

## 含部分水解蛋白婴儿配方奶粉的体外消化特性

张珊珊<sup>1</sup>, 胡婕伦<sup>1</sup>, 彭小雨<sup>2</sup>, 潘丽娜<sup>2</sup>, 董玲<sup>2</sup>, 姜毅康<sup>2</sup>, 汪家琦<sup>2</sup>, 聂少平<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南昌大学食品科学与技术国家重点实验室 中国-加拿大食品科学与技术联合实验室 南昌 330047

<sup>2</sup>澳优乳业(中国)有限公司 湖南澳优食品与营养研究院 长沙 410005

**摘要** 乳蛋白水解工艺可将大分子蛋白水解为小分子蛋白和多肽。添加部分水解蛋白的婴幼儿配方奶粉或有利于婴幼儿消化吸收,然而其与母乳之间的差异尚不清楚。本研究以市场上常见的一款含部分水解蛋白的婴幼儿配方奶粉(EF)为对象,比较其与标准婴幼儿配方奶粉(SF)和母乳(BM)的体外消化吸收特性差异。根据总氨基酸模式和消化后氨基酸模式,分别计算氨基酸得分和可消化氨基酸得分,以评价蛋白质质量。结果表明:两种配方奶粉的蛋白质含量均高于母乳,氨基酸组成与母乳接近,EF、SF和BM的蛋白质体外消化率分别为(33.50±0.39)%、(33.07±0.83)%、(38.49±0.51)%,其中EF的蛋白质吸收率可达BM水平的78%。可消化必需氨基酸得分表明,EF的限制氨基酸为苏氨酸和组氨酸,而其它氨基酸得分均在75分以上,说明其蛋白质质量良好。结论:含部分水解蛋白的婴幼儿配方奶粉比对照奶粉的消化吸收性好,更接近于母乳。本研究结果可为含部分水解蛋白的婴幼儿配方奶粉的消化吸收性能研究提供数据支撑,为蛋白质评价的体外研究方法提供理论依据。

**关键词** 婴幼儿配方奶粉; 部分水解; 母乳; 蛋白质体外消化; 氨基酸评分

**文章编号** 1009-7848(2023)04-0086-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.04.009

蛋白质是生命活动的基础,组成蛋白质的氨基酸是婴幼儿生长所必需的营养物质<sup>[1]</sup>。蛋白质在人体内被消化分解为小肽或氨基酸后才能被利用。蛋白质的消化吸收程度决定蛋白质的营养价值。部分水解蛋白是通过将蛋白进行适度加热或酶解,使其分子质量降低而成为片段更小的蛋白质或肽段,该过程改变了蛋白质表面的抗原决定基,从而能够降低牛奶蛋白过敏的风险<sup>[2]</sup>,并能提高蛋白质的可消化性<sup>[3]</sup>。在配方奶粉中添加部分水解蛋白,可降低过敏反应,更小片段的蛋白质更容易被消化吸收,有利于婴幼儿的健康生长发育<sup>[4]</sup>。然而,含部分水解蛋白的婴幼儿配方奶粉的消化吸收特性尚不清晰,其与母乳间的对比研究鲜见报道。

蛋白质的消化吸收特性可以通过蛋白质分子质量和含量的变化来反映,蛋白质的质量可通过氨基酸得分来反映。其中,可消化必需氨基酸得分(Digestible indispensable amino acid score, DIAAS)<sup>[5]</sup>是评估蛋白质质量的方法之一,然而,其需

要基于必需氨基酸的真正回肠消化率计算得到。在体内研究蛋白质的回肠消化率昂贵、困难,且存在医学伦理桎梏。体外模拟胃肠道消化是一种低成本、操作简单、易重复的替代方式。鉴于此,联合国粮食及农业组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations,FAO)建议开发体外预测人体氨基酸消化率和生物利用度的方法,以更便捷地评估蛋白质质量<sup>[5]</sup>。Havenaa等<sup>[6]</sup>通过体外方法测定鲱鱼卵蛋白的DIAAS,证实了体外方法的可行性。由于母乳样本较难获得,因此DIAAS通常是基于代表性的母乳氨基酸模式计算得出;由于试验条件和仪器设备的不同,因此测得的样品氨基酸模式与代表性母乳氨基酸模式之间的可比性难以保证。

