密级: 论文编号:

中国农业科学院

学位论文

牦牛骨粉制备及其抗骨质疏松活性研究

Study on the Preparation of Yak Bone Powder and Its Anti-Osteoporosis Activity

硕士研究生： 秦晓洁

指 导 教 师： 张春晖

申请学位类别： 工学硕士

专 业： 农产品加工及贮藏工程

研 究 方 向： 畜产品加工理论与技术

培 养 单 位： 农产品加工研究所

研究生院

2019 年 5 月

密级: 论文编号:

中国农业科学院

学位论文

牦牛骨粉制备及其抗骨质疏松活性研究

Study on the Preparation of Yak Bone Powder and Its Anti-Osteoporosis Activity

硕士研究生： 秦晓洁

指 导 教 师： 张春晖

申请学位类别： 工学硕士

专 业： 农产品加工及贮藏工程

研 究 方 向： 畜产品加工理论与技术

培 养 单 位： 农产品加工研究所

研究生院

2019 年 5 月

Secrecy: No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation

Study on the Preparation of Yak Bone Powder and Its Anti-Osteoporosis Activity

M.S. Candidate: Xiaojie Qin

Supervisor: Chunhui Zhang

Major: Agricultural product processing and storage project

Specialty: Theory and technology of animal products processing

May 2019

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：秦晓洁　　时间：2019 年 5 月 30 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

研究生签名：秦晓洁　　时间：2019 年 5 月 30 日

导师签名：　　时间：2019 年 5 月 30 日

中国农业科学院

硕士学位论文评阅人、答辩委员会签名表

论文题目	牦牛骨粉制备及其抗骨质疏松活性研究				
论文作者	秦晓洁	专　业	农产品加工及贮藏工程	研究方向	畜产品加工理论与技术
指导教师	张春晖		培养单位（研究所）	农产品加工研究所	

姓名		职称	硕（博）导师	单　位	专　业	签名
评阅人		教授	硕导□ 博导□			
		教授	硕导□ 博导□			
答辩主席	景浩	教授	硕导□ 博导☑	中国农业大学食品科学与营养工程学院	营养与食品安全	景浩
答辩委员	景浩	教授	硕导□ 博导☑	中国农业大学食品科学与营养工程学院	营养与食品安全	景浩
	尹靖东	教授	硕导□ 博导☑	中国农业大学动物科技学院	动物分子营养与遗传方向	尹靖东
	宋焕禄	教授	硕导□ 博导☑	北京工商大学食品学院	食品科学	宋焕禄
	汤晓艳	研究员	硕导☑ 博导□	中国农业科学院质量标准与检测技术研究所	食品科学	汤晓艳
	莫海珍	教授	硕导□ 博导☑	河南科技学院食品学院	农产品加工与贮藏	莫海珍

会议记录（秘书）	王航
论文答辩时间地点	时间：2019 年 5 月 25 日　上午 8:00 地点：中国农业科学院农产品加工研究所科研 8 号楼会议室

摘 要

随着我国逐渐进入老龄化社会，骨质疏松症发病率不断攀升。目前防治骨质疏松的研究主要集中在药物治疗上，往往忽视了对机体整体代谢的调整，普遍具有一定副作用。因此，寻找能防治骨质疏松、副作用小的功能食品具有重要意义。本课题旨在优化牦牛骨粉制备工艺，并基于体外模拟胃肠道消化模型和骨质疏松动物模型探究粒径对牦牛骨粉消化特性及其抗骨质疏松活性的影响，可为今后开发高活性牦牛骨源功能食品提供理论和技术支撑。

本文首先对牦牛骨脱脂工艺进行了优化分析。为提高脱脂率，以青海牦牛股骨为原料进行超声辅助有机溶剂脱脂参数优化，并比较分析了超声脱脂法和蒸煮脱脂法对骨粉制备的影响。结果显示：乙酸乙酯为最佳脱脂溶剂；超声功率 500 W，超声时间 30 min，液料比（v : m）6 为最佳脱脂参数，脱脂率可达 92.00%，显著高于蒸煮脱脂法（71.25%）（$P < 0.01$）；与蒸煮脱脂法相比，超声脱脂法蛋白质流失率、矿物质流失率显著降低（$P < 0.05$），且钙离子释放度不存在显著差异（$P > 0.05$）。超声波辅助有机溶剂脱脂处理制备骨粉可更多保留骨中营养物质，对改善骨粉加工工艺及提高骨粉品质具有一定参考价值。

其次，本文探究了不同中值粒径（19.92 μm、49.94 μm、76.65 μm、96.73 μm、128.37 μm）牦牛全骨粉的理化特性和消化特性。结果显示，不同粒径骨粉的基本营养成分（蛋白质、脂肪、水分、灰分）、总氨基酸、羟脯氨酸以及矿物质含量皆无显著差异（$P > 0.05$）。但随粒径减小，骨粉的亮度增大、持水力和蛋白质溶解能力越强。通过体外消化系统对不同粒径骨粉进行研究发现，随粒径减小，骨粉蛋白质消化率呈上升趋势，其中 D_{50} 为 19.92 μm 的骨粉经肠部消化后蛋白质消化率可达 28.53%，显著优于其它大粒径骨粉 ($P < 0.05$)；各消化产物中氨基酸含量不同，并皆随骨粉粒径减小而增大，其中酪氨酸（Tyr）、苯丙氨酸（Phe）、赖氨酸（Lys）、精氨酸（Arg）含量最高。然而，随着骨粉粒径减小，分子量小于 0.5 kDa 的肽段相对含量及钙磷释放度皆逐渐降低，其中骨粉钙、磷释放度分别为 3.27～3.84 mg/g、1.34～1.65 mg/g。综上，粒径不会导致骨粉中基本成分发生改变，但随着粒径减小，骨粉表现出较好的理化特性，且其蛋白质消化率以及氨基酸游离度逐渐呈现更佳状态，但小分子量肽段相对含量、钙磷释放度随之降低。

为进一步确定不同粒径牦牛骨粉的抗骨质疏松活性，本文利用 3 种中值粒径（19.92 μm，76.65 μm，128.37 μm）牦牛骨粉饲喂骨质疏松模型大鼠。结果显示，牦牛骨粉饲喂组大鼠的钙、磷表观吸收率分别可达 53.37～55.12%、55.26～58.51%；与模型组相比，牦牛骨粉可显著增加大鼠血清中骨钙素、碱性磷酸酶和抗酒石酸酸性磷酸酶的含量（$P < 0.05$），但骨密度和骨小梁等指标没有统计学意义，并且在所选粒径范围内，粒径差异未对其产生显著影响（$P > 0.05$）。综上，牦牛骨粉在一定程度上表现出抗骨质疏松活性，但在所选粒径范围（19.92～128.37 μm）内，粒径差异未导致其功能差异。

关键词：牦牛，骨粉，粒径，体外消化，骨质疏松

Abstract

With the development of aging society, the incidence of osteoporosis is rising. At present, the research on prevention and cure of osteoporosis mainly focuses on drug treatment, ignoring the adjustment of the overall metabolic state of the body, which generally has some side effects. Therefore, it is of great significance to find some bioactive substances with little by-effects which can well prevent osteoporosis. The research purpose is to study the effect of yak bone powder with different particle sizes on physicochemical and digestive characteristics alone with anti-osteoporosis. Finally, the optimal particle size and mechanism of yak bone powder for anti-osteoporosis will be verified, which can also provide theoretical and technical support for the future development of functional food with high-activity from yak bone.

In order to reduce the degreasing rate and improve the quality of yak bone powder, the ultrasonic assisted organic solvent degreasing method was investigated based on the thighbone of Qinghai yak in this paper, and the nutrient contents and physicochemical properties were analyzed comparing with the traditional boiling degreasing method. Results suggested that ethyl acetate was the optimal degreasing solvent with optimum degreasing conditions as follows: ultrasonic power is 500 W; ultrasonic time is 30min; the ratio of liquid to material (v : m) is 6, under which condition the degreasing rate could reach 92.00%, while that of boiling method is just 71.25%. Meanwhile, the loss rate of protein and collagen were 8.11%, 11.05%, respectively, which were dramatically lower ($P < 0.05$). And there was a serious loss of Na, K, Fe and Mn in cooked yak bone while the loss about Fe, Zn, Mn in ultrasonic skimmed yak bone was slightly. Moreover, no significant difference had been observed about the chemical structure and calcium release of bone powder ($P > 0.05$). In conclusion, the ultrasonic assisted organic solvent degreasing method could remain more nutrients with the higher degreasing rate.

Secondly, the effect of different median particle sizes (19.92 μm, 49.94 μm, 76.65 μm, 96.73 μm and 128.37 μm) on both physicochemical and digestive characteristics of yak bone powder were investigated. The results showed that there were no significant differences in the contents of basic nutrients (protein, fat, water, ash and carbohydrate), total amino acids, hydroxyproline and minerals in bone meal with different particle sizes ($P > 0.05$). Besides, different particle sizes made no contribution to the chemical structure change based on the fourier transform infrared spectroscopy. However, the brightness, protein solubility and water holding capacity were enhanced as the particle size decreased. The digestibility of bone meal with different particle sizes was studied by digestion system *in vitro*. The protein digestibility of bone meal with D_{50} of 19.92 um was 28.53% after intestinal digestion, while that of bone meal with D_{50} of 128.37um is 16.10% which was significantly lower than the former ($P < 0.05$). The free amino acid contents of each digesta were different, among which that of tyrosine (Tyr), phenylalanine (Phe), lysine (Lys) and arginine (Arg) were much higher, while all increased with the decrease of particle size. However, the relative contents of peptides with molecular weight less than 0.5 kDa declined with smaller particle size as well as the calcium and phosphorus release which were 3.27

~ 3.84 mg/g and 1.34 ~ 1.65 mg/g, respectively. Above all, the particle size affected the physicochemical and digestive properties of yak bone meal to a great extent.

In order to investigate the effect of yak bone powder with different particle sizes on the anti-osteoporosis, three median particle sizes (19.92 μm, 76.65 μm, 128.37 μm) were used to feed ovariectomized rats. The results showed that the apparent absorption rates of calcium and phosphorus reached 53.37 ~ 55.12% and 55.26 ~ 58.51%, respectively. Compared with the model group, the content of osteocalcin, alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase in serum of yak bone meal increased significantly ($P < 0.05$). However, there was no significant difference in both bone density and trabeculae between experiment groups ($P > 0.05$). In conclusion, yak bone meal showed anti-osteoporosis activity in ovariectomized rats, but the bone meal with different median particle sizes from 19.92 μm to 128.37 μm did not lead to significant difference in anti-osteoporosis.

Key words: Yak, Bone powder, Particle size, Digestion *in vitro*, Osteoporosis

目 录

摘 要 III
Abstract II
目 录 IV
第一章 引言 1
1.1 骨质疏松症研究进展 1
1.1.1 骨质疏松症 1
1.1.2 骨质疏松症的影响因素 2
1.1.3 骨质疏松症药物治疗研究进展 2
1.2 牦牛资源及研究进展 3
1.2.1 牦牛资源 3
1.2.2 牦牛骨营养成分 3
1.3 国内外研究现状 5
1.4 存在问题 5
1.5 课题研究背景及内容 5
1.5.1 研究背景及意义 5
1.5.2 研究内容 6
1.5.3 技术路线 7
第二章 牦牛骨超声脱脂工艺优化 8
2.1 引言 8
2.2 试验材料 8
2.2.1 材料与试剂 8
2.2.2 仪器与设备 9
2.3 试验方法 10
2.3.1 牦牛骨基本成分测定 10

2.3.2 牦牛骨脱脂参数优化实验 10
2.3.3 脱脂率、胶原蛋白含量及流失率计算 11
2.3.4 牦牛骨粉制备 11
2.3.5 数据处理方法 12
2.4 数据讨论 12
2.4.1 牦牛骨基本成分含量表 12
2.4.2 超声波辅助有机溶剂脱脂参数优化结果分析 12
2.4.3 不同脱脂方式结果分析 16
2.4.4 不同脱脂方式制备骨粉结果分析 18
2.5 小结 20
第三章 不同粒径牦牛骨粉理化特性及消化特性研究 21
3.1 引言 21
3.2 试验材料 21
3.2.1 材料与试剂 21
3.2.2 仪器与设备 22
3.3 试验方法 23
3.3.1 不同粒径骨粉制备工艺 23
3.3.2 牦牛骨粉粒径分布、微观结构、化学结构以及色泽分析 23
3.3.3 不同粒径牦牛骨粉基本成分测定 23
3.3.4 持水力测定 23
3.3.5 蛋白质溶解度测定 23
3.3.6 体外模拟胃肠道消化试验 24
3.3.7 蛋白质消化率及钙磷释放度 25
3.3.8 总氨基酸与游离氨基酸测定 25
3.3.9 肽分子量分布测定 25
3.3.10 数据处理方法 26

3.4 数据讨论 26
3.4.1 粒径分布、微观形态及化学结构分析 26
3.4.2 色泽分析 27
3.4.3 基本成分含量分析 28
3.4.4 总氨基酸及主要矿物质含量分析 29
3.4.5 持水力分析 30
3.4.6 蛋白质溶解度分析 31
3.4.7 蛋白质消化率分析 31
3.4.8 钙磷释放度分析 32
3.4.9 肽分子量分布分析 33
3.4.10 游离氨基酸结果分析 34
3.5 小结 35
第四章 不同粒径牦牛骨粉抗骨质疏松作用研究 37
4.1 引言 37
4.2 材料与试剂 37
4.3 仪器与设备 37
4.4 试验方法 38
4.4.1 动物分组与造模 38
4.4.2 动物饲喂试验 38
4.4.3 样品收集 38
4.4.4 骨密度、骨小梁和骨微观结构测定 38
4.4.5 脏器指数测定 38
4.4.6 钙磷表观吸收率测定 39
4.4.7 血清生化指标测定 39
4.4.8 数据处理方法 39
4.5 数据讨论 39

4.5.1 体重与脏器指数分析 39
4.5.2 钙磷表观吸收率结果分析 40
4.5.3 骨密度分析 41
4.5.4 骨小梁指标分析 41
4.5.5 血清生化指标分析 42
4.6 小结 43
第五章 全文结论 45
5.1 结论 45
5.2 论文的创新点 45
5.3 展望 46
参考文献 47
致谢 55
作者简历 56

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
OP	Osteoporosis	骨质疏松症
YB	Yak Bone	牦牛骨
YBP	Yak Bone Powder	牦牛骨粉
WHC	Water Holding Capacity	持水力
PS	Protein Solubility	蛋白质溶解度
PD	Protein Digestibility	蛋白质消化率
CR	Calcium Release	钙释放度
PR	Phosphorus Release	磷释放度
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectra	傅里叶红外光谱图
SEM	Scanning Electron Micrograph	扫描电子显微镜
TAA	Total Amino Acids	总氨基酸
FAA	Free Amino Acids	游离氨基酸
CAA	Calcium Apparent Absorptivity	钙表观吸收率
PAA	Phosphorus Apparent Absorptivity	磷表观吸收率
BMD	Bone Mineral Density	骨密度
TBPf	Trabecular Bone Pattern factor	骨小梁模式因子
Tb.N	Trabecular Number	骨小梁数目
Tb.Sp	Trabecular Spacing	骨小梁分离度
Tb.Th	Trabecular Thickness	骨小梁厚度
OC	Osteocalcin	骨钙素
B-ALP	Bone-specific alkaline phosphatase	骨特异性碱性磷酸酶
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase	抗酒石酸酸性磷酸酶
S-CTX	Serum C-terminal telopeptide of type Ⅰ	血清Ⅰ胶原 C-胶原末端肽交联

第一章 引言

随着世界范围内预期寿命的增加和人口老龄化进程的加速，骨质疏松症发病率持续攀升。近十年来，我国中老年人群骨质疏松症总体患病率约为23%，其中60岁以上人群总体患病率达36%，推测至2050年，我国骨质疏松症患者将高达2.12 亿。骨质疏松症紧随心血管疾病、糖尿病，已跃居慢性疾病的第3位，成为严重的社会卫生问题。目前，治疗骨质疏松症的药物过于注重调节骨代谢而非机体整体代谢，副作用明显。对于骨质疏松性症患者而言，其骨表面的胶原纤维层排列不规则，且程度参差不齐，钙盐不能有效正常沉积，从而机械补充钙盐不能增加骨密度。因此，寻找副作用小、可长期服用的有效功能物质迫在眉睫。据《神农本草经》记载，牦牛骨“补中，填骨髓”，自古以来就是名贵的滋补食品。牦牛是我国最珍贵的畜种资源之一，其骨胶原蛋白、骨多糖、矿物质、维生素等营养物质丰富，可对人体的新陈代谢、免疫调节以及骨质矿化产生积极影响。研究发现，牦牛骨粉可增加骨钙、骨密度，具有较高的钙表观吸收率。但是，牦牛骨粉仍存在制备工艺复杂、营养损失严重、产品质量不稳定等缺点，骨粉粒径大小不一且其抗骨质疏松作用机制尚不明确，无法为高附加值功能食品开发及工业生产提供有力的技术支持和理论支撑。因此，优化骨粉制备工艺，确定最佳粒径并阐明其抗骨质疏松作用具有重要意义。

1.1 骨质疏松症研究进展

随着世界范围内老龄化人口的增加，骨质疏松症已成为一个日趋严峻的公共卫生问题。据统计，男性与女性的骨质疏松症增长率每10年可分别达至15%和20%，40岁以上人群骨质疏松症发病率可达24%以上，60岁以上人群的总体患病率易高达36%（罗令, 2018），发病形势极其严峻。目前，治疗骨质疏松症的药物种类繁多，例如二膦酸盐、雷奈酸锶或甲状旁腺激素衍生物等，但此类药物治疗多为单靶点治疗，仅注重于调节骨代谢而非机体整体代谢，普遍具有一定的副作用，如胃肠道不适、肌肉骨骼疼痛、引发癌症和心血管疾病的风险等。因此，寻找副作用小、可长期服用的有效功能物质防治骨质疏松症迫在眉睫。

1.1.1 骨质疏松症

骨质疏松症（Osteoporosis, OP）以骨密度降低和骨微结构恶化为主要特征，具有退行性、全身性和代谢性，可使骨骼脆性和骨折风险大幅提升（Kanis *et al.*, 2008; Eastell *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2019)。骨稳态依赖于骨细胞、成骨细胞和破骨细胞的协同作用（Chen *et al.*, 2018; Furuya *et al.*, 2018），当骨吸收和骨形成之间的平衡被破坏时，骨骼密度便会逐渐降低，骨组织微结构不断恶化，从而增加骨脆性和骨折的风险并导致骨折。骨质疏松症被称为一种“无声的流行病”，因为它本身直到骨折才会出现症状，在临床上主要表现为股骨、盆腔、肱部、前臂、椎体低能骨折。骨折是骨质疏松症的主要后果，可导致严重的死亡率、过度残疾，在对生活质量产生不利影响的同时，也造成了不断上升的医疗费用和社会负担（Song *et al.*, 2019）。据统计，全世界每年约有890万例骨折是由骨质疏松症引起（Cruz *et al.*, 2018），而术后再次骨折的风险亦增加至60-82 人/10000 名患者每年（Velde *et al.*, 2018）。骨质疏松症是一种典型的老年性疾病，其发病率可随年

龄增长而不断增加，其导致的骨折发病率亦随年龄呈现指数增长趋势（Pietschmann *et al.*, 2009），其中由于激素变化，绝经后女性发病率增速尤为明显。随着老龄化人口的增加，骨质疏松症已跃升至慢性疾病的第 3 位，紧随心血管疾病、糖尿病，成为世界常见病、多发病（白璧辉, 2018）。骨质疏松症俨然已经成为一个严重的公共卫生问题，影响着千百万人，尤其是老年人和绝经后女性群体。

1.1.2 骨质疏松症的影响因素

骨质疏松症的影响因素可概括为以下几类：遗传因素、内分泌因素、疾病及药物因素、年龄及性别因素等（文天林, 2010）。在诱发骨质疏松症的多种相关激素中，性激素起决定性作用，对女性群体影响尤为显著。由于女性绝经后体内激素发生变化，其骨质疏松症发病率是男性的 3 倍（WHO, 2003）。年龄也同样影响着人体骨矿含量。通常，骨密度在 20 岁左右达到峰值，此后每年稳定下降 1%左右，当到达 80 岁以上，平均总体骨骼矿物质仅占原始的 40%左右（David, 2019），而由于激素水平下降，80 岁以上的女性群体骨质疏松患病率可达 100%（文天林, 2010）。遗传因素同样影响显著，例如维生素 D 受体基因、雌激素受体基因等都起着决定性作用。此外，营养状况和一些疾病及药物也对骨代谢具有关键影响，例如缺乏膳食钙、维生素 D，患有有系统性疾病、吸收障碍、乳腺癌、糖尿病、甲亢等疾病，具有吸烟、使用高酒精和故意减肥等习惯都会导致骨质流失，具有诱发骨质疏松的危险（David, 2019）。

1.1.3 骨质疏松症药物治疗研究进展

骨质疏松症的形成是由于骨吸收和骨形成失衡，导致骨量低，骨折风险高（Rodan & Martin *et al.*, 2000）。通常根据功能机制的不同，临床骨质疏松症防治药物有促进骨形成药物、抑制骨吸收药物和其它多重作用药物。促骨形成药物包括氟化物、甲状旁腺激素类似物等；抑制骨吸收药物则主要有双膦酸盐、降钙素等。此类治疗原理是抑制骨吸收或刺激骨形成，然而这些制剂在提高骨密度的同时，也能促进软骨磷酸盐沉积，从而在一定程度上导致软骨钙化。已有研究表明，双膦酸盐在矿化过程会产生一些特异性变化从而影响软骨代谢（Reginster *et al.*, 2014; Renders *et al.*, 2014），用于刺激甲状旁腺激素分泌的新型骨质疏松症药物如钙化剂，也可引起软骨内钙沉积（Fitzpatrick, 2011）。这些药物皆有其自身的局限性，长期使用还会增加诸如胃肠道出血、癌症和心血管疾病等风险（Daneault *et al.*, 2017; WHO, 2003）。多重作用药物主要有钙剂、VD 和中药等（中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会, 2011; Wang *et al.*, 2019）。在过去几年，美国（Kim *et al.*, 2016）和欧洲（Van *et al.*, 2017; Kanis *et al.*, 2017）骨质疏松症药物的使用显著减少，日本的骨质疏松症药物使用量也停滞不前。其中自 2008 年以来，美国二膦酸盐的用量下降达 50%。因而，采用非药理学干预的早期预防而非治疗策略被强烈提倡，特别是钙和维生素 D 等膳食补充剂已被支持用于治疗骨质疏松症。目前市场上的钙剂主要有碳酸钙、乳酸钙和氨基酸螯合有机钙等，但普遍存在吸收率低、刺激胃、具有不同毒副作用、适用人群有限、价格偏高等缺点。据报道，一片含 200 mg 钙的 $CaCO_3$ 需要 316～632 mL 的胃酸进行钙离子化，而正常人每天分泌胃酸总量仅为 1 500～2 000 mL（Wang *et al.*, 1992; Hansen *et al.*, 1996），且食物在胃中停留时间短，

因此很难被消化利用。维生素 D 补充过量也容易造成食欲减退、运动失调等，长期服用甚至会导致慢性中毒（方秀统, 2014; McClung *et al.*, 2003; 杜春莹, 2014）。此外，中药治疗法也常被用于骨质疏松症，治疗方法分为补肾壮骨法、补肾健脾法、补肾益肝法、补肾活血法。孙伟珊等（2014）利用补肾壮骨颗粒干预骨质疏松大鼠，发现其可改善血脂代谢，提高骨密度。另有实验研究表明，补肾活血方药、仙灵骨葆胶囊都能缓解骨质疏松症，促进骨质愈合以及关节功能的恢复（陈建军, 2015）。

