



DOI: 10.22034/FR.2021.37969.1713

## بهینه سازی کاهش میزان کلسترول شیر با استفاده از بتاسیکلودکستین و کاتچین هیدرات

مریم معینی نیا<sup>۱</sup>، زهرا علی بابایی<sup>۲</sup> و نفیسه زمین دار<sup>۳\*</sup>

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۹/۷/۱۹

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)

<sup>۲</sup> مربی گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)

<sup>۳</sup> استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)

\*مسئول مکاتبه: Email: n.zamindar@khuisf.ac.ir

### چکیده

**زمینه مطالعاتی:** بتاسیکلودکستین یک الیگومر حلقوی متشکل از هفت مولکول گلوکوپیرانوز می‌باشد که جهت جداسازی کلسترول مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف: این مطالعه با هدف بررسی اثر استفاده از کاتچین-هیدرات جهت کاهش سطح مورد نیاز بتاسیکلودکستین برای دستیابی به حداکثر کاهش کلسترول شیر هموژنیزه و استریلیزه می‌باشد. روش کار: در این مطالعه از روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی جهت ارزیابی تغییرات میزان کلسترول شیر به عنوان متغیر وابسته استفاده شد. متغیرهای مستقل شامل بتاسیکلودکستین از غلظت ۰/۱۲ تا ۲/۴۸٪، کاتچین‌هیدرات از غلظت ۰/۰۱ تا ۰/۱۲٪ و زمان مخلوط کردن نمونه‌های شیر تیمار شده با کاتچین‌هیدرات و بتاسیکلودکستین از ۶/۴۸ تا ۴۸/۵۲ دقیقه بودند. میزان پروتئین و چربی شیر، اثر ممانعت‌کنندگی از فعالیت رادیکال آزاد و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در نقاط مرکزی اندازه‌گیری شدند. ارزیابی حسی برای نمونه‌های شیر کنترل و تیمار شده انجام گرفت. نتایج: نشان دادند حداکثر کاهش میزان کلسترول (۹۶/۹۶٪) در غلظت کاتچین‌هیدرات ۰/۰۱٪، بتاسیکلودکستین ۰/۱۲٪ و زمان مخلوط کردن ۳۸ دقیقه حاصل شد. میزان چربی و پروتئین در نمونه‌های تیمار شده نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری یافت. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت رادیکال آزاد افزایش معنی‌داری یافت. ارزیابی حسی بین نمونه‌های شاهد و بهینه تفاوت معنی‌داری نشان نداد و نمونه‌ی بهینه مورد پذیرش ارزیاب‌ها قرار گرفت. نتیجه‌گیری نهایی: نتایج نشان دادند کاتچین‌هیدرات می‌تواند میزان بتاسیکلودکستین مورد نیاز جهت جداسازی کلسترول شیر را کاهش دهد و کمترین تاثیر را بر سایر ریزمغذی‌های شیر بگذارد.

**واژگان کلیدی:** بتاسیکلودکستین، روش سطح پاسخ، شیر هموژنیزه، کاتچین‌هیدرات، کلسترول

### مقدمه

موجود در حیوانات می‌باشد. این ماده پیش‌ساز نمک‌های صفراوی، هورمون‌های استروئیدی و پروویتامین D<sub>3</sub> بوده و وجود آن برای رشد سلول‌ها

کلسترول با فرمول C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>OH ماده‌ای ضروری در غشاهای سلولی، لیپوپروتئین‌های پلاسما و چربی

الکل‌های آروماتیک، اسیدهای چرب و کلاسترول پیوند تشکیل دهد. شکل و اندازه‌ی حفره‌ی داخلی مولکول بتاسیکلودکسترین به نحوی است که این ماده می‌تواند اتصال خوبی با کلاسترول آزاد و استری شده از طریق پیوندهای هیدروفوبی تشکیل دهد (چافیک آواد و گری ۱۹۹۹). مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که بتاسیکلودکسترین می‌تواند میزان کلاسترول مواد غذایی را کاهش دهد (مسکوکا و همکاران ۲۰۱۳). در پژوهشی کاهش میزان کلاسترول شیر پاستوریزه به میزان ۹۷٪ با استفاده از بتاسیکلودکسترین حاصل گردید (آلونسو و فونتجا ۲۰۱۵). در پژوهش دیگری با استفاده از بتاسیکلودکسترین اصلاح شده با اپی‌کلروهیدرین کلاسترول شیر به میزان ۸۳/۳٪ کاهش یافت (کیم و همکاران ۲۰۰۴). بر اساس کمیته تخصصی سازمان غذا و کشاورزی ملل متحد و سازمان جهانی بهداشت، حداکثر مجاز استفاده از بتاسیکلودکسترین ۵ mg/kg در هر روز می‌باشد (آستری و همکاران ۲۰۰۹).

کاتچین‌ها جزء مهم پلی‌فنول‌ها می‌باشند که از گیاهانی از جمله چای سبز استخراج می‌شوند. کاتچین‌ها شامل اپی‌گالوکاتچین‌گالات، اپی‌گالوکاتچین، اپی‌کاتچین‌گالات، اپی‌کاتچین و ایزومرهای اپیمریزه‌ی آن‌ها می‌باشند (یه و همکاران ۲۰۱۳؛ اکثری و همکاران ۱۳۹۹). کاتچین‌ها فواید بسیاری از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد ویروس، ضد سرطان (رفتنی امیری و مداح ۱۳۹۴) و ضد چاقی دارند همچنین به عنوان افزودنی در مواد غذایی جهت بهبود خواص آنتی‌اکسیدانی و افزایش عمر ماندگاری محصولات مورد استفاده قرار می‌گیرند (یان و همکاران ۲۰۰۷). مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که مصرف کاتچین‌های چای سبز موجب کاهش جذب کلاسترول در روده‌ی انسان می‌شود. نشان داده شده است که فسفاتیدیل‌کولین جزء مهمی جهت حلالیت کلاسترول در میسل‌های نمک‌های صفاوی می‌باشد. مکانیسم مولکولی که بوسیله‌ی آن پلی‌فنول‌های چای سبز حلالیت کلاسترول را کاهش می‌دهند کاملاً مشخص