本研究选择市场上常见的一款含部分水解蛋白的婴幼儿配方奶粉(Experimental formula,EF)作为研究对象,比较其与未添加部分水解蛋白的标准配方奶粉(Standard formula,SF)和母乳(Breast milk,BM)在体外消化吸收特性上的差异。同时,基于试验测得的母乳蛋白氨基酸模式以优化DIAAS,在具有可比性的前提下评估蛋白质质量。本研究可为含部分水解蛋白的婴幼儿配方奶粉的消化吸收性能研究提供数据支撑,为蛋白质

收稿日期: 2022-04-07

基金项目: 湖南省创新平台与人才计划项目(2019TP2066)

第一作者: 张珊珊,女,博士生

通信作者: 聂少平 E-mail: spnie@ncu.edu.cn

评价的体外研究方法提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

含部分水解蛋白的婴幼儿配方奶粉(能立多 G4 菁确配方)、标准婴幼儿配方奶粉和母乳(成熟乳)均由澳优乳业(中国)有限公司提供。其中,含部分水解蛋白的婴幼儿配方奶粉中添加了一定含量的部分水解乳清蛋白、酪蛋白磷酸肽和  $\alpha$ -乳清蛋白。

胃蛋白酶、胰酶、2,4,6-三硝基苯磺酸溶液(TNBS,5%水溶液)、L8000 L-亮氨酸,美国 Sigma 公司;猪胆粉,上海康朗生物科技有限公司;考马斯亮蓝超快染色液,上海碧云天生物技术有限公司;磺基水杨酸,北京索莱宝科技有限公司;其它试剂均为国产分析纯级。

### 1.2 仪器与设备

VOSHIN-COS-100 B 数显恒温摇床,无锡沃信仪器有限公司;FE-28 台式 pH 计,梅特勒-托利多国际贸易有限公司;PS-100AD 超声波清洗机,深圳市深华泰超声洗净设备有限公司;5418R

小型台式高速离心机,德国 Eppendorf 公司;Mini-PROTEAN® Tetra 电泳槽、Gel Doc EZ 凝胶成像分析系统,美国 Bio-Rad 公司;Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪,美国 Thermo 公司;L-8900 全自动氨基酸分析仪,日本 HITACHI 公司。

### 1.3 方法

1.3.1 模拟消化液的配制 基于本团队前期建立的体外消化方案<sup>[7-8]</sup>,并参考 Ménard 等<sup>[9]</sup>建立的模拟足月 28 d 新生儿消化模型,同时结合由其他研究者提出的婴儿消化道内 pH 与酶活相关参数<sup>[10-12]</sup>,构建了 5~6 个月婴儿胃肠道的模拟方法。模拟胃消化液(Simulated gastric fluid,SGF)和模拟小肠消化液(Simulated intestinal fluid,SIF)由电解质储备液、酶溶液(SIF 还包括胆汁)和蒸馏水组成。其中,SGF 与 SIF 的电解质储备液浓度均为 1.25 倍(配方见表 1),在添加酶溶液、CaCl<sub>2</sub> 溶液、HCl 和蒸馏水后方可得到 1×的离子浓度。在整个体系中,胃蛋白酶溶液的酶活为 250 U/mL,胰酶溶液的酶活为 10 U/mL(基于其中胰蛋白酶的酶活),胆汁质量浓度为 0.6 mg/mL。其中,胃蛋白酶用蒸馏水配制,胰酶与胆汁用 SIF 电解质储备液配制。

表 1 1.25×电解质储备缓冲液的配制

Table 1 Preparation of the 1.25× electrolyte stock buffer solution

成分	配制浓度/mol·L <sup>-1</sup>	SGF 电解质储备液		SIF 电解质储备液	
		配制 500 mL 用量/ mL	SGF(1×)中的浓度/ mmol·L <sup>-1</sup>	配制 500 mL 用量/ mL	SIF(1×)中的浓度/ mmol·L <sup>-1</sup>
NaCl	2	29.375	94	51.25	164
KCl	0.5	16.25	13	12.5	10
NaHCO <sub>3</sub>	1	-	-	53.125	85
CaCl <sub>2</sub>	0.3	-	-	0.15	3

注:①配制模拟胃和小肠消化液的电解质储备液时,用 6 mol/L HCl 分别将 pH 值调至 4.4,6.5;②由于 Ca<sup>2+</sup>容易在电解质储备液中沉淀,则 CaCl<sub>2</sub>应在消化试验前单独加入。

