

T.C. ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
KESİN RAPORU

**Ekstraksiyon Koşullarının Siyah Çayda ve
Mate Çayında Polifenol, Antioksidan ve
Antimikrobiyal Aktivite Üzerine Etkileri**

Prof. Dr. Sedat VELİOĞLU

Proje Numarası: 2005-0745-004-HPD

Başlama Tarihi: Nisan 2005

Bitiş Tarihi: Nisan 2006

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri

Ankara-“2006”

SİMGELER DİZİNİ.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	iv
1. PROJENİN TÜRKÇE VE İNGİLİZCE ADI ve ÖZETLERİ.....	1
2. AMAÇ VE KAPSAM.....	2
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	3
3.1. Materyal.....	3
3.2. Yöntem.....	3
3.2.1. Örnek Hazırlama ve polifenol ekstraksiyonu.....	3
3.2.2. Toplam Polifenol Tayini	4
3.2.3. DPPH radikal assay yöntemiyle antioksidan aktivite tayini.....	4
3.2.4. İndirgeme gücü (R _p) yöntemiyle antioksidan aktivite tayini.....	4
3.2.5. Antibakteriyel aktivite tayini.....	5
3.2.6. İstatistik Analiz.....	5
4. ANALİZ ve BULGULAR.....	6
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	11
5.1. Çay örneklerinin toplam polifenol miktarı.....	11
5.2. Çay örneklerinin antioksidan aktivitesi.....	12
5.2.1. İndirgeme gücü.....	12
5.2.2. Radikal tutma kapasitesi.....	14
5.3. Çay örneklerinin antibakteriyel aktivitesi.....	15
6. KAYNAKLAR.....	17

Q3G	Kuersetin-3-glukozid
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
K3RG	Kamferol-3-rutinosid
C	(+)-Kateşin
EC	(-)- Epikateşin
GC	(-)- Gallokateşin
EGC	(-)- Epigallokateşin
EGCG	(-)- Epigallokateşin gallat
EGC	(-)- Epikateşin gallat
Q3RG	Rutin
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
TF	Teaflavin
TF-f	Serbest teaflavin
TF-3-G	Teaflavin-3-gallat
TF-3'-G	Teaflavin-3'-gallat
TF-3,3'-DG	Teaflavin-3,3'-digallat
A	Absorbans

Tablo 1. Farklı solvent ve ekstraksiyon sürelerinin siyah çayın toplam polifenol ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi.....	7
Tablo 2. Farklı solvent ve ekstraksiyon sürelerinin mate çayının toplam polifenol ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi.....	8
Tablo 3. Student's t-testi ile, siyah ve mate çayının polifenol içeriği ve iki farklı yöntemle (R _p and DPPH) tayin edilen antioksidan aktivite açısından karşılaştırılması.....	9
Tablo 4. Çayların toplam polifenol ve antioksidan aktiviteleri üzerine solvent çeşidi, ekstraksiyon süresi ve bunların etkileşiminin etkisine ilişkin varyans analizi sonuçları.....	9
Tablo 5. Mate ve siyah çaya ait farklı ekstraktların disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antibakteriyel aktivite sonuçları.....	10

Ekstraksiyon Koşullarının Siyah Çayda ve Mate Çayında Polifenol, Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivite Üzerine Etkileri

The effect of extraction conditions on total polyphenol, antioxidant and antimicrobial activities of black and mate tea

ÖZET

Siyah çay ve mate çayı saf aseton, DMF, etanol, metanol ve bunların %50'lik çözeltileri ile 2, 8 ve 18 saat süre ile ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ham ekstraktlar polifenol içeriği, antioksidan ve antibakteriyel aktivite açısından incelenmiştir. Çay çeşidi ayrımı olmaksızın, bütün ekstraktlar içinde %50 sulu solvent ekstraktları daha fazla polifenol içermiştir ve daha fazla antioksidan aktivite göstermiştir. Her iki çaydan elde edilen sulu aseton ve DMF ekstraktlarının polifenol içeriği bu amaçla halen en yaygın şekilde kullanılan etanol ve metanol solventlerinden daha fazla bulunmuştur. Sulu solvent ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri birbirine yakın düzeyde olup, ekstraktların polifenol konsantrasyonu ile yüksek korelasyon göstermişlerdir. Çayların sulu solvent ekstraktları, kullanılan solvante ve test edilen bakteriye bağlı olarak antibakteriyel aktivite göstermiştir. Test bakterilerine karşı Mate ekstraktları siyah çay ekstraktlarından daha kuvvetli antibakteriyel aktivite göstermiştir. Her iki çaydan elde edilen ekstraktlara karşı en hassas bakterinin *S. aureus* olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Siyah çay, mate, ekstraksiyon, solvent, antioksidan, polifenol, antibakteriyel

ABSTRACT

Black and mate tea were extracted with 8 different solvents of different polarities at 2, 8 and 18h. The crude extracts were screened for polyphenol content, antibacterial and antioxidant activity. In all extracts, regardless of tea type, 50% aqueous solvent extracts had markedly higher polyphenol content and antioxidant activity determined by DPPH radical and reducing power compared to absolute ones. For both black and mate tea, aqueous acetone extracts at 2 h of extraction gave the highest amount of polyphenol, while at 8 h and 18 h aqueous DMF

was found to be the most efficient solvent. Among absolute solvent extracts the order of polyphenol content at all times was DMF>methanol>acetone=ethanol for both teas. At 2, 8 and 18 h of extraction antioxidant activities of aqueous solvent extracts of teas were found to be close to each other. But with respect to absolute solvent extracts, the highest and the least activities were obtained with DMF and acetone, respectively. With both two antioxidant assays, antioxidant activities of teas were correlated with their polyphenol concentration at all 3 different extraction times. Aqueous solvent extracts of teas were also found to possess antibacterial activity depending on the solvent used and bacterium tested. Mate tea extracts exhibited stronger activity against test bacteria than those of black tea. *S. aureus* was found to be the most sensitive to all extracts from both teas.

