تأثير مستخلص كاتكينات catechins الشاي الأخضر(Camellia sinensis) في نمو بعض انواع البكتريا و أمكانية استخدامه في حفظ اللحوم

قيثار رشيد مجيد ناريمان عظيم شناع

قسم علوم الأغذية- كلية الزراعة - جامعة البصرة – جمهورية العراق

المستخلص:

تمت دراسة تأثير المستخلص المائي والكاتكينات لنبات الشاي الاخضر(Camelliasinensis) في تثبيط نمو بعض انواع البكتريا المرضية والمسببة لتلف الأغذية . اضافة الى امكانية استخدامه كمادة حافظة في انظمة اللحوم . اظهرت النتائج وجود فروق معنوية عالية 0.05p > بين المستخلصين المائي والكاتكينات ، إذ اظهر مستخلص الكاتكينات تأثيرا قويا ، وبفرق معنوي 0.05p> تجاه بكتريا Pseudomonas aeruginosa مقارنة بالمستخلص المائي . بينما لم تظهر فروق معنوية بين المستخلصين تجاه بكترياSalmonella typhi و Staphylococcus aureus . ولدى اضافة المستخلص المائي ومستخلص الكاتيكينات بتراكيز (100و 300 و 900)جزء بالمليون إلى اللحم ألبقري المفروم والمخزن بدرجة حرارة 4 م لمدة 15 يوماً . و قياس الرقم البيروكسيدي ، أظهرت النتائج زيادة طفيفة في رقم البيروكسيد بالنسبة إلى تركيزي(300 و 900) جزء بالمليون ، بينما كان تركيز 100جزء بالمليون غير كافي لإحداث التأثير المرغوب والحد من تطور الرقم البيروكسيدي ، في حين أظهرت معاملة السيطرة ارتفاعا واضحا في رقم البيروكسيد مع طول مدة الخزن . كما و تم قياس المحتوى الكلي للنتروجين المتطاير TVN، إذ أظهرت النتائج أن التأثير الأكبر كان للتركيز 900جزء بالمليون بينما انعدم وجود التأثير المعنوي لمستخلص الشاي الأخضر (المائي و الكاتيكينات) عند تركيز 100 . ولدى تقدير العدد الكلي للبكتريا في عينات اللحم المفروم والمعامل بالتراكيز المختلفة ، دلت النتائج على ان لمستخلصات الشاي الأخضر تأثيرا ملحوظا في منع تطور التغيرات الكيميائية ونمو الأحياء ألمجهريه وذلك عند إضافتها بتراكيز عالية 900جزء بالمليون، وأقل تأثيرا بتراكيز 100. وأمكن الاستنتاج بأمكانية استخدام مستخلص الكاتيكينات كمادة حافظة لزيادة العمر الخزني للحم .

الكلمات المفتاحية : الشاي الاخضر (Camellia sinensis) ، الكاتكينات ، حفظ اللحوم

Effect of catechins extract of green tea (Camellia sinensis) in growth of some bacteria and an attempt to useit in meat preservation

Kithar R. Majeed Nareman A . Shnaa

Department of Food Sciences - College of Agriculture - University of Basrah- Republic of Iraq

Abstract

This study was carried out to detect the effect of aqueous and catechins extract of green tea (Camellia sinensis) in the growth of some pathogenic and spoilage bacteria, and attempting to use themin preservative of meat. Results showed high significant differences $p<0.05$ between aqueous and catechin extract .Catechins effect showed high significant $p<0.05$ toward Pseudomonas aeruginosa in compare with the aqueous extract. However no significant differences were detected between the extracts towards Salmonella typhi and Staphylococcus aureus. Aqueous and catechins extract were added in concentrations of (100, 300 and 900) ppm to the minced meat and stored at a temperature 4C° for 15 days.

Results showed that low increasing in the peroxide value was reported when concentrations of 300 and 900 ppm were used, while a concentration of 100ppm was not enough to reduce the peroxide value. However, control samples showed an increase in the peroxide values with extending the period of storage. When the volatile nitrogen was evaluated, results showed that using a concentration of 900ppm gave the greatest affect, while no significant influence of green tea (aqueous, catechins) extracts with a concentration of 100ppm was shown . Total bacterial counts of minced meat was also determined .Results showed that Green tea extracts had the greatest effectiveness in preventing the development and growth of microorganisms when a high concentration of (900ppm)was added. The results also showed that green tea extracts had the highest effectiveness in preventing development of chemicals changing and growth of microorganisms when high concentration (900ppm) was added and less effect at a concentration of (100ppm). It can be concluded that the catechins of green tea could be used in preservation and extending the shelf life of meats.

Keywords**:** Green Tea (Camellia sinensis), Catechins, Meat preservative

المقدمة:

احتلت النباتات الطبية ذات الخصائص المضادة للأحياء المجهرية، مكانة وأهمية كبيرة بمعالجة المشكلات الناجمة عن ألأحياء ألمجهريه ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية ، دون أي مؤثرات جانبية تذكر (22) . ومن هذه النباتات المهمة هو الشاي الأخضر ، أكتشف نبات الشاي ألأخضر في سنة 2737 قبل الميلاد في الصين أي منذ أكثر من 4000 سنة حيث كان يستخدم كشرابا طبيا .يعرف نبات الشاي الأخضر علميا باسم Camellia sinensis وهو يحتوي على العديد من المركبات الكيميائية المتعددة الفوائد لصحة الإنسان، حيث يعد مصدرا جيد اللفلافونيدات (Flavonoids) كمضادات أكسدة طبيعية بالإمكان استخدامها بديلا عن مضادات الأكسدة الصناعية قليلة الضرر.

