

超声波辅助法制备牛骨源柠檬酸钙的工艺优化

单媛媛, 刘叶虹萱, 代雨柔, 周 元, 伊扬磊, 王 欣, 刘变芳, 吕 欣*
(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 以废弃黄牛长骨为原料, 在单因素试验基础上以柠檬酸钙转化率为指标, 通过响应面法研究超声辅助直接中和法制备牛骨源柠檬酸钙的工艺, 并与常规方法制备牛骨源柠檬酸钙的效果进行比较分析。结果表明, 超声辅助制备牛骨源柠檬酸钙的最佳工艺条件为: 料液比1:15 (g/mL)、料酸比1:2、超声功率320 W、超声温度39 ℃、超声时间21 min。在此条件下柠檬酸钙的转化率为71.21%, 所得柠檬酸钙的纯度为94.38%。对超声辅助直接中和法与传统溶钙技术的离子钙转化率进行比较, 发现超声辅助直接中和法反应21 min后离子钙含量比静置法、搅拌法、煮沸法反应60 min后的离子钙含量分别提高了84、4.5 倍和3 倍。超声波处理3 次后牛骨钙的溶出率高达96.18%。结果说明超声波辅助法是将牛骨中钙离子化的有效方法, 可为以牛骨为原料工业生产钙制品提供参考。

关键词: 牛长骨; 柠檬酸钙; 超声波; 响应面优化

Optimization of Ultrasound-Assisted Preparation of Calcium Citrate from Bovine Bone

SHAN Yuanyuan, LIU Yehongxuan, DAI Yurou, ZHOU Yuan, YI Yanglei, WANG Xin, LIU Bianfang, LÜ Xin*
(College of Food Science & Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: In order to make full use of calcium resources in bovine bone, bovine bone waste was chosen as starting material to prepare calcium citrate by an ultrasonic-assisted direct neutralization method and the process conditions were optimized by the combined use of one-factor-at-a-time method and response surface methodology based on the yield of calcium citrate. The new preparation method was evaluated in comparison to the routine calcium dissolution method. Results showed that the optimum process conditions were determined as follows: solid-to-solvent ratio 1:15 (g/mL), solid-to-citric acid ratio 1:2, ultrasonic power 320 W, temperature 39 ℃, and sonication time 21 min, giving a calcium citrate yield of 71.21%. The purity of the product prepared using the optimized conditions was 94.38%. The amount of dissolved calcium after 21 min reaction in the new method was 85, 5.5 and 4 times as high as that obtained by 60 min standing, stirring or cooking without ultrasonic treatment, respectively. The amount of dissolved calcium was as high as 96.18% after three cycles of ultrasonic treatment. These results confirmed the ultrasonic-assisted method to be an effective method for preparing dissolved organic calcium from bovine bone, which can provide a basis for the industrial production of calcium products from waste bovine bone.

Keywords: bovine bone; calcium citrate; ultrasonic; response surface methodology

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181018-197

中图分类号: TS251.94

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 20-0279-07

引文格式:

单媛媛, 刘叶虹萱, 代雨柔, 等. 超声波辅助法制备牛骨源柠檬酸钙的工艺优化[J]. 食品科学, 2019, 40(20): 279-285.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181018-197. <http://www.spkx.net.cn>

SHAN Yuanyuan, LIU Yehongxuan, DAI Yurou, et al. Optimization of ultrasound-assisted preparation of calcium citrate from bovine bone[J]. Food Science, 2019, 40(20): 279-285. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20181018-197. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2018-10-18

基金项目: 陕西省重点研发计划一般项目 (2017NY-150)

第一作者简介: 单媛媛 (1984—) (ORCID: 0000-0002-0043-3549), 女, 副教授, 博士, 研究方向为畜产食品功能化加工。

E-mail: shanyy2013@163.com

*通信作者简介: 吕欣 (1975—) (ORCID: 0000-0002-7666-7202), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品营养与健康。

E-mail: xinlu@nwsuaf.edu.cn

我国是畜牧业大国, 畜禽的生产总量居世界前列, 近年来, 随着人们对肉类食品消费量的增多, 畜骨产量也在急剧增加, 尤其牛骨产量增长幅度最大^[1]。牛骨占牛活体质量的6%~12%, 主要特点是脂肪含量低, 但蛋白质及钙、磷、铁等矿物质含量丰富, 在食品医药方面具有广泛的潜在用途^[2]。但在目前牛骨消费市场, 除排骨和腔骨以原料的形式直接上市消费外, 不宜食用或口感较差的部分由于价格低及贮存不便, 往往加工成饲料或肥料等附加值较低的产品或直接被废弃, 造成了极大的资源浪费和环境污染^[3-4]。因此, 充分利用骨类资源, 开发高附加值产品, 对食品行业, 尤其是肉类加工业的健康发展具有重要意义。