1.3.2 模拟消化与吸收 配方奶粉在试验前现配现用(15 g/100 mL),母乳解冻匀后使用。5 mL 奶液置于 50 mL 离心管内,依次加入 2.4 mL SGF 电解质储备液,0.24 mL 胃蛋白酶溶液,加入 1 mol/L HCl 使该混合样品 pH 值为 4.4,最后加入一定量蒸馏水使 SGF 体积为 8 mL。将混合物置于 37 °C 恒温摇床(180 r/min)中反应 1 h,以模拟胃部消化。随后,立即向该混合样品中加入 5.6 mL SIF 电解质储备液,0.12 mL 0.3 mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液,2 mL

胆汁和 2 mL 胰酶溶液,加入 1 mol/L HCl 使该混合样品 pH 值为 6.5,最后加入一定量蒸馏水使 SIF 体积为 12 mL。将混合物置于 37 °C 恒温摇床(180 r/min)中反应 1 h,以模拟小肠消化。用蒸馏水替代样品作为空白对照。

在模拟胃部和小肠消化的 5,10,15,30,60 min 时取样。胃部消化样品采用中和灭酶法,即向样品中加入适量 1 mol/L NaHCO<sub>3</sub> 使 pH 值达到 7~8,以使胃蛋白酶失活<sup>[13]</sup>。小肠消化样品采用高

温灭酶法,即取样后立即置于沸水浴中加热 5 min,使酶灭活。用于  $\alpha$ -氨基含量测定的样品,于 8 000 $\times$ g 下离心 10 min,将上清液冻存于 -20  $^{\circ}$ C;而用于 SDS-PAGE 与氨基酸组成与含量分析的样品则无需离心,取样灭酶后直接冻存于 -20  $^{\circ}$ C。

采用透析的方式模拟小肠吸收,透析袋大小为 3 ku<sup>[12]</sup>。取适量经模拟胃肠消化后的奶液置于透析袋中,在超纯水内透析 2 h,更换透析液后透析过夜,再次更换透析液后透析 2 h,透析完毕。收集所有透析外液,旋转蒸发浓缩后冷冻干燥。测定前用适量蒸馏水复溶冻干样。

表 2 SDS-PAGE 凝胶配方

Table 2 SDS-PAGE gel formulation

配方	超纯水/mL	分离胶缓冲液	Tris-HCl/mL	30% Acr/Bic 储液/ $\mu$ L	10% SDS/ $\mu$ L	10% AP/ $\mu$ L	TEMED/ $\mu$ L
15%分离胶	1.1	2.5(1.5 mol/L pH 8.8)		1 300	50	50	2
4%浓缩胶	1.7	0.63(1.0 mol/L pH 6.8)		415	50	50	4

1.3.4 蛋白质水解度和利用度的测定 蛋白质的水解伴随着肽键的断裂,故样品中释放出的  $\alpha$ -氨基含量占  $\alpha$ -氨基总量的百分比即可表示为蛋白质的水解度和利用度。 $\alpha$ -氨基含量的测定参考 Adler-Nissen 等<sup>[15]</sup>提出的三硝基苯磺酸(TNBS)法并略作修改。取适量消化样或亮氨酸标准溶液于 2 mL 离心管中,依次加入 0.490 mL 0.2125 mol/L 磷酸缓冲盐溶液(pH 8.2)和 0.25 mL 0.1% TNBS,混匀后于 50  $^{\circ}$ C 避光反应 60 min。冷却至室温后,加入 1 mL 0.1 mol/L HCl 终止反应并酸化溶液,使 pH 值在 3.7~3.9 之间。采用酶标仪于 340 nm 波长处测量吸光值。样品  $\alpha$ -氨基总量的测定需事先酸水解,再通过 TNBS 法测定其中的  $\alpha$ -氨基含量。

1.3.5 氨基酸分析和生物可及性测定 采用 L-8900 全自动氨基酸分析仪对氨基酸进行定性和定量。上机分析前,测定总氨基酸的样品需事先进行酸水解,而测定游离氨基酸的样品需先用 30 g/L 的磺基水杨酸溶液沉淀蛋白。

消化后样品中游离氨基酸占水解氨基酸的百分比即为氨基酸的生物可及性,其指在消化过程中从样品中释放到消化液中的氨基酸的比例<sup>[16]</sup>,计算公式如下:

1.3.3 消化样的蛋白质组成分析 通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)测定消化物的蛋白质大小分布。选择 15% 的分离胶<sup>[14]</sup>和 5% 浓缩胶进行分析,凝胶配方如表 2 所示。样品与上样缓冲液(5 $\times$ )混合后,于 100  $^{\circ}$ C 加热 3~5 min,12 000 $\times$ g 离心 1 min,最后取 10  $\mu$ L 上清液上样,并使用 4  $\mu$ L Mark 作为分子质量校准。电泳程序为 80 V,25 min,后转 120 V,60 min。将凝胶置于考马斯亮蓝超快染色液内染色 40 min,后用蒸馏水脱色。采用凝胶成像分析系统拍照成像。

氨基酸的生物可及性=

$$\frac{\text{经胃肠消化后样品中的游离氨基酸含量}}{\text{酸水解后样品中的氨基酸含量}} \times 100\% \quad (1)$$

1.3.6 蛋白质评价 通过公式(2)、(3)分别计算氨基酸评分(Amino acid score, AAS)和可消化必需氨基酸得分(Digestible indispensable amino acid score, DIAAS)。当 DIAAS  $\geq$  100 时,被认为蛋白质质量“高”;当介于 75~99 时,被认为“良好”。

$$\text{AAS} = \frac{\text{样品蛋白质中某一必需氨基酸含量}}{\text{FAO 推荐的母乳中对应氨基酸含量}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{DIAAS} = \frac{\text{样品蛋白质中某一可消化必需氨基酸含量}}{\text{FAO 推荐的母乳中对应氨基酸含量}} \times 100\% \quad (3)$$

蛋白质评价的参考对象往往是 FAO 推荐的代表性母乳氨基酸模式<sup>[5]</sup>。由于本研究含有母乳样本,可在同一试验条件下,获得母乳和奶粉的氨基酸组成。计算时将 FAO 推荐的母乳氨基酸模式替换为本次测定的母乳氨基酸模式<sup>[17]</sup>,可获得校正后的 AAS(AAS-2)和校正后的 DIAAS(DIAAS-2)。校正后的参数可更好地评价奶粉相比于母乳的蛋白质质量。

值得注意的是, DIAAS 和 DIAAS-2 的参考对象均是未消化母乳的氨基酸模式,其仅考虑了样

品的消化情况,而未考虑母乳的消化情况。鉴于此,本研究将参考对象替换为本次测定的消化后游离的母乳氨基酸模式,用 DIAAS-3 表示,以真实评估奶粉在消化状态下的蛋白质质量。

#### 1.4 数据统计分析

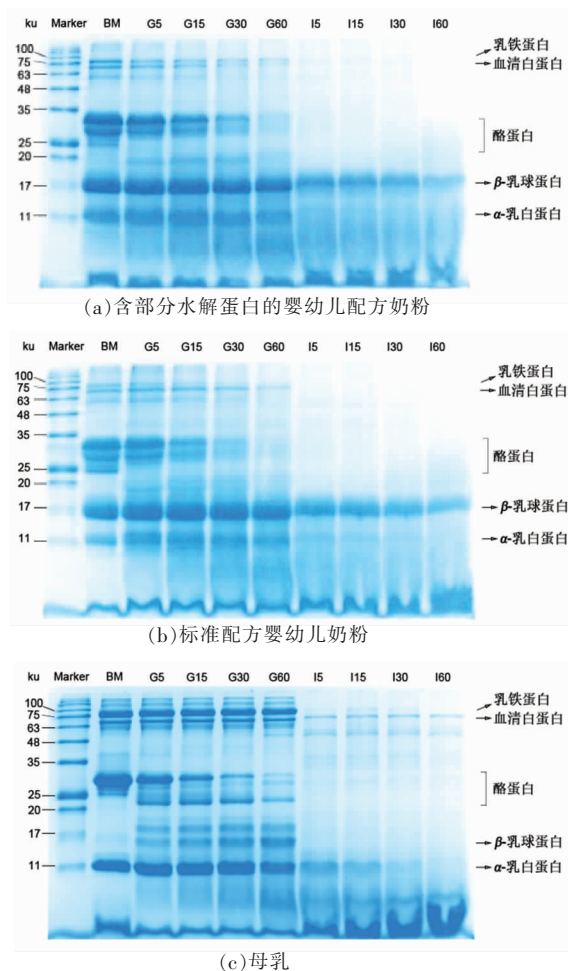
每种样品分别进行 3 次独立、平行的模拟消化试验,各数据结果表示为“平均值±标准差”。采用 IBM SPSS 统计软件(版本 26.0)进行单因素方差分析,采用 Tukey 法进行两两比较, $P < 0.05$  则认为差异具有统计学意义。采用 GraphPad Prism 9 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 模拟消化过程中的分子质量变化