ومن المكونات المهمة الموجودة في الشاي مركبات Polyphenol catechins التي هي مركبات فينولية تظهر بشكل سائد ورئيسي في الشاي الاخضر اذ إن مركبات الكاتكينEpiCatechinGallate (ECG) و (Epi Gallo CatechinGallate EGCG)تمتلك أعلى فعالية مضادة للأكسدة . وان آلية فعله المضاد للأكسدة تتعلقب صورة مباشرة بتركيب الحلقة الاروماتية ومجموعة الهيدروكسيل التي تشكل تركيبها، ويؤدي ذلك إلى تثبيط الجذور الحرة بواسطة مجموعة الهيدروكسيل،وكذلك الارتباط مع ايونات المعادن كالنحاس والحديد (العناصر المحفزة على تكوين الجذور الحرة). وتكمن خصائص الشاي الأخضر المضادة للأكسدة بكونه لا يثبط الاكسدة في الانظمة الحيوية فقط وإنما كمضافات غذائية في الأنظمة الغذائية والحماية تجاه التأثيرات التاكسدية (19).

صنف الشاي الأخضر غذاء وظيفياً(Functional food) لوظائفه المهمة والأساسية في تحسين مدة الخزن للمنتجات الغذائية وفعاليته المضادة للأحياء ألمجهرية والقضاء على البكتريا الضارة المسببة للتلف والفساد فضلا عن ذلك تعزيز الطعم والنكهة واللون والقيمة الغذائية. وتعد مستخلصات أوراق الشاي الأخضر مصدرا أساسيا وحيويا للمركبات الكيميائية الفعالة مثل الفلافونيدات والفينولات المتعددة والفينولات البسيطة والتانينات والتربينات والقلويدات ،ذات التأثير المضاد للأحياء ألمجهريه ، وبين العديد من الباحثين فعالية هذه المركبات عند استخدام التقنيات الحديثة والمتطورة التي تقود إلى تجزئة المركبات الفعالة للشاي الأخضر للتعرف على المركبات الفعالة الأساسية (23) . ونتيجة للخطورة الصحية التي قد تحدثها بعض المضافات الغذائية لاسيما الكيميائية . هدفت هذه الدراسة الى التحري في أمكانية استخدام المستخلص المائي والكاتكينات للشاي الأخضر كوسيلة لحفظ اللحوم وتحسين مدة الخزن.

المواد وطرائق العمل :

المواد:

الشاي الأخضر:

تم الحصول على الشاي الأخضر الخشن من السوق المحلية (وكان يحمل العلامة التجارية المعروفة بالوزة) والمصنع في سيريلانكا .وأجريت عملية الطحن لأوراق الشاي بواسطة مطحنة كهربائية ، بعدها حفظ في أنابيب زجاجية

معقمة ومحكمة الغلق في درجة حرارة 4 مئوية لحين الاستعمال .

1-تحضير مستخلصات الشاي الأخضر:

أ-المستخلص المائي:

استخدمت طريقة Anesini وPerez (2) في تحضير المستخلص المائي البارد وذلك بوزن 20 غم من مسحوق الشاي الأخضر ووضعه في دورق وأضيف له 200مل ماء مقطر ، ترك الدورق في الحاضنة الهزازة incubator)(Shaker لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 35 م ثم نبذ بواسطة جهاز الطرد المركزي (Portable) centrifuge بواقع 2500 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق ، بعدها رشح الرائق بورق ترشيح رقم 1 (Whatman No.1) ، عرض الراشح للتبخير في الفراغ باستخدام جهاز المكثف (Rotary vacuum evaporator) ،لحين تكون سائل كثيف تم تبخيره بدرجة حرارة منخفضة بواسطة جهاز التجفيد (Freezdryer) للحصول على مسحوق جاف.

ب -مستخلص الفلافونيدات (الكاتكينات) Catechins flavonides:

حضر طبقاً للطريقة الموصوفة من قبل Jin (14) وعلى مرحلتين :

1- وزن 100غم من مسحوق أوراق الشاي الأخضر وأضيف له 250 مل ماء مقطر ، بعدها وضع في حمام مائي (Water bath) بدرجة حرارة 50 م° ولمدة أربع ساعات ، ثم رشح الخليط بأوراق ترشيح رقم 1 بواسطة مضخة تخلخل ضغط ، وأهمل الراسب .

2- تمت تنقية المستخلص من المركبات غير القطبية بإضافة الكلوروفورم إلى المزيج في قمع الفصل وبنسبة 1 : 1 (حجم المستخلص المائي : الكلوروفورم) وخلط المزيج جيدا وترك لمدة ساعة لانفصال الطورين ، الطور العلوي (الطور المائي) و الطور الأسفل (الكلوروفورم) الذي تم التخلص منه ، أما الطور المائي فحفظ في وعاء نظيف ، ثم عزل مزيجالكاتيكينات (Catechinsmaxiture) باستخدام خلات الاثيل (Ethyl acetate) بإضافته إلى الطبقة العليا في قمع الفصل وبنسبة 1 : 1 ومزج جيدا وترك لمدة 24 ساعة لانفصال الطورين ،تمثل الطبقة العليا خلات الاثيل التي تم التخلص منها ، فيما تمثل السفلى الطبقة المائية التي تم تركيز باستخدام المكثف وبدرجة حرارة لا تزيد عن 50 م° حتى الجفاف للحصول على مزيج الكاتكيانات.

ج : تشخيص ا لمركبات الفعالة في مستخلص الكاتكينات:

تم تشخيص المركبات الفعالة بواسطة جهاز Fourer Trans Infra Red(FTIR) في قسم الكيمياء / كلية العلوم / جامعة البصرة . إذ مزج المستخلص مع بروميد البوتاسيوم وعملت أقراص جافة من المزيج ، وسجل طيف الأشعة تحت الحمراء .

د- الكشف عن مركبات الكاتكين:

تم الكشف عنها باستخدام تقنية Thin Layer Chromatography (TLC) وهي عبارة عن طبقة رقيقة من الألمنيوم مطلية بطبقة من هلام السليكا ، بابعاد 20x20 وسمك 0.2 ملم والمجهزة من شركة Fluka الألمانية ، وحاوية

على مادة متفلورة عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية . وذلك بوزن 0.01 غم من خليط الكاتكينات ، وأذيب في 10مل كحول أثيلي ، ووضع النموذج على بعد 2سم أسفل الشريحة على شكل بقع بأستعمال أنابيب شعرية وبأستعمال نظامين للفصل :

1-خلات الاثيل : بنزين بنسبة 9:11

2-حامض الخليك : كلوروفورم بنسبة 9:1

تم وضعها في وعاء الفصل كلا على انفراد ، بعدها ترك المحلول يصل إلى ارتفاع 15سم ، بعدها تركت الصفائح تجف بالهواء ، وفحصت مصدر للأشعة فوق البنفسجية عند طول موجي 280 نانوميتر (7) .

