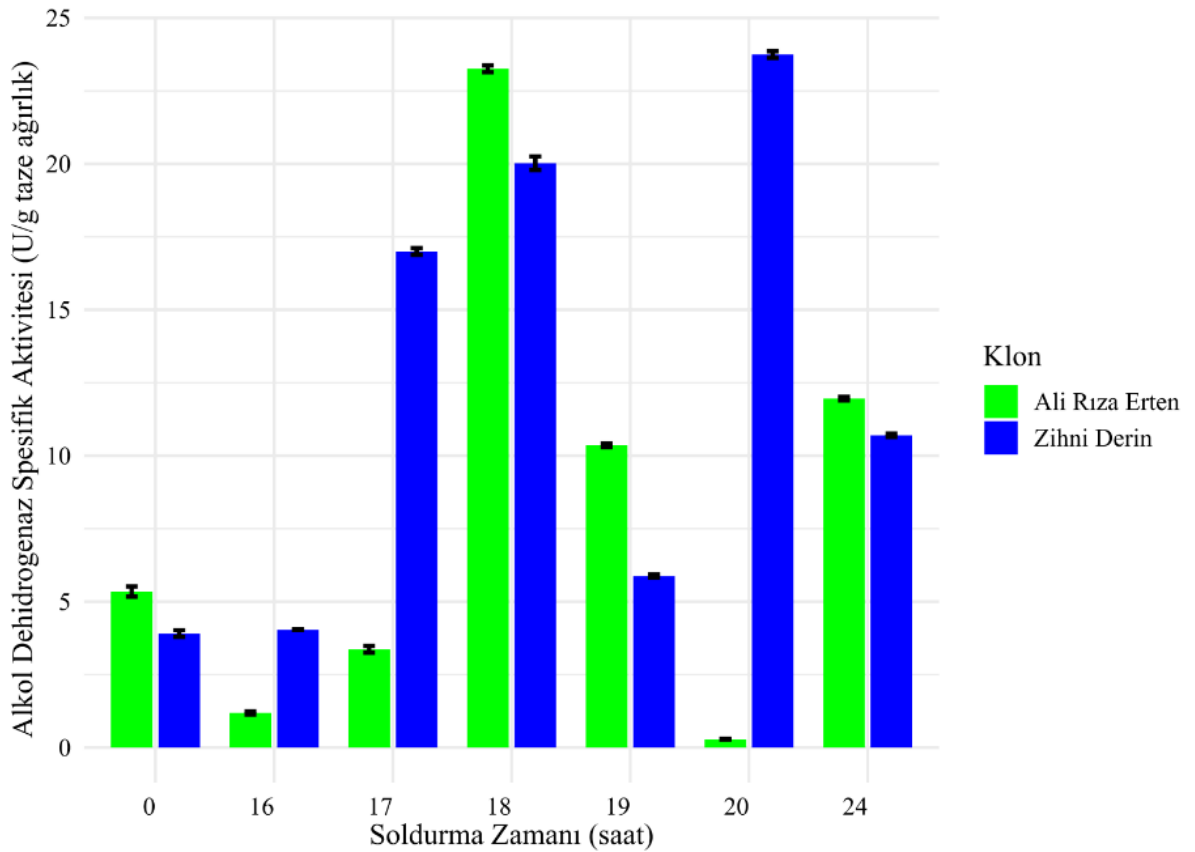
Soldurma Süreleri	Ortalama	Standart Hata	Minimum	Maksimum
0 saat	1,07bc	0,007	1,06	1,10
16 saat	1,12bc	0,01	1,07	1,17
17 saat	0,99c	0,02	0,91	1,07
18 saat	1,30bc	0,02	1,20	1,40
19 saat	1,13bc	0,09	0,78	1,39
20 saat	1,95ab	0,34	1,08	2,82
24 saat	2,26a	0,41	1,30	3,28
Genel	1,40	0,10	0,78	3,28

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar Tukey HSD testine göre anlamlı derecede farklıdır ($P < 0,05$).

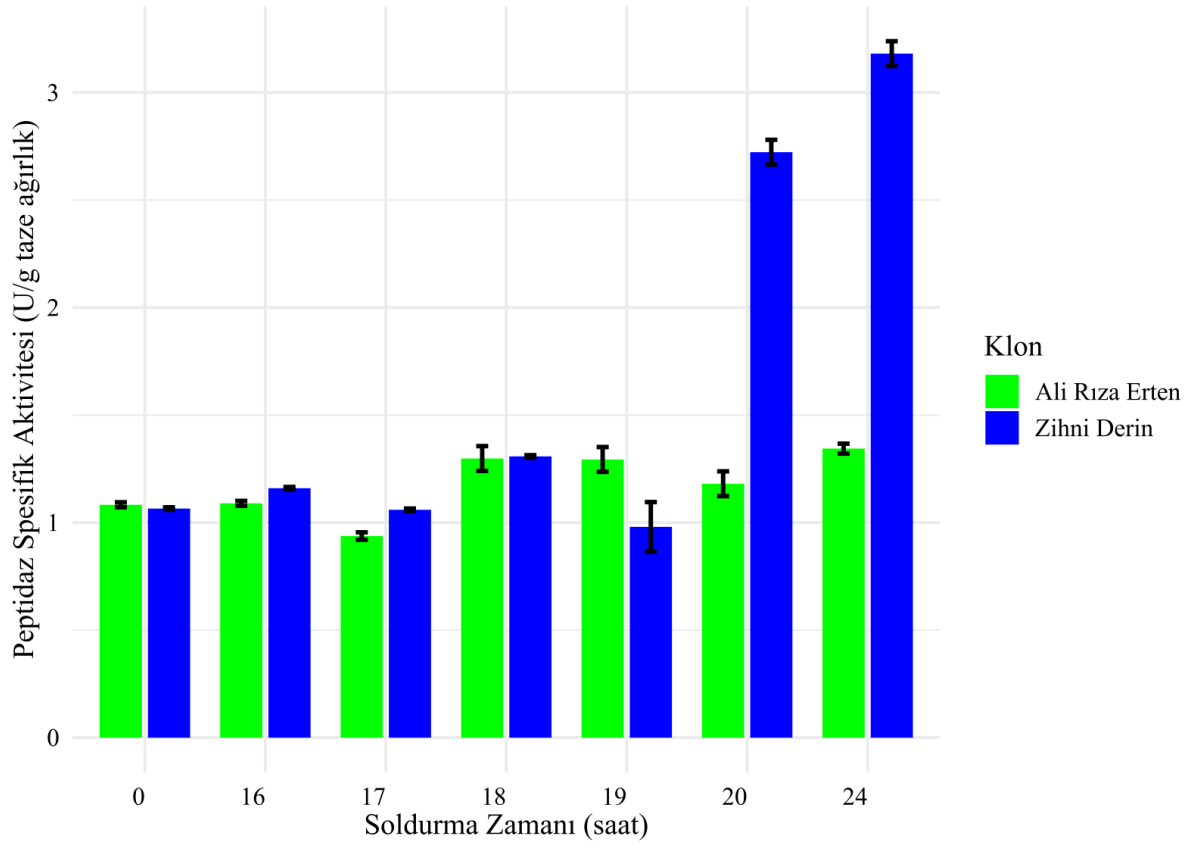
Tablo 11. Soldurma sürelerine göre klonların PPO aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)

Soldurma Süreleri	Ortalama	Standart Hata	Minimum	Maksimum
0 saat	7,95a	0,56	6,61	9,32
16 saat	13,25a	0,77	11,43	14,98
17 saat	47,24a	17,76	7,33	86,97
18 saat	52,46a	18,73	10,54	94,44
19 saat	9,72a	0,30	9,05	10,39
20 saat	20,24a	4,50	10,09	30,40
24 saat	29,91a	8,84	10,11	49,77
Genel	25,82	4,49	6,61	94,44

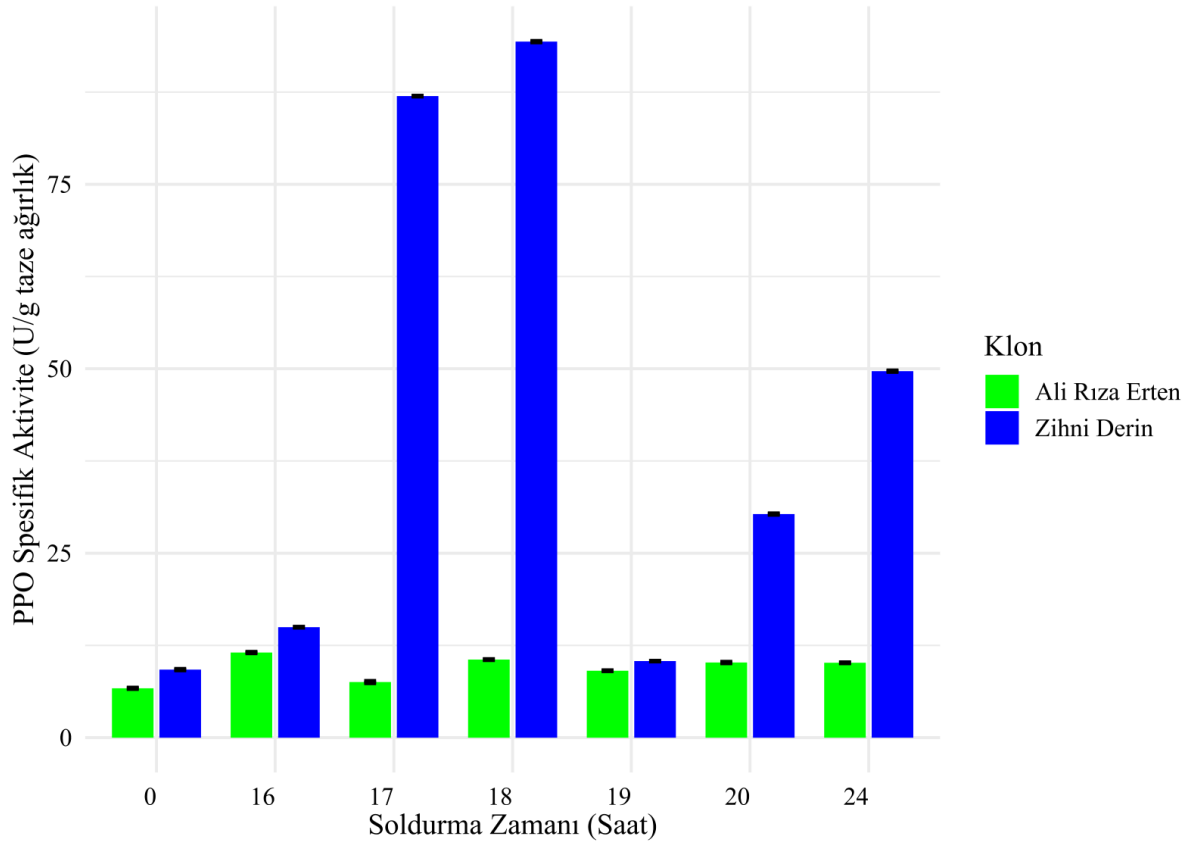
Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar Tukey HSD testine göre anlamlı derecede farklıdır ($P < 0,05$).



Şekil 7. Soldurma sürelerine göre klonların ADH aktivite değerleri



Şekil 8. Soldurma sürelerine göre klonların peptidaz aktivite değerleri



Şekil 9. Soldurma sürelerine göre klonların PPO aktivite değerleri

Klonlara göre enzim aktiviteleri Tablo 12-14’de verilmiştir. Klonların enzim aktiviteleri bağımsız örneklem t testi ile değerlendirildiğinde istatistiksel olarak ADH aktivitesi $P=0,082$ seviyesinde ($t(40)=-1,783$) önemsiz, peptidaz aktivitesi $P=0,021$ seviyesinde ($t(40)=-2,413$) ve PPO aktivitesi $P<0,001$ seviyesinde ($t(40)=-4,410$) önemli farklılıklar göstermiştir. Zihni Derin klonunun enzim aktiviteleri Ali Rıza Erten klonunun enzim aktivitelerinden daha yüksektir (Şekil 10).

Tablo 12. Klonlara göre enzim aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)

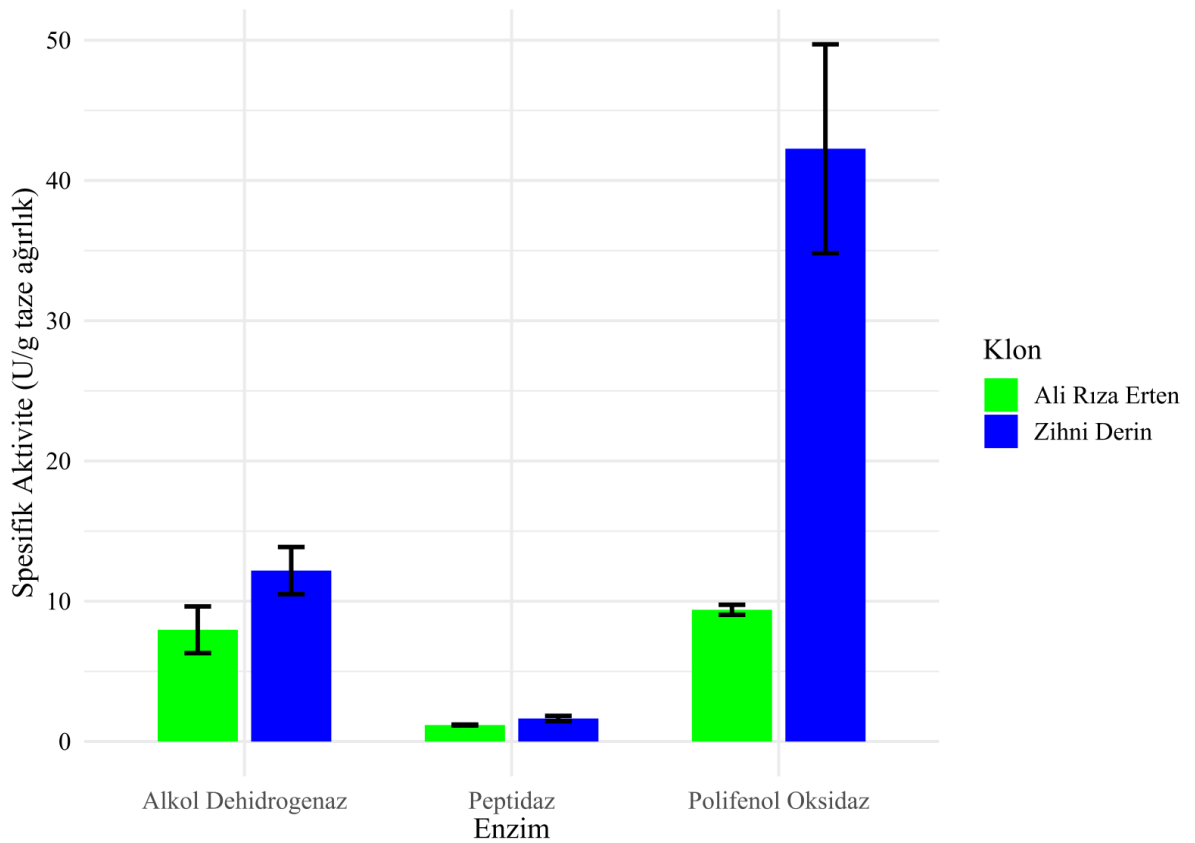
ADH				
Klonlar	Ortalama	Standart Hata	Minimum	Maksimum
Ali Rıza Erten	7,97	1,66	0,27	23,46
Zihni Derin	12,18	1,68	3,71	23,94

