# 六种纳米化鱼骨的理化特性比较研究

李亚杰，熊善柏，尹涛，尤娟，胡杨

（华中农业大学食品科学技术学院，国家大宗淡水鱼加工技术研发分中心，湖北武汉 430070）

**摘要：**以四种淡水鱼（白鲢、草鱼、鲫鱼和罗非鱼）鱼骨和两种海水鱼（鳕鱼和鲨鱼）鱼骨为原料，制备纳米化骨液并比较研究其特性，以期为纳米化鱼骨液的加工和应用提供理论依据。结果显示，鲨鱼骨粗蛋白和胶原蛋白含量最高，胶原交联度最大。鳕鱼骨的灰分含量最高。在前 2 h 球磨中，鱼骨粒径从 6.40~85.41 μm 急剧降低至 62.95~259.12 nm，其中鳕鱼骨粒径降低速率最快，鲨鱼骨最慢。延长球磨时间，鱼骨粒径趋于稳定（106.37~172.37 nm）。纳米鱼骨的钙释放率、游离氨基酸、TCA 可溶性肽和水溶性蛋白含量随球磨时间延长而一直增加（$p$<0.05），说明鱼骨钙的释放机制与鱼骨粒径降低和生成多肽/氨基酸螯合钙均相关。六种纳米鱼骨颗粒为近似圆球形，草鱼骨液的钙释放率最高，罗非鱼和鳕鱼骨液的白度相对较高，鳕鱼和鲨鱼骨液的 pH 值相对较高。

**关键词：**鱼骨；湿法球磨；纳米颗粒；理化性质；副产物

**文章篇号：**1673-9078(2017)7-125-132 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.7.019

# Comparative Study on the Physicochemical Properties of Six Types of Nano-sized Fish Bones

**LI Ya-jie, XIONG Shan-bai, YIN Tao, YOU Juan, HU Yang**

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, National R & D Branch Center for Conventional Freshwater Fish Processing, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Nano-sized fish bone emulsions were prepared from four types of freshwater fish (carp, grass carp, catfish, and tilapia) and two types of seawater fish (cod and shark), respectively. The properties of the emulsions were comparatively investigated in order to provide a theoretical foundation for the production and application of nano-sized fish bone products. The results showed that the highest crude protein content, collagen content, and degree of collagen cross-linking were found in shark bone, while the highest ash content was found in cod bone. During the initial 2 h of ball milling, the average fish bone particle size decreased drastically from 6.40~85.41 μm to 62.95~259.12 nm. The highest and lowest rates of decrease in fish bone particle size were found in cod bone and shark bone, respectively. With increasing milling time, the average particle size gradually stabilized (106.37~172.37 nm). The calcium release percentage, free amino acid content, trichloroacetic acid-soluble peptide content, and water-soluble protein content of the nano-sized fish bones increased steadily throughout the milling process ($p$ <0.05). The results suggested that the mechanism of calcium release was associated with both the reduction of fish bone particle size and the formation of polypeptide/amino acid-chelated calcium. The shape of all six types of nano-sized fish bone particles was close to spherical. Among the six emulsions, the highest calcium release percentage was presented in grass carp bone, a relatively high whiteness was presented in in tilapia and cod bones, and a relatively high pH value was presented in cod and shark bones.

**Key words:** fish bone; wet ball milling; nano particle; physiochemical properties; by-product

2014 年全球捕捞和养殖的水产品总量达到 16.72 千万 t[1]。在鱼类加工过程中，约产生 50%~70%的副产物[2]。目前这些副产物主要是作为原料加工饲料或肥料等低附加值产品，部分副产物被厂家直接丢弃，不仅浪费原料，处理不当还会造成严重的环境污染问题[3]。因此，提高副产物的加工利用率，加工副产物为高附加值的产品，是水产品加工的必然趋势，也逐渐受到研究者的关注。

鱼骨是鱼类加工过程中产生的主要固态副产物之一，其主要成分为胶原蛋白和羟基磷酸钙[4]。鱼骨钙是一种低价的天然钙源。羟基磷酸钙和胶原蛋白有机结合，形成矿化胶原纤维，造成鱼骨中的钙溶出量甚微，不利于鱼骨钙的消化吸收[5]。已有研究报道将

收稿日期：2016-12-26

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（31601501）；现代农业产业技术体系专项基金项目（CARS-46-23）

作者简介：李亚杰（1992-），女，硕士研究生，研究方向：水产品加工及贮藏工程

通讯作者：尹涛（1986-），男，博士，讲师，研究方向：水产品深加工及副产物高值化利用

超微粉碎技术应用于鱼骨加工利用，制备微细化鱼骨粉，可显著提高鱼骨粉的溶解性、持水性和生物利用率[6,7]。Yin 等以湿法球磨的方法制备了外观为牛奶状的纳米鱼骨液，并发现将纳米鱼骨液添加到鱼糜中可有效地起到强化钙和增强鱼糜凝胶强度的双重作用[8]。纳米鱼骨增强鱼糜凝胶强度的作用主要与鱼骨中释放的钙激活内源性转谷氨酸酰胺酶有关[8]。但是，目前关于鱼骨纳米化加工过程中钙的释放机制还不清楚。

不同鱼骨的原料特性不同，例如鲨鱼（软骨鱼）的胶原蛋白中三分之一为Ⅱ型胶原蛋白，而硬骨鱼（如白鲢和罗非鱼等）中的骨胶原蛋白主要为Ⅰ型胶原蛋白[9]；热带和温水鱼的骨胶原较冷水鱼稳定性高[10]，草鱼的骨胶原蛋白较其他淡水鱼的热稳定性和结构稳定性高[11]。鱼骨的原料性质差异可能影响纳米鱼骨的特性。白鲢、草鱼、鲴鱼和罗非鱼为硬骨鱼，是加工鱼糜或鱼片的主要淡水鱼种。鳕鱼为硬骨鱼，是加工鱼糜或鱼片的主要海水鱼种之一。而鲨鱼是软骨鱼，可用于加工鱼糜制品。鱼片和鱼糜加工过程中会产生大量的副产物鱼骨。因此，本课题选取白鲢、草鱼、鲴鱼、罗非鱼、鳕鱼和鲨鱼骨六种鱼骨为原料，采用高能湿法球磨的方法制备纳米骨液，分析原料性质差异对纳米化鱼骨特性的影响，以期为水产品副产物骨的纳米化加工与应用提供加工参数和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