2-اختبار فعالية المستخلصات المختلفة على النمو البكتيري:

1- العزلات البكتيرية

تم الحصول على سبعة أنواع من العزلات البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة كرام المعزولة من مصادر مختلفة منها مرضية وأخرى ملوثة للأغذية، وهذه العزلات هي : Salmonella typhiو.Bacillus spp من مختبرات الاحياء المجهرية في مستشفى البصرة التعليمي و Micrococcus roseusو Klebsiella pneumonia و Escherichia coli (من مختبر ابحاث البكتريا في قسم علوم الحياة/ كلية التربية/ جامعة البصرة) و Staphylococcus aureus و Pseudomonas aureoginosa (من قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة / جامعة البصرة) .

2- أختبار الفعالية:

استخدمت طريقة Agar well diffusion وكالاتي: صب 20 مل من الوسط (Muller Hinton Agar) لكل طبق زجاجي ، ثم لقح الوسط0.1 مل من العالق البكتيري ذو الكثافة الضوئية 0.1 عدد الخلايا $1x10^8$و.ت.م. مل$^{-1}$ (وحدة مكونة للمستعمرة بالميليلتر) ، عند طول موجي 480نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي(Spectrophotometer) ، وذلك باستخدام ناشر زجاجي معقم (Spreader) ، بعدها تركت الأطباق لمدة 30 دقيقة حتى الجفاف ، ثم عملت حفر باستخدام ثاقب معدني معقم قطره 5ملم، وأضيف 0.1 مل من المستخلص في كل حفرة بتركيز100ملغم.مل$^{-1}$باستخدام ماصة دقيقة (Micropipete). حضنت بعدها الأطباق بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة في الحاضنة ، ثم أخرجت الأطباق وتم قياس قطر منطقة التثبيط(بالملم) (أي المنطقة الخالية من النمو) (20).

3- استخدام مستخلص الشاي الأخضر في حفظ اللحم المفروم:

فرم اللحم ألبقري الطازج بواسطة ماكنة الفرم الكهربائية ، وحسبت نسبة الدهن والبروتين فيه على أساس الوزن الرطب ، بعدها قسم اللحم إلى سبعة معاملات بسبعة مكررات لكل منها ، وذلك بوضع اللحم في عبوات مدرجة محكمة الغلق بوزن 15 غم في كل عبوة ، عوملت ثلاث عبوات بالمستخلص المائي وثلاثة أخرى بمستخلص الكاتكينات بتراكيز (100 و300 و900) جزء بالمليون ، فيما تركت السابعة بدون إضافة للمقارنة (Control) للمقارنة . حفظت هذه العبوات في الثلاجة بدرجة حرارة 4م ولمدة 25 يوم.

4-الاختبارات الكيميائية والميكروبية للحم المفروم خلال مراحل الخزن المختلفة :1-رقم البيروكسيد :قدر رقم البيروكسيد وفقا للطريقة المذكورة في (5).

2- النتروجين الكلي الطيار Total Volatile Nitrogen Base (TVNB)

قدرت القواعد النتروجينية الطيارة حسب ما ذكر في (5) خلال مراحل خزن اللحم . وذلك بوضع 10غم من العينة في دورق تقطير بجهاز كلدال مع 2 غم من اوكسيد المغنيسيوم و غم من اوكسيد المغنيسيوم و 300 مل ماء مقطر ومادة مضادة للرغوة بأستخدام الكرات الزجاجية ورج جيدا . أما دورق الأستقبال فوضع فيه 25 مل من محلول حامض البوريك بتركيز 2 % وبضع قطرات من دليل المثيل الأحمر(Methyl red) ، جمع السائل المقطر في دورق الأستقبال ثم تسحيحه مع حامض الكبريتيك 0.1 عياري لحين الوصول الى اللون الوردي الفاتح (نقطة النهاية) وحسبت قيمته طبقا للقانون التالي:

TVNB(mN/100gm meat)=Titration(ml 0.1N H_2SO_4)X14

3- تقدير العدد الكلي للبكتريا: استخدمت طريقة Spread Plate Count المذكورة في (6) وباستعمال الوسط الآغر المغذي (nutrient agar) وحضنت الأطباق بدرجة حرارة (32 - 37) م ولمدة 48 ساعة.

4- الرطوبة: قدرت النسبة المئوية للرطوبة باستعمال فرن التجفيف بدرجة حرارة 105 م وحسب الطريقة الموصوفة في (4).

5- الدهن: قدرت النسبة المئوية للدهن بطريقة السوكسليت الموضحة في (4).

6- البروتين: قدرت النسبة المئوية للبروتين باستعمال طريقة كلدال الموصوفة في (4).

