

## بررسی کاهش کلسترول شیر با استفاده از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ATCC1643 در دو حالت آزاد و تثبیت شده در آلژینات سدیم

سارا سراج زاده، ایران عالم زاده\*

تهران، دانشگاه صنعتی شریف، دانشکده مهندسی شیمی و نفت

پیام نگار: alemzadeh@sharif.edu

### چکیده

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس یکی از مهمترین میکروارگانیسم‌هایی است که قادر به متابولیسم کلسترول می‌باشند. در این تحقیق، نمونه ای از شیر پرچرب با استفاده از باکتری مذکور، فراوری شده که برای این کار اثر باکتری در دو حالت آزاد و تثبیت شده بر روی کاهش کلسترول شیر مورد بررسی قرار گرفته است. در این آزمایش، اثر چند عامل بر کاهش کلسترول بررسی شده که عبارتند از تعداد سلول‌های باکتری در هر دو حالت آزاد و تثبیت شده و نیز اندازه بیدهای آلژینات سدیم حاوی سلول‌های باکتری تثبیت شده. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که سلول‌های آزاد باکتری می‌توانند کلسترول موجود در شیر را از ۱۱ میلی‌گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر به ۰/۵ میلی‌گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر تقلیل دهند. همین‌طور بیدهای حاوی سلول‌های تثبیت شده باکتری با اندازه‌های کوچکتر، باعث افزایش سرعت کاهش کلسترول در محیط می‌شوند. در مورد قابلیت استفاده مجدد بیدهای حاوی سلول‌های باکتری تثبیت شده، این نتیجه حاصل شد که بیدها تا سه بار عملیات پی در پی دارای فعالیت می‌باشند.

کلمات کلیدی: لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، کاهش کلسترول، تثبیت، شیر

### ۱- مقدمه

حلال مناسب یا سیال فوق بحرانی. البته اعمال روش‌های فیزیکی و شیمیایی به منظور کاهش کلسترول مواد غذایی می‌تواند مشکلاتی به همراه داشته باشد، از جمله اینکه این روش‌ها معمولاً غیر انتخابی عمل می‌کنند به این معنی که علاوه بر حذف کلسترول از چربی، ترکیبات آروماتیک که باعث طعم و عطر عالی شیر می‌شوند نیز همراه با کلسترول حذف می‌شوند. در مواردی که برای فراوری شیر از حلال شیمیایی استفاده می‌شود، احتمال زیادی می‌رود که شیر فراوری شده نهایی، حاوی مقداری حلال شیمیایی باشد که وضعیتی نامطلوب است. یک روش مؤثر برای کاهش کلسترول مواد غذایی

مصرف روزانه غذاهای پرچرب که حاوی مقدار زیادی کلسترول می‌باشند یکی از عواملی است که باعث می‌شود انسان در دراز مدت به بیماری تصلب شرایین دچار شود. از این رو، حذف مؤثر کلسترول از غذاهای پر چرب یکی از موضوعات مهمی است که چندین دانشمند تا به حال بر روی آن تحقیقات انجام داده‌اند. تا به حال روش‌های شیمیایی و فیزیکی بسیاری برای کاهش کلسترول مواد غذایی مختلف به کار گرفته شده است، از جمله استخراج کلسترول چربی موجود در ترکیبات غذایی در اثر تماس با

میکروب ایران)، شیر ۲ درصد چرب (شیر میهن، تهران، ایران)، محیط کشت ام.آر.اس برات (خریداری شده از شرکت مرک آلمان)، سرنگ و سوزن با قطره‌های خروجی متفاوت (سرنگ خزر- شرکت تولید کننده تجهیزات دارویی ایران)، انکوباتور (مدل CAG Corporation- آلمان)، اسپکتروفتومتر (مدل US۶۳۵) و اسانس مرکبات (شرکت نوش مازندران).

## ۲-۲ روش‌ها

### ۲-۲-۱ اثر سلول‌های آزاد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ATCC ۱۶۴۳ بر کلسترول شیر

یک واحد باکتری، یک سل باکتری کشت داده شده از محلول سوسپانسیون سلول‌های باکتری مادر است که پس از شمارش، تعداد هر سل باکتری  $10^{10}$  عدد سلول باکتری تخمین زده شد. برای شمارش سلول‌های باکتری ۱ میلی لیتر از محلول سوسپانسیون یکنواخت سلول‌های باکتری را روی لام مشبک مخصوص شمارش سلول‌های میکروارگانیسم قرار می‌دهند و توسط میکروسکوپ الکترونی، تعداد سلول‌های باکتری، شمارش می‌شود.

