

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580046056.X

[51] Int. Cl.

A23D 9/007 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 7 月 2 日

[11] 公开号 CN 101212909A

[22] 申请日 2005.11.7

[21] 申请号 200580046056.X

[30] 优先权

[32] 2004.11.16 [33] ES [31] P200402755

[86] 国际申请 PCT/ES2005/000600 2005.11.7

[87] 国际公布 WO2006/053917 西 2006.5.26

[85] 进入国家阶段日期 2007.7.5

[71] 申请人 马德里自治大学

地址 西班牙马德里

共同申请人 弗瑞尔冷肉制品股份公司

[72] 发明人 吉尔莫·瑞格里洛·拉达

加威尔·塞尼奥兰斯·罗德里格斯

艾琳娜·艾巴尼兹·伊斯古尔

苏姗娜·桑托奥·迪茨

卡洛斯·托雷斯·奥里维拉斯

劳拉·吉米·帕巴洛

克里斯蒂纳·索罗尔·利瓦斯

莫尼卡·罗德里格斯·加西亚-里科

斯 弗朗西斯科·马林·马丁

阿加多·瑞兹·罗德里格斯

帕洛马·弗瑞尔·苏亚雷斯

[74] 专利代理机构 北京高默克知识产权代理有限公司

代理人 刘立天

权利要求书 3 页 说明书 27 页

[54] 发明名称

制备强化食品的天然生物活性成分的油质混合物

[57] 摘要

本发明提供一种用于制备强化食品的基于天然生物活性成分的油质混合物，所述油质混合物包括用 EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油、 α -生育酚和超临界的迷迭香提取物。任选地，该混合物可包含微藻类杜氏盐藻。本发明还提供一种用该基于天然生物活性成分的油质混合物强化的食品。该强化食品对人体健康有很大的好处，由于其具有 $\omega-3/\omega-6$ 比值低于 5 的稳定的多不饱和脂肪酸含量、稳定的 α -生育酚、从超临界的迷迭香提取物得到的酚二萜和，任选地，从微藻类杜氏盐藻得到的类胡萝卜素的含量。最后，本发明还提到一种制备该强化食品的方法。

1、一种用于制备强化食品的基于天然生物活性成分的油质混合物，其特征在于，其包含用 EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油、 α -生育酚和超临界的迷迭香提取物。

2、根据权利要求 1 的油质混合物，其特征在于，其包含：

- 70-99.9% 的用 10 至 40% EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油，
- 0.001-1% 的 α -生育酚，和
- 0.1-5% 的超临界的迷迭香提取物，

其中这些百分比相当于对于所述油质混合物的总重量以重量计的百分比。

3、根据权利要求 2 的油质混合物，其特征在于，其包含：

- 80-97% 的用 10 至 40% EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油，
- 0.001-0.1% 的 α -生育酚，和
- 1-3% 的超临界的迷迭香提取物，

其中这些百分比相当于对于所述油质混合物的总重量以重量计的百分比。

4、根据权利要求 3 的油质混合物，其特征在于，其包含：

- 82% 的用 10 至 40% 用 EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油，
- 0.08% 的 α -生育酚，和
- 1.6% 的超临界的迷迭香提取物，

其中这些百分比相当于对于所述油质混合物的总重量以重量计的百分比。

5、根据权利要求 1-4 任一项的油质混合物，其特征在于，其还包含微藻类杜氏盐藻。

6、根据权利要求 5 的油质混合物，其特征在于，其包含 0.1-20%，优选 3-18%，更优选 16% 的微藻类杜氏盐藻，其中这些百分比相当于对于所述油质混合物的总重量以重量计的百分比。

7、一种用基于天然生物活性成分的油质混合物强化的食品，所述油质混合物包含用 EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油、 α -生育酚和超临界的迷迭香提取物。

8、根据权利要求 7 的强化食品，其特征在于，所述基于天然生物活性成

分的油质混合物还包含微藻类杜氏盐藻。

9、根据权利要求 7-8 任一项的强化食品，其特征在于，其包含：

- 0.1-20% 的用 10 至 40% EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油，
- 0.00001-1% 的 α -生育酚，
- 0.001-5% 的超临界的迷迭香提取物和，任选地，
- 0.01-5% 的微藻类杜氏盐藻，

其中这些百分比相当于对于所述油质混合物的总重量以重量计的百分比。

10、根据权利要求 9 的强化食品，其特征在于，其包含：

- 1-10% 的用 10 至 40% EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油，
- 0.001-0.5% 的 α -生育酚，
- 0.01-3% 的超临界的迷迭香提取物和，任选地，
- 0.1-3% 的微藻类杜氏盐藻，

其中这些百分比相当于对于所述食品的总重量以重量计的百分比。

11、根据权利要求 10 的强化食品，其特征在于，其包含：

- 5% 的用 10 至 40% EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油，
- 0.005% 的 α -生育酚，
- 0.1% 的超临界的迷迭香提取物和，任选地，
- 1% 的微藻类杜氏盐藻，

其中这些百分比相当于对于所述食品的总重量以重量计的百分比。

12、根据权利要求 7-11 任一项的食品，其特征在于，所述食品存在满足于 ω -6/ ω -3 多不饱和脂肪酸的比值低于 5 的多不饱和脂肪酸。

13、根据权利要求 12 的强化食品，其特征在于，其是肉制品。

14、根据权利要求 13 的强化食品，其特征在于，所述肉制品选自法兰克福(frankfurter)香肠、熟火腿、熟火鸡胸、腌制口利左(chorizo)、腌制 salchichon、腌制猪腰肉和腌制火腿。

15、制备根据权利要求 7-14 任一项强化食品的方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

- c) 通过混合这些天然生物活性成分来制备基于天然生物活性成分的油质混合物，和

d) 将在 a) 中制备的油质混合物结合到要强化的食品中。

16、根据权利要求 15 的方法，其特征在于，将所述天然生物活性成分以如下比例结合：

- 70-99.9% 的用 10 至 40% EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油，
- 0.001-1% 的 α -生育酚，
- 0.1-5% 的超临界的迷迭香提取物和，任选地，
- 0.1-20% 的微藻类杜氏盐藻，

其中这些百分比相当于对于所述油质混合物的总重量以重量计的百分比。

17、根据权利要求 16 的方法，其特征在于，将所述天然生物活性成分以如下比例结合：

- 80-97% 的用 10 至 40% EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油，
- 0.001-0.1% 的 α -生育酚，
- 1-3% 的超临界的迷迭香提取物和，任选地，
- 3-18% 的微藻类杜氏盐藻，

其中这些百分比相当于对于所述油质混合物的总重量以重量计的百分比。

18、根据权利要求 17 的方法，其特征在于，将所述天然生物活性成分以如下比例混合：

- 82% 的用 10 至 40% EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油，
- 0.08% 的 α -生育酚，
- 1.6% 的超临界的迷迭香提取物和，任选地，
- 16% 的微藻类杜氏盐藻，

其中这些百分比相当于对于所述油质混合物的总重量以重量计的百分比。

制备强化食品的天然生物活性成分的油质混合物

发明领域

本发明属于强化天然生物活性成分的食品领域。更具体地，本发明涉及基于天然生物活性成分的油质混合物，将其添加到食品，特别是肉制品中，以便在不损害这些食品的质量或安全的情况下，有效地补偿由陆地动物获得的食品的脂类不平衡并且对人体健康发挥有益的作用，特别是疾病的预防。