Tablo 13. Klonlara göre enzim aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)

Peptidaz				
Klonlar	Ortalama	Standart Hata	Minimum	Maksimum
Ali Rıza Erten	1,17	0,03	0,91	1,40
Zihni Derin	1,64	0,19	0,78	3,28

Tablo 14. Klonlara göre enzim aktivite değerleri (U/g taze ağırlık)

PPO				
Klonlar	Ortalama	Standart Hata	Minimum	Maksimum
Ali Rıza Erten	9,40	0,36	6,61	11,63
Zihni Derin	42,26	7,45	9,12	94,44

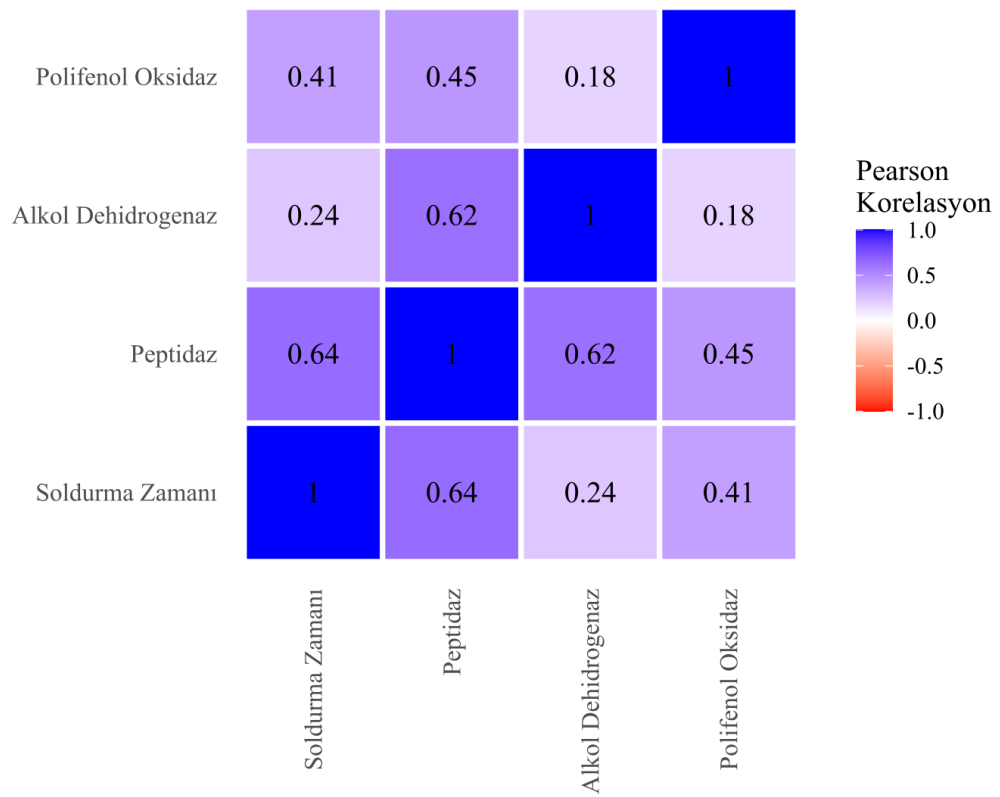


Şekil 10. Klonların ortalama enzim aktivitesi değerleri

3.4. Korelasyon Analiz Sonuçları

3.4.1. Ali Rıza Erten Klonunun Korelasyon Sonuçları

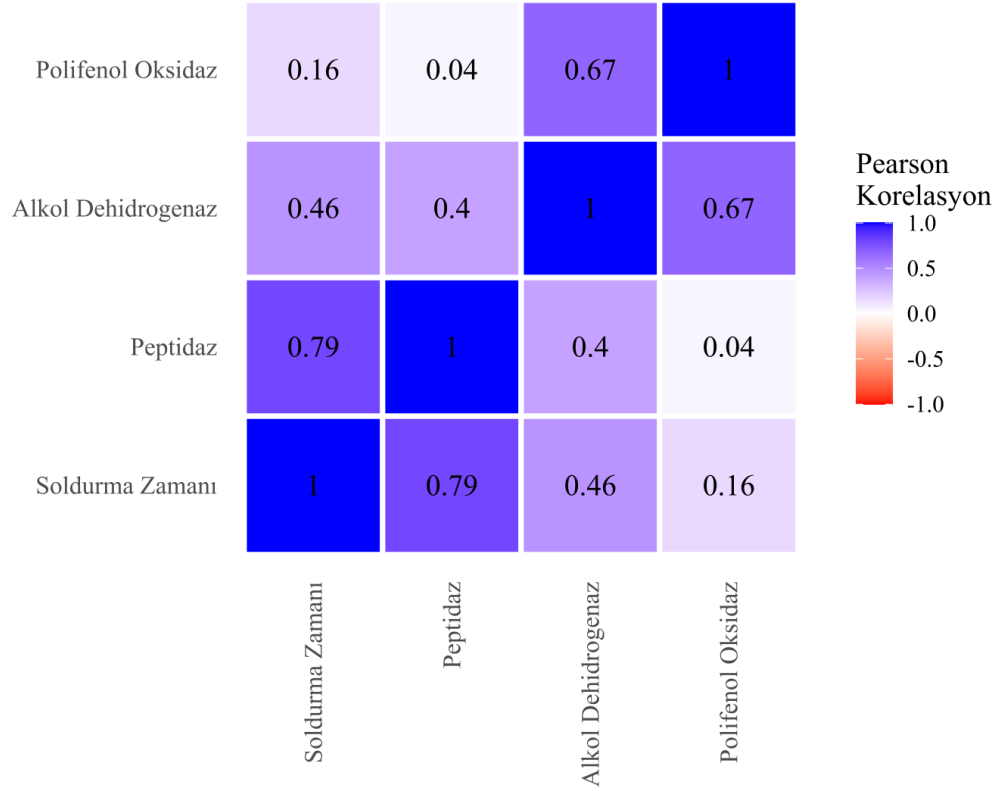
Pearson korelasyon analizine göre ADH aktivitesi ile soldurma süreleri arasında pozitif yönde zayıf ve anlamsız ($r=0,240$; $P=0,295$), PPO aktivitesi arasında pozitif yönde orta ve anlamsız ($r=0,409$; $P=0,066$), peptidaz aktivitesi arasında ise yüksek seviyede pozitif yönde anlamlı ($r=0,640$; $P=0,002$) ilişkinin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 11).



Şekil 11. Ali Rıza Erten klonunun korelasyon sonuçları

3.4.2. Zihni Derin Klonunun Korelasyon Sonuçları

Pearson korelasyon analizine göre PPO aktivitesi arasında pozitif yönde zayıf ve anlamsız ($r=0,162$; $P=0,483$), ADH aktivitesi arasında pozitif yönde orta ve anlamlı ($r=0,463$; $P=0,035$), peptidaz aktivitesi arasında ise yüksek seviyede pozitif yönde anlamlı ($r=0,791$; $P < 0,001$) ilişkinin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 12).

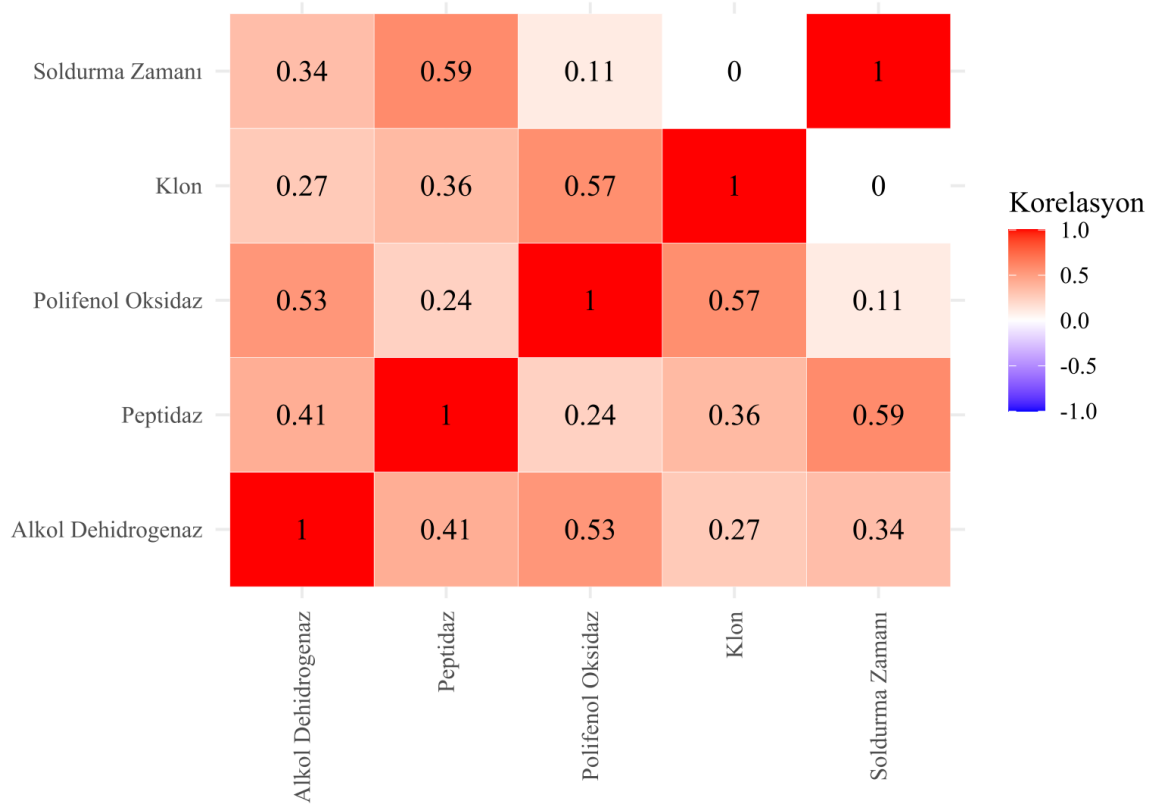


Şekil 12. Zihni Derin klonunun korelasyon sonuçları

3.4.3. Klonların Korelasyon Sonuçları

Pearson korelasyon analizine göre klonlar ile ADH aktivitesi arasında pozitif yönde zayıf ve anlamsız ($r=0,271$; $P=0,082$), peptidaz aktivitesi arasında pozitif yönde orta ve anlamlı ($r=0,356$; $P=0,021$), PPO aktivitesi arasında ise pozitif yönde yüksek seviyede ve anlamlı ($r=0,572$; $P < 0,001$) ilişkinin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 13).

Pearson korelasyon analizine göre klonların soldurma süreleri ile PPO aktivitesi arasında pozitif yönde zayıf ve anlamsız ($r=0,105$; $P=0,507$), ADH aktivitesi arasında pozitif yönde orta ve anlamlı ($r=0,338$; $P=0,028$), peptidaz aktivitesi arasında ise yüksek seviyede pozitif yönde anlamlı ($r=0,588$; $P < 0,001$) ilişkinin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 13).



Şekil 13. Klonların korelasyon sonuçları

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma, Atatürk Çay ve Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü'nün çay fidanlıklarında kontrollü bir şekilde yetiştirilen Ali Rıza Erten ve Zihni Derin klonlarının peptidaz, alkoldehidrogenaz ve polifenol oksidaz aktiviteleri üzerinde farklı soldurma sürelerinin (0, 16, 17, 18, 19, 20 ve 24 saat) etkisini ortaya çıkarmayı amaçlayan ilk çalışmadır. Çayın soldurulması işlemi çay yaprağının kimyasal ve biyokimyasal içeriğinde önemli bir adımdır. Soldurma işlemindeki önemli biyokimyasal olaylardan birisi de enzim aktivitelerinin değişimidir. Çay yaprağındaki enzimler çaya tat, koku ve renk gibi özellikler katmaktadır. Yapılan saha çalışmaları sonucunda Rize ilinde bulunan çay fabrikalarında çay soldurma işleminde optimum soldurma süresi hakkında genel bir uygulamanın yapılmadığı tespit edilmiştir. Literatürde bu konu hakkında herhangi bir veri yoktur. Aynı zamanda ilimizde faaliyet gösteren kuruluşların elinde de bu konu ile ilgili yapılmış ya da yapılmakta olan herhangi bir çalışma yoktur. Bu bilgiler doğrultusunda yapılan bu çalışma mevcut bir eksikliği gidermenin yanında, Türk çayının soldurma süresine açıklık getirerek çayın kalitesinin arttırılması yönünden de önem taşımaktadır. Çalışılan klonların ikisi için ortak bir soldurma süresinin olup olmadığı, uygun soldurma süresinin hangi süre olduğu ve her bir klon için enzimlerin en aktif olduğu soldurma süresinin ortaya konulduğu bu çalışmanın sonuçları literatür ışığında değerlendirilerek tartışılmıştır.

Soldurma, çay işlemede ilk adımdır ve nihai ürün kalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Yeşil çay yaprağının soldurulması ve bir sonraki işleme aşamasına (kıvırma) hazırlanması sırasında, yaprağın nem içeriğindeki azalmaya ürün kalitesinde özellikle aromasında önemli rol oynayan biyokimyasal etkileşimlerin ortaya çıkması eşlik eder. Soldurmanın süresi, sıcaklığı ve bağıl nemi nihai ürünün kalitesi üzerinde önemli etkilere sahiptir (Obanda vd., 2004). Soldurma, siyah çayın kalitesini artırmak ve kendine özgü aromasını oluşturmak için gerekli bir işlemdir. Çay yapraklarının nem içeriği, soldurma derecesinin önemli bir göstergesidir (Huang vd., 2023). Siyah çay üretimi sırasındaki soldurma işlemi, kısmi nemin uzaklaştırılmasına neden olur. Bu aşamada, çay yapraklarının sonraki üretim aşamaları için uygun olan iyi bir fizyolojik durumda olmasını sağlamak için soldurma derecesi ve süresi iyi kontrol edilmelidir. Soldurma aşamasında yaprak hücrelerinden bir miktar su uzaklaştıkça, hücreler

esnekliğini kazanır ve siyah çayın kalitesinin oluşumunda rol oynayan enzimler, yaprak yüzeyinde homojen bir şekilde dağılım gösterir (Dülger vd., 2018).

