

## بررسی امکان کاهش کلسترول در شیرهای خام و هموژنیزه با استفاده از بتاسیکلودکسترین

عبدالمجید مسکوکي<sup>1</sup>، سید حامد رضا بهشتی<sup>2</sup>، عذرا خردمند<sup>3</sup>، سعیده ولی بیگی<sup>3</sup>، جواد فیضی<sup>2</sup>

1- دانشیار گروه فرآوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی

\* نویسنده مسئول (a.maskooki@rifst.ac.ir)

2- آزمایشگاه کنترل کیفیت تست، مشهد

3- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

### چکیده

تاریخ دریافت: 92/03/01

تاریخ پذیرش: 92/08/29

#### واژه‌های کلیدی

بتاسیکلودکسترین

شیر خام

شیر هموژنیزه

کلسترول

ارتباط مستقیم بین افزایش میزان کلسترول در خون و خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی ثابت شده است و مواد غذایی حاوی کلسترول بالا از جمله مواد پروتئینی و گوشتی، تخم مرغ، شیر و فرآورده‌های لبنی می‌توانند سبب افزایش میزان کلسترول پلاسمای خون گردند. در این تحقیق مقادیر مختلف 0، 0.05، 1 و 1/5 درصد بتاسیکلودکسترین را با دو نوع شیر به صورت خام (قبل از پاستوریزاسیون و هموژنیزاسیون) و فرایند شده (پاستوریزه و هموژنیزه) با مقدار ثابت چربی 3 درصد در دو درجه حرارت 8 و 20 درجه سانتی‌گراد مخلوط نموده و مقدار کلسترول باقیمانده در شیر بررسی و با نمونه شاهد مقایسه گردید. نتایج پس از تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که با افزایش میزان بتاسیکلودکسترین به ویژه در درجه حرارت 20 درجه سانتی‌گراد نسبت به 8 درجه سانتی‌گراد مقدار بیشتری کلسترول از شیر خارج می‌شود ( $p \leq 0/05$ ). هرچند که بتاسیکلودکسترین اضافی و آزاد در محیط به دلیل برهم‌کنش‌های داخلی بین خود این مولکول‌ها سبب کاهش عمل کلسترول‌زدایی می‌گردد. ماکزیمم جذب کلسترول پس از افزودن مقدار 1/5 درصد بتاسیکلودکسترین به شیر هموژن در 20 درجه سانتی‌گراد به دست آمد.

### مقدمه

اصلی‌ترین مواد تشکیل دهنده غشای سلول است که باعث استحکام دیواره غشا و سلول می‌گردد (Grundy *et al.*, 1982). به علاوه کلسترول برای هدایت الکتریکی اعصاب و سلول‌های مغزی بسیار ضروری است (Gurr, 1992). در اوایل دهه 1950 دکتر Ancel keys (1950) فیزیولوژیست و متخصص غذاهای نظامی رابطه قوی بین بیماری‌های قلبی عروقی و سطح کلسترول خون و مصرف چربی‌های اشباع را بیان نمود. Denis و Minot (1918) طی آزمایشات

ارتباط مستقیم بین افزایش میزان کلسترول در خون و خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی ثابت شده است و مواد غذایی حاوی کلسترول بالا می‌توانند سبب افزایش میزان کلسترول پلاسمای خون گردند. مهم‌ترین منابع غذایی حاوی کلسترول بالا مواد پروتئینی و گوشتی، تخم مرغ، شیر و فرآورده‌های لبنی به شمار می‌آیند (WHO report, 2010). کلسترول نوعی چربی از گروه استروئیدها و یکی از

یک اختراع ثبت شده توسط Edward و همکاران (1989) کاهش کلاسترول شیر با استفاده از حلال مورد مطالعه قرار گرفته است. بیشترین تلاش‌ها در کاهش کلاسترول شیر و فرآورده‌های لبنی با استفاده از  $\beta$  سیکلودکسترین صورت گرفته‌اند. به طور کلی سیکلودکسترین‌ها، اولیگوساکاریدهای دارای واحدهای گلوکوپیرانوزید هستند که به صورت حلقوی با پیوند 1-4  $\alpha$  به یکدیگر متصل می‌باشند. در  $\alpha$ -سیکلودکسترین 6 واحد قندی،  $\beta$ -سیکلودکسترین 7 واحد و در  $\gamma$ -سیکلودکسترین 8 واحد قندی به هم چسبیده اند (Martin & Del Valle, 2004). خصوصیات منحصر به فردی نظیر سهولت استفاده، قابلیت دسترسی آسان، ارزانی و عدم سوء مصرف از مهم‌ترین دلایل استفاده از این کمپلکس برای گرفتن کلاسترول می‌باشد. Lee و همکاران (1999) برای اولین بار استفاده از  $\beta$  سیکلودکسترین را برای حذف کلاسترول موجود در شیرهموژنیزه مورد بررسی قرار دادند. Ahn و Kwak (1999) با استفاده از روش سطح پاسخ شرایط بهینه‌ای گرفتن کلاسترول در خامه را محاسبه و تعیین نمودند. Chafic Aziz و Gray (2000) روشی برای کاهش اسیدهای چرب آزاد و کلاسترول از چربی‌های حیوانی بدون آب پیشنهاد دادند. Kwak و همکاران (2002) نیز با استفاده از  $\beta$  سیکلودکسترین میزان حذف کلاسترول و تغییرات ایجاد شده در عطر و طعم، اسیدهای چرب و آمینواسیدهای تلخ ایجاد شده در پنیر چدار را مورد بررسی قرار دادند. Kim و همکاران (2004) سازوکار تشکیل کمپلکس  $\beta$  سیکلودکسترین و کلاسترول را تعیین نمودند. بازیابی  $\beta$  سیکلودکسترین توسط Chiu و همکاران (2004) مورد مطالعه قرار گرفته است. تحقیقات انجام شده توسط Kwak و همکاران از سال 1991 تا سال 2007 منجر به ثبت اختراع روش ایجاد کمپلکس  $\beta$  سیکلودکسترین- کلاسترول برای حذف کلاسترول موجود در مواد غذایی گردید. تنها تحقیق انجام شده در داخل کشور توسط آریا فرد و زندی در سال 1386 بر روی کره حیوانی صورت گرفته است. با توجه به تحقیقات انجام شده یکی از موارد موضوع تحقیق درجه حرارت و زمان افزودن  $\beta$  سیکلودکسترین به شیر در فرآیند کارخانه تولید شیر