发明背景

几年来，动物来源的食品已经上市，其是乳制品（尽管还有一些肉制品），通过加入少量百分比的鱼油来引入 ω -3 多不饱和脂肪酸。 ω -3 脂肪酸不以其天然形式存在于来自陆地动物的肉中，并且其在追求健康益处的动物来源食品中的结合以多年科学经验为基础。

传统上，认为动物脂肪是不健康的。十年来，其脂类组合物已经与遭受心血管疾病的可能性有关联。事实上，建议具有心血管危险的个体在他们的日常饮食中限制全脂乳和肉制品。集中在这一方面的研究已进行许多年以试图确定对于这些事件的科学解释。对这一关联的理论已有显著地发展，特别是在近年来。多年来，已认为动物脂肪造成提高的血清胆固醇水平，并且已经确定了胆固醇含量和心血管疾病之间的直接关联。近年来，已经将甘油三酯，特别是血液中的甘油三酯水平以及这些水平在血液中的持续时间，认为是形成心血管危险因素的起因。

上世纪中期以来，研究已经基于确定多不饱和脂肪酸或 PUFAs 在降低血清胆固醇水平上和在心血管疾病中的作用。在该领域最重要的工作由 Ahrens 等人在 1954 年（Ahrens E.H., D.H. Blankenhorn, T.T. Tastas (1954), "Effect

on human serum lipids of substituting plant for animal fat in the diet", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 86, 872.) 和 Keys 等人在 1957 年 (Keys A., J.T. Anderson, F. Grande (1957), "Serum cholesterol response to dietary fat", *Lancet* 1, 787) 进行, 其确定了对于 PUFAs 在心血管疾病预防中重要性的明显证据。从那以后, 大量的研究集中在这一方面, 其中大部分已证实 ω -3 对心脏的有益作用。例如, 最近由墨尔本 Baker 医学研究所的心血管营养实验室 (the Laboratory of Cardiovascular Nutrition of the Baker Medical Research Institute of Melbourne)、东京医学防护大学药学系 (the Department of Medicine of the Medical Defence College of Tokio)、阿德莱德 (澳大利亚) 的健康科学和营养部门的联邦科学与工业研究组织 (CSIRO of the Division of Health Sciences and Nutrition of Adelaide (Australia)) 和 F Hoffmann-La Roche (瑞士) 的维生素研究机构 (Vitamin Research of F Hoffmann-La Roche (Switzerland)) 的研究人员进行临床试验, 刊登于美国临床营养协会 (American Society for Clinical Nutrition) 的美国临床营养期刊 (*American Journal of Clinical Nutrition*) (*Am J Clin Nutr* 76 (2002) 326–330), 表明 ω -3 脂肪酸, 特别是长链的 ω -3 脂肪酸, 换句话说, DHA (二十二碳己酸) 和 EPA (二十碳戊酸), 可以帮助保持动脉弹性并因此保持正常的血压水平以及降低心血管的危险。所述研究在于向患有高胆固醇血症的患者给予 DHA 或 EPA 或安慰剂七个星期。然后研究人员使用超声波来测定参与者的动脉弹性。接受 ω -3 脂肪酸的参与者的动脉硬化显著降低, 而采用安慰剂的参与者没有出现明显的变化。采用 EPA 的参与者出现 36% 的增加的动脉系统抵抗力, 反映主动脉的弹性, 而采用 DHA 的参与者出现 27% 的增加。

ω -3 脂肪酸 (EPA/DHA) 改善血脂分布, 因为其增加弹性, 减少 LDL 胆固醇, 增加 HDL, 降低动脉的甘油三酯水平并且对抗血栓形成。Adeemia (López-Huertas-E; Baro,-L; Carrero,-J-J; Fonolla,-J (2003) "n-3 fatty acids: health effects and opportunities to increase intake", *Agro Food Industry hi*

tech. 2003; 14(3): 18-21; Dewailly,-E; Blanchet,-C; Gingras,-S; Lemieux,-S; Holub,-B-J (2002), "Cardiovascular disease risk factors and n-3 fatty acid status in the adult population of James Bay Cree", *American-Journal-of-Clinical-Nutrition.* 2002; 76(1): 85-92)。

除了在本文前面部分中提到的 ω -3 的有益的心血管作用，这些脂肪酸对基因表达以及其它生化机体过程有重要的作用。 ω -3 的最重要作用之一在于形成细胞膜。大部分脑组织富含 ω -3 脂肪酸。这些作用的现有知识总结在密歇根州大学的生理学、生物化学和分子生物学系 (the Department of Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology de Michigan State University) 的 Donald B. Jump 刊登于美国生物化学和分子生物学协会的生物化学期刊 (the Journal of Biological Chemistry of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology) 的文章中 (*J. Biol. Chem* 227 (2002) 8755–8758)。

现在人们知道多不饱和脂肪酸 (PUFA) ω -3 和 ω -6 涉及人体中重要的生物过程，而且其比值在许多慢性疾病的预防中是一个关键因素 (Simopoulos A.P. (2002), "The importance of the ratio omega-6/omega-3 essential fatty acids", *Biomedicine and Pharmacotherapy* 56, 365)，所述疾病包括癌症 (Nkondjock A., B. Shatenstein, P. Maisonneuve, P. Ghadirian (2003), "Specific fatty acids and human colorectal cancer: an overview", *Cancer Detection and Prevention* 27, 55)。推荐的比值接近于 1 (Simopoulos A.P. (1999), "Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food suppli Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids", 60, 421)。猪肉中的 ω -3/ ω -6 比值平均在 10 以上，并且在猪油中该比值甚至更高。因此，在这两种情况下该比值远远高于推荐值。

一项由 A.P. Simopoulos 进行的有趣的研究工作 [*Biomedicine & Pharmacotherapy* 56 (2002) 365-379]描述了不同的 ω -6/ ω -3 比值的益处。根

据这项工作：

ω -6/ ω -3= 5，对哮喘有有益的作用。

ω -6/ ω -3= 4，对降低心血管危险有确实的作用。

ω -6/ ω -3=2 至 3 之间预防结肠癌和类风湿性关节炎。

所述的 ω -6/ ω -3 比值越低，其抗乳腺癌的预防效果越好。

ω -6/ ω -3 高于 10，则开始具有副作用。

通过添加 ω -3 以有效地补偿 ω -6 的消极作用，必须同时添加具有抗氧化活性的化合物[B. Demmig-Adams y W.W. Adams, III. [*Science* 298 (2002) 2149-2153]。

