

罗非鱼骨制备 CMC 活性钙的工艺及生物利用的研究

吴燕燕^{1,2}, 李来好^{2,*}, 林洪¹, 杨贤庆², 刁石强², 石红²

(1.中国海洋大学, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300)

摘 要: 为了充分利用罗非鱼骨这一丰富的钙源, 本文采用柠檬酸和苹果酸混合酸对罗非鱼骨粉进行 CMC 钙的制备工艺研究, 并以 Wistar 大白鼠为模型, 评价该产品的生物利用率。结果表明: 以柠檬酸和苹果酸按 3:2 的浓度比混合, 在 121℃ 的高温下提取罗非鱼骨粉 1h, 取上清液调 pH 中性, 然后进行浓缩烘干, 钙提取率为 92.1%, 产品在热水中溶解度达 88%。动物代谢实验显示, 与实验对照组比较, CMC 活性钙组无论是在血钙、骨钙和存留率方面均有不同程度的增加, 比碳酸钙更易被机体吸收利用。

关键词: 罗非鱼骨; CMC 活性钙; 生物利用率; Wistar 大白鼠

Studies on Preparation Technology of CMC Activated Calcium and Its Bioavailability from *Tilapia* bone

WU Yan-yan^{1,2}, LI Lai-hao^{2,*}, LIN Hong¹, YANG Xian-qing², DIAO Shi-qiang², SHI Hong²

(1.China Ocean University, Qingdao 266003, China;

2.South China Sea Fisheries Research Institute, CAFS, Guangzhou 510300, China)

Abstract: In order to make good use of the calcium resource in *tilapia* bone, the technology of preparation of CMC active calcium by mixed acids of citra acid and malic acid applied to *tilapia* bone powder was studied. Wistar rat was used as an animal model for evaluating the bioavailability of this product. The results showed that the optimum conditions of preparation of CMC active calcium were adding citra acid with malic acid in the concentration ratio of 3:2 respectively, under 121℃ to extract the *tilapia* bone powder 1h, adjusting the pH of the pure liquid to 7 and then vacuum dried. The calcium withdraw rate was 92.1%. The product was dissolved in hot water up to 88%. The animal metabolism experiment showed that in regard to the level of serum calcium and bone calcium, the CMC active calcium apparent retention was higher in different degree than that of the control group. CMC active calcium was absorbed and utilized more easily than calcium carbonate. It could effectively complement calcium quality. For this reason, the product was a kind of highly absorbable calcium nutraceutical.

Key words: *Tilapia* bone; CMC active calcium; bioavailability; Wistar rat

中图分类号: TS254.9; TQ462.26

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)02-0114-04

具有“21 世纪之鱼”之称的罗非鱼, 深受各国消费者的欢迎。我国罗非鱼产量年来居世界首位, 尤其广东省罗非鱼产量高达 30 万吨^[1]。罗非鱼在加工过程中, 产生了大量的下脚料, 占体重 43% 左右的鱼头和鱼排下脚料, 在广东地区每年就达数千吨。这些下脚料大部分作为饲料, 其经济价值没有得到充分利用。这部分废弃物主要是鱼骨, 含有胶原蛋白、骨粘多糖和各种无机物, 其中钙含量达 26.95%, 是一种很好的钙源。

钙是人体必需的营养成分, 钙与机体生长发育、

骨骼发育和骨质丢失都有关, 终身足够的钙摄入量对预防骨质疏松有一定的作用, 此外钙对维持人体的循环、呼吸、神经、内分泌、免疫等系统的正常生理功能也有很大的作用^[2]。根据全国营养调查结果显示, 有关膳食营养素摄入量中以钙缺乏最为显著。从天然产物中开发易于被人体吸收的活性钙剂是当务之急。本文以罗非鱼加工下脚料鱼骨为原料, 开发高吸收性钙剂 CMC (Citric acid, Malic acid, Calcium), 并研究其在动物体内的吸收利用率。

收稿日期: 2004-02-25

* 通讯作者

基金项目: 中国水产科学研究院基金项目(2001-06-03); 广东省科技计划项目(2004B20401006)

作者简介: 吴燕燕(1969-), 女, 副研究员, 在读博士, 从事水产品综合加工利用及食品安全性研究。

1 材料与方法

1.1 材料

罗非鱼骨 加工冷冻罗非鱼片的下脚料, 由广州陆仕水产集团有限公司提供。

Wistar 大白鼠 由中山大学医学院动物实验中心提供。

试剂 1398 中性蛋白酶、柠檬酸、苹果酸、氢氧化钙等。

1.2 鱼骨粉的制备

取 1000g 冻罗非鱼排、鱼头解冻, 洗净, 斩碎, 放入烧杯中, 加入 15g 1398 中性蛋白酶和 1000ml 水, 搅拌均匀, 加热至中心温度为 50℃, 酶解 2~3h, 滤去酶解液, 用热水浸洗鱼骨, 除去附着的杂质, 然后放入烘箱中, 85℃ 烘干, 干燥后的鱼骨用粉碎机粉碎, 得粉末状鱼骨粉。