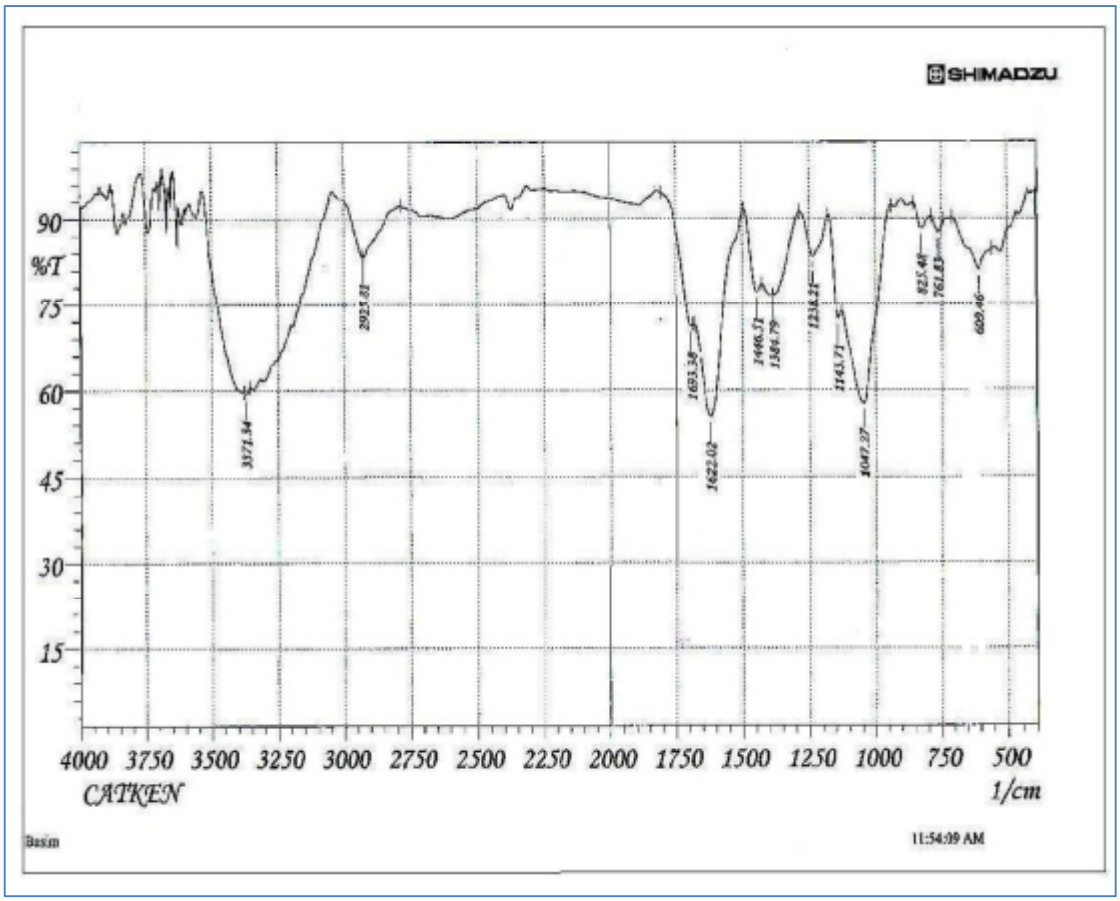
7- التحليل الإحصائي: تم إجراء التحليل الإحصائي ANOVA test وتحليل التباين Analysis of Variance عند مستوى احتمالية $P<0.05$ باستخدام البرنامج الإحصائي Statistical Package for Social Sciences (SPSS).

النتائج والمناقشة:

التشخيص الكيميائي للكاتكينات :

أظهرت نتائج كروماتوكرافي الطبقة الرقيقة لمستخلص الكاتكيناتتكون ست بقع واضحة عند أستظهارها بمصباح الأشعة فوق البنفسجية (صورة 1) والتي تم إستخلاصها بالكلورفورم وخلات الاثيل.بينما أظهرت نتائج تشخيص المركبات الفعالة في مستخلص الكاتكينات بواسطة جهاز FTIR (شكل 1) ، إن طيف الأشعة تحت الحمراء أعطى حزمة عريضة عند التردد (3371.34) سم$^{-1}$ والعائدة الى المجموعة (OH) ، وحزمة عند التردد (2925.50) سم$^{-1}$ العائدة الى المجموعة (CH) ، ولوحظ كذلك حزمة قوية الشدة عند التردد (1622.02) سم$^{-}$

الصورة (1) كروماتوكراقي الطبقة الرقيقة لمستخلص كاتكينات الشاي الأخضر بمصباح الأشعة فوق البنفسجية



الشكل(1) طيف الاشعة تحت الحمراء لمستخلص الكاتكينات

[1]والعائـــدة للمجموعـــة (C=C) ، واحتـــوى المسـتخلص علـى مجموعـة (C-O) إذ أعطـى طيف الاشعة تحت الحمراء حزمة عند التردد

(1047.27) ســم $^{-1}$وكـــذلك عنـــد التـــردد (1446.51) سـم$^{-1}$. يتضـح مـن ذلـك إن طيـف المركبات الفعالـة هو عبـارة عن جزيئـات تمتلك تركيبا حلقيا متعدد الهيدروكسيد ، وهذا مايفسر ظهور مجموعة (OH) على شكل حزم عريضة واسعة.

الفعاليـــة التثبيطيـــة للمستخلصـــات المائيـــة و الكاتكينـات لأوراق الشـاي الأخضـر علـى النمـو البكتيري:

أظهـرت النتـائج المبينـة فـي جـدول (1) وجـود فروق معنوية عند مستوى احتمالية $p < 0.05$ بين المستخلص المـائي ومستخلص الكاتكينـات ، إذ يشير الجدول الذي يضم معدلات أقطار مناطق التثبيط لنمـو العـزلات البكتيريـة المسـتخدمة فـي الدراسة بأن مستخلصات أوراق الشـاي الأخضـر هي مثبطـات قويـة لنمو معظم البكتريـا المرضـية الناشـئة والمنتقلـة عـن طريـق الغـذاء المسـتخدمة فـــي الدراســـة وهـــي : Bacillus sp.وSalmonellatyphi وStaphylococcus aureus وتتفـق هـذه النتـائج مـع مـا توصـل إليـهWeiduo(23) فـي دراسته حول التحليل البيولوجي للمركبات الفعالـة المضـادة للأحياء ألمجهريـه فـي مستخلص أوراق نبـات الشـاي الأخضـر، وان النتـائج المتباينـة أو التثبـيط الانتقـائي لمستخلصـات الشـاي الأخضـر تجـاه البكتريـا المختلفـة، ناشـئ بالأسـاس عـن اختلاف نوعية الشاي المستخدمة أو اختلاف فـي عمليـة التصـنيع،أو إجـراءات الاسـتخلاص أو ظـروف الاسـتخلاص أو نوعيـة المـذيبات المسـتخدمة (15) . كمـا و أظهـر مسـتخلص الكاتكينا تتأثيراً قوياً ، وبفرق معنوي عالي $p < 0.05$ تجـاه بكتريـا aeruginosa Pseudomonas مقارنـة بالمسـتخلص المـائي. وان التـأثير المثـبط للكاتكينـات يعـود إلـى قـدرة الكاتكينـات علـى تثبـيط تركيـب حامضـيDNA وRNA للخلية البكتيرية فضـلا عن ذلك عرقلـة تكوين البروتينات في جدار الخلية (21) .