مختلفی میزان کلاسترول موجود در شیر گاو و انسان و 15 نژاد گاو را مورد مقایسه و بررسی قرار دادند. آن‌ها رابطه مصرف کلاسترول موجود در شیر گاو و افزایش آن را در پلاسمای سرم خون نیز تعیین نمودند. از دهه 1960 با توجه به افزایش بیماری‌ها و مرگ و میرهای ناشی از افزایش کلاسترول توجه دانشمندان به کاهش میزان آن در غذاها معطوف گشت و روش‌های فیزیکی و شیمیایی و یا بیولوژیکی مختلفی برای کاهش کلاسترول در شیر و فرآورده‌های غذایی پیشنهاد گردید. روش‌هایی مانند چربی‌زدائی، مخلوط یا جایگزین کردن روغن‌های گیاهی و یا کاهش کلاسترول به صورت انتخابی مثل استفاده از گاز کربنیک فوق بحرانی و یا جذب چربی شیر با عوامل تشکیل دهنده کمپلکس مورد مطالعه اغلب محققان قرار گرفته است (Richardson *et al.*, 1989). در تحقیقی که توسط Smith و همکاران (1991) انجام شد میزان کاهش کلاسترول موجود در شیر با آنزیم کلاسترول اکسیداز باکتریائی مورد بررسی قرار گرفته است. آن‌ها سه نوع آنزیم کلاسترول اکسیداز را مورد بررسی قرار دادند و متوجه شدند که کلاسترول اکسیداز پسدوموناس فلوروسنس سبب اکسیداسیون سریع کلاسترول در شیر هموژنیزه پاستوریزه می‌گردد. Chafic Aziz و همکاران (1991) از ساپونین برای کلاسترول‌زدائی از شیر و محصولات لبنی استفاده نمودند. Richardson و همکاران (1998) با استفاده از ساپونین کلاسترول موجود در شیر و فرآورده‌های لبنی را تا میزان 90 درصد کاهش دادند. بررسی امکان تولید چربی شیر با کاهش کلاسترول به وسیله گاز کربنیک فوق بحرانی توسط Bradely (1989) مورد مطالعه قرار گرفته است. در این تحقیق با افزایش فشار به طور انتخابی نوع و میزان مواد استخراج شده تغییر می‌کرد و با این روش وی توانست بیش از 90 درصد کلاسترول شیر را در 40 مگا پاسکال و 60 درجه سانتی‌گراد کاهش دهد. در یک تحقیق مشابه قابلیت استخراج کلاسترول از شیر پرچرب به وسیله گاز کربنیک مایع فوق بحرانی مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان‌دهنده کاهش 97 درصدی کلاسترول در فشار 40-80 مگا پاسکال و 40-70 درجه سانتی‌گراد بود (Vedaraman *et al.*, 2004). در

### مواد و روش‌ها

نمونه‌های شیر مورد استفاده در این پروژه از کارخانه شیرپاستوریزه پگاه به دو صورت خام بدون عمل پاستوریزاسیون و هموژنیزاسیون و بلافاصله پس از تحویل به کارخانه و نیز شیر پاستوریزه و هموژنیزه با تنظیم چربی به میزان 3 درصد تهیه گردید. جدول 1 مشخصات فیزیکیوشیمیایی نمونه‌های شیر تهیه شده را نشان می‌دهد.

می‌باشد. هدف از انجام این تحقیق بررسی امکان کاهش کلسترول در شیر خام و هموژنیزه به منظور تولید شیر کم کلسترول در مقیاس صنعتی در جهت کاهش بیماری‌های ناشی از افزایش کلسترول و بالا بردن سلامت جامعه از طریق عرضه فرآورده‌های لبنی سالم است به علاوه شرایط مختلف درجه حرارت برای تعیین مرحله کلسترول زدایی در فرایند تولید شیر پاستوریزه مورد بررسی قرار گرفته است.

جدول 1- متوسط ترکیبات و ویژگی‌های فیزیکی نمونه‌های شیر

ویژگی‌های فیزیکیوشیمیایی نوع شیر	چربی g/100g	کلسترول mg/100g	پروتئین g/100g	ماده خشک بدون چربی (SNF) g/100g	لاکتوز g/100g	دانسیته g/100ml	خاکستر g/100g
شیر خام (3 درصد چربی)	3/1	10/23	3/078	8/538	4/73	1/031	0/729
شیر هموژنیزه 3 درصد چربی	3	10/36	3/035	8/372	4/657	1/032	0/721

Trillion Enterprise استفاده گردید. برای اعمال حرارت و همزدن توأم از همزن - هیتر مغناطیسی مدل IKA استفاده گردید. همچنین از دستگاه pH متر مدل Metrohm 780 سوئیس و دستگاه بن ماری مدل Julabo F 26 آلمان استفاده شد.

### آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه‌های شیر خام و هموژن (3 درصد چربی) با غلظت‌های متفاوت بتا سیکلودکسترین (صفر، 0/5، 1 و 1/5 درصد وزنی- وزنی) در دو دمای عملیات 8 و 20 درجه سانتی‌گراد مخلوط گردید. عملیات هم‌زدن به کمک همزن مغناطیسی با 750 دور در دقیقه انجام گرفت. سپس نمونه‌های تولید شده به لوله مدرج فالكون 50 ml منتقل گردید و درب آن بسته شد و به مدت 10 دقیقه در سانتریفوژ Ependorf (با 3000 دور در دقیقه) قرار داده شد تا حداکثر جداسازی بتاسیکلودکسترین حاوی کلسترول از فاز امولسیون صورت پذیرد. ذکر این نکته الزامی است که دمای عملیات (8 و 20 درجه سانتی‌گراد) در هر یک از مراحل اختلاط و جداسازی قابل کنترل بود.

بتاسیکلودکسترین مورد استفاده در این پژوهش از شرکت سیگما آلدریچ (Sigma- Aldrich) با فرمول  $C_{42}H_{70}O_{35}$  و وزن ملکولی 1134/98 تهیه گردید. برای اندازه‌گیری کلسترول در مرحله آماده‌سازی از اتانول و تولوئن (شرکت مرک) با درجه کروماتوگرافی (HPLC) و هیدروکسید پتاسیم شرکت فلوکا با درجه آزمایشگاهی استفاده گردید.