从五十年代初以来已经知道了香料的抗氧化性质（Chipault J.R., Muzumo G.R., Hawkins J.M., Lundberg W.O. (1952), “The antioxidant properties of natural spices”, *Food Res.* 17, 46）。在 1955 年，首次发现迷迭香是具有最强抗氧化活性的香草之一（Rac M., Ostric-Matijasevic B. (1955), “The properties of rosemary as an antioxidant”, *Rev. Fr. Corps Gras* 2, 796）。起这一作用的化合物已确定。在 1966 年，分离出鼠尾草酚（Briescorn C.H., Fuchs A., Bredenberg J.B., McChesney J.D., Wenkert E. (1966), “The structure of carnosol”, *J. Org. Chem.* 29, 2293）并且将所述植物的抗氧化剂性质归于这种酚二萜。在 1982 年证实了它的结构以及鼠尾草酸的结构（Wu J.W., Lee M.H., Ho C.T., Chan S.S. (1982), “Elucidation of the chemical structures of natural antioxidants isolated from Rosemary”, *JAOCS* 59, 339）并在同年确定了迷迭香酚和迷迭香酸（Inatani R., Nakatani N., Fuwa H., Seto H. (1982), “Structure of a new antioxidative phenolic diterpene isolated from Rosemary”, *Agric. Biol. Chem.* 46, 1666）。此后，确定了迷迭香二醛（Inatani R., Nakatani N., Fuwa H. (1983), “Antioxidative effect of the constituents of Rosemary and their derivatives”, *Agric. Biol. Chem.* 47, 521）、表迷迭香酚和异迷迭香酚（Nakatani N., Inatani R. (1984), “Two antioxidative diterpenes

from Rosemary and a revised structure for rosmanol”, *Agric. Biol. Chem.* 48, 2081)迷迭香二酚(rosmaridiphenol)和迷迭香醌(rosmariquinone)(Houlihan C.M., Ho C.T., Chang S.S. (1985), “The structure of rosmariquinone. A new antioxidant isolated from *Rosmarinus officinalis* L.”, *JAOCS* 62, 1985)。除这些化合物之外, 人们知道迷迭香的叶子中也含有具有抗氧化剂活性的类黄酮(Okamura N., Haraguchi H., Hashimoto K., Yagi A. (1994), “Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves”, *Phytochem.* 37, 1463)。

总体而言, 分别考虑这些化合物, 发现鼠尾草酸具有最高的抗氧化剂活性, 随后是鼠尾草酚、迷迭香酸、迷迭香酚和迷迭香二醛 (Cuvelier M.E., Richard H., Berset C. (1996), “Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary”, *JAOCS* 73, 645)。鼠尾草酚通常是主要的化合物, 常常相当于提取物的 90% 那么多。实际上, 在提取操作期间它与在迷迭香中发现的其它酚类化合物一起从鼠尾草酸的氧化中产生。

迷迭香的酚二萜充当主要的抗氧化剂 (Basaga H., Tekkaya C., Acikel F. (1997), “Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract”, *Lebensm. Wiss. Technol.* 30, 105; Frankel E.N., Shu W.H., Aeschbach R., Prior E. (1996), “Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid in bulk oil and oil-in-water emulsion”, *J. Agric. Food Chem.* 44, 131; y Haraguchi H., Saito T., Okamura N., Yagi A. (1995), “Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosemary officinalis*”, *Planta Medica* 61, 333)。还表明这些产物具有与超氧化物歧化酶相似的活性 (Seok J.K., Daeseok H., Kwang D.M., Joon S.R. (1995), “Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural antioxidants”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59, 822) 并且具有与谷胱甘肽还原酶和 NADPH-醌还原酶的协同作用, 使它们再生并加强它们所具有的自由基阻断作用。近年来

在老鼠中证明，与所提到的酶的这些协同作用归结于在肺、肝和胃中对抗致癌剂的保护作用（Singletary K.W., Rokusek J.T. (1997), "Tissue specific enhancement of xenobiotic detoxification enzymes in mice by dietary rosemary extract", *Plant Foods for Human Nutrition* 50, 47; Offord, E.A., K. Macé, O. Avanti, A.M.A. Pfeifer (1997), "Mechanisms involved in the chemoprotective effects of rosemary extract studied in human liver and bronchial cells", *Cancer Letters* 114, 275)。还知道抗氧化剂防止血液脂蛋白的过氧化反应的作用机理，其在动脉硬化的发展中是一个关键因素（Pinchuk I., D. Lichtenberg (2002), "The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments", *Progress in Lipid Research* 41, 279）。

迷迭香在烹调中是一种非常常见的成分。然而，由于其强烈的香气以及其结构，不能将它以足以具有预期效果的量添加到肉制品中。这是使用提取物的理由。

对于用溶剂提取以得到抗氧化剂，超临界萃取是好的选择。存在一些提取香气和天然染料、啤酒花以及不同植物的油性树脂的方法。在非极端和无氧化剂条件下提取可以产生具有完好天然性质且没有溶剂残留的高品质产品。

油性树脂的情况是值得注意的，并且其通常可以在产生具有不同功能的产物的相同超临界萃取过程中被分馏。一些应用已经用从唇形科植物（迷迭香、百里香、皮萨草、洋苏草（sage）等）提取的方式进行（Nguyen U., Evans D.D., Frakman G. (1994), "Natural antioxidants produced by supercritical fluid extraction", In "Supercritical Fluid Processing of Foods and Biomaterials", Ed. S.S.H. Rizvi. Chapman & Hall, London. p.103）。在这些情况下，使用超临界流体提取的方式或 SFE（超临界流体萃取），所得油性树脂易于分馏成两种产物：通常具有芳香和抗菌性质的精油，和抗氧化剂。

现在，众所周知的是通过 SFE 得到的天然抗氧化剂比用溶剂提取的具有更大的活性。Djarmati 和 coworkers (Djarmati Z., Jankov R.M., Schwirtlich E., Djulinac B., Djordjevic A. (1991), "High antioxidant activity of extracts obtained from sage by supercritical CO₂ extraction", *JAOCS* 68, 731) 表明通过用超临界 CO₂ 比用 BHT 萃取得到的洋苏草抗氧化剂提取物更有效。近年来，黑胡椒提取物发现有同样的情况发生。(Tipsrisukond N., Fernando L.N., Clarke A.D. (1998), "Antioxidant Effects of Essential Oil and Oleoresin of Black Pepper from Supercritical. Carbon Dioxide Extractions in Ground Pork", *J. Agric. Food Chem.* 46, 4329)。

迷迭香抗氧化剂提取物中的植物化学成分具有重要的生物学活性。其对不饱和脂肪酸的作用是特别有益的。

类似地，在现有技术情况下，知道微藻类杜氏盐藻 (*Dunaliella salina*) 的有益性质，杜氏盐藻是一种属于绿色微藻属 (绿藻) 的单细胞藻类。该微藻是第一种商业用于生产精细化学品的微藻，由于它们的高含盐量大大地简化了培养保持，而没有由病原体带来的外来污染的危险 (Borowitzka L.J., Moulton T.P., Borowitzka M.A. (1985), "Salinity and the commercial production of beta-carotene from *Dunaliella salina*", In: Barclay W.J., McIntosh R., eds. *Algas Biomass: and Interdisciplinary Perspective*. J. Cramer Verlag, Verduz)。目前，将杜氏盐藻作为富含 β -胡萝卜素的食物增补剂来使用 (Mokady S., Abramovici A., Cogan U. (1989), "The safety evaluation of *Dunaliella bardawil* as a potential food supplement", *Food Chem. Toxicol.* 27, 221; Tanaka Y. (1990), "Process for production of encapsulated foodstuff containing *Dunaliella* algae", 美国专利 US 4,915,965 和日本专利 JP 88-40755; Leach G., Oliveira G., Morais R. (1998), "Spray-drying of *Dunaliella salina* to produce a beta-carotene rich powder", *J. Ind. Microb. Biotechnol.* 20, 82; Orset S., Leach G.C., Morais R., Young A.J. (1999), "Spray-drying of the microalga *Dunaliella salina*: Effects on