牛骨的化学组成受品种、年龄、饲养条件等多种因素的影响, 变化较大, 但硬骨的组成相对稳定, 硬骨中70%左右为以钙盐为主的矿物质, 98%以上的钙盐为磷酸钙和碳酸钙, 因此动物骨骼是天然的补钙源^[5]。由于牛骨中富含钙磷, 因而将其制成骨泥和骨粉作为钙磷添加剂是利用骨资源的重要途径^[3], 但是由于骨骼钙的羟基磷灰石水溶性极差, 并且骨钙通常与胶原纤维结合, 使得骨粉中离子型钙含量甚微^[6], 如果直接食用骨泥或骨粉, 钙的吸收利用率非常低, 必须经过加工处理才能有效利用其中的钙。目前报道的提高骨钙溶解度方法主要有酸解法、碱解法、酶解法和微生物发酵法等^[7-9], 这些方法可以在一定程度上提高骨钙的溶出率, 但是酸碱水解法会导致牛骨中蛋白质的不可逆变性, 其中效果较好的微生物发酵法中游离钙的转化率较低, 仅为36.9%。近年来也有利用高压脉冲电场^[4,10-11]、感应电场辅助技术^[12]等高新技术进行骨钙溶出的研究, 效果较好, 但是需要特殊的设备。超声波技术作为加速有机反应的重要手段, 具有机械效应、热效应和空化效应^[13], 理论上可以破坏骨胶原与羟基磷灰石的结合, 加速溶质的扩散, 促进有效物质的溶出, 提高反应速率。超声波辅助法在生物活性物质的提取制备^[14-17]、蛋壳源有机钙的转化^[18-21]等方面已有广泛的应用, 但在畜禽骨骼有机钙的转化方面的应用报道很少。

钙是人体不可或缺的重要营养素, 目前市场上的钙制剂种类很多, 但均存在一定的局限性。作为新一代钙源, 柠檬酸钙是一种无臭无味的白色粉末, 它的吸收效率为普通碳酸钙的2.6倍, 对肠胃刺激较小^[22], 可以在医药行业用作人和动物的补钙剂, 诊治骨质疏松症^[23-24]; 在食品工业, 柠檬酸钙也是一种安全的食品添加剂、缓冲剂及酸度调节剂; 柠檬酸钙还被认为是最具有潜在市场价值的饲料添加剂而用于水产养殖中^[25-26]。此外, 柠檬酸钙能保证饲料不吸潮, 并有效改良饲料风味, 提升动物进食量, 缓解动物对激烈现象做出的反应, 还能对动物

体形和肉色进行改良, 使肉的品质得到提高。因此将牛骨中的羟基磷灰石转化成易于被人体吸收的柠檬酸钙具有广阔的应用前景。

本研究目的是探索一种利用超声辅助直接中和法制备牛骨源柠檬酸钙的新工艺, 提高钙的转化效率, 缩短反应时间, 提供钙补充剂的同时解决废弃牛骨造成的环境污染问题。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄牛长骨 西北农林科技大学菜市场; 柠檬酸(食品级) 西北农林科技大学食品学院食品工艺研究室; NaOH、盐酸、硝酸、碳酸钙、乙二醇四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)-Na₂(均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

LDP-1000A型高速多功能粉碎机 浙江永康市红太阳机电有限公司; 电热恒温水浴锅 天津泰斯特仪器有限公司; SHB-D(III)循环水多用真空泵 河南省泰斯特仪器有限公司; R100型磁力搅拌器 上海佑科仪器仪表有限公司; 超声波细胞粉碎机、SB-5200DTD超声波清洗机 宁波新芝生物科技股份有限公司; HH-S数显恒温水浴锅 常州市国立实验设备研究所。

1.3 方法

1.3.1 牛骨预处理

牛长骨清洗后粗碎成10~20 cm大小的骨块, 然后把骨块在0.1 MPa、121 °C条件下蒸煮1 h。煮后的骨块置于烘箱中40 °C鼓风干燥4 h后用多功能粉碎机粉碎, 过150目筛备用。

1.3.2 超声辅助法制备牛骨源柠檬酸钙的工艺流程

称取一定量的牛骨粉置于烧杯中, 加入一定比例的柠檬酸溶液, 放入超声波细胞粉碎机中按照预先设定参数进行超声反应, 其中超声3 s, 间歇5 s。待反应完成进行抽滤, 滤液加热浓缩、干燥后用研钵碾碎, 用细网纱布过滤后即得白色粉末状柠檬酸钙。

