بررسی فعالیت ضد مخمری عصاره هیدروالکلی چای سبز درمحیط کشت و شیر استریل

سمیرا عیسی‌زاده رازلیقی[۱]، مرتضی خمیری [*۲]، علیرضا صادقی [۳]، مهدی کاشانی نژاد [۴]، حبیب الله میرزایی [۵]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی ، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳- استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

٤- استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۵- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰٤/۲۰)

چکیده

مخمرها و کپک‌ها از مهم‌ترین عوامل فساد مواد غذایی اسیدی می‌باشند. در مطالعات مختلفی خواص ضد میکروبی چای سبز به عنوان یک ترکیب طبیعی به اثبات رسیده است. در این پژوهش هدف بررسی فعالیت ضد مخمری عصاره هیدروالکلی چای سبز در محیط کشت و شیر استریل بود. برای این منظور میزان فنل کل و فلاوونوئید به روش رنگ سنجی ارزیابی شد. فعالیت ضد مخمری عصاره هیدروالکلی چای سبز به روش چاهک و دیسک دیفوزیون علیه *ساکارومایسس سرویزیه، کلویورومایسس مارکسیانوس و رودوتورولا گلوتنیس* انجام شد. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره هیدروالکلی چای سبز نیز به روش میکرودایلوشن (ریز رقت در محیط مایع) در محیط کشت و ماکرودایلوشن(رقت سازی در محیط مایع) در شیر استریل بررسی شد. حداقل غلظت بازدارندگی عصاره هیدروالکلی چای سبز در برابر *ساکارومایسس سرویزیه، کلویورومایسس مارکسیانوس و رودوتورولا گلوتنیس* به روش میکرودایلوشن در محیط کشت به ترتیب ۱۲/۵و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر علاوه برآن در روش ماکرودایلوشن در شیر استریل نیز به ترتیب ۱۲/۵، ٦/۲۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. مقاوم‌ترین مخمر به عصاره هیدروالکلی چای سبز *کلویورومایسس مارکسیانوس* تشخیص داده شد. با توجه تاثیر مثبت عصاره چای سبز علیه مخمرهای مورد آزمون می‌توان استفاده عصاره چای سبز را به عنوان ترکیب ضد میکروبی طبیعی در صنعت غذا پیشنهاد کرد به شرط اینکه در خصوص رفع مشکل بدطعمی از مقادیر کمتر ویا روش های توام استفاده کرد.