برای تعیین میزان کلسترول موجود در نمونه‌ها از دستگاه کروماتوگرافی گاز مایع با کارایی بالا از شرکت SYKAM آلمان مجهز به پمپ دو پیستونی S1122 و ستون کروماتوگرافی Symmetry C18 به طول 25 سانتی‌متر، قطر داخلی 4/6 میلی‌متر و مواد پر شده 5 میکرومتری و آشکارساز ماورای بنفش با طول موج 205 نانومتر استفاده گردید. تنظیم دمای ستون با استفاده از آون ستون S4011 انجام گردید. دمای ستون 40 درجه سانتی‌گراد بود. فاز متحرک مورد استفاده متانول خالص با گرید HPLC بود. هم چنین جهت تهیه آب مقطر با خلوص بالا و مورد استفاده از دستگاه آب مقطر مدل TC-SG شرکت Wisdom

## اندازه‌گیری کلسترول

آماده‌سازی و اندازه‌گیری کلسترول با استفاده از روش Klatt, 1999 با اندکی اصلاحات انجام شد. بدین صورت که ابتدا آماده‌سازی نمونه برای دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC) بایستی انجام گیرد. آماده‌سازی نمونه شامل دو مرحله صابونی کردن و استخراج می‌باشد. برای این منظور، مقدار 30 میلی‌لیتر شیر با درصد چربی مشخص به بالن منتقل شده و 40 میلی‌لیتر اتانول (95 درصد و 8 میلی‌لیتر هیدروکسید پتاسیم 50 درصد به آن افزوده شد. بالن به کندانسور وصل و روی دستگاه هیتر- همزن مغناطیسی قرار داده شد تا به مدت 70 دقیقه عمل صابونی شدن انجام شود. پس از این مدت هیتر خاموش شد و از بالای کندانسور 60 میلی‌لیتر اتانول درون بالن ریخته و به مدت 15 دقیقه همزده شد. سپس بالن از کندانسور جدا شده و درب آن بسته و اجازه داده شد تا خنک شود. پس از خنک شدن محلول صابونی شده، 100 میلی‌لیتر تولوئن داخل بالن ریخته و در حدود نیم ساعت روی همزن به هم زده شد تا کلسترول وارد فاز آلی شود. برای عمل استخراج، ابتدا محتویات بالن به قیف دکانتور منتقل شده و در مرحله اول 110 میلی‌لیتر پتاسیم هیدروکساید 1 نرمال به آن افزوده و هم زده شد. به طور کلی در تمامی مراحل استخراج فاز آلی یعنی تولوئن مهم است؛ پس فاز پایینی را دور ریخته و به فاز آلی باقیمانده، 40 میلی‌لیتر پتاسیم هیدروکساید 1 نرمال افزوده و مجدداً همزده شد. پس از استخراج در این مرحله، فاز آلی 3 تا 5 مرتبه، هر بار با 40 میلی‌لیتر آب مقطر شستشو داده شد تا فاز آلی کاملاً شفاف گردد. سپس آن را به بالن 250 میلی‌لیتری منتقل کرده و با استفاده از روتاری واکيوم اواپوراتور تولوئن موجود کاملاً تبخیر شد. در نهایت کلسترول باقیمانده در ته بالن در 5 میلی‌لیتر متانول حل و به دستگاه گازکروماتوگراف تزریق شد. از آن جایی که استانداردهای تهیه شده برحسب قسمت در میلیون است، غلظت نمونه‌های مجهول نیز که از منحنی

کالیبراسیون به دست می‌آید بر حسب قسمت در میلیون یا میلی‌گرم در لیتر می‌باشد و چون میزان کلسترول موجود در فراورده‌های لبنی با واحد میلی‌گرم کلسترول در 100 میلی‌لیتر گزارش می‌شود؛ بنابراین ضریب تبدیلی به صورت فرمول 1 لازم می‌باشد:

فرمول (1)

$$= \text{میلی‌گرم کلسترول در } 100 \text{ میلی‌لیتر} \\ = 100/30 \times 0/005 \times (\text{میلی‌گرم در لیتر}) \times x$$

## طرح آماری

مقادیر بتاسیکلودکستین در چهار سطح 0، 0/5، 1، 1/5 درصد نوع شیر در دو سطح به صورت خام و هموژنیزه با مقدار ثابت چربی 3 درصد، درجه حرارت در دو سطح 8 و 20 درجه سانتی‌گراد و سه تکرار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و مقدار کلسترول باقیمانده تعیین شد. داده‌های خام به دست آمده در طرح آماری فاکتوریل با استفاده از جدول آماری ANOVA با فاکتورهای چندگانه در سطح اطمینان 95 درصد و احتمال خطای 5 درصد ( $p \leq 0/05$ ) تجزیه و تحلیل گردیدند. حداقل مقادیر مورد اختلاف بین میانگین‌ها (LSD) با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan Multiple Range Test) و مقادیر  $R^2$  و ضرائب همبستگی بین میانگین‌ها نیز محاسبه گردید. برای انجام محاسبات آماری از نرم‌افزارهای MiniTab15، Sigma stat 3.1 و Excel 2007 استفاده شد.

## نتایج و بحث

در جدول 2 نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری اثر افزودن بتاسیکلودکستین در چهار سطح شاهد (صفر درصد)، 0/5، 1 و 1/5 درصد بر دو نوع شیر خام و هموژن در دو درجه حرارت 8 و 20 درجه سانتی‌گراد در سه تکرار با یکدیگر مقایسه شدند.

جدول 2- آنالیز واریانس اثر مقادیر مختلف بتاسیکلودکسترین بر میزان کاهش کلاسترول در شیر خام و هموژنیزه