یک واحد باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس کشت داده شده در محیط کشت ام.آر.اس برات، سانتریفوژ شده و شسته شده توسط آب مقطر استریل به شیر اضافه می‌شود که غلظت نهایی آن در شیر به یک میلی لیتر (شیر/سلول باکتری)،  $10^8 \times 1/66$  می‌رسد. ارلن مایر حاوی شیر و سلول‌های باکتری در انکوباتور با دمای  $37^\circ\text{C}$  (دمای بهینه برای فعالیت باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس) قرار داده شدند. در تمام آزمایش‌ها شیر به وسیله اسانس طبیعی مرکبات حاوی اسید سیتریک تا  $\text{pH}=6/8$  اسیدی شد، زیرا  $\text{pH}=6/8$  بالاترین  $\text{pH}$ ی است که در آن لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می‌تواند فعالیت خوبی داشته باشد. با اضافه کردن اسانس طبیعی میوه علاوه بر تنظیم  $\text{pH}$ ، شیر طعم مطلوبی می‌گیرد و نیز از افزودن ترکیبات شیمیایی به شیر جهت تنظیم  $\text{pH}$  اجتناب می‌شود. علاوه این ترکیبات، به منظور تنظیم  $\text{pH}$  به مقادیر محدود، مورد نیاز می‌باشند و تأثیر قابل توجهی بر خواص فیزیکی شیر نمی‌گذارند.

به منظور آگاهی از روند کاهش کلسترول در طول مدت انجام واکنش، در فواصل زمانی مختلف از محیط واکنش نمونه برداری می‌شود و میزان کلسترول آن به روش اسپکتروفتومتری مشخص

پس چرب که در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته روش زیست‌شناختی با به کارگیری میکروارگانیسم‌های مناسب یا آنزیم‌های مترشحه از آنها برای متابولیسم و کاهش کلسترول در محیط است [۱ و ۹].

خانواده باکتریایی کلسترول دارای توانایی متابولیسم کلسترول در غذاها می‌باشد و تا به حال از گونه‌های مختلف این باکتری به عنوان اجرام زنده افزودنی در محصولات لبنی استفاده شده است [۹ و ۸ و ۴]. البته تفاوت آشکاری در زمینه توانایی متابولیسم کلسترول در میان گونه‌های مختلف باکتری لاکتوباسیلوس وجود دارد. لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس یکی از گونه‌های شاخصی است که توانایی قابل توجهی در متابولیسم کلسترول غذاها را پرچرب مانند محصولات لبنی دارد و در سال‌های اخیر از آن به عنوان افزودنی به شیر و سایر محصولات لبنی استفاده شده است [۳ و ۱]. حایز اهمیت است که این سلول‌های میکروبی پس از افزودن به غذا در طول مدت ذخیره و هنگام مصرف زنده باشند، اما زنده بودن آنها در غذاهای ذخیره شده و پس از مصرف، مورد شک و تردید است [۴]. در این تحقیق، شیر پرچرب را جهت کاهش کلسترول موجود در آن توسط سلول‌های آزاد و تثبیت شده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ATCC ۱۶۴۳ تحت فراوری قرار داده ایم. شایان ذکر است که سلول‌های باکتریایی مذکور به خوبی در آلژینات سدیم تثبیت شدند. در واقع عمل تثبیت به منظور حفظ باکتری جهت استفاده پی در پی از آن در طی عملیات متوالی صورت می‌گیرد. علاوه، اثر عواملی نظیر تعداد سلول‌های باکتری و اندازه بیدهای آلژینات حامل باکتری تثبیت شده بر سرعت کاهش کلسترول شیر پرچرب، و در نهایت، قابلیت استفاده مجدد سلول‌های باکتری تثبیت شده در طی عملیات متوالی مورد بررسی قرار گرفته است.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱ مواد

پودر آلژینات سدیم، پودر کلرید کلسیم دوآبه، معرف رنگی کلرید آهن شش آبه در اسید استیک گلاسیال (یخی)، اسید سولفوریک ۹۸٪، متانولیک پتاس ۵/۰ مولار، هگزان، اتانول ۹۶٪ (تمام مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان خریداری شده‌اند)، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ATCC ۱۶۴۳ (خریداری شده از PTCC، کلکسیون

صورت قطره‌هایی به درون ظرف حاوی محلول کلرید کلسیم دوآبه ۰/۵ مولار ریخته شد، در این حالت، سرنگ به صورت عمودی و در فاصله ۲۰ سانتیمتری سطح محلول کلرید کلسیم قرار داده شد [۱۰]. بعد از تثبیت سلول‌های باکتری، برای بررسی زنده بودن سلول‌ها لازم است که بیدهای آلزینات دوباره به حالت محلول درآیند تا سلول‌های باکتری مجدداً آزاد شوند که این کار با حل کردن بیدها در محلول سیترات سدیم ۲٪ استریل در دمای اتاق صورت گرفت [۴]. به منظور بررسی تأثیر اندازه بیدها این فرایند چهار مرتبه با به کارگیری چهار قطر مختلف بید و با استفاده از سر سرنگ‌ها با قطرهای خروجی متفاوت تکرار شد.

### ۲-۲-۳ تخمین اندازه بیدها

چهار انژکتور با چهار سایز خروجی متفاوت در دسترس بودند. برای تخمین قطر بیدهای آلزینات تولید شده توسط هر کدام از سرسرنگ‌ها، ۵ میلی لیتر از محلول آلزینات سدیم به شکل قطره درون کلراید کلسیم ۰/۵ مولار ریخته شد. بعد از تشکیل بیدها، با شمردن تعداد بیدهای به دست آمده و با توجه به حجم اولیه آنها (۵ میلی لیتر) و با استفاده از فرمول حجم کره می‌توان قطر بیدهای به دست آمده را محاسبه کرد. قطر بیدهای به دست آمده توسط چهار سرسرنگ مختلف عبارتند از: ۱/۶۲، ۱/۷، ۱/۷۹ و ۱/۸۴ mm. همین طور برای مطالعه تأثیر تعداد سلول‌های باکتری تثبیت شده بر روی سرعت کاهش کلسترول، این فرایند سه مرتبه با سه میزان مختلف باکتری تثبیت شده (۱، ۲ و ۳ واحد باکتری یا به ترتیب  $1 \times 10^{10}$ ،  $2 \times 10^{10}$  و  $3 \times 10^{10}$  باکتری در ۶۰ میلی لیتر شیر) صورت گرفت.

### ۲-۲-۴ قابلیت استفاده مجدد از سلول‌های باکتری

$10^{10}$  سلول باکتری چهار مرتبه در آلزینات سدیم به شکل بیدها با چهار قطر متفاوت (۱/۶۲، ۱/۷، ۱/۷۹ و ۱/۸۴ mm) تثبیت گردید. بیدهای حاوی باکتری تثبیت شده برای زدایش کلسترول در عملیات پی در پی، هر کدام با زمان عملیاتی چهار ساعت به کار گرفته شدند و روند کاهش کلسترول در طول هر فرایند مورد بررسی قرار گرفت.

می‌شود. برای استخراج کلسترول از چربی موجود در شیر، یک نمونه ۰/۲ گرمی شیر را با دقت وزن کرده و ۵ میلی لیتر محلول ۰/۵ مولار متانولیک پتاس را به آن اضافه می‌کنیم. در لوله آزمایش را محکم بسته و محتویات آن را به مدت ۱۵ ثانیه هم می‌زنیم. لوله آزمایش را درون حمام آب گرم با دمای  $80^{\circ}\text{C}$  برای مدت ۱۵ دقیقه قرار می‌دهیم، لوله آزمایش را هر ۵ دقیقه یکبار بیرون آورده و برای مدت ۱۰ ثانیه هم می‌زنیم. بعد از عملیات حرارتی، لوله آزمایش را به وسیله شیر آب، سرد می‌کنیم و بعد ۱ میلی لیتر آب مقطر و ۵ میلی لیتر هگزان به محتویات لوله آزمایش اضافه می‌کنیم. در لوله را بسته و محتویات آن را به مدت ۱ دقیقه به شدت تکان می‌دهیم و بعد با سرعت  $2000 \text{ xg}$  سانتریفوژ می‌کنیم. فاز بالایی، حاوی کلسترول استخراج شده از شیر است [۲]. ۳ میلی لیتر از محلول معرف رنگی (تری کلرید آهن سه آبه در اسید استیک گلاسیال) به ۱ میلی لیتر از نمونه (محلول کلسترول استخراج شده یا محلول استاندارد) اضافه می‌کنیم، محلول را با شدت هم زده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه بدون حرکت به حال خود رها می‌کنیم و بعد ۱ میلی لیتر اسید سولفوریک به نمونه اضافه کرده و به هم می‌زنیم تا محلول همگنی به دست آید. سپس آن را در محل تاریکی به مدت ۴۵ دقیقه قرار می‌دهیم. جذب نوری محلول به دست آمده در طول موج  $560 \text{ nm}$  به دست می‌آید که با داشتن منحنی استاندارد غلظت کلسترول مشخص می‌شود [۱۱ و ۵].