白鲢鱼骨为鱼糜加工过程中经采肉后分离得到的脊骨，由荆州大明水产食品有限公司提供；鲴鱼、草鱼、罗非鱼、鳕鱼和鲨鱼鱼骨为鱼片加工过程中分离得到的脊骨，其中鲴鱼和草鱼骨由湖北德炎水产食品股份有限公司提供，罗非鱼骨由广西百洋水产集团股份有限公司提供，鳕鱼骨由浙江兴发水产有限公司提供，鲨鱼鱼骨购买于北海斯麦儿贸易有限公司。六种鱼脊骨经冰水漂洗后，于-18 ℃冻藏备用。所用化学试剂均为分析纯，由国药集团化学试剂有限公司提供。

### 1.2 主要仪器设备

ZM-100 型反压高温蒸煮锅，广州标际包装设备有限公司；JL-8 型立式绞肉机，北京市华联工业有限公司；MKCA6-2 型骨泥机，日本 MASUKO 公司；MINI ZETA 03E 湿法高能球磨机，德国耐驰仪器制造有限公司；Zetasizer Nano ZS 纳米粒度分析仪，英国马尔文公司；AA-6300C 原子吸收分光光度计，日本岛津；Mastersizer 3000 超高速智能粒度分析仪，英国马尔文公司；CR-400 型色差仪，日本柯尼卡美能达公司；NEXUS-470 型 FT-IR 红外光谱仪，美国梅特勒公司；H-7650 透射电镜日本 Hitachi 公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 纳米骨液的制备

冷冻鱼脊骨在流水下解冻，漂洗去除血污和部分脂肪，浸没于 3 倍重量的水中，在 120 ℃蒸煮 60 min，倾倒蒸煮液并多次采用热水漂洗，采用绞肉机粗破碎（筛板孔径为 3 mm），添加 1 倍质量的冰水后再用骨泥机破碎（转速 2000 r/min 和磨盘间隙 0.3 mm），加水调整鱼骨泥总固形物浓度为 5%（*m/m*），最后采用湿法高能球磨机纳米化粉碎（搅拌转速 3000 r/min、磨球填充率 85%和磨球直径 0.5 mm）。

#### 1.3.2 化学组成的测定

如 1.3.1 制备的鱼骨泥在 105 ℃干燥后，进行化学组成的测定：粗蛋白含量和灰分含量分别采用凯氏定氮法（GB 5009.5-2010）和灰化法（GB 5009.4-2010）测定；粗脂肪测定采用索氏抽提法（GB/T 14772-2008）；总钙和总磷测定分别采用原子吸收法（GB/T 9695.13-2009）和分光光度法（GB/T 9695.4-2009）；胶原蛋白含量测定采用羟脯氨酸法（GB/T 9695.23-2008），换算系数为 11.1。

#### 1.3.3 化学结构分析

如 1.3.1 制备的骨泥的化学结构分析参考 Boutinguiza 等的方法[12]。骨泥真空冷冻干燥后粉碎，与溴化钾（1:100）混合均匀并压成半透明薄片，用 FT-IR 红外光谱仪分析，波数扫描范围为 400~4000 $cm^{-1}$。扣除红外光谱背景，采用 OMNIC8.0 对酰胺 I 带（1600~1700 $cm^{-1}$）进行傅里叶红外自动去卷曲处理，并进行高斯拟合分峰。

#### 1.3.4 粒径的测定和微观形貌观察

如 1.3.1 制备的骨液中颗粒粒径的测定参照 Yin 等的方法[13]，并略作改动。测试前，加去离子水调整纳米骨液固形物质量浓度为 0.1%，加入六偏磷酸钠作为分散剂，分散剂质量浓度为 0.2%，接着在 100 W 功率下超声处理 10 min。粒径范围位于微米级的样品采用 Mastersizer 3000 超高速智能粒度分析仪测定，而粒径范围位于纳米级的样品采用 Zetasizer Nano 纳米粒度分析仪测定。纳米鱼骨的微观形貌参考 Yin 等[13]的方法采用 H-7650 透射电镜观察，悬液加去离子水稀释固形物浓度到 $10^{-4}$（*m/m*），超声波处理 15 min，滴加纳米鱼骨稀释液到表面渡碳的铜网上，自然干燥，最后在 120 kV 电压和亮场条件下观察。

### 1.3.5 钙释放度的测定

钙离子释放度的测定参考 Zhang 等的方法，并略作改动[14]。精确称取 10 g 骨液，置于 37 ℃恒温水浴摇床中，在 100 r/min 转速下振荡提取 3 h，接着在 4000 r/min 转速下离心 30 min，取上清液过滤，加去离子水定容和稀释。最后用原子吸收分光光度计测定稀释液中钙的含量。钙的释放度为测定的可溶性钙含量与骨液中总钙含量的比值（%）。

### 1.3.6 游离氨基酸、TCA 可溶性肽和水溶性蛋白含量的测定

称取 10 g 骨悬液，在 4000 r/min 转速下离心 30 min，取上清液过滤，加去离子水定容和稀释，采用茚三酮法测定游离氨基酸含量[15]，采用福林酚法测定水溶性蛋白含量[16]。称取 5 g 骨悬液，加入 5 mL 的 20% TCA，均质，静置 1 h 沉淀大分子蛋白，在 4000 r/min 转速下离心 30 min，取上清液过滤，定容和稀释，采用福林酚法测定上清液中的可溶性肽含量。

### 1.3.7 色度值的测定

样品置于 CM-A128 培养皿中，用色度仪测定 L、a*和 b*，测试前色度仪用标准白板校正。W（白度值）的计算公式如下：

$$W = 100 - \sqrt{(100-L)^2 + a^{*2} + b^{*2}}$$

## 1.4 数据处理

所有指标均重复测定 3 次。采用 Office 2007 和 Origin 9.0 作图，用 SAS V8.1 软件进行数据分析，采用 OMNIC 8.0 对红外图谱进行分析。

# 2 结果与讨论

## 2.1 化学组成

经过高温（120 ℃和 60 min）热处理后，不同鱼骨的化学组成如表 1 所示。六种鱼骨的蛋白质、粗脂肪、胶原蛋白、灰分、钙和磷含量存在显著性差异（$p$<0.05）。鲨鱼骨的蛋白质（31.97%）和胶原蛋白（24.09%）含量显著高于其它五种鱼骨（$p$<0.05），而灰分含量较低（$p$<0.05）。鳕鱼的灰分含量最高（82.83%）。六种鱼骨的脂肪含量为 1.17%~4.99%，四种淡水鱼鱼骨的脂肪含量显著高于两种海水鱼鱼骨（$p$<0.05），其中草鱼骨的脂肪含量最高。不同鱼骨的粗蛋白和脂肪含量较文献报道的低[4,17~19]，这是因为高温蒸煮和热水淘洗显著降低骨中的有机物含量。六种鱼骨的钙含量为 249.29 mg/g~294.98 mg/g，其中鳕鱼骨的钙含量相对最高，鲨鱼骨最低。不同鱼骨中的钙磷比例接近 2:1。