Key words: Black tea, mate, extraction, solvent, antioxidant, polyphenol, antibacterial

2. AMAÇ ve KAPSAM

Sağlık etkileri açısından beslenmede önemli bir yer tutan çayın en önemli bileşenlerinden olan polifenollerin ekstraksiyonunda hangi ekstraksiyon koşullarının (solvent tipi, süre gibi) daha etkili olduğu konusunda bir belirsizlik söz konusudur. Siyah ve mate çayının az bilinen antioksidan ve antibakteriyel aktivitesini daha doğru olarak belirleyebilmek için öncelikle uygun bir ekstraksiyon gerekmektedir. Bu araştırma ile ekstraksiyon koşullarının toplam polifenol içeriği, antioksidan ve antibakteriyel aktivite üzerine etkisi saptanacağından mevcut belirsizlik incelenen parametreler ölçüsünde biraz daha giderilmiş olacaktır.

Polifenollerin antioksidan aktivitesi serbest radikalleri bağlama kapasitesi veya demiri indirgeme gücüne dayanmaktadır (Yoshino ve Murakami, 1998; Pulido et al., 2000). Polifenollerin antioksidan aktivitesini belirlemek amacıyla polifenollerin serbest radikal tutma özelliğine dayanan “DPPH yöntemi” çay dahil birçok bitki için yaygın olarak kullanılırken, çay polifenollerinin demiri indirgeme gücüne dayanan “indirgeme gücü” yönteminin kullanıldığı çalışmalar çok sınırlıdır. Diğer taraftan bu özelliğin polifenollerin mikroorganizma gelişimini engelleme yollarından biri olduğu düşünülmektedir (Mila et al. 1996; Chung et al. 1998). Bu çalışmada her iki yöntem birlikte kullanılmış ve böylece hem yöntemler arasındaki, hem de her bir yöntem ile polifenoller arasındaki ilişkinin belirlenmesi

amaçlanmıştır. Mevcut koşullarda antioksidan ile antibakteriyel aktivite arasında bir ilişki olup olmadığı da bu araştırma ile saptanmış olacaktır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Proje materyali olarak Ankara'daki bir marketten temin edilen siyah çay (*Camellia sinensis* L.) ile Sidney-Avustralya'dan temin edilen siyah mate çayı (*Ilex paraguarensis*) örnekleri kullanılmıştır.

Polifenol ekstraksiyonu için kullanılan metanol, etanol ve N,N-dimetilformamid (DMF) analitik ya da HPLC saflıkta olup Fluka (BioChemica-Fluka Cheme GmbH Buchs-Switzerland)'dan, aseton (analitik saflıkta) Aldrich (St. Louis, MO, USA)'den satın alınmıştır. Toplam polifenol analizinde kullanılan *Folin-Ciocalteu's reagent* Merck (Darmstadt-Germany)'den, antioksidan analizlerinden kullanılan 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ve triklorasetik asit (TCA) Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA)'den satın alınmıştır. Kullanılan diğer kimyasallar analitik saflıkta olup Merck (Germany) satın alınmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örnek hazırlama ve polifenol ekstraksiyonu

Çay örnekleri, laboratuvar tipi diskli değirmende öğütüldükten sonra gözenek aralığı 0.710 mm olan elekten geçirilmiş ve analizlerde kullanılmaya kadar + 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Polifenol ekstraksiyonu için, 0.2 g öğütülmüş çay örneği 10 ml ekstraksiyon solventi (aseton, etanol, metanol, DMF ve bunların %50'lik çözeltileri) ile mekanik çalkalayıcıda 2, 8 ve 18 saat süresince oda sıcaklığında ekstrakte edilmiştir. Sürenin bitiminde örnekler katı partikülleri uzaklaştırmak için Whatman No:1 filtre kağıdından filtre edilmiş ve filtrat 10.000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen berrak ekstraktlar -18 °C'de analiz edilinceye kadar muhafaza edilmiştir. Her bir solvent ekstraksiyonu 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Toplam Polifenol Tayini

Toplam polifenol miktarı tayini spektrofotometrik Folin-Ciocalteu yöntemine göre (Obanda ve Owuor, 1997) yapılmıştır. Bu analiz için standart gallik asit çözeltisinin 0.005-0.05 mg/ml aralığındaki 9 farklı konsantrasyonu ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir ($R^2=0.99$). Elde edilen eğrinin regresyon eşitliğinden yararlanılarak, ekstraktların fenolik madde miktarı hesaplanmış ve sonuçlar *mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g* olarak verilmiştir.

Bu yöntemde 10-75 kez seyreltilmiş 1 ml çay ekstraktı 1 ml (3 kez su ile seyreltilmiş) Folin-Ciocalteu reagent ile karıştırılmıştır. 5 dakika sonra bu karışıma 2 ml (% 35'lik) doygun sodyum karbonat çözeltisi ilave edilerek iyice karıştırılmış ve 2 ml su ile 6 ml'ye seyreltilmiştir. Elde edilen karışım 30 dakika karanlıkta bekletildikten sonra oluşan mavi rengin absorbansı spektrofotometrede 700 nm'de okunmuştur.

3.2.3. DPPH radikal assay yöntemiyle antioksidan aktivite tayini

Çay örneklerinin antioksidan aktivitesi, DPPH assay (Katalinić et. al., 2004; Atoui, 2005) kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla 15 kez saf su ile seyreltilmiş çay ekstraktından otomatik pipet yardımıyla 80 µl alınarak 1185 µl 6×10^{-5} molar DPPH radikali (metanolde hazırlanmış) ile karıştırılmıştır. Kontrol olarak saf su kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı vorteks karıştırıcıda karıştırılıp oda sıcaklığında 60 dakika süreyle karanlıkta bekletilmiştir. Sürenin bitiminde karışımın absorbansı spektrofotometrede 517 nm'de kör olarak metanole karşı absorbansı okunmuştur. Antioksidan aktivite DPPH radikalının % engellenmesi (% I) olarak, aşağıdaki eşitlikten (Yen ve Duh, 1994) yararlanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Engelleme (I)} = \frac{Abs_{control} - Abs_{sample}}{Abs_{control}} \times 100$$

3.2.4. İndirgeme gücü (R_p) yöntemiyle antioksidan aktivite tayini

Çay ekstraktlarının indirgeme gücü Yuan et. al., (2005) tarafından önerilen yöntemle belirlenmiştir. Buna göre 0.5 ml çay ekstraktı 1.25 ml fosfat buffer (0.2 M, pH 6.6) ve 1.25

potasyum ferrisiyanür (% 1) ile karıştırılmıştır. Karışım 50 °C'de su banyosunda 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra örnekler soğutulmuş ve 1.25 ml triklorasetikasit (TCA, % 10) ile karıştırılmıştır. Karışımdan 1.25 ml alınarak, 1.25 ml saf su ve 0.25 ml demirklorür (% 0.1) ile karıştırılmıştır. Daha sonra, reaksiyonun tamamlanması için oda sıcaklığında 10 dakika bekletilmiştir. Sürenin bitiminde spektrofotometrede 700 nm'de absorbansı (A) okunmuştur. Absorbanstaki artış indirgeme gücündeki artışı göstermiştir.