کلید واژگان: عصاره هیدرو الکلی چای سبز، فعالیت ضد مخمری، شیر

*مسئول مکاتبات: khomeiri@gau.ac.ir

۱- مقدمه

مخمرها به طور گسترده در طبیعت پراکنده‌اند و قادر به رشد در مواد غذایی اسیدی با کربوهیدارت بالا می‌باشند، بنابراین باعث فساد (تغییر طعم، رنگ، بو و بافت) مواد غذایی نظیر محصولات لبنی، آب میوه‌ها ، میوه ، سالاد و غیره می‌شوند (۱،۲،۳ و٤). از مهم‌ترین مخمرهای عامل فساد مواد غذایی می‌توان به *کاندیدا، پیچیا، رودوتورولا، تورولوپسیس، ساکارومایسس، زیگو ساکارومایسس، هانسنولا و کلیورومایسس* اشاره کرد [۵، ٦ و ۷]. در حال حاضر، روش معمول برای کنترل فساد مواد غذایی استفاده از مواد شیمیایی نگهدارنده است. از جمله نگهدارنده‌هایی که در صنعت غذا استفاده می‌شود ناتامایسین، سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم می‌باشد [۸]. بنزوات در اثر دکربوکسیلاسیون به بنزن که یک ترکیبات سرطان‌زا است تبدیل می‌شود، همچنین مخمرها و کپک‌ها قادرند اسید سوربیک را به ۱ و۳-پنتادین[1] تبدیل کنند که بوی شبیه بوی نفت سفید ایجاد می‌کند [۵ و ۹]. با توجه به اثرات مضر حرارت شدید و نگهدارنده‌های شیمیایی بر خواص تغذیه‌ای مواد غذایی همچنین تمایل مصرف‌کننده به استفاده کم‌تر از نگهدارنده‌های مصنوعی [۱۰]، اخیراً مطالعات وسیعی در مورد آثار ضد میکروبی متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی نظیر اسانس و برخی از ترکیبات موجود در عصاره‌های گیاهی صورت گرفته است و مشخص شده است عوامل فیتوشیمیایی از محصولات طبیعی نظیر عصاره‌های گیاهی به عنوان منبع ترکیباتی می‌باشند که می‌توانند باعث کاهش یا از بین رفتن میکروارگانیسم‌های عامل فساد یا بیماریزا باشند [۱۱- ۱۳]. همچنین از متابولیت‌های ثانویه گیاهی علاوه بر این که به عنوان طعم دهنده در مواد غذایی استفاده می‌شود در صنعت غذا نیز به منظور افزایش عمر ماندگاری مواد غذایی نیز استفاده می‌شود [١٤]. چای سبز[2] از خانواده Theaceae یک ترکیب طبیعی است که به طور گسترده‌ای به عنوان یک نوشیدنی سنتی در آسیا استفاده می‌شود [۱۵]. گیاه چای حاوی مقادیر زیادی از پلی‌فنول‌ها بوده که مقدار آن درچای سبز بیشتر از چای تخمیری می‌باشد. کاتچین جز اصلی ترکیبات پلی فنل چای سبز می‌باشد کاتچین چای سبز شامل انواع اپی کاتچین، اپی کاتچین گالات، اپی گالوکاتچین، اپی گالوکاتچین گالات است [١٦]. علاوه بر پلی‌فنول‌ها سایر ترکیباتی که در عصاره چای سبز یافت می‌شوند عبارت است از آلکالوئیدها نظیر کافئین، تئوفیلین و ترئوبرومین، ویتامینC، پلی‌ساکاریدها، آمینو اسیدها و مواد معدنی [۱۷ و ۱۸]. کاتچین چای سبز دارای فعالیت ضد میکروبی، ضد سرطانی و آنتی اکسیدانی می‌باشد. پلی فنول‌های عصاره چای سبز بر علیه *اشریشیا کلی، استرپتوکوکوس‌ها و استافیلوکوکوس اورئوس* اثر مهاری دارد [۱۹]. نصرالهی و همکاران (۱۳۸۸) نیز در مطالعه‌ای اثر بازدارندگی پلی‌فنول‌های چای سبز به عنوان مواد ضد قارچی گیاهی بر رشد مخمر فرصت طلب کاندیدا آلبیکنس در دو زمان ٢٤ و ٤٨ ساعت بررسی کردند. کمترین غلظت مهارکنندگی پلی فنول‌های چای سبز پس از ٢٤ ساعت به ترتیب برابر ۱۲/۵، ۲۵، ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در ٤٨ ساعت ٦/۲۵، ۱۲/۵، ۵۰ میلی-گرم بر میلی‌لیتر گزارش گردید [۲۰]. همچنین در مطالعه‌ای تاثیر ضد مخمری اسانس لیمو، مریم گلی، سرو کوهی و مرزنجوش را در محیط کشت، آب سیب و شیر به روش ماکرو دایلوشن مورد بررسی قرار گرفته است و گزارش شده که ژئوتریکوم کاندیدوم مقاومترین سویه و ساکارومایسس پومب نیز حساس‌ترین سویه در برابر اسانس-های مورد آزمون هستند [۲۱].

مطالعات کمی بر روی خاصیت ضد مخمری عصاره چای سبز انجام شده است لذا در این تحقیق تاثیر این عصاره روی *ساکارومایسس سرویزیه، کلویورومایسس مارکسیانوس و رودوتورولا گلوتنیس* برای اولین بار در محیط شیر و محیط کشت انجام شده است. لذا هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد مخمری عصاره چای سبز بر مخمرهای عامل فساد مواد غذایی، جهت بررسی کاربرد پتانسیل آن به عنوان ترکیبات طبیعی در محصولات غذایی به منظور تولید غذاهای ارگانیک و سالم می-باشد.

۲- مواد و روش

۲-۱-تهیه گیاه

گیاه چای سبز از کارخانه نوشینه لاهیجان خریداری شده است

1. 1,3-pentadiene
2. *Camellia sinensis*

۲-۲-استخراج عصاره هیدروالکلی گیاه چای سبز

ابتدا گیاه خشک شده توسط آسیاب پودر شده و براساس روش دورلینگ و همکاران (۲۰۰۷) عصاره‌گیری شد. در این روش حدود ۵۰ گرم پودر خشک گیاه به ارلن اضافه شد و ۵۰۰ میلی-لیتر اتانول ۷۰ درصد به نسبت (۱:۱۰) افزوده شد و سپس به مدت سه ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ٤۰ درجه سانتی-گراد با ۲۰۰ دور در دقیقه نگه‌داری گردید. در ادامه، عصاره صاف شده با کاغذ صافی توسط دستگاه تبخیرکننده چرخان در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شده و توسط دستگاه خشک کننده انجمادی به پودر خشک تبدیل گردید و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در ظروف غیر قابل نفوذ به هوا نگه‌داری شد [۲۲].