1.3 CMC 活性钙的制备

采用柠檬酸和苹果酸对骨粉中的钙进行提取, 对影响因素温度(110、115、121℃)、时间(0.5、1.0、1.5h)、柠檬酸和苹果酸浓度比(1:1、2:1、3:2)用 $L_9(3^4)$ 正交试验^[3], 取提取物进行离心分离, 将上清液活化, 调中性, 在真空干燥箱中进行烘干, 干燥物研磨至粉末状, 得乳白色 CMC 活性钙粉。

1.4 鱼骨中钙、活性钙含量的测定

采用 EDTA 络合滴定法测定^[4]。

1.5 动物实验^[5]

Wistar 大白鼠, 体重在 90~100g, 分成 4 组, 每组 8 只, 雌雄各半。实验前处死一组, 测定大白鼠双侧股骨重量和钙含量、血钙。其余 3 组为 A 组、B 组、C 组。实验期 28d, 单笼饲养, 自由进食和饮水, 逐日记录进食量, 每周称重 1 次。第 4 周后将鼠移入代谢笼, 进行钙代谢实验。

动物饲料:

A 组饲料为基础饲料配方 参照 AOAC 配方制备低钙全合成饲料, 其组成为酪蛋白 20%, 豆油 8%, 淀粉 65%, 纤维素 1%, 混合无机盐 5%, 混合维生素 1%, 经测定该饲料含钙量 12mg/100g。

B 组饲料为基础饲料 +3.2%CMC 活性钙。

C 组饲料为基础饲料 +3.2% 碳酸钙。

1.6 鼠股骨钙、血钙测定

采用原子吸收法测定^[4]。

1.7 数据处理

采用方差分析统计方法处理^[6], 其中

吸收率 = (摄钙量 - 粪钙) / 摄钙量

存留率 = (摄钙量 - 粪钙 - 尿钙) / 摄钙量

2 结果与讨论

2.1 罗非鱼骨中提取钙的正交实验

目前, 从动物骨头、贝壳、蛋壳中提取钙制剂常用的方法是采用煅烧法, 主要产品是碳酸钙, 由于 Bourgoin 等人证明常用的牡蛎壳制剂中铝和铅的污染明显, 在煅烧过程铝的化学结构发生变化, 而氧化铝是不能被生物利用的, 铅含量也偏高^[7]。经高温煅烧的活性钙, 碱性强, 对胃肠刺激大, 所以更提倡采用有机酸提取或螯合法^[8]。本研究采用有机酸(柠檬酸和苹果酸)混合提取鱼骨中的钙。

表1 罗非鱼骨中钙提取的正交实验

Table 1 The orthogonal experiment of extractive ratio of calcium from tilapia bone

编号 Number	温度(℃) Temperature	时间(h) Time	浓度比 Ratio of acid	钙提取率(%) Extractive ratio of calcium
1	1 (110)	1 (0.5)	1 (1:1)	37.25
2	1 (110)	2 (1.0)	2 (2:1)	40.51
3	1 (110)	3 (1.5)	3 (3:2)	47.56
4	2 (115)	1 (0.5)	2 (2:1)	45.35
5	2 (115)	2 (1.0)	3 (3:2)	62.32
6	2 (115)	3 (1.5)	1 (1:1)	66.86
7	3 (121)	1 (0.5)	3 (3:2)	77.10
8	3 (121)	2 (1.0)	1 (1:1)	81.20
9	3 (121)	3 (1.5)	2 (2:1)	52.44
K ₁	41.77	53.23	61.77	
K ₂	58.18	61.34	46.10	
K ₃	70.25	55.62	62.33	
极差Extreme differences	28.48	8.11	16.23	

通过正交试验, 由表 1 可以看出温度的因素极差最大, 在 121℃ 高温下提取率最高, 而柠檬酸和苹果酸的比例是第二位影响因素, 以两者之比为 3:2 最好, 时间的影响因素较小, 其中在 1h 的提取效果较好。综合上述分析最佳的提取条件是 $A_3B_2C_3$, 即将罗非鱼骨粉放在柠檬酸和苹果酸(3:2)混合溶液中, 在 121℃ 的高温下提取 1h, 经重复实验表明, 在最佳条件下钙的提取率达到 92.1%。

采用该法从鱼骨中提取钙比薛长湖教授等人采用的乳酸和盐酸混合提取鲑鱼骨钙^[9]的钙提取率高, 而且风味好, 有柠檬酸和苹果酸的清香风味, 鱼腥味较淡, 而采用乳酸和盐酸提取的产品有不愉快气味。