1.3.3 钙离子化效率测定

参考文献[4]的方法略作改进。即加入柠檬酸反应结束后的滤液定容到50 mL, 取5 mL溶液到250 mL锥形瓶中, 加蒸馏水稀释至50 mL。加氢氧化钠调节溶液pH值至11~12之间, 滴加2~3滴钙离子指示剂(铬蓝黑R), 溶液变为酒红色后缓慢滴加EDTA-Na₂溶液, 边滴边摇匀, 当溶液从酒红色变为蓝色且30 s不褪色即为滴定终点, 记录所消耗的EDTA-Na₂的量, 同时以蒸馏水为空白对照, 记录消耗EDTA-Na₂的量。离子钙溶出率按照式(1)计算:

$$\text{离子钙溶出率}/\% = \frac{40 \times \beta \times (V - V_0) \times C_{\text{EDTA}}}{\alpha \times m} \times 100 \quad (1)$$

式中： C_{EDTA} 为EDTA- Na_2 溶液的浓度/(mol/L)； V 为样品滴定时消耗EDTA- Na_2 体积/L； V_0 为空白对照消耗EDTA- Na_2 体积/L； β 为稀释倍数，10； m 为骨粉的质量/g； α 为骨粉中钙的质量分数/%。

1.3.4 柠檬酸钙的纯度和转化率的测定^[27]

采用减量法精确称量柠檬酸钙粉末质量 m_1 ，定容于100 mL容量瓶，每次取20 mL溶液于250 mL锥形瓶中，加入20 mL蒸馏水，再用1 mol/L NaOH溶液调pH值至11~12，随后滴加钙指示剂摇匀。用EDTA标准液小心滴定样品溶液，至酒红色完全褪去，溶液呈纯蓝色，且30 s不褪色为滴定终点，记录消耗EDTA标准液的体积 V 。同时以蒸馏水为空白对照，记录消耗EDTA标准液的毫升数记为 V_0 。柠檬酸钙纯度按式(2)计算：

$$\text{柠檬酸钙纯度}/\% = \frac{(V - V_0) \times C_{\text{EDTA}} \times V_{\text{总}} \times M}{m_1 \times V_{\text{滴}}} \times 100 \quad (2)$$

式中： V 为样品滴定时消耗EDTA- Na_2 体积/L； V_0 为空白对照消耗EDTA- Na_2 体积/L； C_{EDTA} 为EDTA- Na_2 溶液的浓度/(mol/L)； $V_{\text{总}}$ 为柠檬酸钙溶液的总体积/L； $V_{\text{滴}}$ 为参加滴定的柠檬酸钙溶液体积/L； M 为柠檬酸钙的摩尔质量/(g/mol)； m_1 为柠檬酸钙粉末的质量/g。

柠檬酸钙转化率按照式(3)计算：

$$\text{柠檬酸钙转化率}/\% = \frac{m_0 \times \text{柠檬酸钙纯度}}{m} \times 100 \quad (3)$$

式中： m_0 为柠檬酸钙粗粉的质量/g； m 为骨粉的质量/g。

1.3.5 单因素试验

超声辅助制备牛骨源柠檬酸钙的过程中影响钙转化率的因素较多，如超声功率、时间、温度、料酸比、料液比等。以离子钙溶出率为衡量指标，采用单因素试验考察上述因素对离子钙溶出率的影响，每个水平重复3次。

1.3.5.1 超声功率对牛骨钙溶出率的影响

在固定料液比为1:15 (g/mL)、料酸比(牛骨粉与柠檬酸的质量比，下同)1:1.5、超声温度30 ℃、超声时间10 min的条件下，考察超声功率(0、50、100、150、200、250、300、350、400 W)对牛骨离子钙溶出率的影响。

1.3.5.2 超声时间对牛骨钙溶出率的影响

在固定料酸比1:1.5、料液比1:15 (g/mL)、超声功率250 W、超声温度30 ℃、超声10 min的条件下，考察超声时间(0、5、10、15、20、25、30 min)对牛骨离子钙溶出率的影响。

1.3.5.3 超声温度对牛骨钙溶出率的影响

在固定料酸比1:1.5、料液比1:15 (g/mL)、超声时间10 min的条件下，考察不同超声温度(20、30、40、50、60 ℃)对牛骨离子钙溶出率的影响。

1.3.5.4 料酸比对牛骨钙溶出率的影响

在固定料液比为1:15 (g/mL)、超声功率200 W、超声温度30 ℃、超声时间10 min的条件下，考察料酸比(1:0、1:0.25、1:0.5、1:1、1:1.5、1:2、1:2.5、1:3)对牛骨离子钙溶出率的影响。

1.3.5.5 料液比对牛骨钙溶出率的影响

在固定料酸比1:1.5、超声温度为30 ℃、超声时间10 min、超声功率200 W的条件下，考察料液比(1:5、1:10、1:15、1:20、1:25 (g/mL))对牛骨离子钙溶出率的影响。

1.3.6 响应面试验设计

在单因素试验的基础上，依据Box-Behnken试验设计要求^[28]，以超声时间、超声功率及超声温度为考察变量，柠檬酸钙的转化率为响应值，应用Design-Expert 8.0软件设计3因素3水平响应面分析试验，因素与水平见表1。共17个试验点，其中12个为分析因子，5个为零点，零点试验进行5次，以估计误差，试验以随机方式进行，重复3次。