۲-۳-تعیین میزان فنل تام عصاره هیدروالکلی گیاه چای سبز

میزان ترکیبات فنل تام موجود در عصاره چای سبز به روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد [۲۳]. روش فولین سیوکالتو[3] (روش رنگ‌سنجی) از روش‌های متداول اندازه‌گیری ترکیبات فنولی می‌باشد. اساس کار در این روش، احیاء معرف فولین(فسفوتنگستیک و فسفومولیبدیک) به صورت غیر اختصاصی توسط ترکیبات فنولی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را در طول موج ۷٦۰ نانومتر نشان می‌دهد [۲٤]. ۲۰ میکرولیتر از عصاره چای سبز با ۱/۱٦ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین سیوکالته ترکیب شد. پس از گذشت ۵ دقیقه ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد به محلول فوق اضافه گردید و محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد سپس جذب نمونه در طول موج ۷٦۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقادیر فنل کل عصاره‌ها با توجه به معادله خط حاصل از نمودار استاندارد به صورت معادل با گالیک اسید بیان گردید.

3. Folin-Ciocalteu

۲-٤-تعیین میزان فلاوونوئید عصاره هیدروالکلی چای سبز

میزان محتوای ترکیبات فلاوونوئید عصاره هیدروالکلی چای سبز با روش رنگ سنجی اندازه گیری شد. برای این منظور ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره چای سبز در ۱,۵ میلی‌لیتر اتانل ۷۰ درصد حل و با ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۱۰ درصد کلرید آلومینیوم حل شده در اتانل ترکیب شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول پتاسیم استات ۱ مولار و ۲,۸ میلی‌لیتر آب مقطر به محلول بدست آمده اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. در نهایت جذب محلول حاصل در طول موج ٤۲۰ نانومتر اندازه-گیری شد. میزان فلاوونوئید براساس کوئرستین محاسبه شد [۲۵].

۲-۵- تهیه سویه میکروبی

سویه‌های مخمری استفاده شده در این تحقیق شامل *کلوی-وررومایسس مارکسیانوس* (PTCC ۵۱۹۳)، *ساکارومایسس سرویزیه*(PTCC ۵۰۵۲)، *رودوتورولا گلوتنیس*(PTCC ۵۲۵٦) می‌باشند که از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. سویه‌های مورد نظر در محیط کشت YM broth در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند تا سویه‌های مورد نظر فعال گردند. سپس سوسپانسیون مخمر براساس استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند تهیه گردید براساس آزمون تائیدی که در اثر کشت سوسپانسیون در پلیت انجام شد جمعیت مخمرها 10^{7} کلنی بر میلی‌لیتر تعیین گردید [۲٦].

۲-٦-فعالیت ضد مخمری

۲-٦-۱-روش چاهک و دیسک دیفوزیون

برای تعیین فعالیت ضد میکروبی عصاره هیدروالکلی چای سبز از روش چاهک و دیسک دیفوزیون استفاده شد. عصاره هیدروالکلی چای سبز در محلول ۵ درصد دی متیل سولفوکسید حل کرده بنابراین رقت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر براساس رقت سازی سریال بدست آمد. عصاره هیدروالکلی توسط فیلتر سرنگی ۰/٤۵میکرومتر استریل شد. سوسپانسیون میکروبی (۰/۱میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی 10^{7} کلنی در هر میلی‌لیتر) بر روی محیط کشت سابرد دکستروز آگار

به صورت سطحی توسط سوآپ استریل کشت داده شد. در روش دیسک دیفوزیون، ۳۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره بر روی دیسک بلانک استریل به قطر ٦ میلی‌متر ریخته وبه مدت یک ساعت باقی مانده تا خشک شود سپس بر روی محیط کشت سابرودکستروز آگار کشت داده شده انتقال داده شد و به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری گردید. در روش چاهک، با پیپت پاستور چاهک به قطر ٦ میلی‌متر در محیط کشت سابرودکستروز آگار کشت داده شده حفر شد سپس در هر چاهک به میزان ۵۰ میکرولیتر از غلظت-های مختلف عصاره تزریق شد و به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری گردید. در نهایت میزان قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد [۲۷].

۲-٦-۲-روش ریز رقت در محیط مایع (میکرو دایلوشن)

جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و فعالیت ضد قارچی عصاره چای سبز از روش میکرودایلوشن نیز استفاده شد. در این روش از محیط کشت سابرودکستروز براث حاوی ۰/۵ درصد توئین۸۰ استفاده شد. ابتدا غلظت‌های مختلف عصاره چای سبز با حل کردن آن در محیط کشت سابرودکستروز براث حاوی ۰/۵ درصد توئین۸۰ (۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ٦/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵٦ و ۰/۷۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به روش رقت سازی سریال تهیه گردید. سپس توسط فیلتر سرنگی ۰/٤۵ ۰میکرومتر استریل و بعد در هر چاهک میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای حدود ۱۸۰ میکرولیتر عصاره به همراه محیط کشت و ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون مخمر (10^5 کلنی در هر میلی‌لیتر) اضافه گردید. کنترل مثبت (محیط کشت به همراه مخمر) و کنترل منفی (محیط کشت به همراه عصاره چای سبز فاقد مخمر) نیز در این مرحله در نظر گرفته شد و در نهایت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت گرمخانه‌گذاری شد و پس از ٤٨ ساعت جذب میکروپلیت درطول موج ٦۲۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت حداقل غلظت از عصاره که تغییری در جذب آن صورت نگرفته به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی معرفی شد. کمترین غلظت بازدارندگی در اثر مقایسه مقدار جذب نوری بین چاهک حاوی مخمر با چاهک-های حاوی عصاره همراه با مخمر بدست آمد [۲۸].