SDS-PAGE 可将蛋白质内的组分分离,测定不同消化时间点的蛋白组成,可以观察到大分子蛋白的减少和小分子蛋白的增多。两种配方奶粉与母乳在各消化时间点的蛋白质分子质量组成如图 1 所示,依据先前文献报道的蛋白质分子质量可确定部分蛋白质的名称<sup>[18]</sup>。母乳中的蛋白可分为两大类,分别为乳清蛋白和酪蛋白<sup>[19]</sup>。由图可知,未消化的母乳与奶粉样品中深颜色条带主要为酪蛋白(22~30 ku),乳清蛋白的  $\alpha$ -乳白蛋白(11 ku), $\beta$ -乳球蛋白(17 ku),血清白蛋白(66 ku)和乳铁蛋白(80 ku),该蛋白组成与前人报道基本一致<sup>[20]</sup>。根据颜色深浅,可发现 EF 在 11 ku 及以下分子质量的蛋白含量比 SF 更多,其可能为 EF 中添加的水解乳清蛋白。

在模拟胃部消化过程中,两种配方奶粉与母乳的蛋白质水解趋势近似,酪蛋白的特征条带在模拟胃部消化 60 min 内颜色逐渐变淡,而乳清蛋白的颜色却基本无变化,可能原因是乳清蛋白对胃蛋白酶的水解具有抗性<sup>[16]</sup>。进入模拟小肠消化阶段后,配方奶粉与母乳之间的蛋白质变化逐渐出现差异。随着消化时间的延迟,两种配方奶粉与母乳中的大分子质量蛋白质大部分被消化完全,而奶粉中尚存留部分  $\beta$ -乳球蛋白,而母乳中尚存留部分乳铁蛋白和血清白蛋白。对于三者而言,酪蛋白均在小肠消化的前 5 min 内消耗殆尽,这与杨博睿等<sup>[21]</sup>通过 SDS-PAGE 研究母乳蛋白的体外消化结果基本一致。



注:G5,G15,G30 和 G60 分别代表模拟胃消化 5,15,30,60 min 的样品;I5,I15,I30 和 I60 分别代表模拟小肠消化 5,15,30,60 min 的样品。

图 1 两种婴幼儿配方奶粉与母乳在体外模拟胃肠道消化过程中的 SDS-PAGE 代表性图谱

Fig.1 SDS-PAGE profile of infant formula and human milk in simulating gastrointestinal digestion *in vitro*

### 2.2 体外蛋白质消化吸收性

蛋白质作为婴幼儿重要的营养来源,需经胃肠道消化吸收后方可被利用,因此测定其消化吸收率对评价蛋白质质量具有重要意义。通过测定消化液中释放的  $\alpha$ -氨基含量可反映蛋白质的水解情况。模拟消化过程中的  $\alpha$ -氨基释放情况如图 2a 所示,其中前 60 min 为模拟胃部消化阶段,后 60 min 为模拟小肠消化阶段。在模拟胃部消化时,配方奶粉和母乳中的蛋白质均在胃蛋白酶的作用下开始水解,并在 30 min 内基本达到平衡;进入模拟小肠阶段后,在胰蛋白酶的作用下,蛋白质继

续水解,奶粉在小肠消化前5 min的 $\alpha$ -氨基释放量快速升高,而母乳却相对缓慢。为了更好地比较奶粉与母乳消化前、后的 $\alpha$ -氨基含量差异,通过柱状图表示(图2b)。3种未消化样品的初始 $\alpha$ -氨基含量具有显著差异( $P<0.05$ ),一份EF(60 mL)中的 $\alpha$ -氨基为 $(44.14\pm 2.78)\text{mg}$ ,显著高于SF $(29.77\pm 1.32)\text{mg}$ 与BM $(21.77\pm 2.12)\text{mg}$ ;模拟胃部消化以及胃肠消化后,依旧为EF显著高于另外两种( $P<0.05$ ),在小肠消化终点,EF中的 $\alpha$ -氨基含量为 $(207.13\pm 1.90)\text{mg}$ ,SF中为 $(188.47\pm 3.97)\text{mg}$ ,BM中为 $(124.58\pm 1.38)\text{mg}$ 。由图2b的吸收情况可知,并不是所有可释放的 $\alpha$ -氨基都可以被吸收,其中EF中的可吸收部分高达 $(106.46\pm 1.00)\text{mg}$ ,约为可释放部分的1/2,显著高于另外两种乳液( $P<0.05$ )。