表1 响应面试验因素与水平

Table 1 Code and value of independent variables used for response surface design

水平	因素		
	X_1 超声功率/W	X_2 超声温度/℃	X_3 超声时间/min
-1	250	35	18
0	300	40	20
1	350	45	22

1.3.7 超声处理次数对离子钙溶出率的影响

将骨粉(5.0 g)、水和柠檬酸按最佳配比混合均匀后，按响应面试验优化出的最佳工艺参数进行超声波处理，离心得到上清液和骨渣，分别测定游离钙的含量。离心分离得到的骨渣经胶体研磨、干燥后，再重复上述步骤2次，分别计算每次的离子钙溶出率。

1.3.8 超声处理对离子钙溶出效果的验证

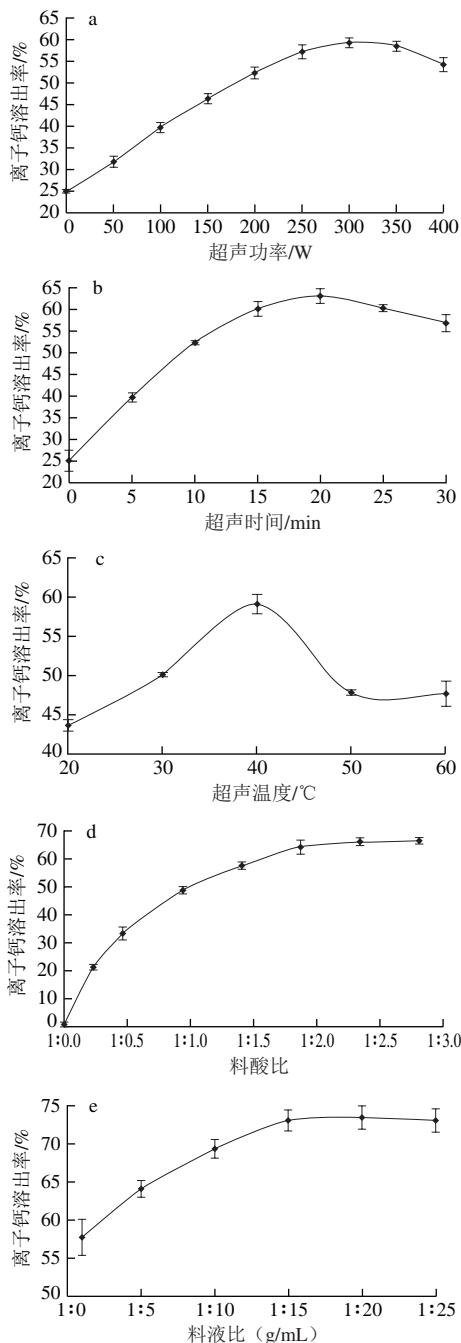
为验证超声波辅助法对促进牛骨可溶性钙快速溶出的强化作用，将超声辅助法与酸煮法得到的牛骨源柠檬酸钙转化率进行比较分析，同时设置静置组(不超声)和常规处理组(搅拌代替超声)，分析不同处理后溶液中柠檬酸钙含量。

1.4 数据分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用Microsoft Office Excel 2013、Design-Expert 8.0.5b工具进行处理，并用Duncan多重比较检验各处理间的差异显著性($P < 0.05$ ，差异显著)。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果



a~e. 超声功率、超声时间、超声温度、料酸比、料液比。

图1 超声功率、超声时间、超声温度、料酸比、料液比
对牛骨钙离子化效果的影响

Fig. 1 Effects of ultrasonic power, sonication time, temperature, solid-to-citric acid ratio and solid-to-solvent ratio on dissolution of free calcium from bovine bone

由图1a可以看出, 与对照组相比, 超声处理有助于牛骨钙的离子化, 在0~350 W范围内, 离子钙溶出率随

超声功率增加而显著提高, 超过250 W以后, 离子钙溶出率增加幅度趋于平缓。分析其原因可能是因为当超声功率在100~300 W时, 在超声波功率增加时, 超声波的空化作用和机械振动增强有助于柠檬酸分子扩散, 提高传质速率, 从而促进柠檬酸与牛骨中的羟基磷灰石进行反应; 此外, 超声波与料液作用产生大量的泡沫, 泡沫破碎后产生局部瞬间压力^[29], 促使骨胶原断裂也有利于牛骨钙的溶出, 因此从牛骨中释放离子钙的效率得到了改善。但是超过300 W以后, 牛骨钙的溶出率有所降低, 可能因过高强度的超声处理会导致生成的柠檬酸钙发生降解或者性质改变。出于能耗与生产周期等因素的综合考虑, 选择300 W左右的超声功率进行响应面试验优化。

