

## اثر ضد قارچی پلی‌فنل‌های برگ سبز چای (*Camellia sinensis*) بر کاندیدا آلبیکنس

زهرا نصرالهی<sup>۱</sup>، محمدحسین یادگاری<sup>۲\*</sup>، سیدمحمد مؤذنی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه فارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه فارچ‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه ایمنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۸/۰۸/۱۱

دریافت مقاله: ۸۸/۰۴/۱۴

### چکیده

**هدف:** در تحقیق حاضر اثر بازدارندگی از رشد پلی‌فنل‌های برگ سبز چای به‌عنوان مواد ضد قارچی گیاهی بر مخمر فرصت‌طلب کاندیدا آلبیکنس (سویه استاندارد PTCC-5027) در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد.  
**مواد و روش‌ها:** با استفاده از آزمون حساسیت دارویی با روش ماکرودیلوشن برات (رقت در لوله)، حداقل غلظت کشندگی ضد قارچی (MFC) و کمترین مهارکنندگی از ۹۰ درصد رشد قارچ (MIC90) برای پلی‌فنل‌های برگ سبز چای و فلوکونازول علیه کاندیدا آلبیکنس (PTCC-5027) در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی شد.

**نتایج:** فعالیت ضد قارچی کاتشین (مؤثرترین ترکیب برگ سبز چای) وابسته به زمان است. کمترین غلظت مهارکنندگی کاتشین در مقادیر  $1 \times 10^{-3}$ ،  $0.5 \times 10^{-3}$  و  $2 \times 10^{-3}$  مخمر در میلی‌لیتر پس از ۲۴ ساعت به ترتیب ۱۲/۵، ۲۵ و ۱۰۰ میلی‌لیتر در میلی‌گرم و پس از ۴۸ ساعت به ترتیب ۶/۲۵، ۱۲/۵ و ۵۰ میلی‌لیتر در میلی‌گرم به‌دست آمد. مخمر نسبت به فلوکونازول مقاوم گزارش شد. کلیه نتایج با محاسبات میانگین آماری، پس از ۳ بار تکرار ثبت شد.

**نتیجه‌گیری:** با وجود مقاومت استرین کاندیدا آلبیکنس مورد مطالعه نسبت به فلوکونازول، پلی‌فنل‌های برگ سبز چای خصوصاً کاتشین، به‌خوبی از رشد این مخمر ممانعت کرده و کاهش رشد در غلظت‌های MIC90 و MFC مشهود است. براساس نتایج به‌دست آمده، برگ سبز چای حاوی ترکیبات مؤثر ضد قارچی بوده و از آن‌جایی که داروهای ضد قارچی رایج، دارای آثار سوء جانبی هستند و از طرفی نیز شاهد افزایش مقاومت‌های دارویی هستیم، امید است با ساخت داروهای گیاهی از مواد مؤثر آن‌ها، جایگزین خوبی برای درمان بیماری‌های قارچی تجویز شود.

**کلیدواژگان:** برگ سبز چای، اثر بازدارندگی، کاندیدا آلبیکنس

### ۱- مقدمه

گسترده‌ی بیماری‌های قارچی فرصت‌طلب در افراد مستعد از طرفی و افزایش روزافزون مقاومت‌های دارویی و اثرات سوء جانبی آن‌ها از طرف دیگر موجب علاقه به تحقیق در زمینه بررسی آثار ضد قارچی گیاهان شده است. گیاه چای با نام

\*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فارچ‌شناسی پزشکی، صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵  
Email: yadegarm@modares.ac.ir

محیط سابرو دکستروز آگار (Sabouraud dextrose agar) کشت و به منظور فعال شدن رشد، ۲ الی ۳ مرتبه پاساژ داده شد. سپس از چندین کلونی آن، استوک (Stock) غلیظی در آب مقطر تهیه و برای انجام آزمایش‌های تعیین حساسیت، از استوک سوسپانسیون تهیه و توسط لام مخصوص شمارش سلول‌های خونی، مقادیر  $10^3 \times 0.5$ ،  $10^3 \times 1$  و  $10^3 \times 2$  سلول مخمر در میلی‌لیتر آماده شد [۵].