表 1 六种鱼骨的基本化学组成

**Table 1 Proximate composition of the six fish bone samples ( $\bar{x}\pm s$, $n$=3)**

| 名称 | 粗蛋白/% | 粗脂肪/% | 胶原蛋白/% | 灰分/% | Ca/(mg/g) | P/(mg/g) | Ca/P |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 鲢鱼 | 12.10±0.64$^{E}$ | 1.33±0.20$^{D}$ | 7.10±0.09$^{F}$ | 77.31±0.64$^{B}$ | 274.50±3.79$^{B}$ | 145.43±6.39$^{A}$ | 1.89:1 |
| 草鱼 | 16.79±0.62$^{C}$ | 4.99±0.34$^{A}$ | 11.13±0.50$^{D}$ | 70.84±0.87$^{D}$ | 255.07±2.52$^{C}$ | 120.59±4.04$^{C}$ | 2.11:1 |
| 鲫鱼 | 19.77±0.15$^{B}$ | 2.44±0.21$^{C}$ | 12.20±0.41$^{C}$ | 72.62±0.08$^{C}$ | 261.05±9.77$^{BC}$ | 130.66±4.11$^{B}$ | 1.99:1 |
| 罗非鱼 | 16.31±0.94$^{C}$ | 3.43±0.10$^{B}$ | 14.17±0.17$^{B}$ | 78.00±0.43$^{B}$ | 289.37±5.12$^{A}$ | 134.27±6.29$^{B}$ | 2.15:1 |
| 鳕鱼 | 14.82±0.26$^{D}$ | 1.03±0.21$^{D}$ | 8.73±0.14$^{E}$ | 82.83±0.36$^{A}$ | 294.98±5.69$^{A}$ | 153.48±5.77$^{A}$ | 1.92:1 |
| 鲨鱼 | 31.97±0.56$^{A}$ | 1.17±0.04$^{D}$ | 24.09±0.21$^{A}$ | 69.25±0.57$^{E}$ | 249.29±15.08$^{C}$ | 114.26±2.52$^{C}$ | 2.18:1 |

注：同列不同字母代表不同鱼骨之间有显著性差异（$p$<0.05）。

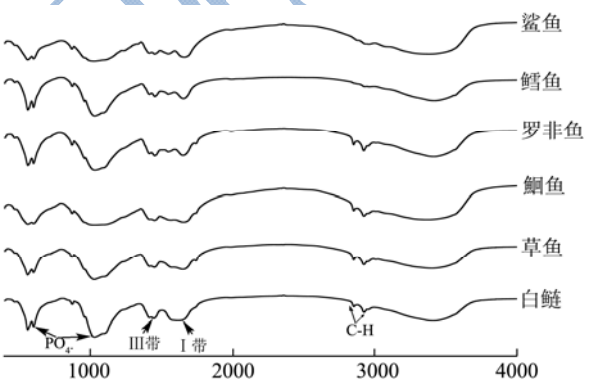



图 1 六种鱼骨的傅立叶红外光谱图

**Fig.1 FT-IR spectra of the six fish bone samples**

## 2.2 红外图谱分析

如图 1 所示，不同鱼骨样品均显示 $PO_4^{3-}$官能团的三个特征吸收峰位，分别为位于 1028 $cm^{-1}$ 的 $v_3$ 非对称伸缩振动峰，602 $cm^{-1}$ 的 $v_4$ 非对称弯曲振动峰以及 561 $cm^{-1}$ 的 $v2$ 对称弯曲振动峰[20]。1450 和 875 $cm^{-1}$ 处形成的峰为 $CO_3^{2-}$的吸收峰[21]。

六种骨的 $PO_4^{3-}$和 $CO_3^{2-}$官能团的特征吸收峰位置和强度无明显差异。2920 $cm^{-1}$ 左右和 2850 $cm^{-1}$ 左右的两个低强度峰为 $CH_2$ 基团伸缩振动峰，为酰胺 B 带[12]。与其他四种淡水鱼的红外光谱图相比，鳕鱼和鲨鱼骨的酰胺 B 带明显消失，这可能是由于鳕鱼和鲨鱼

骨中的小分子肽含量高（见表 3），干燥时易形成聚集体，有更多的羰基存在于聚集体内[22]。1600~1700 $cm^{-1}$ 为酰胺 I 带峰，与蛋白多肽骨架中羰基 C=O 基团的伸缩振动耦合 N-H 弯曲振动、CN 振动和 CCN 变形有关，是蛋白质二级结构变化的敏感区[23]。对酰胺 I 带进行高斯拟合处理的结果如表 2 所示，1610~1640 $cm^{-1}$ 为蛋白的 $\beta$-折叠，罗非鱼的 $\beta$-折叠含量最高；1650 $cm^{-1}$ 为无规则卷曲，其中鲨鱼骨的无规则卷曲含量最低，白鲢的含量最高；1670 $cm^{-1}$ 为 $\beta$-转角，鲨鱼骨的 $\beta$-转角含量最高，鲢鱼最小[24]；1690 $cm^{-1}$ 为胶原蛋白特有峰，其强度大小代表着胶原交联程度，鲨鱼骨的胶原交联最大，罗非鱼的胶原交联最小[25]。1540~1600 $cm^{-1}$ 为酰胺 II 带峰，与蛋白的 N-H 弯曲振动和 C-N 伸缩振动有关[26]。1240~1450 $cm^{-1}$ 为酰胺III带峰，是胶原蛋白特有的特征吸收峰，与三股螺旋结构有关[27]。