كمـا و يعتمـد علـى بيروكسـيد الهيـدروجين المســتمد مــن تفاعــل Epi Gallo CatechinGallate (EGCG) مع الأوكسجين وهـذا التـأثير ناشـئ مـن تـداخل الكاتكينـات مـع الاوكسجين و الغشاء الخلوي والأنزيمات (13) و(3). كمـا ولـم تظهـر فـروق معنويـة بـين المستخلصين تجاه بكتريا Salmonella typhi و Staphylococcus aureus . ومن خلال استقراء النتـائج فـي الجدول (1) حول معدلات أقطار التثبيط ، ونتائج التحليل الإحصائي ، أمكن المقارنة بين المستخلصين وبيان درجة تأثيرهما فـي نمـو الأنـواع البكتيريـة فقـد كـان تـأثير المستخلص المـائي افضـل من تـأثير الكاتكينـات ، إذ أحتوى المستخلص المائي على مجموعـة من المركبات التي تظهر درجات عاليـة من الفعاليـة المضـادة للميكروبـات قياسـا بالكاتكينـات ، وان المركبـــات الثانويـــة فـــي الشـــاي الأخضـــر (الكاتكينـات) أو الفلافونيدات تسـاهم فـي الفعاليـة كعوامـل مـؤازرة (Synergistic factor) إذ وجد أن لها تأثير آتعاونياً فـي زيـادة وإطالـة تـأثير مركبات الشاي الأخرى مثل: (الكافيين) الذي يعد احـد المركبـات الحيويـة الفعالـة (10) و **(16) .** ويختلف تأثير الكاتكينـات علـى البكتريـا بـأختلاف

جدول (1) معدلات أقطار مناطق التثبيط لمستخلصي أوراق الشاي الأخضر (المائي والكاتيكينات) ضدالعزلات البكتيرية

معدلات قطر التثبيط(ملم)		
مستخلص الكاتكينات	المستخلص المائي	نوع البكتريا
تثبيط ضعيف ضبابي	17 ملم	Microccoccus roseus
11 ملم	6 ملم تثبيط ضعيف	Pseudomonas aeruginosa
14 ملم	22 ملم	Klebsiella pneumonia
لا يوجد تثبيط	8 ملم	Escherichia coli
16 ملم	20 ملم	Bacillus spp
8 ملم	10 ملم	Salmonella typhi
10 ملم	11 ملم	Staphylococcus aureus

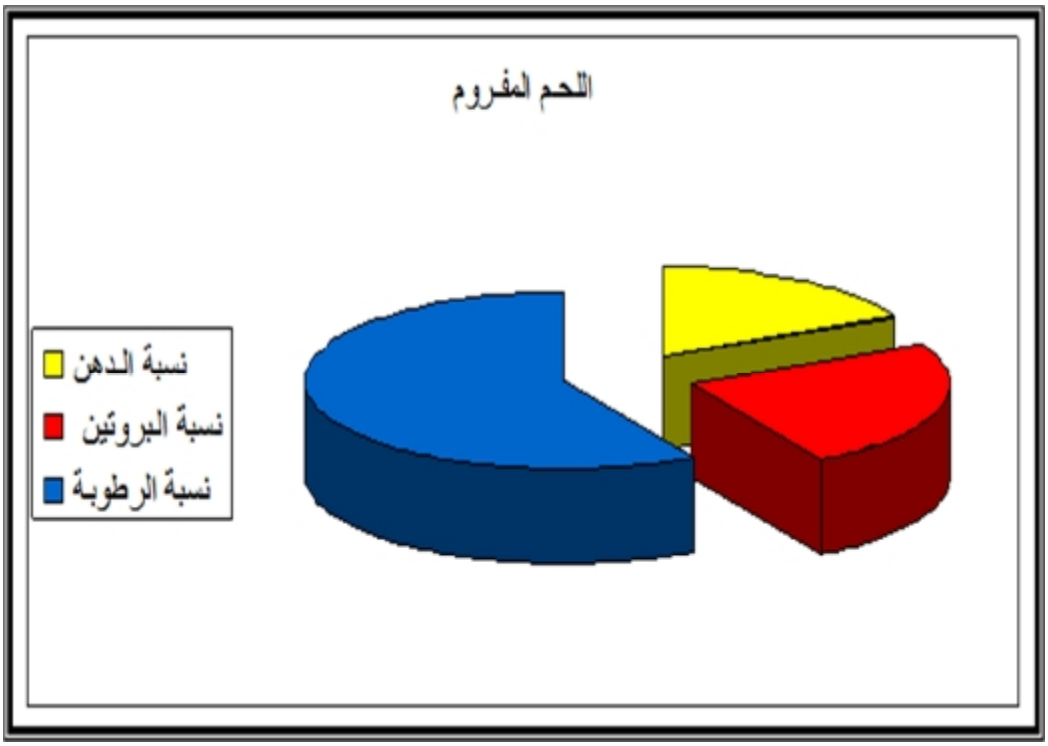
نوع البكتريا وجدرانها استخدام مستخلصي الشاي الأخضر(المائي، الكاتكينات) كمادة حافظة في اللحم ألبقري المفروم:

لدى إجراء مجموعة من الاختبارات الكيميائية والميكروبية للحم المفروم الخام والمضاف له تراكيز مختلفة من مستخلصي الشاي الأخضر (100 و 300 و900) جزء بالمليون ، خلال فترة الخزن بالتبريد 15 يوماً وعلى درجة حرارة 4 م ، تم في البداية حساب معدل المحتوى الرطوبي والبروتين والدهن حددت نسبتها في اللحم ألبقري المفروم قبل الخزن، حيث أظهرت النتائج إن نسبة البروتين بلغت 24.46% فيما بلغت نسبة الدهن 18.45% في حين كانت نسبة الرطوبة 60.16 % (الشكل 2).ولدى حساب العدد البكتيري الكلي للحم لعينة السيطرة(غير المعاملة بالمستخلصات) وجد أنه $2.3x10^3$ و.ت.م . غم$^{-1}$.