beta-carotene content and isomer composition", *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4782)。澳大利亚生产 80% 以上的 β -胡萝卜素，其消耗世界范围的所有来自杜氏盐藻的培养物。在这种微藻中发现 β -胡萝卜素的浓度以重量计最多为该微藻干燥重量的 14%，使得这种藻具有最高含量的这种化合物，化合物的累积取决于培养条件（盐度、温度、光照强度）。最近的研究已达到不同 β -胡萝卜素异构体（如，9-顺式）的分离和纯化（Yamano Y., Yoshizawa M., Ito M. (1999), "Isolation of 9Z beta-carotene from *Dunaliella bardawil* and its stereoselective synthesis", *J. Nutr. Sci. Vitamin.* **45**, 49），并且已确定了其与合成的 β -胡萝卜素（主要是“全-反式”成分）相比较的抗氧化剂活性。存在于该微藻中具有官能性质的其它化合物是生育酚（其通常以 α -生育酚来定量，因为其异构组成是未知的）、多不饱和脂肪酸（PUFAs）（Franke H., Springer M., Pulz O., Tietz U., Mueller U. (1994), "Polyunsaturated fatty acids from microalgae", *Int. Food Ingr.* **4**, 41）、甾醇（如麦角甾醇）和水溶性的维生素（如维生素 B1、维生素 B6、维生素 H、维生素 B2 等）。类黄酮或酚类化合物在该藻中的存在还没有描述。然而，期待它们的存在，因为已经在相似的微藻种类中发现了它们（Rauha, JP; Remes, S; Heinonen, M; Hopia, A; Kähkönen, M; Kujala, T; Pihlaja, K; Vuorela, H; Vuorela, P. (2000), "Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds", *Int. J. Food Microbiol.* **56**, p. 3-12）。

关于类胡萝卜素的作用，除了之前描述的作用之外，最近已经证明类胡萝卜素（如叶黄素）例如在预防与年龄有关的黄斑变性中的作用。在这些类胡萝卜素与其它非类胡萝卜素抗氧化剂结合时，这些作用更加明显（Beatty S 等人，*Surv. Ophthalmol* 2000; 45:115-134; Cait 等人，*Prog Retin Eye Res* 2000; 10:205-211），（Junqueira VB 等人，*Mol Aspects Med* 2004; 25:5-16）（Koh HH 等人，*Experimental Eye Research* 2004; 79:21-27; Beatty S 等人，*Arch Biochem Biophys* 2004; 430:70-76）。

最后，在现有技术情况下认识到 α -生育酚从营养视角以及在体内作为抗氧化剂的有益作用。

现在发明人刚好发现，将用长链 ω -3 多不饱和酸（如 EPA 和 DHA）强化的鲑鱼油、 α -生育酚和超临界的迷迭香提取物的组合添加到食品中会导致在抗氧化剂和多不饱和脂肪酸之间产生出乎意外的协同反应。这使抗氧化剂活性比预期转化为更多的增加。这同样有助于在强化食品的生产、储存和烹调期间保持生物活性物质的水平，以及随后对消耗它们的人体健康的有益作用。

因此，本发明提供一种协同的油质组合物，其基于以 EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油、 α -生育酚和超临界的迷迭香提取物，以用于强化食品的制备。例如，该组合物还可以包含微藻类杜氏盐藻，这种微藻还含有对健康有益的组分，如类胡萝卜素叶黄素或 β -胡萝卜素。

类似地，本发明还提供以 ω -3/ ω -6 多不饱和脂肪酸的比值低于 5 的油质混合物进行强化的食品，其对例如哮喘、癌症或不同心血管疾病的疾病的预防有益。由于这些多不饱和脂肪酸和 α -生育酚以及来自超临界的迷迭香提取物的酚二萜之间的协同作用，这一比值同样在所述食品的生产、储存和烹调期间被保持。这些强化食品同样保留了关于感觉性质以及安全的品质特性。

因此，由本发明提供的强化产品对人体健康有益，由于其 ω -3/ ω -6 比值低于 5 的稳定的多不饱和脂肪酸水平，以及其 α -生育酚、由迷迭香的超临界提取物得到的酚二萜和任选地从微藻类杜氏盐藻得到的类胡萝卜素的稳定含量。

发明目的

因此，本发明的目的是提供一种用于制备强化食品的基于天然生物活性成分的协同油质混合物，其包含以 EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油、 α -生育酚和超临界的迷迭香提取物。

本发明的另一目的是提供一种以该基于天然生物活性成分的油质混合物

进行强化的食品。

最后，本发明的另一目的是提供一种制备该强化食品的方法。

发明详述

本发明提供一种用于制备强化食品的基于天然生物活性成分的油质混合物，其特征在于其包含以 EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油、 α -生育酚和超临界的迷迭香提取物。

在本申请的上下文中，术语“强化食品”是指向其中添加有既不是天然含有的也不是以低浓度包含的成分物质的食品。

类似地，术语“天然生物活性成分”是指根据科学知识技术的现状，具有有益于健康的生物学活性的、天然来源的化合物。

如上所述，以 EPA（二十碳戊酸）和 DHA（二十二碳己酸）强化的鲑鱼油提供 ω -3 多不饱和脂肪酸。这些是公知的用于食品工业的功能性成分，所以其使用具有非常低的危险。 ω -3 脂肪酸的引入可以补偿来自陆地动物（特别是来自猪）的油脂的不利的脂类分布，因为猪肉的消耗能导致 ω -6 脂肪酸的增加。这些 ω -6 脂肪酸在细胞水平的氧化还原作用不平衡中的介入会导致：细胞增殖的增加，例如发生癌症；炎性过程的引发，例如发生心血管、自身免疫和神经病学的疾病；以及引起神经紊乱的神经传递的缺乏。类似地，细胞的氧化还原作用平衡对生命过程调节器中的基因表达和产生关键基因突变的 DNA 损伤产生影响。

因此，将以 EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油添加到来自陆地动物的食品中以其对其进行强化，有助于补偿其天然的 ω -3/ ω -6 不平衡，因为，例如，陆地动物（例如猪和火鸡）的动物脂肪中 ω -6/ ω -3 的比值平均高于 10（尽管与 40% 脂肪含量的猪肉相比，火鸡肉只存在 1% 的脂肪含量）。在猪油中， ω -6/ ω -3 的比值甚至更高，在这些动物的肉中该比值大大高于推荐值。

然而，由于 ω -3 脂肪酸的消耗可以增加氧化应激反应，向食品中添加这

些脂肪酸应当与同时添加抗氧化剂（例如，超临界的迷迭香提取物或 α -生育酚）相结合。尽管如上所述的这些抗氧化剂在现有技术情况下是已知的，但是直到现在，其与用 EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油相结合时的重要协同作用还是未知。