## ۲-۲- تعیین حساسیت ارگانیسم نسبت به فلوکونازول (Fluconazole)

فلوکونازول به‌عنوان یک داروی آزولی (Azol) مرجع، برای مقایسه با اثر کاتشین (Catechin) استخراج شده، استفاده شد. بدین منظور، استوک فلوکونازول از شرکت پارس دارو تهیه و به روش ماکرودیولوشن (Macro dilution)، رقت‌های ۴-۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بر مقادیر  $10^3 \times 0.5$ ،  $10^3 \times 1$  و  $10^3 \times 2$  سلول در میلی‌لیتر کاندیدا آلیکنس (PTCC-5027) اثر داده شد. پس از زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری، نمونه‌ها از درون ویال روی محیط سابرو دکستروز آگار کشت و نتایج براساس شمارش تعداد کلونی ثبت شد [۶-۸].

## ۲-۳- تهیه گیاه

برگ سبز چای از نوع بهاره منطقه لاهیجان ایران تهیه و جوان‌ترین برگ‌ها از انتهای‌ترین قسمت ساقه استفاده شد.

## ۲-۴- به‌دست آوری پلی‌فنل‌های برگ تازه چای

مقدار ۱۰۰ گرم برگ سبز چای درون ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس حجم نهایی توسط تغلیظ در خلاء به ۵۰۰ میلی‌لیتر کاهش یافت. در مرحله بعد، حلال آلی کلروفرم به عصاره اضافه شده و پس از مخلوط کردن به دو بخش تبدیل شد. بخش زیرین محتوی کلروفرم و رنگدانه‌های چای و

علمی کاملیا سیننسیس حاوی مقادیر زیادی پلی‌فنل بوده که به‌ترتیب مقدار این مواد در چای عمل‌آوری شده، کمتر می‌شود به‌طوری‌که در انواعی از چای سیاه به صفر تنزل می‌یابد. پلی‌فنل‌ها، موادی بی‌رنگ و محلول در آب هستند که دارای تأثیرات مهمی در سلامتی انسان، اعم از خاصیت ضد میکروبی، ضد سرطان، ضد آرژنی، پیشگیری‌کننده بیماری‌های قلبی-عروقی و تقویت‌کننده سیستم ایمنی بدن هستند. از جمله آثار ضد میکروبی پلی‌فنل‌ها، تأثیر مهارکنندگی بر رشد انواع باکتری‌ها و انواع ویروس‌ها و همچنین قارچ‌های رشته‌ای و مخمیری است [۱-۳]. مخمر کاندیدا آلیکنس (*Candida albicans*)، فلور طبیعی بدن است که در افراد سالم به‌ندرت باعث بیماری می‌شود اما به‌عنوان یک مخمر فرصت‌طلب در افراد مستعد از قبیل مبتلایان به ایدز (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS) و مصرف‌کنندگان آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف و همچنین افرادی که پیوند عضو شده‌اند، ایجاد عفونت می‌کند. اهمیت بیماری‌های ناشی از این مخمر، علاوه بر ایجاد عفونت در افراد مستعد، به بیماران ایدزی مربوط می‌شود که شاخص اصلی AIDS در آن‌ها، کاندیدیازیس (Candidiasis) مری است [۴].

هدف از این مطالعه، بررسی توان مهارکنندگی رشد پلی‌فنل‌های برگ سبز چای بر سویه کاندیدا آلیکنس (PTCC-5027) بر مبنای یافتن میزان کمترین غلظت مهارکنندگی از ۹۰ درصد رشد قارچ (Minimum Inhibitory Concentration 90: MIC90) و کمترین غلظت کشندگی ضد قارچی (Minimum Fungicidal Concentration: MFC) است.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- ارگانیسم

سویه کاندیدا آلیکنس (PTCC-5027) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی ایران (وابسته به سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی کشور) تهیه شد. ابتدا ارگانیسم بر

## HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

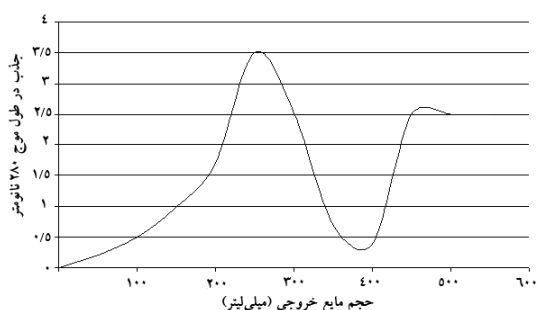
تأیید شد.