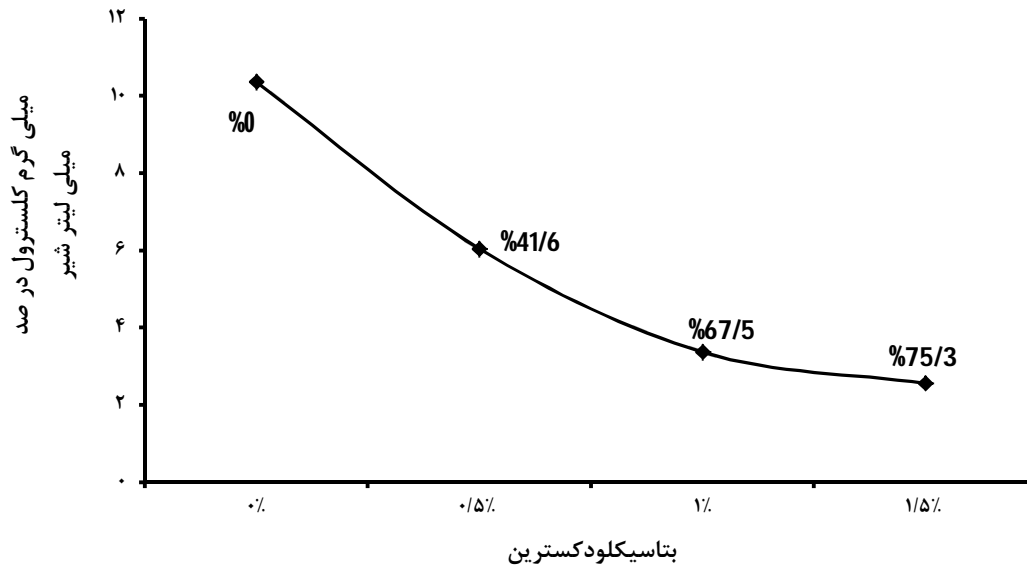
Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
B.CD	3	889/748	296/583	1391/283	<0/001
Milk	1	20/227	20/277	95/119	<0/001
Temp	1	11/496	11/496	53/926	<0/001
B.CD x Milk	3	47/539	15/846	74/335	<0/001
B.CD x Temp	3	5/213	1/738	8/152	<0/001
Milk x Temp	1	0/0513	0/0513	0/241	0/625
B.CD x Milk x Temp	3	7/235	2/412	11/313	<0/001
Residual	80	17/054	0/213		
Total	95	998/612	10/512		

داشته باشد و این مسأله به واسطه برهم‌کنش‌های داخل ملکولی خود  $\beta$ .CD است. از آن جا که مولکول  $\beta$ .CD یک اولیگو ساکارید با هفت مولکول واحد قندی است که به نحوی آرایش یافته‌اند که می‌توانند مولکول‌های خاصی از جمله کلاسترول را در حود جای دهند. مهمترین ویژگی‌های بتا سیکلودکسترین قابلیت دربرگیری کمپلکس‌های جامد (کمپلکس‌های میزبان) با طیف وسیعی از ترکیبات جامد-مایع و گاز بصورت کمپلکس می‌باشد. در این نوع کمپلکس‌ها مولکول میهمان به وسیله حفره مولکول‌های میزبان (بتا سیکلودکسترین) محصور می‌شود. تشکیل کمپلکس با جفت شدن مولکول میهمان درون حفره کمپلکس میزبان شکل می‌گیرد (Martin & Valle, 2004). به علاوه حفره داخلی غیر قطبی و خاصیت آبگریزی دارد. با وجود این حفره بتا سیکلودکسترین قادر است مولکول‌های آب‌گریزی را در خود جای دهد. کلاسترول از جمله چربی‌هایی است که قادر است درون حفره جای گرفته و به همراه بتاسیکلودکسترین خارج شود. در عوض جداره خارجی مولکول خاصیت آب دوستی دارد و می‌تواند با مولکول‌های آب دوست از جمله خود بتاسیکلودکسترین تشکیل کمپلکس داده و سبب جلوگیری از جای دادن مولکول کلاسترول درون حفره‌ها گردد. لذا وجود بتاسیکلودکسترین اضافی شانس جذب مولکول‌های کلاسترول را کاهش می‌دهد (Kwak et al., 2007).

همان طور که در جدول 2 ملاحظه می‌گردد کلیه سطوح مورد آزمایش و اثرات متقابل آن‌ها به جز در اثرات متقابل نوع شیر و درجه حرارت افزودن  $\beta$ .CD دارای اختلاف کاملاً معنی‌دار آماری در سطح  $P \leq 0/05$  می‌باشند.

#### اثر افزایش میزان بتاسیکلودکسترین بر کاهش کلاسترول

با افزایش میزان  $\beta$ .CD میزان کلاسترول موجود در هردو نمونه شیر کاهش می‌یابد در شکل 1 کاهش کلاسترول بر حسب میلی‌گرم در 100 میلی‌لیتر شیر نشان داده شده است و به طوری که ملاحظه می‌گردد این کاهش برای مقادیر 0/5، 1 و 1/5 درصد به ترتیب 6/044، 3/37 و 2/56 میلی‌گرم در صد گرم شیر است. به عبارت دیگر و به طوری که در شکل 1 مشاهده می‌شود این کاهش برحسب درصد به ترتیب 41/6 درصد، 67/5 درصد و 75/3 درصد است. تفاوت معنی‌داری بین درصد جذب کلاسترول با افزایش مقادیر بین 1 و 1/5 درصد مشاهده نمی‌شود و بیانگر این نکته است که افزایش  $\beta$ .CD اضافی نقش زیادی در کاهش یا جذب کلاسترول از شیر ندارد. ضریب همبستگی یا  $R^2=1$  در معادله به دست آمده تأیید کننده صحت این نتایج است. این مسأله توسط سایر محققان نیز به اثبات رسیده است. Lee و همکاران (1999) نشان دادند که افزایش مقادیر بیش از 1/5 درصد می‌تواند به جای افزایش جذب کلاسترول کاهش



شکل 1- میزان کاهش کلسترول شیر در با افزایش مقادیر مختلف  $\beta$ .CD بر حسب میلی گرم در صد میلی لیتر شیر

مولکول‌های کلسترول به صورت به هم پیوسته در ساختار سایر چربی‌های شیر وجود دارند. این مسأله می‌تواند روی عملیات جذب کلسترول توسط  $\beta$ .CD مؤثر باشد. در شکل 2 تفاوت میزان کاهش کلسترول را در 100 میلی لیتر شیر خام و هموژن نشان می‌دهد. بین مقادیر کاهش کلسترول در شیر خام و هموژن تفاوت کاملاً معنی‌داری مشاهده می‌شود. میزان کاهش کلسترول بر حسب درصد نیز در شکل 2 برای هر دو نمونه شیر بیان شده‌اند و به طوری که مشاهده می‌شود کاهش کلسترول در شیر هموژن در حدود 10 درصد بیشتر از شیر خام است. در عملیات هموژنیزاسیون به دلیل شکستن مولکول‌های چربی و افزایش توزیع و پراکندگی آن در افزایش میزان جذب کلسترول مؤثر و در شیر خام کاهش کلسترول کمتری مشاهده می‌گردد. این مسأله می‌تواند به وضعیت خاص مولکول کلسترول و قرار گرفتن آن در حفره میانی مولکول  $\beta$ .CD تعبیر گردد. هنگامی که شیر هموژن و پاستوریزه می‌شود ساختار مولکول‌های چربی بهم ریخته و از حالت طبیعی خارج می‌گردند و لذا ممکن است بعضی از مولکول‌های کلسترول از نظر ساختاری به ویژه از نظر اندازه تغییر نموده و وارد حفره مولکول  $\beta$ .CD گردند. در منابع مقایسه‌ای بین میزان جذب کلسترول توسط  $\beta$ .CD در شیر خام و هموژن صورت نگرفته است. Lee و همکاران (1999)