1.2 牦牛资源及研究进展

1.2.1 牦牛资源

牦牛（yak）是主要分布在青藏高原及其相连的高山、亚高山区，海拔可达 3000 米以上，可以适应高寒气候，是生活在海拔最高处的哺乳动物（除人类外）（Wiener *et al.*, 2003）。牦牛为藏民提供肉、奶、纤维和燃料，在藏民生活中发挥着重要作用（Cai, 2003），素有“雪域之舟”的美誉。这些极端的环境条件造就了牦牛肉的优良品质，其质地、蛋白质、脂肪等均优于普通牛肉（Zhang *et al.*, 2015; Hou *et al.*, 2013; Jie *et al.*, 2018），其肉被誉为“牛肉之冠”，堪称高原之宝。除中国，蒙古、吉尔吉斯、塔吉克等国家都有饲养。据统计，我国现有牦牛超过 1600 万，主要分布在西藏、四川、青海、甘肃等地，约占世界牦牛种群的 95%（Zhang *et al.*, 2015），同时也是世界上拥有牦牛种群最多的国家。牦牛是藏区牧民赖以生存的重要生产生活资料，具有不可代替的经济和生态地位。

据《晶珠本草》等藏医宝典记载，仲骨生胃火，骨髓可愈创伤。藏医所用仲骨即为牦牛骨（Yak bone, YB）。除入药外，牦牛骨也是我国藏族传统的营养食品。由于牦牛数量较少、经济价值高、牦牛骨髓采集量较小等特点，牦牛骨髓也逐渐成为名贵的滋补食品。然而，大量的研究都集中于分析牦牛肉的营养成分、牦牛产肉产乳性能以及其它相关的分子生物学方面（吴婷, 2017），牛骨这一副产物却恰恰被忽略。众所周知，牦牛长期生活在高寒无污染的环境，其骨未受到兽药滥用或污染，因此牦牛骨是中国肉类行业潜在的新资源（Zhao *et al.*, 2019）。

1.2.2 牦牛骨营养成分

动物屠宰骨副产物一般约占动物体重的 20%（吴婷, 2017），主要由骨细胞和骨基质组成，而骨基质则主要由以羟基磷灰石形式存在的磷酸钙和骨胶原蛋白组成（周利兵, 2010）。牦牛骨中除了含有优质蛋白、脂肪、矿物质（如钙、磷、铁）以及维生素等基本营养物质，还含有胶原蛋白、硫酸软骨素等有益生物活性物质。尤其牦牛骨中的钙磷比例为 2 : 1，达到了人体钙吸收的最佳比例，可充分满足骨生长的营养素需求，是理想的天然钙源（阎萍, 2009）。早在两千年前，《四部医典》等藏医宝典中就有利用牦牛骨治疗诸如骨质增生、骨质疏松的记载（李加宗吉, 2013）。

1.2.2.1 蛋白质

牦牛骨蛋白质含量丰富，以胶原蛋白为主。胶原蛋白分子量高达 300 kDa，由三股肽链左手螺旋绞合而成（赫佳丹, 2009），结构稳定，一般的加工方式都很难令其分解，故而难以被人体吸收利用（刘静, 2016）。据研究，当胶原蛋白被裂解为几千到几万道尔顿的骨胶原蛋白多肽时，

可以显著提高溶解度和消化吸收利用率，明显优于直接食用胶原蛋白（Fahnestock *et al.*, 2003; 付文雯, 2010）由于持有特殊的生物活性功能，在生物体内承担着极其重要的生物学功能，近年来，骨胶原蛋白肽逐渐成为广大学者的研究热点。骨胶原蛋白肽主要由 18 种氨基酸构成，甘氨酸可占总氨基酸 1/3，虽缺少色氨酸，但其营养价值仍不容小觑（贾伟, 2017）。研究发现，骨胶原蛋白肽可有效防治骨质疏松症（Kim *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2010; Watanabe *et al.*, 2009）和骨关节疼痛（Moskowitz *et al.*, 2000）；卢玉坤等（2013）人发现胶原蛋白肽可促进小肠对钙的吸收，提高利用率；Kim 等（2001）人发现其还具有抗氧化、降血压等功能。

1.2.2.2 矿物质

不同动物骨骼中的化学成分差异很大，但都以无机矿物质为主，在骨组织中可达 70%。而其中磷酸钙和碳酸钙远高于高于 98%，其余则是其它常量和微量元素（贾伟, 2017）。牦牛骨中矿物质的存在形式与其它动物骨骼一样，但由于羟基磷灰石与胶原蛋白有机结合，其溶解度很极低，难以利用。经分析，牦牛骨中钙含量最高，可达 25%~30%，其次为 P、Na、K（李天才，2002），另外还含有 40 余种其它具有代谢作用的元素。周利兵等（2010）通过对青海牦牛骨中的微量元素分析发现，K、Na、Ca、Mg、P、F 等为牦牛骨中的第一主要成分；徐贵钰等（2009）发现青海藏药牦牛骨中 Zn、Fe、Ca 等有益元素影响高，而 Ni、Cd、Pb 等有害微量元素则影响相对很低。此外，赵勇等（2010）人通过对娘亚、阿里、林芝等 7 个不同地域品种牦牛的不同部位进行矿物质测定，发现骨骼中的各个元素含量受地域影响较大，并且腿骨相较于其他部位中的大多数元素含量明显较高，同时，与黄牛骨、猪骨以及羊骨相比，牦牛骨中的矿物质元素含量普遍要高。矿物质是人体生长发育过程中不可或缺的营养元素，可起到代谢、神经传导、维持酸碱平衡等作用。因此，牦牛骨具有更广阔的开发和应用价值。

1.2.2.3 脂肪

近年来，除了研究牦牛骨的蛋白质及微量元素以外，牦牛骨脂肪酸的组成也逐渐引起了大众的注意。据报道，动物骨骼中的脂肪中油酸种类丰富，稍逊于茶油。动物骨含有高达 50%以上的油酸，其中棕榈酸、硬脂酸分别占 20%和 19%左右，而亚油酸作为人体必需脂肪酸也高达 5%以上（徐德林, 1994; 孙远明, 2006）。研究发现，牦牛骨的主要脂肪酸为 C18 : 1n9c、C16 : 0 等 ，其含量分别可达总脂肪酸的 47％、17％，不饱和脂肪酸的含量是饱和脂肪酸的 2 倍（刘文媛, 2016）。此外，祝洪山（1987）对比了猪油和猪骨油，发现骨油中的游离脂肪酸含量以及不饱和度明显偏高，营养价值更为丰富。但在骨粉制备中，大量油脂可导致产品极易氧化酸败，产生不良风味和有害物质（Derouchey *et al.*, 2004），同时，脂肪的存在不利于畜骨进一步粉碎，阻碍蛋白质溶出和矿物质元素吸收，对骨粉品质有很大影响（杨晓霞, 2016; Fekete *et al.*, 2009）。因此一般对骨粉进行脱脂处理，并加以回收利用。

1.2.2.4 其它物质

除优质蛋白，骨组织还含有许多骨多糖。这是由于动物骨骼由软骨增殖并转化成骨组织时，软骨中的Ⅱ胶原蛋白逐渐被Ⅰ型胶原蛋白取代，形成多糖（刘安军, 2007）。特别是软骨组织中，硫酸软骨素异常丰富。此外，动物骨骼中还含有丰富的维生素，诸如维生素 A、维生素 D、维生素 B_1、B_2、B_{12} 等（白建, 2006）。

1.3 国内外研究现状

现今，国外骨产品非常丰富，主要体现在蛋白利用和钙利用方面，例如制备明胶、功能肽、骨粉、骨泥、骨素等（刘静, 2016）。世界各国对骨资源的开发都愈发重视，特别在日本、美国等国家，对于骨产品的开发研究处于世界前列。甚至，一些管理机构、相关生产企业正如春后竹笋般涌出，如日本增幸株式会社、美国连珠公司等（程妍, 2009; Morimura *et al*., 2002）。国外对骨的开发利用较早，其中丹麦早在上个世纪 70 年代就率先开展了对骨蛋白的研究。国外对畜禽骨的开发涵盖明胶、骨蛋白、骨汤、骨泥等，产品丰富，研究成果较为显著。在我国，由于对骨副产物固有价值了解不足，并缺乏相关研究，直到上个世纪 80 年代才从引进该领域技术（蔡杰, 2011）。但随着我国对骨副产物加工利用的重视，相关研究也如火如荼的进行。尤其是各骨产品加工机械不断涌现。目前，国内学者更多的致力于研究开发骨蛋白酶解技术，畜禽骨产品附加值以及其综合利用率仍然相对较低。

国内外对于牦牛骨的开发较少，关于牦牛的研究主要集中在我国。魏秋霞等（2008）人采用新鲜牦牛骨生产浓缩骨汤，探究了骨汤加工过程中风味化合物产生的主要途径；郭文瑞等（2013）人研究了冷却去油工艺对牦牛骨汤挥发性化合物的影响。此外，刘静等（2018; 2016）人利用酶解法制备了牦牛骨胶原多肽，并对其胶原多肽螯合钙进行了研究；赵要武（2007）和肖帆（2017）等人发现牦牛骨粉、骨髓粉可有效提高大鼠钙表观吸收率并增加骨密度。牦牛骨作为一种高营养价值的天然无污染资源，正逐渐引起广泛重视，具有重要的研究意义。

1.4 存在问题

牦牛壮骨粉是广泛适用于骨质疏松、骨质增生、易骨折人群的高效壮骨产品，但仍普遍存在制备工艺耗时长、营养损失严重、产品质量不稳定等缺点，并且不同粒径对牦牛骨粉理化特性、消化特性及其抗骨质疏松作用的影响尚不清晰。

1.5 课题研究背景及内容

1.5.1 研究背景及意义

随着我国老龄化程度的加重，骨质疏松症发病率持续攀升。目前预防和改善骨质疏松症的研究主要集中在药物治疗上，忽视了对机体整体代谢状态的调整，普遍具有一定副作用。因此，寻找副作用小且能够防治骨质疏松的功能物质具有重要意义。本课题旨在优化牦牛骨粉制备工艺，并通过建立体外模拟肠胃道消化模型和动物实验研究不同粒径牦牛骨粉的消化特性及其抗骨质疏松作用，明确牦牛骨粉抗骨质疏松的最佳粒径。本研究可为工业化生产提供技术支持；为揭示不同粒径牦牛骨粉抗骨质疏松作用提供了新的理论依据；对开发低剂量、高活性牦牛骨源抗骨质疏松活性功能食具有指导作用；对提高牦牛附加值、促进牧区社会经济发展具有重要意义。

1.5.2 研究内容

1. 超声脱脂工艺优化

以青海牦牛骨为原料，基于超声波的空化作用，对脱脂溶剂进行筛选，并在确定脱脂溶剂后，以脱脂率为指标通过响应面法对超声脱脂参数（超声功率、脱脂时间及液料比）进行优化，从而确定超脱脂质的最佳参数。此外，以蒸煮脱脂法为对照，对两种脱脂牦牛骨的脱脂率、蛋白质流失率、羟脯氨酸流失率、主要矿物质流失率、微观形态进行测定分析，并对脱脂后制备的两种牦牛骨粉进行粒径分布、微观结构、化学结构、钙离子释放度进行分析，从而进一步验证超声脱脂的优势。

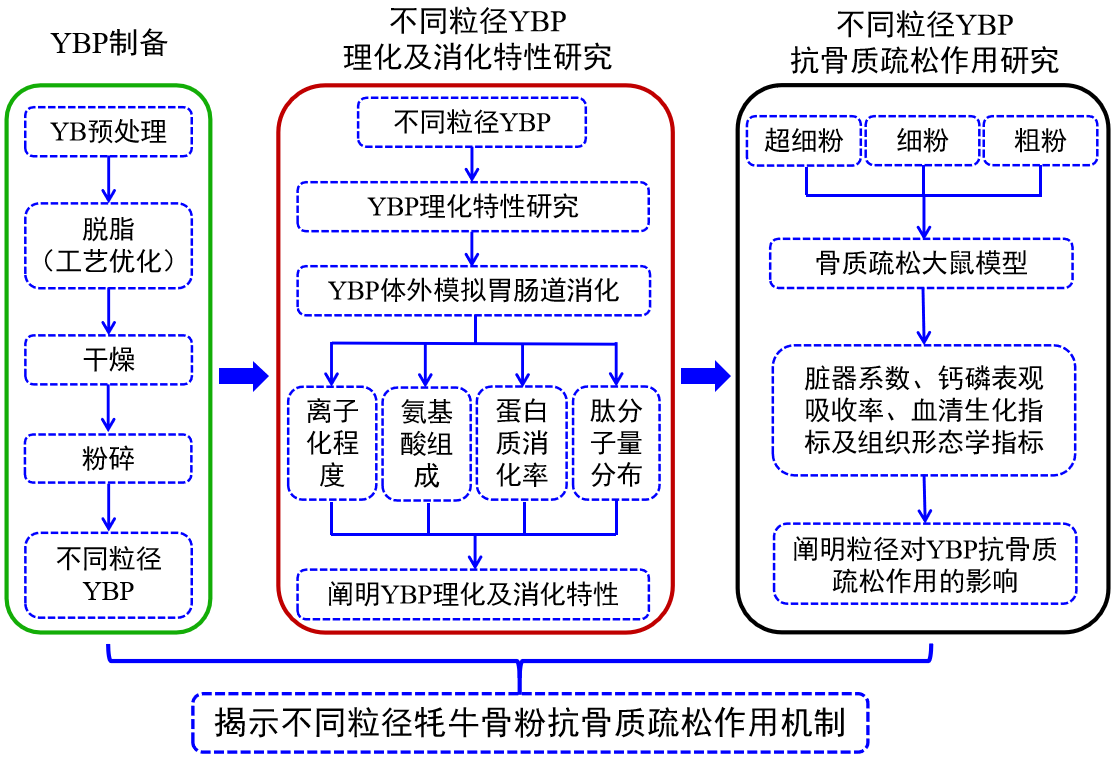
2. 不同粒径牦牛骨粉理化特性及消化特性研究

以青海牦牛骨为原料，利用超声辅助乙酸乙酯脱脂后通过行星式球磨法对其进行超微粉碎，并获得 5 种不同中值粒径的牦牛骨粉。为阐明粒径对骨粉理化特性的影响，该部分首先对不同粒径骨粉的基本成分含量以及胶原蛋白、主要矿物质、总氨基酸等指标进行测定，进而对不同骨粉的化学结构、微观形态、持水力、蛋白质溶解性以及色泽进行分析。此外，该部分还利用体外模拟消化系统对不同粒径消化特性进行研究，分别对蛋白质消化率、肽分子量分布、游离氨基酸含量以及钙磷释放度进行测定。最终确定不同粒径牦牛骨粉的理化特性和消化特性。

3. 不同粒径牦牛骨粉抗骨质疏松作用研究

该部分实验选取低、中、高三种粒径骨粉进行研究。选取 7 周龄雌性 Wistar 大鼠建立骨质疏松模型进行动物实验，分组为假手术组、模型组、阳性对照组、实验组（Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ）。通过分析大鼠的钙磷表观吸收率、骨形态组织学指标及血清生化指标等最终阐明粒径对牦牛骨粉抗骨质疏松作用的影响。

1.5.3 技术路线


YBP制备
YB预处理
脱脂
（工艺优化）
干燥
粉碎
不同粒径
YBP
不同粒径YBP
理化及消化特性研究
不同粒径YBP
YBP理化特性研究
YBP体外模拟胃肠道消化
离子
化程
度
氨基
酸组
成
蛋白
质消
化率
肽分
子量
分布
阐明YBP理化及消化特性
不同粒径YBP
抗骨质疏松作用研究
超细粉
细粉
粗粉
骨质疏松大鼠模型
脏器系数、钙磷表观
吸收率、血清生化指
标及组织形态学指标
阐明粒径对YBP抗骨质
疏松作用的影响
揭示不同粒径牦牛骨粉抗骨质疏松作用机制

第二章 牦牛骨超声脱脂工艺优化

2.1 引言

牦牛是生活在中国青藏高原的特色物种之一，牦牛骨骼占躯体总生物量 1/3，富含胶原蛋白、软骨素、维生素以及钙、磷、镁、锌等骨生长必需的营养素（赵勇, 2010; 张春晖, 2015），其中胶原蛋白占总蛋白含量的 35%～40%（Fonkwe *et al.*, 1996）。研究表明，动物骨中的蛋白质具有很高的营养价值（Chiesa *et al.*, 2011），其中的骨胶原蛋白肽能改善人体皮肤肤质（Matsumoto *et al.*, 2006），促进大鼠股骨的骨折愈合和人成骨细胞 I 型胶原蛋白基因的表达（Tsuruoka *et al.*, 2011）。此外，骨骼中的 Ca : P 比值近似为 2，是人体吸收钙磷的最佳比例（魏秋霞, 2008），但多以磷酸钙形式存在于羟基磷灰石晶体中，溶解度很低并且羟基磷灰石与胶原蛋白有机结合，难以得到有效利用（Olszta *et al.*, 2007; Morimura *et al.*, 2002）。

对原料骨进行脱脂处理是骨粉制备的前提。赵要武等（2007）研究发现牦牛骨粉（yak bone powder, YBP）可增加骨密度，并具有较高的钙表观吸收率。但牦牛骨中含有大量油脂，其产品极易氧化酸败，产生不良风味和有害物质（Derouchey *et al.*, 2004），影响产品感官品质，危害身体健康（Balogh *et al.*, 2015; Fekete *et al.*, 2009）。同时，脂肪的存在不利于畜骨进一步粉碎，阻碍蛋白质溶出和矿物质元素吸收，对骨粉品质有很大影响（杨晓霞, 2016; Fekete *et al.*, 2009）。传统的动物脱脂法有机溶剂法、酶法、酸碱法、蒸煮法和超声波乳化法等（李晔, 2012），普通有机溶剂法脱脂率较高，但存在耗时长、溶剂残留等问题；酶法不易分离，后续加工困难且成本高；酸碱法脱脂率较高，但容易造成蛋白等营养损失，污染环境；蒸煮法多以高温高压蒸煮为主，但脱脂率低，生产成本较高，易造成营养物质损失。

超声脱脂是利用超声波空化作用及其产生的热效应、机械效应等加速油脂的扩散和溶出（刘文媛, 2018）。然而使用超声波辅助有机溶剂对骨原料脱脂制备骨粉的研究尚未见报道。本研究对超声波辅助有机溶剂脱脂方法进行优化，旨在提高脱脂率的同时保留更多营养成分以提高产品质量和稳定性，为改善牦牛骨和其他畜禽骨骨粉加工工艺提供参考。

2.2 试验材料

2.2.1 材料与试剂

原料骨：随机选取青藏牦牛 6 头（2～3 岁），屠宰后取其股骨（剔除软骨、碎肉及筋膜等杂质），粉碎至 5～10 mm 保存于-20 ℃备用。

实验所需试剂如表 2.1 所示。

表 2.1 实验所需试剂

Table 2.1 The reagents for the experiment

试剂名称	化学式	生产厂家
无水乙醇	CH_3CH_2OH	国药集团化学试剂有限公司
正己烷	C_6H_{14}	国药集团化学试剂有限公司
乙酸乙酯	$CH_3COOCH_2CH_3$	国药集团化学试剂有限公司
浓硫酸	H_2SO_4	国药集团化学试剂有限公司
高氯酸	$HClO_4$	国药集团化学试剂有限公司
异丙醇	$(CH_3)_2CHOH$	国药集团化学试剂有限公司
硝酸	HNO_3	国药集团化学试剂有限公司
无水乙酸钠	CH_3COONa	国药集团化学试剂有限公司
一水柠檬酸	$C_6H_8O_7·H_2O$	国药集团化学试剂有限公司
正丙醇	$CH_3CH_2CH_2OH$	国药集团化学试剂有限公司
氯胺 T	$C_7H_8ClNNaO_2S$	国药集团化学试剂有限公司
对二甲氨基苯甲醛	$C_9H_{11}NO$	国药集团化学试剂有限公司
氧化镧	La_2O_3	国药集团化学试剂有限公司
碳酸钙	$CaCO_3$	国药集团化学试剂有限公司
胃蛋白酶（1 200 U/g）		国药集团化学试剂有限公司

2.2.2 仪器与设备

实验所需仪器设备如表 2.2 所示。

表 2.2 实验所需设备

Table 2.2 The Equipment needed for the experiment

仪器名称	型号	生产厂家
紫外分光光度计	T6	北京普析通用仪器有限责任公司
高速万能粉碎机	FW 100	天津泰斯特仪器有限公司
行星式球磨仪	PM200	上海弗尔德仪器设备有限公司
离子溅射喷金仪	Eiko IB．5	日本 Hitachi 公司
场发射环境扫描电子显微镜	Quanta 200 FEG	北京国家纳米中心提供
冷冻离心机	Allegra X-12R	美国 Beckman Coulter 有限公司
双光束原子吸收分光光度计	AA-6800	日本岛津公司
脂肪测定仪	SER148	意大利 VELP 公司
全自动凯氏定氮仪	KJELTEC2300	丹麦 FOSS 公司
傅里叶近红外光谱分析仪	TENSOR 27	瑞士 Bruker 公司
立式压力蒸汽灭菌锅	LDZX-50KBS	上海申安医疗器械厂
实时喷雾测量仪	Helos-kr	德国 Sympatec 公司
超声清洗器	YQ1001C	上海易净超声波仪器有限公司

2.3 试验方法

2.3.1 牦牛骨基本成分测定

脂肪含量测定：索氏抽提法，依照 GB 5009.6-2016 进行。水分含量：直接干燥法，依照 GB 5009.3-2016 进行。灰分含量：马弗炉高温灼烧法，依照 GB 5009.4-2016 进行。蛋白质含量：凯氏定氮法，依照 GB 5009.5-2016 进行。羟脯氨酸含量：依照 GBT 9695.23-2008 进行测定。Ca 含量测定：火焰原子吸收光谱法，依照 GB 5009.92-2016 进行。矿物质含量测定：电感耦合等离子体质谱法，依照 GB5009.268-2016 进行。

2.3.2 牦牛骨脱脂参数优化实验

2.3.2.1 脱脂工艺

超声脱脂法：牦牛腿骨→剔除筋膜、肉等杂质→初步粉碎（5～10 mm）→称样→与脱脂溶剂以一定的液料比混合→超声脱脂处理→溶剂回收→38 ℃条件下通风干燥 12 h→测定残留脂肪含量。

蒸煮脱脂法（杨红, 2015）：牦牛腿骨→剔除筋膜、肉等杂质→初步粉碎（5～10 mm）→称样并预煮 2 min 去腥→沥干→高温高压蒸煮处理（118 ℃90 min，料液比为 1 : 2.5）→撇除上层油脂并沥干→75 ℃条件下通风干燥 12 h。

2.3.2.2 脱脂溶剂的筛选

基于不同脱脂溶剂在其他脱脂研究中的应用条件，本试验中分别选取无水乙醇、异丙醇、正己烷、乙酸乙酯作为脱脂溶剂，在超声功率 300 W、液料比（mL : g）为 2、时间为 20 min 的条件下（常温）对牦牛骨进行超声脱脂，测定脱脂前后牦牛骨中的脂肪含量，比较四种不同溶剂的脱脂效果，计算脱脂率。