## ۲-۴-۲- سنجش کاتشین برگ سبز چای با

## روش HPLC

با استفاده از کاتشین استاندارد (Sigma)، متان (Merck)، اسید فرمیک، دستگاه HPLC با این مشخصات: پمپ ۵۱۰، سیستم تزریق کننده waters UK6، دتکتور UV (Detector) (Lambda-max 481)، ستون C18 شیماتزو (Shimadzu) (مشخصات: ۵ میکرون، ۴/۶×۲۵ سانتی‌متر)، ثبات (Waters, 748/748 B) وجود کاتشین در پلی‌فنل‌های به‌دست آمده از برگ سبز چای تأیید شد.

برای رسم منحنی، میزان ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کاتشین استاندارد در حلال دی‌متیل سولفات (Dimethyl Sulfate: DMSO) حل و در نهایت از این محلول، عصاره آبی ۱/۱۰۰ تهیه شد. همچنین از کاتشین به‌دست آمده از برگ سبز چای نیز به میزان ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با آب مقطر رقتی برابر با رقت کاتشین استاندارد تهیه شد. حلال‌های مورد استفاده در این روش، متانل و اسید فرمیک بود که به‌عنوان بخش آلی استفاده شد. دتکتور دستگاه در طول موج ۲۸۰ نانومتر و سرعت جریان عبوری براساس ۱ میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم شد. ۱۰ میکرولیتر از نمونه کاتشین استاندارد به دستگاه تزریق و پس از ۳ دقیقه منحنی ترسیم شد (نمودار ۲). همین مرحله برای کاتشین به‌دست آمده از برگ سبز چای نیز انجام شد (نمودار ۳).



نمودار ۱ منحنی کروماتوگرافی پلی‌فنل‌های به‌دست آمده از برگ سبز چای

بخش تشکیل شده در بالا حاوی بقیه عصاره چای بود. نظر به این‌که پلی‌فنل در بخش بالایی قرار دارد، این بخش جدا شده و به آن اتیل استات افزوده شد. در این مرحله نیز پس از مخلوط نمودن، دو بخش تشکیل شد که بخش بالایی محتوی اتیل استات و پلی‌فنل‌های برگ سبز چای و بخش پایین شامل بقیه عصاره بود. مراحل فوق ۳ بار تکرار، و در نهایت بخش حاوی اتیل استات تخلیص شد. پلی‌فنل‌های به‌دست آمده توسط انجماد خشک به شکل پودر عمل‌آوری شد [۹-۱۱]. در مرحله بعد، پلی‌فنل‌ها توسط روش کروماتوگرافی تخلیص شد.

## ۲-۴-۱- کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون

در این سیستم، مولکول‌ها با وزن‌های مختلف در زمان‌های متفاوت براساس وزن مولکولی از یکدیگر تفکیک می‌شوند. این سیستم، حساس، دقیق و تفکیک در آن به‌خوبی انجام می‌گیرد به‌طوری که تغییری در ساختمان مولکولی مواد ایجاد نمی‌شود.

این سیستم کروماتوگرافی شامل پمپ پریستالتیک (Peristaltic pump)، ستون ۱/۵×۱۰۰ سانتی‌متر، پمپ عبوردهنده آب سرد، لوله‌های شیشه‌ای جمع‌آوری نمونه، بشر، اتانل به‌عنوان بافر و ژل سفادکس LH-20 (Sephadex LH-20) (Sigma) است که این ژل مولکول‌های با وزن ۱۰-۱۵۰۰ کیلوالتون را به‌خوبی تفکیک می‌کند.

کروماتوگرافی طی مراحل زیر انجام گرفت:

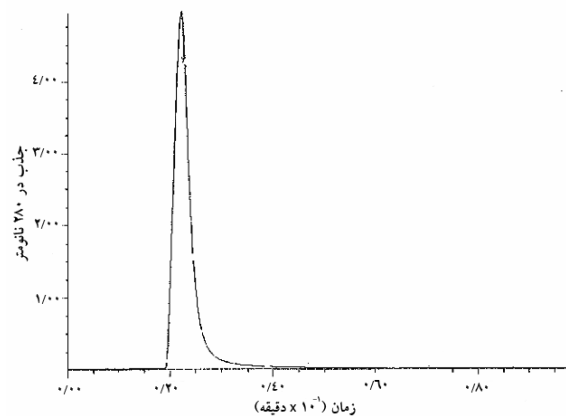
با افزودن اتانل به پلی‌فنل‌های پودری، این نمونه را بر سطح ژل اضافه کرده تا نمونه روی سطح ژل بنشیند. سپس اتانل توسط پمپ پریستالتیک وارد ستون کروماتوگرافی شد و جریان خروجی، ۱۰ میلی‌لیتر در ساعت و دستگاه جمع‌آوری کننده، ۳ میلی‌لیتر در هر لوله تنظیم شد. آن‌گاه جذب آن‌ها در طول موج ۲۸۰ نانومتر محاسبه و نمودار رسم شد (نمودار ۱). با توجه به این‌که مهم‌ترین پلی‌فنل ضد قارچی موجود در چای کاتشین است و این ماده در طول موج ۲۸۰ نانومتر دارای جذبی حدود ۳ است؛ لوله محتوی مواد خروجی با جذب ۳ در طول موج ۲۸۰ نانومتر مجزا و وجود کاتشین در آن توسط روش