1-تقدير الرقم البيروكسيدي: Peroxide value number (POV): لمعرفة درجة تزنخ دهن اللحم التاكسدي، بمقارنة العينات المعاملة بالمستخلص (المائي والكاتكينات) مع عينات السيطرة التي لا تحتوي على المستخلص خلال مراحل الخزن. تمتقدير قيم POV وأظهرت النتائج (جدول 2) عدم وجود فروق معنوية في القيم الابتدائية للرقم البيروكسيدي لجميع المعاملات في اليوم الأول من الخزن والبالغة 1.25 ملي مكافئ . كغم$^{-1}$ لحم، أما بعد مرور5 أيام من الخزن، أظهرت معاملة السيطرة ارتفاعا واضحا في قيم البيروكسيد والتي كانت بحدود 4.5 ملي مكافئ. كغم$^{-1}$ لحم، في حين

كانت هناك زيادة قليلة في باقي المعاملات المتمثلة بالتراكيز t300 وt900 لمستخلص الكاتكينات وبالتراكيز m300وm900 للمستخلص المائي، ويعود السبب في ذلك إلى وجود المركبات المضادة للأكسدة الطبيعية في مستخلصات الشاي الأخضر مثل quercetin وtrolox و caffeic acidوrutin وcherogenic acid وcatechins وهي المركبات الأقوى في إزاحة الجذور الحرة (المفتاح لسلسلة التفاعلات التاكسدية) والارتباط بالحديد والنحاس (العوامل المحفزة لتشكيل الجذور الحرة) (9) ، بينما كانت المعاملتين t100 و m100 ذات تأثير ضعيف ، ويعود سبب ذلك إلى إن التركيز 100 جزء بالمليون يكون غير كافي لإحداث التأثير المرغوب والحد من تطور الرقم البيروكسيدي ، وبعد مرور 10 أيام من الخزن المبرد سجلت معاملة السيطرة ارتفاعا أكثر في رقم البيروكسيد مقارنة ببقية المعاملات بلغ 7.3 ملي مكافئ . كغم$^{-1}$ لحم ، في حين بلغت بقية المعاملات t900 وt300 وm900 وm300 (3.32 و5.11 و 3.21 و5.01) ملي مكافئ . كغم$^{-1}$ لحم على التوالي، أما بعد مرور15 يوماً من الخزن ارتفع رقم البيروكسيد لمعاملة السيطرة بوضوح قياسا ببقية المعاملات ، والاختلاف المعنوي سجل بين المعاملات t900 و t300 و m900 و m300 والمقارنة ، ويعود سبب ذلك إلى إن التراكيز العالية من مستخلصات الشاي الأخضر تكون فعالة جدا في السيطرة على الأكسدة ، والدراسة التي قام بها Alghazeer واخرون (1) قد أيدت هذه النتيجة ، من إن إضافة مستخلص الشاي الأخضر بتركيز 500 , 250) جزء بالمليون إلى شرائح السمك ، سبب نقصان في نسبة البيروكسيد والهيدروبيروكسيد المتشكلة خلال 8 أسابيع من الخزن عند (-10) درجة مئوية ، في حين لم تظهر فروقا واضحة بين المقارنة والمعاملتين t100 و m100. ويمكن الأستنتاج من هذه النتائج إن مستخلصات الشاي الأخضر فعالة جداً ليس فقط في أكسدة الدهون وإنما في منع تكوين الأحماض الدهنية الحرة عند مقارنتها مع غيرها من المستخلصات النباتية ، إذ وجد Kumudavally واخرون (17)أن الأحتفاظ برذاذ مستخلص الشاي الأخضر أدى الى اطالة فترة الحفظ للحم الضان الطازج لمدة فوق 4 أيام على درجة حرارة 25م، وذلك عندما سجل25 % زيادة في محتوى الأحماض الدهنية الحرة (FFA) بمستخلص الشاي الأخضر قياسا ب 85% زيادة في عينة السيطرة.

2- المحتوى الكلي للنتروجين المتطاير (TVN) Total Volatile Nitrogen : قدرت القواعد النتروجينية الطيارة الكلية خلال مراحل خزن اللحم لبيان درجة التحلل ألبروتيني الحاصل بواسطة الإنزيمات الموجودة طبيعيا باللحم أو عن طريق الإنزيمات المفرزة من قبل البكتريا . يتبين من الجدول (3) عدم وجود فروق بين معاملات اللحم ألبقري المفروم تجاه التغيرات الحاصلة في TVN في اليوم الأول من الخزن ، إذ بلغ 1.4 ملغم . 100 غم$^{-1}$وهذه النتيجة تتفق مع ماتوصلت إليه (11) حول إضافة مستخلص الشاي الأخضر إلى اللحم، وتأثيره على % TVN في زمن الصفر من الخزن ألتبريدي، أظهر عدم وجود فروق معنوية بين السيطرة والعينات قيد الدرسة. وبعد مرور7 أيام من الخزن



جدول(2)التغيرات الحاصلة في قيم الرقم البيروكسايدي (ملي مكافئ. كغم$^{-1}$ لحم) في معاملات اللحم ألبقري المفروم أثناء الخزن مدة 15 يوماً في درجة حرارة 4 مئوية

فترة الخزن (يوم)	المعاملات						
	C	t900	t300	t100	m900	M300	M100
1	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
5	4.5	2.25	2.75	3.92	2.0	2.90	4.11
10	7.3	3.32	5.11	6.92	3.21	5.01	6.51
15	12.5	5.2	6.12	10.4	5.0	7.01	9.97

(t) عينة اللحم المفروم المضاف لها مستخلص الكاتكينات بالتراكيز المختلفة ،(m)عينة اللحم المفروم المضاف لها المستخلص المائي بالتراكيز المختلفة.