تمام آزمایشات حداقل سه بار تکرار گردید و میانگین نتایج بدست آمده به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی ارائه گردید (جدول۲).

۲-٦-۳- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی به روش رقت سازی در محیط مایع (ماکرودایلوشن) در شیر استریل

به منظور تعیین حداقل غلظت بازدارندگی در شیر استریل، عصاره چای سبز استریل شده توسط فیلتر سرنگی۰/٤۵ میکرومتر به شیر کم چرب استریل تهیه شده از کارخانه پگاه گلستان اضافه گردید (۲۰ میلی لیتر) تا غلظت‌های نهایی ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ و ٦/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. سپس سوسپانسیون مخمر به آن اضافه گردید. در نهایت به مدت ۲٤، ٤٨، ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. پس از گرمخانه گذاری جمعیت مخمرهای موجود در نمونه های شیر با استفاده از محیط کشت بررسی شد و در نهایت حداقل غلظتی که در آن رشدی مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی تعیین گردید [۲۹]. تمام آزمایشات حداقل سه بار تکرار گردید و میانگین نتایج بدست آمده به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی در محیط شیر استریل ارائه گردید (جدول۳).

۲-٦-٤- آنالیز آماری

در این تحقیق تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد و نتایج بدست آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال($p<۰/۰۵$) صورت گرفت. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزاری sas.9.1 صورت گرفت.

۳- بحث و نتایج

۳-۱-تعیین میزان فنل تام عصاره هیدروالکلی چای سبز

ترکیبات فنلی، متابولیت‌های ثانویه اکثر گیاهان، به ویژه گیاهان دارویی هستند. این ترکیبات، توان ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی بالایی دارند[۳۰]. معادله خط رگرسیون که رابطه غلظت محلول‌های گالیک اسید با میزان جذب نمونه در طول موج ۷٦۰ نانومتر را نشان می‌دهد به صورت زیر می‌باشد:

$$Y=۰/۱۲X+۰/۰۰۸$$

میزان فنل کل برحسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره چای سبز حدود ۱۲٤/۱٦۱ به دست آمد. تسای و همکاران (۲۰۰۸) عصاره چای سبز را با استفاده از متانول استخراج کردند و سپس میزان فنل کل را با روش فولین سیوکالته اندازه‌گیری کردند و میزان فنل کل را ۱٤۹ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره گزارش کردند که نتایج این مطالعات با مطالعه حاضر مطابقت دارد. رابیه و همکاران (۲۰۰٤) نیز میزان فنل کل عصاره آبی چای سبز و سیاه را به ترتیب ۵۹/۸ و ۵۹/۳ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره گزارش کرده‌اند که با نتایج مطالعات ما چندان مطابقت نداشت [۳۱]. آنیتا و همکاران (۲۰۱٤) میزان فنل کل عصاره اتانولی چای سبز را ۹٦ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره گزارش کردند که با نتایج ما مطابقت دارد[۳۲]. ممکن است دلیل تفاوت در میزان فنل کل به نوع حلال به کار رفته، تفاوت در شرایط استخراج ترکیبات فنولی از گیاه چای سبز و تفاوت در منطقه کشت گیاه چای سبز باشد [۳۳].

۳-۲- میزان فلاوونوئید

فلاوونوئیدها طیف وسیعی از متابولیت ثانویه گیاهی و گروهی متنوعی از پلی فنل‌های گیاهان هستند. این ترکیبات نقش مهمی در فعالیت بیولوژیکی و شیمیایی نظیر خواص آنتی اکسیدانی ایفا می‌کنند. میزان فلاوونوئید بر حسب میلی‌گرم کوئر سیتین بر گرم عصاره هیدروالکلی چای سبز حدود ۳/۸٦ تعیین شد. آنیتا و همکاران(۲۰۱٤) نیز میزان فلاوونوئید عصاره اتانلی چای سبز را حدود ۷,۵ میلی‌گرم بر گرم کوئرسیتین گزارش کردند [۳۲]. در حالی که در مطالعه‌ای دیگر محققان میزان فلاوونوئید عصاره چای سبز را ۳۵۰ میلی گرم کوئرسیتین بر گرم عصاره چای سبز تعیین کردند [۳٤]. تفاوت در میزان فلاوونوئید در مطالعات گوناگون را نیز می‌توان به تفاوت در آب و هوای کشت این گیاه در مناطق مختلف نسبت داد.