از عصاره آبی کاتشین نیز رقت ۶/۲۵-۲۰۰ میلی گرم در میلی لیتر تهیه و سپس حجم نهایی لوله‌های محتوی مخمر و عصاره توسط محیط کشت ساپرو دکستروز مایع به ۱ میلی لیتر رسانده شد. رقت‌های مختلف کاتشین برای مقادیر  $0.5 \times 10^3$ ،  $1 \times 10^3$  و  $2 \times 10^3$  سلول در میلی لیتر مخمر مورد آزمایش بررسی شد.

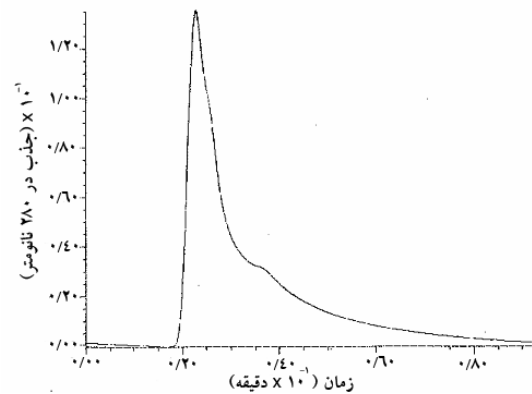
به منظور افزایش صحت آزمایش‌ها، هر سری از هر آزمایش، ۳ مرتبه تکرار و سپس میانگین نتایج آن‌ها پس از دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد محاسبه و ثبت شد.

### ۳- نتایج

پس از انجام آزمایش‌ها مشاهده شد که فلوکونازول در رقت‌های مختلف تأثیری بر کاندیدا آلبیکنس (PTCC-5027) نداشت؛ بنابراین این سویه استاندارد کاندیدا آلبیکنس، مقاوم به فلوکونازول اعلام شد در حالی که کاتشین اثر مهارکنندگی بر رشد مخمر داشت. همچنین فعالیت ضد قارچی کاتشین وابسته به زمان بود به طوری که میزان مهارکنندگی از رشد این ترکیب پلی فنلی پس از زمان ۴۸ ساعت بیشتر از ۲۴ ساعت بود. MIC90 کاتشین (کمترین غلظتی که در آن ۹۰ درصد مخمرها رشد نداشتند) در مقادیر  $0.5 \times 10^3$ ،  $1 \times 10^3$  و  $2 \times 10^3$  سلول در میلی لیتر پس از ۲۴ ساعت به ترتیب ۱۲/۵، ۲۵ و ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر و نتایج پس از ۴۸ ساعت به ترتیب ۶/۲۵، ۱۲/۵ و ۵۰ میلی لیتر در میلی گرم به دست آمد. MFC کاتشین (حداقل غلظت کشندگی ضد قارچی) در مقادیر  $0.5 \times 10^3$ ،  $1 \times 10^3$  و  $2 \times 10^3$  سلول در میلی لیتر پس از ۲۴ ساعت به ترتیب ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر و نتایج پس از ۴۸ ساعت به ترتیب ۱۲/۵، ۲۵ و ۱۰۰ میلی لیتر در میلی گرم به دست آمد، کلیه نتایج پس از ۳ بار آزمایش و با محاسبه میانگین آماری به دست آمد (نمودار ۴ و جدول ۱).