جـدول (3) التغيـرات الحاصـلة فـي محتـوى النتـروجين القاعـدي المتطـاير(TVN) فـي معاملات اللحم ألبقري المفروم أثناء الخزن مدة 15 يومآ في درجة حرارة 4 مئوية

فترة الخزن (يوم)	المعاملات						
	C	t900	t300	t100	m900	M300	M100
1	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
7	4.2	2.8	4.2	4.2	2.8	4.2	4.2
14	16.8	10.2	15.4	16.8	9.8	14	16.8

(t) عينة اللحم المفروم المضاف لها مستخلص الكاتكينات بالتراكيز المختلفة ،(m)عينة اللحم المفروم المضاف لها المستخلص المائي بالتراكيز المختلفة

ظهر هنالك اختلاف واضح سجلته معاملة السيطرة بلغ 4.2 ملغم . 100 غم$^{-1}$ لحم ، وزيادة قليلة في TVN حصلت في عينات اللحم المعاملة بمستخلص الكاتكينات بتركيز900 جزء بالمليون (t900) ، وعينات اللحم المعاملة بالمستخلص المائي بالتركيز 900 جزء بالمليون (m900) ، إذ بلغت 2.8ملغم.100غم $^{-1}$ لحم ، في حين انعدم وجود التأثير المعنوي لمستخلصات الشاي الأخضر بالتركيز 100جزء بالمليون ، أما بعد مرور 14 يومآ من الخزن، ارتفعت قيمة % TVN لمعاملة السيطرة والمعاملات t100 و m100 وبوضوح قياسا بالمعاملات الأخرى ، إذ بلغت 16.8 ملغم.100 غم$^{-1}$ في حين سجلت المعاملات m900 وt900 (9.8 – 10.2) ملغم . 100 غم$^{-1}$لحمعلى التوالي. في حين بلغت قيمة TVN للمعاملتين m300 و t300 (14 – 15.4) ملغم . 100 غم $^{-1}$ لحم على التوالي. إن إضافة مستخلصات الشاي الأخضر (كمضادات أكسدة طبيعية) إلى اللحم ، يساهم في تعزيز جودة منتجات اللحم ، ومنع تحلل وفساد وتدهور صفاتها وخصائصها ، لإنتاج منتجات عالية الجودة وآمنة وهذه النتائج تتفق مع ما وجدته Ferial واخرون (11) بان إضافة مستخلص الشاي الأخضر بصورة منفردة كمضادات أكسدة إلى اللحم هو فعال تجاه إنقاص TVN ، ولهذا السبب تحسنت عملية الخزن بالتبريد والخصائص الحسية للحم.

3- حساب العدد الكلي للبكتريا (و.ت.م. غم$^{-1}$) وحدة مكونة للمستعمرة بالغرام لعينات اللحم المفروم أثناء الخزن على درجة حرارة 4 م:

جدول (4) العدد البكتيري الكلي (وحدة مكونة للمستعمرة بالغرام) للحم المفروم في أثناء الخزن لفترات مختلفة على درجة حرارة 4 مئوية

فترة الخزن (يوم)	المعاملات						
	C	t900	t300	t100	m900	M300	M100
2	$2.9x10^4$	$0.82x10^3$	$0.42x10^4$	$1.3x10^4$	$0.91x10^3$	$0.62x10^4$	$0.9x10^4$
7	$2.2x10^5$	$1.6x10^3$	$1.1x10^4$	$2.3x10^4$	$1.9x10^3$	$1.56x10^4$	$2.1x10^4$
14	$2.28x10^8$	$2x10^4$	$2x10^6$	$1.9x10^8$	$2.3x10^4$	$2.2x10^6$	$2.2x10^8$

(t) عينة اللحم المفروم المضاف لها مستخلص الكاتكينات بالتراكيز المختلفة ، (m)عينة اللحم المفروم المضاف لها المستخلص المائي بالتراكيز المختلفة.

تشير النتائج في الجدول (4) إلى إن الأعداد البكتيرية الكلية في معاملة السيطرة للحم المفروم قد ارتفعت بشكل واضح ومستمر خلال مراحل الخزن المتتابعة مقارنة بالمعاملات الأخرى ، إذ بلغت ألأعداد البكتيرية بعد مرور 14 يوم من الخزن $2.28x10^8$و.ت.م. غم$^{-1}$ لمعاملة السيطرة بينما كانت الزيادة طفيفة في العينات المعاملة بمستخلص الكاتكينات (t900) وبلغت$2x10^4$ و.ت.م. غم$^{-1}$ و $2.3x10^4$و.ت.م. غم$^{-1}$ للعينة المعاملة بالمستخلص المائي (m900) بينما سجلت معاملتي (m100) و(t100) التأثير الأقل في خفض الأعداد البكتيرية . ويمكن أن يعود سبب ذلك إلى قدرة مستخلصات الشاي الأخضر على تقليل الأعداد الميكروبية الكلية في اللحم المفروم ومن ثم تحسين قابلية حفظ المنتوج .وهذا قد يعزى الى القدرة التثبيطية للمركبات الفينولية ومنها الكاتيكينات من خلال القدرة على تغيير نفاذية جدار الخلية ، وبالتالي تثبيط عمل الانزيمات المسؤولة عن التفاعلات الأيضية الأساسية بتداخلها غير المتخصص مع البروتينات مما يؤدي الى مسخ البروتين ومن ثم عدم قدرة البكتريا على الأستمرار.

عموما يمكن الاستنتاج بان مستخلصات الشاي الأخضر تمتلك فعالية تثبيط جيدة في منع تطور

ونمو الأحياء المجهرية عند إضافتها بالتراكيز العالية إلى الأغذية ، وذلك للحفاظ على الجودة والنوعية ضد عوامل التلف الميكروبية، وان الشاي الأخضر يعتبر مصدر غني بالكاتكينات(Catechins) (18) وهي مضادات أكسدة قوية سواء بالتجارب المعملية أو داخل الجسم الحي (8) ، إذ أظهرت التجارب إنها أكثرفعالية من Vitamin (C) و(Vitamin E) و(B-carotene) (12) ، وكذلك تمتلك تأثير تآزري مع بعض مضادات الأكسدة الأخرى مثل فيتامين E وفيتامين C وTrolox وبعض الأحماض العضوية مثل Tartaric acid و Malic acid وUric acidوCitricacid التي تعطي تأثيرآتعاونياً للحماية تجاه تلف β-carotene (وحدة بناء فيتامين A) ، المستخدمة كمادة ملونة في الأغذية وان قوة الكاتكينات في منع أكسدة الدهون أعلى من التوكوفيرولات و BHAو BHTوTBHQ إضافة إلى تحسين اللون والنكهة (12).