3.2.5. Antibakteriyel aktivite tayini

Çay ekstraktının antibakteriyel aktivitesini belirlemek amacıyla test bakterileri olarak *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644, Oxoid, UK), *E. coli* O157:H7, *Hafnia alvei*, *Yersinia enterocolitica* 0:3 ve *Bacillus cereus* kullanılmıştır. *Y. enterocolitica* Tyriptic Soy Broth (Merck, Germany) ortamında 30 °C'de 18-24 saat geliştirilmiştir. Diğer bakteriler ise aynı ortamda 37 °C'de 18-24 saat süre ile geliştirilmiştir. Test organizmaları Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ndeki kültür koleksiyonundan alınmıştır.

Antibakteriyel aktivite, disk difüzyon yöntemi (Bauer, et. al., 1966) ile belirlenmiştir. Bu yöntemle göre 6 mm çapında sterilize bir disk (Oxoid, Basinstoke, UK) 200 µl çay ekstraktı ile yüklenmiş ve steril laminar hava akımlı kabin (Forma Scientific) içinde steril petri kutusunda kurumaya bırakılmıştır. Test bakterisi Nutrient Agar (Merck, Germany) içeren 9 cm çapındaki bir petri kutusuna steril bir pamuk swab yardımıyla aktarılmıştır ve ince bir film halinde tüm besiyeri yüzeyine yayılmıştır. Bakteriyel gelişmenin inhibisyonu (engellenmesi) her bir disk çevresinde oluşan şeffaf inhibisyon, zonun çapının ölçülmesiyle değerlendirilmiştir. Kontrol disk olarak sadece ekstraksiyon solventi ile yukarıda açıklandığı gibi muamele edilmiş disk kullanılmıştır.

3.2.6. İstatistik Analiz

İstatistik analizler SPSS programı (10.1 versiyonu) ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar 3 tekrarlı ölçümlerin ortalaması \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. Tek yönlü ve iki yönlü olarak varyans analizleri yapılmıştır. Ortalamalar arasındaki önemli farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırmalı testi ile belirlenmiştir. Değişkenler arasında (örneğin siyah çayın toplam

polifenol ile mate çayının toplam polifenol, siyah çayın indirgeme gücü ile mate çayının indirgeme gücü) istatistiki karşılaştırmalar Student's t-testi ile gerçekleştirilmiştir. Farklılıkların $p < 0.05$ seviyesinde önemli olduğu düşünülmüştür. Değişkenler arasında korelasyonlar regresyon analizi (Sokal ve Rohlf, 1995) ile gerçekleştirilmiştir.

4. ANALİZ ve BULGULAR

Araştırma kapsamında siyah çayda ve mate çayında farklı solventlerle farklı sürelerde yapılan ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstraktlarda gerçekleştirilen toplam polifenol ve antioksidan aktivite analizlerinin sonucu Tablo 1 ve Tablo 2'de gösterilmiştir. Siyah ve mate çayı ekstraktının polifenol içeriği ve antioksidan aktivite açısından karşılaştırılması amacıyla yapılan Student's t-testi sonucu Tablo 3'de verilmiştir. Siyah ve mate çayından polifenollerin ekstraksiyonu için kullanılan solventin çeşidi, uygulanan ekstraksiyon süresinin ve bunların birlikte etkileşiminin ekstraktların polifenol miktarına ve antioksidan aktivitelerine etkisini belirlemek amacıyla iki yönlü varyans analizi yapılmış ve bunun sonucu Tablo 4'de gösterilmiştir. Siyah ve mate çayının sulu solvent ekstraktlarının antibakteriyel aktiviteleri belirlenmiş ve buna ilişkin sonuçlar Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 1. Farklı solvent ve ekstraksiyon sürelerinin siyah çayın toplam polifenol ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi^a

Parametre	Ekstr. süresi (h)	Ekstraksiyon solventi							
		50% Aseton		50% DMF		50% Etanol		50% Metanol	
		aseton	Aseton	DMF	DMF	etanol	Etanol	metanol	Metanol
Toplam polifenol (mg GAE/ g)	2	114.01±1.13 ^{cG}	0.44±0.04 ^{aA}	95.60±0.42 ^{aF}	18.57±0.08 ^{aC}	74.35±0.16 ^{aE}	0.48±0.06 ^{aA}	58.38±1.42 ^{aD}	8.58±0.62 ^{aB}
	8	92.76±0.97 ^{aF}	1.43±0.04 ^{bA}	104.96±1.43 ^{bG}	44.14±0.93 ^{bC}	85.37±0.64 ^{bE}	1.87±0.15 ^{bA}	62.87±1.87 ^{aD}	22.82±1.10 ^{bB}
	18	98.19±1.10 ^{bF}	1.62±0.04 ^{cA}	109.36±0.71 ^{cG}	49.10±1.97 ^{cC}	86.31±3.50 ^{bE}	2.13±0.13 ^{bA}	68.69±1.34 ^{bD}	23.14±0.70 ^{bB}
Antioksidan aktivite									
İndirgeme gücü (A)	2	1.16±0.06 ^{aF}	0.09±0.00 ^{aA}	1.11±0.01 ^{aF}	0.34±0.00 ^{aC}	0.87±0.00 ^{aE}	0.10±0.00 ^{aA}	0.67±0.01 ^{aD}	0.22±0.00 ^{aB}
	8	1.08±0.01 ^{aG}	0.11±0.00 ^{bA}	1.16±0.01 ^{bH}	0.59±0.00 ^{bD}	0.94±0.00 ^{cF}	0.13±0.00 ^{cB}	0.76±0.00 ^{cE}	0.39±0.01 ^{bC}
	18	1.04±0.02 ^{aF}	0.11±0.00 ^{bA}	1.18±0.00 ^{cG}	0.62±0.00 ^{cC}	0.89±0.00 ^{bE}	0.12±0.00 ^{bA}	0.74±0.00 ^{bD}	0.38±0.00 ^{bB}
Radikal tutma kapasitesi (% I)	2	95.42±0.33 ^{cG}	2.60±0.18 ^{aA}	93.73±0.46 ^{bF}	46.72±0.63 ^{aD}	94.36±0.22 ^{bFG}	4.99±0.13 ^{aB}	85.81±0.63 ^{aE}	25.04±0.75 ^{aC}
	8	93.75±0.06 ^{aG}	3.05±0.20 ^{aA}	92.06±0.16 ^{aF}	78.30±0.25 ^{bD}	93.24±0.11 ^{aG}	5.86±0.07 ^{bB}	90.99±0.68 ^{bE}	52.28±0.51 ^{bC}
	18	94.67±0.13 ^{bE}	2.65±0.15 ^{aA}	94.60±0.24 ^{bE}	83.20±1.76 ^{cD}	94.87±0.13 ^{bE}	6.31±0.12 ^{cB}	92.85±0.07 ^{cE}	54.20±0.30 ^{bC}