Siyah çay üretiminde enzimler, ürünün kalite özelliklerinin oluşumunda kritik bir rol üstlenir. Üretim sürecinde çeşitli enzimlerin aktiviteleri ortaya çıkar. Örneğin, primer polifenollerin oksitlenmesi ile tat ve renk oluşumuna katkıda bulunan polifenoloksidaz, bazı alkollerin sentezlenmesi ve aroma gelişiminden sorumlu alkoldehidrogenaz ve proteinlerin aminoasitlere dönüşümünü sağlayan peptidaz bu sürecin başlıca enzimlerindendir (Altan, 2001).

Çay bitkisinin genç yaprak ve sürgünlerinde bulunan enzimler (polifenol oksidaz, peroksidaz, pektinaz, alkoldehidrogenaz, transaminaz, peptidaz) çaya işleme aşamasında, ileri derecede biyokimyasal dönüşümler oluşturarak, çayın karakteristik tat ve koku kazanmasına neden olurlar. Bir başka deyişle değişik tip ve nitelikteki siyah çayın üretilmesi genç çay yaprakları ile tomurcuğunda bulunan enzimler sayesinde olur (Kacar, 2010).

Yeşil yaprağın hazırlanması veya soldurulması, çay işlemede en önemli adımdır, çünkü soldurma hızının ve soldurma için geçen sürenin, biyokütlenin kurutulmasındaki enzim aktivitelerini etkilediği bilinmekte ve bunun da üretilmiş siyah çayda istenen kalite parametrelerinden doğrudan sorumlu olduğu ifade edilmektedir (Latha ve Ramarethinam, 2000). Benzer şekilde yapılan bu çalışmada, her iki çay klonlarına uygulanan farklı soldurma sürelerinin peptidaz, alkoldehidrogenaz ve polifenol oksidaz aktivitelerini etkilediği ve her soldurma süresinde farklı aktivitenin olduğu tespit edildi (Şekil 7-9).

Çay bitkisinde peptidaz aktivitesi özellikle sürgün uçlarında belirlenmiştir ve bitki çeşitlerine göre bu aktivite farklılık göstermektedir. Soldurma aşamasında bu enzim, proteinlerin aminoasitlere parçalanmasında rol oynar (Sanderson ve Roberts, 1964). Serbest aminoasit içerikleri, çayın kalite güvencesi açısından kritik bir kriter olarak kabul edilmekte ve tat ile renk üzerinde olumlu etkiler sağlamaktadır (Yao vd., 2006). Soldurma sürecinde, yapraklardaki protein miktarının azalması ve serbest aminoasit oranının artması, çayın aroma bileşenleri bakımından zenginleşmesine katkı sağlar (Roberts ve Sanderson, 1966). Ayrıca, soldurma işlemi şikimat yolağı üzerinde etkili olarak polifenollerin ve polifenolik metabolitlerin öncüsü olan aromatik

aminoasitler ve sinnamik asitlerin sentezini destekler; bu bileşikler çayın nihai kalitesini belirlemede önemli bir rol oynar (Latha ve Ramarethinam, 2000).

Serbest amino asitler, kuru ağırlığın %1-4'ünü oluşturan önemli lezzet bileşenleridir ve çay demlemelerinin umami ve tatlılığına katkıda bulunan ana tat bileşikleridir (Yu ve Yang, 2020). Nükleotidler ve türevleri ile amino asitler ve türevleri esas olarak taze ve canlı tat özellikleri sunar (Ye vd., 2024). Proteinlerin siyah çay üretim süreci sırasında peptidaz tarafından amino asitlere parçalandığı bildirilmektedir (Kumar vd., 2012; Chen vd., 2020b). Soldurma sırasında çay yapraklarındaki serbest amino asitlerdeki aşamalı artışın, endojen peptidazın hidrolitik aktivitesinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Sanderson ve Roberts, 1964). Soldurma sürecinde protein hidrolizinin amino asit içeriğinde bir artışa yol açtığına genel olarak inanılmaktadır (Yin vd., 2009; Chen vd., 2020a).

Kottur vd. (2011) yapmış oldukları çalışmalarında peptidaz aktivitesinin aktif olarak büyüyen çay dokularında (tomurcuk) daha yüksek olduğunu ve sürgün olgunluğu ile azaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca, üretim süreci boyunca, enzim aktivitesinin geniş ölçüde değiştiği ve solmuş yapraklarda maksimum peptidaz aktivitesi gözlemlendiğini ifade etmişlerdir. Peptidaz aktivitesi, çay yaprağındaki amino asitlerin seviyesini belirlediği için çok önemlidir. Bu amino asitler, aroma bileşenlerinin oluşumunda önemli bir rol oynar. Çay yaprağı proteininin soldurma, kıvırma ve fermentasyon süreçleri sırasında serbest amino asitlere parçalandığı bildirilmiştir (Chen vd., 2020a). Önceki çalışmalar, toplam amino asitlerdeki artışın solmuş yapraklardaki protein proteolizine bağlama eğilimindedir (Ye vd., 2018; Ye vd., 2020; Li vd., 2021).

Soldurma işlemi sırasında, protein amino asitlerindeki artışların, proteinlerin peptidaz tarafından parçalanmasından kaynaklandığı öne sürülmüştür (Yao vd., 2006). Jabeen vd. (2019) taze çay yapraklarına kıyasla solmuş çay örneklerinde artan amino asit miktarının, proteinlerin peptidaz tarafından amino asitlere parçalanmasından kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir. Aynı zamanda çayın soldurulması için en uygun süreyi 23 saat olarak belirtmişlerdir. Protein parçalanmasının yanı sıra, soldurma sırasında şeker de amino aside dönüştürülür (DevChoudhary ve Bajaj, 1980). Belitz vd. (2009) soldurma sırasında nem içeriğindeki azalmanın, belirli hidrolitik enzimlerin aktivitesini azaltabileceğini ve bunun da su özütünün değerlerini

artırabileceğini bildirmiştir. Bu nedenle sadece soldurma süreleri değil aynı zamanda nem içeriklerinin de enzim aktiviteleri üzerinde önemli etkisinin olacağı açıktır. Soldurma ürünün dengeli tat ve aromasının oluşumu için gerekli bir hazırlık sürecidir. Hem çay yapraklarında hem de diğer birçok bitkide, yaprak dokularındaki su eksikliğinin birden fazla bitki enziminin aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. Soldurma sırasındaki su kaybı, sentetik aktivitede bir azalmaya ve peptidazın hidrolitik aktivitesinde bir artışa neden olur; bu da hidroliz ve çay ekstraksiyonunda artışa yol açar. Soldurma, fermentasyon sırasında homojen oksidasyon için çok önemlidir. Soldurma olmadan yüksek kaliteli siyah çay elde etme girişimlerinin tümü başarısızlıkla sonuçlanmıştır (Belitz vd., 2001; Omiadze vd., 2014). Roberts ve Sanders (1966) çay üretiminin soldurma aşamasında toplam serbest amino asitlerde bir artış olduğunu doğrulamıştır. Artış oranı, dokuların öldüğü noktaya kadar sıcaklıkla pozitif ilişkili olabilir; bu noktadan sonra daha fazla değişiklik olmaz (Tomlins ve Mashingaidze, 1997). Serbest amino asitler, çayın taze ve ferahlatıcı tadına katkıda bulunan ana faktörlerdir. Yapılan bir çalışmada, soldurma sürecinde serbest amino asitlerdeki değişimin daha belirgin olduğu rapor edilmiştir. Toplam serbest amino asitlerde önce bir azalma, sonra artma, sonra tekrar azalma ve tekrar artma şeklinde bir eğilimin olduğu, 2 ve 8 saatlik çay örneklerindeki toplam amino asit miktarının, 0 saatlik örneklere göre önemli ölçüde daha düşük olduğu, en yüksek değer 6 saatlik çay örneklerinde, en düşük değerin ise 8 saatlik çay örneklerinde olduğu bulunmuştur (Qiao vd., 2023). Ntezimana vd. (2021) 4, 6, 8, 10 ve 12 saatlik doğal soldurmaya maruz bıraktığı çay bitki örneklerinde (2,5 yaprak) amino asitlerin soldurma süresinin artmasıyla önemli ölçüde arttığını ve 10 saatlik soldurma süresinde belirgin bir tepe değeri elde ettiğini bildirmişlerdir. Huang vd. (2023) çayda farklı soldurma yöntemlerini ele aldıkları çalışmalarında serbest amino asit yoğunluğun normal soldurma ve güneşte soldurma sırasında arttığını, soldurmanın amino asit konsantrasyonunda büyük bir artışa neden olduğunu ve her soldurma yönteminin stresi umami amino asitlerini (Teanin, Glutamat ve Glutamin) güçlü bir şekilde etkilediğini ifade etmişlerdir. Bazı çalışmalar, yapraklarda amino asit sentezinin solmanın erken evrelerinde devam eden bir süreç olduğunu ve aynı zamanda bazı amino asitlerin birikmesine yol açtığını ileri sürmektedir (Li vd., 2020; Wang vd., 2019; Yu vd., 2020b). Önceki bir çalışma, taze yapraklardaki toplam amino asit miktarının

soldurmadan 12 saat sonrasına kadar tutarlı bir şekilde artmaya başlamadığını göstermiştir (Wang vd., 2019). Başka bir çalışmada, yayılmış yaprakların su içeriği %78,12'den %69,71'e düştüğünde toplam amino asit miktarının sürekli olarak arttığı, ancak önce azaldığı ve ardından %69,71'den %61,63'e yükseldiği bulunmuştur (Yin vd., 2009). Ayrıca, Li vd. (2020)'nin sonuçları, soldurma işlemi sırasında toplam amino asit eğiliminin çeşitler arasında da değiştiğini göstermiştir. Bunlar, birleşik etkinin soldurma sürecinde amino asit içeriğinin çeşitliliğine yol açtığını göstermektedir. Yaprak ve saplarla işlenen çaylardaki amino asitler gibi aroma bileşenlerinin içeriğinin, yalnızca yapraklarla üretilenlere göre daha yüksek olduğu ve bunun çayın tadını etkileyebileceği bulunmuştur (Zeng vd., 2017). Qiao vd. (2023) soldurma işlemi sırasında toplam serbest amino asit miktarının düzenli olarak artmadığını tespit ettiklerini ifade etmişlerdir. Literatürle uyumlu olarak yapılan bu çalışmada, peptidaz aktivitesi soldurma süreleri boyunca her iki klonda düzenli olarak artmamış olup en yüksek aktivite her iki klonda 24 saatlik soldurma süresinde tespit edilmiştir (Şekil 2 ve Şekil 5). Soldurma işleminin enzimatik aktiviteleri artırdığı bilinmektedir (Deb ve Pou, 2016).

PPO siyah çay üretiminde hayati bir rol oynar. PPO, siyah çay üretimi sırasında çay fermantasyonunda oynadığı kilit rol nedeniyle çay bitkisinde en çok ilgi gören enzimdir (Ravichandran ve Parthiban, 1998). Çay bitkisinin tüm kısımlarında bulunur (Buzun vd., 1984) ve çay kalitesi, içeriğiyle pozitif ilişkilidir (Biswas vd., 1971). PPO aktivitesi, olgun yapraklara göre körpe (genç) yapraklarda daha yüksektir (Takeo ve Baker, 1973; Thanaraj ve Seshadri, 1990). Hammadde işleme, doku bozulması ve hücre bütünlüğünün bozulmasıyla birlikte gerçekleşir ve enzim fenol substratlarını etkilemeye başlar. Fenol oksidaz aktivitesi, ürünün karakteristik tadının, kokusunun ve renginin oluşumuyla sonuçlanır. Siyah çayın kalitesi ve üretim türü de fenol oksidazın verimliliğine ve çeşitli bileşiklerin oksidasyon derecesine bağlıdır (Omiadze vd., 2014).

Soldurma PPO aktivite seviyesinde değişikliklere neden olan bir süreçtir. Nem kaybı nedeniyle, taze yaprakların solması veya depolanması sırasında PPO aktivitesi azalır. Çok sert solma veya yüksek nem azalması, PPO aktivitesinde %50-55'e varan bir azalmaya neden olabilir (Ullah ve Roy, 1982). Ntezimana vd. (2021) soldurma sırasında, PPO ve peroksidaz (POD) aktivitesinin soldurma süresi arttıkça önemli

ölçüde ($P < 0,05$) arttığını ifade etmişlerdir. Ölmez ve Yılmaz (2010) depolama sırasında PPO aktivitesinde küçük bir azalma gözlemlemiştir. Ullah ve Roy (1982), PPO aktivite kaybını soldurma sırasındaki nem kaybına bağlamıştır. Çay sürgünlerinin solmasıyla sürgünlerin PPO aktivitesinin azaldığı ve solmuş sürgünlerin rehidrasyonu ile aktivite kaybının geri kazanıldığını gösterilmiştir. PPO aktivitesindeki düşüşün solma derecesine bağlı olduğu bulunmuştur (Ullah ve Roy, 1982). Nem içeriğinde büyük bir azalmayla birlikte çok sert soldurma, PPO aktivitesini kısıtlar. Solma sırasındaki PPO aktivite kaybı, solmuş sürgünlerin yeniden sulanmasıyla geri kazanılabileceğinden, PPO aktivitesinin sürgünlerin nem içeriğiyle ilişkili olabileceği düşünülmüştür (Ullah vd., 1984). Solma sırasında, yeşil yapraklardaki nem içeriğindeki aşırı kayıp (örneğin uzun süre veya yüksek sıcaklık), yaprakların PPO aktivitesinde azalmaya neden olur (Turkmen vd., 2009). Örneğin, yapraktaki nem %72,5'ten %64,8'e düştükçe, son siyah çaydaki teaflavin seviyeleri %16 oranında azalır (Tomlins ve Mashigaidze, 1997). Obanda vd. (2004), solma süresi arttıkça TF seviyelerinin azaldığını ve solma süresi uzadıkça siyah çay sıvılarının parlaklığının azaldığını bildirmiştir. Ayrıca, Sud ve Baru (2000), TF ve parlaklık için en düşük değerlerin yağmurlu mevsim çaylarında gözlemlendiğini, bunun muhtemelen PPO aktivitesini azaltan tutarsız ve düşük solma derecesinden kaynaklandığını bildirmiştir. Öte yandan, Muthumani ve Kumar (2007) tarafından normal solmuş ve dondurularak solmuş yaprakların fermente edilebilirliğinin bir karşılaştırması yapılmış ve TF seviyelerinin daha yüksek olduğu, sıvının ise 4 saat dondurularak soldurulmuş yapraklarda daha parlak olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, solmuş yaprakların nem içeriği yaklaşık %60 olduğunda ve bağıl nem %55 ile %65 arasında tutulduğunda, PPO aktivitesinin ve siyah çay kalitesinin önemli ölçüde arttığını keşfettiler. Aynı sıcaklık ayarlarında, çay yapraklarının kalitesi azalırken, solma süresi arttıkça PPO aktivitesi önemli ölçüde artmaktadır (Wang vd., 2014; 2019). Ayrıca, Cloughley (1979), PPO aktivitesinin artan sıcaklıkla birlikte azaldığını bildirmiştir. Dolayısıyla, geleneksel soldurmaya kıyasla soğuk depolama sırasında daha az nem kaybı meydana geldiği ve sıcaklık düşük olduğu için, PPO aktivite kaybı da geleneksel soldurma sırasındakinden daha az olmuştur.