2.3.2.3 单因素实验设计

在 30 ℃恒定水温条件下对牦牛腿骨进行超声脱脂单因素实验，各因素的基本条件为：超声功率 300 W、脱脂时间 20 min、液料比（mL : g）为 2。各因素梯度分别设置为：超声功率：200 W、300 W、400 W、500 W、600 W；脱脂时间：20 min、30 min、40 min、50 min、60 min；液料比（mL : g）：2、3、4、5、6。每次改变其中一个因素，进行单因素试验。以牦牛骨的脱脂率为评价指标，每个因素重复实验 3 次，测定结果取平均值。

2.3.2.4 响应面实验设计

在单因素试验结果基础上，根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理，考察超声功率、脱脂时间、液料比 3 个因素及其交互作用对脱脂率的影响，试验因素及水平设计见表 2.3。

表 2.3 响应面设计因素及水平表

Table 2.3 factors and levels of response surface design

因素 Factors	水平 Levels		
	-1	0	1
超声功率 Ultrasonic power *A*/W	300	400	500
超声时间 Ultrasonic time *B*/min	20	30	40
液料比 Material ratio /(mL·g^{-1})	4	5	6

2.3.3 脱脂率、胶原蛋白含量及流失率计算

脱脂率的计算：取 5 g 脱脂牦牛骨，依照 GB 5009.6-2016 对其脂肪含量进行测定，做 3 次平行，取平均值，脱脂率的计算按照公式：

$$R = \frac{m_1 - m_0}{m_1} \times 100\%$$

式中 R 为脱脂率；m_1 为原料牦牛骨中脂肪的质量；m_0 为脱脂牦牛骨中脂肪的质量。

胶原蛋白含量的计算：取 100 mg 脱脂牦牛骨，依照 GBT 9695.23-2008 对其羟脯氨酸含量进行测定，做 3 次平行，取平均值，胶原蛋白含量及流失率的计算分别按照公式：

$$J = m_{羟脯氨酸} \times 6.77$$

$$W = \frac{m_{0胶原蛋白} - m_{1胶原蛋白}}{m_{0胶原蛋白}} \times 100\%$$

式中 m 羟脯氨酸为羟脯氨酸质量； J 为胶原蛋白质量；W 为胶原蛋白流失率；m_0 胶原蛋白为原料牦牛骨中胶原蛋白质量；m_1 胶原蛋白为脱脂牦牛骨中的胶原蛋白质量，6.77 为羟脯氨酸与胶原蛋白之间的换算系数（董宪兵, 2013）。

2.3.4 牦牛骨粉制备

备用脱脂牦牛骨用高速万能粉碎机粉碎 45 s（15 s /次，共 3 次），筛分获得 60～100 目牦牛粗骨粉，用行星式球磨仪制备牦牛骨粉备用（尹涛, 2015）。参数设置：350 r/min，4 h，磨球直径为 10 mm。

2.3.4.1 牦牛骨粉粒度分布及其微观形态观察

粒度分布：牦牛骨粉的粒度分布采用 CAMSIZER X2 测定，骨粉的平均粒径采用中值粒径 D_{50} 表示。

微观形态：牦牛骨及骨粉的微观形态参考 Yi 等（2015）的方法，采用扫描电镜观察，加速电压为 10 KV。

2.3.4.2 牦牛骨粉化学结构分析及钙离子释放度测定

化学结构分析：化学键分析参考 Boutinguiza 等（2012）的方法，用 FT-IR 红外光谱分析仪分析，波数扫描范围为 600～4000 cm^{-1}。

钙离子释放度检测：称取 0.25 g 牦牛骨粉于 50 mL 离心管（精确至 0.001 g），加入 25 mL 消化液（用 HCl 调至 pH 为 2），添加胃蛋白酶（60 U/mL），混匀，封口。将上述离心管放置 37 ℃温摇床提取 3 h，100 r/min。提取结束后，在 4 000 r/min 条件下离心 30 min。取上清过滤并定容至 100 mL 容量瓶，稀释 100 倍后用火焰原子吸收光谱仪进行检测（Zhang *et al*., 2016）。做 3 次平行试验。其计算公式如：

$$C = \frac{m_{上清钙}}{m_{样品钙}} \times 100\%$$

式中 C 为牦牛骨粉钙离子释放度；$m_{上清钙}$为上清液中钙的质量；$m_{样品钙}$为样品中钙的总质量。

2.3.5 数据处理方法

运用 SPSS22.0 软件 one-way ANOVA 对数据进行方差分析同时利用 Duncan 新复极差法进行显著性检测，其中各图同一指标中不同字母表示差异显著（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）运用 Origin8.0 作图；利用 Design-Expert 8.0 软件对响应面的数据进行方差和线性回归分析。

2.4 数据讨论

2.4.1 牦牛骨基本成分含量表

表 2.4 牦牛骨主要成分含量

Table 2.4 Main components of yak bone

鲜骨 Raw bone	干基骨 Dry bone		
水分 Moisture (%)	蛋白 Protein (%)	脂肪 Fat (%)	灰分 Ash (%)
15.04 ± 0.26	24.90 ± 0.67	25.15 ± 0.59	51.49 ± 1.64

牦牛骨基本成分含量如表 2.4 所示。蛋白含量为 24.90%，高于鲁西牛、延边牛、南阳牛、秦川牛的同部位蛋白含量。脂肪含量高达 25.15%，不利于骨的进一步粉碎，其产品极易氧化酸败，严重影响骨粉品质（杨晓霞, 2016; Fekete *et al*., 2009）。这表明，牦牛骨虽然富含营养成分但脂肪含量较高，因此有必要对牦牛骨进行脱脂处理。

2.4.2 超声波辅助有机溶剂脱脂参数优化结果分析

2.4.2.1 单因素试验结果

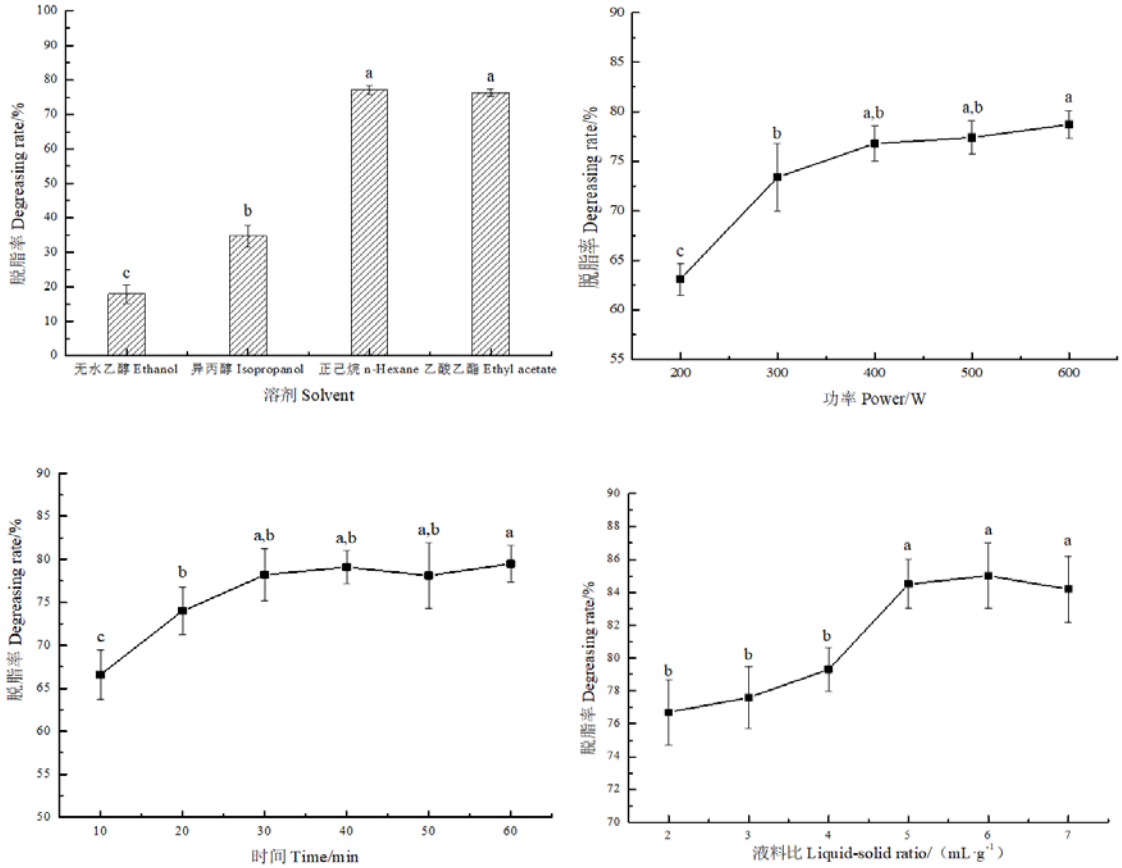
由图 2.1a 可以看出，正己烷和乙酸乙酯脱脂效果显著优于无水乙醇和异丙醇，二者之间无显著差异（$P > 0.05$）。此外，乙酸乙酯具有良好的溶解性、挥发性，其沸点低、毒性小，是一种易于回收并被国家标准规定允许使用的食品添加剂。因此最终选取乙酸乙酯作为最适脱脂溶剂。

由图 2.1b 可以看出，牦牛骨脱脂率随超声功率的增大而递增，可能由于功率增大导致空化效应和机械振动增强，其具有的能量和波动性促进了分子的扩散（李晔, 2012），从而促进骨中油

脂的溶出。当超声功率为 400 W 时，其脱脂率为 76.8%。但当超声功率超过 400 W 时，脱脂率变化减缓，这可能是由于脱脂溶剂的溶脂能力已趋于饱和，400 与 500、600 W 的超声功率对脱脂率无显著差异（$P > 0.05$）。因此，选取 400 W 为最佳条件进行后续试验。

由图 2.1c 可以看出，脱脂率随超声时间延长逐渐提高。在超声时间为 10～30 min 时，脱脂率迅速上升，而在 30～60 min 内，脱脂率增加减缓。随超声波的作用由表及里，抵达内部，油脂的扩散率相应减少（Zhao *et al.*, 2007）。因此，达到一定时间后，脱脂率增加趋势会减缓。当超声波作用完全抵达牦牛骨内部时，继续延长时间则不会再产生影响。当脱脂时间为 30 min 时，脱脂率可达 78.2%，且与 40、50、60 min 时的脱脂效果无显著差异（$P > 0.05$），因此选取 30 min 为后续试验的脱脂时间；

由图 2.1d 可以看出，液料比为 2～5 时，脱脂率随着液料比的增大呈上升趋势。这是由于对于一定质量的牦牛骨来说，溶剂用量的增加会降低溶剂中油脂的浓度，增加牦牛骨与溶剂接触表面的浓度差，从而促使传质推动力的增加（Lou *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2013; Špela *et al.*, 2003）。当脱脂溶剂用量增大到一定程度后，牦牛骨中的大部分油脂已经溶出，随用量持续增加，油脂溶出渐缓，从经济角度考虑，可选择液料比为 5 作为后续优化试验的最适条件。当液料比为 5 时，其脱脂率与 6、7 的脱脂率已无显著差异（$P > 0.05$），脱脂率可达 84.5%。



注：不同小写字母（a~c）表示不同分组间存在显著差异（$P < 0.05$），下同。

Note：Different lowercase letters (a~c) indicate significant difference ($P < 0.05$) of different groups, the same below.

图 2.1　不同脱脂溶剂、超声功率、超声时间和液料比对牦牛骨脱脂率的影响

Fig.2.1 Effect of solvents, ultrasonic power, ultrasonic time and ultrasonic temperature on degreasing rate of YB

2.4.2.2 Box-Behnken 试验设计与结果

响应面试验共 17 个试验点，包括 12 个为析因点、5 个零点试验。结果如表 2.5 所示，R_1 表示脱脂率。

通过 Design-Expert 8.0 软件对数据进行分析，脱脂率（R_1）与超声功率（A）、超声时间（B）和液料比（C）之间建立二次回归模型公式如下：

$$R_1=80.36+3.83A'+1.29B'+2.70C'+0.52A'B'+1.15A'C'+1.19B'C'+2.03A'^2+0.89B'^2+0.81C'^2$$

表 2.5 响应面设计试验结果

Table 2.5 Results of response surface design

试验号 No.	A'	B'	C'	脱脂率 Degreasing rate R_1/%
1	1	0	1	90.58
2	0	0	0	78.96
3	0	-1	1	82.36
4	-1	0	-1	78.11
5	-1	-1	0	78.98
6	0	0	0	82.09
7	1	-1	0	85.51
8	0	0	0	81.90
9	-1	1	0	80.00
10	0	0	0	80.36
11	0	1	-1	79.37
12	0	-1	-1	78.65
13	0	0	0	78.48
14	1	1	0	88.61
15	-1	0	1	80.54
16	0	1	1	87.83
17	1	0	-1	83.55

2.4.2.3 回归方程显著性分析

为考察模型的拟合度，寻找主效应显著性以及各因素之间的相互作用，对回归方程进行 ANOVA 方差分析，结果如表 2.6 所示。

该模型 $P < 0.01$，$F = 14.29$，所选模型极显著；失拟项 $P > 0.05$，说明其它因素对实验结果的影响较小，该模型在整个回归区域内拟合较好；$R^2Adj\text{-}R^2Pre < 0.2$,说明该模型可充分说明工艺过程（李莉, 2015）。方差分析结果表明，该模型与试验具有较高的拟合度，能很好的反映出各因素与脱脂率之间的关系。通过 P 值的检验结果发现，该模型一次项 A、C 中 $P < 0.01$，对模型贡献大，因此其对脱脂率影响极显著，而一次项 B、二次项 A'^2 中 $P < 0.05$，表明其对脱脂率影响显著。由 F 检验可以得出超声功率、超声时间和液料比对牦牛骨脱脂率都有一定的影响，其因子贡献率为超声功率 > 料液比 > 超声时间，但其交互作用不显著。

表 2.6 方差分析表

Table 2.6 Analysis of variance table

方差来源 Sources of variance	平方和 Sum of squares	自由度 d*f*	均方 Mean square	*F* 值 *F* value	*P* 值 *P* value
模型 Model	226.48	9	25.16	14.29	0.001 0**
A	117.20	1	117.20	66.55	<0.000 1**
B	13.29	1	13.29	7.55	0.028 6*
C	58.48	1	58.48	33.21	0.000 7**
AB	1.08	1	1.08	0.61	0.458 9
AC	5.29	1	5.29	3.00	0.126 7
BC	5.64	1	5.64	3.20	0.116 6
A^2	17.35	1	17.35	9.85	0.016 4*
B^2	3.31	1	3.31	1.88	0.212 4
C^2	2.74	1	2.74	1.56	0.252 1
残差 Residual	12.33	7	1.76		
失拟项 Lack of fit	1.47	3	0.49	0.18	0.904 6
纯误差 Pure error	10.86	4	2.71		
总离差 Cor total	238.80	16			
系数 Coefficient	R^2=0.9484　Adj R^2=0.8820　Pre R^2=0.8306　Adeq precision=12.834				

注：**表示极显著（$P < 0.01$），* 表示显著（$P < 0.05$）

Note: **represents highly significant ($P < 0.01$), *represents significant ($P < 0.05$).

2.4.2.4 响应曲面与等高线分析

依据回归拟合函数以及各因素对牦牛骨脱脂率的影响，每 2 个因素对牦牛骨脱脂率画出响应面和等高线图，考虑到定性分析各因素对牦牛骨脱脂率的关系，固定另外 1 个因素时，均作“0”水平处理。图 2 为各因素交互作用的响应面和等高线图。

对牦牛骨脱脂率影响显著的因素，表现为等高线密集、曲线较陡，响应值变化较大；反之，等高线疏松、响应曲面较为平滑，响应值变化较小（李少博, 2017）。因此由图可以判断各因素对响应值的影响程度为：$A > C > B$；2 因素之间的交互作用较弱。

由于无法直接从响应曲面上确定最佳工艺参数，需要利用 Design-expert 软件对回归方程进一步分析。考虑到能耗，在脱脂率大于 91%的情况下选择能耗最低的最佳工艺参数：超声功率 499.86 W、超声时间 30.7 min、液料比（v : m）5.99，模型预测在此条件下的理论脱脂率为 91.02%。为验证结果可靠性，考虑到实际操作便利性和成本问题，验证工艺参数修正为：超声功率 500 W、超声时间 30 min、液料比（v : m）为 6。3 次重复验证后，得到实际脱脂率为 92.00 ± 0.20%，验证值与预测值的相对误差为 1.08%，即表明验证值与模型预测值基本接近，优化结果具有可靠性。

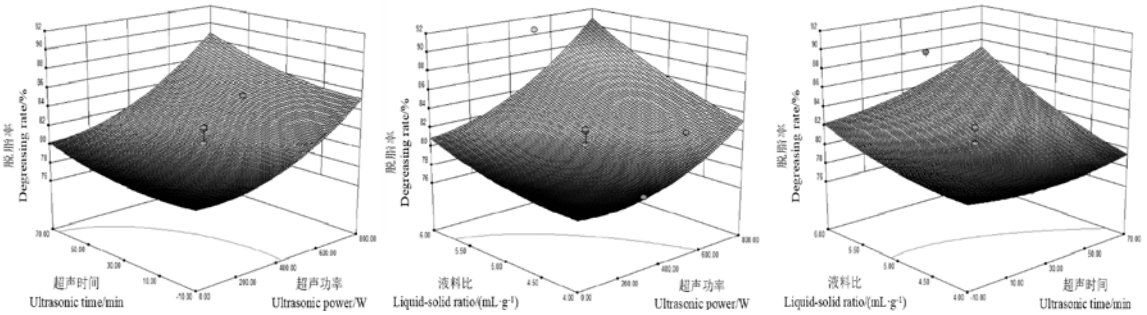


图 2.2　*AB*、*AC*、*BC* 交互作用对牦牛骨脱脂率的影响

Fig.2.2 Effect of the interaction of various factors of *AB*, *AC* and *BC* on degreasing rate of YB

2. 4. 3 不同脱脂方式结果分析

2.4.3.1 脂肪、蛋白质和胶原蛋白含量比较分析

将牦牛骨分别采用超声波法和蒸煮法进行脱脂处理，获得结果如图 2.3 所示。超声波法和蒸煮法所获得的牦牛骨脱脂率分别为 92.00%、71.25%；经脱脂处理后，牦牛骨中总蛋白具有不同程度的流失，超声波法和蒸煮法蛋白流失率分别为 8.11%、13.28%，其中胶原蛋白流失率分别为 11.05%、18.40%。2 种不同处理方法都会对牦牛骨中蛋白质造成一定程度的流失，牦牛骨经超声波处理后，其中部分与酯类结合的蛋白质随着油脂的溶出而流失；除与酯类结合的蛋白质，牦牛骨中还存在少量水溶性蛋白质，并且高温高压条件下蛋白质三螺旋结构解体，骨组织被破坏，导致牦牛骨蛋白质流失率增大（肖厚荣, 2016）。

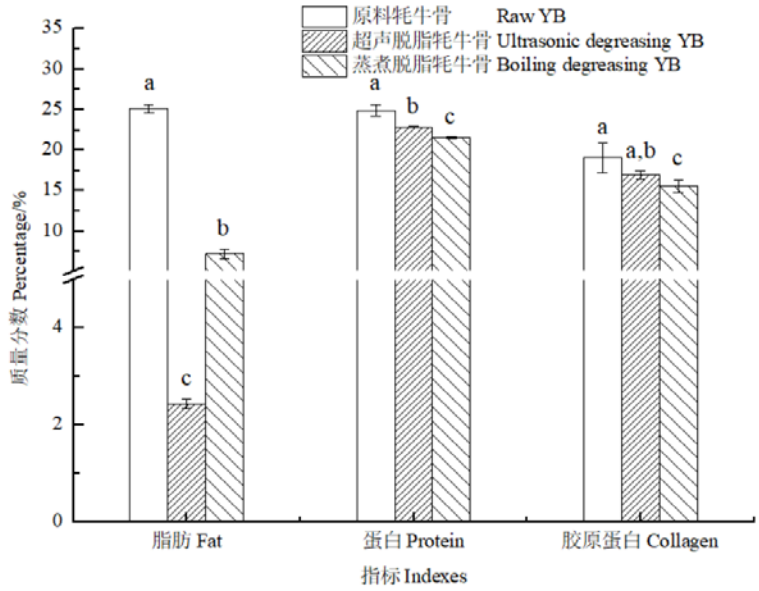


图 2.3 不同脱脂方法对牦牛骨中脂肪含量、总蛋白含量以及胶原蛋白含量的影响

Fig.2.3 Effect of different degreasing methods on fat, protein and collagen content of YB

2.4.3.2 矿物质含量结果分析

利用电感耦合等离子体质谱法对经两种方法处理的脱脂牦牛骨中 P、Ca 等 12 种矿物质含量测定，结果如表 2.7 所示。经高压蒸煮处理的牦牛骨中 Na、K、Fe、Mn 等元素流失严重，经计算计算得流失率分别可达 19.00%、58.95%、14.32%、20.86%，这可能由于牦牛骨经过高压高温处理后，部分蛋白质结构解体，骨组织变得疏松多孔，矿物质得以释放并以离子形式游离到水中（李少博, 2017）而流失；经超声波处理的牦牛骨，Fe、Zn、Mn 等元素亦存在流失现象，流失率分别为 18.66%、2.18%、15.04%，这可能与乙酸乙酯具有一定溶解金属元素的能力有关。但 2 种脱脂牦牛骨中 P、Ca、Mg、Cu、Se、Mo、Sr 等元素与原料骨中的含量无明显差异，这可能由于该类元素存在于羟基磷灰石中并与蛋白质紧密结合，很难以离子的形式游离出来。由此，与高压蒸煮相比，超声脱脂法能显著降低矿物质流失率（$P < 0.05$），能够更大程度地保留骨粉中的矿质元素。

表 2.7 牦牛骨矿物质含量

Table 2.7 Mineral contents of YB

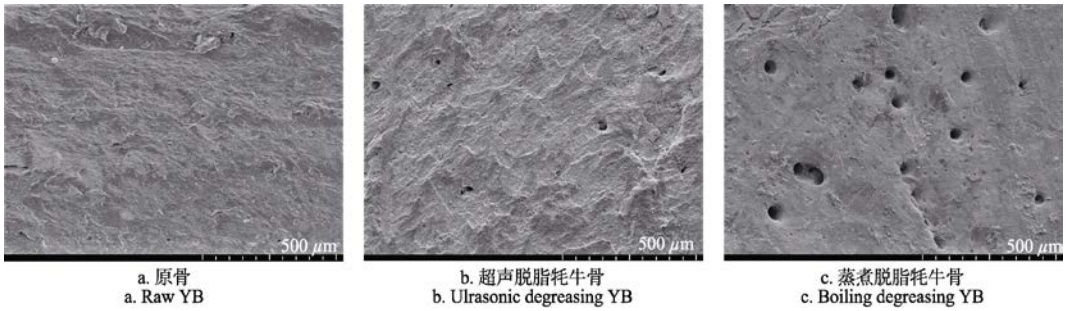
矿物质种类 Minerals	含量 Contents/(mg·kg^{-1})		
	原料骨 Raw bone	超声脱脂牦牛骨 Ultrasonic degreasing YB	蒸煮脱脂牦牛骨 Cooking degreasing YB
P	89 653.10 ± 1 262.75^{a}	83 209.23 ± 16 161.28^{a}	84 597.92 ± 3 250.30^{a}
Ca	180 239.99 ± 4 076.37^{a}	182 719.95 ± 3 439.33^{a}	185 979.29 ± 5 456.89^{a}
Na	5 289.13 ± 126.33^{b}	5 319.92 ± 61.93^{b}	4 284.67 ± 76.36^{a}
Mg	3 207.31 ± 34.64^{a}	3 255.34 ± 33.23^{a}	3 237.32 ± 62.12^{a}
K	354.39 ± 3.09^{b}	340.18 ± 4.82^{b}	145.48 ± 3.67^{a}
Fe	27.13 ± 3.95^{b}	22.01 ± 2.35^{a}	23.24 ± 0.67^{a}
Zn	61 255.93 ± 884.68^{b}	59 919.20 ± 652.35^{a}	61 271.02 ± 448.54^{b}
Mn	0.472 ± 0.052^{b}	0.401 ± 0.014^{a}	0.374 ± 0.060^{a}
Cu	0.223 ± 0.031^{a}	0.214 ± 0.300^{a}	0.203 ± 0.017^{a}
Mo	0.143 ± 0.005^{a}	0.137 ± 0.004^{a}	0.139 ± 0.008^{a}
Sr	174.90 ± 6.48^{a}	177.52 ± 2 .43^{a}	168.81 ± 2.71^{a}

注：结果以平均值±标准差表示，a~c 为不同样品间存在显著差异（$P < 0.05$）。

Note: Results are indicated by mean ± standard deviation, and a~c indicate significant differences between different samples at 5% level.