表 2 酰胺 I 带拟合六种鱼骨的蛋白二级结构

**Table 2 Fitting results of secondary protein structure of the six fish bone samples by amide I band**

| | 白鲢 | 草鱼 | 罗非鱼 |
|---|---|---|---|
| $\beta$-折叠 | 1612/1632(27.36±0.68$^{b}$) | 1612/1632(29.15±0.78$^{b}$) | 1614/1638(30.88±1.16$^{a}$) |
| 无规则卷曲 | 1652(25.37±0.34$^{a}$) | 1652(19.91±1.25$^{b}$) | 1652(20.56±1.15$^{b}$) |
| $\beta$-转角 | 1671(22.41±0.03$^{c}$) | 1671(25.81±1.38$^{ab}$) | 1672(24.68±0.32$^{bc}$) |
| 胶原交联 | 1690(24.86±0.37$^{cd}$) | 1690(25.13±0.65$^{c}$) | 1690(23.88±0.32$^{d}$) |
| | 鲴鲴鱼 | 鲨鱼 | 鳙鱼 |
| $\beta$-折叠 | 1612/1635(26.03±0.97$^{b}$) | 1615/1633(23.55±0.39$^{b}$) | 1612/1634(29.19±0.05$^{b}$) |
| 无规则卷曲 | 1657(19.33±2.07$^{b}$) | 1650(17.06±1.07$^{b}$) | 1654(20.08±2.75$^{b}$) |
| $\beta$-转角 | 1673(27.38±1.81$^{ab}$) | 1668(28.02±1.25$^{a}$) | 1671(26.03±2.14$^{ab}$) |
| 胶原交联 | 1691(27.26±0.66$^{b}$) | 1689(31.37±0.33$^{a}$) | 1689(24.70±0.55$^{cd}$) |

注：同列不同字母代表不同鱼骨之间有显著性差异（$p$<0.05），下同。

## 2.3 粒径分布和微观形貌观察

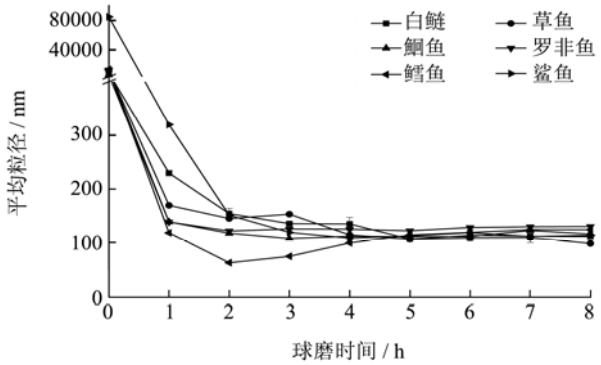
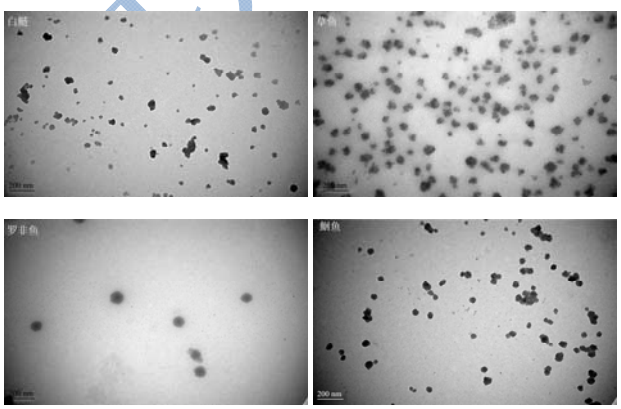



图 2 球磨过程中六种鱼骨的平均颗粒粒径

**Fig.2 Average particle size of the six fish bone samples during the milling process**



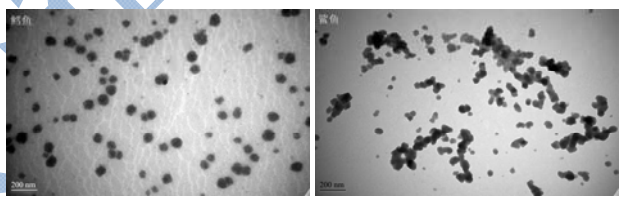


图 3 球磨 6 h 制备的六种纳米鱼骨颗粒的透射电镜图

**Fig.3 TEM images of particles of the six fish bone samples with 6 h of milling**

高能湿法球磨过程中，不同鱼骨的平均粒径变化如图 2 所示。白鲢、草鱼、罗非鱼、鲴鱼、鳙鱼和鲨鱼骨在球磨前的初始平均粒径分别为 9.26 μm、12.65 μm、13.25 μm、6.40 μm、13.76 μm 和 85.41 μm。在球磨初期，六种鱼骨粒径急剧减小（$p$<0.05）；球磨 2 h 后，粒度均值分别降至 195.22 nm、145.22 nm、122.00 nm、127.60 nm、62.85 nm 和 259.12 nm；继续延长球磨时间，五种鱼骨的平均粒径缓慢变小，而鳙鱼骨粒径逐渐增加；在球磨 5 h 后，六种鱼骨的粒径保持稳定，分别为 106.37 nm、116.93 nm、122.45 nm、116.85 nm、114.52 nm 和 172.37 nm。在天然的鱼骨中，矿物质嵌入胶原蛋白纤维网络结构中，形成的有机物-无机物复合结构使骨同时具有较高的韧性和硬度，可以有效地抵抗一定外力对骨的破坏，一般而言，胶原蛋白含量越高的骨应变能力更强，较难被破碎[28]。球磨前 4 h，不同鱼骨颗粒粒径存在显著差异，其中鳙鱼骨的

颗粒粒径最小，这可能与鳕鱼骨的灰分含量较高、胶原蛋白含量较少且球磨过程中降解程度较高（见表 3）有关。鲨鱼骨颗粒粒径在球磨前 4 h 较大，这可能是因为鲨鱼骨胶原蛋白含量较高（见表 1），胶原交联程度高（见表 2），因此鲨鱼骨应变能力较强，不易被破碎。球磨 5~6 h，不同鱼骨的颗粒粒径无显著差异（$p$>0.05）。随着球磨时间延长，鳕鱼和罗非鱼骨颗粒团聚现象较为严重，其粒径略大于其他鱼骨的颗粒粒径，这可能和不同鱼骨的胶原蛋白的非螺旋端肽含量有关，端肽可以有效阻止胶原蛋白聚集组装[29]。

不同纳米鱼骨的 TEM 图如 3 所示，纳米鱼骨颗粒近似圆球形，且颗粒大小分布均匀。根据 TEM 图计算出白鲢、草鱼、鲴鱼、罗非鱼、鳕鱼和鲨鱼骨颗粒的平均粒径分别为 97.03 nm、80.10 nm、61.20 nm、107.31 nm、69.45 nm 和 79.26 nm，略小于 Nano ZS90 测定的粒径大小，这是因为 Nano ZS90 测定的为颗粒的水合直径，其值大于实际颗粒直径。