PPO aktivitesi taze çay yapraklarında en yüksek seviyede bulunurken soldurma ile birlikte azaldığı tespit edilmiş olup, aktivitedeki bu azalma yeşil yaprak nem içeriğindeki kayıptan kaynaklanmaktadır (Ullah ve Roy, 1982). PPO aktivitesinin yapraklarla karşılaştırıldığında boğum aralarında daha yüksek olduğu bildirilmiştir ve yapraklar arasında, hassas yapraklar olgun yapraklardan daha yüksek enzim aktivitesine sahiptir (Thanaraj ve Seshadri, 1990). Rehidrasyonla orijinal aktivite geri kazanılır. Bu durum, daha iyi fermentasyon ve dolayısıyla daha kaliteli çay için maksimum PPO aktivitesini korumak amacıyla yeşil yaprağın nem içeriğinin kontrol edilmesi gerektiğini vurgulamaktadır (Ravichandran ve Parthiban, 1998). Sürgün olgunlaştıkça enzim aktivitesinde belirgin bir düşüş görülürken, gövde en az enzim içerir. Ayrıca, PPO aktivitesinin yeni budanmış alılarda en yüksek olduğu ve budama yaşıyla birlikte yavaşça azaldığı bulunmuştur (Ravichandran ve Parthiban, 1998). Dolayısıyla, toplama standardı (toplanan yaprak sayısı) ayın kalitesi ve dolayısıyla fiyatı üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir. Ancak, ücretler de dahil olmak üzere sürekli artan üretim maliyetleri ve işgücünün bulunmaması nedeniyle, kaliteden ziyade verime (hasata) öncelik verilmektedir. Ölmez ve Yılmaz (2010) birinci ve ikinci sürgün dönemlerinde almış oldukları çay örneklerini (2,5 yaprak) geleneksel soldurma yöntemi ile soldurmuşlar ve PPO aktivitelerinin değişimini araştırmışlardır. İkinci sürgün çay örneklerinin PPO aktivitesinin ($42\pm0,64$) birinci sürgün çay örneklerinin PPO aktivitesinden ($42\pm0,64$) daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ikinci sürgün çay örnekleri ele alınmış olup Ali Rıza Erten klonunda kontrol örneklerinden son soldurma süresine kadar bir artış gözlenmiş olsa da bu artış düzenli olmamıştır ve en yüksek PPO aktivitesi 16 saatlik soldurmada tespit edilmiştir. Zihni Derin klonunda ise durum daha farklı olup kontrol örneklerindeki (0 saat; 9,22) en düşük aktiviteyi 19 (10,38) ve 16 (14,97) saatlik soldurma yapılan örnekler izlemiş olup en yüksek aktivite 18 saatlik soldurmada tespit edilmiştir. En düşük aktiviteler her iki klon için kontrol örneklerinde (0 saat) belirlenmiştir.

Aroma, ay kalitesinin önemli bir göstergesidir. ay yaprağı lipitlerindeki linoleik ve linolenik asitlerden oluşan uçucu C_6 bileşikleri, çayın temel bileşenleridir. C_6 bileşikleri, çay yapraklarının hasat sonrası sürecinde oluşur ve dönüşür (Zhou vd., 2020b). ADH, bitkilerde altı karbonlu uçucu maddelerin biyosentez yolunda hayati bir enzimdir. Ancak, ay bitkilerindeki işlevleri hakkında çok az şey bilinmektedir (Liu

vd., 2022). ADH, özellikle soldurma işlemi sırasında çay bitkilerindeki uçucu bileşiklerin dönüşümünde önemli bir rol oynar. Bu enzim, çayın aroma profiline önemli katkılarda bulunan C₆-aldehitlerin C₆-alkollere indirgenmesinde rol oynar. Çay işleme sürecinin soldurma aşaması, nihai çay ürününün lezzet ve aromasının gelişimi için kritik öneme sahiptir ve ADH aktivitesi bu dönüşümde önemli bir faktördür. ADH aktivitesindeki azalmanın yaz aylarında yapraklarda C₆-aldehit birikimiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Francis vd., 1974).

Wu vd. (2024), güneş ışığında soldurmanın beyaz çayın çiçeksi aromasını artırdığını, tankta soldurmanın ise çimensi aromasını zenginleştirdiğini ifade etmişlerdir. Ayrıca, gölge altında yapılan soldurmanın da aromatik profili dengelediğini belirtmişlerdir ve beyaz çayın çiçek aromasının bariz nedenini ADH'nin yüksek aktivitesine bağlamışlardır. ADH aktivitesi, güneş ışığında, tankta ve gölge altında yapılan her üç soldurma işleminde de önce artan, sonra azalan bir eğilim göstermiştir. Li vd. (2022), yaptıkları çalışmalarında yaprak alkolü içeriğinin geç solma döneminde sabit kaldığını veya hafifçe azaldığını; bunun muhtemelen temel enzim aktivitesinin zayıflamasından kaynaklandığını ifade etmişlerdir.

ADH, birincil yağ asitlerinden aldehitlerin alkollere dönüştürülmesine yardımcı olur ve alkol bileşikleri siyah çaya çiçeksi meyve aroması verir (Wang vd., 2001; Yang vd., 2013). Fenilalanin, fenilasetaldehite dönüştürülür ve ardından feniletıl alcole indirgenir (Tomlins ve Mashingaidze, 1997). Genellikle, glikozitlerin hidrolizi ve uçucu bileşiklerin ve öncüllerinin de novo biyosentezi, soldurma sırasında uçucu bileşiklerin birikmesine neden olur (Wang vd., 2019). Soldurma işlemlerinde ADH aktivitesinde artış gözlenmesinin nedeni, hasat sırasında taze çay yapraklarının hasar görmesinden ve soldurma işlemi tamamlanmadan önce meydana gelen abiyotik streslerden kaynaklanıyor olabilir. Toplanan taze yapraklar in vitro olarak çevresel streslere (örneğin ışık, ısı) maruz bırakıldığı için (You vd., 2018) ADH aktivitesinde artışa yol açmış olabilir. ADH'nin, LOX-HPL (lipoksijenaz-hidroperoksit liyaz) sistemi tarafından üretilen C₆-aldehitleri azaltarak C₆-alkolleri ürettiği ve yaprak alkol esterlerinin türevleri için zengin öncüller sağlamış olacağı ön görülmektedir. ADH aktivitesi, oluşan uçucu C₆-alkol miktarını belirler ve bu da çay üretimi için işlenen taze yaprakların kalitesini kontrol eder (Zhou vd., 2020b). Çalışmada ele alınan çay klonlarından Ali Rıza Erten'de 18 saatlik soldurmada en yüksek, 20 saatlik soldurmada

ise en düşük ADH aktivitesi gözlemlendi. Zihni Derin klonunda en yüksek ve en düşük ADH aktiviteleri sırasıyla 20 saatlik soldurmada ve 0 saatlik kontrol grubunda (taze yapraklarda) belirlendi (Şekil 1 ve Şekil 4). Benzer şekilde, Oolong çayının hasat sonrası sürecinde ADH aktivitesindeki değişikliklerin ortaya çıkarıldığı bir çalışmada, ADH aktivitesinin taze yapraklarda düşük (0,020 U₂), ancak daha sonra önemli ölçüde artarak güneşte soldurma fazında zirveye ulaştığı (0,550 U₂) ifade edilmiştir (Zhou vd., 2020b). Li vd. (2022) kırmızı ışıktaki soldurmanın ADH ekspresyonunu artırabileceğini ve bunun da geç soldurma aşamalarında yaprak alkollerinin ve diğer aroma arttırıcı bileşiklerin daha fazla üretilmesine yol açabileceğini rapor etmişlerdir. Soldurma işleminden sonra taze yapraklardaki aroma maddelerinde meydana gelen değişiklik, soldurma işleminin tat oluşumu üzerindeki etkisini daha iyi yansıtabilir (Yin vd., 2009).

Soldurmanın süresi, sıcaklığı ve bağıl nemi nihai ürünün kalitesi üzerinde önemli etkilere sahiptir (Obanda vd., 2004). Soldurma sırasında, çay yaprağı su konsantrasyonunun değişmesiyle birlikte, yaprak içi enzimlerin (özellikle peroksidaz ve polifenol oksidaz) aktivitesi artar (Ntezimana vd., 2021), yaprak içinde kimyasal reaksiyonları tetikleyerek yağ asidi bileşiklerinin alkoller ve aldehitler gibi önemli aromatik bileşiklere parçalanmasına yol açar (Huang vd., 2024). Soldurma süresi biyokimyasal etkileşimlerde önemli bir rol oynar (Soheili-Fard vd., 2015). Kimyasal soldurma için optimum sürenin 14 saat olduğu bildirilmiştir (Ullah, 1984). Deneysel çalışmalar, 20 saatin üzerindeki soldurma süresinin siyah çayın kalitesinin bozulmasına yol açtığını (Owuor ve Orchard, 1989) ve dolayısıyla soldurma süresinin 18 saat ile sınırlandırılması gerektiğini göstermiştir (Owuor ve Orchard, 1992; Omiadze vd., 2014). Soheili-Fard vd. (2015), 16 saatte solmuş yaprakların en yüksek tearubigin içeriğine sahip olduğunu ve nihai üründe en iyi duyu kalite özelliklerini verdiğini tespit etmişlerdir. Ravichandran ve Parthiban (1998), soldurma sırasında çay aromasının geliştiğini bildirmiştir. Baruah vd. (2012) daha uzun kimyasal soldurmanın siyah çay tadı kalitesini iyileştirdiğini bildirmiştir. Owour ve Orchard (1992), optimum kimyasal soldurmanın 14 saat içinde elde edilebileceğini bildirmiştir. Jabeen vd. (2019), 23 saate kadar soldurma işlemi sırasında çay yapraklarının toplam serbest amino asitlerinde artış eğiliminin olduğunu, ardından bir düşüşün gözlemlendiğini ifade etmişlerdir. Emdabi vd. (2009), teaflavin oluşumunun en yüksek seviyelerinin

soldurma süresi yaklaşık 19-20 saat olduğu zamanda tespit edildiğini bildirmişlerdir. Kalidass vd. (2019) yapmış oldukları çalışmalarında, hasat edilen yeşil yaprakların 16 saate kadar soldurulmasının arzu edilen aromaya sahip kaliteli çayları elde etmek için en uygun zaman olabileceğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte 10 saat içinde solmuş çay yapraklarının işlenmesi, zayıf biyokimyasal özelliklerle sonuçlanırken 18 saatten fazla işlemenin de CTC siyah çaylarının kalite özelliklerini bozduğu ifade edilmiştir. Bireysel serbest amino asitlerin çoğunda artan bir eğilim gözlenmiş olup toplam serbest amino asitler 18 saate kadar artmış, ardından azalmıştır. Bu deneyde yüksek amino asit içeriği, orta kateşin içeriği ve düşük kafein içeriği elde etmek için 25 °C'de 15-18 saat soldurma önerilmiştir (Ye vd., 2020). Qiao vd. (2023) farklı soldurma süreleri altında ana aroma bileşenlerindeki değişiklikleri araştırdıkları çalışmalarında, soldurmanın çoğu amino asit ve aroma uçucu maddesinin içeriği üzerinde büyük etkiye sahip olduğunu, çoğu uçucu maddenin göreceli içeriğinin soldurma süresinin 6-8. saatlerinde en yüksek olduğunu ve bu sonuçların aroma kalitesinin duyuşal değerlendirmesinin sonuçlarıyla tutarlı olduğunu ifade etmişlerdir. Ntezimana vd. (2021) soldurma süresinin artmasıyla aromatik madde içeriğinde önce artma, sonra azalma eğiliminin olduğunu, genel sonuçların 8 saat ile 10 saat arasındaki soldurma süresinin siyah çay kalitesini ve besin özelliklerini iyileştirebileceğini ifade etmişlerdir. Çayın aroması da dahil olmak üzere kalitesinin artırılması için en uygun soldurma süresi 8 ila 10 saat arasındadır, çünkü bu süre aromatik maddelerdeki artış ile polifenol ve flavonoidlerdeki azalmayı dengeler (Ntezimana vd., 2021). Yapılan bu çalışmada, hem klonlar arasında hem de klonların kendi içlerinde her üç enzim açısından soldurma sürelerinde farklı spesifik aktiviteler tespit edilmiştir. En yüksek peptidaz aktivitesi her iki klonda 24 saatlik soldurulan çay örneklerinde gözlemlenirken, en düşük aktivite ise Ali Rıza Erten klonunda 17 saatlik, Zihni Derin klonunda ise 19 saatlik soldurulan çay örneklerinde belirlendi. ADH aktivitesi Ali Rıza Erten klonunda en yüksek aktiviteyi 18 saatlik soldurmada, Zihni Derin klonunda ise 20 saatlik soldurmada verdi. En düşük aktivite ise Ali Rıza Erten ve Zihni Derin klonları için sırasıyla 20 saat ve 0 saatte (kontrol grubu) tespit edildi. PPO için en yüksek aktiviteler Ali Rıza Erten ve Zihni Derin klonlarında sırasıyla 16 ve 18 saat soldurulan örneklerde, en düşük aktiviteleri ise her iki klonun kontrol grubu (0 saat) örneklerinde belirlendi. Her iki klonun soldurma sürelerine göre en yüksek peptidaz