^a: Aynı sütundaki farklı harfler (a, b, c...) ve aynı satırdaki farklı harfler (A, B, C...) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Tablo 2. Farklı solvent ve ekstraksiyon sürelerinin mate çayının toplam polifenol ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi^a

Parametre	Ekst. süresi (h)	Ekstraksiyon solventi							
		50% Aseton		50% DMF		50% Etanol		50% Metanol	
		aseton	Aseton	DMF	DMF	etanol	Etanol	metanol	Metanol
Toplam polifenol (mg GAE/g)	2	117.62±2.25 ^{a F}	0.55±0.04 ^{a A}	101.10±0.71 ^{a E}	42.10±0.9 ^{a C}	98.58±1.72 ^{a DE}	2.06±0.01 ^{a A}	97.01±0.77 ^{a D}	36.08±0.39 ^{a B}
	8	111.64±2.44 ^{a E}	1.76±0.13 ^{b A}	119.28±4.14 ^{b F}	62.42±0.79 ^{b C}	111.17±1.76 ^{b E}	3.64±0.24 ^{b A}	97.09±1.47 ^{a D}	43.69±0.59 ^{b B}
	18	115.03±5.06 ^{a E}	2.72±0.04 ^{c A}	119.28±2.06 ^{b E}	71.13±3.07 ^{c C}	112.27±0.91 ^{b E}	4.78±0.13 ^{c A}	99.76±0.34 ^{a D}	48.70±1.42 ^{c B}
Antioksidan aktivite									
İndirgeme gücü (A)	2	1.31±0.04 ^{a E}	0.10±0.00 ^{a A}	1.26±0.01 ^{a E}	0.56±0.00 ^{a B}	1.15±0.01 ^{a D}	0.11±0.00 ^{a A}	1.06±0.02 ^{a C}	0.53±0.01 ^{a B}
	8	1.26±0.00 ^{a F}	0.13±0.00 ^{c A}	1.27±0.01 ^{a F}	0.76±0.00 ^{b C}	1.17±0.01 ^{a E}	0.15±0.00 ^{b A}	1.08±0.01 ^{a D}	0.62±0.01 ^{b B}
	18	1.21±0.07 ^{a E}	0.12±0.00 ^{b A}	1.28±0.01 ^{a F}	0.80±0.01 ^{c C}	1.15±0.00 ^{a E}	0.14±0.00 ^{b A}	1.07±0.00 ^{a D}	0.61±0.00 ^{b B}
Radikal tutma kapasitesi (% I)	2	93.00±0.49 ^{a E}	3.12±0.07 ^{a A}	92.39±0.32 ^{a E}	64.09±0.42 ^{a D}	92.69±0.12 ^{a E}	5.68±0.23 ^{a B}	92.39±0.44 ^{a E}	60.71±1.68 ^{a C}
	8	92.37±0.19 ^{a E}	4.04±0.05 ^{b A}	92.26±0.22 ^{a E}	85.75±0.06 ^{b D}	92.10±0.34 ^{a E}	6.19±0.13 ^{a B}	92.00±0.17 ^{a E}	68.86±1.53 ^{b C}
	18	93.06±0.26 ^{a E}	3.08±0.16 ^{a A}	92.19±0.37 ^{a E}	89.02±0.31 ^{c D}	92.93±0.23 ^{a E}	9.63±0.60 ^{b B}	92.54±0.31 ^{a E}	76.56±0.24 ^{c C}

^a: Aynı sütundaki farklı harfler (a, b, c...) ve aynı satırdaki farklı harfler (A, B, C...) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05).

Tablo 3. Siyah ve mate çayının polifenol içerik antioksidan aktivite açısından Student's t-testi kullanılarak karşılaştırılması.

Parametre	t-değeri ^a	Önem derecesi
Polifenol içeriği	2.286	0.024 ^b
Antioksidan aktivite		
İndirgeme gücü	2.407	0.017 ^b
Radikal tutma kapasitesi	0.705	0.482

^a: Hesaplanan t-değeri t_{critic} ($p<0.05$)=1.979 değeri ile karşılaştırılmıştır.