الزامی می‌باشد (آهن و همکاران ۲۰۱۲). این ماده نقش مهمی در سلامت قلب و عروق انسان دارد. کلاسترول در بسیاری از مواد غذایی از جمله محصولات لبنی یافت می‌شود. میزان بالای کلاسترول (ما و شیبه ۲۰۰۶) در شیر و محصولات لبنی موجب افزایش میزان کلاسترول خون می‌گردد (نتف و همکاران ۱۹۴۸). ترکیبات اصلی شیر چربی، پروتئین، لاکتوز، مواد معدنی و آب می‌باشند. چربی شیر عمدتاً متشکل از تری‌گلیسیریدها (۹۸٪) است که توسط غشایی متشکل از پروتئین، فسفولیپید و گلیکوپروتئین (ال لولی ۲۰۱۱) پایدار شده‌اند. قطر گلبول‌های چربی شیر ۰/۲ تا ۱۵ میکرومتر می‌باشد (هاپرتز و کلی ۲۰۰۶). غشاء گلبول‌های چربی شیر از سه لایه تشکیل شده است: تک‌لایه‌ی داخلی اولیه متشکل از پروتئین و لیپیدهای قطبی می‌باشد که منشاء آن‌ها سیتوپلاسم و شبکه‌ی آندوپلاسمی است. غشاء دو لایه‌ی خارجی عمدتاً متشکل از فسفولیپیدها و سایر ترکیبات غشایی پلاسم می‌باشد. فسفاتیدیل‌کولین و اسفنگومیلین در سطح خارجی غشاء دو لایه واقع شده‌اند در حالی که فسفاتیدیل اینوزیتول و فسفاتیدیل سرین عمدتاً در غشاء تک لایه‌ی داخلی یافت می‌شوند (مارکوردت و همکاران ۲۰۱۵). در هر میلی‌لیتر از شیر گاوی تقریباً ۱۰<sup>۱۰</sup> گلبول چربی وجود دارد. کلاسترول عمدتاً در داخل غشاء واقع شده است و به صورت نامتقارن در هر دو لایه‌ی غشاء فسفولیپیدی توزیع شده است همچنین کلاسترول به مقدار اندکی در تری‌گلیسیریدهای درون گلبول‌های چربی وجود دارد (لوپز و منارد ۲۰۱۱). بتاسیکلودکسترین یک الیگوساکارید حلقوی متشکل از ۷ مولکول گلوکوپیرانوز می‌باشد که توسط پیوندهای ۴-۱-α به یکدیگر متصل شده‌اند و شکلی شبیه به دونات دارند (چافیک آواد و گری ۱۹۹۹). این ماده غیر سمی و خوراکی بوده و از لحاظ شیمیایی پایدار می‌باشد و می‌تواند به آسانی از ترکیبات جدا شود (داس و همکاران ۲۰۱۳). حفره‌ی داخلی این ماده هیدروفوب بوده و اجازه می‌دهد که با مولکول‌هایی چون

بتاسیکلودکسترین بیشتر می‌باشد (مسکوکی و همکاران ۲۰۱۳). لذا هدف از این پژوهش استفاده از کاتچین-هیدرات در بهینه‌سازی کاهش میزان کلسترول شیر استریلیزه و هموژنیزه بوسیله‌ی بتاسیکلودکسترین می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

شیر استریلیزه و هموژنیزه حاوی ۳٪ چربی از شرکت لبنیات پگاه اصفهان، بتاسیکلودکسترین با درصد خلوص  $\leq 97\%$  از شرکت مرک آلمان و کاتچین‌هیدرات از شرکت سیگما ایالت متحده‌ی آمریکا خریداری شد. سایر واکنش‌گرها و محلول‌ها با درجه‌ی آنالیتیکی از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

### آماده‌سازی نمونه

به منظور انجام آزمایش‌ها از شیر استریلیزه و هموژنیزه حاوی ۳٪ چربی به عنوان نمونه‌ی کنترل استفاده شد و نمونه‌ی تیمار شده مطابق پژوهش مسکوکی و همکاران (۲۰۱۳) با کمی تغییرات آماده شد. جهت تهیه‌ی نمونه‌ی تیمار شده ۷۰ میلی‌لیتر شیر استریلیزه و هموژنیزه حاوی ۳٪ چربی با غلظت‌های مختلف کاتچین‌هیدرات مطابق جدول ۱ با استفاده از همزن آلفا دی ۵۰۰ (ساخت ایران) در شرایط ۷۵۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  (دمای اتاق) مخلوط شدند. سپس نمونه‌ها با غلظت‌های مختلف بتاسیکلودکسترین در زمان‌های مختلف در شرایط rpm ۷۵۰ در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  مخلوط شدند. نمونه‌ها در شرایط  $1000 \times g$  در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس قسمت رویی نمونه‌ها به منظور اندازه‌گیری میزان کلسترول به وسیله‌ی دستگاه کروماتوگرافی گازی و نیز اندازه‌گیری سایر اجزاء شیر جدا شد.

### صابونی شدن

صابونی شدن مستقیم با استفاده از بتولین (تری تریپنویید پنتاسیکلیک)، lup-20(29)-ene-3 $\beta$ , 28-

نیست. احتمالاً علت آن برهم‌کنش بین کاتچین‌ها و فسفاتیدیل‌کولین در میسل‌های نمک‌های صفاوی می‌باشد همچنین ادعا شده است که اپی‌گالوکاتچین‌گالات می‌تواند حلالیت فسفاتیدیل‌کولین و کلسترول را در محلول‌های میسلی کاهش داده و موجب حذف کلسترول از میسل‌ها شود. این اثر احتمالاً به علت برهم‌کنش تائوروکولیک اسید<sup>۱</sup> با اپی‌گالوکاتچین‌گالات در میسل‌های نمک‌های صفاوی می‌باشد که موجب خروج کلسترول و فسفاتیدیل‌کولین از میسل‌های نمک‌های صفاوی می‌شود (اوگاوا و همکاران ۲۰۱۶) همچنین اثبات شده است که برهم‌کنش بین پلی‌فنل‌ها با میسل‌های کازئین شیر و پروتئین‌های آب پنیر موجب تغییرات ساختاری پروتئین‌های شیر می‌گردد (یه و همکاران ۲۰۱۳). غشاء گلبول‌های چربی شبیه به غشاهای بیولوژیکی می‌باشد (کینان و همکاران ۱۹۷۰). در پژوهش دیگری نیز اثبات شده است که پیوند هیدروژنی بین گروه‌های هیدروکسیل کاتچین و گروه‌های قطبی فسفولیپیدها تشکیل می‌شوند که این امر امکان ایجاد برهم‌کنش‌های هیدروفیل و هیدروفوب بین کاتچین و گلبول‌های چربی شیر را باعث می‌شود (کامیه‌را و همکاران ۲۰۰۸؛ رشیدی‌نژاد و همکاران ۲۰۱۶). تصور می‌شود که کاتچین‌هیدرات می‌تواند با فسفولیپیدها و پروتئین‌های غشاء گلبول‌های چربی شیر واکنش داده و حلالیت کلسترول را کاهش دهد، در نتیجه سبب می‌شود که کلسترول به راحتی از غشاء گلبول‌های چربی شیر جدا شده و در حفره‌ی مولکول بتاسیکلودکسترین به دام افتد. در نتیجه حداکثر کاهش کلسترول را می‌توان با استفاده از مقدار بسیار پایین‌تری از بتاسیکلودکسترین بدست آورد. شایان ذکر است که کاهش کلسترول در شیر هموژنیزه نسبت به شیر خام بهتر انجام می‌گیرد. علت آن است که ذرات لیپیدی در شیر هموژنیزه بطور چشمگیری کوچکتر از شیر خام می‌باشند در نتیجه احتمال به دام افتادن ذرات کلسترول در حفره‌ی مولکول