aktivitesi (24 saatte) hariç gerek farklı soldurma süreleri gerekse farklı enzim aktiviteleri bakımından tek düze bir sonuç elde edilememiştir. Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde de çayın soldurma süresi ile ilgili belirsizliğin devam ettiği görülmektedir. Deb ve Jolvis (2016) belirli bir soldurma süresinin olmadığını, ancak genellikle optimum sürenin 14 ila 18 saat olarak kabul edilebileceğini ifade etmişlerdir. Mevcut çalışmada yer alan Ali Rıza Erten klonunun ADH (18 saat) ve PPO (16 saat) aktiviteleri, Zihni Derin klonunun PPO (16 saat) aktivitesi literatür ile uyum sağlamaktadır. Ntezimana vd. (2021) soldurma sırasında, polifenol oksidaz ve peroksidaz aktivitesinin soldurma süresi arttıkça önemli ölçüde arttığını ifade etmişlerdir. Latha ve Ramarethinam (2000) soldurmanın 4 saatten 20 saate ilerlemesiyle fenilalanin amonyum liyaz (PAL) aktivitesinin azaldığını, pik aktivitesinin soldurmanın 4. saatinde olduğunu ve daha sonra kıvrırma ve fermentasyon ile azaldığını, ön ateşleme aşamalarından sonra hiçbir aktivite olmadığını belirtmişlerdir. Kıvrırma aşamalarında artan aktivite ile 20 saatte solmuş yapraklarla karşılaştırıldığında, solmayanlarda yüksek PPO aktivitesi bulunduğunu ifade etmişlerdir. Benzer olarak bu çalışmada da soldurulmamış yapraklara kıyasla 24 saat soldurulmuş olanlarda daha fazla peptidaz aktivitesi gözlemlendi. Ali Rıza Erten klonunun peptidaz aktivitesi (24 saat), Zihni Derin klonunun ADH (20 saat) ve peptidaz aktiviteleri (24 saat) yukarıda bahsedilen literatür bilgileri ile benzerlik göstermektedir. Bunun nedeni, soldurma işlemi sırasında çay yapraklarındaki çeşitli bileşiklerin konsantrasyonlarındaki değişikliklerin, enzimatik aktivite ve yaprakların kurumasından etkilenmesi olabilir (Shi vd., 2023). Ayrıca aromatik bileşikler sentez veya bozunmaya uğrayabilir (Zeng vd., 2019). Nem kaybının yapraklardaki enzimleri etkilediği de bilinmektedir (Bardzik vd., 1971). Çay sürgünlerinde hidrolitik ve oksidatif enzimlerin yaygın olarak bulunması, siyah çayın üretimi sırasında kalite özelliklerinin oluşmasında önemli bir rol oynamaktadır. Doğal soldurma, taze yaprakların sabit bir ortamda yavaşça su kaybettiği, oda sıcaklığında zaman alıcı bir soldurma türüdür. Güneş soldurmada, güneş ışınları taze yaprakların kıvrılmaya hazırlanması için kullanılır. Güneş soldurma daha az zaman alsa ve çay yapraklarının aroma kalitesini önemli ölçüde iyileştirse de dengesiz radyasyon yoğunluğu yaprak su kaybı oranını kontrol etmede zorluk yaratarak tatmin edici olmayan sonuçlara yol açar. Sıcak hava soldurma, çay yapraklarına etki eden havanın ısıtılmasıyla su kaybını teşvik

eder ve metabolit değişimlerini etkiler. Bu uygulamada sıcaklık ve hava akışı hassas bir şekilde kontrol edilebilir. Güneş soldurma ve sıcak hava soldurma, sıcaklık etkisi koşulları altında doğal soldurmaya göre daha yüksek yoğunlukta dehidrasyon stresi gösterir ve bu nedenle endojen enzimlerin aktivitesini önemli ölçüde artırır (Huang vd., 2023).

Farklı enzimlerin içeriğindeki farklılıklar, çeşitlerin değerlendirilmesinde önemli bir rol oynamasına rağmen, çay üzerine çok az çalışma yapılmıştır. Ravichandran ve Parthiban (1998)'nın yapmış oldukları çalışmalarında farklı klonlara göre PPO aktivitelerinde geniş bir çeşitlilik gözleendiği, UPASI-3 klonunun PPO aktivitesinin SA-6 klonunun üç katından fazla olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, bu klonlardan elde edilen siyah çayları organoleptik değerlendirmeye göndermiş ve profesyonel tadımcılar tarafından bildirilen puanların, PPO aktiviteleriyle iyi bir korelasyon gösterdiğini ifade etmişlerdir. Farklı klonların enzim aktiviteleri arasında mevsimsel değişikliklere ve sürgün olgunluğuna bağlı olarak geniş bir değişim görüldüğünü, yolma ve budama gibi tarla uygulamalarının enzim aktiviteleri üzerinde büyük bir etkisinin olduğunu belirtmişlerdir. Üretimin farklı aşamalarında enzim aktivitelerindeki değişimin boyutunun büyük ölçüde farklılık gösterdiğini ve soldurma sırasındaki aktivite kaybının, rehidrasyonla geri kazanılabilmekte olduğunu bildirmişlerdir. PPO aktivitesinin mevsimsel değişimleri UPASI-9 çeşidinde düzenli aralıklarla incelenmiştir. PPO aktivitesinin, kuraklık mevsiminde (Ocak-Mart) en düşük seviyede olduğu, yüksek mahsul mevsiminde (Nisan-Haziran) arttığı, Temmuz-Eylül aylarında tekrar düştüğü ve Ekim-Aralık döneminde ise en yüksek seviyeye ulaştığı rapor edilmiştir. Dolayısıyla iklim, yani su bulunabilirliği, enzim aktivitesiyle doğrudan pozitif bir korelasyona sahiptir. Burada da tadımcıların puanı enzim aktivitesiyle pozitif bir ilişki göstermiştir. Yüksek PPO aktivitesinin daha fazla miktarda çay pigmenti üretimine ve dolayısıyla kalitenin artmasına yol açacağı ifade edilmiştir (Ravichandran ve Parthiban, 1998). Yapılan bir çalışmada, altı farklı klonlar (UPASI-3, UPASI-4, UPASI-10, UPASI-12, UPASI-14 ve SA/6) arasında PPO aktivitesinde geniş bir varyasyon gözlemlenmiştir. Farklı klonlardaki çay filizlerinin PPO aktivitesi 12,54 ila 43,58 ünite arasında değişmiştir. UPASI-14 klonunun PPO aktivitesi, SA/6 klonunkinden yaklaşık 3,5 kat daha fazlaydı; bu, ilkinin hızlı fermente olan bir klon, ikincisinin ise yavaş fermente olan bir klon olduğu gerçeğiyle

uyumludur (Thanaraj ve Seshadri, 1990). ay yapraklarının PPO aktivitesi, klon türü, mevsim, sürgün bileşeni ve işlem gibi çeşitli parametrelere göre büyük ölçüde değişir. Lopez vd. (2005), çay klonlarının substrat seviyesi ve enzim aktivitesindeki değişimleri ara tırmı  ve kate inler ile PPO'nun değişkenlik gösterdiğini ve bunun da nihai siyah çay kalitesini etkilediğini bulmuşlardır. Yazarlara göre, enzim substrat oranı açısından daha yüksek değerler kaydeden klonlar, önemli ölçüde daha yüksek TF seviyeleri göstermiştir. Li vd., (2020)'nin sonuçları, soldurma işlemi sırasında toplam amino asit eğiliminin çeşitler arasında da değiştiğini göstermiştir. Mevcut çalışmadan elde edilen sonuçlara bakıldığında, Zihni Derin klonunun enzim aktiviteleri Ali Rıza Erten klonunun enzim aktivitelerinden daha yüksek olup PPO aktivitesi açısından $P < 0,001$, peptidaz aktivitesi açısından ise $P=0,021$ seviyesinde anlamlı farklılar tespit edilmiştir. ADH aktivitelerindeki değişim klonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış olup Zihni Derin klonundaki total aktivitenin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tüm klonların enzim aktivitelerine bakıldığında, ADH ve PPO aktiviteleri 18 saatlik soldurma yapılan örneklerde en yüksek seviyede, peptidaz aktivitesi ise 24 saatlik soldurulan örneklerde tespit edildi. Çalışma sonuçlarımıza benzer olarak Nasir vd. (2015) alı malarında tüm klonların çoğunun 16 ila 18 saat arasında iyi kalite verdiğini ifade etmişlerdir. Ancak her klon için optimum soldurma saatine dikkat edilmesi gerektiğini de bildirmişlerdir. Kuru ayın niteliğinde azalma olmaması açısından hasat işleminden sonra 24 saat içinde çayın soldurma işleminin tamamlanması gerekir (Safi, 2018).

Korelasyon ifadesi +1 ile -1 arasındaki değişimdir. 0,5 ile 1 arasındaki ifadeler yüksek korelasyonları, 0,3 ile 0,5 arasındaki ifadeler orta korelasyonları, 0,0 ile 0,3 arasındaki ifadeler zayıf ve değersiz korelasyonları gösterir (Tatar vd., 2019). Bu alı mada Ali Rıza Erten klonunun enzim aktiviteleri ile soldurma süreleri arasındaki korelasyon ilişkileri incelendiğinde, soldurma süreleri ile ADH aktivitesi arasında pozitif yönde zayıf ve anlamsız, PPO aktivitesi arasında pozitif yönde orta ve anlamsız, peptidaz aktivitesi arasında ise yüksek seviyede pozitif yönde anlamlı ilişkinin olduğu tespit edilmiştir. Zihni Derin klonunun soldurma süreleri ile PPO aktivitesi arasında pozitif yönde zayıf ve anlamsız, ADH aktivitesi arasında pozitif yönde orta ve anlamlı, peptidaz aktivitesi arasında ise yüksek seviyede pozitif yönde anlamlı ilişkinin olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu durum, soldurma süreleri ile enzim aktiviteleri arasındaki

ilişkilere bakıldığında Zihni Derin klonu için soldurma sürelerinin daha önemli olduğu anlamına gelmektedir. Soldurma sürelerinin bu üç enzimin aktivitelerinin optimum düzeye taşınmasında önemli olduğu ve bu aralıkta yapılan soldurmanın çay kalitesinde etkili olan bileşenlerin sentezinde dengeyi sağlayacağı ön görülmektedir. Her iki klondan elde edilen enzim verileri ile klonlar arasındaki ilişkiye bakıldığında, klonlar ile ADH aktivitesi arasında pozitif yönde zayıf ve anlamsız, peptidaz arasında pozitif yönde orta ve anlamlı, PPO arasında ise pozitif yönde yüksek seviyede anlamlı ilişkinin olduğu tespit edilmiştir. Korelasyon ilişkilerine bakıldığında bu sonuçlar, yüksek ADH aktivitesine sahip olan klonların aroma bileşikleri bakımından daha zengin profillere sahip olmaları, peptidaz düzeyi yüksek olan klonlarda tat açısından kritik önemde olan amino asitlerin oranının yüksek olması ve PPO aktivitesi yüksek klonlarda daha fazla teaflavin ve tearubigin oluşumu, artan renk yoğunluğu, daha güçlü aroma ve tat profillerinin olması ile açıklanabilir. ADH, PPO ve peptidaz aktiviteleri ile klonlar arasındaki ilişkilerin bilinmesi çayın aroması, umami, tat ve renk gibi kalite özelliklerini belirlemede klonlar arasındaki farklılıkları ortaya çıkararak seleksiyon seçiminde ya da özgün klon geliştirme süreçlerinde kullanılabilir.

Çay, üreticileri için önemli bir ekonomik girdi sağlamasının yanı sıra, yüksek eğimli ve dağlık alanların tarımsal üretime kazandırılmasına imkan tanıyan; aynı zamanda bölgesel kalkınma ve ekonomiye katma değer sağlama potansiyeli yüksek, stratejik öneme sahip bir üründür. Ülkemiz için stratejik bir ürün olarak değerlendirilen çay bitkisinin günümüzdeki en önemli sorunlarından biri çayın kalitesine katkı yapan aşamalardan ilki olan soldurma süresi ile ilgili belirsizliğin devam etmesidir. Yapılan bu çalışmada çayın tat, renk ve aroma gibi kalite parametrelerinde önemli etkiye sahip olan peptidaz, polifenol oksidaz ve alkoldehidrogenaz enzimlerinin en aktif olduğu soldurma süresinin yapılan deneyler sonucu elde edilmesi, ilin önemli kurum/kuruluşlarına bilgi verilmesi ve çay kalitesinin arttırılmasına katkı sağlanması amaçlanmıştır. Bu ana amaç doğrultusunda mevcut çalışmada hem klonlar arasında hem de klonların kendi içlerinde, üç enzimin spesifik aktivitelerinde soldurma sürelerine bağlı olarak farklılıklar tespit edilmiştir. Peptidaz enzimi açısından en yüksek aktivite, her iki klonda da 24 saatlik soldurma uygulamasında gözlemlenmiş; en düşük aktivite ise Ali Rıza Erten klonunda 17 saatlik, Zihni Derin klonunda ise 19 saatlik soldurmada kaydedilmiştir. Alkol dehidrogenaz enziminin en yüksek aktivitesi,

Ali Rıza Erten klonunda 18 saatlik soldurmada, Zihni Derin klonunda ise 20 saatlik soldurmada belirlenmiştir. Bu enzimin en düşük aktivitesi ise sırasıyla Ali Rıza Erten klonunda 20 saatlik, Zihni Derin klonunda ise kontrol grubunda (0 saat) tespit edilmiştir. Polifenol oksidaz enzimi için en yüksek aktivite değerleri Ali Rıza Erten klonunda 16 saatlik, Zihni Derin klonunda e ise 18 saatlik soldurmada gözlenirken; her iki klonda da en düşük aktivitenin kontrol grubunda (0 saat) olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, farklı soldurma sürelerinin her iki çay klonunda peptidaz, alkol dehidrogenaz ve polifenol oksidaz aktivitelerini önemli ölçüde etkilediğini ve her soldurma süresinde enzim aktivitelerinin değişkenlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ancak, en yüksek peptidaz aktivitesinin 24 saatlik soldurma ile elde edilmesi dışında, enzim aktivitelerinde ve farklı soldurma sürelerinde tekdüze bir eğilim saptanmamıştır. Çalışmada, Zihni Derin klonunun enzim aktiviteleri, Ali Rıza Erten klonuna göre genel olarak daha yüksek düzeyde bulunmuştur. Tüm klonların genel enzim aktiviteleri incelendiğinde, ADH ve PPO aktivitelerinin 18 saatlik soldurma süresinde en yüksek seviyelere ulaştığı, peptidaz aktivitesinin ise 24 saatlik soldurma uygulaması sonucunda maksimum düzeye çıktığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, her iki çay klonunda soldurma sürecinde hiçbir enzim aktivitesinde kademeli artışın gözlenmediği, enzim aktivite değişimlerinin çoğunun belirgin bir düzenliliğe sahip olmadığı, çoğu enzim aktivitelerinin dalgalanma gösterdiği ve peptidaz dışında her iki klondaki enzim aktivitelerinin değişken olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma, enzimlerin soldurma süresi sırasında uğradıkları değişiklikleri göstererek siyah çay kalitesi üzerindeki önemine dikkat edilmesi gerektiğini vurgulamaktadır.

ADH, peptidaz ve PPO aktivitelerinin manipülasyonu, soldurma sırasında çay kalitesini artırmak için umut verici bir yaklaşım sunarken, enzimatik etkileşimlerin ve çevre koşullarının daha geniş bağlamını dikkate almak çok önemlidir.

ADH, peptidaz ve PPO aktivitelerine odaklanmak tat, renk ve aroma oluşumuna dair içgörüler sağlasa da soldurma sırasında meydana gelen daha geniş metabolik ve genetik değişiklikleri dikkate almak önemlidir. Çeşitli enzimlerin etkileşimi ve birden fazla genin ifadesi, çayın genel lezzet profiline katkıda bulunabilir. Ayrıca, soldurma yönteminin seçimi (örneğin, doğal, güneşte veya sıcak havada soldurma) bu biyokimyasal süreçleri daha da etkileyerek çayın nihai kalitesini

etkileyebilir. Bu karmaşık etkileşimleri anlamak, istenen lezzet özelliklerini geliştirmek için çay işleme tekniklerinin optimize edilmesine yardımcı olabilir.