۳-۳- فعالیت ضد مخمری عصاره هیدرو الکلی چای سبز

نتایج حاصل از بررسی قطر هاله عدم رشد (دیسک دیفوزیون و چاهک) غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی چای سبز علیه سه مخمر عامل فساد مواد غذایی (*کلویورومایسس مارکسیانوس*، *ساکارومایسس سرویزیه* و *رودوتورولا گلوتنیس*) بر حسب میلی‌متر در جدول ۱ آمده است. نتایج نشان می‌دهد که در هر دو روش (دیسک دیفوزیون و چاهک) رابطه مستقیم بین میزان غلظت عصاره با میزان بازدارندگی وجود دارد به طوری که با افزایش غلظت عصاره چای سبز میزان هاله عدم رشد نیز به طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین تفاوت معنی‌داری بین سه جنس مخمر دیده شد ($p < ۰/۰۵$). به طوری که *ساکارومایسس سرویزیه* نسبت به *رودوتورولا گلوتنیس* و *کلویورومایسس مارکسیانوس* حساسیت بیشتری نسبت به عصاره چای سبز از خود نشان داد. همان‌طور که در جدول ۱ آمده است، عصاره چای سبز در غلظت ۲۵ و ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر رشد مخمر *رودوتورولا گلوتنیس* و در غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در روش دیسک و در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در روش چاهک بر روی *کلویورومایسس مارکسیانوس* تاثیری نداشته است و هاله عدم رشد تشکیل نشد. بنابراین، عصاره چای سبز، قادر به کاهش فعالیت مخمرهای مورد آزمون شد. کیم و همکاران (۲۰۱۳) اثر ضد قارچی عصاره آبی چای سبز را در برابر مخمر *کاندیدا آلبیکنس* به روش دیسک دیفوزیون بررسی و گزارش کردند که هیچ هاله عدم رشدی در اطراف دیسک حاوی عصاره چای سبز تشکیل نشد [۳۵]. آرکانا و همکاران (۲۰۱۱) نیز اثر ضد میکروبی عصاره متانولی چای سبز را بر علیه *آسپرژیلوس نیجر* و *کاندیدا آلبیکنس* مطالعه کردند و مشاهده نمودند که میزان قطر هاله عدم رشد در مورد *کاندیدا آلبیکنس*، ۲۰ میلی‌متر ولی برای *آسپرژیلوس نیجر* صفر بود که با نتایج مطالعات ما از لحاظ تاثیر عصاره چای سبز بر قارچ‌ها و تفاوت در حساسیت سوش-های مختلف میکروبی مطابقت دارد [۳٦]. نتایج میزان حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی عصاره چای سبز نیز در جدول۲ آمده است. براساس نتایج بدست آمده *ساکارومایسس سرویزیه* با حداقل غلظت مهارکنندگی ۱۲/۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نسبت به *کلویورومایسس مارکسیانوس* و *رودوتورولا گلوتنیس* از حساسیت بیشتری نسبت به عصاره چای سبز برخوردار بود. در مطالعه‌ای میزان حداقل غلظت بازدارندگی عصاره هیدروالکلی چای سبز را در غلظت‌های ۲۰، ٤۰، ٦۰، ۸۰ و۱۰۰ میکرولیتر با روش رقیق‌سازی در محیط مایع بر روی *آسپرژیلوس نیجر* ، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و*کاندیدا آلبیکنس* بررسی شد و نتایج نشان داد که عصاره چای سبز بر روی این میکروارگانیسم‌ها

تاثیری نداشت [۳۷]، که با مطالعات ما از لحاظ تاثیر ناچیز عصاره چای سبز بر قارچ‌ها مطابقت ندارد. هیراساوا و همکاران (۲۰۰٤) نیز تاثیر مهارکنندگی اپی‌گالوکاتچین گالات را بر روی *کاندیدا آلبیکنس* با روش رقیق سازی محیط مایع بررسی کردند و میزان حداقل غلظت مهارکنندگی آن را ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر گزارش کردند که از لحاظ نتایج تاثیر بر روی مخمر با مطالعات ما مطابقت دارد [۳۸]. فعالیت ضد میکروبی عصاره چای سبز به دلیل حضور آلکالوئیدها، کاتچین، تانن و فلاوونوئیدهای موجود در آن می‌باشد ، کاتچین موجود در عصاره چای سبز باعث کاهش سیالیت غشاء سلول در هر دو ناحیه هیدروفوب و هیدروفیل لایه فسفولیپیدی میکروارگانیسم‌ها می‌شود. فعالیت ضد میکروبی کاتچین غالباً به خاطر آزاد سازی اسید گالیک و گروه هیدروکسیل و مهار فعالیت DNA پلی‌مراز سلول می‌باشد [۳۹]. در مطالعه‌ای تویوشیما و همکاران (۱۹۹۳) مکانیسم ضد قارچی کاتچین‌های چای سبز علیه تریکوفیتون متنا گروفیت را با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند که تاثیر ضد قارچی کاتچین بدلیل حمله به غشای سلولی و لیز کردن هیف و کنیدی می‌باشد [٤۰]. ونگ (۲۰۰٦) بیان اشته که گالیک اسید در غلظت‌های بیشتر از ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌توانند بر روی قارچ‌ها تاثیر بازدارندگی داشتند [٤۱].