برای بهتر نشان دادن میزان کاهش کلسترول در شیر مقادیر عددی بر حسب درصد نیز در شکل نشان داده شده‌اند. با افزایش 0/5 درصد  $\beta$ .CD در حدود 40 درصد کلسترول در شیر کاهش می‌یابد اما این روند با افزایش دو برابری  $\beta$ .CD کاهش داشته و فقط نصف اندازه قبلی یعنی حدود 25 درصد کاهش کلسترول مشاهده می‌شود. هم چنین وقتی مقدار افزایش  $\beta$ .CD به 1/5 درصد می‌رسد کاهش کلسترول نسبت به مقدار قبلی فقط 7/5 درصد است. می‌توان نتیجه گرفت که برای کاهش حداکثری کلسترول باید مقدار بهینه‌ای تعیین گردد. Ahn و Kwak (1999) با استفاده از روش سطح پاسخ شرایط بهینه گرفتن کلسترول از خامه را محاسبه و تعیین نمودند. آن‌ها برای کاهش کلسترول در خامه مقدار 10 درصد  $\beta$ .CD را پیشنهاد نمودند.

#### مقایسه میزان جذب کلسترول در دو شیر خام و هموژن

شیر خام به دلیل ساختار طبیعی و خاص دارای درشت مولکول‌های چربی است که ممکن است تحت شرایط خاص نظیر درجه حرارت، ماندگاری و عملیات هموژنیزاسیون و پاستوریزاسیون و یا تحت تأثیر افزایش خواسته و یا ناخواسته آنزیم‌ها و عوامل خارجی دستخوش تغییر شوند. از طرف دیگر

شیر 3/6 درصد چربی به دست آمد. در شکل 2 میزان کاهش کلسترول برحسب درصد در دو شیر خام و هموژن مشاهده می‌گردد.



شکل 2- میزان کلسترول باقیمانده شیر خام و هموژن برحسب میلی‌گرم در 100 میلی‌لیتر شیر

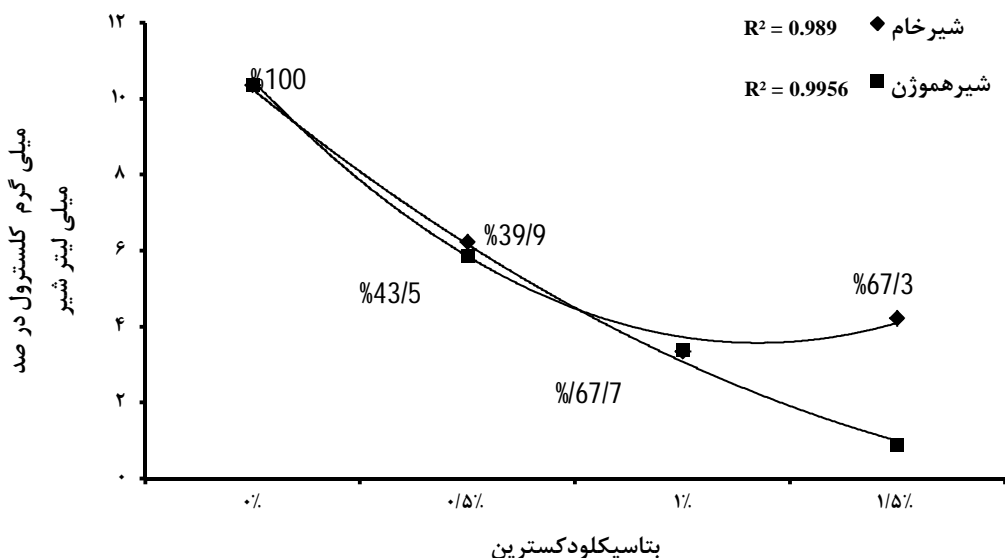
شیر هموژن به میزان قابل ملاحظه‌ای بیشتر و شیب منحنی تغییری نمی‌کند و میزان کلسترول‌زدایی به بالاترین میزان یعنی 91/4 درصد افزایش می‌یابد. ولی در شیر خام شیب منحنی کاهش کلسترول از 67/7 درصد به 67/3 درصد می‌رسد. در تفسیر این نتایج می‌توان گفت که در شیر خام غیرهموژن مولکول‌های چربی به صورت به هم چسبیده وجود داشته و تشکیل ماکرومولکول‌های بزرگ و کمپلکسی می‌دهند، لذا کمتر جذب مولکول‌های  $\beta$ .CD می‌شوند. بنابراین مولکول‌های  $\beta$ .CD در مقادیر بالاتر از 1/5 درصد به صورت آزاد در محیط وجود دارند و بر اثر برهم‌کنش‌های داخل مولکولی اثر جذب کنندگی کمتری دارند (Lee et al., 1999). هم‌چنین به دلیل جذب کم مولکول‌های کلسترول توسط  $\beta$ .CD روند افزایش جذب کلسترول در شیر هموژن با افزایش مقدار  $\beta$ .CD به توزیع یکنواخت مولکول‌ها و در شیر خام به میزان مولکول‌هایی بستگی دارد که قادرند در حفره  $\beta$ .CD قرار گیرند. هم‌چنین برهم‌کنش‌های مولکولی بین خود مولکول‌های  $\beta$ .CD در شیر هموژن کمتر اتفاق می‌افتد.

توانستند 92 تا 95 درصد کلسترول موجود در شیر هموژن را با استفاده از 0/5 تا 1/5 درصد  $\beta$ .CD جذب نمایند حذف با مخلوط کردن  $\beta$ .CD در درجه حرارت 10 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه در

Alonso و همکاران (2008) نشان دادند که مقادیر 0/4، 0/6، 0/8 و 1 درصد  $\beta$ .CD می‌تواند بین 65/42 تا 95/3 درصد کلسترول در شیر پاستوریزه و غیر هموژن را کاهش دهد. این مقادیر در درجه حرارت 4 درجه سانتی‌گراد و 20 دقیقه هم‌زدن به دست آمد.