<sup>1</sup> Taurocholic acid

### اندازه‌گیری میزان پروتئین، چربی، اثر ممانعت کنندگی از رادیکال آزاد (DPPH) و محتوای فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل

در این پژوهش میزان پروتئین و چربی شیر در نقاط مرکزی با استفاده از دستگاه میکواسکن (FOSS، مدل مینور، ساخت کشور دانمارک) و میزان اثر ممانعت کنندگی از رادیکال آزاد (بالاکریشن و آگراوال ۲۰۱۴) و محتوای فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل آن بر حسب اسید آسکوربیک با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimadzu، مدل UV-120-02، ساخت کشور ژاپن) اندازه‌گیری شد (تاج‌خان و همکاران ۲۰۱۷).

### ارزیابی حسی

برخی از ویژگی‌های حسی نمونه‌های کنترل و بهینه از جمله طعم، رایحه و پذیرش کلی در چهارچوب آزمون هدونیک پنج نقطه‌ای (۱= غیرقابل قبول، ۲= نسبتاً رضایت‌بخش، ۳= متوسط، ۴= خوب و ۵= عالی) توسط ۱۰ ارزیاب آموزش دیده (۵ ارزیاب زن و ۵ ارزیاب مرد در محدوده سنی ۲۰-۴۰) ارزیابی شد. نمونه‌ها در دمای اتاق آماده شدند و در ظروف درب بسته با کدهای  $M_1$  و  $M_2$  در اختیار ارزیاب‌ها قرار گرفتند (کشتکاران و همکاران ۲۰۱۲).

### تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

روش سطح پاسخ با استفاده از طرح مرکب مرکزی جهت ارزیابی متغیرهای مستقل بتاسیکلودکسترین، کاتچین‌هیدرات و زمان مخلوط کردن نمونه مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با کمک نرم‌افزار Design expert 7 در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. همچنین تحلیل آماری پروتئین، چربی، اثر ممانعت کنندگی از رادیکال آزاد و محتوای فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار در نمونه‌های آزمایشی می‌باشد. میانگین نمونه‌های کنترل و تیمار شده با آزمون t-test ( $P \leq 0.05$ ) مقایسه شدند. داده‌ها با نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۶ مورد ارزیابی قرار

diol (هوردیجوسکا و همکاران ۲۰۱۸) به عنوان استاندارد داخلی با کمی تغییرات انجام شد. یک گرم چربی شیر با یک میلی‌لیتر محلول استاندارد داخلی با ۵ میلی‌لیتر پتاسیم هیدروکسید متانولی ۰/۵ مول بر لیتر مورد استفاده قرار گرفت. طی فرایند صابونی شدن مشتق متیله‌ی اسیدهای چرب تشکیل شده که این ترکیبات سنگین بوده و به راحتی در کروماتوگرافی گازی رسوب می‌نمایند. ترکیبات غیرصابونی شونده با استفاده از ۳۰ میلی‌لیتر دی‌اتیل‌اتر با نرخ جریان ۲ میلی‌لیتر بر دقیقه استخراج شدند و سپس مستقیماً به صفحات TLC انتقال یافتند و با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی مورد بررسی قرار گرفتند (آلونسو و همکاران ۱۹۹۵). جهت شناسایی پیک کلاسترول در منحنی GC ابتدا استاندارد کلاسترول به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد تا زمان بازداری آن مشخص گردد. در ادامه نمونه‌ی مورد نظر به دستگاه تزریق شد. با مقایسه‌ی زمان بازداری پیک‌های نمونه شیر و نمونه استاندارد، کلاسترول موجود شناسایی و سپس مقدار آن محاسبه شد.

### شرایط کروماتوگرافی گازی

اندازه‌گیری میزان کلاسترول شیر با روش مستقیم به وسیله‌ی دستگاه کروماتوگرافی گازی آجیلنت (ساخت آمریکا) که مجهز به شناساگر یونیزاسیون شعله، تزریق‌کننده بخار و سیستم تزریق شکافت (دو قسمتی) می‌باشد، انجام شد. آزمایش‌ها با استفاده از ستون مویی، از جنس سیلیکا HP-5 با طول ۵۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت ۰/۱ میکرومتر انجام شدند. گاز هیدروژن با سرعت جریان ۳۶ سانتی‌متر بر ثانیه به عنوان گاز حامل در نظر گرفته شد. دمای تزریق‌کننده و شناساگر یونیزاسیون شعله  $320^\circ\text{C}$  و برنامه‌ی دمایی آزمایش از  $240^\circ\text{C}$  تا  $255^\circ\text{C}$  افزایش یافت (سرعت ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد بر دقیقه) و میزان تزریق نمونه به دستگاه برابر با یک میکرولیتر بود (آلونسو و همکاران ۱۹۹۵).

۰/۱۲٪ و زمان مخلوط کردن نمونه‌ها از ۶/۴۸ تا ۴۸/۵۲ دقیقه استفاده شد. طبق جدول ۱ در این روش طرح مرکب مرکزی شامل ۲۰ آزمایش با ۶ تکرار در نقاط مرکزی مدل (آزمایش‌های شماره‌ی ۳، ۴، ۷، ۹، ۱۵ و ۱۶)، ۶ نقطه‌ی محوری، ۸ نقطه‌ی گوشه‌ای، ۳ بلوک، ۳ فاکتور و ۵ سطح (∞، +۱، ۰، -۱، -∞) می‌باشد.

گرفتند. همچنین تحلیل آماری ارزیابی حسی با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد.