Table 1 Antifungal activity (diameter of the inhibition zones in mm) of green tea extract(mg/ml) by disc diffusion and well diffusion technique

Kluyveromyce marxianus	*Saccharomyces cerevisiaea*	*Rhodotorula glutinis*			
9.67±0.33^{cd}	19±0.57^{a}	14.33±0.33^{b}	100	disc diffusion	green tea extract
8±0.57^{d}	15.33±0.33^{b}	9.5±0.28^{cd}	50		
5±0.57^{e}	14.83±0.16^{b}	**0**^{f}	25		
0^{f}	14±0.28^{b}	**0**^{f}	12.5		
8.67±0.57^{cd}	21±0.57^{a}	10.33±0.57^{c}	100	well diffusion	
6±0.57^{e}	19±0.57^{ab}	7.33±0.57^{cde}	50		
^{f}**0**	17.33±0.57^{b}	4±0.57^{e}	25		

Values in the same column with different letters are significantly different ($p < 0.05$) as measured by Results are mean ± SD of three determinations

Table 2 Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of green tea extract(mg/ml)

Saccharomyces cerevisiaea	*Rhodotorula glutinis*	*Kluyveromyce marxianus*		
12.5	25	25	**MIC**	green tea extract
70	70	70	**MFC**	

MIC = minimum inhibitory concentration
MFC = minimum fungal concentration

۳-٤- حداقل غلظت بازدارندگی عصاره هیدروالکلی چای سبز درشیر استریل

نتایج میزان حداقل غلظت بازدارندگی عصاره هیدروالکلی چای سبز درشیر استریل در جدول ۳ گزارش شده است. در محیط شیر استریل *رودوتورولا گلوتنیس* در زمان‌های مختلف ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت نسبت به *ساکارومایسس سرویزیه* و *کلویورومایسس مارکسیانوس* نسبت به عصاره چای سبز از حساسیت بیشتری برخوردار است. علاوه بر این حداقل غلظت بازدارندگی عصاره چای سبز علیه مخمرهای مورد آزمون در شیر استریل کمتر از مقدار بدست آمده در محیط کشت است. فعالیت ضد قارچی کاتچین به میزان pH بستگی دارد که در این زمینه هیراساوا و تاکادا (۲۰۰۳) اثبات کردند که فعالیت ضد قارچی کاتچین‌ها با کاهش pH کاهش پیدا می‌کند به طوری که میزان حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره چای سبز با کاهش pH از ۷ به ٦ حدود ۱۰ برابر کاهش داشته است. بنابراین می‌توان دلیل تاثیر بازدارندگی قوی عصاره چای سبز بر رشد مخمرها در شیر استریل نسبت به محیط کشت را به pH بالای شیر استریل نسبت داد [۳۸]. با

توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای بر روی خاصیت ضد میکروبی عصاره چای سبز در شیر صورت نگرفته است بنابراین نتایجی برای مقایسه در دسترس نمی‌باشد. اما تحقیقات مشابه در شیر صورت گرفته مثل رزمجو و همکاران (۱۳۹٤) که در مطالعه‌ای نشان دادند که عصاره پرتغال رشد کاندیدا آلبیکنس را در شیر طی زمان‌های ٦، ۱۲، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت مهار می‌کند که از لحاظ کاهش مخمر توسط عصاره در شیر با مطالعه ما مطابقت دارد [٤۲].

Table 3 Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of green tea extract(mg/ml) in sterilized milk

Saccharomyces cerevisiaea			*Kluyveromyce marxianus*			*Rhodotorula glutinis*			
24 (h)	48 (h)	72 (h)	24 (h)	48 (h)	72 (h)	24(h)	48 (h)	72(h)	
6.25	12.5	12.5	6.25	12.5	25	3.125	6.25	6.25	green tea extract

٤- نتیجه گیری

بررسی نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره چای سبز بکار رفته در این تحقیق به علت دارا بودن ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی بالا بر روی مخمرهای عامل فساد مواد غذایی موثر می‌باشد. لذا استفاده از عصاره چای سبز به عنوان یک ترکیب ضد میکروبی طبیعی در مواد غذایی، به ویژه در مواد غذایی با اسیدیته پایین نظیر شیر مناسب به نظر می‌رسد.

٥- منابع

[1] Belletti, N., Kamdem, S.S., Patrignani, F., Lanciotti, R., Covelli, A., and Gardini, F. 2007. Antimicrobial activity of aroma compounds against *Saccharomyces cerevisiae* and improvment of microbiological stability of soft drinks as assessed by logistic regression. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 5580–5586.