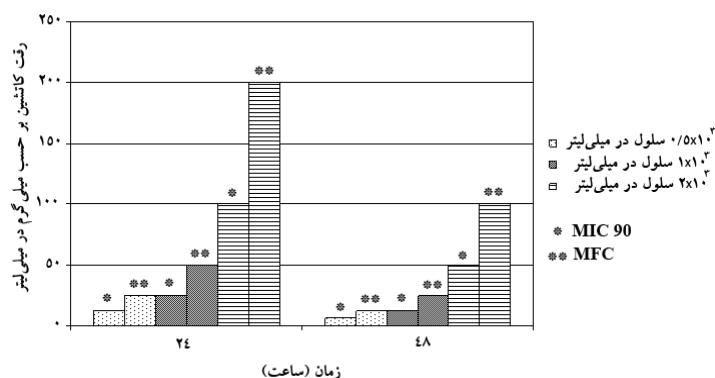
نمودار ۲ منحنی HPLC کاتشین استاندارد



نمودار ۳ منحنی HPLC کاتشین برگ سبز چای

### ۲-۵- اندازه‌گیری MIC به روش رقت در لوله

در روش اندازه‌گیری MIC90 و MFC در محیط مایع به روش ماکرودیلوشن برات (Macro dilution broth)، ابتدا یک میلی لیتر محلول استوک داروی فلوکونازول را با ۹ میلی لیتر محیط مایع استریل رقیق کرده و غلظت نهایی ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر به دست آمده سپس با رقیق شدن پی در پی غلظت‌های ۴ تا ۱۲۸ میکروگرم در میلی لیتر فلوکونازول حاصل شد. رقت‌های دارو در ۳ سری جداگانه تهیه و هر کدام از مقادیر  $0.5 \times 10^3$ ،  $1 \times 10^3$  و  $2 \times 10^3$  سلول در میلی لیتر کاندیدا آلبیکنس (PTCC-5027)، جداگانه به آن‌ها اضافه شد.



نمودار ۴ بررسی MIC90 و MFC کاتشین بر کاندیدا آلبیکنس (PTCC-5027) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت

جدول ۱ آثار ضد قارچی کاتشین و داروی فلوکونازول براساس مقادیر MIC 90 و MFC بر کاندیدا آلبیکنس (PTCC-5027) در دو زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت

حساسیت به فلوکونازول	MFC	MIC 90	تعداد ارگانیسم (سلول در میلی‌لیتر) زمان (ساعت)		ارگانیسم
			۲۴	۴۸	
مقاوم	۲۵	۱۲/۵	۲۴	۰/۵x۱۰ <sup>۳</sup>	کاندیدا آلبیکنس (PTCC-5027)
مقاوم	۱۲/۵	۶/۲۵	۴۸	۰/۵x۱۰ <sup>۳</sup>	
مقاوم	۵۰	۲۵	۲۴	۱x۱۰ <sup>۳</sup>	
مقاوم	۲۵	۱۲/۵	۴۸	۱x۱۰ <sup>۳</sup>	
مقاوم	۲۰۰	۱۰۰	۲۴	۲x۱۰ <sup>۳</sup>	
مقاوم	۱۰۰	۵۰	۴۸	۲x۱۰ <sup>۳</sup>	

## ۴- بحث

کاندیدا آلبیکنس (PTCC-5027) به اثبات رسید. همچنین اثر ضد کاندیدایی کاتشین در زمان‌های مختلف، متفاوت است به طوری که پس از ۴۸ ساعت اثر مهارتی بالاتری دارد. در ضمن آزمایش‌هایی نیز مبنی بر چگونگی تأثیر عصاره کامل چای سبز انجام گرفت که در غلظتی که پلی‌فنل‌ها مؤثر بودند، بی‌تأثیر بود. بنابراین می‌توان خاطر نشان کرد که مؤثرترین ترکیبات ضد میکروارگانیسمی و اختصاصاً ضد قارچی چای، پلی‌فنل‌ها هستند که مهم‌ترین آن‌ها کاتشین است.

مطالعه هیروساوا (Hirasawa) و همکاران روی اثرهای چای سبز، نشان‌گر تأثیرات ضد قارچی آن بر کاندیدا آلبیکنس است [۱۲].

مطالعه پارک (Park) و همکاران بر روی آثار اپی‌گالوکاتشین (Epigallocatechin)، ترکیبی در چای

سیر روزافزون ابتلا به بیماری‌های کاندیدایی در افراد مستعد از جمله مبتلایان به AIDS، افراد دیابتی، مصرف‌کنندگان آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف و افرادی که شیمی درمانی می‌شوند از طرفی و مقاومت‌های دارویی اعم از ذاتی و اکتسابی از طرف دیگر، گرایش محققین را نسبت به مطالعه در زمینه داروهای گیاهی به دلیل تأثیرگذاری بهتر و آثار جانبی کمتر، افزایش داده است. مقاومت کاندیدای مورد بررسی به داروی آزولی مرجع فلوکونازول و حساسیت آن به پلی‌فنل‌های چای، دلیلی بر این مدعا است.