2.4.3.3 牦牛骨微观结构分析

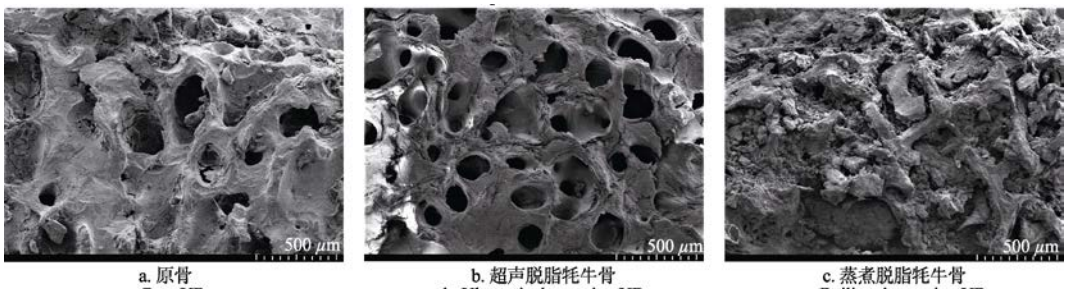
选取经不同方法处理的牦牛骨，并对其股骨头和股骨体 2 部分结构进行比较分析，扫描电镜结果如图 2.4 所示。经 2 种方法处理后，牦牛骨在油脂减少的同时，其结构由致密、规则变得疏松、多孔。经超声脱脂处理后，一方面分布在骨结构中的油脂被溶出，使缝隙、孔洞等原有结构更明显突出，另一方面由于超声波产生的空化效应和机械振动作用，骨结构产生一定疏松，孔隙增加。经蒸煮脱脂处理后，股骨体孔洞明显增加，股骨头产生一定程度的破碎，这可能是由于高温打断了胶原蛋白分子内氢键使其三螺旋结构解体（Arnoczky *et al.*, 2000），并进一步破坏了与矿物质的结合（Shimp *et al.*, 2008），这也可能是造成矿质元素流失严重的原因之一。



a. 原骨
a. Raw YB
b. 超声脱脂牦牛骨
b. Ulrasonic degreasing YB
c. 蒸煮脱脂牦牛骨
c. Boiling degreasing YB

a. .股骨体

a. Corpus ossis femoris



a. 原骨
a. Raw YB
b. 超声脱脂牦牛骨
b. Ulrasonic degreasing YB
c. 蒸煮脱脂牦牛骨
c. Boiling degreasing YB

b. 股骨头

b. Caput ossis femoris

图 2.4 不同脱脂方法对牦牛骨微观结构的影响

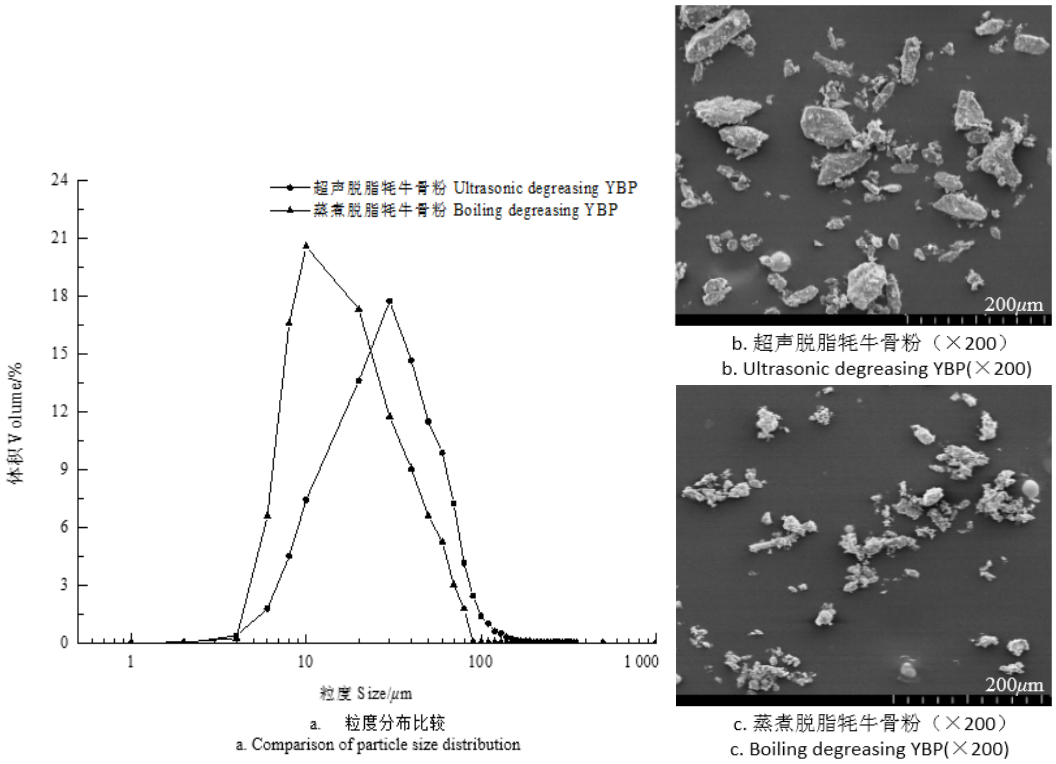
Fig.2.4 Effect of different degreasing methods on microstructure of YB

2.4.4 不同脱脂方式制备骨粉结果分析

2.4.4.1 骨粉粒径分布及微观形态比较分析

利用粒度分析仪对经 2 种方法处理制备的牦牛骨粉进行粒径分布比较分析，结果如图 2.5a 所示。经球磨后，超声脱脂牦牛骨粉中值粒径为 35.84 ± 0.60 μm，90%颗粒分布在 75 μm 以内；蒸煮脱脂牦牛骨粉中值粒径为 11.73 ± 0.29 μm，90%颗粒分布在 40 μm 以内。蒸煮脱脂牦牛骨粉粒径要显著小于超声脱脂牦牛骨粉，分布宽度窄，这是因为牦牛骨经高压高温处理后，其结构遭到破坏，变得更为疏松多孔，从而更利于超微粉碎的进行（杨红, 2015）。

对经 2 种方法处理的牦牛骨粉进行扫描电镜分析，结果如图 2.5bc 所示。蒸煮脱脂牦牛骨粉粒径较小，分布更均匀，大多呈现椭圆形，形状更加规则；超声脱脂牦牛骨粉粒径分布范围较广，存在形状不规则的大颗粒。与牦牛骨扫描电镜图和粒径分布图结果一致。



a.　粒度分布比较
a. Comparison of particle size distribution

b. 超声脱脂牦牛骨粉（×200）
b. Ultrasonic degreasing YBP(×200)

c. 蒸煮脱脂牦牛骨粉（×200）
c. Boiling degreasing YBP(×200)

图 2.5 牦牛骨粉粒度分布及微观形态比较分析

Fig.2.5 Comparison of particle size distribution and microstructure of YBP

2.4.4.2 骨粉化学结构及钙离子释放度分析

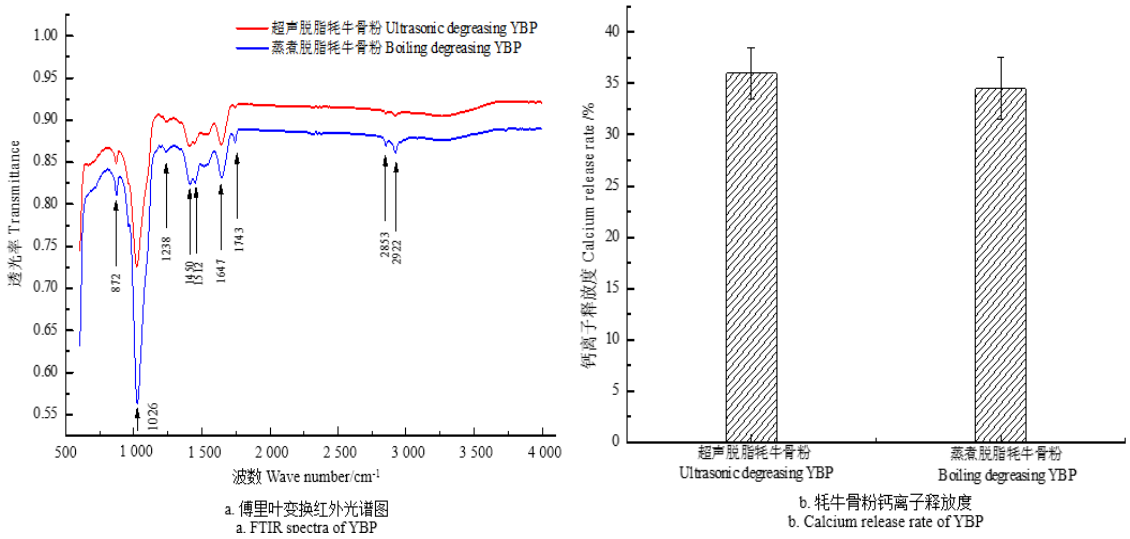
傅里叶红外图谱是可有效区分物质差异包括指纹区（600～1 300 cm^{-1}）和官能区（1 300～4 000 cm^{-1}）。指纹区可反映单键伸缩振动和变形振动，吸收峰因分子结构不同而产生差异（韩克光, 2015）；官能区为高频区，被用来检测官能团种类及变化（俞园园, 2013）。

对经 2 种不同方法处理的牦牛骨粉进行傅里叶红外扫描分析，结果如图 2.6a 所示。872 cm^{-1} 是 CO_3^{2-}的弯曲振动吸收峰，为 CO_3^{2-}进入羟基磷灰石晶格取代 PO_4^{3-}的特征吸收峰（Yin *et al*., 2015; 阮孝慈, 2017; Khoo *et al*., 2015），1 450、1 512 cm^{-1} 是 CO_3^{2-}的拉伸振动吸收峰（Bonadio *et al*., 2013），1 026 cm^{-1} 为 PO_3^{-1} 的对称伸缩振动（任灿, 2017）；1 238 cm^{-1} 属酰胺Ⅲ带，是 C-N 伸缩振动和 N-H 弯曲振动，以及甘氨酸主链脯氨酸侧链上-CH_2 的非平面摇摆振动的特征吸收峰；1 600~1 700 cm^{-1} 多肽主链上 C=O 伸缩振动，1 647 cm^{-1} 属酰胺 I 带吸收峰；1 743 cm^{-1} 为酯类 C=O 伸缩振动峰，为骨油吸收峰（阮孝慈，2017）；2 854 和 2 927 cm^{-1} 的吸收峰是 C-H 有机物拉伸振动吸收峰（阮孝慈, 2017; Boutinguiza *et al*., 2012）。

由图 2.6a 可得，2 种脱脂牦牛骨粉化学结构大体相同，皆以磷酸盐和碳酸盐为主，含有少量的有机物；超声脱脂牦牛骨粉在 1 743、2 853、2 922 cm^{-1} 处无明显峰值，这可能是由于其油脂去除完全，而蒸煮脱脂牦牛骨粉中残留脂肪高，出现明显峰值。

通过对牦牛骨粉钙离子释放度进行测定，结果显示二者钙离子释放度无显著差异（$P > 0.05$）（如图 2.6b 所示）。研究表明 75 μm 牦牛骨粉钙离子释放度大于 100 μm 骨粉钙释放度（肖厚荣, 2016），但小于 75 μm 牦牛骨粉不同粒径之间钙离子释放度是否存在差异尚未见报道。本研究中，牦牛骨经超声脱脂和蒸煮脱脂后制备 2 种脱脂骨粉的中值粒径分别为 35.84 μm 和 11.73 μm，两

者分布宽度窄、差距相对较小，因而可能导致其钙离子释放度差异不显著（$P > 0.05$）。这一结果同样表明利用高效超声脱脂工艺处理制备的牦牛骨粉粒径虽然大于蒸煮脱脂牦牛骨粉粒径，但并不会显著影响钙离子释放度（$P > 0.05$），说明该种脱脂工艺具有可行性。另外，蒸煮脱脂牦牛骨粉的脂肪含量（8.81% ± 0.65%）显著高于超声脱脂牦牛骨粉（3.16% ± 0.03%）（$P < 0.05$），较高残留脂肪可能会影响钙离子的释放，从而导致两种骨粉的钙离子释放度没有显著差异（$P > 0.05$）。



a. 傅里叶变换红外光谱图 a. FTIR spectra of YBP　　b. 牦牛骨粉钙离子释放度 b. Calcium release rate of YBP

图 2.6 牦牛骨粉化学结构及钙离子释放度的比较

Fig.2.6 Comparison of chemical structure and calcium release rate of YBP

2.5 小结

本文通过响应面法对牦牛骨超声脱脂参数进行了优化，并比较分析了超声脱脂法和蒸煮脱脂法对制备骨粉的影响，得出以下结论：

1）超声脱脂参数优化各因素对脱脂率的影响顺序为：超声功率>液料比>超声时间，其中超声功率和液料比对脱脂率有极显著影响，但两两因素间无明显交互作用；超声脱脂的最佳参数：超声功率 500 W、超声时间 30 min、液料比（v : m）为 6，在此条件下脱脂率为 92.00 ± 0.20%。

2）超声脱脂率显著高于蒸煮脱脂率（$P < 0.01$），超声脱脂可以更大程度地保留蛋白质、矿物质等营养成分（$P < 0.01$）。

3）超声脱脂后制得骨粉中值粒径（35.84 ± 0.60 μm）高于蒸煮脱脂后制得骨粉中值粒径（11.73 ± 0.29 μm）；两种骨粉化学结构和钙离子释放度不存在显著差异。

结果表明，该研究提供了一种高效脱脂的方法，可为改善牦牛骨和其他畜禽骨骨粉加工工艺及提高骨粉品质提供参考。

第三章 不同粒径牦牛骨粉理化特性及消化特性研究

3.1 引言

目前，关于骨粉粒径的研究主要集中在鱼骨、兔骨两种原料。Wu 等（2012）人采用研磨-气流喷射法经过筛获得了 6 种不同粒径鱼骨粉，其粒径分别为> 500 μm，300～500 μm，150～300 μm，75～150 μm，50～75 μm，7.65 μm，研究发现其蛋白质溶解度以及钙离子释放度皆随粒径减小而增大；Tao（2016）利用干法球磨法和湿法球磨法分别制得了中值粒径为 1.75 μm 和 115.3 nm 的鱼骨粉，粒径降低可增加钙离子释放度和凝胶强度；李少博等（2017）人以兔骨为原料采用逐步过筛法制备了中值粒径分别为 236.01 μm、65.92 μm、21.89 μm 和 502.52 nm 的 4 种骨粉，结果发现其基本成分含量存在差异且粒径越小钙离子释放度越大；李亚杰等（2017）人采用湿法球磨法制备骨液，发现随球磨时间延长，其游离氨基酸以及钙离子释放度都呈现增加趋势。一般来说，骨粉粒径越小，其孔隙越多、表面积越大，并具有更好的分散性和溶解性（尹涛, 2015），故而大家普遍追求粒径最小化。当降低粒度到纳米级还会引起不同于常规颗粒的特性，如粒度效应、小尺寸效应、表面效应等（Augustin & Oliver, 2012）。然而，被普遍应用于制备纳米鱼骨粉的湿法球磨法等方法并不适用于牦牛骨，牦牛骨质地坚硬，很难被破碎到纳米级别，程妍（2009）利用高温高压蒸煮-酶解法制备了 13 μm 的牦牛骨粉。并且，以传统过筛法获得的为非全骨粉，不能充分利用骨骼亦不具有代表性。关于粒径对骨粉的影响目前仍止步于理化特性研究，关于消化特性现有研究，尤其关于牦牛骨粉的粒径研究，目前仍鲜有报道。本试验旨在探究不同粒径牦牛全骨粉的理化特性和消化特性。

3.2 试验材料

3.2.1 材料与试剂

原料骨：随机选取青藏牦牛 6 头（2～3 岁），屠宰后取其股骨（剔除软骨、碎肉、筋等杂质），粉碎至 5～10 mm 保存于-20 ℃备用。

实验所需试剂如表 3.1 所示。

表 3.1 实验所需试剂

Table 3.1 The reagents for the experiment

试剂名称	化学式	生产厂家
碳酸氢钠	$NaHCO_3$	国药集团化学试剂有限公司
氯化钾	KCl	国药集团化学试剂有限公司
氯化钙	$CaCl_2$	国药集团化学试剂有限公司
氯化镁	$MgCl_2$	国药集团化学试剂有限公司
盐酸	HCl	国药集团化学试剂有限公司
乙酸	CH_3COOH	国药集团化学试剂有限公司

（续表 3.1）

试剂名称	化学式	生产厂家
浓硫酸	H_2SO_4	国药集团化学试剂有限公司
高氯酸	$HClO_4$	国药集团化学试剂有限公司
异丙醇	$(CH_3)_2CHOH$	国药集团化学试剂有限公司
硝酸	HNO_3	国药集团化学试剂有限公司
无水乙酸钠	CH_3COONa	国药集团化学试剂有限公司
一水柠檬酸	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	国药集团化学试剂有限公司
正丙醇	$CH_3CH_2CH_2OH$	国药集团化学试剂有限公司
氯胺 T	$C_7H_8ClNN_aO_2S$	国药集团化学试剂有限公司
对二甲氨基苯甲醛	$C_9H_{11}NO$	国药集团化学试剂有限公司
氧化镧	La_2O_3	国药集团化学试剂有限公司
碳酸钙	$CaCO_3$	国药集团化学试剂有限公司
α 淀粉酶（A3176）		美国 sigma 公司
胃蛋白酶（P6887）		美国 sigma 公司
胰液素（P1750）		美国 sigma 公司
胆汁提取物（B8631）		美国 sigma 公司
牛血清蛋白		美国 sigma 公司
细胞色素 C		美国 sigma 公司
抑肽酶		美国 sigma 公司
四肽 GGYR		美国 sigma 公司
三肽 GGG		美国 sigma 公司

3.2.2 仪器与设备

实验所需仪器设备如表 3.2 所示。

表 3.2 实验所需设备

Table 3.2 The Equipment needed for the experiment

仪器名称	型号	生产厂家
紫外分光光度计	T6	北京普析通用仪器有限责任公司
高速万能粉碎机	FW 100	天津泰斯特仪器有限公司
行星式球磨仪	XQM-2	长沙天创粉末技术有限公司
离子溅射喷金仪	Eiko IB．5	日本 Hitachi 公司
场发射环境扫描电子显微镜	Quanta 200 FEG	北京国家纳米中心提供
冷冻离心机	Allegra X-12R	美国 Beckman Coulter 有限公司
高速低温离心机	X-12	美国贝克曼库尔特公司
超声清洗器	YQ1001C	上海易净超声波仪器有限公司
脂肪测定仪	SER148	意大利 VELP 公司

（续表 3.2）

仪器名称	型号	生产厂家
全自动凯氏定氮仪	KJELTEC2300	丹麦 FOSS 公司
傅里叶近红外光谱分析仪	TENSOR 27	瑞士 Bruker 公司
氨基酸分析仪	L8900 AA	日本 Hitachi 有限公司
液相色谱仪	1200	美国 Agilent 公司
实时喷雾测量仪	Helos-kr	德国 Sympatec 公司
体外模拟消化系统	GI20	澳大利亚 NI 公司

3.3 试验方法

3.3.1 不同粒径骨粉制备工艺

牦牛腿骨→剔除杂质→初步粉碎（5～10 mm）→称样→超声脱脂处理→溶剂回收→38 ℃条件下通风干燥 12 h→粗粉碎（60～100 目）→超微粉碎。

3.3.2 牦牛骨粉粒径分布、微观结构、化学结构以及色泽分析

粒度分布：牦牛骨粉的粒度分布采用 HELOS-KR 实时喷雾测量仪测定，骨粉的平均粒径采用中值粒径 D_{50} 表示。

微观形态参考方法 2.3.4.1。

化学结构参考方法 2.3.4.2。

色泽分析：采用电子眼分析。

3.3.3 不同粒径牦牛骨粉基本成分测定

参考方法 2.3.1。

3.3.4 持水力测定

持水力测定参考 Wu 等（2012）的方法。离心管称重 m_1，样品 m_2，按照 0.05 : 1 分散入水中，60 ℃水浴（10，20，30，40，50 min），取出于冷水中放置 30 min，4 500 rpm 离心 20 min，弃上清，称重得 m_3。

计算公式为：$WHC(g/g)=(m_3-m_2-m_1)/m_2$

3.3.5 蛋白质溶解度测定

蛋白质溶解度测定参考 Wu 等的方法（2012）将骨粉按比例 0.05 : 1 准备称量于离心管（1 g/20 g water），震荡混匀，划出液面线，94-100 ℃水浴（10，20，30，40，50，60，70，80，90，100

min），加水补至液面线处，冷水中冷却 30 min 至室温，4500 rpm 离心 20 min，取上清采用福林试剂法进行蛋白含量测定。计算公式如下：

$$PS(\%) = \frac{C_{i1}}{C_{i0}} \times 100$$

其中 c_{i1} 为上清液的蛋白质含量(mg)，c_{i0} 为 YBP (g)中蛋白质的总含量，PS 为 YBP 的蛋白质溶解度。

3.3.6 体外模拟胃肠道消化试验

骨粉消化实验在体外消化系统 GI20 进行，参数设置参考(Infogest, 2014; Minekus *et al.*, 2014; Lotti Egger *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018)的方法，并进行了一些修改。动态体外消化系统是根据成年人的胃肠道消化条件而设定，包括口、胃、肠三个阶段，可重现生理过程。消化液配制如表 3.3 所示，动态体外消化系统运行参数如表 3.4 所示。口腔、胃部、肠道分别设置消化 2 min、90 min、120 min，口腔消化调整 α 淀粉酶浓度为 250 U/mL，胃部消化使最终胃蛋白浓度为 2 000 U/mL，肠道消化使胰液素以及胆汁提取物的最终浓度分别为 1 mg/mL、10 mM，消化液的最终体积为 40 mL。整个消化过程都在 37 ℃ 条件下进行，并以 85 rpm 的搅拌速度模拟咀嚼和胃肠道蠕动情况。消化结束后，煮沸 3 分钟使停止反应。每个样品做 3 次重复。

表 3.3 消化液配制表

Table 3.3 The composition of digestion juices

缓冲液	pH	酶	试剂
Buffer 1	7		$NaCO_3$（14.4 mM），KCl（21.1 mM），$CaCL_2$（1.59 mM），$MgCl_2$（0.2 mM）
Buffer 2	2		HCl
Buffer 3	6		乙酸，NaOH，$CaCL_2$（4 mM），$MgCl_2$（0.05 mM）
Buffer 4			$NaHCO_3$（1M）
Buffer 5			乙酸，NaOH，$CaCL_2$（4 mM），$MgCl_2$（0.05 mM）
酶 A	7	α 淀粉酶（250 U/mL）	Buffer 1
酶 B	2	胃蛋白酶（2 500 U/mL）	Buffer 2
酶 C	6	胰液素（2 mg/mL），胆汁提取物（20 mM）	Buffer 3