[2] Belletti, N., Kamdem, S.S., Tabanelli, G., Lanciotti, R., and Gardini, F. 2010. Modeling of combined effects of citral, linalool and B-pinene used against *Saccharomyces cerevisiae* in citrus-based beverages subjected to a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*. 136: 283–289.

[3] Fleet, G. H. 1990. Yeasts in dairy products. A review. *Journal of Applied Bacteriology*.68: 199–211.

[4] Ray, B. 1996. Fundamental food microbiology. Boca Raton: CRC Press.

[5] Stratford,M., Plumbridge, A., and Archer, D.B. 2007. Decarboxylation of sorbic acid by spoilage yeasts is associatedwith the PAD1 gene. *Applied and EnvironmentalMicrobiology*. 73: 6534–6542.

[6] Forsythe, S. J. 2004. Microbiologia da segurança alimentar. Porto Alegre:Artmed.

[7] Wojtatowicz, M., Chrzanowska, J., Juskekyk, P., Skib, A., and Gdula, A. 2002. IdentiWcation and biochemical characteristics of yeast myco-Xora of Rokpol cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 69,135–140.

[8] Esfandiari, Z., Badiey, M., Mahmoodian, P., Sarhangpour, R., Yazdani, E., and Mirlohi, M. 2013. Simultaneous determination of sodium benzoate, potassium sorbate and natamycin content in Iranian drink (Doogh) and the associated risk of their intake through doogh consumption. *Iranian Publication Health*. 42(8): 915-920.

[9] Filtenborg, O., Frisvad, J. C., and Thrane, U. 1996. Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*. 33(1): 85-102.

[10] Yesil Celiktas, O., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E. F., Vardar Sukan, T., and Baser,K. H. C. 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100: 553–559.

[11] Tepe, B., Daferera, D., Sökmen, M., Polissiou, M., and Sökmen, A. 2004. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigii* M. zohary et ph davis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(5): 1132-1137.

[12] Melnick, S. J. 2006. Developmental therapeutics: Review of biologically based

CAM therapies for potential application in children with cancer. *Part I. Journal of pediatric hematology/oncology*. 28: 221-230.

[13] van Kessel, K., Assefi, N., Marrazzo, J., and Eckert, L. 2003. Common complementary and alternative therapies for yeast vaginitis and bacterial vaginosis: A systematic review. *Obstetrical & gynecological survey*. 58: 351-358.

[14] Kalemba, D., and Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10, 813–829

[15] Banerjee, S., Manna, S., Saha, P., Panda, C K., and Das, S. 2005. Black tea polyphenols suppress cell proliferation and induce apoptosis during benzo-(a)pyrene-induced lung carcinogenesis. *European Journal of Cancer Preventio*n. 14: 215-221

[16] Yang, C. S., Maliakal, P., and Meng, X. 2002. Inhibition of Carcinogenesis by Tea. Annual Review of *Pharmacology and Toxicology*. 42(1): 25-54.

[17] Yang, C. S., Lambert, J. D., Ju, J., Lu, G., and Sang, S. 2007. tea and cancer prevention: molecular mechanisms and human relevance. *Toxicology And Applied Pharmacology*. 224(3): 265-273.

[18- Karori, S.M., Wachira, F. N.,Wanyoko, J. K., and Ngure, R. M. 2007. Antioxidant capacity ofdifferent types of tea products. *African Journal of Biotechnology*. 6(19): 2287−2296.

[19] An, B. J., Kwak, J. H., and Son, J. H. 2004. Biological and antimicrobial activity of irradiated green tea polyphenols. *Food Chemistry Journal*. 88(4): 549-55.

[20] Nasrollahi, g., yadegari, d. H & Moazeni, SA. D. 1388. Antifungal of green tea leaves Polyphenol on Candida albicans. *Madras Medical Sciences*. 12 (3): 77-71.

[21] Tserennadmid, R., Takó, M., Galgóczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vágvölgyi, C., Almássy, K., and Krisch, j. 2011. Anti yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *International Journal of Food Microbiology*. 144 : 480–486

[22] Durling, N. E. , Catchpole, O. J., Grey, J. B., Webby, R. F., Mitchell, K. A., Foo, L. Y., and Perry, N. B. 2007. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (Salvia officinalis) using ethanol – water mixtures. *Food Chemistry*. 101: 1417 – 1424.

[23] Slinkard, K., and Singleton, V. L. 1977. Total phenol analysis; automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. 28: 49-55.

[24] Mohsen, S. M., and Ammar, A. S. 2009. Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food chemistry*. 112(3), 595-598.

[25] Chang, Y.L., Kim, D.O., Lee, K.W., Lee, H.J., Lee, C.Y. 2002. Vitamin C equivalent anti oxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 50(13):3713-3717.