Transkriptomik çalışmalar, soldurma yöntemlerinin ve sürelerinin, ADH, peptidaz ve PPO aktiviteleriyle ilişkili olanlar da dahil olmak üzere uçucu bileşik biyosentezinde yer alan genlerin ifadesini önemli ölçüde etkileyebilir. Ayrıca, soldurma işleminde tat, renk ve aroma kalitesiyle ilgili düzenleyici ağların oluşturulması, çay aroma kalitesi düzenleyici genlerinin çıkarılması için kolaylık sağlar. Ancak, çay endüstrisinde ADH, peptidaz ve PPO kullanımına ilişkin güncel bilgiler yalnızca dağınık kaynaklardan elde edilebilmektedir, ADH, peptidaz ve PPO ile çay arasındaki ilişkiyi net bir şekilde ortaya koymak için daha kapsamlı bir çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKÇA

- Aaqil, M., Peng, C., Kamal, A., Nawaz, T., Zhang, F., & Gong, J. (2023). Tea harvesting and processing techniques and its effect on phytochemical profile and final quality of black tea: A review. *Foods*, 12(24), 4467.
- Aftab, S., Saleem, M., Farrukh, S., Shamrez, B., Hamid, F. S., & Aslam, S. (2015). Effect of different timing of withering on polyphenols and caffeine contents of black tea (*Camellia sinensis* L.). *Moroccan Journal of Chemistry*, 3(3), 3–3. <https://doi.org/10.48317/IMIST.PRSM/morjchem-v3i3.2980>
- Alici, E. H., & Arabaci, G. (2018). A novel serine protease from strawberry (*Fragaria ananassa*): Purification and biochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 1295–1304. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.165>
- Altan, A. (1997). Özel gıdalar teknolojisi (250 s.). Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Atölyesi.
- Altan, A. (2001). Özel gıdalar teknolojisi. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Genel Yayın.
- Türkiye İstatistik Kurumu. (2024). TÜİK. <http://www.tuik.gov.tr> (Erişim tarihi: 10 Temmuz 2025)
- Bak, L. K., Schousboe, A., & Waagepetersen, H. S. (2006). The glutamate/GABA–glutamine cycle: Aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of Neurochemistry*, 98, 641–653.
- Bardzik, J. M., Marsh, H. V., Jr., & Havis, J. R. (1971). Effects of water stress on the activities of three enzymes in maize seedlings. *Plant Physiology*, 47(6), 828–831.
- Barrett, A. J. (1994). Classification of peptidases. In *Methods in Enzymology* (Vol. 244, pp. 1–15). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)44003-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)44003-4)
- Baruah, D., Bhuyan, L. P., & Hazarika, M. (2012). Impact of moisture loss and temperature on biochemical changes during withering stage of black tea processing on four Tocklai released clones. *Two and a Bud*, 59(2), 134–142.
- Belitz, H. D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). Coffee, tea, cocoa. In *Food Chemistry* (pp. 938–970). https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7_22
- Biswas, A. K., Biswas, A. K., & Sarkar, A. R. (1971). Biological and chemical factors affecting the valuations of north-east Indian plains teas: II.—Statistical evaluation of the biochemical constituents and their effects on briskness, quality and cash valuations of black teas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 22(4), 196–204.

- Bokuchava, M. A., & Skobeleva, N. I. (1969). The chemistry and biochemistry of tea and tea manufacture. *Advances in Food Research*, 17, 215–292. [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60311-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60311-0)
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Buzun, G. A., Dzhemukhadze, K. M., & Milesenko, L. F. (1984). O-diphenol oxidase of tea and quality of the raw material. *Subtrop Ku'lt*, 1, 35–38.
- Çalıkoglu, E., & Bayrak, A. (2009). Çay işleme sırasında aroma maddelerindeki değişim. *Gıda*, 34(2), 115–119.
- Carr, M. K. V., & Stephens, W. (1992). Climate, weather and the yield of tea. Chapman and Hall. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2326-6_4
- Cheetham, M. E. (1995). Cell stress genes and chronic neurodegenerative disorders. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 21(6), 486–488. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1995.tb01093.x>
- Chen, Q., Zhu, Y., Dai, W., Lv, H., Mu, B., Li, P., Tan, J., Ni, D., & Lin, Z. (2019). Aroma formation and dynamic changes during white tea processing. *Food Chemistry*, 274, 915–924. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.072>
- Chen, S., Liu, H., Zhao, X., Li, X., Shan, W., & Wang, X. (2020a). Non-targeted metabolomics analysis reveals dynamic changes of volatile and non-volatile metabolites during oolong tea manufacture. *Food Research International*, 128, 108778.
- Chen, Y., Zeng, L., Liao, Y., Li, J., Zhou, B., Yang, Z., & Tang, J. (2020b). Enzymatic reaction-related protein degradation and proteinaceous amino acid metabolism during the black tea (*Camellia sinensis*) manufacturing process. *Foods*, 9(1), 66. <https://doi.org/10.3390/foods9010066>
- Cho, J. Y., Mizutani, M., Shimizu, B., Kinoshita, T., Ogura, M., Tokoro, K., ... Sakata, K. (2007). Chemical profiling and gene expression profiling during the manufacturing.
- Cloughley, J. B. (1979). The effect of temperature on enzyme activity during the fermentation phase of black tea manufacture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31, 920–923.
- Constabel, C. P., & Barbehenn, R. (2008). Defensive roles of polyphenol oxidase in plants. In *Induced plant resistance to herbivory* (pp. 253–270). Dordrecht: Springer Netherlands.

- Cornish-Bowden, A. (2014). Current IUBMB recommendations on enzyme nomenclature and kinetics. *Perspectives in Science*, 1(1), 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.004>
- Cupp-Enyard, C. (2008). Sigma's non-specific protease activity assay—Casein as a substrate. *Journal of Visualized Experiments*, (19), e899. <https://doi.org/10.3791/899>
- Çalıkoglu , E., Bayrak, A. (2009). Çay İşleme Sırasında Aroma Maddelerindeki Değişim. *Gıda*, 34(2), 115-119.
- Dai, W., Hu, Z., Xie, D., Tan, J., & Lin, Z. A. (2019). Novel spatial-resolution targeted metabolomics method in a single leaf of the tea plant (*Camellia sinensis*). *Food Chemistry*, 311, 126007.
- Deb, S., & Jolvis Pou, K. R. (2016). A review of withering in the processing of black tea. *Journal of Bio Systems Engineering*, 41(4), 365–372. <https://doi.org/10.5307/JBE.2016.41.4.365>
- Devchoudhary, M. N., & Bajaj, K. L. (1980). Biochemical changes during withering of tea shoots. *Two Bud*, 27, 13–16.
- Dülger, D., Ergün, F., & Demir, N. (2018). Investigation of bioactive chemicals of passion flower (*Passiflora incarnata* L.). *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 5(4), 471–476. <https://doi.org/10.30910/turkjans.471285>
- Eden, T. (1976). *Tea. Tropical Agriculture Series*. Longman Group Limited.
- Elmas, C., & Gezer, C. (2019). Çay bitkisinin (*Camellia sinensis*) bileşimi ve sağlık etkileri. *Akademik Gıda*, 17(3), 417–428. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.647733>
- Emdadi, L., Nasernajad, B., Shokrgozar, S. T., Mehranian, M., & Vahabzadeh, F. (2009). Optimization of withering time and fermentation conditions during black tea manufacture using response surface methodology. *Scientia Iranica*, 16, 61–68.
- Fisunoğlu, M., & Besler, H. T. (2008). Çay ve sağlık ilişkisi. *Klasmat Yayınları*.
- Food and Agriculture Organization. (2024). FAOSTAT. <https://www.fao.org/faostat/en/#data> (Erişim tarihi: 26 Temmuz 2025)
- Francis, C. M., Devitt, A. C., & Steele, P. (1974). Influence of flooding on the alcohol dehydrogenase activity of roots of *Trifolium subterraneum* L. *Functional Plant Biology*, 1(1), 9–13.
- Fu, X., Chen, Y., Mei, X., Katsuno, T., Kobayashi, E., Dong, F., & Yang, Z. (2017). Regulation of formation of volatile compounds of tea (*Camellia sinensis*) leaves by single light wavelength. *Scientific Reports*, 5, 16858.

- Gandhi, K. D., Faldu, P. R., Patel, K. G., Solanki, V. H., Kansara, R. V., Singh, S., & Vyas, T. K. (2018). Plant polyphenol oxidase: Biochemical properties and browning of fruits and vegetables. *Indian Journal of Agricultural Biochemistry*, 31(1), 1–8. <https://doi.org/10.5958/0974-4479.2018.00001.1>
- Gascoyne, K., Marchand, F., Desharnais, J., & Américi, H. (2011). Tea: History, terroirs, varieties. <https://www.amazon.com/Tea-Terroirs-Varieties-Kevin-Gascoyne/dp/0228100275>
- González-Rábade, N., Badillo-Corona, J. A., Aranda-Barradas, J. S., & del Carmen Oliver-Salvador, M. (2011). Production of plant proteases in vivo and in vitro: A review. *Biotechnology Advances*, 29(6), 983–996. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.017>
- Gui, J., Fu, X., Zhou, Y., Katsuno, T., Mei, X., Deng, R., & Yang, Z. (2015). Does enzymatic hydrolysis of glycosidically bound volatile compounds really contribute to the formation of volatile compounds during the oolong tea manufacturing process? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 6905–6914.
- Guo, X.-Y., Lv, Y.-Q., Ye, Y., Liu, Z.-Y., Zheng, X.-Q., Lu, J.-L., Liang, Y.-R., & Ye, J.-H. (2021). Polyphenol oxidase dominates the conversions of flavonol glycosides in tea leaves. *Food Chemistry*, 339, 128088. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128088>
- Hazarika, B., Bora, D. K., Gogoi, M., & Saikia, A. (2024). Diversifying tea: A comprehensive review of tea and its derived products. <https://doi.org/10.53550/ajmbes.2024.v26i01.012>
- Heinstra, P. W., Geer, B. W., Seykens, D., & Langevin, M. (1989). The metabolism of ethanol-derived acetaldehyde by alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) and aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.3) in *Drosophila melanogaster* larvae. *Biochemical Journal*, 259, 791–797.
- Heutinck, K. M., ten Berge, I. J., Hack, C. E., Hamann, J., & Rowshani, A. T. (2010). Serine proteases of the human immune system in health and disease. *Molecular Immunology*, 47(11–12), 1943–1955. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.04.020>
- Hilal, Y. (2017). Morphology, manufacturing, types, composition and medicinal properties of tea (*Camellia sinensis*). Elyn Publishing, 01(02). <https://elynspublishing.com/index.php/journal/article/morphology-manufacturing-types-composition-and-medicinal-properties-of-tea-camellia-sinensis>
- Huang, F., Yang, P., Bai, S., Liu, Z., Li, J., Huang, J., & Xiong, L. (2024). Lipids: A noteworthy role in better tea quality. *Food Chemistry*, 431, 137071. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137071>

- Huang, W., Fang, S., Su, Y., Xia, D., Wu, Y., Liu, Q., ... Ning, J. (2023). Insights into the mechanism of different withering methods on flavor formation of black tea based on target metabolomics and transcriptomics. *LWT*, 189, 115537.
- Huang, X., Ou, S., Li, Q., Luo, Y., Lin, H., Li, J., Zhu, M., & Wang, K. (2021). The R2R3 transcription factor CsMYB59 regulates polyphenol oxidase gene CsPPO1 in tea plants (*Camellia sinensis*). *Frontiers in Plant Science*, 12, 739951. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.739951>
- Hussain, I., Khan, F., Iqbal, Y., & Khalil, S. J. (2006). Investigation of heavy metals in commercial tea brands. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 28, 246–251.
- Ishigami, T., Hirose, Y., & Yamada, Y. (1988). Characterization of polyphenol oxidase from *Chaetomium thermophile*, a thermophilic fungus. *Journal of General and Applied Microbiology*, 34(5), 401–407. <https://doi.org/10.2323/JGAM.34.401>
- IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). (1984). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides: Recommendations 1983. *European Journal of Biochemistry*, 138, 9–37. <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1432-1033.1984.tb07877.x>
- Jabeen, S., Alam, S., Saleem, M., Ahmad, W., Bibi, R., Hamid, F. S., & Shah, H. U. (2019). Withering timings affect the total free amino acids and mineral contents of tea leaves during black tea manufacturing. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 2411–2417. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.03.011>
- Jie, T., Jie, T., Gong, Z., Deng, Y., Chen, L., Li, Q., Shao, Y., Lin, L., & Xiao, W. (2017). Purification, characterization and enzymatic synthesis of theaflavins of polyphenol oxidase isozymes from tea leaf (*Camellia sinensis*). *LWT - Food Science and Technology*, 84, 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.065>
- Jukanti, A. K. (2017). Reaction features of polyphenol oxidases (pp. 57–72). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5747-2_4
- Kacar, B. (2010). Çay bitkisi, biyokimyası, gübrenmesi, işleme teknolojisi. Nobel Yayın Dağıtım.
- Kagi, J. H., & Vallee, B. L. (1960). Metallothionein: a cadmium-and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J. biol. Chem*, 235(12), 3460-3465.
- Kalidass, S., Vijaya, K. U., & Kumar, R. R. (2019). Biochemical Changes During Withering Process of CTC black Tea Manufacture. *Oriental Journal of Chemistry*, 35(4).
- Karigar, C. S., & Rao, S. S. (2011). Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review. *Enzyme Research*, 2011, 1–11. <https://doi.org/10.4061/2011/805187>

- Karori, S. M., Wachira, F. N., Wanyoko, J. K., & Ngure, R. M. (2007). Antioxidant capacity of different types of tea products. *African Journal of Biotechnology*, 6, 2287–2296. <https://doi.org/10.5897/AJB2007.000-2358>
- Kassambara, A. (2020). ggpubr: 'ggplot2' based publication ready plots (R package version 0.4.0). <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>
- Kassambara, A. (2023). ggcorrplot: Visualization of a correlation matrix using 'ggplot2' (R package version 0.1.4). <https://CRAN.R-project.org/package=ggcorrplot>
- Kerio, L. C., Wachira, F. N., Wanyoko, J. K., & Rotich, M. K. (2013). Total polyphenols, catechin profiles and antioxidant activity of tea products from purple leaf coloured tea cultivars. *Food Chemistry*, 136, 1405–1413. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.066>
- Khan, N., & Mukhtar, H. (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life Sciences*, 81, 519–533. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.06.011>
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J. C., & Krebs, B. (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dinuclear copper active site. *Nature Structural Biology*, 5, 1084–1090. <https://doi.org/10.1038/4195>
- Koech, K. R., Wachira, F. N., Ngure, R. M., Orina, I. A., Wanyoko, J. K., Bii, C., & Karori, S. M. (2013). Antifungal activity of crude tea extracts. *African Journal of Agricultural Research*, 8, 2086–2089. <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.6742>
- Kolcuoğlu, Y. (2012). Purification and comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota gracilentia*). *Process Biochemistry*, 47(12), 2449–2454.
- Kottur, G., Venkatesan, S., Senthil Kumar, R. S., & Murugesan, S. (2011). Impact of genotype, seasons and manufacturing process on the activities of peptidase and lipoxygenase in tea. *European Food Research and Technology*, 232(2), 335–341. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1393-5>
- Kubiak-Tomaszewska, G., Tomaszewski, P., & Piatkowska, E. (2020). Molecular mechanisms of ethanol biotransformation. *Xenobiotica*, 50(7), 797–812. <https://doi.org/10.1080/00498254.2020.1761571>
- Kumar, D. S. (2015). Purification and characterization of ionically unbound polyphenol oxidase from *Cinnamomum tamala* syn. *Cinnamomum* leaves. *Asian Food Biotech*, 2(2), 31–38. <https://doi.org/10.22037/AFB.V2I2.7487>
- Kumar, R. S. S., Murugesan, S., Kottur, G., & Gyamfi, D. (2012). Black tea: The plants, processing/manufacturing and production. In V. Preedy (Ed.), *Tea in health and disease prevention* (pp. 41–57). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384937-3.00004-5>