## 2.4 钙离子释放率

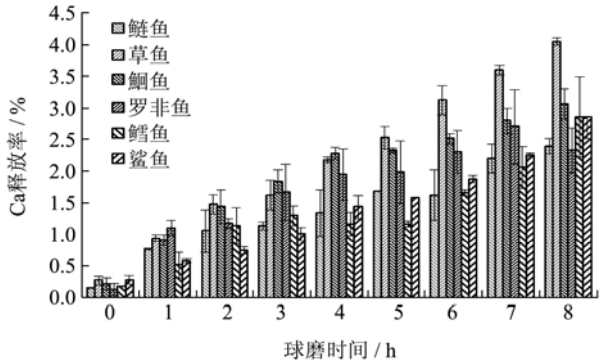



图 4 球磨过程中六种纳米鱼骨的钙释放率

**Fig.4 Release percentage of calcium from the six fish bone samples during the milling process**

不同球磨时间的六种纳米骨液的钙释放率如图 4 所示。未球磨的六种鱼骨的钙释放率分别为 0.16%（白鲢）、0.28%（草鱼）、0.22%（鲴鱼）、0.14%（罗非鱼）、0.18%（鳕鱼）和 0.29%（鲨鱼）。原料鱼骨中的钙主要以溶解度低的羟基磷灰石晶体形式存在，且羟基磷灰石晶体嵌入胶原蛋白纤维网络的孔隙中，难以与水接触，造成未球磨的鱼骨液中的钙释放率较低。六种鱼骨的粒径在球磨 2 h 后趋于稳定，而钙释放率随着时间延长而一直显著增加（$p$<0.05）。球磨前期（<2 h），在磨球间的碰撞和剪切作用下，鱼骨颗粒比表面积增加，鱼骨胶原纤维和羟基磷灰石结晶结构破坏[17]，有利于鱼骨中的钙与水接触并释放。延长球磨时间，鱼骨胶原纤维降解生成的小分子肽和氨基酸等（表 3）可能螯合钙离子，促进鱼骨中钙的进一步释放。球磨过程中，草鱼、鲴鱼和罗非鱼骨的钙释放率相对较高。球磨 6 h 后，草鱼骨的钙释放率显著高于其它五种鱼骨，其钙释放率在 8 h 为 4.07%。关于球磨过程中鱼骨钙和多肽/氨基酸的作用机制有待于进一步研究。

## 2.5 游离氨基酸、TCA 可性溶性肽和水溶性蛋白含量

如表 3 所示，在球磨过程中，六种鱼骨液的游离氨基酸、TCA 可性溶性肽和水溶性含量显著增加（$p$<0.05）。Wu 等发现超微粉碎鲢鱼骨粉可以显著提高其蛋白质的溶出率，这与本文的结论相一致[6]。球磨过程中，蛋白分子之间化学键被破坏，生成小分子片段。一些难溶难消化的蛋白质，经过球磨，其理化性质和形貌特性发生变化，可以增加其溶解性和消化性[30]。球磨前鳕鱼的游离氨基酸和小肽含量相对较高，这可能与鳕鱼骨中蛋白的热稳定性有关。罗非鱼、草鱼和白鲢鱼骨液的游离氨基酸增加较多，鲨鱼骨悬液的 TCA 可性溶性肽和水溶性蛋白含量增加较多。不同鱼骨液中游离氨基酸、TCA 可性溶性肽和水溶性蛋白的差异可能与原料骨的组成和蛋白质特性有关。蛋白质在球磨过程中降解生成小肽和氨基酸可能是引起钙释放率在骨颗粒粒径稳定后继续增加的主要原因。已有文献报道，氨基酸在碱性介质中，受剧烈的外界条件影响，其两侧的羧基和氨基能与金属离子联结形成螯合物，其稳定常数可高达 $10^7$~$10^{12}$ [31]。

表 3 球磨过程中六种纳米鱼骨的游离氨基酸、TCA 可性溶性肽和水溶性蛋白含量

**Table 3 Free amino acid, TCA-soluble peptide, and water-soluble protein contents of the six fish bone samples during the milling process ( $\bar{x}\pm s$, $n$=3)**

| | 球磨时间/h | 白鲢 | 草鱼 | 鲴鱼 | 罗非鱼 | 鳕鱼 | 鲨鱼 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 游离氨基酸 /(μg/g) | 0 | 30.43±2.01$^{Df}$ | 28.76±1.55$^{Df}$ | 80.48±1.85$^{Ce}$ | 25.25±2.53$^{De}$ | 168.36±3.42$^{Be}$ | 251.08±2.62$^{Ad}$ |
| | 1 | 55.11±2.34$^{Ee}$ | 52.72±3.03$^{Ee}$ | 94.16±4.86$^{Ce}$ | 76.44±6.03$^{Dd}$ | 140.51±4.60$^{Bf}$ | 247.84±9.17$^{Ad}$ |
| | 2 | 93.19±9.14$^{Dd}$ | 66.03±0.57$^{Ed}$ | 125.02±1.07$^{Cd}$ | 110.30±0.94$^{CDc}$ | 155.52±11.91$^{Bef}$ | 196.60±15.06$^{Ae}$ |
| | 3 | 90.37±6.55$^{Dd}$ | 89.12±2.78$^{Dc}$ | 141.41±1.46$^{Bc}$ | 114.59±3.70$^{CDc}$ | 171.19±7.67$^{Ae}$ | 175.35±10.64$^{Ae}$ |