[26] Shafei, M., Sharifan, A., Aghazade Meshki, M. 2012. Composition of Essential Oil of *Ziziphora clinopodioides* and Its Antimicrobial Activity on *Kluyveromyces marxianus*. Food Technology & Nutrition . 9(1): 101- 107

[27] NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)., 2000a. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests. Approved Standard, M2-A7.

[28- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)., 2000b. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, M7-A5.

[29] Wong, C. C., Li, H. B., Cheng, K. W., and Chen, F. 2006. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*. 97(4): 705-711.

[30] Tsai, T. H., Tsai, T. H., Chien, Y. C., Lee, C. W., and Tsai, P. J. 2008. In vitro antimicrobial activities against cariogenic streptococci and their antioxidant capacities: A comparative study of green tea versus different herbs. *Food Chemistry*. 110(4), 859-864.

[31] Rababah, T. M., Hettiarachchy, N. S. and Horax, R. 2004. Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, ginger, rosemary, gotu kola, and ginkgo extracts, vitamin E, and tert-butylhydroquinone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(16): 5183-5186.

[32] Anita, P., Sivasamy, S., Kumar, P. M., Balan, I. N., and Ethiraj, S. 2014. In vitro antibacterial activity of Camellia sinensis extract against cariogenic microorganisms.

Journal of Basic and Clinical Pharmacy.6(1): 35-

[33] Rusak, G., Komes, D., Likić, S., Horžić, D., and Kovač, M. 2008. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chemistry*. 110(4): 852-858.

[34] Subramaniam, P., Eswara, U., Maheshwar Reddy, K. R. 2012. Effect of different types of tea on *Streptococcus mutans*: An *in vitro* study. *Indian Journal of Dental Research*. 23: 43-8.

[35] Kim, S. H., Lee, L. S., Bae, S. M., Han, S. J., Lee, B. R., and Ahn, W. S. 2008. Antimicrobial and antifungal effects of a green tea extract against vaginal pathogens. Journal of Women's Medicine.1(1): 27-36.

[36] Archana, S., and Abraham, J. 2011. Comparative analysis of antimicrobial activity of leaf extracts from fresh green tea, commercial green tea and black tea on pathogens. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 1(8): 149-152.

[37] Hirasawa, M., and Takada, K. 2004. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against Candida albicans. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 53(2): 225-229.

[38] Williamson, M. P., McCormick, T. G., Nance, C. L., and Shearer, W. T. 2006. Epigallocatechin gallate, the main polyphenol in green tea, binds to the T-cell receptor, CD4: Potential for HIV-1 therapy. Journal of allergy and clinical immunology. 118(6): 1369-1374.

[39] Jane,H. 2001. Micronutrient research for optimum health. tea and chronic disease prevention.Http://1pi. Oregonstate. Edu/Nsw1trmain.Htm1.

[40] Toyoshima, Y., Okubo, S., Toda, M. et al. 1993. Effect of catechin on the ultrastructure of Trichophyton mentagrophytes. Kansenshogaku Zassh.i 68: 295–303

[41] Wang, L. P., 2006, Experimental study on antitumor effect of gallic acid. Jilin University, China: Master Thesis. Wijngaard, H. H., Rle, C., and Brunton, N., 2009, Asurvey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants, Food Chemistry, 116(1), 202-207.

[42] Razmjoo, M., Khak,i P., Faghih Nasiri, M., Rezaei K. 2016. Possibility Study of Multilayer Encapsulation by External Gelation Procedure on the Survival of Probiotic Bacteria Undergoing Orange Juice Pasteurization. Iranian *Journal of Nutrition Sciences & Food Technology.* 11(1):59-66

Evaluation of the antimicrobial activities of green tea extract in media and sterilized milk

Eisazadeh, S. [1], Khomeiri, M. [1*], Sadeghi, A. R. [1], Kashaninejad, M. [1], Mirzaei, H. [1]

1. Department Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

(Received: 2016/04/11 Accepted: 2016/07/10)

Yeasts and molds are considered as major causes of spoilage of acidic foods. Various studies have shown that green tea (*Camellia sinensis*) has antimicrobial properties. the study aimed to investigate the anti-yeast activity of green tea extract in the plate and sterilized milk. Total phenol and flavonoid content were determined by colorimetric method. Anti-yeast activity of green tea against *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* and *Rhodotorula glutinis* was measured using well diffusion and disk diffusion agar. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (MFC) of green tea were examined by micro dilution in plate and by macro-dilution in sterilized milk in tubes. MIC of green tea extract was in range of 12.5 to 25 mg/ml in microdilution method and 6.5 to 25 mg/ml in macro dilution method. *Kluyveromyces marxianus* was the most resistant yeast against green tea extract. Consequently, because of the positive effect of green tea extract against the studied yeasts, it could be utilized as an anti-yeast compound in food and drug technology.

Keywords: Green tea extract, Anti-yeast, Milk

* Corresponding Author E-Mail Address: khomeiri@gau.ac.ir