若不考虑初始的氨基酸含量,蛋白质的水解情况如图2c和图2d所示。由图2d可知,BM、EF和SF在模拟胃消化后的蛋白质消化率分别为 $(19.12\pm 0.16)\%$ , $(11.15\pm 0.22)\%$ 和 $(10.70\pm 0.40)\%$ ,在模拟小肠消化后分别为 $(38.49\pm 0.51)\%$ , $(33.50\pm 0.39)\%$ 和 $(33.07\pm 0.83)\%$ ,故BM的蛋白质消化率均显著高于两种奶粉( $P<0.05$ ),而两种奶粉之间并无显著性差异( $P>0.05$ )。对于蛋白质吸收率,

BM中有 $(28.15\pm 0.77)\%$ 的蛋白质可被消化利用,显著高于奶粉( $P<0.05$ ),其中EF为 $(21.88\pm 0.21)\%$ ,SF更少,仅有 $(12.6\pm 0.83)\%$ 。在胃肠消化后,两种奶粉的消化率虽然无显著性差异,但是其可吸收的程度相差较大,EF中蛋白质的生物利用度可达到BM的78%左右,而SF仅为BM的45%。可以推断,由于两种奶粉蛋白质组成相似,故其蛋白质的水解度变化基本一致,而生成的小分子或奶液本身自带的小分子含量不同却会引起生物利用度的差异。综上所述表明,EF的蛋白质消化吸收相对于SF更接近BM,且比SF更易吸收。郭艳红等<sup>[22]</sup>报道了不同婴幼儿奶粉的体外蛋白质消化情况(无母乳作为对照),各奶粉在模拟胃部消化后的蛋白质消化率在50%左右,在模拟小肠消化后的蛋白质消化率均可达到70%。该消化率高于本研究中的结果,可能原因是模拟消化的时间更长,酶活力更强,其胃和小肠的模拟消化时间均长达1.5 h,而本研究所采用的模拟方法为目前国际上主流且较新的方法,考虑到婴幼儿消化的实际情况,分别选择1 h作为胃和小肠的消化时间,尽管时间较短,但更为合理。董学艳等<sup>[23]</sup>在研究母乳和不同婴幼儿配方奶粉的蛋白质消化特性中发现母乳的蛋白质水解度高于奶粉,与本研究结果一致。