جهت بررسی اثر تعداد سلول‌های آزاد، این فرایند دو مرتبه دیگر با ۲ و ۳ واحد باکتری (به ترتیب با غلظت‌های نهایی  $3/8 \times 10^8$  و  $5 \times 10^8$  سلول باکتری بر هر میلی لیتر شیر) اجرا می‌شود.

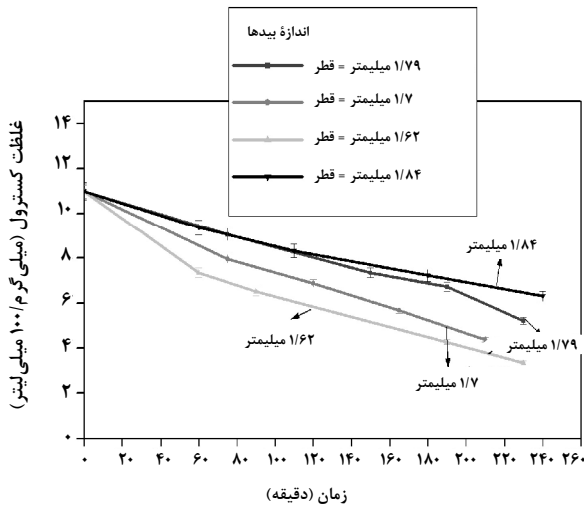
### ۲-۲-۲ تأثیر سلول‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

#### ATCC ۱۶۴۳ تثبیت شده بر روی کلسترول شیر

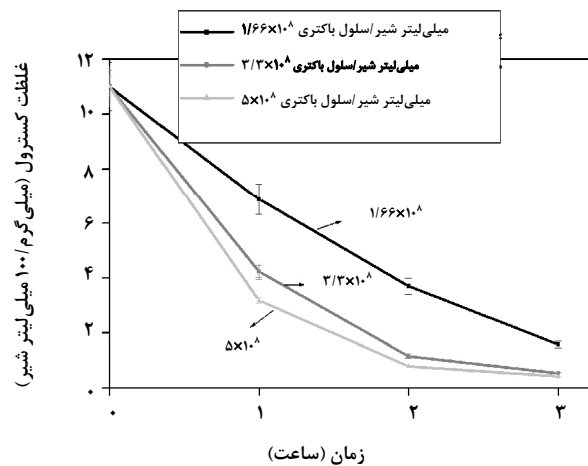
روش تثبیت سلول‌های باکتری: محلول ۳ درصد آلزینات سدیم در آب مقطر استریل با استفاده از همزن مغناطیسی تهیه شد. سلول‌های لاکتوباسیلوس (کشت داده شده در محیط کشت ام.آر.اس برات، سانتریفوژ شده و شسته شده توسط آب مقطر استریل) به محلول آلزینات سدیم اضافه گردید و به طور مداوم به مدت یک ساعت توسط همزن مغناطیسی همزده شد تا محلول کاملاً یکنواختی به دست آید. محلول به دست آمده توسط سرنگ به