من خلال نتائج هذه الدراسة نقترح أستخدام مستخلص الكاتكينات للشاي الأخضر كمادة حافظة للحوم او غيرها من الأغذية ، كونه تميز بقابليته في التقليل من التلف الكيميائي والميكروبي للحم المخزون في التبريد، وكذلك تميزه بعدم وجود رائحة الشاي او طعمه الذي قد يكون غير مرغوبا في حفظه للمواد الغذائية ، بعكس المستخلص المائي رغم تميزه تقريبا بنفس تأثير مستخلص الكاتيكانات، وكذلك عدم تأثيراته الجانبية الصحية عند أستخدامنا للمواد الحافظة الكيميائية.

المصادر

1. Alghazeer, R.; S. Saeed, and Howell N.K.2008. Aldehyde formation in frozen mackerel (Scomber Scombrus) in the presence and absence of instant green tea. Food Chemistry. 108:801-810.

2. Anessini, C. and C. Perez, .1993. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. J.E Thanopagrm, 39:119-128.

3. Arakawa, H.; M. Maeda; S. Okubo, and T. Shimamura. 2004. Role of hydrogen peroxide in bactericidal action of catechin. Biol. Pharm .Bull. 27:277-281.

4. A.O.A.C. 1975. Official Methods of Association of official Agriculture Chemists .Washington D.C., U.S.A.

5. A.O.A.C. 1980. Official methods of analysis of association of official analytical Chemistis, Washington U.S.A.

6. APHA. American Public Health Association .1978. Standard methods for the examination of diary products 14th ed. Washington. USA.

Journal of American Science, 7(7): 540-548.

12. Hara, Y. 2001. Green tea; Health Benefits and application. Marcel Dekker, New York.

13. Hayakawa, F.; Y. Ishizu; N. Hoshino, and Yamaji, A. 2004. Prooxidatie activities of tea catechins in the presence of Cu^{+2}, Biochem .68:1825-1830.

14. Jin, y.; C.H. Jin, and Row, K.H. .2006. Separation of catechin compounds from different teas. Centre for Advanced Bio. Separation Technology. Department of Chemical Engineering, Inhale. University, Inch eon, Korea. Biotechnology Journal. 1(2): P209 – 213 .

15. Kim, S.; Ruengwilysip, C. and Fung D.Y.2004. Antibacterial effect of water soluble tea extracts on food borne pathogens in laboratory medium and in a food mode. J. Food Prot., 67: 2608-2612.

16. Kumar, N.S.; M.J. Rajapaksha, and Chromatoger, A. 2005. Separation of catechin constituents from five tea cultivars using high- speedcounter-

7. Archana, S. and Jayanthi Abraham. 2011. Comparative analysis of antimicrobial activity of leaf extracts from fresh green tea, commercial green tea and black tea on pathogens .J. of applied pharmaceutical science, 1(8):149-152.

8. Cabrera, C.; R. Artacho, and Ginemez, R. 2006. Beneficial effects of Green tea–a review. J. Am. College Nutr., 25(2):79-99.

9. Chander, R. and A.K. Khanna. 2005. Antioxidant and lipid lowering activities of Indian black tea. Indian Journal of clinical Biochemistry. 20:153-159.

10. Dulloo, A.G.; X.J. Seydon; L. Girardier, and Chantre, P. and Vandermander, J .2000. Beneficial effects of green tea. J. Agric. Obes. Relat. Metab. Disord. 24-252-258.

11. Ferial, M.Abu-salem; E. Abu–Salem; A. Abou–Arab, ; M. Hayam, Ibrahim and Azza, A. Abou –Arab. .2011. Effect of Adding green tea extract, thyme oil or their combination to luncheon roll meat during refrigerated storage. Department of Food Technology. National Research Centre, Dokki, Cairo, Egypt.

current chromatography. J. of chromatography, 1083: 223-228.

17. Kumudavally, K.V.; H.S. Phanindrakumar; A. Tabassum; K. Radhakrishna, and Bawa, A.S. .2008. Green tea a potential preservative for extending the shelf life of fresh mutton at ambient temperature (25+2 Cº). Food Chemistry, 107 (1): 426 – 433.

18. Lambert, J.D and C.S. Yang, .2003. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. Journal of Nutrition 133(10): 3262- 3267.

19. Masuda,T.; Y. Inaba,; T. Maekaw,; Y. Takeda,; H. Yameguchi,; K. Nakamoto,; H. Kuninaga,; S. Nishizato, and Nouaka A. N .2003. Simple detection method of powerful antiradical compounds in the raw extract of plants and its application for the identification of antiradical plant constituents. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51:1831-1838.

20. Perez, Z.C.; M. Pauli, and Bazergue, P. 1990. Antibiotic assay by the agar–well diffusion method. J. Acta. Biologic. Acta. Medicine experimentalis, 15: 113-115.

21. Selvatore, M.J.; A.B. King, and Graham, A.C. 1998. Antibacterial activity of lonchocarpol. A.J. Nat. Pord., 61: 640- 642.

22. Vorathikunchai, S.P. and L. Kit pipit, .2003. Activates of crude extracts of the medicinal plants on methicillin–resistant Staphylococcus aureus. J. Clin. Microbial Infect. 9: 236.

23. Weiduo, S.I.; G. Joshua; T. Rong; K. Milosh and Yulong, Y. 2006. Bioassay–guided purification and identification of antimicrobial competes in Chinese green tea extract. J. of Chromatography A., 1125: 204 – 210.