从图1b可以得出, 在0~20 min内, 离子钙溶出率随超声时间延长而上升, 超出20 min后, 离子钙溶出率增加缓慢甚至下降。分析其原因, 可能随着超声时间的延长, 促进了柠檬酸与牛骨中羟基磷灰石的接触, 加快反应效率, 超声时间越长, 所得到的柠檬酸钙越多; 但当超声时间超过20 min以后, 超声波的作用从牛骨颗粒表面扩散到牛骨颗粒内部, 继续延长时间不会对牛骨颗粒产生影响, 但是会使生成的柠檬酸钙分解加速或使柠檬酸钙的物理性质发生改变, 导致超声过程中絮凝, 产生不同程度的沉淀^[19], 直接阻碍了离子钙含量的测定。因此, 依据生产实际和成本考虑, 选取超声时间约为18~22 min进行后续响应面优化试验。

由图1c可以看出, 在0~40 °C范围内, 离子钙溶出率随超声温度升高而提高, 当超声温度达40 °C时, 牛骨钙的离子化率显著高于其他温度时的离子钙溶出率 ($P < 0.05$), 这是因为反应温度升高会加快溶质的扩散速率, 有利于柠檬酸渗透并与牛骨颗粒接触, 因而更有利于反应进行。但是超过40 °C以后, 随着超声温度的继续升高, 离子钙溶出率反而下降, 可能是由于温度过高, 柠檬酸钙结晶导致溶解性下降, 使测定的溶液中钙含量降低^[30]。因此, 将超声反应温度的范围确定在35~45 °C, 进行后续响应面优化试验。

由图1d可以看出, 离子钙溶出率随酸用量增加而提高, 当骨粉与柠檬酸的比例为1:2时, 钙的离子化效率增加很快, 超过此区间以后, 离子钙溶出率增加幅度趋于平缓。因此选择料酸比1:2作为最优条件。

由图1e可以看出, 在料液比1:15 (g/mL) 以下时, 随着溶剂用量的增大, 离子钙溶出率显著上升 ($P < 0.05$)。当料液比为1:15 (g/mL) 时, 离子钙溶出率达到最大值73.0%, 继续增大料液比对离子钙溶出率无显著性影响 ($P > 0.05$)。原因可能与柠檬酸钙在水中的溶解度有关, 料液比在1:15 (g/mL) 之前, 转化出的柠檬酸钙不能完全溶于水, 导致测得离子钙的含量降低。综合考虑实际生产成本, 选择料液比1:15 (g/mL) 进行后续响应面优化试验。

2.2 响应面分析

2.2.1 响应面回归模型的建立与分析

根据单因素试验结果, 固定料酸比1:2、料液比1:15 (g/mL), 以超声功率 (X_1)、超声温度 (X_2) 和超声时间 (X_3) 为试验因素, 以柠檬酸钙转化率为响应值, 利用响应面法对超声辅助制备牛骨源柠檬酸钙的制备工艺进行优化, 结果如表2所示。

表2 响应面试验优化结果

Table 2 Experimental design with results for response surface analysis

试验号	X_1 超声功率	X_2 超声温度	X_3 超声时间	Y 柠檬酸钙转化率/%
1	0	0	0	73.4
2	0	0	0	70.8
3	-1	1	0	44.9
4	0	1	1	59.1
5	0	1	-1	47.4
6	0	-1	1	61.3
7	1	0	1	65.3
8	-1	0	1	60.8
9	0	0	0	72.0
10	0	0	0	70.2
11	1	-1	0	63.6
12	0	-1	-1	57.3
13	-1	0	-1	59.8
14	0	0	0	74.0
15	1	0	-1	62.8
16	-1	-1	0	54.7
17	1	1	0	58.0

根据表2结果, 通过Design-Expert 8.0软件对数据进行多元回归拟合分析, 柠檬酸钙转化率 (Y) 与超声功率 (X_1)、超声温度 (X_2) 和超声时间 (X_3) 之间建立二次回归模型:

$$Y = 72.09 + 3.69X_1 - 3.46X_2 - 2.41X_3 + 1.06X_1X_2 + 0.36X_1X_3 + 1.93X_2X_3 + 5.44X_1^2 - 11.33X_2^2 - 4.47X_3^2$$

表3 回归方程的方差分析

Table 3 Analysis of variance of quadratic polynomial regression model

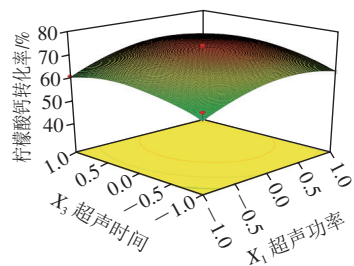
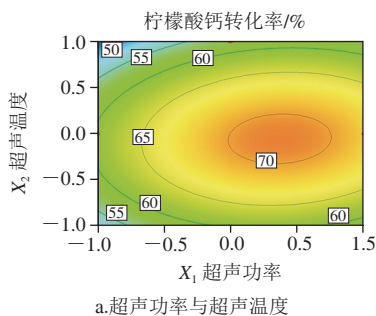
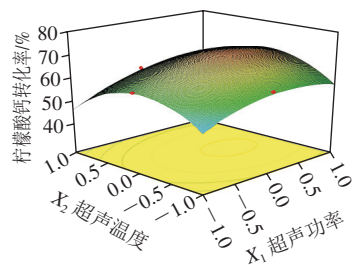
方差来源	自由度	平方和	F值	P值
回归模型	9	1 089.33	14.84	0.005 6**
X_1 超声功率	1	109.15	13.38	0.008 1**
X_2 超声温度	1	95.63	11.72	0.011 1*
X_3 超声时间	1	46.32	5.68	0.048 7*
X_1X_2	1	4.52	0.55	0.005 8**
X_1X_3	1	0.52	0.064	<0.000 1**
X_2X_3	1	14.90	1.83	0.014 8*
X_1^2	1	124.62	15.28	0.481 1
X_2^2	1	540.70	66.28	0.808 2
X_3^2	1	84.24	10.33	0.218 6
失拟项	3	46.74	6.01	0.057 9
误差项	4	10.36		
总误差	16	1 146.44		
R^2		0.950 2		

注: **差异极显著 ($P < 0.01$), *差异显著 ($P < 0.05$)。

为进一步分析所获得的回归方程的拟合度, 对模型进行了ANOVA方差分析, 其结果如表3所示。可以看出, 拟合方程的P值为0.005 6, 这表明所获得的方程在99%水平下具有显著性。方程的失拟项 ($P = 0.057 9$) 不显著, 说明方程的拟合程度较好, 回归方程可以很好地准确分析和预测各因素与钙转化率之间的关系。该模型一次项 X_1 和交互项 X_1X_2 、 X_1X_3 的P值小于0.01, 对模型贡献大, 因此其对牛骨源柠檬酸钙转化的影响极显著, 而一次项 X_2 、 X_3 和交互项 X_2X_3 的P值小于0.05, 表明其对牛骨源柠檬酸钙转化的影响显著。由F检验可以得出各因素对牛骨源柠檬酸钙转化率的影响依次是 X_1 (超声功率) $> X_2$ (超声温度) $> X_3$ (超声时间)。

2.2.2 响应面优化

根据回归拟合方程, 每2个因素对牛骨源柠檬酸钙转化率作响应面和等高线图 (图2)。通过观察响应面的变化情况和等高线的稀疏程度可直观地反映超声功率 (X_1)、超声温度 (X_2)、超声时间 (X_3) 之间交互作用对牛骨源柠檬酸钙转化率的影响, 等高线的形状越接近椭圆形, 表明其自变量间交互作用对响应值的影响越大^[16-17]。综合分析可知, 超声温度 (X_2) 和超声功率 (X_1) 的交互作用对牛骨源柠檬酸钙转化率的影响最为明显。



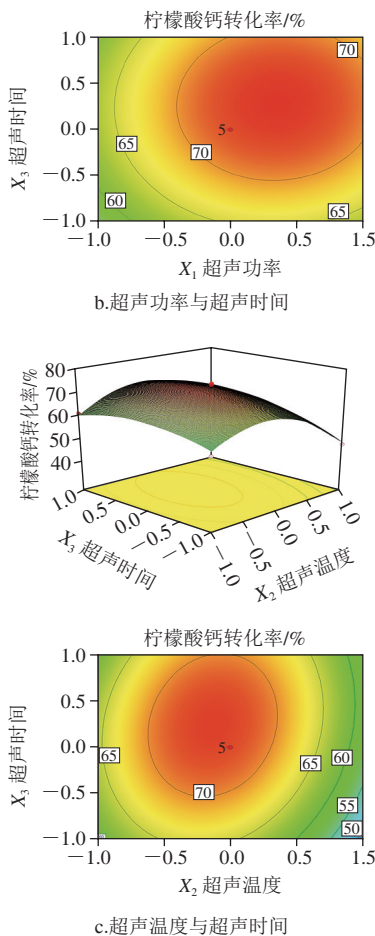


图2 各因素交互作用对柠檬酸钙转化率的影响

Fig. 2 Response surface and contour plots showing interactive effects of variables on dissolution of free calcium from bovine bone

2.2.3 最佳条件的预测及验证

表4 不同处理方法牛骨源柠檬酸钙的转化率

Table 4 Yields of calcium citrate prepared by different methods

实验分组	超声辅助法 (21 min)	取消超声处理 (静置60 min)	搅拌代替超声 (搅拌60 min)	蒸煮代替超声 (100 ℃、60 min)
柠檬酸钙转化率/%	71.21±1.72	0.84±0.12	12.88±0.12	18.37±0.89
柠檬酸钙纯度/%	94.38±1.87	91.54±2.04	92.04±0.98	90.46±1.85