## ۳- نتایج و بحث

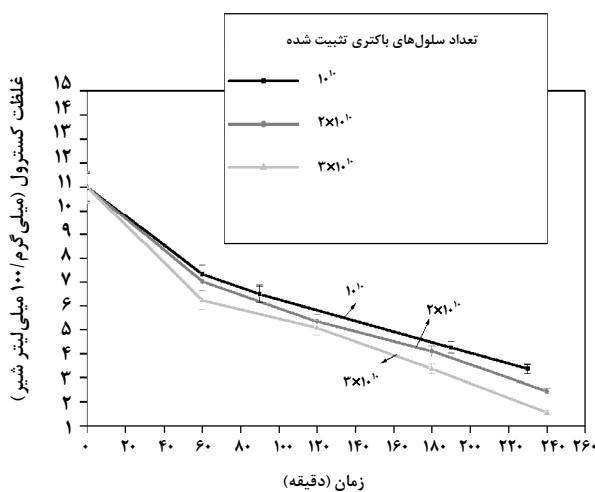
شکل (۱)، روند کاهش کلاسترول در شیر را در طی واکنش زیست‌شناختی توسط سلول‌های آزاد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ATCC ۱۶۴۳ نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل (۱) دیده می‌شود، با افزایش تعداد سلول‌های آزاد، کلاسترول با سرعت بیشتری کاهش یافته است و با غلظت نهایی:  $5 \times 10^8$  (میلی لیتر شیر/اسلول) و بعد از سه ساعت مدت عملیاتی، ۹۵٪ کلاسترول شیر کاهش پیدا کرده است.



شکل ۲- تأثیر  $10^{10}$  سلول تثبیت شده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ATCC ۱۶۴۳ بر کلاسترول شیر و اثر اندازه بیدها بر کاهش کلاسترول در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و  $\text{pH}=6/8$



شکل ۱- اثر سلول‌های آزاد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ATCC ۱۶۴۳ بر کاهش کلاسترول شیر در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و  $\text{pH}=6/8$



شکل ۳- تأثیر سلول‌های تثبیت شده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ATCC ۱۶۴۳ بر کاهش کلاسترول شیر در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و  $\text{pH}=6/8$

با توجه به نتایج به دست آمده از مرحله قبل که نشان می‌داد بهترین اندازه بید برای کاهش کلاسترول  $1/62\text{mm}$  است، آزمایش‌های این مرحله با بیدهای آلژینات به قطر ثابت  $1/62\text{mm}$ ، ولی با تعداد مختلف سلول‌های باکتری انجام گرفتند ( $10^{10}$ ،  $2 \times 10^{10}$  و  $3 \times 10^{10}$  سلول باکتری). شکل (۳) به طور واضح نشان می‌دهد که با افزایش سلول‌های تثبیت شده، سرعت کاهش کلاسترول افزایش یافته است.

شکل (۲) تأثیر اندازه بیدهای آلژینات سدیم حاوی سلول‌های باکتری تثبیت شده را بر سرعت کاهش کلاسترول در شیر نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل (۲) نشان داده شده است، با افزایش اندازه بیدها سرعت کاهش کلاسترول تقلیل می‌یابد.

به نظر می‌رسد مؤثرتر عمل کردن بیدهای با اندازه‌های کوچکتر به این دلیل است که سرعت نفوذ شیر در بیدهای آلژینات وابسته به سطح بیدهاست و نسبت سطح به حجم در بیدهای با قطر کوچکتر بیشتر است. بنابراین، وقتی از بیدهای با اندازه کوچکتر استفاده می‌شود، در محیط واکنش زیست‌شناختی، سطح فعال بیشتری وجود دارد که منجر به متابولیسم قسمت بیشتری از کلاسترول موجود در محیط می‌شود. شکل (۳) اثر تعداد سلول‌های باکتری تثبیت شده بر سرعت کاهش کلاسترول را نشان می‌دهد.