超临界的迷迭香提取物，也有助于降低由不饱和脂肪酸所引起的氧化应激反应，其具有预防非常严重的疾病的潜在保护作用，还是出色的天然食物防腐剂。对于本发明的目的，例如，可以使用由 Flavex（奥地利）出售的超临界的迷迭香提取物，或者使用通过在 150 至 250 巴的压力下以及 40 和 70°C 之间的温度条件下用超临界 CO₂ 萃取来制备的超临界的迷迭香提取物。

另一方面，如上所述， α -生育酚作为抗氧化剂存在重要的益处。对于本发明的目的，例如，可以使用由 Roche 销售的 α -生育酚。

强化的鲑鱼油的多不饱和脂肪酸、 α -生育酚和超临界的迷迭香提取物的协同相互作用可以实现 ω -3/ ω -6 的比值低于 5，并且在向其中添加该油质混合物的食品的生产、储存和烹调期间保持该值。该协同作用导致 α -生育酚和超临界的迷迭香提取物的抗氧化剂活性的保持，并导致在向其中添加本发明油质混合物的食品中保持所述的 α -生育酚含量和来自超临界的迷迭香提取物的酚二萜含量。

在本发明的一个具体实施方案中，所述油质混合物包含：

- 70-99.9% 的具有 10 至 40% EPA 和 DHA 的强化鲑鱼油，
- 0.001-1% 的 α -生育酚，和
- 0.1-5% 的超临界的迷迭香提取物，

其中这些百分比相当于对于所述油质混合物的总重量以重量计的百分比。

在优选的实施方案中，所述油质混合物包含：

- 80-97% 以 10 至 40% EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油，
- 0.001-0.1% 的 α -生育酚，和
- 1-3% 的超临界的迷迭香提取物，

其中这些百分比相当于对于所述油质混合物的总重量以重量计的百分比。

在更优选的实施方案中，所述油质混合物包含：

- 82% 以 10 至 40% EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油，
- 0.08% 的 α -生育酚，和
- 1.6% 的超临界的迷迭香提取物，

其中这些百分比相当于对于所述油质混合物的总重量以重量计的百分比。

在本发明的另一具体实施方案中，所述油质混合物还包含微藻类杜氏盐藻。如上所述，这种微藻是最多用于食品的微藻之一，因此已经很好地研究了它的毒性，并且它的使用不会造成健康危险。所述微藻类杜氏盐藻具有相当高的类胡萝卜素含量，其可以提高 α -生育酚和超临界的迷迭香提取物的抗氧化剂作用，并且其还具有对选择性疾病（例如一些影响视力的疾病）的预防作用。由于 α -生育酚和超临界的迷迭香提取物之间的协同作用，该类胡萝卜素含量可以在向其中添加本发明油质混合物的食品中得到保持。

例如，本发明的目的可以用由 Nature Beta Technologies (NBT) Ltd. (以色列) 销售的微藻类杜氏盐藻达到。

在本发明的优选实施方案中，所述油质混合物包含 0.1-20%，优选 3-18%，更加优选 16% 的微藻类杜氏盐藻，其中这些百分比相当于对于所述油质混合物的总重量以重量计的百分比。

在另一方面，本发明提供一种用基于天然生物活性成分的油质混合物强化的食品，所述油质混合物包含如上所述的用 EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油、 α -生育酚和迷迭香的超临界提取物。

在具体的实施方案中，用基于天然生物活性成分的油质混合物来强化该食品，所述混合物包含用 EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油、 α -生育酚和超临界的迷迭香提取物，以及微藻类杜氏盐藻。

在本发明的优选实施方案中，该食品包含：

- 0.1-20% 的用 10 至 40% EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油，

- 0.00001-1% 的 α -生育酚,
- 0.001-5% 的超临界的迷迭香提取物和, 任选地,
- 0.01-5% 的微藻类杜氏盐藻。

其中这些百分比相当于对于所述食品的总重量以重量计的百分比。

在本发明更优选的实施方案中, 该强化食品包含:

- 1-10% 的用 10 至 40% EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油,
- 0.001-0.5% 的 α -生育酚,
- 0.01-3% 的超临界的迷迭香提取物和, 任选地,
- 0.1-3% 的微藻类杜氏盐藻。

其中这些百分比相当于对于所述食品的总重量以重量计的百分比。

类似地, 在本发明更加优选的实施方案中, 该强化食品包含:

- 5% 的用 10 至 40% EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油,
- 0.005% 的 α -生育酚,
- 0.1% 的超临界的迷迭香提取物和, 任选地,
- 1% 的微藻类杜氏盐藻。

其中这些百分比相当于对于所述食品的总重量以重量计的百分比。

将所述鲑鱼油用相对于所述油的总重量以重量计为 10 至 40%比例的 EPA 和 DHA 进行强化。在优选的实施方案中, 所述鲑鱼油用相对于油总重量以重量计为 18%的 EPA 和 12%的 DHA 进行强化。

对于本发明的目的, 例如, 可以使用由 **Productos Quimicos de Murcia S.A.**销售的用 18% EPA 和 12% DHA 强化的鲑鱼油。

本发明的强化食品存在 ω -6/ ω -3 多不饱和脂肪酸的比值低于 5 的多不饱和脂肪酸含量, 如上所说明, 其对人体健康具有重要的益处。由于 ω -3 脂肪酸、 α -生育酚和超临界的迷迭香提取物的协同相互作用, 这一比值在以该方法强化的食品的生产、储存以及随后的烹调中始终保持不变。

在一个具体的实施方案中, 本发明的强化食品是肉制品。优选地, 本发

明的强化食品是选自法兰克福（frankfurter）型香肠、熟火腿（蒸熟的火腿）、熟火鸡胸、腌制“口利左（chorizo）”香肠、腌制“salchichon”香肠、腌制猪腰肉和腌制火腿的肉制品。

在另一方面，本发明相当于一种制备该强化食品的方法，其包括以下步骤：

- a) 通过混合这些天然生物活性成分来制备基于天然生物活性成分的油质混合物，和
- b) 将在 a) 中制备的油质混合物加入到要进行强化的食品中。

在该方法的一个具体的实施方案中，将天然生物活性成分以如下比例结合：

- 70-99.9% 的用 10 至 40% EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油，
- 0.001-1% 的 α -生育酚，
- 0.1-5% 的超临界的迷迭香提取物和，任选地，
- 0.1-20% 的微藻类杜氏盐藻，

其中这些百分比相当于对于所述油质混合物的总重量以重量计的百分比。

在本发明方法的优选实施方案中，将所述天然生物活性成分以如下比例结合：

- 80-97% 的用 10 至 40% EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油，
- 0.001-0.1% 的 α -生育酚，
- 1-3% 的超临界的迷迭香提取物和，任选地，
- 3-18% 的微藻类杜氏盐藻，

其中这些百分比相当于对于所述油质混合物的总重量以重量计的百分比。

在本发明方法的更加优选的实施方案中，将所述天然生物活性成分以如下比例结合：

- 82% 的用 10 至 40% EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油，
- 0.08% 的 α -生育酚，