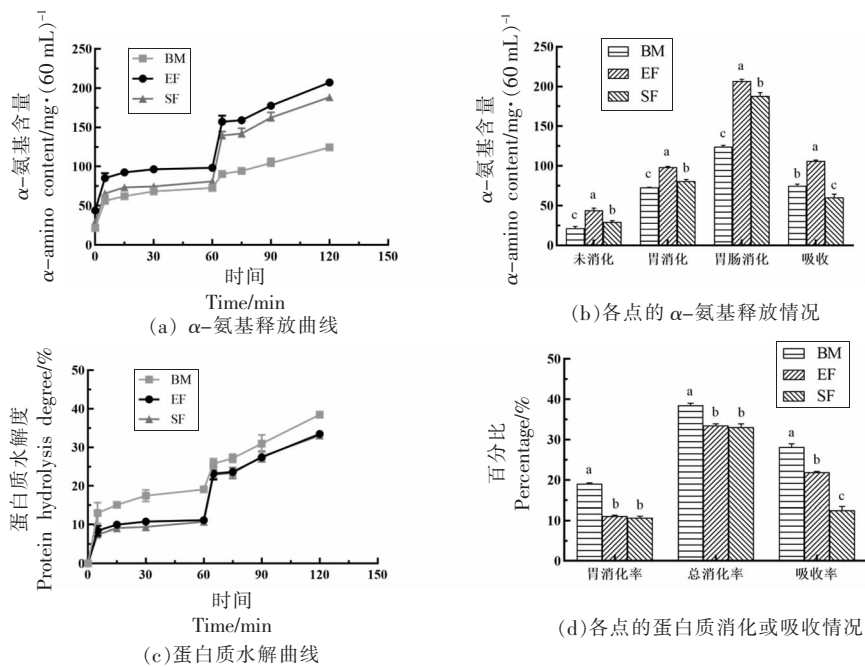


图2 两种婴幼儿配方奶粉与母乳的蛋白质消化情况

Fig.2 Protein digestion of infant formula and human milk

### 2.3 氨基酸组成及氨基酸评分

蛋白质的营养价值通常根据蛋白质的含量、氨基酸组成和消化吸收利用程度来评价,因此检测氨基酸的组成尤为重要。两种配方奶粉与母乳的总氨基酸组成如表 3 所示。比较发现,两种奶粉与 BM 氨基酸组成相似,奶粉的氨基酸总量略高于 BM。本研究所测定的母乳氨基酸组成与刘翠等<sup>[24]</sup>报道的结果基本一致。

通常而言,婴儿配方奶粉的必需氨基酸模式越接近母乳,则越有利于婴儿的生长发育。因此,基于母乳氨基酸模式计算奶粉的 AAS 是一项十分关键的蛋白质评价指标,其分数越接近 100,说明其含量与母乳约为接近。两种奶粉的 AAS 结果如表 4 所示,其中 AAS 是基于 FAO 推荐的母乳

氨基酸模式计算得到的,为消除试验仪器或方法上存在的与 FAO 推荐值之间的误差,AAS-2 由本研究所获得的母乳氨基酸模式计算得到。对于 AAS,两种奶粉中的第一限制氨基酸是芳香氨基酸(酪氨酸和苯丙氨酸),并且含硫氨基酸(蛋氨酸和半胱氨酸)和异亮氨酸的值均低于 100。在张雪等<sup>[25]</sup>的研究中,婴幼儿配方牛、羊奶粉的第一限制氨基酸为含硫氨基酸。对于 AAS-2,各类必需氨基酸的 AAS 均高于 100。酪氨酸和苯丙氨酸可能由于方法或仪器原因,检测值低于 FDA 推荐值,AAS-2 或许更能反映奶粉与母乳之间氨基酸的组成情况,从而推测本试验采用的两种配方奶粉的必需氨基酸模式与母乳十分接近。

表 3 两种婴幼儿配方奶粉与母乳的总氨基酸组成

Table 3 Total amino acid composition of infant formula and human milk

氨基酸	EF	SF	BM
Ile*	52.18 ± 0.89 <sup>a</sup>	51.15 ± 0.39 <sup>a</sup>	41.19 ± 1.48 <sup>b</sup>
Leu*	124.00 ± 1.58 <sup>a</sup>	123.42 ± 1.31 <sup>a</sup>	107.81 ± 3.14 <sup>b</sup>
Lys*	96.76 ± 1.30 <sup>a</sup>	92.37 ± 0.75 <sup>b</sup>	67.43 ± 1.32 <sup>c</sup>
Met*	19.11 ± 0.51 <sup>b</sup>	20.59 ± 0.32 <sup>a</sup>	13.90 ± 0.44 <sup>c</sup>
Cys	10.57 ± 0.23 <sup>a</sup>	9.30 ± 0.30 <sup>a</sup>	10.62 ± 1.20 <sup>a</sup>
Tyr	17.61 ± 0.63 <sup>b</sup>	20.79 ± 0.32 <sup>a</sup>	18.91 ± 0.97 <sup>b</sup>
Phe*	32.92 ± 0.56 <sup>b</sup>	35.82 ± 0.57 <sup>a</sup>	25.95 ± 1.07 <sup>c</sup>
Thr*	55.15 ± 0.87 <sup>b</sup>	51.82 ± 0.48 <sup>a</sup>	37.65 ± 1.76 <sup>c</sup>
Val*	62.90 ± 1.10 <sup>a</sup>	66.25 ± 0.11 <sup>a</sup>	51.34 ± 2.42 <sup>b</sup>
His*	21.75 ± 0.35 <sup>b</sup>	23.24 ± 0.27 <sup>a</sup>	20.07 ± 0.83 <sup>c</sup>
Asp	87.09 ± 1.58 <sup>a</sup>	87.11 ± 0.67 <sup>a</sup>	70.96 ± 2.65 <sup>b</sup>
Glu	173.80 ± 2.72 <sup>a</sup>	178.24 ± 1.56 <sup>a</sup>	154.90 ± 8.56 <sup>b</sup>
Ser	48.05 ± 0.76 <sup>a</sup>	48.68 ± 0.37 <sup>a</sup>	36.77 ± 1.70 <sup>b</sup>
Gly	16.09 ± 0.32 <sup>b</sup>	19.32 ± 0.08 <sup>a</sup>	17.34 ± 1.03 <sup>b</sup>
Arg	29.37 ± 0.38 <sup>a</sup>	31.78 ± 0.83 <sup>a</sup>	31.66 ± 2.07 <sup>a</sup>
Ala	41.09 ± 0.67 <sup>a</sup>	39.24 ± 0.30 <sup>a</sup>	29.65 ± 2.00 <sup>b</sup>
Pro	58.83 ± 0.98 <sup>b</sup>	65.04 ± 1.45 <sup>a</sup>	63.04 ± 1.79 <sup>a</sup>
EAA(E)	464.77 ± 7.03 <sup>a</sup>	464.67 ± 3.72 <sup>a</sup>	365.34 ± 11.74 <sup>b</sup>
TAA(T)	947.27 ± 15.03 <sup>b</sup>	964.15 ± 8.88 <sup>b</sup>	799.20 ± 29.85 <sup>a</sup>
E/T(%)	46.77 ± 0.09 <sup>a</sup>	45.78 ± 0.07 <sup>b</sup>	43.21 ± 0.51 <sup>c</sup>