通过回归模型的预测,确定超声波辅助牛骨钙离子化制备柠檬酸钙的最佳工艺条件为:超声功率317 W、超声温度39.45 ℃、超声时间20.52 min、料液比1:2、料液比1:15 (g/mL)。在此条件下柠檬酸钙转化率为73.22%。结合生产实际,将各因素调整为:超声功率320 W、超声温度39 ℃、超声时间21 min、料液比1:2、料液比1:15 (g/mL)。在此条件下进行5次平行实验验证,同时设置取消超声处理和用常规方法代替超声(反应60 min)进行比较。由表4可知,在超声辅助的最佳工艺条件下,牛骨源柠檬酸钙转化率可达71.21%,与理论预测值73.45%,误差值仅为3.05%,证实了该模型的有效性。同时,在最佳工艺条件下柠檬酸钙的纯度为

94.38%。超声辅助反应21 min比常规方法反应60 min时的柠檬酸钙的转化率显著提升,表明超声波辅助在促进牛骨有机钙转化的速率和效率方面均具有明显优势。

2.3 超声波处理次数对牛骨钙离子化效果的影响

在优化出的最佳工艺参数基础上,探索将牛骨钙全部溶出的工艺,即将骨粉、水和柠檬酸按最佳配比混合均匀后,进行超声波处理,然后离心得到上清液和骨渣,分别测定游离钙的含量(表5)。离心分离得到的骨渣经胶体磨研磨后干燥后,再重复上述步骤2次。牛骨粉只经1次超声处理后,骨中72.19%的钙被游离出来;经超声波第2次处理后,仍有17.04%的离子钙溶出,2次总离子钙溶出率达89.23%;对牛骨粉进行3次循环超声处理后,可溶性离子钙溶出率达到96.18%,牛骨中的绝大部分钙基本变为离子钙。

表5 超声处理次数对牛骨钙离子化效果的影响

Table 5 Effect of number of ultrasonic cycles on dissolution of free calcium from bovine bone

处理 次数	钙含量/mg		离子钙 溶出率/%
	上清液	骨渣	
1	801.82±2.80	308.45±7.67	72.19±0.55
2	159.60±2.33	148.86±7.02	17.04±0.35
3	62.52±1.34	86.33±7.63	6.95±0.21

注:未经超声处理的牛骨粉中钙含量为220 mg/g。

3 结 论

在单因素试验基础上,利用Box-Behnken响应面优化试验设计,确定了超声波辅助制备牛骨源柠檬酸钙的最优工艺条件为料液比1:15 (g/mL)、料液比1:2.0、超声功率320 W、超声温度39 ℃、超声时间21 min,在此条件下获得的柠檬酸钙转化率为71.21%,柠檬酸钙纯度为94.38%。经循环3次超声波处理后牛骨离子钙溶出率高达96.18%。由响应面方差分析和各因素交互作用分析各因素对牛骨源柠檬酸钙转化的影响顺序为超声功率>超声温度>超声时间,且超声温度和超声功率对柠檬酸钙得率的交互作用最为明显。相对于常规方法,超声波辅助制备工艺可显著提升牛骨源柠檬酸钙的转化率,同时缩短反应时间,具有明显优势。

参考文献:

[1] 曹兵海. 2015年肉牛牦牛产业发展趋势与政策建议[J]. 中国牛业科学, 2015, 41(1): 1-2. DOI:10.3969/j.issn.1001-9111.2015.01.001.

[2] 王琳琳, 余群力, 曹晖, 等. 我国肉牛副产品加工利用现状及技术研究[J]. 农业工程技术, 2015, 17: 36-41. DOI:10.16815/j.cnki.11-5436/s.2015.17.007.

[3] 刘丽莉, 梁严予, 尹光俊, 等. 混合菌种发酵牛骨粉制备血管紧张素转换酶抑制肽[J]. 河南科技大学学报(自然科学版), 2017, 38(1): 67-72. DOI:10.15926/j.cnki.issn1672-6871.2017.01.014.

[4] 杨巍, 陈文华, 成晓瑜, 等. 牛骨中钙离子化的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(22): 217-220. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2009.22.049.