2.2 两种钙剂在不同条件下的溶解度比较

从表 2 可见, 当 pH 为中性时, 碳酸钙的溶解度均远远小于 CMC 活性钙, 而当 pH 为 4 时, CMC 钙迅速全部溶解, 而碳酸钙只是部分溶解。CMC 活性钙在煮沸的水中基本溶解, 其溶解度为 88%。由于钙盐的溶

表 4 大白鼠钙代谢测定结果

Table 4 The measurement result of calcium metabolism of Wistar rat

组别	摄钙量(mg/d·只)	粪钙(mg/d·只)	尿钙(mg/d·只)	血钙(mmol/L)	股骨钙(mg/g)	吸收率(%)	存留率(%)
Number	Ca intake	Muck Ca	Urine Ca	Serum Ca	Bone Ca	Rate of absorb	Rate of retention
A 组	6.2	6.9	0.05	2.29	30.5	-11.3	-12.2
B 组	52.5	14.8	1.54	3.62	38.5	71.6	68.9
C 组	48.8	16.5	1.61	3.15	34.7	66.2	62.9

表 2 钙剂的溶解度比较

Table 2 The dissolution degree of the calcium products comparison

条件 Condition	溶解度(mg/100ml)Dissolution	
	CMC 活性钙	碳酸钙
	CMC active calcium	Citra acid calcium
蒸馏水(pH=7)	54	1.0
煮沸水(pH=7)	88	2.5
盐酸液(pH=4)	100	44

解性同钙的吸收率有关^[10], 钙以离子状态吸收, 在机体内也以离子状态参与生命活动, 以有机酸制取的活性钙比用无机酸制取的钙溶解度大, 人体对钙的吸收相应高了一些。CMC 活性钙的溶解性明显优于碳酸钙, 可见其吸收率亦较好。

2.3 CMC 活性钙粉的生物利用研究

2.3.1 CMC 活性钙剂对大鼠增重的影响

采用相同成分和含量、仅钙剂来源不同的人工合成饲料饲喂大鼠, 喂养 28d, 对大鼠增重的影响和饲料利用率的测定结果见表 3。低钙对照 A 组的大鼠体重增长和饲料利用率均显著低于各补钙组, 而且表现出脱毛、易受惊、四肢无力等特征, 提示缺钙是影响机体正常生长的重要因素。喂养 CMC 活性钙的 B 组体重增长和饲料利用率与喂养碳酸钙的 C 组无显著性差异($p > 0.05$), 这两组大白鼠的体重呈稳定增长趋势, 皮毛光滑柔顺, 精力旺盛。测定结果表明 CMC 活性钙的生物效价略高于碳酸钙。

表 3 实验大鼠体重增加与饲料利用率的关系

Table 3 The relation of wistar rat weight increment and the animal feed utilization

组别	增加体重(g)	饲料利用率(%)
Number	Weight increment	Feed utilization
A 组	75.50	25.8
B 组	118.65	28.6
C 组	109.70	27.9

2.3.2 CMC 活性钙剂对大鼠钙代谢的影响

不同来源钙剂对大鼠钙代谢的结果列于表 4。由表 4 可看出, 低钙对照 A 组与其它两组相比, 有显著的差

异。喂养 CMC 活性钙的 B 组无论在吸收率、存留率或股骨钙上均高于喂养碳酸钙的 C 组, 表明补钙可有效改善大鼠骨质的钙化状况, 维持血钙在正常的范围之内。说明 CMC 活性钙在体内可被良好的吸收, 这与 Miller 等人报道健康青春期受试者对柠檬酸苹果酸钙的平均吸收率高于碳酸钙^[11,12]相吻合。

3 小 结

3.1 采用柠檬酸和苹果酸提取鱼骨中的钙, 当柠檬酸和苹果酸的浓度比为 3:2 时, 钙提取率达到 92.1%, 提取率高于采用乳酸与盐酸混合溶液提取鱼骨中的钙。

3.2 Brennan 等^[13]认为用于防治骨质疏松症的钙剂必须是可溶解并且可以被生物体所利用的。CMC 活性钙的溶解性好, 在 pH=4 条件下完全溶解, 在热水中溶解度达 88%, 比碳酸钙等无机酸钙溶解性好, 而且比柠檬酸钙等有机酸钙溶解性高, 经动物实验证明, CMC 活性钙在大鼠体内的吸收率高于碳酸钙, 表明其更易被机体吸收利用, 能有效的补充钙质。