- Langley, C., Tatsis, E. C., Hong, B., Nakamura, Y., Paetz, C., Stevenson, C. E. M., Basquin, J., Lawson, D. M., Caputi, L., & O'Connor, S. E. (2022). Expansion of the catalytic repertoire of alcohol dehydrogenases in plant metabolism. *bioRxiv*, 61. <https://doi.org/10.1101/2022.07.24.501124>
- Latha, K., & Ramarethinam, S. (2000). Variations in the activities of the enzymes involved in the formation and interconversion of polyphenols during black tea manufacture. *Indian Journal of Plant Physiology*, 5, 400–402.
- Li, D., Li, C., Hu, C., Yang, Y., Lin, C., Zhao, D., ... et al. (2020). Study on the accumulation mechanism of amino acids during bruising and withering treatment of oolong tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(47), 14071–14080.
- Li, Y., Chen, Y., Dai, X., Pan, K., Mi, X., Qiao, D., Chen, J., Chen, Z., Shen, Q., & Zhang, X. (2024). A comprehensive study of the physiology and chemistry of tea withering based on untargeted metabolomic, transcriptomic, and biochemical analyses. *Food Chemistry*, 141713. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.141713>
- Li, Y., He, C., Yu, X., Zhou, J., Ntezimana, B., Yu, Z., ... Ni, D. (2022). Study on improving aroma quality of summer-autumn black tea by red-light irradiation during withering. *LWT*, 154, 112597.
- Liao, Y., Yu, Z., Liu, X., Zeng, L., Cheng, S., Li, J., Tang, J., & Yang, Z. (2019). Effect of major tea insect attack on formation of quality-related nonvolatile specialized metabolites in tea (*Camellia sinensis*) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(24), 6716–6724. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01854>
- Lin, Y. S., Tsai, Y. J., Tsay, J. S., & Lin, J. K. (2003). Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1864–1873. <https://doi.org/10.1021/jf021066b>
- Liu, S., Guo, L., Zhou, Q., Jiang, Z., Jin, L., Zhu, J., ... Wei, C. (2022a). Identification and functional analysis of two alcohol dehydrogenase genes involved in catalyzing the reduction of (Z)-3-hexenal into (Z)-3-hexenol in tea plants (*Camellia sinensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(6), 1830–1839.
- Liu, Y., Chen, Q., Liu, D., Yang, L., Hu, W., Kuang, L., Teng, J., & Liu, Y. (2022b). Comparison of the biochemical properties and enzymatic synthesis of theaflavins by soluble and membrane-bound polyphenol oxidases from tea (*Camellia sinensis*) leaves. *Food Science and Technology*, 42. <https://doi.org/10.1590/fst.117321>
- Lopez, S. J., Thomas, J., Pius, P. K., Kumar, R. R., & Muraleedharan, N. (2005). A reliable technique to identify superior quality clones from tea germplasm. *Food Chemistry*, 91, 771–778.

- Mahmutoğlu, H. (1994). Rize ilinin bazı ekolojik koşullarında, seleksiyonla bulunan altı çay (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) klonunun (F-3, M-10, D-7, T-10, G-3 ve P-20) gelişiminin araştırılması (Doctoral dissertation). Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Mangolin, C. A., Prioli, A. J., & Machado, M. F. P. S. (1994). Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) isozymes as markers at 2,4-dichlorophenoxyacetic acid × kinetin combinations in callus cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochemical Genetics*, 32, 191–200.
- Mayer, A. M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? *Phytochemistry*, 67(21), 2318–2331. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.006>
- McDonald, A. G., & Tipton, K. F. (2014). Fifty-five years of enzyme classification: Advances and difficulties. *The FEBS Journal*, 281(2), 583–592. <https://doi.org/10.1111/febs.12530>
- McDonald, A. G., & Tipton, K. F. (2023). Enzyme nomenclature and classification: The state of the art. *The FEBS Journal*, 290(6), 1507–1520. <https://doi.org/10.1111/febs.16274>
- Mishra, R. K., Chaudhury, S., Ahmad, A., Pradhan, M., & Siddiqi, T. O. (2009). Molecular analysis of tea clones (*Camellia sinensis*) using AFLP markers. *International Journal of Integrative Biology*, 5(2), 130–136.
- Mozumder, N. R., Lee, J. E., & Hong, Y. S. (2025). A comprehensive understanding of *Camellia sinensis* tea metabolome: From tea plants to processed teas. *Annual Review of Food Science and Technology*, 16.
- Mu, D., Wu, G. L., Liu, Z. K., Tao, Y., Zhou, L. Z., Xu, W. W., & Wang, J. Q. (2014). Analysis of volatile compounds of fresh tea leaves from Yaoluoping Nature Preserve by SDE-GC-MS (in Chinese). *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 37, 811–815.
- Muthumani, T., & Kumar, R. S. (2007). Influence of fermentation time on the development of compounds responsible for quality in black tea. *Food Chemistry*, 101(1), 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.008>
- Naithani, V., & Kakkar, P. (2005). Evaluation of heavy metals in Indian herbal teas. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75(1), 197–203. <https://doi.org/10.1007/s00128-005-0738-4>
- Nas, S., & Öksüz, M. (1987). Siyah çayda kalite. *Gıda*, 12(3).
- Nasir, S., Mohammed, A., & Debela, A. (2015). Influence of clone and duration of withering on quality of black tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz) at Wush Wush, south western Ethiopia. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences*, 3(5).

- Ntezimana, B., Li, Y., He, C., Yu, X., Zhou, J., Chen, Y., & Ni, D. (2021). Different withering times affect sensory qualities, chemical components, and nutritional characteristics of black tea. *Foods*, 10(11), 2627. <https://doi.org/10.3390/foods10112627>
- Obanda, M., Owuor, P. O., Mang'oka, R., & Kavoi, M. M. (2004). Changes in thearubigin fractions and theaflavin levels due to variations in processing conditions and their influence on black tea liquor brightness and total colour. *Food Chemistry*, 85(2), 163–173. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00183-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00183-8)
- Obanda, M., Owuor, P. O., & Mang'oka, R. (2001). Changes in the chemical and sensory quality parameters of black tea due to variations of fermentation time and temperature. *Food Chemistry*, 75, 395–404.
- Ölmez, H., & Yilmaz, A. (2010). Changes in chemical constituents and polyphenol oxidase activity of tea leaves with shoot maturity and cold storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34, 653–665.
- Omiadze, N. T., Mchedlishvili, N. I., Rodriguez-Lopez, J. N., Abutidze, M. O., Sadunishvili, T. A., & Pruidze, N. G. (2014). Biochemical processes at the stage of withering during black tea production. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 50(4), 394–397. <https://doi.org/10.1134/S0003683814040103>
- Onat, T., Emerk, K., & Sözmen, E. (2002). *İnsan biyokimyası*. Palme Yayıncılık. ISBN 975-8624-20-2
- Ono, E., Handa, T., Koeduka, T., Toyonaga, H., Tawfik, M. M., Shiraishi, A., & Matsui, K. (2016). CYP74B24 is the 13-hydroperoxide lyase involved in biosynthesis of green leaf volatiles in tea (*Camellia sinensis*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 98, 112–118.
- Owuor, P. O., & Obanda, M. (1996). The impact of withering temperature on black tea quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(3), 288–292. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199603\)70:3<288::AID-JSFA482>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199603)70:3<288::AID-JSFA482>3.0.CO;2-Q)
- Owuor, P. O., & Orchard, J. E. (1991). Variations in black tea quality due to changing withering techniques in smallholder factories. *Tea*, 12(1), 32–40.
- Owuor, P. O., & Orchard, J. E. (1989). Withering. *Annual Report. Tea Research Foundation of Kenya*, 89–102.
- Owuor, P. O., & Orchard, J. E. (1992). Effects of storage time in a two-stage withering process on the quality of seedling black tea. *Food Chemistry*, 45(1), 45–49. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(92\)90011-P](https://doi.org/10.1016/0308-8146(92)90011-P)

- Özdemir, F. (1992). Farklı kıvrırma metotlarının üç sürgün dönemi çayın siyah çaya işlenmesinde uygulanma etkinliği ve üretilen siyah çayların bazı fiziksel, kimyasal ve duyusal özellikleri (Doktora Tezi). Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Palma, J. M., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I., & Luis, A. (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: Role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6–8), 521–530. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01404-3](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01404-3)
- Pearce, R. D., & Simokhin, S. P. (2022). Expansion of the catalytic repertoire of alcohol dehydrogenases in plant metabolism. *Angewandte Chemie*, 134(48). <https://doi.org/10.1002/ange.202210934>
- Peterson, J., Dwyer, J., Jacques, P., Rand, W., Prior, R., & Chui, K. (2004). Tea variety and brewing techniques influence flavonoid content of black tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(3–4), 397–405.
- Polaina, J., & MacCabe, A. P. (2007). *Industrial enzymes* (pp. 531–547). Springer. ISBN 978-1-4020-5377-1
- Qi, S., Zeng, T., Sun, L., Xu, L., & Xiao, P. (2024). Widely targeted metabolomic analysis reveals effects of yellowing process time on the flavor of vine tea (*Ampelopsis grossedentata*). <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101446>
- Qiao, D., Zhu, J., Mi, X., Xie, H., Shu, M., Chen, M., & Wei, C. (2023). Effects of withering time of fresh leaves on the formation of flavor quality of Taiping Houkui tea. *LWT*, 182, 114833.
- Qiu, F. F., Yu, Z., Ai, Z., Chen, Y., Liao, G., & Ni, D. (2014). The influence of withering temperature, humidity and wind speed on the quality of black tea. *Chin. Tea*, 11, 22–25.
- Queiroz, C., Lopes, M. L. M., Fialho, E., & Valente-Mesquita, V. L. (2008). Polyphenol oxidase: Characteristics and mechanisms of browning control. *Food Reviews International*, 24(4), 361–375. <https://doi.org/10.1080/87559120802190872>
- R Core Team. (2024). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Rani, K., Rana, R., & Datt, S. (2012). Review on latest overview of proteases. *International Journal of Current Life Sciences*, 2(1), 12–18.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597–635. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.597-635.1998>

- Ravichandran, R., & Parthiban, R. (1998). Changes in enzyme activities (polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase) with type of tea leaf and during black tea manufacture and the effect of enzyme supplementation of dhool on black tea quality. *Food Chemistry*, 62(3), 277–281.
- Rawal, H. C., Kumar, P. M., Bera, B., Singh, N. K., & Mondal, T. K. (2020). Decoding and analysis of organelle genomes of Indian tea (*Camellia assamica*) for phylogenetic confirmation. *Genomics*, 112(1), 659–668.
- Ren, G., Fan, Q., He, X., Li, W., & Tang, X. (2020). Applicability of multifunctional preprocessing device for simultaneous estimation of spreading of green tea, withering of black tea and shaking of oolong tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(2), 560–569. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10046>
- Roberts, G. R., & Sanderson, G. W. (1966). Changes undergone by free amino-acids during the manufacture of black tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 17(4), 182–188. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740170409>
- RStudio Team. (2024). RStudio: Integrated development environment for R. Posit Software, PBC. <https://posit.co/>
- Sabhapondit, S., Bhattacharyya, P., Bhuyan, L. P., Hazarika, M., & Goswami, B. C. (2014). Optimisation of withered leaf moisture during the manufacture of black tea based upon theaflavins fractions. *International Journal of Food Science and Technology*, 49(1), 205–209. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12299>
- Safi, Y. (2018). Çay atıklarından yararlanarak çay özütü miktarının artırılması (Yüksek Lisans Tezi). Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize.
- Saklı, A. R., & Abanoz, Y. (2024). Çayın anavatanı, sistematığı ve tarihi gelişimi. In K. Yazıcı (Ed.), *A'dan Z'ye Çay* (Aralık 2024). Ankara, Türkiye.
- Salleh, A. S., Zaliha, R. J., Rahman, R. A., & Basri, M. (2006). *New lipases and proteases*. Nova Science Publishers. ISBN 1600210686
- Sanderson, G. W., & Selvendran, R. R. (1965). The organic acids in tea plants: A study of the non-volatile organic acids separated on silica gel. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 16, 251–258. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740160504>
- Sanderson, G. W., & Roberts, G. R. (1964). Peptidase activity in shoot tips of the tea plant (*Camellia sinensis*). *Biochemical Journal*, 93(2), 419. <https://doi.org/10.1042/bj0930419>
- Sang, S., Lambert, J. D., Ho, C.-T., & Yang, C. S. (2011). The chemistry and biotransformation of tea constituents. *Pharmacological Research*, 64(2), 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.02.007>