- [5] EASTRIDGE M L. Major advances in applied dairy cattle nutrition[J]. Journal of Dairy Science, 2006, 89(4): 1311-1323. DOI:10.3168/jds.S0022-0302(06)72199-3.
- [6] 张春晖. 骨源食品加工技术[M]. 北京: 科学出版社, 2015: 30-35.
- [7] 刘忠霞, 翁佩芳. 酸解法提取牛骨中可溶性钙的研究[J]. 宁波大学学报(理工版), 2013, 26(2): 17-21.
- [8] 唐勇, 李洪军, 睢道惠. 乳酸菌发酵对超微猪骨粉营养及理化特性的影响[J]. 农业工程学报, 2002, 18(2): 118-122. DOI:10.3321/j.issn:1002-6819.2002.02.030.
- [9] 张华, 王欣, 连喜军, 等. 利用酶法促使骨粉中钙转化的研究[J]. 食品科学, 2000, 21(3): 34-36. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2000.03.012.
- [10] 周亚军, 隋思瑶, 黄卉, 等. 高压脉冲电场辅助提取鱼骨钙工艺优化[J]. 农业工程学报, 2012, 28(23): 265-270.
- [11] 殷涌光, 赫桂丹. 用高压脉冲电场促进牛骨可溶性钙快速溶出[J]. 吉林大学学报(工学版), 2009, 39(1): 249-253. DOI:10.13229/j.cnki.jdxbgxb2009.01.007.
- [12] 杨娜, 金亚美, 吴凤凤, 等. 感应电场辅助提取鱼骨钙工艺优化[J]. 农业工程学报, 2016, 32(7): 258-262. DOI:10.11975/j.issn.1002-6819.2016.07.036.
- [13] 王丹丽, 马晓彬, 王文骏, 等. 高频超声波及其在食品工业中的降解改性研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(21): 279-284. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201621047.
- [14] 曹璇, 申铨日. 超声波辅助稀碱水解法提取金鲳鱼骨油的工艺优化与脂肪酸组成分析[J]. 食品科学, 2017, 38(18): 280-285. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201718043.
- [15] ATHANASIOS C, NIKOLAS G S, DIMITRA J D, et al. Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*)[J]. Ultrason Sonochem, 2006, 13(1): 54-60. DOI:10.1016/j.ultsonch.2004.12.003.
- [16] 王海燕, 李睿, 曾秀, 等. 响应面优化超声波提取桑叶槲皮素工艺[J]. 食品科学, 2014, 35(22): 56-62. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201422011.
- [17] 陈晨, 胡文忠, 田沛源, 等. 超声辅助提取香蕉皮多酚工艺优化及其抗氧化性的分析[J]. 食品科学, 2014, 35(2): 12-17. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201402003.
- [18] 黄丽燕, 刘文营, 张强, 等. 蛋壳制备有机酸钙方法的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(2): 462-464. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2012.02.095.
- [19] 林松毅, 魏巍, 赵颂宁, 等. 超声波法制备蛋壳柠檬酸钙的工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(22): 126-131. DOI:10.3321/j.issn:1002-6630.2009.22.027.
- [20] 郑海鹏, 董全. 蛋壳制取有机活性钙的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2008(3): 87-92. DOI:10.3969/j.issn.1006-2513.2008.03.016.
- [21] 全沁果, 杨明, 林菲, 等. 响应面法优化鸡蛋壳柠檬酸钙的制备工艺[J]. 核农学报, 2016, 30(1): 79-85. DOI:10.11869/j.issn.100-8551.2016.01.0079.
- [22] 祁云云, 张凯, 丁晓墅, 等. 国内活性钙研究现状[J]. 天津化工, 2006(2): 14-15. DOI:10.3969/j.issn.1008-1267.2006.02.006.
- [23] BURT M G, MANGELSDORF B L, SRIVASTAVA D, et al. Acute effect of calcium citrate on serum calcium and cardiovascular function[J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2013, 28(2): 412-418. DOI:10.1002/jbmr.1761.
- [24] HEANEY R P, DOWELL M S, BIERMAN J, et al. Absorbability and cost effectiveness in calcium supplementation[J]. Journal of the American College of Nutrition, 2001, 20(3): 239-246. DOI:10.1080/07315724.2001.10719038.
- [25] 陈红飞, 程鸽, 程璐, 等. 由废弃贝壳制备食品添加剂柠檬酸钙[J]. 辽宁化工, 2018, 47(8): 758-763. DOI:10.3969/j.issn.1004-0935.2018.08.012.
- [26] 张勇, 周建群, 高丽红, 等. 饲料添加剂柠檬酸钙质量剖析及质量指标的设定[J]. 粮食与饲料工业, 2014(8): 40-42. DOI:10.7633/j.issn.1003-6202.2014.08.011.
- [27] 刘德婧, 马美湖. 超声辅助法制备蛋壳源乳酸钙[J]. 中国食品学报, 2017, 17(6): 90-97. DOI:10.16429/j.1009-7848.2017.06.012.
- [28] 任露泉. 试验优化设计与分析[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 246-278.
- [29] HIGUERA-BARRAZA O A, DEL TORO-SANCHEZ C L, RUIZ-CRUZ S, et al. Effects of high-energy ultrasound on the functional properties of proteins[J]. Ultrason Sonochem, 2016, 31: 558-562. DOI:10.1016/j.ultsonch.2016.02.007.
- [30] 秦亚楠. 柠檬酸及其钙盐结晶过程研究[D]. 天津: 天津大学, 2014: 1-2.