- 1.6% 的超临界的迷迭香提取物和，任选地，
- 16% 的微藻类杜氏盐藻，

其中这些百分比相当于对于所述油质混合物的总重量以重量计的百分比。

因此，将合适量的每种功能性成分称重，然后混合，得到油质并且略微着色的产品，以制备本发明的强化食品。

如果要强化的食品相当于例如法兰克福（frankfurter）香肠的肉制品，则在混合过程以及肉糜的生产期间添加所述生物活性成分的油质混合物。然后将所述肉糜用于填充香肠肠衣，将香肠煮熟，真空包装并冷藏 30 至 90 天的最长期限。

对于强化的蒸熟的火腿，将生物活性成分的油质混合物与盐水一起注入到生的火腿切肉。此后，将切肉放在按摩滚筒中以帮助所述生物活性化合物的混合物以均匀的方式向内扩散至遍及所述的肉。然后将所述切肉煮熟，真空包装，然后冷藏保存 30 至 90 天的最长期限。

为制备强化的熟火鸡胸，将生物活性成分的油质混合物与盐水一起注入到生的胸部切肉中。接下来，将切肉放在按摩滚筒中以帮助所述生物活性化合物的混合物以均匀的方式向内扩散至遍及所述肉。然后，将所述切肉煮熟，真空包装，然后冷藏保存 30 至 90 天的最长期限。

为制备强化的腌制腰肉，将生物活性成分的油质混合物注入到生猪腰切肉中。接下来，用所述肉充满肠衣并腌制。

为制备强化的腌制火腿，将生物活性成分的油质混合物与盐一起涂抹于生火腿切肉的表面。然后将切肉适度地按压并腌制。

为制备强化的腌制口利左（chorizo），将生物活性成分的油质混合物与绞碎的肉和香料混合。接下来，用所述混合物制成香肠并将其进行腌制。

为制备强化的腌制“salchichon”，将生物活性成分的油质混合物与绞碎的肉和香料混合。然后，用所述混合物制成香肠并将其进行腌制。

因此，总之，由于添加本发明的协同油质混合物，所述强化食品存在以

下优点：

1. 具有低于 5 的 ω -6/ ω -3 比值，并且在整个生产过程中，在其贮存期限内以及在这些产品的烹调过程（例如油炸）中保持该脂肪酸分布。
2. 由于它的 PUFA 结合，而在氧化指数方面不出现明显的增加，但是在其生产、储存和烹调期间该指数几乎保持不变。
3. 在它的生产、储存和烹调期间，添加的抗氧化剂产品的抗氧化剂活性不出现明显的降低。
4. 在它的生产、储存和烹调期间， α -生育酚的含量不出现明显的变化。
5. 在它的生产、储存和烹调期间，由超临界的迷迭香提取物提供的酚二萜的含量不出现明显的变化。
6. 在它的生产、储存和烹调期间，由微藻类杜氏盐藻提供的类胡萝卜素不出现明显的变化。

以下是强化食品的两个实施例，包括所有可能的用于肉制品的加工操作：

- **实施例 1.** 法兰克福（Frankfurter）型香肠，证明在包括烹调以及在冷藏和真空条件下 60 天的储存，及随后的油炸的过程中如何得到并保留所描述的性质。
- **实施例 2.** 腌制的伊比利亚口利左（chorizo），证明在 50 天的腌制过程中如何得到并保留所描述的性质。

给出这些实施例以帮助清楚地理解本发明。本发明的范围不以任何方式受限制于这些实施例。

方法

1. 脂肪酸分布

提取：评价不同的方法以提取存在于样品中的脂类馏分：**a)** 己烷，**b)** 己烷/甲醇，和 **c)** 己烷/水 (5/1)。方法 **a)**和 **b)** 产生难以与己烷相分开的中间相。方法 **c)** 是唯一一个试验过的能使己烷相恰当地分离的方法，因此选择其用来

保持提取。

脂类提取方案：将 5 克样品预先研磨以使所述样品匀化。然后，将 1 克的每个样品放在 50 毫升的 falcon 小瓶中并加入 5 毫升 milli-Q H₂O，随后加入 25 毫升己烷。样品用 Ultra Turrax 用力摇动 1 分钟并收集上清液。在一些情况下，要进行离心步骤以完全地分开水相和己烷相。该离心以 3800 rpm 进行 5 分钟。为了确保将样品中的大部分脂肪被提取出来，用 25 毫升己烷进行第二次提取。在每次提取中，在 40℃、旋转蒸发器中将己烷蒸发至恒重，并且在防止日光的氮气气氛下将所得残余物保存在小瓶中。

提取物的衍生化方案：制备 25 毫克/毫升（用于没有鲑鱼油的样品）和 50 毫克/毫升（用于有鲑鱼油的样品）浓度的所述提取物在氯仿/甲醇 2/1 (v/v) 中的溶液。在 60℃，将全部 0.5 毫升的这些溶液在甲醇（0.1M）中用 NaOH 进行甲基化 30 分钟。接下来，通过加入 0.2 毫升 mQ 水来停止所述衍生化。然后，将形成的脂肪酸甲酯用 1 毫升的己烷萃取两次。为了从己烷相中除去残余的水，将所述部分用无水硫酸钠干燥。

用于脂类分析的色谱方法：在 Perkin-Elmer 自动系统 XL 色谱仪中进行分析，其具有以下尺寸的 BTR-Carbowax 柱：L = 30 m；I.D.：250 μm；相增稠器：0.25 μm。所用的色谱方法如下：

注射器温度：220℃

炉温程序：100℃—180℃ (20℃/min)—220℃ (15℃/min) (33 min)

FID 检测器温度：230℃

总分析时间：40 min.

He 压力：4 巴 (4 .10⁵ Pa)

合成气体压力：4 巴 (4 .10⁵ Pa)

氢气压力：2 巴 (2 .10⁵ Pa)

柱顶部压力：12 巴 (12 .10⁵ Pa)

He 流速：1 ml/min.

分流比：20: 1

注射体积：1 μ l

通过注射 20 毫克/毫升(在己烷中)的 PUFA N°1 Marine Source, Supelco (4-7033)溶液来确定不同的脂肪酸甲酯的保留时间。

2. 氧化指数

本方法基于作为脂类氧化的最终化合物产生的丙二醛(MDA)的定量。为了测定该化合物，使用三氯乙酸将其从样品中提取出来，然后通过硫代巴比妥酸的比色反应来定量，结果形成在 531 纳米处具有最大吸光度峰的粉色加合物。用于所述定量的方法：取出 10 克样品 (± 0.005 g) 并记录重量，加入 20 毫升 10%三氯乙酸并将样品在 20000 rpm 匀化 30 秒。然后，将其在 4000 rpm 和 10°C 条件下离心 30 分钟。离心之后，将样品过滤并在试验试管中收集 2 毫升上清液。向这些 2 毫升的上清液中加入另外 2 毫升的硫代巴比妥酸溶液(TBA, 300 毫克/100 毫升)；将所述溶液在涡旋中混合、覆盖铝箔并在有沸水的水浴锅中放置 20 分钟。然后将其冷却至环境温度并测定在 531 纳米处形成的颜色。为了测定样品本身的颜色，用 2 毫升水代替 2 毫升 TBA，按照对样品进行试验，对空白进行同样的试验。