转下页

接上页

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 4 | 96.19±5.02$^{CDd}$ | 85.50±4.50$^{Dc}$ | 166.84±13.61$^{Bb}$ | 106.70±5.86$^{CDc}$ | 230.36±4.42$^{Ad}$ | 228.11±6.68$^{Ad}$ |
| | 5 | 107.82±3.07$^{Dc}$ | 105.11±4.6$^{Cb}$ | 162.89±8.50$^{Bb}$ | 135.96±10.11$^{CDb}$ | 260.17±9.14$^{Abc}$ | 248.36±0.41$^{Ad}$ |
| | 6 | 111.66±0.14$^{Ebc}$ | 116.03±6.75$^{Ea}$ | 192.10±7.05$^{Ca}$ | 147.31±14.41$^{Db}$ | 266.52±9.88$^{Bbc}$ | 301.99±7.23$^{Ac}$ |
| | 7 | 122.80±7.53$^{Dbc}$ | 122.83±4.09$^{Da}$ | 208.25±11.18$^{Ba}$ | 183.30±1.35$^{Ca}$ | 309.89±2.80$^{Aa}$ | 326.77±19.64$^{Ab}$ |
| | 8 | 159.66±1.39$^{Ea}$ | 119.79±0.61$^{Fa}$ | 193.56±1.58$^{Ca}$ | 175.30±3.35$^{Da}$ | 244.68±13.14$^{Bcd}$ | 387.5±5.89$^{Aa}$ |
| TCA 可溶肽 /(mg/g) | 0 | 2.08±0.73$^{ABb}$ | 1.73±0.10$^{Bf}$ | 2.16±0.04$^{ABf}$ | 0.73±0.05$^{Ce}$ | 2.63±0.05$^{Ac}$ | 2.80±0.20$^{Ad}$ |
| | 1 | 2.66±0.01$^{CDab}$ | 2.99±0.55$^{CDe}$ | 3.12±0.12$^{Ce}$ | 2.30±0.17$^{Dd}$ | 4.97±0.11$^{Bb}$ | 6.40±0.43$^{Ac}$ |
| | 2 | 3.00±0.26$^{Da}$ | 3.62±0.01$^{Cde}$ | 3.64±0.18$^{Cd}$ | 3.28±0.01$^{CDc}$ | 5.15±0.11$^{Bb}$ | 7.21±0.29$^{Ab}$ |
| | 3 | 3.14±0.03$^{Da}$ | 4.35±0.09$^{Cbcd}$ | 4.15±0.07$^{Cc}$ | 4.06±0.20$^{Cab}$ | 5.13±0.48$^{Ba}$ | 8.49±0.11$^{Aa}$ |
| | 4 | 3.32±0.06$^{Da}$ | 4.11±0.44$^{Ccd}$ | 4.25±0.07$^{Cbc}$ | 4.00±0.03$^{Cb}$ | 6.22±0.08$^{Ba}$ | 8.94±0.49$^{Aa}$ |
| | 5 | 3.29±0.12$^{Ea}$ | 4.95±0.33$^{Cab}$ | 4.46±0.19$^{CDab}$ | 4.24±0.18$^{Dab}$ | 6.23±0.10$^{Ba}$ | 8.99±0.38$^{Aa}$ |
| | 6 | 3.38±0.18$^{Da}$ | 5.05±0.52$^{Ca}$ | 4.63±0.05$^{Ca}$ | 4.48±0.32$^{Cb}$ | 6.22±0.10$^{Ba}$ | 9.09±0.03$^{Aa}$ |
| | 7 | 3.45±0.09$^{Ea}$ | 5.33±0.28$^{Ca}$ | 4.70±0.23$^{Da}$ | 4.73±0.20$^{Dab}$ | 6.36±0.32$^{Ba}$ | 9.16±0.04$^{Aa}$ |
| | 8 | 2.89±0.68$^{Dab}$ | 4.74±0.04$^{Ca}$ | 4.73±0.04$^{Ca}$ | 4.43±0.70$^{Cab}$ | 6.54±0.52$^{Ba}$ | 8.94±0.36$^{Aa}$ |
| 水溶性蛋白 /(mg/g) | 0 | 1.25±0.02$^{Be}$ | 0.95±0.07$^{Cf}$ | 1.51±0.04$^{Ae}$ | 0.28±0.03$^{Dc}$ | 1.37±0.11$^{ABc}$ | 1.51±0.14$^{Ad}$ |
| | 1 | 1.74±0.07$^{BCd}$ | 1.64±0.08$^{Be}$ | 2.23±0.06$^{Bd}$ | 1.45±0.47$^{Cbc}$ | 4.19±0.3$^{Ab}$ | 4.20±0.26$^{Ac}$ |
| | 2 | 2.30±0.06$^{Dc}$ | 1.81±0.01$^{Ede}$ | 2.91±0.05$^{Cc}$ | 2.01±0.34$^{DEab}$ | 4.37±0.30$^{Bb}$ | 5.58±0.09$^{Ab}$ |
| | 3 | 2.63±0.01$^{CDb}$ | 2.18±0.05$^{Dbc}$ | 3.39±0.31$^{Cbc}$ | 2.14±0.59$^{Dab}$ | 4.41±0.14$^{Bb}$ | 5.57±0.55$^{Ab}$ |
| | 4 | 2.70±0.17$^{Db}$ | 2.06±0.22$^{DEcd}$ | 3.58±0.09$^{Cab}$ | 1.73±0.66$^{Eab}$ | 5.53±0.17$^{Ba}$ | 6.38±0.27$^{Aa}$ |
| | 5 | 2.87±0.09$^{Dab}$ | 2.48±0.16$^{Eab}$ | 3.58±0.20$^{Cab}$ | 2.21±0.22$^{Eab}$ | 5.53±0.07$^{Ba}$ | 6.36±0.04$^{Aa}$ |
| | 6 | 2.82±0.01$^{Dab}$ | 2.52±0.26$^{Da}$ | 4.06±0.58$^{Ca}$ | 2.43±0.42$^{Dab}$ | 5.39±0.20$^{Ba}$ | 6.83±0.09$^{Aa}$ |
| | 7 | 3.07±0.15$^{BCa}$ | 2.67±0.14$^{Ca}$ | 4.08±0.34$^{Ba}$ | 2.81±0.73$^{Cab}$ | 5.51±0.06$^{Aa}$ | 6.42±0.64$^{Aa}$ |
| | 8 | 3.09±0.22$^{CDa}$ | 2.37±0.02$^{Dabc}$ | 4.00±0.21$^{BCab}$ | 3.06±0.98$^{CDa}$ | 4.46±0.75$^{Bb}$ | 7.02±0.24$^{Aa}$ |