^b: $p<0.05$

Tablo 4. Çayların toplam polifenol ve antioksidan aktiviteleri üzerine solvent çeşidi, ekstraksiyon süresi ve bunların etkileşiminin etkisine ilişkin varyans analizi sonuçları

Parametre	Çay	Varyasyon kaynakları			
		Solvent	Süre	Solvent x süre	
Toplam polifenol	Siyah	3927.44*	109.55*	44.63*	
	Mate	2002.94*	59.79*	10.08*	
Antioksidan aktivite	Radikal tutma kapasitesi	Siyah	18770.82*	791.15*	273.55*
		Mate	14987.60*	219.58*	89.80*
	İndirgeme gücü	Siyah	2973.97*	77.58*	23.20*
		Mate	2168.72*	16.19*	8.09*

*: önem derecesi; $p<0.05$

Table 5. Mate ve siyah çaya ait farklı ekstraktların disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antibakteriyel aktivite sonuçları^{at}

	Ekstr. süresi (h)	Mate çayı				Siyah çay			
		Mate ekstraksiyon solventinin çapı (mm)				Siyah çay ekstraksiyon solventinin çapı (mm)			
		<i>Aseton</i>	<i>DMF</i>	<i>Etanol</i>	<i>Metanol</i>	<i>Aseton</i>	<i>DMF</i>	<i>Etanol</i>	<i>Metanol</i>
<i>S. aureus</i>	2	20.00±0.29 ^{aC}	19.67±0.33 ^{aB} C	18.67±0.17 ^{aA}	19.00±0.00 ^{aA} B	12.00±0.00	13.00±0.00 ^a	8.00±0.00 ^a	-
	8	22.67±0.33 ^{bD}	20.00±0.00 ^{aC}	18.00±0.00 ^{aA}	19.17±0.17 ^{aB}	13.00±0.00 ^B	14.00±0.00 ^{bC}	8.67±0.17 ^{bA}	-
	18	24.83±0.17 ^{cD}	21.00±0.00 ^{bC}	18.33±0.33 ^{aA}	19.50±0.29 ^{aB}	13.00±0.00 ^B	14.33±0.33 ^{bC}	9.00±0.00 ^{cA}	-
<i>H. alvei</i>	2	16.67±0.33 ^{ab} C	-	16.00±0.00 ^{aB}	12.83±0.17 ^{aA}	8.00±0.00 ^a	-	-	-
	8	16.17±0.17 ^{aB}	-	16.33±0.33 ^{aB}	12.50±0.29 ^{aA}	8.17±0.17 ^a	-	-	-
	18	17.00±0.00 ^b	-	17.00±0.00 ^b	13.00±0.00 ^a	9.00±0.00 ^b	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i>	2	9.00±0.00 ^{aAB}	8.67±0.33 ^{aA}	9.67±0.33 ^{aBC}	10.00±0.00 ^{aC}	-	-	-	-
	8	11.67±0.17 ^{bB}	11.67±0.33 ^{bB}	12.00±0.00 ^{bB}	10.50±0.29 ^{aA}	-	-	-	-
	18	12.00±0.00 ^c	12.00±0.00 ^b	13.00±0.00 ^c	12.00±0.00 ^b	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	2	15.00±0.00 ^C	15.00±0.00 ^C	13.33±0.33 ^{aB}	11.33±0.17 ^{aA}	-	-	-	-
	8	16.00±0.00 ^C	16.00±0.00 ^C	15.00±0.00 ^{bB}	13.67±0.33 ^{bA}	-	-	-	-
	18	16.00±0.00	16.00±0.00	15.00±0.00 ^b	14.00±0.00 ^b	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	2	9.00±0.00	8.00±0.00	7.00±0.00	8.00±0.00	8.00±0.00 ^C	7.00±0.00 ^{aA}	7.67±0.17 ^{aB}	-
	8	10.00±0.00	8.00±0.00	8.00±0.00	9.00±0.00	11.00±0.00	8.00±0.00 ^b	8.00±0.00 ^a	-
	18	9.00±0.00	8.00±0.00	8.00±0.00	7.00±0.00	12.00±0.00 ^B	8.33±0.33 ^{bA}	8.00±0.00 ^{aA}	-
<i>E. coli</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	-	-	-	-	-	-

^a: Aynı sütündeki farklı harfler (a, b, c...) ve aynı satırdaki farklı harfler (A, B, C...) istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir (p<0.05).

-: inhibisyon zonu belirlenemedi.

t : inhibisyon zon çapı (mm)

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

5.1. Çay örneklerinin toplam polifenol miktarı

Tablo 1 ve Tablo 2’de görüldüğü gibi çayların polifenol miktarı; çay çeşidi, kullanılan solvent ve ekstraksiyon süresine bağlı olarak geniş bir aralıkta seyretmiştir. Siyah çayda 0.4-114 mg GAE/g, mate çayında ise 0.5-119.3 mg GAE/g düzeyinde toplam polifenol tespit edilmiştir. Toplam polifenol miktarı açısından, iki çay arasında görülen fark önemli bulunmuştur (Tablo 3). İncelenen tüm ekstraksiyon sürelerinde, belirlenen polifenol miktarı % 50’lik solvent ekstraktlarında, saf solvent ekstraktlarındakine göre daha yüksek bulunmuştur.

Hem siyah, hem de mate çayı için 2 saatlik süre sonunda ekstraktlarda belirlenen polifenol miktarı açısından solventler arasında bir sıralama yapıldığında sıralamanın;

% 50 aseton > % 50 DMF ≥ % 50 etanol > % 50 metanol > DMF > metanol > % 50 etanol = etanol

şeklinde olduğu görülmüştür. Siyah çay için 8 ve 18 saatlik süre sonunda da benzer eğilim gözlenmiştir. Ancak farklı olarak ilk sırada % 50 DMF, ikinci sırada ise % 50’lik aseton ekstraktları yer almıştır. Diğer taraftan 8 ve 18 saatlik süre sonunda mate çayı ekstraktlarındaki sıralamanın siyah çaya göre farklı, ancak birbirine benzer olduğu tespit edilmiştir.

Her iki çay için, toplam polifenol içeriği kullanılan solvent ve ekstraksiyon süresine göre önemli ölçüde farklılık göstermiştir (Tablo 4). Benzer sonuçlar daha önce badem kavuzları (Pinelo et. al., 2004) ve fabrika atıkları (Lapornik et.al., 2005) ile yapılan çalışmalarda da belirtilmiştir.

Bu araştırmanın sonucuna göre, ekstraktların polifenol içeriği kullanılan solventin polaritesine bağlı olarak büyük farklılıklar göstermiştir ve sulu solventler saf olanlara göre polifenol ekstraksiyon için çok daha etkili bulunmuştur. Bu durumda her iki çayda bulunan polifenollerin polaritesinin oldukça yüksek olduğu söylenebilmektedir.