## نتایج و بحث

### بهینه سازی فرایند

در این مطالعه از روش سطح پاسخ جهت ارزیابی میزان کلسترول شیر به وسیله‌ی سه متغیر بتاسیکلودکسترین در غلظت‌های ۰/۱۲ تا ۲/۴۸٪، کاتچین‌هیدرات از ۰/۰۱ تا

جدول ۱- اثر غلظت بتاسیکلودکسترین و کاتچین‌هیدرات و زمان مخلوط کردن نمونه‌ها بر کاهش کلسترول شیر

Table 1- Effect of beta-cyclodextrin and catechin hydrate concentration and mixing time of samples on milk cholesterol reduction

Number	Block	Catechin hydrate (%)	Beta-cyclodextrin (%)	Mixing time (min)	Cholesterol (g/ 100 g fat)
1	Block 1	0.1	0.6	40	0.1
2	Block 1	0.03	0.6	15	0.18
3	Block 1	0.07	1.3	27.5	0.025
4	Block 1	0.07	1.3	27.5	0.02
5	Block 1	0.1	2	15	0
6	Block 1	0.03	2	40	0.01
7	Block 2	0.07	1.3	27.5	0.03
8	Block 2	0.1	2	40	0.04
9	Block 2	0.07	1.3	27.5	0.03
10	Block 2	0.03	0.6	40	0.03
11	Block 2	0.1	0.6	15	0.16
12	Block 2	0.03	2	15	0.01
13	Block 3	0.01	1.3	27.5	0.03
14	Block 3	0.07	1.3	6.48	0.04
15	Block 3	0.07	1.3	27.5	0.04
16	Block 3	0.07	1.3	27.5	0.03
17	Block 3	0.12	1.3	27.5	0.04
18	Block 3	0.07	2.48	27.5	0.03
19	Block 3	0.07	1.3	48.52	0.04
20	Block 3	0.07	0.12	27.5	0.28

معنی‌دار نمی‌باشد ( $P > 0.05$ ). مقدار  $R^2$  متعادل شده ( $R^2_{adj}$ ) برابر با ۰/۹۷۷۴ می‌باشد که نشان می‌دهد تنها ۲/۲۶٪ از متغیرهای کل توسط مدل توجیه نشده‌اند. ضریب تغییرات مدل برابر با ۹/۳۲ می‌باشد که بیانگر دقت و قابل اعتماد بودن مدل است. میزان کاهش کلسترول شیر مستقیماً تحت تاثیر غلظت بتاسیکلودکسترین و توان دوم غلظت بتاسیکلودکسترین ( $P < 0.0001$ ) می‌باشد. مقدار Pvalue مربوط به آثار متقابل بتاسیکلودکسترین و کاتچین‌هیدرات (AB)، بتاسیکلودکسترین و زمان مخلوط کردن نمونه (BC) و کاتچین‌هیدرات و زمان مخلوط کردن نمونه (AC) به ترتیب  $P < 0.05$ ،  $P < 0.0001$  و  $P < 0.0001$  می‌باشد در حالی که زمان مخلوط کردن نمونه (C) به تنهایی اثری بر کاهش میزان کلسترول ندارد (جدول ۲).

بر اساس آنالیزهای رگرسیون چندگانه میزان جذر کلسترول باقیمانده در نمونه از طریق معادله‌ی درجه‌ی دوم زیر بر اساس پارامترهای کد شده بیان می‌شود.

$$\text{Sqrt}(Y) = 0.17 + 0.017A - 0.12B - 4.67 \times 10^{-3}C - 0.024AB + 0.055AC + 0.058BC + 0.058B^2$$

در معادله‌ی ذکر شده،  $\text{Sqrt}(Y)$  جذر کلسترول باقیمانده در نمونه (چربی gr/100gr) می‌باشد و A، B و C به ترتیب بیانگر متغیرهای مستقل کاتچین‌هیدرات، بتاسیکلودکسترین و زمان مخلوط کردن نمونه می‌باشند. نتایج حاصل نشان‌دهنده‌ی همبستگی زیادی بین داده‌های تجربی و داده‌های پیش‌بینی‌شده توسط مدل می‌باشند. تحلیل آماری مدل به صورت تجزیه واریانس انجام شد. در مدل ۶ وجهی انتخابی، مقدار ضریب تبیین برابر با ۰/۹۸۶۷ بوده و عدم برازش مدل

جدول ۲- تجزیه واریانس (ANOVA) مدل شش وجهی

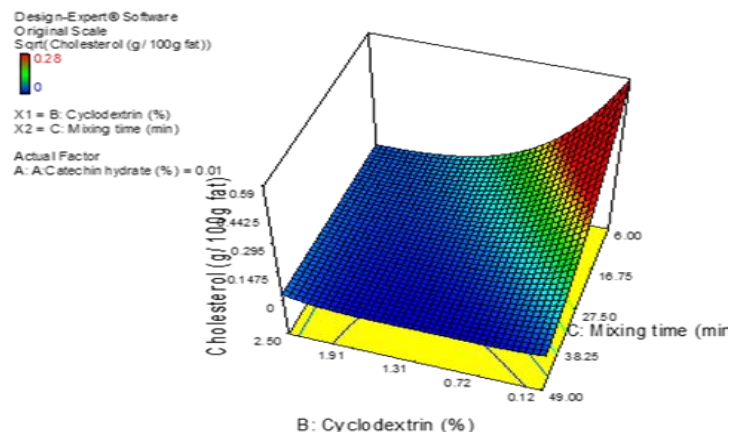
Table 2- Analysis of variance (ANOVA) of quadratic model.

Source	Degree of freedom	sum of squares	mean square	F-value	P-value
Model	7	0.29	0.042	106.13	<0.0001 **
Residual	10	$3.95 \times 10^{-3}$	$3.95 \times 10^{-4}$		
Lack of fit	7	$3.95 \times 10^{-3}$	$5.12 \times 10^{-4}$	4.28	< 0.1297 ns
Pure error	3	$3.95 \times 10^{-4}$	$1.20 \times 10^{-4}$		
Variables	Degree of freedom	sum of squares	mean square	F-value	P-value
A	1	$4.04 \times 10^{-3}$	$4.04 \times 10^{-3}$	10.24	0.0095
B	1	0.18	0.18	465.28	< 0.0001
C	1	$2.98 \times 10^{-4}$	$2.98 \times 10^{-4}$	0.75	0.4054
B <sup>2</sup>	1	0.05	0.05	126.24	< 0.0001
AB	1	$4.50 \times 10^{-3}$	$4.50 \times 10^{-3}$	11.42	0.007
AC	1	0.024	0.024	60.88	< 0.0001
BC	1	0.027	0.027	68.14	< 0.0001

\*\* Significant at 0.05, ns Not significant

رابطه‌ی بین پارامترهای مستقل و مقدار کلسترول شیر به وسیله‌ی نمودارهای سطح پاسخ سه بعدی و کانتورهای دو بعدی نشان داده شده است.