注：同列不同大写字母代表不同鱼骨之间有显著性差异（$p$<0.05），不同小写字母代表不同球磨时间样品之间有显著性差异。

## 2.6 pH 值

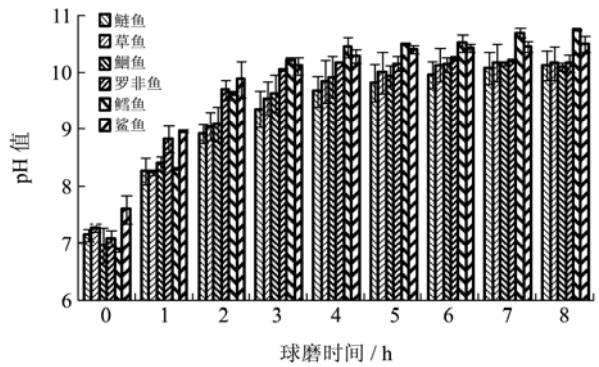



图 5 球磨过程中六种骨液样品的 pH 值

**Fig.5 pH values of the six fish bone samples during the milling process**

球磨过程中，不同鱼骨的纳米悬液的 pH 值变化如图 5 所示。未经球磨的不同骨液为弱碱性，pH 值之间无显著差异（$p$>0.05）。球磨过程中，不同鱼骨悬液的 pH 值随着粒径的降低而显著增加（$p$<0.05），在粒径趋于稳定后无明显变化（$p$>0.05）。球磨过程中 pH 值的增加可能是与水中的质子不断置换颗粒表面的金属阳离子（$Ca^{2+}$、$Na^{+}$和 $Mg^{2+}$等）有关。Yin 等报道在湿法球磨鱼骨过程中，纳米颗粒表面的 Ca/P 显著降低，说明以羟基磷灰石形态存在的 Ca 释放到水中[8]。另一方面，球磨过程中 pH 值的增加也可能与骨胶原蛋白的降解和碱性氨基酸基团暴露有关。球磨过程中鳕鱼和鲨鱼的纳米骨液 pH 值高于其他四种鱼骨，这可能和鳕鱼和鲨鱼骨球磨过程中生成更多的水溶性蛋白和游离氨基酸有关（见表 3）。

## 2.7 色度

不同纳米鱼骨液的色度变化见图 6。随球磨时间的增加，不同鱼骨液的 L 值（明度）、a*值（红色）和 W 值（白度）均先增加（$p$<0.05）后保持稳定（$p$>0.05）。Christidis 认为颗粒在研磨过程中的 L 值显著增加与颗粒表面变平滑，颗粒的微晶数增加有关[32]。罗非鱼和鳕鱼骨液的白度较高，鲨鱼骨液的白度最低，这可能与鲨鱼骨中有机物含量较高有关。骨中有机物含量越少，颜色越白，相反亦然[33]。纳米鱼骨液与未球磨骨液相比，具有较高的 L 值和 W 值，添加到鱼肉、面粉和米粉等底色为白色的食品中，对产

品的感官品质影响较小。

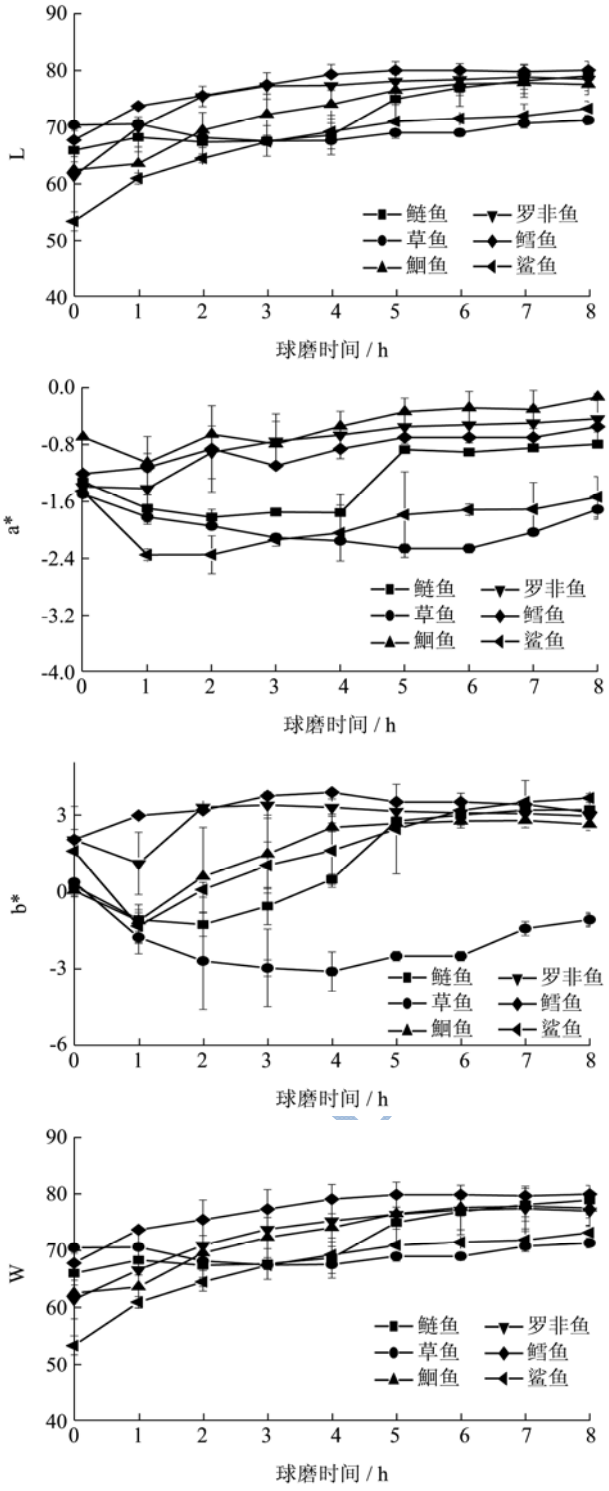



图 6 球磨过程中六种鱼骨液的色度参数

**Fig.6 Color parameters of the six fish bone samples during the milling process**

## 3 结论

3.1 球磨过程中，鱼骨颗粒的粒径、骨液的 pH 和骨液的白度值随着时间的延长先增加后保持稳定，而鱼骨钙的释放率随球磨时间的延长而一直增加。鱼骨钙的释放机制与鱼骨粒径降低和生成多肽/氨基酸螯合钙有关。

3.2 鱼骨的纳米化加工过程及其制品的特性受到鱼骨原料性质差异的影响。鳕鱼骨无机物含量高，较易破碎，极限粒径小；而鲨鱼骨的有机物含量较高和胶原交联程度较高，难以破碎；罗非鱼和鳕鱼骨液的白度较高，鲨鱼骨液的白度最低；鳕鱼和鲨鱼骨液的 pH 值相对较高；草鱼骨液的钙释放率最高。

3.3 湿法高能球磨作为一种新型的超微粉碎技术，可以用于制备纳米鱼骨液，有效促进鱼骨中蛋白质和钙等营养物质的溶出。制备的纳米鱼骨液为弱碱性，pH 值约 10.0；除鳕鱼骨外，鱼骨颗粒的极限平均粒径约为 110 nm；纳米鱼骨颗粒外观为近似圆球形。

## 参考文献

[1] Faostat. The state of world fisheries and aquaculture [J]. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2016