در پایان، قابلیت استفاده مجدد از بیدها و اثر اندازه بیدها بر قابلیت استفاده مجدد بیدها مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در جدول (۱) نشان داده شده است، بیدها سه مرتبه در طول سه مرتبه عملیات متوالی دارای فعالیت بودند. بر طبق نتایج به دست آمده، بیدهای بزرگتر در مقایسه با بیدهای کوچکتر در طی عملیات متوالی، فعالیت خود را بیشتر حفظ می‌کنند. برای مثال، با استفاده از بیدهای با قطر ۱/۸۴mm در طی سه مرتبه عملیات متوالی، میزان کلسترول از ۱۱ به ترتیب به ۷/۴، ۸/۱ و ۸/۸ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید، در حالی که با استفاده از بیدهای کوچک به قطر ۱/۶۲mm در طی سه مرتبه عملیات متوالی، میزان کلسترول در شیر از ۱۱ به ترتیب به ۳/۸، ۶/۳ و ۹/۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر در سه مرتبه عملیات متوالی رسید. به نظر می‌رسد که چون نسبت سطح به حجم در بیدهای آلژینات با حجم بزرگتر، در مقایسه با بیدهای با حجم کوچک تر کمتر است، احتمال آزاد شدن سلول‌های باکتری از بیدهای با قطر بزرگتر، کمتر می‌باشد و بنابراین بیدهای بزرگتر، به نسبت، فعالیت خود را بیشتر حفظ می‌کنند.

جدول ۱- اثر قطر بیدها حاوی ۱۰<sup>۱۰</sup> سلول لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۱۶۴۳ ATCC تثبیت شده بر قابلیت استفاده مجدد آنها طی عملیات متوالی

اندازه بیدها (میلی متر)	فرایند اول	فرایند دوم	فرایند سوم	خطای نسبی (%)
۱/۶۲	۳/۸	۶/۳	۹/۶	۴/۶
۱/۷	۴/۵	۶/۸	۸/۹	۳/۷
۱/۷۹	۵/۹	۷/۶	۹/۱	۳/۱
۱/۸۴	۷/۴	۸/۱	۸/۸	۴/۳

#### ۴- نتیجه‌گیری

در پایان، به عنوان نتیجه‌گیری نهایی می‌توان گفت که هم سلول‌های آزاد و هم سلول‌های تثبیت شده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۱۶۴۳ ATCC در کاهش کلسترول شیر مؤثر می‌باشند. بر طبق نتایج به دست آمده، کاهش کلسترول شیر قبل از مصرف، با فراورش آن با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۱۶۴۳ ATCC

در اولین مرحله آزمایش‌ها که از سلول‌های آزاد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس برای کاهش کلسترول در شیر استفاده شد با افزایش تعداد سلول‌ها سرعت کاهش کلسترول افزایش پیدا کرده است. با استفاده از هر (میلی لیتر شیر / ۵×۱۰<sup>۱۰</sup> سلول)، و بعد از ۳ ساعت مدت عملیات در دمای ۳۷ °C، غلظت کلسترول در شیر، از ۱۱ به ۰/۲ میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر تقلیل یافته است.

در مرحله دوم آزمایش‌ها، تأثیر قطر بیدهای حاوی سلول‌های تثبیت شده مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان می‌دهند که با کاهش اندازه بیدهای حاوی سلول‌های تثبیت شده، سرعت زدایش کلسترول افزایش می‌یابد. طبق نتایج به دست آمده، فراوری شیر با تعداد ۱۰<sup>۱۰</sup> سلول باکتری تثبیت شده با سایز ۱/۸۴mm و بعد از سه ساعت زمان عملیاتی و در درجه حرارت ۳۷ °C مقدار کلسترول در محیط از ۱۱ به ۶/۷ میلی گرم در ۱۰۰/میلی لیتر کاهش یافته در حالی که با استفاده از بیدهای با قطر ۱/۶۲ mm مقدار کلسترول به ۳/۶ میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر تقلیل پیدا کرده است.

همین طور اثر تعداد سلول‌های باکتری تثبیت شده مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان می‌دهند که با افزایش تعداد سلول‌های تثبیت شده، کلسترول با سرعت بیشتری زدوده شده است. در فراوری ۶۰ میلی لیتر شیر با ۱۰<sup>۱۰</sup>، ۲×۱۰<sup>۱۰</sup> و ۳×۱۰<sup>۱۰</sup> سلول‌های باکتری تثبیت شده و بعد از ۴ ساعت زمان عملیاتی، مقدار کلسترول شیر از ۱۱ میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر شیر به ترتیب به مقادیر ۳/۸، ۲/۴ و ۱/۵ میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر شیر تقلیل پیدا کرده است. طبق نتایج، به نظر می‌رسد در مقایسه با سلول‌های باکتری تثبیت شده، سلول‌های آزاد عملکرد بهتری دارند. اگر شیر با سلول‌های آزاد فراوری شود دسترسی سلول‌های باکتری به سوپسترا بیشتر است و بنابراین سلول‌ها برای متابولیسم کلسترول بیشتر تحریک می‌شوند. بعد از فراوری شیر توسط سلول‌های باکتری، سلول‌های باکتری عمدتاً زنده هستند و اینکه سلول‌های باکتری پس از فراوری در محصول شیر فراوری شده نهایی به حالت زنده رها شوند یا پس از فراوری وارد مرحله استریلیزاسیون شوند، امری اختیاری و وابسته به نوع محصول نهایی است. شیر فراوری شده حاوی سلول‌های آزاد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۱۶۴۳ ATCC، به مدت ۴۸ ساعت پس از فراوری در یخچال نگهداری شد و هیچگونه انعقاد و یا تغییرات محسوس در گرانروی شیر مشاهده نگردید.