Bu araştırma bulguları ile uyumlu olarak, Wang et. al., (2004) bazı bitkilerden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için % 15-96 arasındaki etanol konsantrasyonunu denemişler ve en

yüksek verimi %30-60 arasındaki etanol konsantrasyonu ile elde etmişlerdir. Benzer şekilde Chavan et. al. (2001) farklı tipte bezelyelerden elde ettikleri sulu aseton ekstraktlarında saf aseton ekstraksiyonuna göre daha fazla polifenol tespit etmişlerdir.

Siyah çayda, ekstraksiyon süresinin 2 saatten 8 saate çıkması polifenol içeriğini %50 aseton ekstraksiyonu hariç önemli ($p<0.05$) ölçüde artırmıştır. Sürenin 8 saatten 18 saate çıkması durumunda ise polifenol içeriği daha az artış göstermiştir. Bu artış sadece % 50 aseton, aseton, % 50 DMF, DMF ve % 50 metanol ekstraktlarında önemli ($p<0.05$) bulunmuştur.

Mate çayı için, ekstraksiyon süresinin 2 saatten 8 saate çıkması durumunda % 50 aseton ve % 50 metanol ekstraktları hariç diğer ekstraktların polifenol içeriği önemli ölçüde artırmıştır. Süre 8 saatten 18 saate çıktığında ise sadece saf solvent ekstraksiyonun polifenol içeriği artmıştır ($p<0.05$). Buna göre ekstraksiyon süresindeki artışa bağlı olarak ekstraktın polifenol miktarı solvent ve çay çeşidine bağlı olarak değişmiştir. Farklı meyvelerden polifenollerin ekstrakte edilmesinde üzüme ait metanol ve etanol ekstraksiyonunun polifenol içeriği ekstraksiyon süresinin artmasıyla artış gösterirken diğer meyve ekstraktlarda farklı eğilim gözlenmiştir (Lapornik et. al., 2005).

5.2. Çay örneklerinin antioksidan aktivitesi

5.2.1. İndirgeme gücü

Tablo 1 ve Tablo 2’de görüldüğü gibi siyah ve mate çay ekstraktının indirgeme gücü sırasıyla 0.1-0.2 ve 0.1-1.3 arasında değişmiştir. % 50’lik solvent ekstraktlarının aktivitesi saf olanlardan daha yüksek bulunmuştur. Çay ayırımı olmaksızın 2 saatlik ekstraksiyon sonunda ekstraktların indirgeme gücü, yüksek olandan düşük olana doğru, aşağıdaki gibi sıralanmıştır:

% 50 aseton ≥ % 50 DMF > % 50 etanol > % 50 metanol > DMF > metanol > etanol = aseton

Diğer taraftan, 8 ve 18 saatlik ekstraksiyon süresi sonunda da benzer sıralama gözlenmiştir. Farklı olarak % 50’lik DMF çözeltisi 1. sırada yer alırken, 2. sırada % 50’lik aseton çözeltisi yer almıştır.

Bu sonuçlara göre, çay ayırımı olmaksızın polar solventler, her durumda indirgeme gücü daha yüksek olan polar polifenollerini ekstrakte etmiştir. Benzer şekilde çay polifenollerinin demir bağlama yeteneğinin molekül yapılarına bağlı olduğu yapılardaki –OH grubu gibi bazı önemli fonksiyonel grupların Fe-bağlama etkinliğini artırdığı belirtilmiştir (Khochar ve Apenten, 2003).

Ekstraksiyon süresinin 2 saatten 18 saate uzaması, kullanılan solvent ve materyale bağlı olarak ekstraktların indirgeme gücünde farklılığa yol açmıştır (Tablo 1). Siyah çay ekstraktının indirgeme gücü sürenin 2 saatten 8 saate artmasıyla önemli ($p<0.05$) artış göstermiştir (% 50 aseton hariç). Ancak sürenin daha fazla uzaması sadece % 50 DMF, DMF ve % 50 etanol ekstraktında önemli bir artışa ($p<0.05$) neden olmuştur.

Mate çayında ise ekstraksiyon süresinin 2 saatten 8 saate uzamasıyla saf solvent ekstraktlarının indirgeme gücü önemli artış ($p<0.05$) göstermiş, sulu ekstraktları ise değişmemiştir (Tablo 2). Sürenin daha fazla uzaması ekstraktın indirgeme gücünü etkilememiştir.

Tablo 3'te görüldüğü gibi mate ekstraktının indirgeme gücü her durumda siyah çaya göre daha yüksek bulunmuştur. Bu durum mate çayı ekstraktının polifenol içeriklerinin yüksekliği ile paralellik göstermiştir. Siyah çaydan farklılığın bileşimindeki farklılıktan kaynaklandığı söylenebilir. Siyah çay fazla miktarda teaflavin ve tearubijin gibi kompleks polifenoller içerirken (Langley-Evans, 2000), mate çayı klorojenik asit gibi basit polifenollerini daha fazla içermektedir (Mello, et. al., 2005; Filip ve Ferraro, 2003). Mate çayının yapısında bulunan klorojenik asitin demiri indirgeme gücüne dolayısıyla güçlü bir antioksidan potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir (Yoshino ve Murakami, 1998). Mate ve siyah çay ekstraktının indirgeme gücü ile polifenol miktarı arasında yüksek bir korelasyon bulunmuştur. Tespit edilen korelasyon katsayıları, siyah çayın 2, 8 ve 18 saat ekstraksiyon için sırasıyla 0.98, 0.99 ve 0.99'dur. Bu değerler mate çayında ise 0.98, 0.99 ve 0.97'dir. Önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında Psarra et. al. (2002) şarapların polifenol miktarı ile indirgeme gücü arasında düşük bir korelasyon ($R^2=0.5956$), radikal tutma kapasitesi ile nispeten yüksek bir korelasyon ($R^2=0.8115$) bulmuşlardır. Bu araştırmanın bulguları ile oluşan farklılık muhtemelen kullanılan materyallerin fenolik yapısındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır.