3.3 钙磷比值与骨丢失有关, 美国推荐膳食供给量的理想钙磷比为 1:1^[14], 薛长湖等^[9]研究认为鱼骨比其他原料如牡蛎壳制备的活性钙中钙磷比更接近这个比值, CMC 活性钙是从罗非鱼骨中制得, 所以更有利于人体的吸收利用。

3.4 CMC 活性钙的制备工艺简便, 所得产品为白色粉状, 具有良好风味。生物利用度明显高于柠檬酸钙和碳酸钙, 是一种高吸收性钙素材。

参考文献:

[1] 常平, 梁振昌. 罗非鱼的养殖概况及其发展前景[J]. 水产科技, 1994, (4): 10-11.
[2] 章超桦. 功能性食品素材——钙的市场前景[J]. 中国食物与营养, 1999, (6): 28-30.
[3] 中国科学院数学研究所统计组. 常用数理统计方法[M]. 北京: 科学出版社, 1979.
[4] 杨惠芬, 李明元, 沈文. 食品卫生理化检验标准手册[M]. 北京: 中国标准出版社出版, 1998. 178-183.
[5] 施新猷. 医学动物实验方法[M]. 北京: 人民出版社, 1980. 440-445.

酶法从紫苏子油中制取 α -亚麻酸工艺研究(II)

尿素包络纯化工艺的探讨

魏 决¹, 罗 雯¹, 肖 青²

(1.成都大学生物工程系, 四川 成都 610106; 2.四川省粮油中心监测站, 四川 成都 610015)

摘 要: 在前期实验所获得的最佳工艺条件下, 以利用解脂假丝酵母脂肪酶水解紫苏子油, 得到的混合脂肪酸为原料, 通过正交实验, 探讨了与尿素包络法纯化 α -亚麻酸反应有关的主要影响因素, 得出了最适的温度、时间和溶剂配比分别为 -10°C ; 24h 和 1:3:6, α -亚麻酸纯度 87.2%, 得率 67.5%。

关键词: 混合脂肪酸; α -亚麻酸; 尿素包络; 纯化

Enzymatic Hydrolysis and Isolation of α -Linolenic Acid from Perilla Oil (II)

Study on Urea Clathrate Purity Method

WEI Jue¹, LUO Wen¹, Xiao Qing²

(1. Biological Engineering Department, Chengdu University, Chengdu 610106, China;

2. Grain and Oil Center Supervision Station in Sichuan Province, Chengdu 610015, China)

Abstract: Under the optimum conditions of pre-test, the mix-fatty acids were obtained by enzyme reaction. The optimum effecting factors in reaction to purify α -linolenic acid by urea clathrate were studied: temperature of urea clathrate: -10°C ; time of urea clathrate precipitation: 24 hours and proportion of solvent; 1:3:6. The purity of α -linolenic acid was 87.2% and the yield of α -linolenic acid about 67.5%.

Key words: mix-fatty acid; α -linolenic acid; urea clathrate; purification

中图分类号: TS201.25

文献标识码: B

文章编号: 1002-6630(2005)02-0117-03

在“脂肪酶水解工艺的探讨(I)”中, 我们利用脂肪酶水解紫苏子油, 得到相应的混合脂肪酸, 通过尿素包络沉淀法, 由于混合脂肪酸中的直链饱和脂肪酸在

低温和有机溶剂中与尿素会形成内含直链分子的六方型晶体而结晶析出, 而不饱和脂肪酸中的双键使分子形状弯曲, 造成体积增大, 不易与尿素形成包合物。由此可将饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸分离开来。

收稿日期: 2003-12-01

作者简介: 魏决(1962-), 女, 副教授, 研究方向为食品加工工艺、动植物天然有效成分提取。

1 材料与方法

- [6] 杨树勤. 卫生统计学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986. 93-100.
- [7] Bourgoïn BP, et al. Am J Public Health, 1993, (83): 1155-1160.
- [8] 郭岩, 李艳波, 韩水龙. 钙剂的合理应用及其制剂的进展[J]. 现代医药卫生, 2001, 17(2): 160-161.
- [9] 薛长湖, 李兆杰, 孙成, 等. 由鳕鱼排制备活性钙[J]. 青岛海洋大学学报, 1995, 25(2): 173-179.
- [10] Schnepf M, Madrick T. Nutr Res. 1991, (11): 961-970.

- [11] Miller J Z, et al. Am J Clin Nutr, 1988, 48: 1291-1294.
- [12] Nicar M J, Pak C Y C. J Clin Endocrinol Met, 1985, 61: 391-393.
- [13] Brennan M J, Duncan W E, Wartofaky L, et al. In vitro dissolution of carbonate preparations[J]. Calcif T issue Int, 1991, 49: 308.
- [14] National Research Council. In: Recommended dietary allowances. 10th ed[M]. Washington DC: Food and Nutrition Board, National Academy Press, 1989.