## مراجع

- [1] Boudreau A. and Arul J. "Cholesterol Reduction and fat fractionation technologies for milk fat: An Overview", *Journal of Dairy Science*, 76(1772-1781), (1993).
- [2] Fletouris D.J., Botsoglou N.A., Psomas I.E. and Mantis A.I. "Rapid Determination of Cholesterol in Milk and Milk Products by Direct Saponification and Capillary Gas Chromatography", *Journal of Dairy Science*, 81(2833-2840), (1998).
- [3] Gilliland S., Nelson C. and Maxwell C. "Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*", *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, Feb, 377-381, (1985).
- [4] Grosso C. and Trindade C. "Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and immobilized *B. lactis* in yoghurt", *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol.35, No.1-2, 151-156, (2004).
- [5] Kimoto H., Ohomoto S. and Okamoto T. "Cholesterol Removal from Media by Lactococci", *Journal of Dairy Science*, 85(3182-3188), (2002).
- [6] Kourkoutas Y., Bosnea L., Taboukos S., Baras C., Lambrou D. and Kanellaki M. "Probiotic cheese production using *Lactobacillus casei* cells immobilized on fruit pieces", *Journal of Dairy Science*, 89(1439-1451), (2005).
- [7] Lin M.Y. and Chen T.W. "Reduction of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* in Culture Broth", *Journal of Food and Drug Analysis*, 8(97-102), (2000).
- [8] Liong M.T. and Shah N.M. "Acid and Bile Tolerance and Cholesterol Removal Ability of Lactobacilli Strains", *Journal of Dairy Science*, 88(55-66), (2005).
- [9] Madison, WI. "Cholesterol reduction technologies overview", Wisconsin milk marketing board, Research review, Spec. Rep. No.2(Oct.), 21-26, (1989).
- [10] Mattison, "BO Immobilized cells and Organelles", 2nd edition, volume 1, chapter 3, 81-82, (1983).
- [11] Rudel L.L. and Morris M.D. "Determination of Cholesterol using 0-phthalaldehyde", *Journal of Lipid Research*, 14(364-366), (1973).

در شرایط فراوری بهینه این باکتری ( دما  $37^{\circ}\text{C}$  و  $\text{pH} = 6/8$ ) امکان پذیر است. هر چند، سلول‌های آزاد در این زمینه مؤثرتر عمل کردند. در مقایسه با سلول‌های تثبیت شده، با استفاده از سلول‌های آزاد، میزان بیشتری از کلسترول شیر، در مدت عملیاتی کمتر، از آن زدوده شد. با استفاده از سلول‌های آزاد تا ۹۵ درصد کلسترول شیر از آن زدوده شد. سلول‌های باکتری تثبیت شده در طی سه مرتبه عملیات متوالی دارای فعالیت بودند، البته در طی هر عملیات، در مقایسه با عملیات قبلی، در فعالیت بیدها کاهش دیده می‌شد. همچنین بیدهای با اندازه بزرگتر فعالیت خود را بیشتر حفظ کردند. به طور کلی، عوامل مؤثر بر کاهش کلسترول شیر در این روش، تعداد باکتری‌ها، چه در حالت آزاد و چه در حالت تثبیت شده، و نیز، قطر بیدهای تثبیت شده است. در حالت کلی در مقایسه با سلول‌های تثبیت شده، سلول‌های آزاد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ATCC ۱۶۴۳ عملکرد بهتری در کاهش کلسترول شیر داشتند و به نظر می‌رسد استفاده از سلول‌های آزاد مناسب‌تر است.