3. 抗氧化剂活性

所添加化合物的提取通过加入乙醇(每 10 克样品 20 毫升乙醇)来进行，并将在离心后所得滤液干燥。将在每种情况下得到的干燥残余物溶于浓度为 15 毫克/毫升的乙醇中。将全部 0.1 毫升的这种溶液用来评价通过 β -胡萝卜素漂白试验的不同化合物的抗氧化剂能力，其产生 60 μ g/ml 的所研究化合物在所述反应介质中的浓度。当所述物质在助氧化条件下处于具有亚油酸的乳剂中时，所述胡萝卜素漂白试验评价对抑制-胡萝卜素氧化具有潜在抗氧化剂作用的物质的能力。

4. 生育酚的分析

样品的制备

为了将添加到混合物中的鲑鱼油的生育酚含量进行定量，将 20 μ l 油直接注入到 HPLC 总。从每个样品中取出 10 克并与 20 毫升乙醇混合。将其在匀浆器（ultraturrax）中匀化 1 分钟并离心。将上清液经过过滤器并在旋转蒸发器中浓缩至干燥。然后加入 2 毫升乙醇。将浓缩物经过过滤器并注入到使用反相柱（Nova-Pak C18 60A 4 μ m 3.9 x 150 mm, Waters）用于分析的 HPLC 中并且以 1 毫升/分钟的流速展开，随后用 97%甲醇在 1%乙酸中的混合物（v/v）的等梯度方法洗脱 20 分钟。峰用光电二极管检测器进行检测，以通过与所提及的标准品有关的保留时间和它们的谱来确定峰，并且在大部分化合物的最大波长（295 纳米）处进行定量。

为了定量所检测的区域，使用生育酚标准品来展开标定曲线以量化对应于所述样品的峰。

5. 迷迭香提取物的抗氧化剂

提取方法：将总共 10 克的每个样品称重，并将 20 毫升丙酮加入到每个样品中。在匀浆器中匀化 1 分钟之后，将其放置 2 小时以促进相分离。接下来，将它们以 3500 r.p.m 离心 30 分钟。上清液通过滤纸过滤，然后在旋转蒸发器中蒸发。

色谱方法：在具有 150 毫米长、4.6 毫米内径和 3.5 μ m 粒径的 NovaPack C₁₈ 柱的 HPLC 系统中进行分析。用于分离的流动相存在于溶剂 A（具有 1% 乙酸的乙腈）和 B（具有 1% 乙酸的水）的混合物中。所述流动相的组成沿着 30 分钟的梯度进行变化，从 50% B 开始进行 5 分钟，在 15 分钟为 30% B 并且在 30 分钟达到 0% B。在整个分离期间将流速保持在 0.7 毫升/分钟。在 200 至 450 纳米的波长范围中用二极管束检测器来检测化合物。将检测狭缝确定在 4 纳米，并将取样间隔确定在 200 毫秒。选择用于化合物检测的波长为 230 纳米。该设备安装有 20 μ L 的注射器。

6. 类胡萝卜素的分布

来自微藻的类胡萝卜素的提取：在石油醚:丙酮（1:1）中制备 0.05 克/毫

升的螺旋藻和杜氏藻的提取液，以比较两种藻的类胡萝卜素浓度。制备在叔丁基甲基醚中的 0.005 克/毫升杜氏藻（相当于 1%加入所述样品）提取液，以定量在类胡萝卜素提取中所产生的类胡萝卜素损失，因为只进行一种从所述样品的提取。进行第二次提取，以用文献中的数据来确证实验数据。

来自样品的类胡萝卜素的提取：将总共 5 克的每个样品称重，并在家用食品加工器中用伴随有 5 秒停顿的 1 分钟时间切碎。将总共 5 克切碎的混合物与 10 毫升叔丁基甲基醚混合。将所述混合物在匀浆器中匀化 1 分钟，并静置直至两相分开（在暗处）。立即将上清液（20 μ l）注入到所述 HPLC 中用于分析。

HPLC 分析：将所述样品和标准品注入到使用反相柱（Microsorb C18, 250 x 4.6 mm Varian）的 HPLC 中，并以 1 毫升/分钟的流速按照从 50%的混合物 B 开始的梯度展开，其在 14 分钟内增加至 100% B 并保持不变直到 53 分钟的展开结束。所用的溶剂混合物相当于：混合物 A：二氯甲烷:甲醇:乙腈:水（0:60:5:35）和混合物 B：二氯甲烷:甲醇:乙腈:水（25:28:42.5:4.5）。使用光电二极管检测器进行峰检测，以从它们与所提及的标准品有关的保留时间和谱来确定峰，并且在大部分化合物的最大波长（450 纳米）处进行定量。为了定量所检测的区域，使用叶黄素来展开标定曲线以量化所述样品的叶黄素峰。用从 β -胡萝卜素曲线获得的直线来量化 β -胡萝卜素和 9-顺式- β -胡萝卜素的峰，由于它们的谱的相似性。

实施例 1.法兰克福（Frankfurter）型香肠

制备

在得到生产法兰克福（frankfurter）型香肠的标准肉糜之后，在每千克肉糜中加入如下量的油质混合物成分：

- 50 克除臭的并用 18% EPA 和 12% DHA 强化的鲑鱼油
- 1 克超临界的迷迭香提取物

- 0.05 克 α -生育酚
- 10 克杜氏盐藻

将油质混合物加入到混合器里的肉糜中，以便得到具有油质混合物成分均匀分布的乳液。然后，将其制成香肠，并在 70℃烹制 60 分钟。接下来，将所述香肠真空包装，并在 5℃冷藏 90 天。在 180℃油炸三分钟。

结果

下表 1.1.显示了在加工操作之后和在不同储存时间所测定的香肠的脂类分布。

表 1.1. 脂肪酸的摩尔百分比

	对照 肉糜	不在香肠 中的酱	熟香肠	储存 21 天 后的香肠	储存 60 天 后的香肠	油炸的 香肠
豆蔻酸 (C14:0)	1.4	3.0	3.0	2.1	2.1	2.9
棕榈酸 (C16:0)	25.0	23.0	23.9	23.7	22.9	23.5
棕榈烯酸 (C16:1)	2.3	4.4	4.1	4.0	3.9	4.2
硬脂酸 (C18:0)	12.4	10.7	11.4	11.9	11.3	11.0
油酸 (C18:1)	40.7	35.0	36.1	36.9	35.3	36.0
亚油酸 (C18:2) n-6	14.7	12.3	12.5	12.4	12.1	12.6
亚麻酸 (C18:3) n-3	0.8	0.8	0.8	0.8	0.7	0.8
十八碳四烯酸 (C18:4) n-3	0.0	0.6	0.5	0.4	0.4	0.5
C20:1	0.6	0.8	0.7	0.9	0.7	0.7
EPA (C20:5) n-3	0.0	4.5	3.3	3.2	3.2	3.5
DPA (C22:5) n-3	0.0	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3
DHA (C22:6) n-3	0.0	2.6	1.5	1.5	2.0	2.0
饱和的	38.8	36.7	38.3	37.6	36.2	37.4
单不饱和的	43.7	40.2	41.0	41.8	40.0	41.0
n-6	14.7	12.3	12.5	12.4	12.1	12.6
n-3	0.8	8.9	6.3	6.2	6.6	7.1
n-6/n-3	17.9	1.4	2.0	2.0	1.8	1.8