5.2.2. Radikal tutma kapasitesi

Siyah ve mate çayı ekstraktının farklı ekstraksiyon sürelerindeki radikal tutma kapasitesi Tablo 1 ve Tablo 2’de görüldüğü gibi, sırasıyla %2.6-95.4 ve %3.1-93.1 arasındadır. Toplam polifenol ve indirgeme gücünde olduğu gibi % 50 solvent ekstraktları saf solvent ekstraktlardan daha etkili bulunmuştur. Bu durum bu ekstraktın polifenol içeriklerinin daha yüksek olmasından kaynaklanabilmektedir. Daha önce yapılmış çalışmalarda (Negi et. al., 2005; Yuan et. al., 2005; Canadanovic-Brunet et. al., 2005) da radikal tutma kapasitesi üzerine ekstraksiyon solventinin etkisi olduğu belirtilmiştir. Tablo 4’te, çay ayırımı olmaksızın kullanılan solvent ve uygulanan sürenin radikal tutma kapasitesini önemli ölçüde etkilediği gösterilmektedir. Siyah çay ekstraktının 2 ve 8 saat süren ekstraksiyonu sonunda radikal tutma kapasitesinin sıralaması aşağıda belirtilmiştir:

% 50 ≥ % 50 etanol ≥ % 50 DMF > % 50 metanol > DMF > metanol > etanol > aseton

Siyah çayın 18 saat, mate çayının 2, 8 ve 18 saat sonundaki sulu solvent ekstraktlarının radikal tutma kapasiteleri arasında önemli bir farklılık görülmemiştir ($p > 0.05$). Saf solvent ekstraktları arasında ise DMF en yüksek kapasiteyi göstermiştir. Bunu sırasıyla metanol, etanol ve aseton izlemiştir.

Ekstraksiyon süresinin artması siyah çayın aseton ekstraksiyonu hariç diğer solvent ekstraktları arasında önemli bir farklılığa yol açmıştır. Mate ekstraktları arasında ise sadece saf solvent ekstraktları arasında önemli bir farklılık gözlenmiştir. DPPH’in inhibisyonu çay tipi ve solvente bağlı olarak farklılık göstermiştir. İstatistik analiz sonucuna göre siyah ve mate çayının radikal tutma kapasitesi arasında önemli bir farklılık tespit edilmemesine rağmen mate çayının saf solvent ekstraktının radikal tutma kapasitesinin siyah çaydan fazla olduğu gözlenmiştir. Ancak, beklenmedik bir sonuç olarak mate çayının sulu solvent ekstraktının indirgeme gücü ve polifenol miktarının fazla olmasına rağmen siyah çayın sulu ekstraktından daha düşük kapasite göstermiştir. Diğer taraftan radikal tutma kapasitesinin antioksidan bileşiklerin konsantrasyonuna bağlı olduğu (Canadanovic-Brunet et. al., 2005; Gülçin et. al., 2003; Yıldırım et. al., 2003) belirtilmektedir. Fakat bu araştırma sonucu ile uyumlu olarak Romero et. al., (2004) konsantrasyonu % 12.5-100 olan fermente soya ekstraktının indirgeme güçlerini sırasıyla %29.46, %40.08, %70.05 ve %91.18 bulurken aynı ekstraktının radikal tutma etkilerini % 25 konsantrasyondan sonra azalma olduğu belirterek

%56.5, %79.3, %75.8 ve %60.7 olarak saptamışlardır. Araştırmacıların sonucuna göre radikal tutma kapasitesinin belli bir noktadan sonra konsantrasyona bağlı olmadığı söylenebilmektedir. Sonuç olarak mekanizmaları farklı olan 2 antioksidan yöntemi farklı gözlemlere yol açabilmektedir (Sun ve Ho, 2005).

Çay ekstraktının radikal tutma kapasitesi ile polifenol miktarı arasında yüksek bir korelasyon saptanmıştır. Siyah çay için korelasyon katsayıları (R^2) 2, 8 ve 18 saat için sırasıyla 0.89, 0.85 ve 0.84 tespit edilirken, bu katsayı mate çayı için 0.87, 0.83 ve 0.83 olarak tespit edilmiştir. Psarra et. al., (2002)'in şaraplarda bulunduğu sonucun aksine bu araştırmada toplam polifenollerin indirgeme gücü ile korelasyonu radikal tutma kapasitesi ile olan korelasyondan daha fazla bulunmuştur. Bu durum her 2 çayda bulunan polifenollerin antioksidan yöntemlere karşı daha farklı reaktivite göstermesinden kaynaklanabilmektedir.

5.3. Çay örneklerinin antibakteriyel aktivitesi

Yapılan ön denemelerde siyah ve mate çayının saf solvent ekstraktları önemli bir antibakteriyel aktivite göstermemiştir. Bu nedenle çalışmada yalnızca sulu solvent ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesi incelenmiştir. Ulaşılan bulgular Tablo 5'te gösterilmektedir. Mate çayı ekstraktları *E.coli* dışındaki tüm bakterilere karşı farklı derecelerde antibakteriyel aktivite göstermiştir. Mate çayı için % 50 aseton ekstraktının etkili ekstraksiyon olduğu tespit edilmiştir. Mate ekstraktları içinde *H. alvei* bakterisine karşı % 50 DMF ekstraktı etkisiz kalmıştır. Mate çayı ekstraktına karşı tüm bakteriler içinde en az direnci *S.aureus* göstermiştir. *E.coli* ise hiçbir mate ekstraktı tarafından engellenememiştir.

Siyah çay ekstraktı sadece *S.aureus*, *H. alvei* ve *B. cereus* bakterilerine karşı değişen derecelerde etkili olmuştur. Ancak % 50 metanol ekstraktı hiç etki gösterememiştir (Tablo 5). Gram pozitif bakterilerin, Gram negatif bakterilerden daha hassas olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeni olarak G negatif bakterilerin dış membranlarında bulunan lipopolisakkaritler gösterilmektedir (Alzoreky ve Makahara, 2003; Baydar et. al.,2004).

Genel olarak, ekstraksiyon süresindeki 2 saatten 18 saate olan artış test edilen bakteri ve kullanılan solvente bağlı olarak, ekstraktın antibakteriyel aktivitesini önemli oranda artırmıştır (Tablo 5). Solvent ekstraktları arasında test bakterisi ve ekstraksiyon süresine bağlı olarak önemli fark ($p<0.05$) görülmüştür. Literatürde çay üzerine yapılmış benzer bir çalışma

olmamasına rağmen farklı bitkilerle yapılan bazı çalışmalarda (Negi et. al., 2005; Baydar et. al., 2004, Tepe et. al., 2005) farklı solvent ekstraktının antibakteriyel aktiviteleri arasında farklılıklar olduğu belirtilmiştir.