ارزیابی اثرات متقابل بین متغیرهای مستقل بر میزان کلسترول شیر

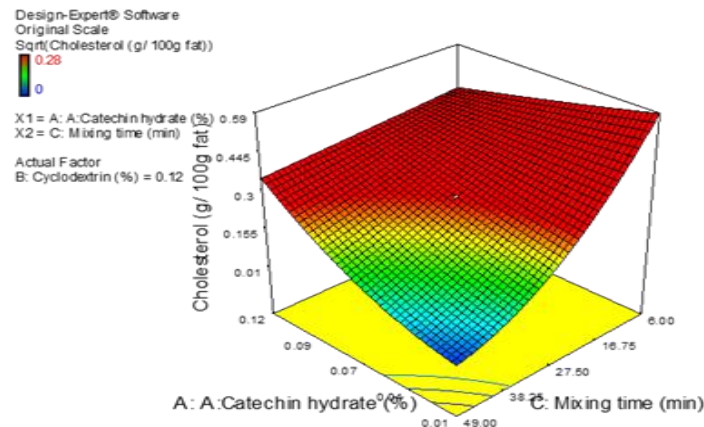


شکل ۱- نمودار رویه سه بعدی بر هم کنش بتاسیکلودکسترین و زمان مخلوط کردن در غلظت ثابت کاتچین هیدرات ۰/۰۱٪ بر مقدار کلسترول شیر

Figure 1- Response surface plots of beta-cyclodextrin and mixing time interaction at constant concentration of catechin hydrate 0.01% on the amount of milk cholesterol.

میسلهای نمکهای صفراوی از طریق اتصال با فسفاتیدیل کولین موجود در این میسلها می باشد (یونگوسا و همکاران ۲۰۱۱) از طرف دیگر نشان داده شده است که کاتچینها می توانند با فسفاتیدیل کولین موجود در غشاء دو لایه‌ی فسفولیپیدی نیز واکنش دهند (کامپهیرا و همکاران ۲۰۰۸). همچنین اثبات شده است که مولکولهای کازئین در سطح گلبولهای چربی شیر تازه تشکیل شده وجود دارند (هنسترا و اسکمیدت ۱۹۷۰). از طرفی کاتچینها می توانند با کازئینهای شیر واکنش داده و تغییرات ساختاری در آنها ایجاد نمایند (یه و همکاران ۲۰۱۳). از آنجایی که غشاء گلبولهای چربی شیر شبیه به غشاهای بیولوژیکی می باشند (کینان و همکاران ۱۹۷۰). بنابراین کاتچین هیدرات می تواند با برخی از اجزای غشاء گلبولهای چربی شیر هموژنیزه از جمله فسفاتیدیل کولین و کازئین واکنش دهد. در نتیجه یکپارچگی و پایداری غشاء گلبولهای چربی شیر ممکن است آسیب دیده و حلالیت کلسترول کاهش یابد. در نهایت کلسترول می تواند از غشاء گلبول چربی شیر جدا شده و به راحتی در حفره‌ی مولکول بتاسیکلودکسترین به دام افتد.

اثر متقابل بتاسیکلودکسترین و زمان مخلوط کردن نمونه در غلظت ثابت کاتچین هیدرات (۰/۰۱٪) در شکل ۱ نشان داده شده است. در تمام غلظت‌های بتاسیکلودکسترین از ۰/۱۲ تا ۲/۵٪ و زمان مخلوط کردن نمونه از ۳۸ تا ۴۹ دقیقه، حداکثر کاهش کلسترول مشاهده شد (۹۶/۹۶٪). با افزایش نسبت مولی بتاسیکلودکسترین به کاتچین هیدرات، زمان مخلوط کردن نمونه برای دستیابی به حداکثر کاهش کلسترول می تواند کاهش یابد در نتیجه در غلظت‌های بتاسیکلودکسترین از ۱/۹ تا ۲/۵٪ در زمان مخلوط کردن ۶ دقیقه، حداکثر کاهش کلسترول مشاهده گردید (۹۶/۹۶٪). در این مطالعه در غلظت ۰/۰۱٪ کاتچین هیدرات، غلظت ۰/۱۲٪ بتاسیکلودکسترین (نسبت مولی بتاسیکلودکسترین به کلسترول برابر با ۴:۱) و زمان مخلوط کردن از ۳۸ تا ۴۹ دقیقه، حداکثر کاهش کلسترول حاصل گردید (۹۶/۹۶٪) در حالی که مسکوی و همکاران (۲۰۱۳) در غلظت ۱٪ بتاسیکلودکسترین (نسبت مولی بتاسیکلودکسترین به کلسترول برابر با ۳۴:۱) در شیر هموژنیزه حداکثر کاهش کلسترول را گزارش کردند. علت مولکولی این امر مشابه با اثر کاتچین هیدرات بر روی خارج کردن کلسترول از داخل

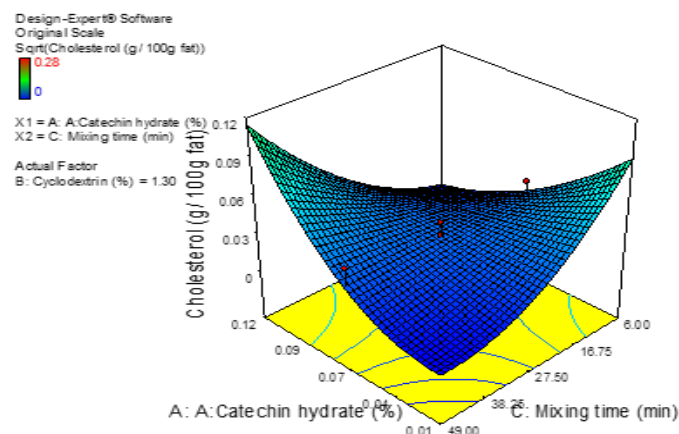


شکل ۲- نمودار رویه سه بعدی بر هم کنش کاتچین هیدرات و زمان مخلوط کردن در غلظت ثابت بتاسیکلودکسترین ۰/۱۲٪ بر مقدار کلسترول شیر

Figure 2- Response surface plots of catechin hydrate and mixing time interaction at constant concentration of beta- cyclodextrin 0.12% on the amount of milk cholesterol.

شده است که کاتچین‌هیدرات می‌تواند در حفره‌ی مولکول بتاسیکلودکسترین به دام افتد (یان و همکاران ۲۰۰۷). در این پژوهش نشان داده شده است که با کاهش زمان مخلوط کردن از ۲۷/۵ تا ۶ دقیقه، به تدریج از میزان کاهش کلسترول شیر کاسته شد. این امر به علت ناکافی بودن زمان مخلوط کردن نمونه در غلظت ۰/۱۲٪ بتاسیکلودکسترین می‌باشد.

اثر متقابل کاتچین‌هیدرات و زمان مخلوط کردن نمونه در غلظت ثابت بتاسیکلودکسترین (۰/۱۲٪) در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهند که با افزایش غلظت کاتچین‌هیدرات به بالاتر از ۰/۰۳٪، کلسترول شیر به میزان کمی کاهش می‌یابد. این امر به علت رقابت بین کلسترول و کاتچین‌هیدرات برای به دام افتادن در حفره‌ی مولکول بتاسیکلودکسترین می‌باشد زیرا اثبات



شکل ۳- نمودار رویه سه بعدی بر هم کنش کاتچین‌هیدرات و زمان مخلوط کردن در غلظت ثابت بتاسیکلودکسترین ۱/۳۰٪ بر مقدار کلسترول شیر

Figure 3- Response surface plots of catechin hydrate and mixing time interaction at constant concentration of beta- cyclodextrin 1.30% on the amount of milk cholesterol.