从表 1.1.的数据, 首先可以推断出, 由于添加 50g/kg 的以 EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油, ω -6/ ω -3 的比值从 17.9 降低到低于 2, 并且在整个生产过程、储存和烹调期间保持该数值。而且, 脂类分布也保持稳定。

在加工和储存期间必需保持所述油质混合物的抗氧化剂活性, 以达到所预定的目标。此外, 因为 PUFA 是可氧化的, 所以抗氧化剂活性有助于保持脂类分布的稳定。

表 1.2. 显示对于所述香肠的氧化指数数据。

表 1.2. 氧化指数

	对照肉糜	不在香肠中的肉糜	熟香肠	储存 21 天的香肠	储存 60 天的香肠	油炸的香肠
mg MDA/Kg 香肠	0.10	0.27	0.32	0.29	0.32	0.35

即使添加可观量的 PUFA, 在整个加工时期和储存期间所述氧化指数仍保持低水平。这一结果于其它表现相符, 并证实 PUFA 脂类分布的保持, 以及因此 ω -3 6/ ω -3 的比值和所述油质混合物成分的抗氧化剂活性的保持。

表 1.3. 表现对于所述香肠的抗氧化剂活性分析的结果。

表 1.3. 抗氧化剂活性

	对照肉糜	不在香肠中的肉糜	熟香肠	储存 21 天后的香肠	储存 60 天后的香肠	油炸的香肠
抗氧化剂活性	19.23%	68.73%	57.48%	56.58%	51.80%	63.66%

油质混合物的添加使抗氧化剂活性比在加工前的香肠中测定的数值增加了 3.4 倍。该抗氧化剂活性在加工和储存期间略有降低, 但在储存期限内决不会降低到低于没有油质混合物的产品所得值的 2.5 倍。

油炸之后抗氧化剂活性的增加可能是由于所用油（轻榨优质橄榄油）的

吸附作用。

表 1.4. 显示香肠中的 α -生育酚分析的结果。在加工和储存结束时，香肠中的 α -生育酚的存在是所述油质混合物高抗氧化剂活性的另一个指标。

的确，在其中只将鲑鱼油加 α -生育酚添加到所述香肠的平行试验中，在烹调之前甚至不检测 α -生育酚。此刻，抗氧化剂活性是 32.92%，换句话说，比当加入完全的油质混合物时所得抗氧化剂活性的一半。这证明了 α -生育酚和超临界的迷迭香提取物之间的协同作用。

表 1.4. α -生育酚的浓度

	对照肉糜	不在香肠中的肉糜	熟香肠	储存 21 天的香肠	储存 60 天的香肠	油炸的香肠
$\mu\text{g/g}$ α -生育酚	0.0	30.0	14.5	11.5	10.2	8.7

超临界的迷迭香提取物组分的存在是在加工期间该提取物在香肠中的持久性的指标。表 1.5.显示鼠尾草酸分析的结果，超临界的迷迭香提取物的最有活性的抗氧化剂成分也是最不稳定的。

表 1.5. 鼠尾草酸的浓度

	对照肉糜	不在香肠中的肉糜	熟香肠	储存后 21 天的香肠	储存后 60 天的香肠	油炸的香肠
$\text{mg}/10\text{g}$ 鼠尾草酸	0.0	224.9	198.5	167.6	141.9	140.2

虽然发现存在于所述香肠中的鼠尾草酸的量随着加工进行和储存期间减小，但是证明在加工结束时，甚至在烹调之后，存在显著数量的该化合物。

表 1.6. 给出香肠中类胡萝卜素分析的结果。这些化合物来源于微藻类杜氏盐藻。

表 1.6. 类胡萝卜素的浓度

	对照肉糜	不在香肠中的肉糜	熟香肠	储存 21 天后的香肠	储存 60 天后的香肠	油炸的香肠
mg/g 叶黄素	0.001	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02
mg/g β -胡萝卜素	0.004	0.42	0.37	0.37	0.28	0.41

虽然可以观察到一些波动，但是发现所述类胡萝卜素在加工中始终保持稳定。最后一步过程中的增加可能是由于在微藻细胞内部的这些化合物的释放。

结论

所述油质混合物进入法兰克福（frankfurter）香肠中的结合给予这些香肠抗氧化剂活性，在生产过程、储存和烹调中天然抗氧化剂的含量和 ω -6/ ω -3 比值>5 始终保持稳定。

实施例 2. 腌制的伊比利亚口利左（chorizo）

制备

向传统伊比利亚口利左（chorizo）的标准成分中，在每千克肉糜中加入如下量的油质混合物的成分：

- 50 克除臭的并且补充有 18% EPA 和 12% DHA 的鲑鱼油
- 1 克超临界的迷迭香提取物
- 0.05 克 α -生育酚
- 10 克杜氏盐藻

接下来，将所述混合物在真空下在工业混合器中混合，装入肠衣并腌制至 50 天。

结果

下表 2.1.显示了在加工操作之后和在不同储存时间所测定的腌制口利左（chorizo）的脂类分布。

表 2.1. 所测定的脂肪酸的摩尔百分比

	对照混 合物	口利左	腌制 25 天 的口利左	腌制 50 天 的口利左
豆蔻酸 (C14:0)	1.3	3.9	3.0	2.2
棕榈酸 (C16:0)	27.5	25.2	26.5	26.5
棕榈烯酸 (C16:1)	2.6	5.6	4.8	4.5
硬脂酸 (C18:0)	12.7	10.8	11.7	12.0
油酸 (C18:1)	46.6	36.5	40.1	40.6
亚油酸 (C18:2) n-6	6.1	5.1	5.2	6.2
亚麻酸 (C18:3) n-3	0.4	0.5	0.3	0.5
十八碳四烯酸 (C18:4) n-3	0.0	0.7	0.3	0.4
C20:1	0.7	0.8	0.8	0.8
EPA (C20:5) n-3	0.0	5.3	3.0	2.3
DPA (C22:5) n-3	0.0	0.4	0.3	0.3
DHA (C22:6) n-3	0.0	3.2	2.0	1.5
饱和的	41.6	39.9	41.2	40.8
单不饱和的	49.9	42.9	45.6	46.0
n-6	6.1	5.1	5.2	6.2
n-3	0.4	10.1	5.9	5.0
n-6/n-3	14.2	0.5	0.9	1.2

从表 2.1.的数据，首先可推断出，由于添加 50g/kg 以 EPA 和 DHA 强化的鲑鱼油， ω -6/ ω -3 的比值从 14.2 降低到接近于 1，并且在整个生产过程（包括 50 天的腌制过程）中保持该数值。

关于抗氧化剂活性、 α -生育酚、鼠尾草酸、类胡萝卜素和氧化指数的测定，所述结果类似于所述香肠所表现出来的结果。

结论

所述油质混合物结合到腌制的伊比利亚口利左（**chorizo**）中赋予其抗氧化剂活性，在整个加工过程（包括 **50** 天的腌制时间）中天然抗氧化剂的含量和 ω -6/ ω -3 比值**>5** 始终保持稳定。