表 3.4 体外消化系统参数表

Table 3.4 The parameters of digestion system *in vitro*

时间 time（min）	说明 Description	试剂 Reagent	流速/Flow rate 体积/Volume	葡萄糖 Glucose
0	蠕动泵 2	酶 A	10 mL/min	
	注射泵 1		4 mL	
2	蠕动泵 1	酶 B	20 mL/min	
	注射泵 1		16 mL	
90	注射泵 3	Buffer 4	0.3 mL	
	清洗		10 mL/min	
90	蠕动泵 1	酶 C	20 mL/min	
	注射泵 1		20 mL	√
105				√
120				√
150				√
210				√

3.3.7 蛋白质消化率及钙磷释放度

蛋白质消化率（PD）参考王娟（2008）的方法，并稍作修改。蛋白质消化率计算公式如下：

$$PD(\%) = \frac{m_{i1}}{m_{i0}} \times 100$$

其中 m_{i1} 为上清液蛋白质含量（mg），m_{i0} 为 YBP 中蛋白质总含量（mg）。

参考 Yin 等(2015)的方法对骨粉进行钙、磷释放度测定。钙、磷释放度分别记为CR(mg/g_{YBP})、PR（mg/g_{YBP}）。

3.3.8 总氨基酸与游离氨基酸测定

参考 Sun 等（2015）人的方法利用色谱法对样品中的氨基酸进行测定。

3.3.9 肽分子量分布测定

肽分子量测定参考了 Irvine 等（1986）的方法。采用凝胶过滤柱 G2000 SWXL 300 mm × 7.8 mm ，流动相为乙腈/水/三氟乙酸（30/70/0.1，v / v / v），流速设置为 0.5 mL/min，温度为 37°C，进样量为 20 μL。分子量校准曲线（Y = x + 0.5323−7.4538, R^2 = 0.967）由下列标准品获得：牛血清白蛋白（66 446），细胞色素 C（12 355 Da），抑肽酶（6 511 Da），四肽 GGYR（451 Da）和三肽 GGG（189 Da）。数据分析采用凝胶渗透色谱软件。

3.3.10 数据处理方法

数据分析方法同 2.3.5，并运用 Origin 8.0 和 Heml 1.0 作图。

3.4 数据讨论

3.4.1 粒径分布、微观形态及化学结构分析

本实验利用行星式球磨仪对粗粉碎后的脱脂牦牛骨粉（60～100 目）进行超微粉碎。为探究粒径对骨粉理化特性以及消化特性的影响，本实验首先通过分析在 400 rpm、1: 3（v : v）的条件下球磨不同时间的骨粉粒径，进而选取 5 种不同中值粒径骨粉进行后续实验。结果（如图 3.1A）发现粒径随时间延长逐渐减小，并且当球磨 8 小时骨粉中值粒径可达 9.96 ± 0.37 μm，随时间进一步延长再无显著变化（$P > 0.05$）。经分析，最终选取 0、1.5、3、5、8 小时 5 个时间点制备骨粉，分别命名为 D_{0h}、$D_{1.5h}$、D_{3h}、D_{5h}、D_{8h} 五种骨粉，其中值粒径分别为 128.37 ± 0.64 μm，96.73 ± 0.57 μm，76.65 ± 0.49 μm，49.94 ± 0.41 μm，19.92 ± 0.34 μm，粒径分布如图 3.1c 所示。并且电镜结果显示，中值粒径越小，骨粉颗粒形状越均一、规则，粒径分布范围窄，这与粒径分布图结果一致。

为探究粒径对牦牛骨粉化学结构是否产生影响，在 400～4 000 cm^{-1} 范围内对两种骨粉进行傅里叶红外图谱扫描，结果如图 3.1B 所示。

559 cm^{-1} 和 604 cm^{-1} 为骨粉羟基磷灰石中 PO_3^{-4} 的弯曲振动吸收峰，870 cm^{-1} 是 CO_3^{2-}的弯曲振动吸收峰，为 CO_3^{2-}进入羟基磷灰石晶格取代 PO_4^{3-}的特征吸收峰（Yin *et al.*, 2015; Khoo *et al.*, 2015），1 456、1 549 cm^{-1} 是 CO_3^{2-}的拉伸振动吸收峰（Bonadio *et al.*, 2013），1 022 cm^{-1} 为 PO_3^{-1} 的对称伸缩振动；1 240 cm^{-1} 属酰胺Ⅲ带，是 C–N 伸缩振动和 N–H 弯曲振动，以及甘氨酸主链脯氨酸侧链上–CH_2 的非平面摇摆振动的特征吸收峰；1 600~1 700 cm^{-1} 多肽主链上 C=O 伸缩振动，1 662 cm^{-1} 属酰胺 I 带吸收峰；1 747 cm^{-1} 为酯类 C=O 伸缩振动峰，为骨油吸收峰；2 853 和 2 924 cm^{-1} 的吸收峰是 C–H 有机物拉伸振动吸收峰（Boutinguiza *et al.*, 2012），而 3 308 cm^{-1} 处的宽峰则与骨粉中水分有关。结果显示，不同粒径牦牛骨粉的红外扫描图谱出峰位置基本一致，在球磨的过程中不产生新的物质，即表明粒径不会造成骨粉在化学结构上的差异性。

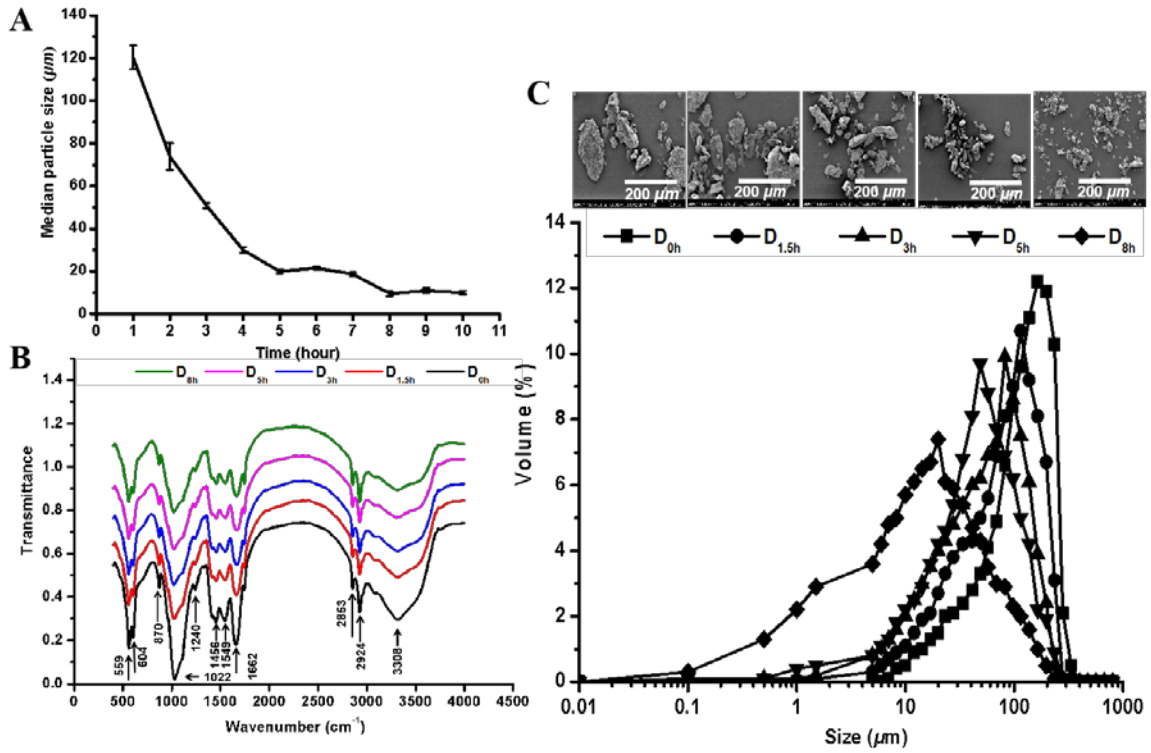


图 3.1 粒径分布、微观结构及化学结构

Fig. 3.1 Analysis of particle size distribution, microstructure and chemical structure

3.4.2 色泽分析

色泽是影响骨粉的重要直观指标之一。为研究粒径对骨粉色泽的影响，本试验通过电子眼对骨粉的亮度值 L*、红度值 a*及黄度值 b*进行分析。结果如图 3.2 所示，随着粒径减小，骨粉红度值（a*）、黄度值（b*）呈下降趋势，亮度值（L*）不断上升，且不同骨粉间红度值和亮度值皆存在显著性差异（$P < 0.05$）。其中，骨粉 D_{8h} 的 L*值、a*值、b*值分别为 87.36 ± 0.18、1.98 ± 0.06、8.70 ± 0.16，与其它骨粉间皆存在显著性差异（$P < 0.05$）。结果证明，粒径的改变会引起影响骨粉色泽变化，粒径越小，骨粉的亮度值越高，红度值和黄度值越小。色泽是产品感官评价的一个重要因素，对于消费者感官评价食品品质具有重要影响。

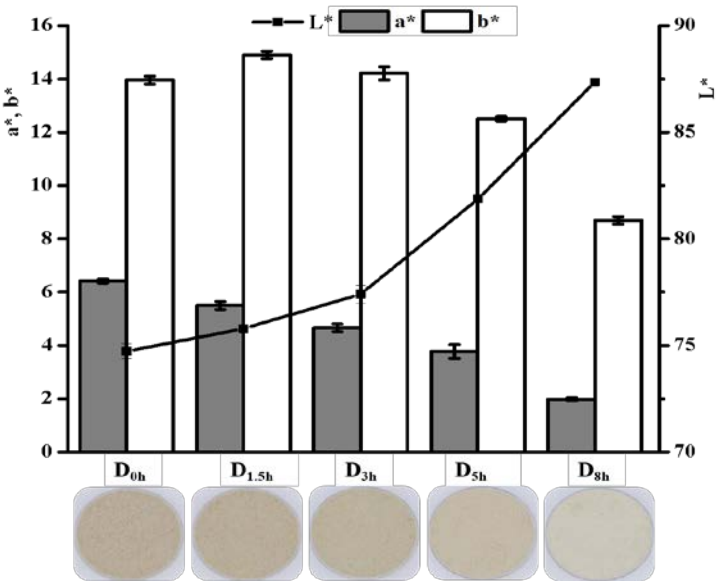


图 3.2 粒径对骨粉色泽的影响

Fig. 3.2 Effect of particle size on color of YBP

3.4.3 基本成分含量分析

为探究粒径对牦牛骨粉基本成分的影响，该部分对不同粒径骨粉中水分、蛋白质、脂肪、灰分、碳水化合物以及羟脯氨酸进行了测定。结果如表 3.5 所示，5 种骨粉的水分、蛋白质、脂肪、灰分、碳水化合物含量皆不存在显著性差异（$P > 0.05$），随着球磨时间的延长和粒径的减小，骨粉主要含有成分不产生变化，这与傅里叶红外光谱图结果一致。羟脯氨酸是胶原蛋白的标志性氨基酸，因此常以羟脯氨酸含量衡量样品中胶原蛋白。经测定发现，不同骨粉中羟脯氨酸的含量基本一致，可达 2.6%左右，粒径对羟脯氨酸不产生显著影响（$P > 0.05$）。此外，该法制备的牦牛骨粉脂肪含量仅为 4%左右，而蛋白质含量高，可达 30%左右。

表 3.5 不同粒径牦牛骨粉基本成分含量表

Table 3.5 The basic component contents of YBP with different particle sizes

	水分 Moisture(%)	蛋白质 Protein(%)	脂肪 Fat(%)	灰分 Ash(%)	碳水化合物 Carbohydrate (%)	羟脯氨酸 Hydrocyproline (%)
D_{0h}	2.97 ± 0.13^a	30.15 ± 0.21^a	4.00 ± 0.08^a	60.06 ± 0.15^a	2.83 ± 0.14^a	2.62 ± 0.06^a
$D_{1.5h}$	2.99 ± 0.08^a	30.17 ± 0.34^a	3.96 ± 0.13^a	60.16 ± 0.08^a	2.72 ± 0.47^a	2.56 ± 0.13^a
D_{3h}	2.97 ± 0.22^a	30.49 ± 0.06^a	3.87 ± 0.05^a	59.95 ± 0.15^a	2.73 ± 0.25^a	2.58 ± 0.09^a
D_{5h}	3.00 ± 0.20^a	30.31 ± 0.30^a	3.86 ± 0.11^a	59.98 ± 0.29^a	2.86 ± 0.50^a	2.62 ± 0.15^a
D_{8h}	3.07 ± 0.31^a	30.08 ± 0.27^a	4.01 ± 0.12^a	59.42 ± 0.52^a	2.71 ± 0.60^a	2.53 ± 0.10^a

注：结果以平均值 ± 标准差表示，a~c 为不同样品间存在显著差异（$P < 0.05$），下同。

Note: Results are indicated by mean ± standard deviation, and a~c indicate significant differences between different samples at 5% level, the same below.

3.4.4 总氨基酸及主要矿物质含量分析

为探究不同粒径牦牛骨粉氨基酸含量的差异，本试验通过氨基酸分析仪对样品进行了分析。结果如表 3.6 所示，谷氨酸、苯丙氨酸及精氨酸在 D_{8h} 骨粉中的含量较低，其中显著低于骨粉 D_{0h}、$D_{1.5h}$（$P < 0.05$）。但随着粒径变化无明显变化规律，其它氨基酸含量在 5 种骨粉中皆无显著差异（$P > 0.05$）。粒径的改变对骨粉中氨基酸含量不产生明显的规律变化。此外，牦牛骨粉中甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、丙氨酸、精氨酸、脯氨酸含量皆大于 1%，其中甘氨酸含量最高，可达 3.6%以上，谷氨酸次之。

此外，经对骨粉中磷、钙、钠、镁、锌、钾、锰、铝、铁等 9 种主要矿物质进行测定，结果（表 3.7）表明各骨粉中主要矿物质含量无显著差异（$P > 0.05$），即表明粒径变化不对骨粉中磷、钙、钠、镁、锌、钾、锰、铝、铁等矿物质元素产生影响，骨粉在超微粉碎的过程中保持元素守恒。

表 3.6 不同粒径牦牛骨粉氨基酸含量表

Table 3.6 The amino acids contents of YBP with different particle sizes

氨基酸 Amino acids	含量 Percentage(%)				
	D_{0h}	$D_{1.5h}$	D_{3h}	D_{5h}	D_{8h}
天冬氨酸（Asp）	1.244 ± 0.025^{a}	1.217 ± 0.009^{a}	1.180 ± 0.100^{a}	1.270 ± 0.100^{a}	1.167 ± 0.043^{a}
苏氨酸（Thr）	0.458 ± 0.014^{a}	0.446 ± 0.001^{a}	0.440 ± 0.040^{a}	0.450 ± 0.050^{a}	0.432 ± 0.024^{a}
丝氨酸（Ser）	0.670 ± 0.025^{a}	0.654 ± 0.011^{a}	0.653 ± 0.050^{a}	0.657 ± 0.060^{a}	0.629 ± 0.051^{a}
谷氨酸（Glu）	2.392 ± 0.052^{ab}	2.338 ± 0.018^{bc}	2.260 ± 0.100^{bc}	2.507 ± 0.110^{a}	2.222 ± 0.084^{c}
甘氨酸（Gly）	3.949 ± 0.073^{a}	3.874 ± 0.005^{a}	3.760 ± 0.100^{a}	3.943 ± 0.367^{a}	3.626 ± 0.168^{a}
丙氨酸（Ala）	1.711 ± 0.031^{a}	1.681 ± 0.004^{a}	1.653 ± 0.068^{a}	1.753 ± 0.110^{a}	1.589 ± 0.069^{a}
半胱氨酸（Cys）	0.053 ± 0.003^{a}	0.051 ± 0.001^{a}	0.048 ± 0.008^{a}	0.050 ± 0.010^{a}	0.043 ± 0.004^{a}
缬氨酸（Val）	0.579 ± 0.001^{a}	0.567 ± 0.006^{a}	0.573 ± 0.031^{a}	0.597 ± 0.045^{a}	0.546 ± 0.049^{a}
甲硫氨酸（Met）	0.188 ± 0.003^{a}	0.191 ± 0.001^{a}	0.177 ± 0.006^{a}	0.187 ± 0.021^{a}	0.177 ± 0.008^{a}
异亮氨酸（Ile）	0.387 ± 0.001^{a}	0.382 ± 0.008^{a}	0.373 ± 0.006^{a}	0.380 ± 0.036^{a}	0.370 ± 0.003^{a}
亮氨酸（Leu）	0.887 ± 0.013^{a}	0.866 ± 0.005^{a}	0.637 ± 0.055^{b}	0.907 ± 0.060^{a}	0.842 ± 0.030^{a}
酪氨酸（Tyr）	0.360 ± 0.006^{a}	0.347 ± 0.008^{a}	0.340 ± 0.020^{a}	0.360 ± 0.017^{a}	0.339 ± 0.003^{a}
苯丙氨酸（Phe）	0.597 ± 0.012^{a}	0.576 ± 0.005^{ab}	0.567 ± 0.012^{ab}	0.593 ± 0.040^{a}	0.550 ± 0.002^{b}
赖氨酸（Lys）	0.835 ± 0.019^{a}	0.811 ± 0.001^{a}	0.800 ± 0.044^{a}	0.840 ± 0.061^{a}	0.778 ± 0.032^{a}
组氨酸（His）	0.218 ± 0.005^{a}	0.215 ± 0.003^{a}	0.203 ± 0.006^{a}	0.210 ± 0.017^{a}	0.209 ± 0.005^{a}
精氨酸（Arg）	1.537 ± 0.011^{a}	1.502 ± 0.005^{b}	1.527 ± 0.038^{a}	1.600 ± 0.100^{a}	1.414 ± 0.069^{b}
脯氨酸（Pro）	1.919 ± 0.022^{a}	1.874 ± 0.002^{a}	1.843 ± 0.040^{a}	1.920 ± 0.144^{a}	1.814 ± 0.049^{a}

表 3.7 不同粒径牦牛骨粉主要矿物质含量表

Table 3.7 The main minerals contents of YBP with different particle sizes

矿物质 Minerals	含量 Contents/(mg·kg^{-1})				
	D_{0h}	$D_{1.5h}$	D_{3h}	D_{5h}	D_{8h}
P	110 543.30 ± 577.79^a	110 730.72 ± 396.56^a	111 620.04 ± 179.84^a	108 534.73 ± 933.09^a	106 448.84 ± 124.49^a
Ca	223 197.62 ± 3235.74^a	222 262.02 ± 1359.13^a	221 267.64 ± 491.34^a	219 352.29 ± 3126.83^a	227 857.39 ± 685.98^a
Na	6 296.86 ± 49.10^a	6 347.48 ± 105.55^a	64 87.40 ± 16.65^a	6 361.65 ± 49.39^a	6 382.89 ± 20.69^a
Zn	85.01 ± 0.40^a	85.82 ± 0.20^a	87.58 ± 0.36^a	85.88 ± 0.50^a	87.28 ± 0.41^a
Mg	4 465.45 ± 50.46^a	4 506.17 ± 48.84^a	4 582.42 ± 17.94^a	4 469.87 ± 42.56^a	4 457.65 ± 26.69^a
K	841.89 ± 14.34^a	844.31 ± 17.23^a	853.00 ± 9.05^a	838.09 ± 5.69^a	840.74 ± 0.20^a
Mn	0.389 ± 0.023^a	0.358 ± 0.033^a	0.381 ± 0.016^a	0.417 ± 0.011^a	0.411 ± 0.001^a
Al	2.30 ± 0.20^a	2.32 ± 0.18^a	2.27 ± 0.67^a	2.27 ± 0.13^a	2.29 ± 0.05^a
Fe	43.30 ± 10.93^a	46.93 ± 2.16^a	45.01 ± 0.58^a	43.40 ± 19.33^a	47.88 ± 0.23^a

3.4.5 持水力分析

由于氨基酸中的氨基为亲水基团，富含蛋白质的骨粉常表现出较高的持水力。如图 3.3，通过在 60 ℃条件先水浴不同时间发现，小粒径骨粉表现出较强的持水性，其中骨粉 D_{8h} 的吸水力显著高于其它骨粉（$P < 0.05$）。这可能由于骨粉经过超微粉碎，颗粒比表面积增大，同时蛋白质暴露面积增大，其表面性质发生了剧烈的变化，如表面积和能量的增加。此外，随着时间的延长，骨粉充分与水接触，促进了蛋白水合，逐渐表现出更高的持水性，因而骨粉的持水力皆成上升趋势。其中骨粉 D_{8h} 水浴 10 min 时，其持水力为 0.973 g/g，而当水浴 50 min 时其持水力可达 1.10 g/g，但当水浴 50 min 时，骨粉 D_{0h}、$D_{1.5h}$、D_{3h}、D_{5h} 之间已无显著差异（$P > 0.05$）。

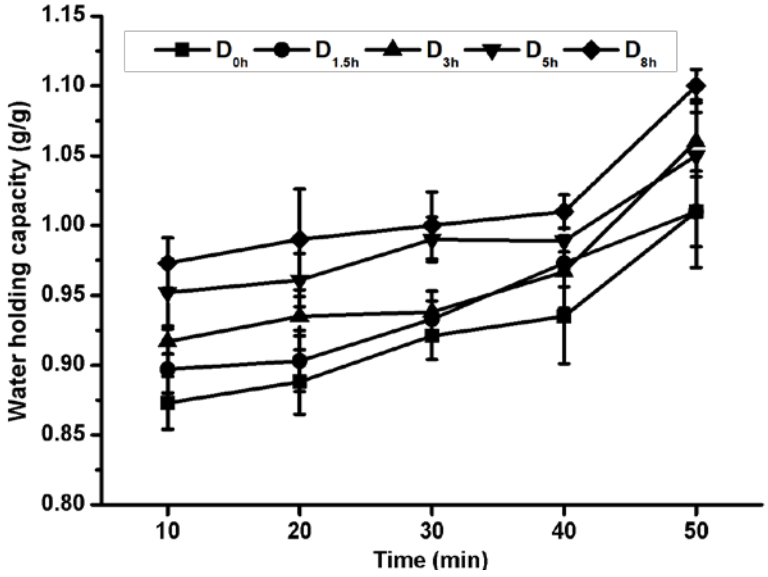


图 3.3 不同粒径牦牛骨粉的持水力

Fig. 3.3 WHC of YBP with different particle sizes

3.4.6 蛋白质溶解度分析

为探究粒径对骨粉中蛋白质溶解度的影响，本试验在 100 ℃条件下对样品水浴加热一定时间，并对上清中的蛋白质含量进行测定。结果如图 3.4 所示，粒径越小，骨粉的蛋白质溶解度越高。当水浴加热 10 min 时，骨粉 D_{8h} 的蛋白质溶解度为 7.71%，而骨粉 D_{0h} 的蛋白质溶解度仅为 4.47%，前者显著高于后者（$P < 0.05$）。这可能是小粒径骨粉比表面积大，蛋白暴露面积大，从而可充分与水接触并导致其溶解度高。此外，随着水浴时间的延长，不同骨粉的蛋白质溶解度皆呈上升趋势，这可能由于蛋白质逐渐水解并溶于水中。当水浴时间增加至 100 min 时，骨粉 D_{8h} 的蛋白质溶解度增至 12.3%，显著高于其它骨粉（$P < 0.05$），具有良好的蛋白质溶解度。