گلبول‌های چربی را تسهیل می‌نماید اما زمان مخلوط کردن طولانی نمونه، فرصت کافی جهت ایجاد رقابت بین کاتچین‌هیدرات و کلسترول برای به دام افتادن در حفره‌ی مولکول بتاسیکلودکستین می‌دهد و در نتیجه اثر منفی بر جداسازی کلسترول دارد.

بررسی اثر میزان بتاسیکلودکستین، کاتچین‌هیدرات و زمان مخلوط کردن بر مقدار پروتئین، چربی، اثر ممانعت‌کنندگی از رادیکال آزاد و محتوای فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل شیر

اثر متقابل کاتچین‌هیدرات و زمان مخلوط کردن نمونه در غلظت ثابت بتاسیکلودکستین (۱/۳٪) در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان‌دهنده‌ی رابطه‌ی عکس بین دو متغیر مستقل به منظور دستیابی به حداکثر کاهش کلسترول شیر می‌باشند. در غلظت‌های کاتچین-هیدرات از ۰/۰۱ تا ۰/۰۸٪ و زمان مخلوط کردن از ۲۷/۵ تا ۴۹ دقیقه یا در غلظت کاتچین‌هیدرات از ۰/۰۸ تا ۰/۱۲٪ و زمان مخلوط کردن از ۶ تا ۲۷/۵ دقیقه حداکثر کاهش کلسترول مشاهده شد. علت آن است که کاتچین‌هیدرات در ابتدا جداسازی کلسترول از غشاء

جدول ۳- مقایسه میانگین چربی، پروتئین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های کنترل و تیمار شده در نقطه مرکزی (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

Table 3- Mean comparison of fat, protein and antioxidant activity in control and treated samples in central points (Mean  $\pm$  SD)

Sample	Fat (gr/ 100 cc)	Protein (gr/100 cc)	Radical scavenging DPPH	Antioxidant activity (ppm)
Control sample	3.125 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	3.12 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	85.28 $\pm$ 2.58 <sup>b</sup>	88.6 $\pm$ 1.6 <sup>b</sup>
Treated sample	2.268 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	2.873 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	403.88 $\pm$ 48.53 <sup>a</sup>	451 $\pm$ 53.7 <sup>a</sup>

The different small letters in same columns indicate the significant differences (P < 0.05).

شیر نیز می‌توانند در حفره‌ی مولکول بتاسیکلودکستین به دام افتند. این نتیجه مطابق با نتیجه‌ی گزارش شده توسط مسکوکي و همکاران (۲۰۱۳) می‌باشد. قابل ذکر است که با افزایش میزان بتاسیکلودکستین، میزان کاهش ریزمغذی‌های شیر از جمله چربی و پروتئین افزایش می‌یابد. در این پژوهش با کاهش چشمگیر میزان بتاسیکلودکستین مصرفی، از این امر جلوگیری به عمل آمد. اثر ممانعت‌کنندگی از رادیکال آزاد (بالاکریشن و آگراوال ۲۰۱۴) و محتوای فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل بر حسب اسید آسکوربیک (تاج خان و همکاران ۲۰۱۷) نمونه‌های شیر تیمار شده نسبت به نمونه‌های کنترل افزایش یافت. علت این امر باقی ماندن مقداری کاتچین‌هیدرات در شیرهای تیمار شده می‌باشد (جدول ۳).

نتایج حاصل از جدول ۳ نشان می‌دهد که میزان پروتئین در نمونه‌های تیمار شده کاهش یافته است. علت این امر به دام افتادن آمینواسیدها در حفره‌ی مولکول بتاسیکلودکستین و نیز جذب بارهای منفی پروتئین بر سطح مولکول بتاسیکلودکستین می‌باشد. در نتیجه بخشی از پروتئین‌های شیر همراه با ترکیب بتاسیکلودکستین-کلسترول در طی فرایند سانتریفیوژ از محیط جدا می‌شوند. این نتیجه مطابق با نتیجه‌ی گزارش شده توسط مسکوکي و همکاران (۲۰۱۳) می‌باشد. طبق جدول ۳ مقایسه‌ی نمونه‌های کنترل و تیمار شده نشان دادند که میزان چربی در نمونه‌های تیمار شده کاهش یافته است. علت این نتیجه آن است که مولکول‌های کلسترول بخشی از چربی‌های شیر می‌باشند که از شیر تیمار شده در طی جداسازی ترکیب بتاسیکلودکستین- کلسترول طی فرایند سانتریفیوژ جدا می‌شوند. همچنین برخی از اسیدهای چرب آزاد

## نتایج آزمون ارزیابی حسی

جدول ۴ نتایج میانگین ارزیابی حسی برای یکی از نمونه‌های بهینه پیشنهادی نرم افزار (غلظت کاتچین‌هیدرات ۰/۳۶٪ و غلظت بتاسیکلودکسترین ۱/۸٪ و زمان مخلوط کردن ۲۲/۴۷ دقیقه) و شاهد برای

پارامترهای عطر، طعم و پذیرش کلی ( $P < 0.05$ ) را نشان می‌دهد. نتایج نشان دادند که تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های شاهد و بهینه وجود نداشت و نمونه‌ی بهینه مورد پذیرش ارزیاب‌ها (با امتیاز) قرار گرفت.

جدول ۴- ارزیابی حسی نمونه کنترل و بهینه

Table 4- Sensory evaluation of control and optimized samples

Samples	Odor	Taste	Overall acceptability
Control	5.0 ± 0.50 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.85 <sup>a</sup>	5.0 ± 0.90 <sup>a</sup>
Treated	5.0 ± 0.58 <sup>a</sup>	5.0 ± 0.35 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.67 <sup>a</sup>

Similar letters within the same parameter indicate not significant differences ( $P < 0.05$ )

## نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده تصور می‌شود که کاتچین‌هیدرات دارای اثر دوگانه بر روی فرایند کاهش کلسترول در شیر استریلیزه و هموژنیزه می‌باشد. اثر مثبت آن عبارت است از جدا شدن کلسترول از غشاء گلبول‌های چربی و به دام افتادن آن در حفره‌ی مولکول بتاسیکلودکسترین، که باعث می‌شود به مقادیر کمتری از بتاسیکلودکسترین جهت جداسازی کلسترول نیاز باشد و اثر منفی آن ناشی از رقابت کاتچین‌هیدرات با کلسترول برای به دام افتادن در حفره‌ی مولکول بتاسیکلودکسترین می‌باشد. در مجموع نتایج بدست آمده نشان می‌دهند که اثر مثبت استفاده از کاتچین-

هیدرات در غلظت‌های کم نسبت به اثر منفی آن غالب می‌باشد. لازم به ذکر است که غلظت مولی منطقی بتاسیکلودکسترین به کلسترول جهت جداسازی ۱:۱ می‌باشد ولی از آنجایی که مولکول‌های کلسترول درون گلبول‌های چربی قرار دارند، جهت جداسازی آن‌ها به نسبت مولی بیشتری نیاز است. این نسبت در پژوهش‌های گذشته ۳:۱ بوده درحالی‌که در این پژوهش به علت استفاده از کاتچین‌هیدرات که سبب خروج گلبول‌های کلسترول از گلبول‌های چربی می‌شود، به ۴:۱ کاهش یافته است به نحوی که این فرایند را در مقیاس صنعتی امکان پذیر می‌کند.