Araştırma bulguları, antibakteriyel aktivite açısından siyah ve mate çayı ekstraktları arasında çok büyük farklılık olduğunu göstermiştir. Mate çayı ekstraktlarının test edilen bakterilere karşı çok etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu durum ekstraktların antibakteriyel aktiviteden sorumlu farklı fenolik bileşikleri içermesinden kaynaklanabilmektedir. Ancak her iki çayın fenolik bileşik kompozisyonunu belirlemek daha sonraki çalışmaların konusu olacaktır. Ayrıca, mate ekstraktlarından sadece sulu DMF ekstraktının *H. alvei*'ye karşı etkisiz kalması da beklenmedik bir sonuç olarak düşünülmektedir ve bu durumun nedeninin yapılacak daha kapsamlı çalışmalarla ortaya konulması gerekmektedir. Çay ekstraktlarının polifenol miktarı ile antibakteriyel aktiviteleri arasında herhangi bir ilişki tespit edilememiştir ($R^2=0$). Benzer bir sonuç *Polygonum cognatum* ekstraktları için de söz konusudur (Yıldırım et. al., 2003). Diğer taraftan, daha önce yapılmış bazı çalışmalarda (Jayaprakasha et. al., 2003; Özkan et. al., 2004) bitki ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesinden bireysel fenolik bileşiklerin sorumlu olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada, siyah ve mate çayının, 2, 8 ve 18 saat ekstraksiyon sonunda % 50 solvent ekstraktları polifenol miktarı, antioksidan ve antibakteriyel aktivite açısından saf solventlerden çok daha etkili bulunmuştur. Etkinlik derecesi sulu solventlerin birbirine yakın bulunurken, saf solventler içinde DMF ve metanol çok daha etkili olmuştur. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda polifenol ekstraksiyonu için etkisi yüksek olan bu solventler önerilmektedir. Mate çayının incelenen özellikler açısından siyah çaydan daha üstün olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle mate çayının doğal bir antioksidan kaynağı ve bazı patojen bakterilere karşı doğal bir engelleyici olarak tüketilmesi önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Alzoreky NS and Nakahara K, (2003). Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *Int J Food Microbiol* 80: 223-230.
- Atoui AK, Mansouri A, Boskou G and Kefalas P, (2005). Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem* 89: 27-36.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493–496.
- Baydar NG, Özkan G. and Sağdıç O, (2004). Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control* 15: 335-339.
- Chavan UD, Shahidi F and Naczki M, (2001). Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. *Food Chem* 75:5 09-512.
- Canadanovic-Brunet JM, Djilas SM and Cetkovic GS, (2005). Free-radical scavenging activity of wormwood (*Artemisia absinthium*) extracts. *J Sci Food Agric* 85: 265-272.
- Chung KT, Lu Z and Chou MW, (1998). Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria. *Food Chem Toxicol* 36: 1053-1060.
- Filip R and Ferraro GE, (2003). Researching on new species of “Mate”: *Ilex brevicuspis*. *Eur J Nutr* 42: 50-54.
- Gülçin I, Oktay M, Kirecci E and Kufrevioglu OI, (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chem* 83: 371-382.
- Jayaprakasha GK, Selvi T and Sakariah KK, (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Res Int* 36: 117-122.
- Katalinić V, Milos M, Modun D, Music I and Boban M, (2004). Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chem* 80: 593-600.
- Khokhar S and Apenten RKO, (2003). Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure-activity relations. *Food Chem* 81:133-140.
- Langley-Evans SC, (2000). Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay. *Int J Food Sci Nutr* 51:181-188.
- Lapornik B, Prosěk M and Wondra AG, (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J Food Eng* 71:214-222.
- Mello LD, Alves AA, Macedo DV and Kubota LT, (2005). Peroxidase-based biosensor as a tool for a fast evaluation of antioxidant capacity of tea. *Food Chem* 92: 515-519.

- Mila I, Scalbert A and Expert D, (1996). Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and rots. *Phytochemistry* 42: 1551-1555.
- Negi PS, Chauhan AS, Sadia GA, Rohinishree YS and Ramteke RS, (2005). Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed extracts. *Food Chem* 92: 119-124.
- Obanda M and Owuor PO, (1997). Flavanol composition and caffeine content of green leaf as quality potential indicators of Kenyan black teas. *J Sci Food Agric* 74: 209-215.
- Özkan G, Sagdic O, Baydar NG and Karamahmutoglu Z, (2004). Antibacterial activities and total phenolic contents of grape pomace extracts. *J Sci Food Agric* 84: 807-1811.
- Pinelo M, Rubilar M, Sineiro J and Nunez, MJ, (2004). Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chem* 85: 267-273.
- Psarra E, Makris DP, Kallithraka S and Kefalas P, (2002). Evaluation of the antiradical and reducing properties of selected Greek white wines: correlation with polyphenolic composition. *J Sci Food Agric* 82: 1014-1020.
- Pulido R, Bravo L and Saura-Calixto F, (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agr Food Chem* 48: 3396-3402.
- Romero AM, Doval MM, Sturla MA and Judis MA, (2004). Antioxidant properties of polyphenol-containing extract from soybean fermented with *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Lipid Sci Technol* 106: 424-431.
- Sokal RR and Rohlf FJ, (1995). *Biometry, The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, W.H. Freeman and Co. New York, 887p.
- Sun T and Ho C, (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chem* 90: 743-749.
- Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M and Polissiou M, (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chem* 90: 333-334.
- Wang H, Provan GJ and Helliwell K, (2004). Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. *Food Chem* 87: 307-311.
- Yen GC and Duh PD, (1994). Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active oxygen species. *J Agric Food Chem* 42: 629-632.
- Yıldırım A, Mavi A and Kara AA, (2003). Antioxidant and antimicrobial activities of *Polygonum cognatum* Meissn extracts. *J Sci Food Agric* 83: 64-69.

- Yuan YV, Bone DE and Carrington MF, (2005). Antioxidant activity of dulse (*Palmira palmata*) extract evaluated in vitro. *Food Chem* 91: 485-494.
- Yoshino M and Murakami K, (1998). Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. *Anal Biochem* 257: 40-44.