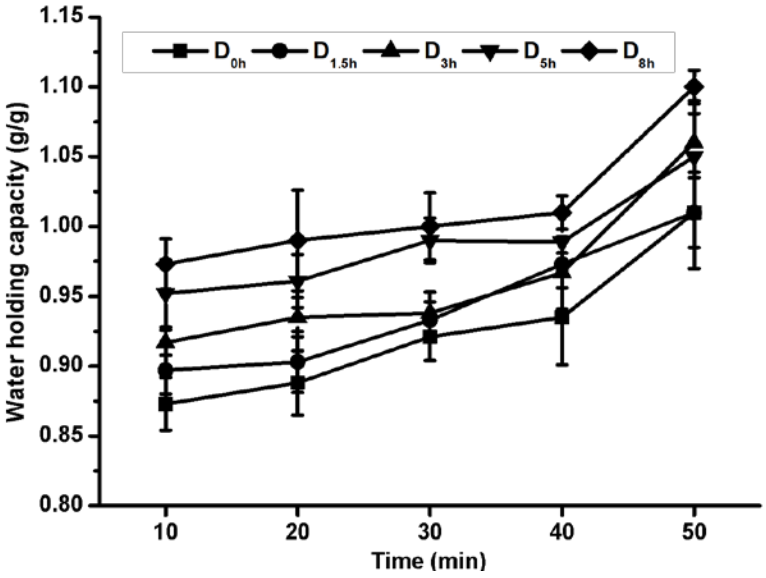
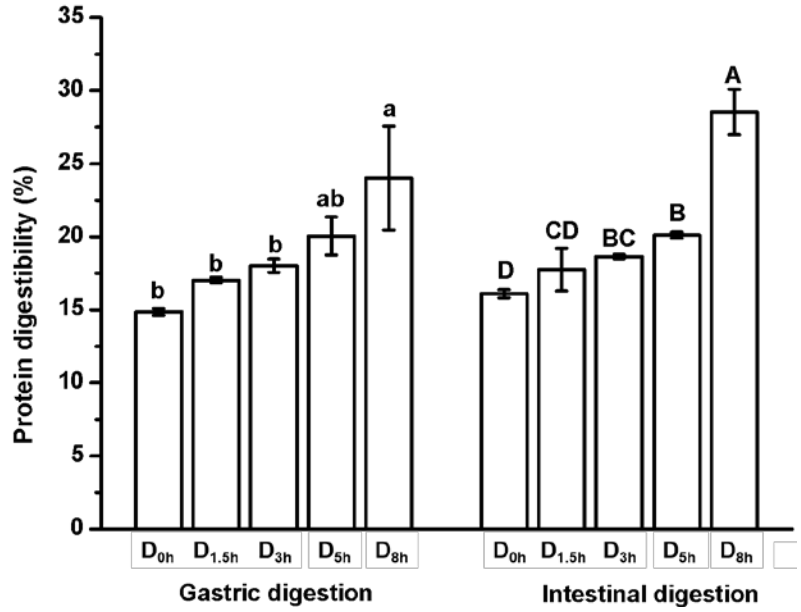


图 3.4 不同粒径牦牛骨粉的蛋白质溶解度

Fig. 3.4 Protein solubility of YBP with different particle sizes

3.4.7 蛋白质消化率分析

蛋白质消化率常作为判断食物消化特性的重要指标，尤其是富含蛋白质的食物。本试验利用凯氏定氮法对 5 种不同粒径骨粉的蛋白质消化率进行了测定。结果显示（图 3.5），随着粒径减小，蛋白质消化率明显升高，且胃、肠道消化结束后，骨粉 D_{8h} 的蛋白质消化率皆显著高于其它骨粉（$P < 0.05$），这可能是粒径越小，暴露的可消化蛋白越多，并且小粒径骨粉比表面积大，可增加与胃蛋白酶的接触，加快蛋白质的消化。但由胃部进入肠道后，蛋白质消化率无明显升高，这大概由于可消化的骨粉蛋白大部分已在胃部完成。肠道消化结束后，骨粉 D_{0h} 的蛋白质消化率为 16.10%，而骨粉 D_{8h} 的蛋白质消化率可达 28.53%，结果表明，粒径越小，骨粉蛋白质消化率越高。



注：不同小写字母（a~c）表示不同样品在胃部消化过程中存在显著差异（$P < 0.05$）；不同大写字母（A~D）表示不同样品在肠部消化过程中存在显著差异（$P < 0.05$），下同。

Note：Different lowercase letters (a~c) indicate significant difference ($P < 0.05$) of different samples during gastric digestion; different uppercase letters (A~D) indicate significant difference ($P < 0.05$) of different samples during intestinal digestion, the same below.

图 3.5 不同粒径牦牛骨粉的蛋白质消化率

Fig. 3.5 Protein digestibility of YBP with different particle sizes

3.4.8 钙磷释放度分析

本试验通过模拟体外胃肠道消化对 5 种不同粒径骨粉的钙磷释放度进行了探究。经分析发现（图 3.6），5 种不同粒径骨粉的钙离子释放度和磷释放度皆随胃部进入肠部而明显升高，且随着粒径的增大呈现上升趋势。胃部消化结束后，骨粉 D_{0h} 的钙离子和磷释放度皆显著高于其它骨粉（$P < 0.05$），而进入肠道后，其差距逐渐减小，但仍呈现大粒径骨粉释放度较优的趋势。这可能是随着球磨时间延长，骨粉粒径逐渐减小，使蛋白质大部分暴露，在消化过程中，蛋白质先与酶结合并溶出，而矿物质后溶；大粒径骨粉蛋白质暴露面积相对较小，矿物质暴露面积相对较大，因而矿物质溶出速率偏高。骨粉由胃部进入肠道后，蛋白质被逐渐酶解，矿物质也不断释放，并逐渐缩小了不同骨粉之间的差距。肠道消化结束后，骨粉的磷释放度为 1.34～1.65 mg/g，而钙离子释放度是磷释放度的 2.33～2.44 倍，约为 3.27～3.84 mg/g，与骨粉中钙磷含量比例一致。

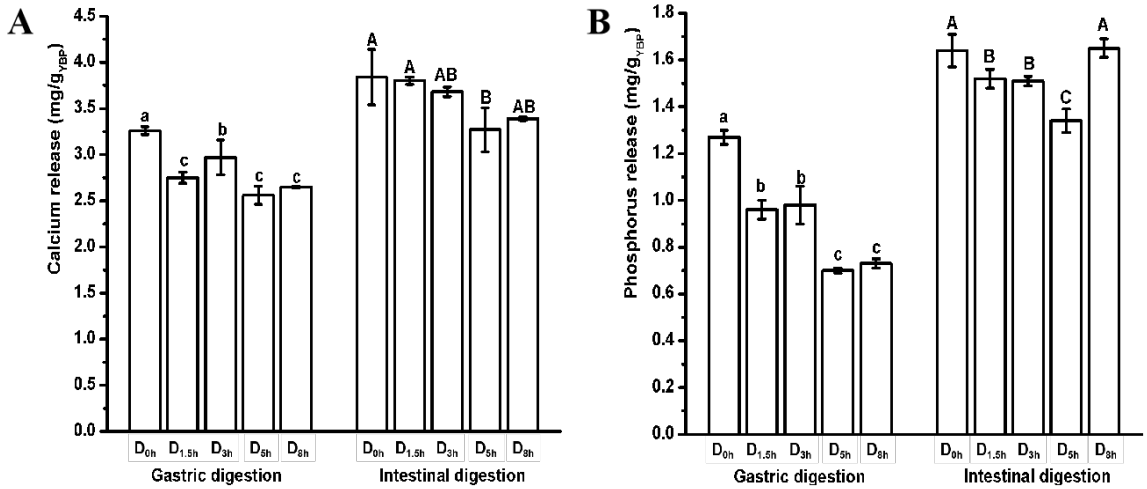


图 3.6 不同粒径牦牛骨粉的蛋白质消化率

Fig. 3.6 Protein digestibility of YBP with different particle sizes

3.4.9 肽分子量分布分析

为探究不同粒径牦牛骨粉在胃、肠道的消化效果，本试验对消化产物的相对分子量分布进行了分析。结果如图 3.7 显示，经过胃部和肠道消化，各消化产物中分子量小于 0.5 kDa 的肽段相对含量皆随着骨粉粒径的减小而降低，其在骨粉 D_{0h}、$D_{1.5h}$ 消化产物中的相对含量皆显著高于骨粉 D_{5h}、D_{8h}（$P < 0.05$），但肠道消化结束后其在骨粉 D_{0h}、$D_{1.5h}$、D_{3h} 之间已无显著差异（$P > 0.05$），并可达 66%以上；分子量小于 1 kDa 的肽段相对含量易呈现随着粒径减小而降低的趋势，其在骨粉 D_{0h}、$D_{1.5h}$、D_{3h} 消化产物中的相对含量在胃部消化结束后显著高于骨粉 D_{5h}、D_{8h}（$P < 0.05$），但在肠道消化结束后其在骨粉 D_{0h}、$D_{1.5h}$、D_{3h}、D_{5h} 之间已无显著差异（$P > 0.05$），并达到 89%以上，粒径导致的差异逐渐减小。一方面，小粒径骨粉蛋白质消化率高即释放到溶液中的蛋白质绝对含量高，在相同酶浓度的消化液中无法充分酶解可导致小分子肽段相对含量偏低；另一方面，小粒径骨粉具有较高的表面张力，易产生抱团现象，短时间内在体温条件下无法迅速充分与消化液中的酶接触，而随着骨粉由胃部进入肠道，蛋白质逐渐被酶解，各骨粉消化产物之间小分子量肽段含量的差异亦逐渐减小。此外，各骨粉消化产物中分子量小于 3 kDa 的肽段相对含量已无显著差异（$P > 0.05$），胃部消化结束后其相对含量可达 96%以上，且进入肠道后无明显增加。

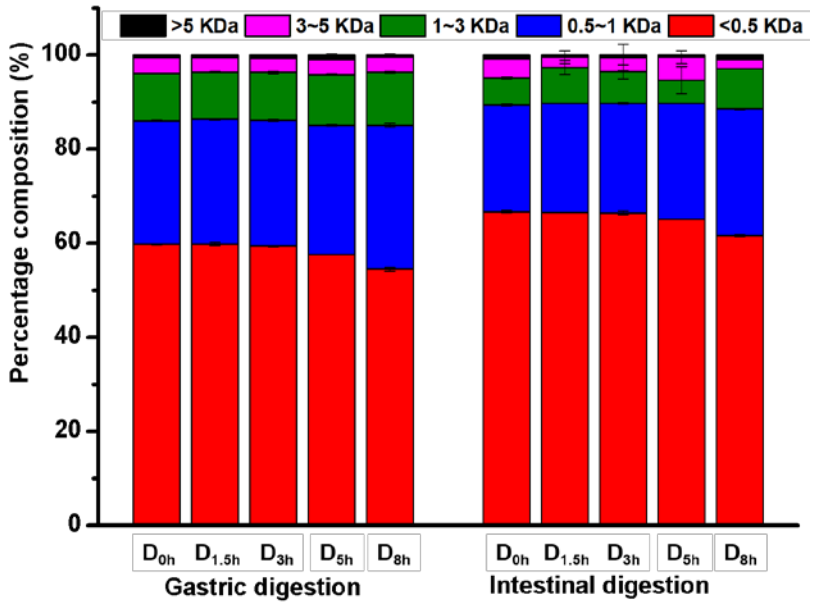


图 3.7 不同粒径牦牛骨粉消化物的相对肽分子量分布

Fig. 3.7 The relative molecular weight distribution of YBP digesta with different particle sizes

3.4.10 游离氨基酸结果分析

为进一步探究粒径对牦牛骨粉消化程度的影响，本试验对骨粉经胃部、肠消化后产生的 17 种游离氨基酸含量进行了分析，单位记为 μg/g_{YBP}。结果如图 3.8 显示，骨粉粒径越小，消化产物中游离氨基酸的含量越高，这可能是小粒径骨粉暴露的蛋白多，增加了与蛋白酶的接触，使其容易被分解成氨基酸。不同消化产物的游离氨基酸含量不同，但由胃部进入肠道后，皆明显提高。其中，消化产物中的酪氨酸（Tyr）、苯丙氨酸（Phe）、赖氨酸（Lys）、精氨酸（Arg）含量最高，骨粉 D_{8h} 在肠道消化结束后关于这几种氨基酸的含量分别可达 6332.62 μg/g_{YBP}、2931.18 μg/g_{YBP}、2742.98 μg/g_{YBP}、4624.93 μg/g_{YBP}，皆显著高于其它氨基酸（$P < 0.05$）。肠道消化结束后，亮氨酸和异亮氨酸游离度可达 1658.59 μg/g_{YBP}，具有较高的游离度；苏氨酸（Thr）、丝氨酸（Ser）、谷氨酸（Glu）、丙氨酸（Ala）、缬氨酸（Val）、甲硫氨酸（Met）游离度较小，分布在 139.65~623.69 μg/g_{YBP} 之间；并且，所有骨粉消化产物中均不含半胱氨酸（Cys）、组氨酸（His）和脯氨酸（Pro）。此外，与原料相比甲硫氨酸（Met）、酪氨酸（Tyr）、苯丙氨酸（Phe）的释放度最高，可达 50%以上，赖氨酸（Lys）和精氨酸（Arg）次之，达 30%以上。

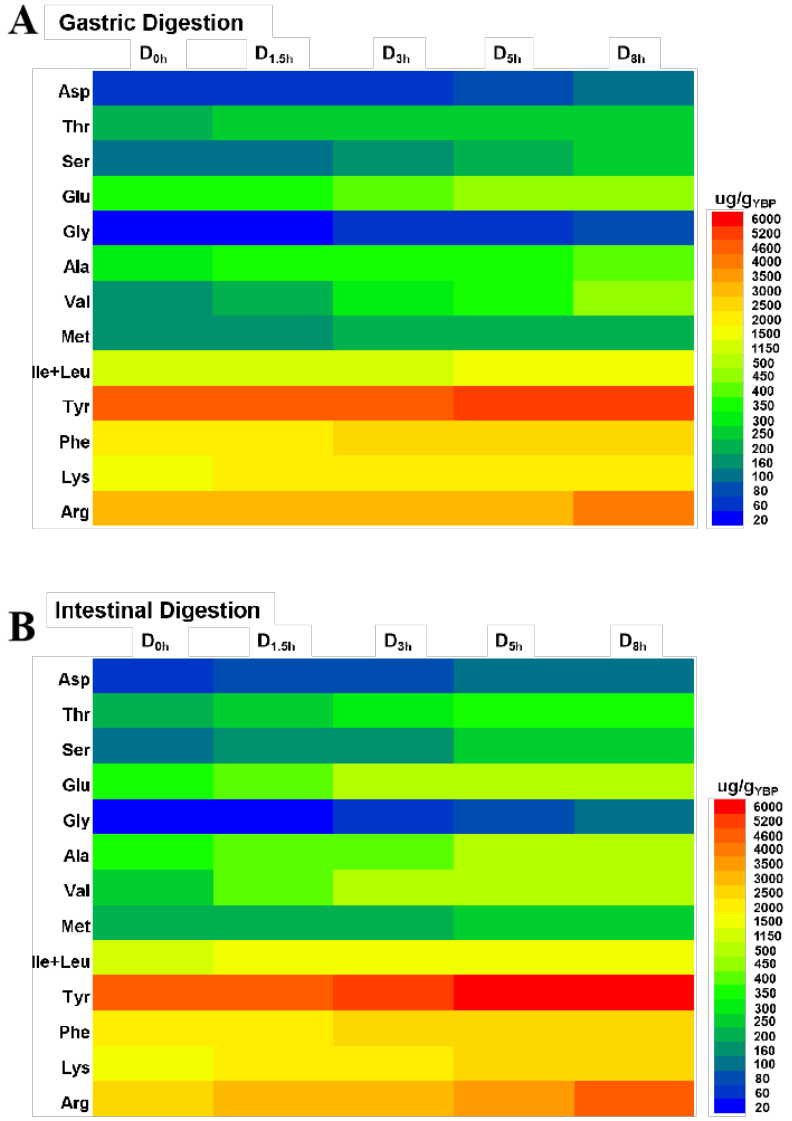


图 3.8 不同粒径牦牛骨粉消化液的游离氨基酸含量

Fig. 3.8 The FAA contents of YBP digesta with different particle sizes

3.5 小结

本试验通过对 5 种不同中值粒径牦牛骨粉进行基本成分、理化特性以及消化特性差异分析，得出以下结论：

1）粒径的变化不引起牦牛骨粉中基本营养成分（蛋白质、脂肪、水分、灰分）、总氨基酸、羟脯氨酸以及矿物质改变，且不改变骨粉主要化学结构；

2）粒径越小，骨粉的亮度越高、持水力和蛋白质释放能力越强，表现出较好的理化特性；

3）随粒径减小，骨粉蛋白质消化率呈上升趋势，肠道消化结束后其相对含量可达 28.53%；游离氨基酸含量皆随骨粉粒径减小而增高；分子量小于 0.5 kDa 和 1 kDa 的肽段相对含量随粒径减小呈下降趋势，但小于 3 kDa 的肽段相对含量无显著差异（$P > 0.05$），可达 96%以上；

4）骨粉钙磷释放度随着粒径减小而降低，肠道消化结束后，所有骨粉的钙、磷释放度分别在 3.27～3.84 mg/g、1.34～1.65 mg/g 之间。

结果表明，粒径越小，骨粉的理化特性和蛋白质消化率、氨基酸游离度等消化特性呈现更佳状态，但钙磷矿物质释放度偏低。为确定不同粒径牦牛骨粉的营养效果，还需进行动物实验加以验证。

第四章 不同粒径牦牛骨粉抗骨质疏松作用研究

4.1 引言

近年来，“药食同源”理论被广泛支持与推广，人们也越来越注重对食物中有效成分的摄取与利用。在我国，牦牛骨作为传统壮骨材料被广泛应用，以牦牛骨为原料探究其主要成分对改善骨质疏松的作用也逐渐成为研究焦点。赵要武等（2007）人发现牦牛骨粉不仅具有较高的钙表观吸收率还能增加大鼠骨密度；程妍（2009）利用牦牛骨粉配制牦牛骨营养粉饲喂大鼠，亦发现其可显著增加骨密度，并不会影响血清 AKP、TG、CHO 水平；贾伟（2017）发现牦牛骨胶原蛋白肽有利于人体成骨细胞 ALP 表达和矿化结数量增加，可有效促进人体成骨细胞的增长。由于牦牛骨粉制备方法各异，粒径也大相径庭，因此探究粒径对抗骨质疏松的作用并确定最佳粒径范围具有重要意义。本试验选取 3 种不同中值粒径牦牛骨粉饲喂去卵巢大鼠，以探究粒径对牦牛骨粉抗骨质疏松作用的影响。

4.2 材料与试剂

实验所需试剂如表 4.1 所示。

表 4.1 实验所需试剂

Table 4.1 The reagents for the experiment

试剂名称	化学式	生产厂家
0.9%氯化钠注射液	NaCl	国药集团化学试剂有限公司
硝酸	HNO_3	国药集团化学试剂有限公司
高氯酸	$HClO_4$	国药集团化学试剂有限公司
氧化镧	La_2O_3	国药集团化学试剂有限公司

4.3 仪器与设备

实验所需仪器设备如表 4.2 所示。

表 4.2 实验所需设备

Table 4.2 The Equipment needed for the experiment

仪器名称	型号	生产厂家
冷冻离心机	Allegra X-12R	美国 Beckman Coulter 公司
电感耦合等离子质谱仪	7700X	美国 Agilent 技术有限公司
微型 CT 扫描仪	Inveon	德国 SIEMENS 公司

4.4 试验方法

4.4.1 动物分组与造模

于北京实验动物中心采购 SPF 级 7 周龄 Wistar 雌性大鼠 48 只。1 周适应期结束后，随机均分为 6 组：假手术组（SHAM）、模型组（OVX-M）、阳性对照组（OVX-P）、试验Ⅰ组（OVX-Ⅰ）、试验Ⅱ组（OVX-Ⅱ）、试验Ⅲ组（OVX-Ⅲ）（Erfanian A *et al.*, 2014）。

分组后首先对 6 组大鼠进行以下手术：假手术组大鼠切除卵巢一侧少许脂肪，进行缝合；模型组大鼠切除两侧卵巢，缝合；阳性对照组大鼠切除两侧卵巢，缝合；试验Ⅰ组大鼠切除两侧卵巢，缝合；试验Ⅱ组大鼠切除两侧卵巢，缝合；试验Ⅲ组大鼠切除两侧卵巢，缝合。手术恢复期均饲喂低钙饲料 6 周以诱导骨质疏松（Erfanian *et al.*, 2014）。

4.4.2 动物饲喂试验

恢复期结束后，假手术组和模型组饲喂基础饲料 12 周；阳性对照组参考 Zhao 等（2011）方法并稍作修改，饲喂基础饲料并灌胃雌二醇（50 μg/kg）12 周；试验Ⅰ组、试验Ⅱ组和试验Ⅲ组分别饲喂骨粉饲料Ⅰ、骨粉饲料Ⅱ和骨粉饲料Ⅲ，自由饮食（去离子水）。饲养环境参考 Beata 等（2018）的方法进行。每周称一次体重。

低钙动物饲料依据 GB 14924.3-2010 进行配制，调整钙含量为 0.07%，并分别添加碳酸钙、骨粉 D_{0h}、骨粉 D_{3h}、骨粉 D_{8h} 调整钙含量至 1.2%左右（Beata *et al.*, 2018），即分别为基础饲料、骨粉饲料Ⅰ、骨粉饲料Ⅱ、骨粉饲料Ⅲ。

4.4.3 样品收集

饲喂结束后，进行一天代谢试验，记录摄食量，收集尿液、粪便。随后将大鼠处死，收集心、肝、脾和肾等器官进行称重。取双侧股骨，剔除附着的软组织和软骨，浸泡于 10%福尔马林固定液并在 4 ℃条件下储存（Mada *et al.*, 2017）。

4.4.4 骨密度、骨小梁和骨微观结构测定

骨密度、骨小梁数目及微观结构测定参考 Parfitt 等（1988; 1983）和 Zhang 等（2018）的方法应用微型 CT 扫描仪扫描测定。电压 80 kv，电流 500 uA，曝光时间为 3200 ms。扫描结束后采用 Inveon Research Workplace 软件分析。

4.4.5 脏器指数测定

脏器指数（包括肝体比、肾体比、脾体比等）的测定参考 Zhe 等（2017）的方法进行。

4.4.6 钙磷表观吸收率测定

钙表观吸收率（CAA）、磷表观吸收率（PAA）的测定参考 Zhe 等（2017）和 Erfanian 等（2014）的方法，并稍作修改。计算公式如下：

$$CAA= (\ 摄入钙－粪钙) /\ 摄入钙\times 100\%$$

$$PAA= (\ 摄入磷－粪磷) /\ 摄入磷\times 100\%$$

其中，摄入钙（mg/d）=饲料中钙含量（mg/d）×饲料消费量（mg/d），粪钙（mg/d）= 粪便中钙含量（mg/d）×粪便排出量（mg/d）；摄入磷和粪磷计算方法同钙。

4.4.7 血清生化指标测定

血清中 OC、B-ALP、TRAP 和 S-CTX 的测定参考 Peng 等（2017）的方法，采用 ELISA 试剂盒法进行测定。

4.4.8 数据处理方法

数据分析方法同 2.3.5；大鼠股骨形态组织学指标采用 Inveon Research Workplace 软件分析。

4.5 数据讨论

4.5.1 体重与脏器指数分析

通过对大鼠体重进行监测，结果显示各组大鼠体重在试验期间皆不断增加。试验期结束后，OVX-M、OVX-P、OVX-Ⅰ、OVX-Ⅱ、OVX-Ⅲ 5 组去卵巢大鼠平均体重增长率分别为 80.71%、83.66%、90.91%、87.17%、85.87%，显著高于 SHAM 组（59.84%）（$P < 0.05$）。这可能由于切除卵巢后雌激素水平降低，导致体重急速增加。此外，粒径差异对不会对大鼠体重产生显著影响，并且牦牛骨粉无显著抑制体重的效果。