## منابع مورد استفاده

اکثیری م، شهیدی الف و ناطقی ل، ۱۳۹۹، پایدارسازی آنتوسیانین‌های عصاره چای ترش با استفاده از پلی فنول‌ها. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۳۰ (۴)، ۱۴۹ - ۱۳۷.

رفتگی امیری ز و مداح پ، ۱۳۹۴، بررسی میزان پلی فنل‌های کل و کافئین موجود در چای سبز و سیاه و پودر فوری آن‌ها. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۲۵ (۳)، ۴۲۶ - ۴۱۹.

Ahn J, Jeong I, Kwak B, Leem D, Yoon T, Yoon C, Jeong J, Park J and Kim J, 2012. Rapid determination of cholesterol in milk containing emulsified foods. Food Chemistry 135: 2411-2417.

Alonso L and Fontecha J, 2015. Effect of  $\beta$ -cyclodextrin on phospholipids and cholesterol of the milk fat globule membrane. Advances in Dairy Research 3:10-12.

- Alonso L, Lozada A, Fontecha J and Juarez M, 1995. Determination of cholesterol in milk fat by gas chromatography with direct injection and sample saponification. *International Journal of Separation Science* 41: 23–28.
- Astray G, Gonzalez-Barreiro C, Mejuto J, Rial-Otero R and Simal-Gándara J, 2009. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids* 23: 1631–1640.
- Balakrishnan G and Agrawal R, 2014. Antioxidant activity and fatty acid profile of fermented milk prepared by *pediococcus pentosaceus*. *Journal of Food Science and Technology* 51: 4138–4142.
- Chafic Awad A and Gray J, 1999. Methods to reduce free fatty acids and cholesterol in anhydrous animal fat. USA Patent 6129945A. Date issued: 9 December.
- Das S, Rajabalaya R, David S, Gani N, Khanam J and Nanda A, 2013. Cyclodextrins-the molecular container. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological Chemical Science* 4:1694–1720.
- Henstra S and Schmidt D, 1970. On the structure of the fat- protein in homogenized cow's milk. *Netherlands Milk Dairy Journal* 24: 45-51.
- Hordyjewska A, Ostapiuk A and Horecka A, 2018. Betulin and betulinic acid in cancer research. *Journal of Pre-clinical and Clinical Research* 2: 72-75.
- Huppertz T and Kelly A, 2006. Physical chemistry of milk fat globules. *Advanced Dairy Chemistry* 2: 173-212.
- Kamihira M, Nakazawa H, Kira A, Mizutani Y, Nakamura M and Nakayama T, 2008. Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated by a quartz- crystal microbalance analysis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 72: 1372-1375.
- Keenan T, James Morre D, Olson D, Yunghans W and Patton S, 1970. Biochemical and morphological comparison of plasma membrane and milk fat globule membrane from bovine mammary gland. *Journal of Cell Biology* 44(1): 80-93.
- Keshtkaran M, Mohammadifar M, Asadi G, Azizinejad R and Balaghi S, 2012. Effect of gum tragacanth on rheological and physical properties of a flavored milk drink made with date syrup. *Journal of Dairy Science* 96: 4794-4803.
- Kim SH, Ahn J and Kwak HS, 2004. Crosslinking of beta-cyclodextrin on cholesterol removal from milk. *Pharmaceutical Research* 27: 1183–1187.
- Lopez C and Menard O, 2011. Human milk fat globules: Polar lipid composition and in situ structural investigations revealing the heterogeneous distribution of proteins and the lateral segregation of sphingomyelin in the biological membrane. *Colloids, Surfaces B: Biointerfaces* 83: 29-41.
- Ma H and Shieh K, 2006. Cholesterol and human health. *The Journal of American Science* 2: 46–50.
- Marquardt D, Geier B and Pabst G, 2015. Asymmetric lipid membranes: Toward more realistic model systems. *Membranes* 5(2): 180-196.
- Maskooki A, Beheshti S, Valibeigi S and Feizi J, 2013. Effect of cholesterol removal processing using  $\beta$ -cyclodextrin on main components of milk. *International Journal of Food Science* 2013: 1-6.
- El-loly M, 2011. Composition, properties and nutritional aspects of milk fat globule membrane- A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 61: 7-32.
- Nataf B, Mickelsen O, Keys A and Petersen W, 1948. The cholesterol content of cow 's milk. *Journal of Nutrition* 36: 495-506.
- Ogawa K, Sayumi H, Satoshi N and Yanase E, 2016. Interaction between tea polyphenols and bile acid inhibits micellar cholesterol solubility. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 64 (1): 204–209.
- Rashidinejad A, Birch EJ and Everett DW, 2016. Interactions between milk fat globules and green tea catechins. *Food Chemistry* 199: 347–355.
- Taj Khan I, Nadeem M, Imran M, Ayaz M, Ajmal M, Ellahi M and Khaliq A, 2017. Antioxidant capacity and fatty acids characterization of heat treated cow and buffalo milk. *Lipids in Health and Disease* 16:163.
- Uekusa Y, Kamihira M, Ishijima M, Sugimoto O, Ishii T, Kumazawa S, Nakamura K, Tanji K, Naito A and Nakayama T, 2011. Interaction of epicatechin gallate with phospholipid membranes as revealed by solid-state NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808(6): 1654-1660.

- Yan C, Xiu Z, Li X and Hao C, 2007. Molecular modeling study of beta-cyclodextrin complexes with ( + ) - catechin and ( - ) -epicatechin. *Journal of Molecular Graphics Modelling* 26: 420–428.
- Ye J, Fan F, Xu X and Liang Y, 2013. Interactions of black and green tea polyphenols with whole milk. *Food Research International* 53: 449- 455.