#### مقایسه میزان کاهش کلسترول در شیر خام و هموژن توسط مقادیر مختلف $\beta$ .CD

در شکل 3 میزان کاهش کلسترول در شیر خام و هموژن در مقادیر مختلف  $\beta$ .CD نشان داده شده‌اند. در هر دو نمونه شیر خام و هموژن با افزایش میزان  $\beta$ .CD کاهش کلسترول بیشتری مشاهده می‌شود این روند برای شیر خام در غلظت 1/5 درصد به صورت نزولی است در حالی که در شیر هموژن با افزایش مقدار  $\beta$ .CD روند کاهش کلسترول کماکان ادامه می‌یابد. در مقادیر 0/5 و 1 درصد  $\beta$ .CD نسبت کاهش در هر دو نوع شیر تقریباً یکسان است و اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود. در حالی که در مقدار 1/5 درصد  $\beta$ .CD روند افزایشی جذب کلسترول برای



شکل 3- مقایسه میزان کاهش کلسترول در شیر خام و هموزن توسط مقادیر مختلف  $\beta$ .CD

4 مشاهده می‌شود، هنگامی که دمای عملیات کاهش می‌یابد و به 8 درجه سانتی‌گراد می‌رسد در تمام مقادیر  $\beta$ .CD مورد استفاده درصد جذب کلسترول نسبت به دمای 20 درجه سانتی‌گراد کاهش می‌یابد. اما روند افزایش جذب کلسترول با افزایش مقادیر  $\beta$ .CD برای شرایط 20 درجه سانتی‌گراد هم چنان حفظ شده است. در دماهای پایین‌تر به دلیل ایجاد تغییرات در ساختار مولکول‌های چربی و امولسیون شیر که یک مایع غیر نیوتونی و ویسکوزیته آن وابسته به درجه حرارت است به دلیل افزایش دانسیته ممکن است برهم‌کنش‌های مولکولی و قرار گرفتن مولکول کلسترول در حفره کمتر اتفاق افتاده و لذا میزان جذب و گیر افتادن کلسترول توسط  $\beta$ .CD کمتر باشد و بر عکس در دماهای بالاتر درصد گیر افتادن مولکول‌ها بیشتر شده و لذا افزایش جذب بیشتری مشاهده می‌گردد. تحقیقات انجام شده تاکنون نیز بیانگر نتایج متناقضی است. Lee و همکاران (1999)، Kim و همکاران (2004) اختلاف معنی‌داری در میزان کاهش کلسترول توسط  $\beta$ .CD بین دماهای 4، 10، 15 و 20 درجه سانتی‌گراد مشاهده نمودند. در حالی که Rahoma و همکاران (2003) با این نظریه مخالفند. آن‌ها معتقدند که میزان جذب کلسترول توسط  $\beta$ .CD با افزایش درجه حرارت عملیات از 4، به 8 و 40 درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد. Tsui و Yen

بالغ بر 95 درصد چربی‌های شیر را گلبول‌های با اندازه بین 0/1 تا 15 میکرون تشکیل می‌دهد که عمدتاً توسط غشایی با قطر 8-10 نانومتر پوشانده شده‌اند. جنس این غشا پروتئین و فسفولیپید است و آن‌ها ممکن است تحت اثر عوامل مختلف فیزیکوشیمیایی نظیر هموزنی‌زاسیون، حرارت، آنزیم‌ها و عوامل آبگریز و آبدوست نوآرایی جدیدی پیدا کنند. عمل هموزنی‌زاسیون با شکستن و کوچک کردن این مولکول‌ها سبب تغییر در اندازه و دانسیته آن‌ها می‌گردد. به علاوه هموزنی‌زاسیون شیر سبب نوآرایی جدیدی در غشای لیپوپروتئینی چربی می‌گردد که روی خواص آبدوستی و آبگریزی آن‌ها تأثیر گذار است. لذا پس از عمل هموزنی‌زاسیون دانسیته و پیوستگی فاز در امولسیون شیر افزایش می‌یابد (Yen *et al.*, 2009). توزیع مولکول‌های  $\beta$ .CD در شیر هموزن بیشتر است لذا ممکن است برهم‌کنش مولکولی کمتر اتفاق بیافتد و مولکول‌های حاضر از این عمل ممانعت به عمل آورند.

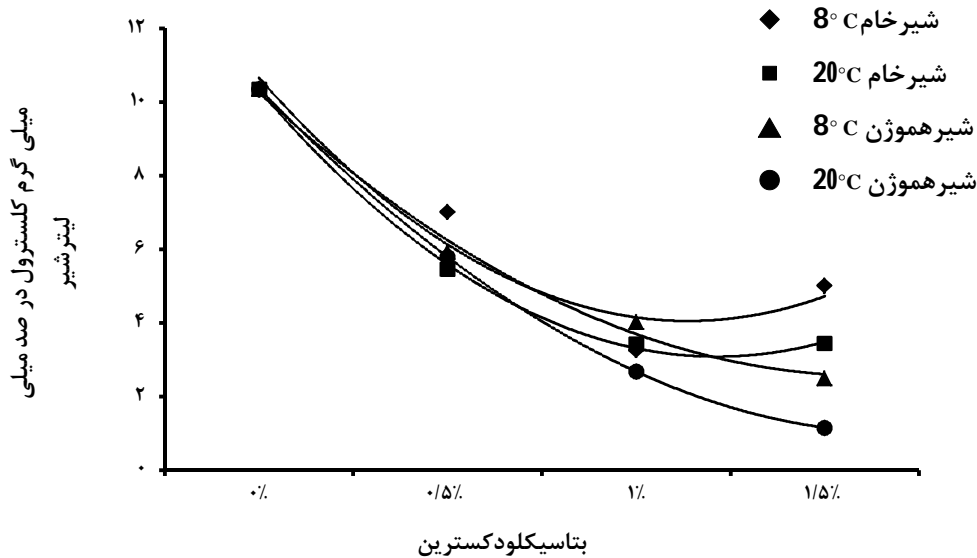
#### اثر درجه حرارت تیمار بر میزان کاهش کلسترول در دو شیر خام و هموزن

همبستگی قابل ملاحظه‌ای بین درصد کاهش کلسترول در دو شیر هموزن و خام در درجه حرارت‌های مختلف وجود دارد. به طوری که در شکل



به دست آمده از این تحقیق نشان داد که میزان کلسترول زدایی در 20 درجه سانتی‌گراد نسبت به 8 درجه سانتی‌گراد بیشتر و از نظر آماری ( $P \leq 0/05$ ) دارای اختلاف کاملاً معنی دارند.