- Sathyanathan, R., Palanisamy, C. P., Gandhi, S., AKA, M., Padmanabhan, M., Perisamy, S. K., & Kanniappan, G. V. (2015). Biochemical analysis on crop shoots of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze tea from the selected UPASI-16 clone. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*, 2(1), 40–48.
- Sekiya, J., Kajiwar, T., & Hatanaka, A. (1984). Seasonal changes in activities of enzymes responsible for the formation of C6-aldehydes and C6-alcohols in tea leaves, and the effects of environmental temperatures on the enzyme activities. *Plant and Cell Physiology*, 25, 269–280.
- Singh, D., Samantal, T., Das, S., Ghoshl, A. K., Mitra, A., & Ghosh, B. C. (2012). Development of a customized trough to study withering of tea leaves. *Two and a Bud*, 59(2), 143–147.
- Sluijsmans, C. M. J., Van Dijk, T. A., Kolenbrander, C. J., De la Lande Cremer, L. C. N., Smilde, K. W., & Werkhoven, C. H. E. (1978). The spreading of animal excrement on utilized agricultural areas of the community. I. Scientific bases for the limitation of quantities and criteria for rules thereon. *Information on Agriculture*, 47, July 1978. ISBN 92-825-0500-6
- Soheili-Fard, F., Ghassemzadeh, H. R., & Salvatian, S. B. (2015). Impact of withering process on sensory properties of black tea. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 6(5), 42–48.
- Sud, R. G., & Baru, A. (2000). Seasonal variations in theaflavins, thearubigins, total colour and brightness of Kangra orthodox tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) in Himachal Pradesh. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1291–1299.
- Sullivan, M. L. (2015). Beyond brown: Polyphenol oxidases as enzymes of plant specialized metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 5, 783. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00783>
- Takeo, T. (1966). Tea leaf polyphenol oxidase: Part III. Studies on the changes of polyphenol oxidase activity during black tea manufacture. *Agricultural and Biological Chemistry*, 30(6), 529–535. <https://doi.org/10.1080/00021369.1966.10858642>
- Takeo, T., & Baker, J. E. (1973). Changes in multiple forms of polyphenol oxidase during maturation of tea leaves. *Physicochemistry*, 12, 21–24.
- Tanaka, T., & Kouno, I. (2003). Oxidation of tea catechins: Chemical structures and reaction mechanism. *Food Science and Technology Research*, 9, 128–133.
- Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü. (2024). Tarım ürünleri piyasaları: Çay raporu. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge> (Erişim tarihi: 2 Eylül 2025)

- Tatar, S., Obek, E., Arslan Topal, E. I., & Topal, M. (2019). Uptake of some elements with aquatic plants exposed to the effluent of wastewater treatment plant. *Pollution*, 5(2), 377–386. <https://doi.org/10.22059/poll.2019.269722.542>
- Temizkan, G., Yilmazer, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Ertan, H., Topal Sarıkaya, A., & Arda, N. (2008). *Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler* (G. Temizkan & N. Arda, Eds.). Nobel Yayınevi. ISBN 9789754205831
- Tesnière, C., & Verriès, C. (2001). Alcohol dehydrogenase: A molecular marker in grapevine (pp. 203–223). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2308-4_8
- Thanaraj, S. N. S., & Seshadri, R. (1990). Influence of polyphenol oxidase activity and polyphenol content of tea shoot on quality of black tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 51(1), 57–69. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740510107>
- Tomlins, K. I., & Mashigaidze, A. (1997). Influence of withering, including leaf handling, on the manufacturing and quality of black teas—a review. *Food Chemistry*, 60(4), 573–580. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00035-6)
- Too, J. C., Kinyanjui, T., Wanyoko, J. K., & Wachira, F. N. (2015). Effect of sunlight exposure and different withering durations on theanine levels in tea (*Camellia sinensis*). *Food and Nutrition Sciences*, 6(11), 1014. <https://doi.org/10.4236/fns.2015.611105>
- Tran, L. T., Taylor, J. S., & Constabel, C. P. (2012). The polyphenol oxidase gene family in land plants: Lineage-specific duplication and expansion. *BMC Genomics*, 13(1), 395. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-395>
- Turkmen, N., Sarı, F., & Velioglu, Y. S. (2009). Factors affecting polyphenol content and composition of fresh and processed tea leaves. *Akademik Gıda*, 7(6), 29–40.
- Türkhan, A., Faiz, Ö., Kaya, E., & Koçyiğit, A. (2018). Immobilization of polyphenol oxidase enzyme on new matrix antimony doped tin oxide (SnO₂: Sb) thin film. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(7).
- Uçkaya, F. (2015). *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Portakal) ve *Citrus limon* (L.) Burm.F. (Limon) çiçeklerinden proteaz ve peroksidaz enzimlerinin saflaştırılması ve endüstride kullanımlarının araştırılması (Doktora Tezi). Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Muğla.
- Ullah, M. R., & Roy, P. C. (1982). Effect of withering on the polyphenol oxidase level in the tea leaf. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33(5), 492–495. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740330515>
- Ullah, M. R., Gogoi, N., & Baruah, D. (1984). The effect of withering on fermentation of tea leaf and development of liquor characters of black teas. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35(10), 1142–1147.

- URL-1. (2022). Çay çalıştayı kitapçığı. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi. <http://cayihtisas.erdogan.edu.tr/Files/ckFiles/cayihtisas-erdogan-edu-tr/%C3%87AY%20%C3%87ALI%C5%9ETAYI%20K%C4%B0TAP%C3%87I%C4%9EI.pdf> (Erişim tarihi: 4 Ağustos 2025)
- Uzun, E. (2013). *Camellia sinensis* var. *sinensis* (L.) Kuntze (Theaceae)'de yükseklik gradiyenti boyunca makroelement değişimi ve rezorbsiyonu (Yüksek Lisans Tezi). Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize.
- Verloop, A. J. W., Vincken, J.-P., & Gruppen, H. (2016). Peroxidase can perform the hydroxylation step in the “oxidative cascade” during oxidation of tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(42), 8002–8009. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03029>
- Wachira, F. N., Kamunya, S. M., Karori, S. M., Chalo, R. M., & Maritim, T. (2013). The tea plants: Botanical aspects (pp. 3–17). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384937-3.00001-X>
- Wang, D., Kurasawa, E., Yamaguchi, Y., Kubota, K., & Kobayashi, A. (2001). Analysis of glycosidically bound aroma precursors in tea leaves. 2. Changes in glycoside contents and glycosidase activities in tea leaves during the black tea manufacturing process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1900–1903.
- Wang, K., Chen, Q., Lin, Y., Li, S., Lin, H., Huang, J., & Zhonghua, L. (2014). Comparison of phenolic compounds and taste of Chinese black tea. *Food Science and Technology Research*, 20(3), 639–646. <https://doi.org/10.3136/fstr.20.639>
- Wang, Y., Zheng, P. C., Liu, P. P., Song, X. W., Guo, F., Li, Y. Y., ... & Jiang, C. J. (2019). Novel insight into the role of withering process in characteristic flavor formation of teas using transcriptome analysis and metabolite profiling. *Food Chemistry*, 272, 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.013>
- Ward, O. P. (1985). Proteolytic enzymes. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive biotechnology* (1st ed., pp. 789–818). Pergamon Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00187-7>
- Weisburger, J. H. (1997). Tea and health: A historical perspective. *Cancer Letters*, 114(1–2), 315–317. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)04691-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(97)04691-0)
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant graphics for data analysis*. Springer. <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Wickham, H., & Bryan, J. (2023). *readxl: Read Excel files (R package version 1.4.3)*. <https://CRAN.R-project.org/package=readxl>

- Wickham, H., François, R., Henry, L., & Müller, K. (2023). dplyr: A grammar of data manipulation (R package version 1.1.4). <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>
- Wu, H., Sheng, C., Lu, M., Ke, H., Li, T., Wei, Y., & Ning, J. (2024). Identification of the causes of aroma differences in white tea under different withering methods by targeted metabolomics. *Food Bioscience*, 59, 104020.
- Wu, H., Huang, W., Chen, Z., Chen, Z., Shi, J., Kong, Q., Sun, S., Jiang, X., Chen, D., & Yan, S. (2019). GC–MS-based metabolomic study reveals dynamic changes of chemical compositions during black tea processing. *Food Research International*, 120, 330–338.
- Wu, Z.-J., Ma, H.-Y., & Zhuang, J. (2018). iTRAQ-based proteomics monitors the withering dynamics in postharvest leaves of tea plant (*Camellia sinensis*). *Molecular Genetics and Genomics*, 293(1), 45–59. <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1362-9>
- Yabacı, S. N. (2008). Çay bitkisi polifenol oksidaz enziminin saflaştırılması ve bazı özelliklerinin belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi). Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Yamamoto, T., Juneja, L. R., Chu, D. C., & Kim, M. (1997). Chemistry and applications of green tea. CRC Press. ISBN 0-8493-4006-3
- Yang, Z., Baldermann, S., & Watanabe, N. (2013). Recent studies of the volatile compounds in tea. *Food Research International*, 53(2), 585–599. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.011>
- Yang, C., Hu, Z., Lu, M., Li, P., Tan, J., Chen, M., Lv, H., Zhu, Y., Zhang, Y., Guo, L., Peng, Q., Dai, W., & Lin, Z. (2018). Application of metabolomics profiling in the analysis of metabolites and taste quality in different subtypes of white tea. *Food Research International*, 106, 909–919. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.069>
- Yang, Z.-W., Duan, X.-N., Jin, S., Li, X.-W., Chen, Z.-M., Ren, B.-Z., & Sun, X.-L. (2013). Regurgitant derived from the tea geometrid *Ectropis obliqua* suppresses wound-induced polyphenol oxidases activity in tea plants. *Journal of Chemical Ecology*, 39(6), 744–751. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0296-x>
- Yao, L., Liu, X., Jiang, Y., Caffin, N., D’Arcy, B., Singanusong, R., ... & Xu, Y. (2006). Compositional analysis of teas from Australian supermarkets. *Food Chemistry*, 94(1), 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.009>
- Yazıcı, K. (2021). Tea agriculture in Turkey. In M. Pakyürek (Ed.), *Current studies on fruit science* (pp. 1–284). Iksad Publications, Ankara. ISBN: 978-625-8423-25-9

- Yazıcı, S. Ö. (2012). *Gypsophila pilulifera* Boiss. türünden elde edilen ekstraktların saflaştırılmış alkalen proteaz ve DNA hasarı üzerine etkileri ile antioksidan kapasitelerinin araştırılması (Doktora Tezi). Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.
- Ye, J., Luo, Y., Wang, Y., Zhang, Q., Zhang, S., Gu, J., & Wang, H. (2024). Withering and fermentation affect the transformation and accumulation of key metabolites in Rougui (*Camellia sinensis*) for the formation of special taste characteristics. *Foods*, 13(23), 3955.
- Ye, Y., Dong, C., Luo, F., Cui, J., Liao, X., Lu, A., ... & Tong, H. (2020). Effects of withering on the main physical properties of withered tea leaves and the sensory quality of Congou black tea. *Journal of Texture Studies*, 51(3), 542–553. <https://doi.org/10.1111/jtxs.12498>
- Ye, Y., Yan, J., Cui, J., Mao, S., Li, M., Liao, X., & Tong, H. (2018). Dynamic changes in amino acids, catechins, caffeine and gallic acid in green tea during withering. *Journal of Food Composition and Analysis*, 66, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.008>
- Yılmaz, L., & Elmacı, Y. (2018). Polyphenol oxidase enzyme and inactivation methods. *Turkish Journal of Agriculture: Food Science and Technology*, 6(3), 333–345. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v6i3.333-345.1727>
- Yin, J., Xu, Y., Yuan, H., Yu, S., Wei, K., Chen, J., et al. (2009). Dynamic change of main biochemical components of premium green tea fresh leaves during spreading. *Journal of Tea Science*, 29(2), 102–110.
- Yoruk, R., & Marshall, M. R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *Journal of Food Biochemistry*, 27(5), 361–422. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2003.tb00289.x>
- You, F. N., Chen, S. S., Zhou, Z. W., Li, X. L., Hao, Z. L., & Sun, Y. (2018). Effect of flavor components on different illumination time during withering process in Tieguanyin tea. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 39(09), 1856–1862.
- Yu, X. (2020). Effects of different withering methods on components metabolism related to color, aroma and taste quality in green tea (PhD Thesis). Huazhong Agricultural University.
- Yu, X., Li, Y., He, C., Zhou, J., Chen, Y., Yu, Z., Wang, P., & Ni, D. (2020a). Nonvolatile metabolism in postharvest tea (*Camellia sinensis* L.) leaves: Effects of different withering treatments on nonvolatile metabolites, gene expression levels, and enzyme activity. *Food Chemistry*, 327, 126992. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126992>
- Yu, X., Hu, S., He, C., Zhou, J., Qu, F., Ai, Z., Chen, Y., & Ni, D. (2019). Chlorophyll metabolism in postharvest tea (*Camellia sinensis* L.) leaves: Variations in color

- values, chlorophyll derivatives, and gene expression levels under different withering treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 10624–10636.
- Yu, Z., & Yang, Z. (2020b). Understanding different regulatory mechanisms of proteinaceous and non-proteinaceous amino acid formation in tea (*Camellia sinensis*) provides new insights into the safe and effective alteration of tea flavor and function. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(5), 844–858. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1552245>
- Yuan, C., Yan, L., Li, Q., Jin, R., & Ren, L. (2018). Purification of tea saponins and evaluation of its effect on alcohol dehydrogenase activity. *Central European Journal of Biology*, 13(1), 56–63. <https://doi.org/10.1515/biol-2018-0008>
- Zeng, J., Li, Y., Li, F., & Zhou, S. (2024). Comparison of the activity of theaflavins produced by recombinant polyphenol oxidase and commercial enzyme. *Synlett*. <https://doi.org/10.1055/a-2456-9862>
- Zeng, L., Watanabe, N., & Yang, Z. (2019). Understanding the biosyntheses and stress response mechanisms of aroma compounds in tea (*Camellia sinensis*) to safely and effectively improve tea aroma. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(14), 2321–2334. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1506907>
- Zeng, L., Zhou, Y., Fu, X., Mei, X., Cheng, S., Gui, J., et al. (2017). Does oolong tea (*Camellia sinensis*) made from a combination of leaf and stem smell more aromatic than leaf-only tea? Contribution of the stem to oolong tea aroma. *Food Chemistry*, 237, 488–498.
- Zhang, G., Yang, J., Dandan, C., Dandan, Z., Li, Y., Wan, X., & Zhao, J. (2020). Transcriptome and metabolic profiling unveiled roles of peroxidases in theaflavin production in black tea processing and determination of tea processing suitability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(11), 3528–3538. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07737>
- Zhang, L., Ho, C.-T., Zhou, J., Santos, J. S., Armstrong, L., & Granato, D. (2019). Chemistry and biological activities of processed *Camellia sinensis* teas: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(5), 1474–1495. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12479>
- Zhang, S. (2023). Recent advances of polyphenol oxidases in plants. *Molecules*, 28(5), 2158. <https://doi.org/10.3390/molecules28052158>
- Zheng, X. Q., Li, Q. S., Xiang, L. P., & Liang, Y. R. (2016). Recent advances in volatiles of teas. *Molecules*, 21, 338.
- Zhou, J., Yu, X., He, C., Qiu, A., Li, Y., Shu, Q., & Ni, D. (2020a). Withering degree affects flavor and biological activity of black tea: A non-targeted metabolomics approach. *LWT*, 130, 109535. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109535>

Zhou, Z., Wu, Q., Yao, Z.-L., Deng, H., Liu, B., Yue, C., Deng, T., Lai, Z., & Sun, Y. (2020b). Dynamics of ADH and related genes responsible for the transformation of C6-aldehydes to C6-alcohols during the postharvest process of oolong tea. *Food Science and Nutrition*, 8(1), 104–113. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1272>

Zohora, K. F. T., & Arefin, M. R. (2022). Tea and tea product diversification: A review. *Turkish Journal of Agriculture: Food Science and Technology*, 10(12), 2334–2353. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v10i12.2334-2353.5280>