[2] Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) [J]. Food Chemistry, 2005, 89(3): 363-372

[3] Olsen R L, Toppe J, Karunasagar I. Challenges and realistic opportunities in the use of by products from processing of fish and shellfish [J]. Trends in Food Science & Technology, 2014, 36(2): 144-151

[4] Toppe J, Albrektsen S, Hope B, et al. Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species [J]. Comparative Biochemistry & Physiology Part B Biochemistry & Molecular Biology, 2007, 146(3): 395-401

[5] Olszta M J, Cheng X, Sang S J, et al. Bone structure and formation: A new perspective [J]. Materials Science & Engineering R Reports, 2007, 58(3-5): 77-116

[6] Wu G C, Min Z, Wang Y Q, et al. Production of silver carp bone powder using superfine grinding technology: Suitable production parameters and its properties [J]. Journal of Food Engineering, 2012, 109(4): 730-735

[7] 谢雯雯,尹涛,张晋,等.鱼骨粉粒径对鱼骨粉-鱼蛋白酶解物混合物中钙生物利用率的影响[J].食品科学,2014,35(7): 211-216

XIE Wen-wen, YIN Tao, ZHANG Jin, et al. Effects of fish bone powder particle size on calcium bioavailability of fish bone powder fish protein hydrolysate mixture [J]. Food Science, 2014, 35(7): 211-216

[8] Yin T, Park J W. Textural and rheological properties of Pacific whiting surimi as affected by nano-scaled fish bone and heating rates [J]. Food Chemistry, 2015, 180: 42-47

[9] Rama S, Chandrakasan G. Distribution of different molecular species of collagen in the vertebral cartilage of shark (*Carcharius acutus*). [J]. Connective Tissue Research, 1984, 12(2): 111-118

[10] Li Z R, Wang B, Chi C F, et al. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorous niphonius*) [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 31(1): 103-113

[11] Wang H, Liang Y, Zhang H. Physical-chemical properties of collagens from skin, scale, and bone of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2013, 23(3): 264-277

[12] Boutinguiza M, Pou J, Comesaña R, et al. Biological hydroxyapatite obtained from fish bones [J]. Materials Science & Engineering C, 2012, 32(3): 478-486

[13] Yin T, Park J W, Xiong S B. Physicochemical properties of nano fish bone prepared by wet media milling [J]. LWT-Food Science & Technology, 2015, 64(1): 367-373

[14] Zhang J, Yin T, Xiong S B, et al. Thermal treatments affect breakage kinetics and calcium release of fish bone particles during high energy wet ball milling [J]. Journal of Food Engineering, 2016, 183: 74-80

[15] 赵新淮,冯志彪.蛋白质水解物水解度的测定[J].食品科学,1994,15(11):65-67
ZHAO Xin-huai, FENG Zhi-biao. Determination of degree of hydrolysis of protein hydrolysate [J]. Food Science, 1994, 15(11): 65-67

[16] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265-275

[17] Yin T, Du H, Zhang J, et al. Preparation and characterization of ultrafine fish bone powder [J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2016, 25(7): 1045-1055

[18] Liu H Y, Han J, Guo S D. Characteristics of the gelatin extracted from channel catfish (*Ictalurus Punctatus*) head bones [J]. Food Science & Technology, 2009, 42(2): 540-544

[19] 马国红,张延华,王爱英,等.几种常见鱼类鱼鳞、鱼骨成分分析[J].山东师范大学学报:自然科学版,2013,28(4):137-139
MA Guo-hong, ZHANG Yan-hua, WANG Ai-ying, et al. The composition analysis of several common fish scales and fishbone [J]. Journal of Shandong Normal University (Natural Science), 2013, 28(4): 137-139

[20] Bonadio T G M, Sato F, Medina A N, et al. Bioactivity and structural properties of nanostructured bulk composites containing $Nb_2O_5$ and natural hydroxyapatite [J]. Journal of Applied Physics, 2013, 113(22): 2235051-2235058

[21] D'elían L, Gravina A N, Ruso J M, et al. Manipulating the bioactivity of hydroxyapatite nano-rods structured networks: effects on mineral coating morphology and growth kinetic [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2013, 1830(11): 5014-5026

[22] Muyonga J H, Cole C G B, Duodu K G. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*) [J]. Food Chemistry, 2004, 86(3): 325-332

[23] Bandekar J. Amide modes and protein conformation [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 1992, 1120(2): 123-143

[24] Farrell H M, Wickham E D, Unruh J J, et al. Secondary structural studies of bovine caseins: temperature dependence of *β*-casein structure as analyzed by circular dichoism and FT-IR spectroscopy and correlation with micellization [J]. Food Hydrocolloids, 2001, 15(4-6): 341-354

[25] Paschalis E P, Verdelis K, Doty S B, et al. Spectroscopic characterization of collagen cross links in bone [J]. Journal of Bone & Mineral Research, 2001, 16(10): 1821-1828

[26] Krimm S, Bandekar J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins [J]. Advances in Protein Chemistry, 1986, 38(2): 181-364

[27] Plepis A M D G, Goissis G, Das-Gupta D K. Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen [J]. Polymer Engineering & Science, 1996, 36(24): 2932-2938

[28] Ji B, Gao H. A Study of fracture mechanisms in biological nano-composites via the virtual internal bond model [J]. Materials Science & Engineering: A, 2004, 366(1): 96-103

[29] Silver F H, Freeman J W, Seehra, G P. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties [J]. Journal of Biomechanics, 2003, 36(10): 1529-1553

[30] Zhang W, Zhang X, Liang M, et al. Mechanochemical preparation of surface-acetylated cellulose powder to enhance mechanical properties of cellulose-filler-reinforced NR vulcanizates [J]. Composites Science & Technology, 2008, 68(12): 2479-2484

[31] 陈睿妍,黄雨苏.氨基酸螯合钙的研制[J].中国药业,2004,13(10):51

CHEN Rui-yan, HUANG Yu-sun. Preparation of amino acid chelated calcium [J]. China Pharmaceuticals, 2004, 13(10): 51

[32] Christidis G E, Makri P, Perdikatsis V. Influence of grinding on the structure and colour properties of talc, bentonite and calcite white fillers [J]. Clay Minerals, 2004, 39(2): 163-175

[33] Hemung B O. Properties of tilapia bone powder and its calcium bioavailability based on transglutaminase assay [J]. International Journal of Bioscience Biochemistry & Bioinformatics, 2013, 3(4): 306-309

现代食品科技