(1995) نیز گزارش نمودند که گرفتن کلسترول توسط  $\beta$ .CD هنگامی که دمای عملیات از 40 درجه سانتی‌گراد به 50 درجه سانتی‌گراد افزایش می‌یابد بیشتر است. علیرغم حصول نتایج سایر محققان، نتایج



شکل 4- اثر درجه حرارت تیمار بر میزان کاهش کلسترول در دو شیر خام و هموژن

#### نتیجه‌گیری و پیشنهادات

از آن جا که بر اساس منابع موجود و پیشینه تحقیق کلسترول موجود در مواد غذایی از جمله شیر و فرآورده‌های لبنی به راحتی جذب بدن شده و وارد پلاسمای خون می‌شوند تا نقش اصلی خود را به عنوان تأمین کننده بخش لیپوپروتئینی جداره سلول‌های زنده ایفا نمایند اما از ازدیاد جذب آن و افزایش میزان کلسترول در پلاسمای خون نباید غافل شد. زیرا مقادیر اضافی کلسترول اکسید شده در خون سبب افزایش چربی‌های مضر ( $LDL^1$  و  $VLDL^2$ ) و در نتیجه خطر بروز بیماری‌های قلبی و عروقی از جمله گرفتگی عروق و سکته‌های قلبی و مغزی می‌گردد. روش‌های مختلفی برای کاهش کلسترول در مواد غذایی از جمله شیر و فرآورده‌های لبنی وجود دارد که ساده ترین آن‌ها حذف کلیه یا کاهش بخشی از چربی موجود در مواد غذایی است. اما این امر سبب کاهش

مقایسه و بررسی اثرات متقابل درجه حرارت تیمار و میزان  $\beta$ .CD بر درصد کاهش کلسترول در دو شیر خام و هموژن

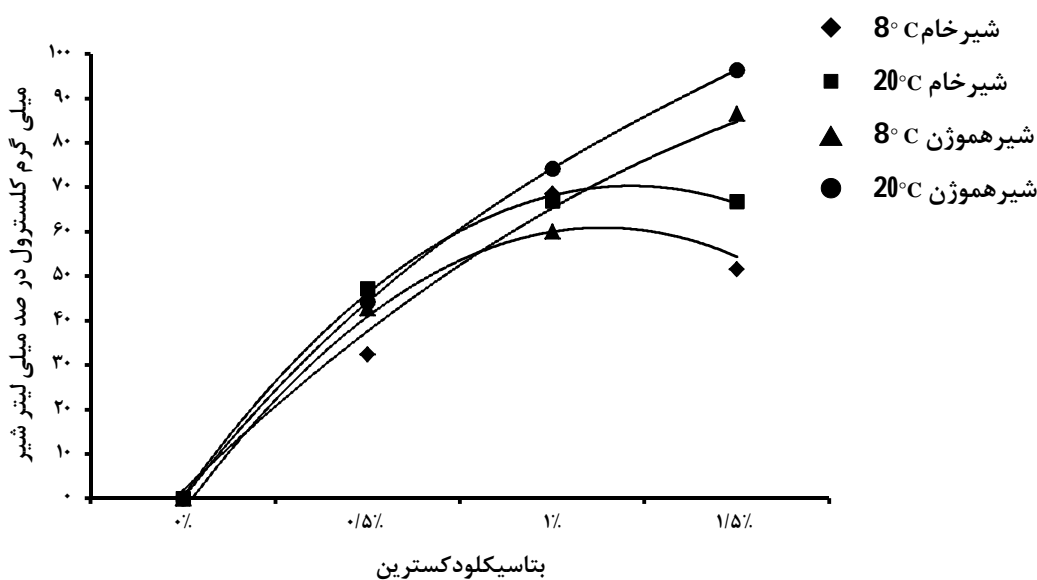
همان طور که در شکل 5 مشاهده می‌شود روند کاهش کلسترول برای نمونه شیرهای هموژن با افزایش میزان  $\beta$ .CD از 1 درصد به 1/5 درصد نزولی و برای نمونه شیرهای خام افزایشی است. ضریب همبستگی بالا در تمام مقادیر مؤید صحت نتایج حاصل است. با بررسی اثرات متقابل سه پارامتر شیر، مقدار  $\beta$ .CD و درجه حرارت ضمن تأیید نتایج قبلی مشاهده می‌شود که اختلافات بین آن‌ها در مقادیر 1/5 درصد  $\beta$ .CD معنی‌دار است. میزان کاهش کلسترول در تمام نمونه‌ها در 20 درجه سانتی‌گراد بیشتر از 8 درجه سانتی‌گراد است. تفاوت کاهش کلسترول بین شیر خام و هموژن نیز در غلظت 1/5 درصد  $\beta$ .CD کاملاً مشهود است.

1- Low Density Lipoproteins

2- Very Low Density Lipoproteins

حرارت‌های بالاتر (20 درجه سانتی‌گراد) و به ویژه در شیر هموژنیزه بیشتر صورت می‌گیرد. حداکثر جذب کلسترول زمانی صورت می‌گیرد که تعادل مناسبی بین مقدار  $\beta$ .CD و کلسترول موجود در شیر برقرار باشد و وجود  $\beta$ .CD اضافی سبب کاهش روند کلسترول زدایی می‌گردد.

خواص تغذیه‌ای و به هم خوردن تعادل فیزیکی از جمله بافت و قوام مواد غذایی می‌گردد. لذا کاهش کلسترول به صورت انحصاری و بدون کاهش بقیه محتویات چربی از جمله موارد مورد علاقه دانشمندان و محققان علم مواد غذایی است. در این تحقیق نقش قاطع  $\beta$ .CD در کاهش کلسترول در شیر به اثبات رسید. به علاوه عمل کلسترول زدایی در درجه



شکل 5- اثر متقابل افزایش مقادیر مختلف  $\beta$ .CD بر میزان کاهش کلسترول در دو نوع شیر خام و هموژن و دو درجه حرارت

دکتر کدخدایی رؤسای قبلی و وقت پژوهشگر علوم و صنایع غذایی، مهندس محمد اسدی، سرکار خانم سمیرا میهن پرست، کارشناسان آزمایشگاه تست، سرکار خانم زعفرانی، آقای رضا جوادی و کلیه همکاران شاغل در این دو مجموعه که به نوعی سبب انجام موفقیت آمیز طرح شدند قدردانی و سپاسگزاری نمایند.

### تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پروژه تحقیقاتی بررسی امکان کاهش کلسترول در شیر است که با حمایت مالی، فنی و خدماتی پژوهشگر علوم و صنایع غذایی و آزمایشگاه کنترل کیفی تست، گروه صنعتی آسه آرد به صورت سرمایه‌گذاری مشترک انجام شده است. گروه تحقیق بر خود لازم می‌داند از مدیریت هر دو مجموعه به ویژه جناب آقای مهندس همتی و جناب آقای

### منابع

- 1- آریافر م، و زندی پ. 1386. تولید کره کم کلسترول با استفاده از بناسیکلودکسترین. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی، 2 (3): 23 تا 30.
- 2- Ahn, J. & Kwak, H. S. 1999. Optimizing cholesterol removal in cream using  $\beta$ -cyclodextrin and response surface methodology. *Journal of Food Science*, 64(4): 629-632.
- 3- Alonso, L., Cuesta, P., Fontecha, J., Juarez, M. & Gilliland, S. E. 2008. Use of  $\beta$ -cyclodextrin to decrease the level of cholesterol in milk fat. *Journal of Dairy Science*, 92: 863-869.

- 4- Bradely, R. & Jir. L. 1989. Removal of cholesterol from milk fat using supercritical carbon dioxide. *Journal of Dairy Science*, 72(10): 2834-2840.
- 5- Chafic Aziz, A. & Gray, J. I., 2000. Methods to reduce free fatty acids and cholesterol in anhydrous animal fats. US patent, No: 6,129,945.
- 6- Chiu, S.H., Wen, T., Chung, R. Giridhar,W. & Wu, T. 2004. Immobilization of  $\beta$ -cyclodextrin in chitosan beads for separation of cholesterol from egg yolk. *Food Research International*, 37: 217–223.
- 7- Denis, W. & Minot, A. S. 2010. Cholesterol in milk. [www.jbc.org](http://www.jbc.org).
- 8- Edward, S., Segovia, E. & Jacquelyn, C. Patent application title: Systems and methods for reducing cholesterol in a milk product. Patent application number: 20090280233.
- 9- Gurr, M. I. 1992. Dietary lipids and coronary heart disease: old evidence, new perspective. *Progress in Lipid Research*, 31: 195–243.
- 10- Grundy, S. M., Brheimer, D., Blackburn, H., Brown, W. V., Kwiterovich, P. O., Mattson, F., Schonfeld G. & Weidman W. H. 1982. Rationales of the diet-heart statement of the americanheart association. Report of the Nutrition Committee, 65: 839– 854.
- 11- Kim, S. H., Ahn, J. & Kwak, H. S. 2004. Crosslinking of  $\beta$ -cyclodextrin on cholesterol removal from milk. *Archives of Pharmacal Research*, 27 (11): 1183-1187.
- 12- Klatt, L.V. 1995. Cholesterol analysis in food by direct saponification- Gas chromatographic method: Collaborative study, *Journal of AOAC International*, 78: 75–79.
- 13- Kwak, H. S., Jung, C. S., Shim, S. Y. & Ahn, J. 2002. Removal of cholesterol from cheddar cheese by  $\beta$ -cyclodextrin *journal of Agriculture and. Food Chemistry*, 50: 7293-7298.
- 14- Kwak, H. S., Kim, S. H., Kim, J. H., Choi, H. J. & Kang, J. 2004. Immobilized  $\beta$ -cyclodextrin as a simple and recyclable method for cholesterol removal in Milk. *Archives of Pharmacia Research*, 27 (8): 873-877.
- 15- Kwak, H. S., Kim, S. H. & Kang, J. 2007. Methods for cross linking betacyclodextrin for the cholesterol trapping and regeneration thereof, US Patent No: 2007/0093447.
- 16- Lee, D. K., Ahn, J. & Kwak, H. S. 1999. Cholesterol Removal from homogenized milk with  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Dairy Science*, 82 (11): 2327-2330.
- 17- Martin, E.M. 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39: 1033–1046.
- 18- Rahoma, S. Mohamed, M. Saldan, D. A. Alvaro B. Azevedo, A. & Kopcak U. 2003. Removal of cholesterol from food products using supercritical in Fluids. *Food Chemistry and Processing by Marcel Dekker, Inc.*
- 19- Richardson, T., Calif, D., Jimenez, R. & Champaign, F. 1989. Process to remove cholesterol from dairy products. US Patent No: 5,326,579.
- 20- Smith, M., Sullivan, C. & Goodman, N. 1991. Reactivity of milk cholesterol with bacterial cholesterol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39 (12): 2158-2162.
- 21- Vedaraman, N., Brunner, G., Srinivasa, C., Muralidharan, C., Raa, P. G. & Raghavan, K.V. 2004. Extraction of cholesterol from cattle brain using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 32: 231–242.
- 22- WHO report. 2010. Cardiovascular disease: prevention and control WHO. *Worldwide Missions Statistics –edition*, [www.who.org](http://www.who.org).
- 23- Yen, G.C. & Tsui, L.T. 1995. Cholesterol removal from a lard mixture with  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Food Science*, 60: 561-564.
- 24- Yun, S., Kim, E., Kyung H., Joungewa, A. & Kwak, H. S. 2009. Chemical and sensory properties of cholesterol-reduced processed cheese spread. *International Journal of Dairy Technology*, 62 (3): 348-353.

## Cholesterol reduction of raw and homogenized milk using betacyclodextrin

Abdolmajid Maskooki<sup>1\*</sup>, Seyed Hamed Reza Beheshti<sup>2</sup>, Azra Kheradmand<sup>3</sup>,  
Saeedeh Valibeigi<sup>3</sup>, Javad Feizi<sup>2</sup>

1- Associate Professor, Department of Food Processing, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

\*Corresponding author (a.maskooki@rifst.ac.ir)

2- Testa Quality Control Laboratory, Mashhad, Iran

3- MSc. Graduated student, Department of Food Science & Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

### Abstract

The direct relation between high blood cholesterol and cardiovascular diseases has been proved. Food containing high amount of cholesterol such as meat and meat products, egg yolk, milk and dairy products can be elevated the cholesterol content in blood plasma. The possibility of cholesterol reduction in milk using beta cyclodextrin was investigated. In this research, various amounts of  $\beta$ - cyclodextrin (0, 0.5, 1 and 1.5 %) were mixed with raw (unhomogenized and unpasteurized) and homogenized milk at two temperature conditions of 8°C and 20°C. The cholesterol content of milk was measured for each treatment. The results that statistically were analyzed and showed that the cholesterol content of milk remarkably was decreased with increasing the amount of  $\beta$ - cyclodextrin, particularly in homogenized milk at 20°C. However, the reduction rate of cholesterol were decreased when extra  $\beta$ - cyclodextrin added due to its intermolecular reactions. The maximum cholesterol reduction was achieved when 1.5 %  $\beta$ -cyclodextrin added to homogenized milk at 20°C.

**Keywords:** Betacyclodextrin, Cholesterol, Homogenized milk, Raw milk