大鼠处死后，取其肝、肾、心、脾进行称重并计算脏器指数。脏器指数是毒理试验中的常用评价指标。正常时各脏器与体重的比值比较恒定，但当动物染毒后，受损脏器重量可以发生改变，故脏器指数也随之改变。一般来说，脏器系数增大，表示脏器充血、水肿或增生肥大等；脏器系数减小，表示脏器萎缩及其他退行性改变。该研究结果显示，与 SHAM 组相比，骨粉饲喂组的心脏和肝脏指数皆显著偏低（$P < 0.05$），但粒径差异未对各脏器指数产生显著影响（$P > 0.05$）。

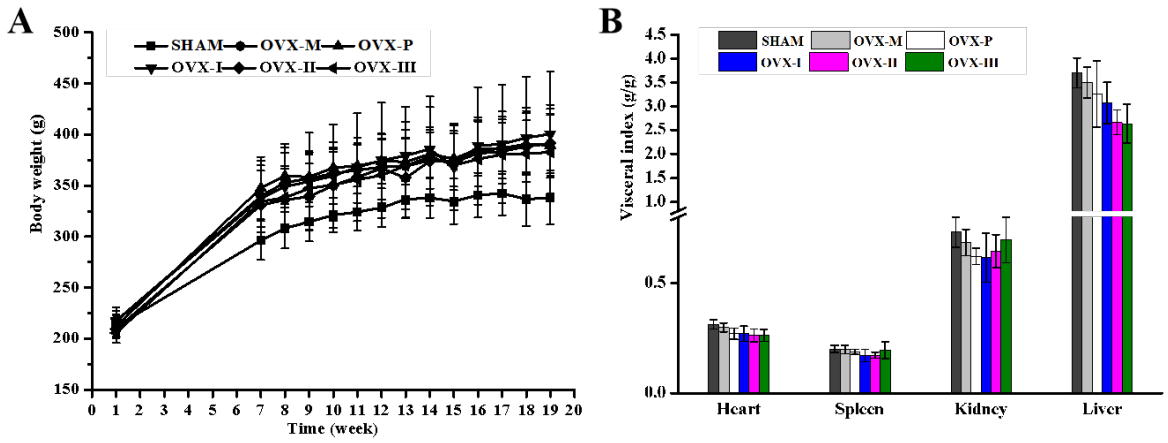
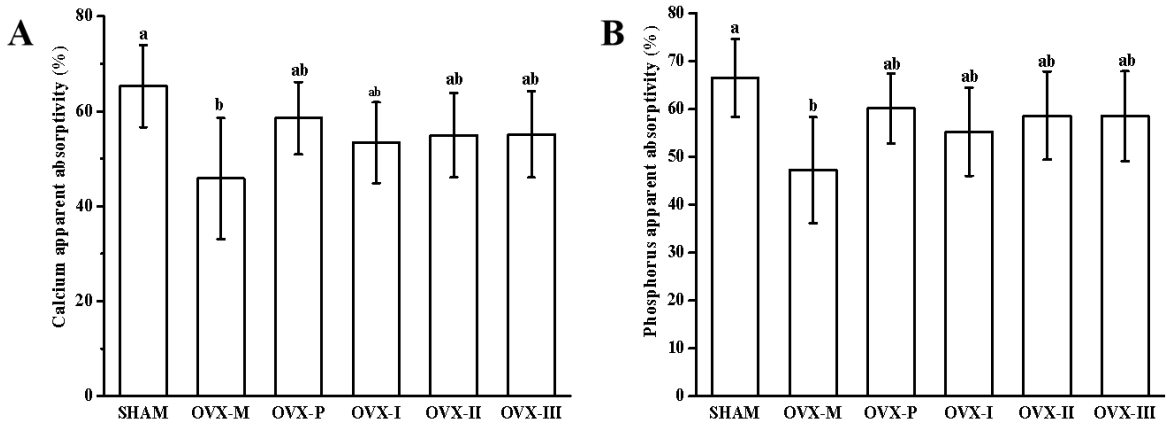


图 4.1 大鼠体重及脏器指数图

Fig. 4.1 The body weights and visceral indexes of rats

4.5.2 钙磷表观吸收率结果分析

本试验通过对各组大鼠进行代谢试验，探究了不同粒径牦牛骨粉对钙磷的促吸收作用，结果如图 4.2 所示。钙磷表观吸收率变化一致，这可能由于钙磷在骨粉中以磷酸钙的形式存在，被同时消化吸收。其中，模型组大鼠的表观吸收率显著低于假手术组（$P < 0.05$），这可能由于大鼠被切除卵巢后雌激素水平降低，钙磷的吸收转运率降低。阳性对照组和骨粉饲喂组与模型组相比皆有所上升，但不存在统计学意义（$P > 0.05$）。并且，骨粉饲喂组（OVX-Ⅰ、OVX-Ⅱ、OVX-Ⅲ）之间皆无显著性差异（$P > 0.05$），即粒径差异未对其钙磷吸收造成显著影响。骨粉饲喂组的钙、磷表观吸收率分别可达 53.37～55.12%、55.26～58.51%。



注：不同小写字母（a~c）表示不同分组间存在显著差异（$P < 0.05$），下同。

Note：Different lowercase letters (a~c) indicate significant difference ($P < 0.05$) of different groups, the same below.

图 4.2 大鼠钙磷表观吸收率

Fig. 4.2 The calcium and phosphorus apparent absorption of rats

4.5.3 骨密度分析

为探究不同粒径骨粉的抗骨质疏松作用，对各组大鼠股骨进行了骨密度测量。结果显示（图4.3），假手术组大鼠骨密度显著高于其它5组（$P < 0.05$），表明骨质疏松模型建立成功。但各去卵巢组之间骨密度无显著差异（$P > 0.05$），即牦牛骨粉对于骨质疏松模型大鼠不具有明显改善骨密度的作用。

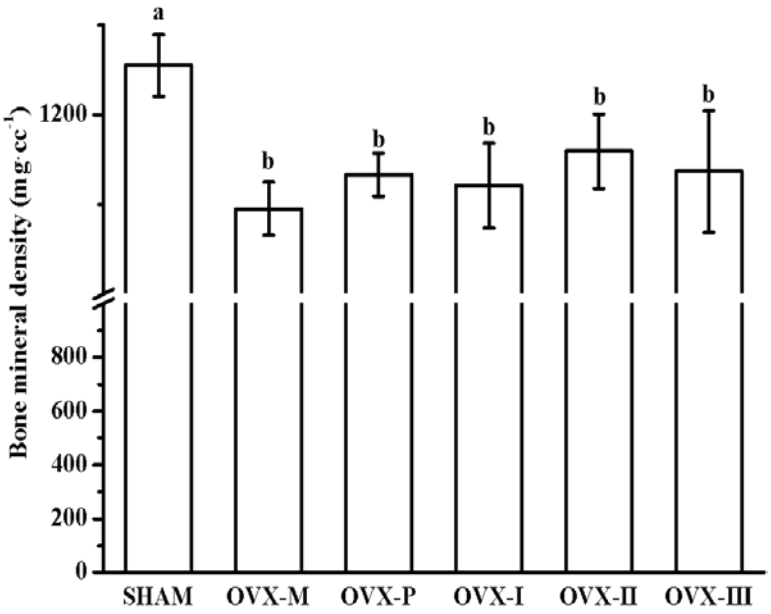


图 4.3 大鼠股骨骨密度及微观结构图

Fig. 4.3 The mineral density and microstructure of rat femurs

4.5.4 骨小梁指标分析

为充分验证不同粒径骨粉的抗骨质疏松作用，本试验还对各组大鼠股骨的骨小梁数目（Tb.N）、骨小梁厚度（Tb.Th）、骨小梁分离度（Tb.Sp）以及骨小梁模式因子（TBPf）进行了测定。一般来说，骨小梁数目越少，则越趋向于骨质疏松。如图 4.4A 所示，各去卵巢组骨小梁数目皆显著小于假手术组（$P < 0.05$），进一步验证了造模成功。但各去卵巢组间骨小梁数目无显著差异（$P > 0.05$），与骨密度测试结果一致。此外，骨小梁厚度值越小、骨小梁分离度和模式因子越大，其骨质疏松程度越严重。由图 4.4 所示，骨小梁厚度、分离度及模式因子呈现的结果皆与骨密度结果一致。牦牛骨粉对于骨质疏松模型大鼠不具有明显改善骨小梁的作用。图 4.4.E 为各组大鼠股骨同一水平处骨小梁重建三维图。

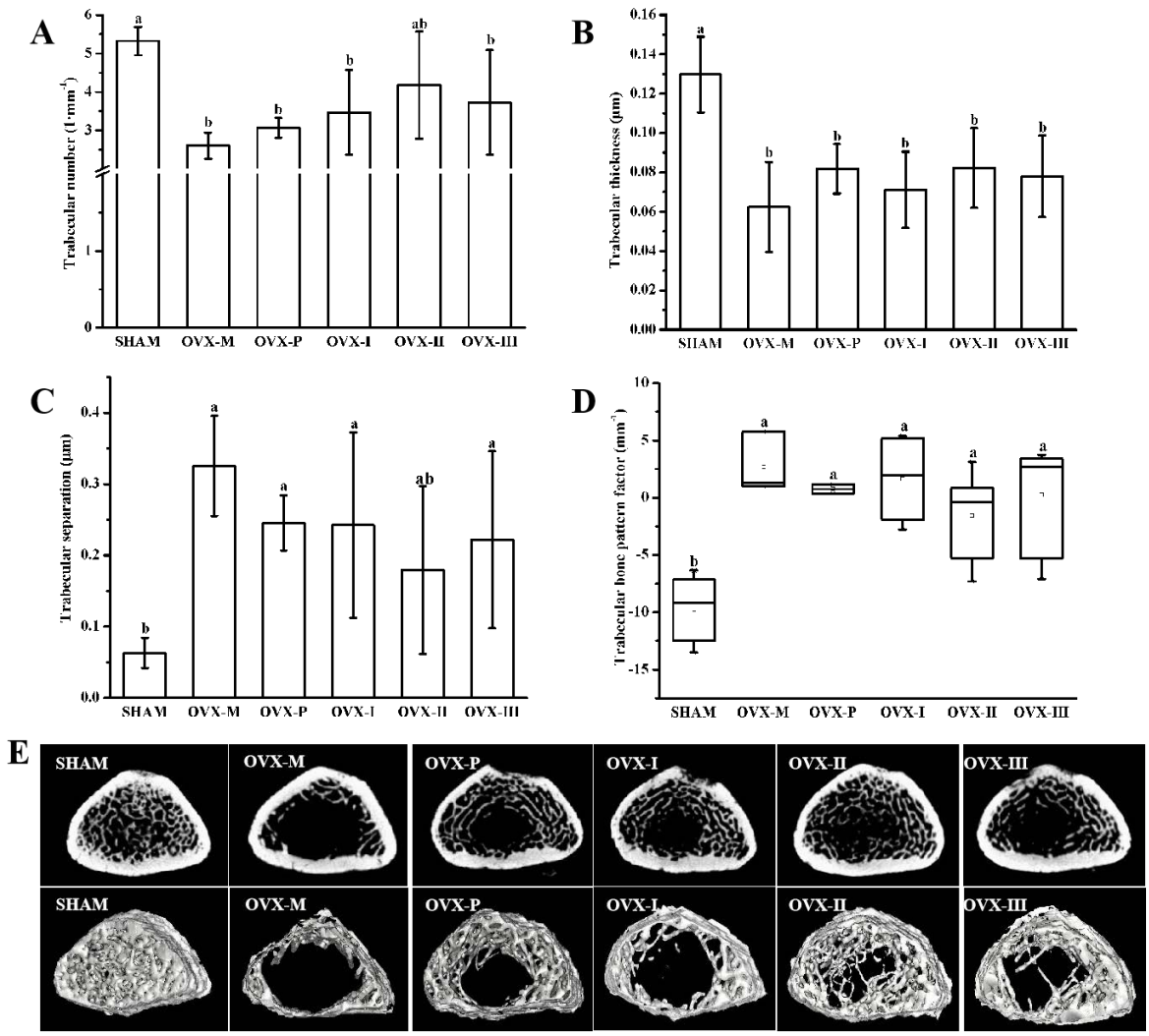


图 4.4 大鼠骨小梁指标

Fig. 4.4 The trabecular indexes of rat femurs

4.5.5 血清生化指标分析

骨钙素（OC）和血清骨特异性碱性磷酸酶（ALP）是骨形成生化标志物，可反映成骨细胞活性及骨形成状态；血清抗酒石酸酸性磷酸酶（TRAP）和血清 I 型胶原 C-胶原末端肽交联（S-CTX）为骨吸收生化标志物，主要反应破骨细胞的活性和骨吸收水平。骨转换生化标志物对于早期筛查骨质疏松症和检测药物治疗效果具有极高可靠性和应用性。如图 4.5 显示，骨粉饲喂组的 OC、ALP 和 TRAP 水平显著高于模型组（$P < 0.05$），表明牦牛骨粉可显著提高骨质疏松大鼠血清中骨转化标志物含量，具有一定改善大鼠骨质疏松的作用；但 4 种标志物含量在不同粒径骨粉饲喂组之间无显著差异（$P > 0.05$），即在所选粒径范围内，粒径差异不会对其产生显著影响。

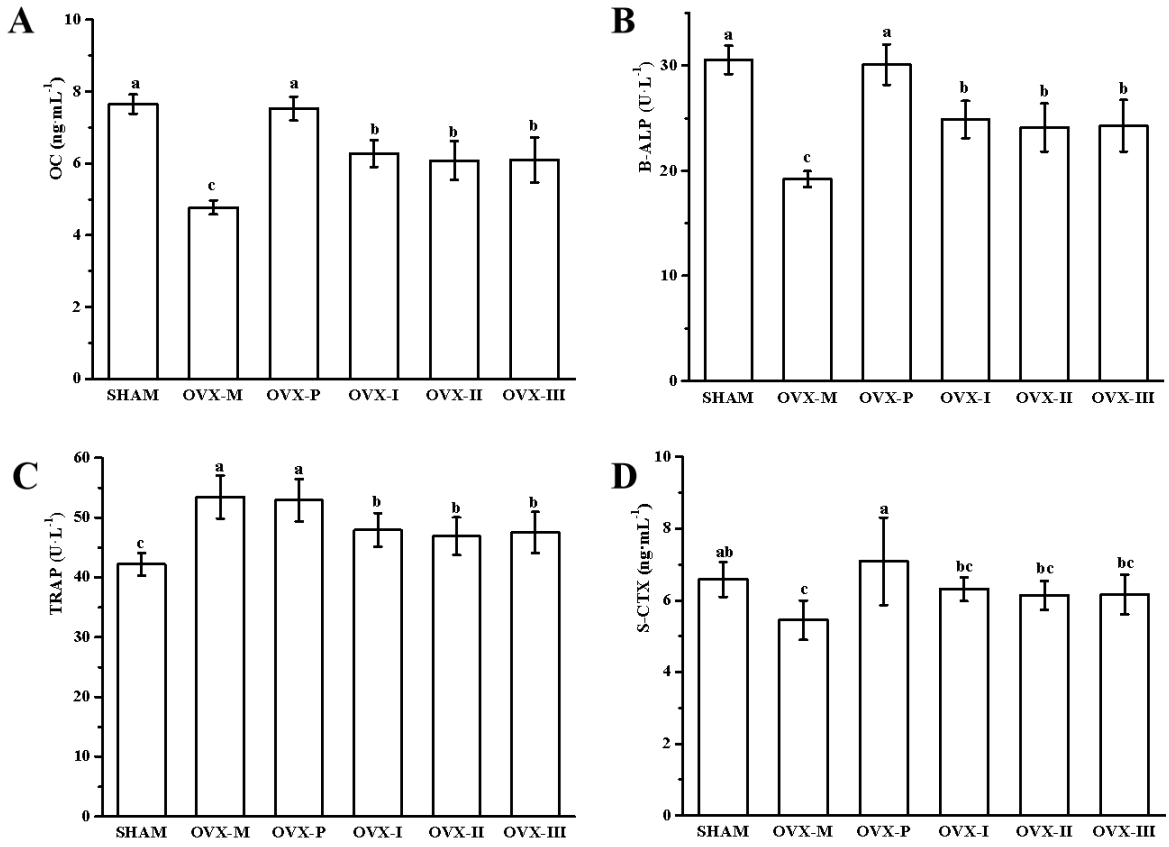


图 4.5 大鼠血清生化指标

Fig. 4.5 The serum biochemistry indexes of rats

4.6 小结

本章试验利用 3 种不同中值粒径牦牛骨粉饲喂骨质疏松大鼠，通过对一系列指标进行分析，得出以下结论：

1）牦牛骨粉无显著抑制骨质疏松大鼠体重的效果，且粒径差异不会对大鼠体重产生显著影响；

2）骨粉饲喂组的心脏和肝脏指数皆显著偏低（$P < 0.05$），但粒径差异未对各脏器指数产生显著影响（$P > 0.05$）；

3）钙磷表观吸收率在各组大鼠之间变化一致，其中假手术组大鼠的钙磷表观吸收率显著高于其它各组（$P < 0.05$）。骨粉饲喂组（OVX-Ⅰ、OVX-Ⅱ、OVX-Ⅲ）之间无显著性差异（$P > 0.05$），其钙、磷表观吸收率分别可达 53.37～55.12%、55.26～58.51%；

4）骨组织形态学指标结果显示，假手术组大鼠骨密度和骨小梁指标皆显著优于其它 5 组（$P < 0.05$），骨质疏松模型建立成功。但与模型组相比，牦牛骨粉不具有明显改善骨密度和骨小梁的作用（$P > 0.05$）；

5）血清生化指标结果显示，与模型组相比，牦牛骨粉可显著提高骨质疏松大鼠血清中 OC、ALP 和 TRAP 的水平（$P < 0.05$），具有一定改善大鼠骨质疏松的作用；但在所选粒径范围内，

粒径差异不会对其产生显著影响（$P > 0.05$）。

牦牛骨粉可被应用于功能食品以改善骨质疏松，为减少制备工艺时长和能耗，可在 19.92～128.37 μm 范围内，适当选取制备较大中值粒径牦牛骨粉。

第五章 全文结论

5.1 结论

1. Box-Behnken 试验优化分析结果表明，超声功率 500 W、超声时间 30 min、液料比（v : v）6 为牦牛骨最佳脱脂参数，脱脂率可达 92.0%，显著高于蒸煮脱脂法（71.25%）（$P < 0.01$）；与蒸煮脱脂法相比，超声脱脂法蛋白质流失率、主要矿物质元素流失率皆显著降低（$P < 0.05$）。超声波辅助有机溶剂脱脂处理可更多地保留牦牛骨营养物质，对改进骨粉加工工艺及提高骨粉品质具有一定参考价值。

2. 为探究粒径对牦牛骨粉理化特性的影响，本文制备了 5 种中值粒径牦牛全骨粉（19.92 μm，49.94 μm，76.65 μm，96.73 μm，128.37 μm），并对其基本营养成分、色泽、蛋白质释放度以及持水力等指标进行了分析。结果显示，粒径不会引起骨粉中基本营养成分（蛋白质、脂肪、水分、灰分）、总氨基酸、羟脯氨酸以及矿物质的含量改变（$P > 0.05$），且不会改变骨粉主要化学结构。然而，粒径越小，骨粉的亮度越高、持水力和蛋白质释放能力越强，表现出较好的理化特性。

3. 通过对不同粒径骨粉进行体外模拟胃肠道消化发现，随粒径减小，骨粉蛋白质消化率显著上升（$P < 0.05$），其中 D_{50} 为 19.92 μm 的骨粉经肠部消化后蛋白质消化率可达 28.53%；所有消化产物中氨基酸含量皆随骨粉粒径减小而呈现增高趋势，其中，酪氨酸（Tyr）、苯丙氨酸（Phe）、赖氨酸（Lys）、精氨酸（Arg）含量最高。但在各消化产物中，分子量小于 0.5 kDa 的肽段相对含量以及钙、磷释放度随粒径减小呈现降低趋势，肠道消化结束后，骨粉的钙、磷释放度分别在 3.27～3.84 mg/g、1.34～1.65 mg/g 之间。综上，粒径大小会影响牦牛骨粉的消化特性，粒径越小，骨粉的蛋白质消化率及氨基酸游离度呈现更佳状态，而小分子量肽段分布以及钙磷等矿物质释放度偏低。

4. 为进一步确定不同粒径牦牛骨粉的抗骨质疏松活性，本文利用 3 种中值粒径（19.92 μm，76.65 μm，128.37 μm）牦牛骨粉饲喂骨质疏松模型大鼠。结果显示，与模型组相比，牦牛骨粉可显著提高骨质疏松大鼠血清中 OC、ALP 和 TRAP 的水平（$P < 0.05$），具有一定改善大鼠骨质疏松的作用；但在所选粒径范围内，粒径差异不会对其产生显著影响（$P > 0.05$）。与模型组相比，牦牛骨粉不具有明显改善骨质疏松大鼠钙磷表观吸收率、骨密度和骨小梁的作用（$P > 0.05$），且骨粉饲喂组钙、磷表观吸收率分别可达 53.37～55.12%、55.26～58.51%。

牦牛骨粉营养成分丰富，其在动物体内的消化、吸收、转运及沉积是一个复杂的过程。研究表明，牦牛骨粉具有一定改善骨质疏松的作用，但在所选范围内（D_{50}：19.92～128.37 μm），粒径差异不对其产生显著影响。牦牛骨粉可被应用于功能食品以改善骨质疏松，且可适当选取制备较大中值粒径牦牛骨粉。本论文可为牦牛骨粉的开发利用提供一定的理论和技术支撑。

5.2 论文创新点

本论文选取超声辅助有机溶剂对牦牛骨进行脱脂，显著提高了营养物质保留率，并通过体外模拟胃肠道消化模型和动物模型首次阐明了粒径对牦牛骨粉理化特性、消化特性及其抗骨质疏松

作用的影响。

5.3 展望

1.本论文研究了微米级粒径对牦牛骨粉理化、消化特性以及抗骨质疏松作用的影响，可进一步拓宽粒径范围，如对纳米级牦牛骨粉进行深入探究；

2.可进一步设置不同剂量骨粉饲喂试验，阐明牦牛骨粉抗骨质疏松的量效作用机制。

参考文献

1. 白璧辉, 谢兴文, 李鼎鹏, 等. 我国近 5 年来骨质疏松症流行病学研究现状. 中国骨质疏松杂志, 2018.
2. 白建, 梁亚萍, 黄素珍, 等. 骨粉新产品的开发研制. 肉类研究. 2006, 01: 33-35.
3. 蔡杰, 洪玮娣, 熊汉国. 我国畜禽骨骼及其蛋白质资源综合利用进展. 肉类研究, 2011, 25(03): 38-42.
4. 陈建军, 叶湛, 杜一鑫, 等. 仙灵骨葆治疗骨质疏松股骨粗隆间骨折的临床疗效. 中国老年学, 2015, 35(19): 5562-5564.
5. 程妍. 骨胶原蛋白酶解工艺及骨营养粉对大鼠补钙功效的研究[硕士学位论文]. 甘肃农业大学, 2009.
6. 杜春莹, 胡肇衡, 陈玲, 等. 阿仑膦酸钠对绝经后骨质疏松症患者骨代谢指标的影响. 中国骨质疏松杂志, 2014(1): 22-25.
7. 董宪兵, 李侠, 张春晖, 等. 分光光度法测定畜禽骨素中胶原蛋白含量. 现代食品科技, 2013, 29(10): 2538-2541.
8. 董原, 蒋继丰, 王存堂, 等. 畜禽骨泥在食品加工中的应用前景. 黑龙江畜牧医, 2010(04): 29-30.
9. 付文雯. 牛骨胶原多肽螯合钙的制备及其结构表征[硕士学位论文]. 华中农业大学, 2010.
10. 方秀统, 于方. 骨质疏松症的药物治疗进展. 中华医学杂志, 2014, 94(37): 2956-2959.
11. 郭文瑞, 李永鹏, 王军, 等. 冷却去油工艺对牦牛骨汤挥发性化合物的影响. 食品工业科技, 2013, 34(22): 80-83.
12. 赫桂丹. PEF 下牛骨钙离子化及胶原多肽提取优化综合开发研究[硕士学位论文]. 吉林大学, 2009.
13. 韩克光, 甄守艳, 范华, 等. 钙螯合羊骨胶原多肽的制备及表征分析. 农业工程学报, 2015, 31(21): 301-307.
14. 菅景颖. 胶原多肽螯合钙的制备及其壮骨、骨质疏松防治作用研究[硕士学位论文]. 河北农业大学, 2007.
15. 贾伟. 牛骨营养品质评价与牦牛骨胶原蛋白肽功效研究[博士学位论文]. 2017.
16. 刘安军, 孙洪臣, 刘有志, 等. 牛骨蛋白与多糖的逐级提取及分离方法研究. 农业工程学报, 2007, 23(3): 208－212.
17. 刘静. 牦牛骨胶原多肽螯合钙的制备研究[硕士学位论文]. 2016.
18. 刘静, 李诚, 胡迤萧, 等. 酶解法制备牦牛骨胶原多肽及其加工性能评价. 食品与生物技术学报, 2018, 37(05): 105-112.
19. 李加, 宗吉. 藏牦牛股骨粉加味治疗骨质疏松. 中国民间疗法, 2013, 05: 58.
20. 李少博, 李洪军, 贺稚非, 等. 纳米级兔骨粉球磨法制备工艺优化. 农业工程学报, 2017, 33(14): 300-306.