*Journal of Food Researches/vol.31 No.4 2021/pp 65-78*

*<https://foodresearch.tabrizu.ac.ir>*

DOI: 10.22034/FR.2021.37969.1713

## Optimization of milk cholesterol reduction using beta-cyclodextrin and catechin hydrate

M Moeini Nia <sup>1</sup>, Z Alibabaei <sup>2</sup> and N Zamindar <sup>3\*</sup>

Received: January 20, 2020

Accepted: October 10, 2020

<sup>1</sup>MSc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University Khorasgan Branch, Isfahan, Iran

<sup>2</sup>Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University Khorasgan Branch, Isfahan, Iran

<sup>3</sup>Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University Khorasgan Branch, Isfahan, Iran

\* Corresponding author: E mail: n.zamindar@khuisf.ac.ir

**Introduction:** Cholesterol with the formula of  $C_{27}H_{45}OH$  is a requisite component in cell membrane and cell growth (Nataf et al., 1948). The compound has a major role in human heart health. It has been proved that high cholesterol is a risk factor for human cardiovascular diseases and coronary heart diseases. Cholesterol is synthesized in mammalian cells (Ma and Shieh 2006). It is mostly found within the milk fat globule membrane and asymmetrically distributed in the both layer of the outer bilayer and it is found in triglyceride core in less amount (Lopez and Menard 2011). Beta-cyclodextrin ( $\beta$ CD) is known as a safe food ingredient which is a cyclic oligosaccharide consisting of seven glucopyranose molecules that are linked together with  $\alpha$  1- 4 bonds. The size and geometry of the  $\beta$ CD hydrophobic internal cavity allows good complexing with free and esterified cholesterol (Chafic Awad and Gray 1999). Absorption of cholesterol in human intestine decreases by consumption of green tea catechins. Phosphatidylcholine (PC) is an important substance for cholesterol solubility in micelles containing of bile salts, PC and cholesterol. This effect is probably due to the interaction of catechins and PC in bile salts micelles (Ogawa et al., 2016). It is assumed that catechin hydrate can help cholesterol removal from fat globules with similar mechanism. Then, separated cholesterol molecules can be easily entrapped in  $\beta$ CD cavity. The aim of this study is evaluating the effect of using catechin hydrate to decrease the amount of necessary beta- cyclodextrin for achieving maximum cholesterol reduction in homogenized and sterilized milk.

**Material and methods:** Sterilized and homogenized milk with 3% fat was purchased from Pegah Dairy Co (Isfahan, Iran). Beta-cyclodextrin was purchased from Merk and catechin hydrate was purchased from Sigma Chemical CO (St. Louis, MO, USA). All reagents and solvents were of analytical grade. Response Surface Methodology (RSM) was used to optimize conditions that affect milk cholesterol reduction. Central composite design with 20 experimental points (6 center points, 6 axial points, 8 corner points, 3 blocks, 3 factors and 5 levels) was used. 70 ml of milk with different catechin hydrate concentrations was stirred (Alfa D 500 stirrer) at 750 rpm for 30 min at 25°C. Then, samples were stirred with different beta-cyclodextrin concentrations at various mixing time (according to RSM design) and centrifuged at  $1000 \times g$ , 25°C, for 10 min. The supernatant was separated and used for cholesterol determination by gas chromatography (GC) (Alonso et al., 1995). Protein and fat content of milk were assayed at central points of experimental design using

milkoscan. Radical scavenging and total anti-oxidant capacity were measured by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Balakrishnan and Agrawal 2014) and ascorbic acid methods (Taj khan et al., 2017), respectively. Sensory evaluation of samples was carried out with 10 panelists (5 females and 5 males, ages 25 to 40 years old). A five- point hedonic scale was provided to the panelists (Keshtkaran et al., 2012). The amount of fat, protein, radical scavenging DPPH and total antioxidant capacity were measured in central points. The statistical analyses were based on the mean  $\pm$  standard deviation (SD) in experimental samples. Mean value of control and treated samples were compared using student's t- test ( $P \leq 0.05$ ). Sensory evaluation data was analyzed by SPSS software.

**Results and discussion:** The interaction between  $\beta$ CD and mixing time at constant catechin hydrate concentration (0.01%) showed that maximum cholesterol reduction (96.96%) was obtained at  $\beta$ CD concentration of 0.12% and mixing time of 38 min. The reason for this result is due to the interaction of catechin hydrate with some of fat globule membrane components such as PC and casein in homogenized milk that decreases cholesterol solubility. So, cholesterol can be easily separated from milk fat globules. Then, maximum cholesterol reduction was achieved at low concentration of  $\beta$ CD ( $\beta$ CD: cholesterol molar ratio of 4:1). The interaction between catechin hydrate and mixing time at constant concentration of  $\beta$ CD 0.12% showed that by increasing catechin hydrate concentration to more than 0.03%, cholesterol reduction decreased. This effect is due to the competition between cholesterol and catechin hydrate for entrapping in  $\beta$ CD cavity. The interaction between catechin hydrate concentrations and mixing time at constant  $\beta$ CD concentration (1.3%) showed reverse correlation between these two factors. Maximum cholesterol reduction was obtained at catechin hydrate concentration from 0.01% to 0.08% and mixing time from 27.5 to 49 min; or catechin hydrate concentration from 0.08% to 0.12% and mixing time from 6 to 27.5 min. Comparison between control and treated milk at central points showed that fat content decreased in treated samples. Because cholesterol molecules are a part of milk lipids that is separated from treated milk. On the other hand, some of milk free fatty acids could be entrapped in  $\beta$ CD cavity. Also, the amount of protein in treated samples decreased because of entrapping of amino acids in  $\beta$ CD cavity and absorption of negative charge of proteins on the outer surface of  $\beta$ CD. Therefore, part of milk proteins together with  $\beta$ CD- cholesterol complex leaves the environment during centrifugation process (Maskooki et al., 2013). While, the amount of antioxidant activity measured by ascorbic acid and DPPH methods increased which was due to the residual catechin hydrate in treated milk. Sensory evaluation results showed that no significant difference was observed between control and treated sample.

**Conclusion:** According to results, it seems that catechin hydrate has dual effects on cholesterol reduction from sterilized and homogenized milk. A positive effect is observed at the low concentration of catechin hydrate due to the separation of cholesterol from fat globules that decreases the needed amount of  $\beta$ CD and negative effect is due to the competition between catechin hydrate and cholesterol for entrapping in  $\beta$ CD cavity. Overall, the positive effect dominates the negative one at low concentration of catechin hydrate. It should be mentioned that the reasonable  $\beta$ CD: cholesterol molar ratio for cholesterol separation is 1:1 but practically this molar ratio is not enough, because cholesterol is placed in fat globule membranes. In previous studies  $\beta$ CD: cholesterol molar ratio was 34:1 while in this study the molar ratio decreased to 4:1, because catechin hydrate separates cholesterol from fat globule membranes and cholesterol easily entraps in  $\beta$ CD cavity. Therefore, by decreasing the amount of needed  $\beta$ CD for milk cholesterol removal, this process can be done in industrial scale.

**Keywords:** Beta-cyclodextrin, Response surface methodology, Homogenized milk, Catechin hydrate, Cholesterol