در تحقیق حاضر، تأثیر مهارتی پلی‌فنل‌های برگ سبز چای به‌ویژه مؤثرترین ترکیب آن یعنی کاتشین بر رشد قارچ

مقادیر مخمر و رقت‌های کاتشین، رشد کاندیدا آلبیکنس پس از مدت ۴۸ ساعت نسبت به ۲۴ ساعت، کاهش بیشتری داشت.

نظر به فعالیت‌های گسترده ضد قارچی مواد طبیعی موجود در گیاهان لازم است علاوه بر ارزیابی آثار ضد قارچی آن‌ها، مطالعاتی نیز در خصوص چگونگی مکانیسم اثرشان انجام شود و تهیه دارو از مواد مؤثر آن‌ها مورد توجه بیشتر قرار گیرد.

## ۵- تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تحت عنوان پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته قارچ‌شناسی پزشکی انجام شده است.

سبز، دلیلی بر تأثیرات ضد قارچی این ترکیبات بر مخمرها است [۱۳].

نتیجه حاصل از تحقیق حاضر نیز تأثیر مهارکنندگی کاتشین را نشان می‌دهد.

میزان پلی‌فنل‌ها در چای سبز به دلیل اعمال فرایندهایی مثل بخاردهی روی برگ سبز چای، کاهش می‌یابد به طوری که این ترکیبات در چای سیاه به دلیل انجام فرایندهای مختلف تقریباً به صفر می‌رسد [۱۴].

میزان کاتشین مؤثر بر مهار رشد مخمر کاندیدا آلبیکنس، بسته به تعداد سلول قارچ متفاوت است به طوری که هر چه تعداد سلول کاندیدایی بیشتر باشد، غلظت بیشتری کاتشین لازم است تا رشد آن‌ها را مهار کند. علاوه بر آن، زمان، فاکتور مؤثر دیگری در مهار رشد است به طوری که در شرایط یکسان از نظر

## ۶- منابع

- [1] Dufresne CJ, Farnworth ER. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *J Nutr Biochem* 2001; 12(7): 404-21.
- [2] Middleton E Jr. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol* 1998; 439: 175-82.
- [3] Fujiki H. Two stages of cancer prevention with green tea. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125(11): 589-97.
- [4] Menon T, Umamaheswari K, Kumarasamy N, Solomon S, Thyagarajan SP. Efficacy of fluconazole and itraconazole in the treatment of oral candidiasis in HIV patients. *Acta Trop* 2001; 80(2): 151-4.
- [5] Wong-Beringera A, Hindler J, Brankovic L, Muehlbauer L, Steele-Moore L. Clinical applicability of antifungal susceptibility testing on non-Candida albicans species in hospitalized patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 39(1): 25-31.
- [6] Pfaller MA, Bale M, Buschelman B, Lancaster M, Espinel-Ingroff A, Rex JH, Rinaldi MG, Cooper CR, McGinnis MR. Quality control guidelines for National Committee for Clinical Laboratory Standards recommended broth macrodilution testing of amphotericin B, fluconazole, and flucytosine. *J Clin Microbiol* 1995; 33(5): 1104-7.
- [7] Krcmery V Jr. Is there in vivo-in vitro correlation between antifungal susceptibility, species of Candida spp. and clinical outcome? *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16(4): 537-9.
- [8] Cetinkaya Z, Kiraz N. In vitro investigation of antifungal activities of phenotypic variation Candida albicans strains against fluconazole,

- itraconazole and voriconazole. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2005; 46(3): 197-201.
- [9] Sava VM, Yang SM, Hong MY, Yang PC, Huang GS. Isolation and characterization of melanic pigments derived from tea and tea polyphenols. *Food Chemistry* 2001; 73(2): 177-84.
- [10] Yam TS, Shah S, Hamilton-Miller JM. Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 152(1): 169-74.
- [11] Wang H, Provan GJ, Helliwell K. Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis. *Trends Food Sci Technol* 2000; 11(4/5): 152-60.
- [12] Hirasawa M, Takada K. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53(2): 225-9.
- [13] Park BJ, Park JC, Taguchi H, Fukushima K, Hyon SH, Takatori K. Antifungal susceptibility of epigallocatechin 3-O-gallate (EGCg) on clinical isolates of pathogenic yeasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 347(2): 401-5
- [14] Chou CC, Lin LL, Chung KT. Antimicrobial activity of tea as affected by the degree of fermentation and manufacturing season. *Int J Food Microbiol* 1999; 48(2): 125-30.