21. 刘文媛，贾伟，吴婷，等. 气相色谱测定牦牛骨中脂肪酸的甲酯化方法比较. 色谱，2016, 34(11): 1113-1119.
22. 刘文媛，贾伟，李侠，等. 超声辅助水热法提取牛骨油工艺参数优化. 农业工程学报，2018, 34(8): 283-290.
23. 李莉，张赛，何强，等. 响应面法在试验设计与优化中的应用. 实验室研究与探索，2015(8): 41-45.
24. 罗令，孙晓峰，皮丕喆，等. 近 10 年来我国中老年人群骨质疏松症患病率的荟萃分析. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(11): 20-25.
25. 李晔，马良，张宇昊，等. 正交试验优化鱼皮超声乳化法脱脂工艺. 食品科学，2012，(24): 127-131.
26. 李亚杰，熊善柏，尹涛，等. 六种纳米化鱼骨的理化特性比较研究. 现代食品科技，2017(07): 131-138.
27. 卢玉坤. 鳕鱼皮胶原蛋白肽的促钙吸收作用研究[硕士学位论文].中国海洋大学, 2013.
28. 阮孝慈，张贵芳，邓宇，等. 牛骨成分的综合表征分析. 中国科技论文, 2017(6): 712-715.
29. 任灿. 超微兔骨与高钙兔糜凝胶的制备及其理化特性研究[硕士学位论文]. 重庆：西南大学, 2017.
30. 魏秋霞. 原辅材料及加工贮藏工艺对牦牛骨浓缩汤品质影响的研究[硕士学位论文]. 四川农业大学, 2008.
31. 文天林，孙天胜，王玲，等. 骨质疏松症的流行病学、病因和分类. 人民军医，2010(9): 662-663.
32. 孙伟珊，魏秋实，霍少川，等. 补肾壮骨颗粒对去势骨质疏松大鼠血脂代谢指标的影响. 世界中西医结合杂志, 2014, 9(11): 1168-1171.
33. 孙远明. 食品营养学. 科学出版社, 2006.
34. 王娟. 牛乳清蛋白加压凝胶消化性及其钙生物利用率的研究[硕士学位论文]. 中国农业科学院, 2008.
35. 吴婷. 牦牛骨胶原蛋白提取纯化及结构解析[硕士学位论文]. 甘肃农业大学, 2017.
36. 吴婷，贾伟，管声，等. 5 个品种牛骨的营养组成及其含量差异分析. 食品工业科技，2017, 38(2): 342-348.
37. 肖帆，徐蔷，李华迪，等. 酶解牦牛骨粉骨髓粉对大鼠骨密度影响的研究. 医学信息，2017, 30(4): 39-41.
38. 肖厚荣，杨红，汪珊珊，等. 牛骨粉品质及其生物利用率研究. 食品研究与开发, 2016, 37(12): 5-9.
39. 徐德林，刘振国. 骨油深加工制备油酸的研究. 黑龙江日化, 1994(2): 8-9.
40. 尹涛. 纳米鱼骨的制备、特性表征及其对鱼糜胶凝影响的机制研究[博士学位论文]. 华中农业大学, 2015.
41. 杨红，肖厚荣，张慧，等. 高温蒸煮法制备牛骨粉的工艺研究. 安庆师范学院学报(自然科学版), 2015, 21(2): 85-88.

42. 阎萍, 梁春年, 郭宪, 等. 中国牦牛产业现状及发展对策: 第四届中国牛业发屉大会.中国河南南阳, 2009.
43. 杨晓霞. 牛骨水解蛋白粉制备工艺研究[硕士学位论文]. 内蒙古农业大学, 2016.
44. 俞园园. 类人胶原蛋白-铜螯合物的制备及相关性质研究. 化学与生物工程, 2013, 30(7): 29-32.
45. 张春晖. 骨源食品加工技术. 北京: 科学出版社, 2015.
46. 祝洪山. 猪骨油食用价值探讨. 食品科学, 1987, 8(6): 25-27.
47. 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊疗指南. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2017, 10 (5): 413-444.
48. 周利兵, 姜紫勤, 吴启勋, 等. 青海牦牛骨主要矿物质元素的综合评价. 畜牧与词料科学, 2010(02): 28-29.
49. 赵勇, 陈红剑. 牦牛骨中钙、磷及多种微量元素的分析研究. 西藏科技, 2010(7): 39-41.
50. 赵要武, 许继取, 朱清华, 等. 牦牛骨粉对大鼠骨钙、骨密度及骨钙吸收率影响的研究. 食品科学, 2007 (6): 321-323.
51. Augustin M A., Oliver C M. 1- An overview of the development and applications of nanoscale materials in the food industry. Nanotechnology in the Food Beverage & Nutraceutical Industries, 2012: 3-39.
52. Arnoczky S P., Aksan A. Thermal modification of connective tissues: basic science considerations and clinical implications. Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2001, 8(5): 305.
53. Beata N., Agnieszka M., Marta S., et al. Effect of long-term administration of mangiferin from Belamcanda chinensis on bone metabolism in ovariectomized rats. Journal of Functional Foods, 2018, 46: 12-18.
54. Byun H G., Kim S K. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. Process Biochemistry, 2001, 36(12): 1155-1162.
55. Balogh K., Weber M., Erdélyi M., et al. Investigation of lipid peroxide and glutathione redox status of chicken concerning on high dietary selenium intake. Acta Biologica Hungarica, 2015, 58(3): 269-279.
56. Boutinguiza M., Pou J., Comesaña R., et al. Biological hydroxyapatite obtained from fish bones. Materials Science and Engineering, 2012, 32(3): 478-486.
57. 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. Journal of Applied Physics, 2013, 113(22): 493.
58. Cruz A S., Lins H C., Medeiros R V A., et al. Artificial intelligence on the identification of risk groups for osteoporosis, a general review. BioMedical Engineering OnLine, 2018, 17(1): 12.
59. Cai L., Wiener G. The yak. Ccpa Monitor, 1995, 44(4): 57-58.

60. Chiesa S., Gnansounou E. Protein extraction from biomass in a bioethanol refinery-possible dietary applications: use as animal feed and potential extension to human consumption. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 427-436.
61. Chen K., María Roca. *In vitro* digestion of chlorophyll pigments from edible seaweeds. Journal of Functional Foods, 2018, 40: 400-407.
62. Yan C Y., Zhang S J., Wang C S., et al. A fructooligo saccharide from Achyranthes bidentata inhibits osteoporosis by stimulating bone formation. Carbohydrate Polymers, 2019, 210: 110-118.
63. Chen Z., Wang N., Duan G., et al. Osteoblast-osteoclast interactions. Connective Tissue Research. 2018, 59: 99-107.
64. Daneault A., Prawitt J., Fabien Soulé., et al. Biological effect of hydrolyzed collagen on bone metabolism. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57: 1922-1937.
65. Derouchey J M., Hancock J D., Hines R H., et al. Effects of rancidity and free fatty accids in choice white grease on growth performance and nutrient digestibility in weanling pigs. Journal of Animal Science, 2004, 82(10): 2937-2944.
66. David J. Wilson. Osteoporosis and Sports[J]. 2019.
67. Erfanian A., Mirhosseini H., Manap M Y A., et al. Influence of nano-size reduction on absorption and bioavailability of calcium from fortified milk powder in rats. Food Research International, 2014, 66: 1-11.
68. Eastell, R. Prevention and management of osteoporosis. Medicine, 2017 (45): 565-569.
69. Fahnestock S R., Steinbtichel A. Polyamides and complex proteinaceous materials. Wiley-VCH, 2003.
70. Fitzpatrick L A., Dabrowski C E., Cicconetti G., et al. The effects of ronacaleret, a calcium-sensing receptor antagonist, on bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with low bone mineral density. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2011, 96(8): 2441-2449.
71. Fonkwe L G., Singh R K. Protein recovery from mechanically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. Process Biochemistry, 1996, 37(6): 605-616.
72. Fekete S G., Andrásofszky E., Glávits R., et al. Pathological changes induced by rancid feed in rats and effects on growth and protein utilisation. Acta Veterinaria Hungarica, 2009, 57(2): 247-261.
73. Hansen C., Werner E. Intestinal calcium absorption from different calcium preparations:influence of anion and solubility. Osteoporosis International. 1996(6): 386.
74. Hou L., Chai S T., Liu S J., et al. Comparative studies on beef amino acid composition and fatty acid composition of Qinghai yak and qinchuan cattle. Meat Research, 2013, 27(3): 30-36.
75. Infogest. Static in vitro digestion method for food. 2014.
76. Irvine G B., Shaw C.. High-performance gel permeation chromatography of proteins and peptides on columns of TSK-G2000-SW and TSK-G3000-SW: A volatile solvent giving separation based on charge and size of polypeptides. Analytical Biochemistry, 1986, 155(1): 141-148.

77. Jha S., Wang Z., Laucis N., et al. Trends in media reports, oral bisphosphonate prescriptions, and hip fractures 1996-2012: An Ecological Analysis. Journal of Bone and Mineral Research, 2015, 30(12): 2179-2187.
78. Jie Z., Zhenzhen X., Ailiang C., et al. Identification of meat from yak and cattle using SNP markers with integrated allele-specific polymerase chain reaction–capillary electrophoresis method. Meat Science, 2019, 148: 120-126.
79. Nakashima T., Hayashi M., Fukunaga T., et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. Nature Medicine, 2011, 17(10): 1231-1234.
80. Kim H K., Kim M G., Leem K H. Osteogenic activity of collagen peptide via ERK/MAPK pathway mediated boosting of collagen synthesis and its therapeutic efficacy in osteoporotic bone by back-scattered electron imaging and microarchitecture analysis. Molecules, 2013, 18(12): 15474-15489.
81. Kanis J A. Identification and management of patients at increased risk of osteoporotic fracture: outcomes of an ESCEO expert consensus meeting, Osteoporos International, 2017, 28 (7): 2023-2034.
82. Kanis J A., Cooper C., Rizzoli R., et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. Osteoporosis International, 2018.
83. Kim S., Kim Y., Byun H., et al. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(4): 1984-1989.
84. Kim S C., Kim D H., Mogun H., et al. Impact of the US food and drug administration's safety-related announcements on the use of bisphosphonates after hip fracture. Journal of Bone and Mineral Research, 2016, 31 (8): 1536-1540.
85. Kim S K., Byun H G., Park P J., et al. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(6): 2992-2997.
86. Khoo W., Nor F M., Ardhyananta H., et al. Preparation of natural hydroxyapatite from bovine femur bones using calcination at various temperatures. Procedia Manufacturing, 2015(2): 196-201.
87. McClung M R. Prevention and management of osteoporosis. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2003, 17(1): 53-71.
88. Lotti Egger., Olivia Ménard., Christian Baumann., et al. Digestion of milk proteins: Comparing static and dynamic *in vitro* digestion systems with *in vivo* data. Food Research International, 2019, 118: 32-39.
89. Lin X., Xiong D., Peng Y Q., et al. Epidemiology and management of osteoporosis in the People's Republic of China: current perspectives. Clinical Interventions in Aging, 2015, 25(10): 1017-1033.

90. Li Y., Zhao Y., Sun X., et al. Prevention and therapeutic effects of sika deer velvet collagen hydrolysate on osteoporosis in rats by retinoic acid. China journal of Chinese materia medica, 2010, 35(6): 759-762.
91. Zhang L., Sun B., Xie P., et al. Using near infrared spectroscopy to predict the physical traits of *Bos grunniens* meat. LWT - Food Science and Technology, 2015, 64(2): 602-608.
92. Lou Z., Wang H., Zhang M., et al. Improved extraction of oil from chickpea under ultrasound in a dynamic system. Journal of Food Engineering, 2010, 98(1): 13-18.
93. Matsumoto H. Clinical effects of fish type I collagen hydrolysate on skin properties. ITE Letters on batteries, new technologies and medicine, 2006, 7: 386-390.
94. Furuya M., Kikuta J., Fujimori S., et al. Direct cell–cell contact between mature osteoblasts and osteoclasts dynamically controls their functions *in vivo*. Nature Communications, 2018, 9(1).
95. Minekus M., Alminger M., Alvito P., et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - An international consensus. Food & Function, 2014, 5(6): 1113-1124.
96. Moskowitz R W. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. Seminars in Arthritis & Rheumatism, 2000, 30(2): 87.
97. Morimura S., Nagata H., Uemura Y., et al. Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. Process Biochemistry, 2002, 37(12): 1403-1412.
98. Mada S B., Reddi S., Kumar N., et al. Antioxidative peptide from milk exhibits antiosteopenic effects through inhibition of oxidative damage and bone-resorbing cytokines in ovariectomized rats. Nutrition, 2017, 21: 43-44.
99. Osteoporosis International: A journal established ss result of cooperation between the european foundation for osteoporosis and the national osteoporosis foundation of the USA, 19: 399-428.
100. Olszta M J., Cheng X., Sang S J., et al. Bone structure and formation: A new perspective. Materials Science & Engineering R Reports, 2007, 58(3/4/5): 77-116.
101. Peng Z., Hou H., Zhang K., et al. Effect of calcium-binding peptide from Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) bone on calcium bioavailability in rats. Food Chemistry, 2017, 221: 373-378.
102. Pietschmann P., Rauner M., Sipos W., et al. Osteoporosis: An age-related and gender-specific disease–a mini-review. Gerontology, 2019, 55: 3-12.
103. Parfitt A M. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units (summary of proposed system). Bone, 1988, 9(1): 67-69.
104. Parfitt A M., Mathews C H., Villanueva A R., et al. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. Journal of Clinical Investigation, 1983, 72(4): 1396-1409.
105. Reginster J Y., Neuprez A., Dardenne N., et al. Efficacy and safety of currently marketed anti-osteoporosis medications. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, 2014, 28: 809-834.

106. Renders G A., Vermeer J A., Leung P M., et al. Implications of high-dosage bisphosphonate treatment on bone tissue in the jaw and knee joint. Calcified Tissue International, 2014, 95: 436-45.
107. Sun H M., Wang J Z., Zhang C H., et al. Changes of Flavor Compounds of Hydrolyzed Chicken Bone Extracts during Maillard Reaction. Journal of Food Science, 2014, 79(12): C2415-C2426.
108. Song H., Zhang S., Zhang L., et al. Ingestion of collagen peptides prevents bone loss and improves bone microarchitecture in chronologically aged mice. Journal of Functional Foods, 2019, 52: 1-7.
109. Shimp L. Heat resistance of allograft tissue. Cell and Tissue Bank, 2008, 9(4): 259-266.
110. Špela S H., Hadolin M., Škerget M., et al. Solvent extraction study of antioxidants from balm (*Melissa officinalis L.*) leaves. Food Chemistry, 2003, 80(2): 275-282.
111. Tsuruoka N., Yamato R., Sakai Y., et al. Promotion by collagen tripeptide of type I collagen gene expression in human osteoblastic cells and fracture healing of rat femur. Bioscience Biotechnology & Biochemistry, 2007, 71(11): 2680-2687.
112. Tian Y., Xu Z., Zheng B., et al. Optimization of ultrasonic- assisted extraction of pomegranate (*Punica- granatum L.*) seed oil. Ultrasonics Sonochemistry, 2013, 20(1): 202-208.
113. Van d V R Y., Wyers C E., Teesselink E., et al. Trends in oral anti-osteoporosis drug prescription in the United Kingdom between 1990 and 2012: Variation by age, sex, geographic location and ethnicity. Bone, 2017, 94: 50-55.
114. Van d V R Y., Wyers C E., Geusens P P M M., et al. Incidence of subsequent fractures in the UK between 1990 and 2012 among individuals 50 years or older. Osteoporosis International, 2018, 29(11): 2469-2475.
115. Watanabe-Kamiyama M., Shimizu M., Kamiyama S., et al. Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats. Journal of agricultural and food chemistry, 2009, 58(2): 835-841.
116. Wu G C., Zhang M., Wang Y Q., et al. Production of silver carp bone powder using superfine grinding technology: Suitable production parameters and its properties. Journal of Food Engineering, 2012, 109(4): 730-735.
117. World Health Organization. Prevention and management of osteoporosis. Report of a Scientific Group. WHO Technical Report Series no. 2013, 921: 161-164. Geneva: WHO.
118. Wang S J., Lai Y H., Chen H C., et al. Comparisons of the effects of calcium carbonate and calcium acetate on zinc tolerance test in hemodialysis patients. American Journal of Kidney Diseases, 1992, 19(1):57-60.
119. Wang X., Zhang M., Zhang D., et al. Structural elucidation and anti-osteoporosis activities of polysaccharides obtained from Curculigo orchioides. Carbohydrate Polymers, 2019, 203: 292-301.
120. Yin T., Du H., Zhang J., et al. Preparation and characterization of ultrafine fish bone powder. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2016, 25(7): 1045-1055.
121. Yin T., Park J W., Xiong S. Physicochemical properties of nano fish bone prepared by wet media milling. LWT-Food Science and Technology, 2015, 64(1): 367-373.

122. Zhang J., Yin T., Xiong S., et al. Thermal treatments affect breakage kinetics and calcium release of fish bone particles during high-energy wet ball milling. Journal of Food Engineering, 2016, 183: 74-80.
123. Zhang L., Sun B., Xie P., et al. Using near infrared spectroscopy to predict the physical traits of *Bos grunniens* meat. LWT - Food Science and Technology, 2015, 64(2): 602-608.
124. Zhang M., Wang Y., Zhang Q., et al. UPLC/Q-TOF-MS-based metabolomics study of the anti-osteoporosis effects of Achyranthes bidentata polysaccharides in ovariectomized rats. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 112: 433-441.
125. Zhao S., Kwok K C., Liang H. Investigation on ultrasoundassisted extraction of saikosaponins from radix bupleuri. Separation and Purification technology, 2007, 55(3): 307-312.
126. Zhao X., Wu Z X., Zhang Y., et al. Anti-osteoporosis activity of Cibotium barometz extract on ovariectomy-induced bone loss in rats. Journal of Ethnopharmacology, 2011, 137(3): 1080-1088.

致谢

光阴如梭，研究生生活即将结束。在此，我要向各位老师和同学致以最初诚挚的谢意，正是因为你们的帮助，我的论文才能得以顺利完稿。

首先，衷心感谢我的导师张春晖研究员。无论是选题、实验方案还是文章写作，张老师都倾注了极大的心血，给了我无私的指导和教诲。不管是上班还是休息，每当我有所疑问，老师必定会在第一时间回复并给予指点，帮助我克服一个又一个的困难。我不禁折服于老师孜孜不倦的工作精神和一丝不苟的科研态度。同时，他严谨的治学之风和广阔的科研视野无一不令同学所敬佩。借此机会，我谨向敬爱的张老师说一声：老师，您辛苦了！谢谢老师三年给予我的耐心指导与支持！

其次，我还要感谢李侠师姐。师姐无论是在实验中还是生活中，都给予了我莫大的帮助。不管是生活、学习还是实验，每每遇到问题，师姐总是第一时间帮我克服困难。同时我要衷心感谢贾伟师兄，师兄有着令人敬仰的专业素养，却又平易近人、和蔼可亲、幽默机智。此外，我还要感谢王航师姐、米思师姐。她们有着深厚的专业背景，一丝不苟的科研精神，她们为人热情，像姐姐一样给我们带来帮助、带来欢乐。每每前去请教，她们总是会给予我最中肯的建议。正是因为有了他们严格、无私、高质量的教导，我才能在这几年的学习过程中不断成长。

另外，感谢刘文媛师姐，尚柯师姐，刘云鹤师姐，韩东师兄，沈青山师兄，叶孟亮师兄，许雄师兄，钱书意师兄，张鸿儒师兄，宋玉师姐，王策师姐，李娟师姐，王晓军师姐对我实验、学习及生活中提供的帮助和指导；感谢李康，李睿，王丽莎师妹，王静帆师妹，胡斐斐师妹，辛董董师弟这些小可爱们的陪伴。

同时，感谢我的家人所给予我的关心和支持，你们永远是我最坚实的后盾。

最后，衷心感谢参与我课题所有答辩和论文评审的各位专家能在百忙之中给予我悉心指导。

谢谢大家！

秦晓洁

2019.05.25

作者简历

姓名：秦晓洁 性别：女 民族：汉族

出生年月：1993 年 11 月 籍贯：山东省日照市

学习经历：

2012.9-2016.7 西北农林科技大学 食品科学与工程学院 食品科学与工程专业

2016.9-2019.7 中国农业科学院 农产品加工研究所 农产品加工及贮藏工程专业

硕士期间发表的论文：

秦晓洁, 沈青山, 贾伟, 等. 超声辅助脱脂对牦牛骨粉制备及其理化特性的影响[J]. 农业工程学报, 2018, 34(21): 272-280.

Hang Wang, **Xiaojie Qin**, Si Mi, *et al.* Contamination of yellow-feathered broiler carcasses: Microbial diversity and succession during processing[J]. Food Microbiology, 2019, 83: 18-26.

Qingshan Shen, Chunhui Zhang, Wei Jia, **Xiaojie Qin**, *et al.* Liquefaction of chicken sternal cartilage by steam explosion to isolate chondroitin sulfate[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 215: 73-81.

参与科研项目：

西藏自治区重大科技专项（XZ201801NA04）;

自治区重大科技专项-新疆民族风味肉制品加工关键技术与产业化（2016A01001-1 ）

获得奖励：

2017-2019 专业二等奖学金

2018. 05 社会活动优秀奖