注:结果表示为 mg/g 蛋白质。\*, 必需氨基酸。英文缩写:Ile 为异亮氨酸(Isoleucine), Leu 为亮氨酸(Leucine), Lys 为赖氨酸(Lysine), Met 为蛋氨酸(Methionine), Cys 为半胱氨酸(Cysteine), Tyr 为酪氨酸(Tyrosine), Phe 为苯丙氨酸(Phenylalanine), Thr 为苏氨酸(Threonine), Val 为缬氨酸(Valine), His 为组氨酸(Histidine), Asp 为天冬氨酸(Aspartic acid), Glu 为谷氨酸(Glutamic acid), Ser 为丝氨酸(Serine), Gly 为甘氨酸(Glycine), Arg 为精氨酸(Arginine), Ala 为丙氨酸(Alanine), Pro 为脯氨酸(Proline), EAA 为必需氨基酸(Essential amino acid), TAA 为总氨基酸(Total amino acids)。同行不同小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

### 2.4 配方奶粉和母乳氨基酸生物可及性及可消化必需氨基酸得分

氨基酸的组成模式是决定蛋白质质量的重要

因素,而消化决定了可被机体利用的氨基酸。表 5 为奶粉和母乳消化后的游离氨基酸组成,部分氨基酸的含量低于检测限而无数值显示,其含量较

低可能与蛋白质的消化程度低有关。可游离的氨基酸占其总量的比例称为氨基酸的生物可及性,相关结果见图3。整体而言,苯丙氨酸在所有必需氨基酸中具有较高的生物可及性,其次是赖氨酸和亮氨酸。对于两种奶粉而言,EF在各氨基酸的生物可及性均高于SF,尤其是苏氨酸和组氨酸,SF在消化后几乎没有这两类氨基酸游离出来。该结果说明经过水解处理的蛋白可以有利于组氨酸的释放,组氨酸是婴幼儿的一种必需氨基酸,有利于婴幼儿的生长发育。

氨基酸的评分方法中,AAS使用最为广泛,然而由于其未考虑到蛋白质的消化率,因此FDA提出了一种新的方法评价氨基酸,即DIAAS,可由公式(3)计算得到。为消除仪器带来的误差,以及更好地比较两种奶粉与母乳之间的氨基酸组成和消化情况,分别计算了DIAAR-2和DIAAR-3,结果见表4。由于母乳作为婴幼儿的首选推荐膳食,母乳的消化水平可作为奶粉对比的基准,即奶粉的消化情况与母乳的消化情况越接近则越好。DIAAS-3是基于二者消化后的情况进行对比,能较

好地反映奶粉相比于母乳的消化情况。由表4可知,SF的DIAAS-3结果显示组氨酸和苏氨酸比率为0,表明其蛋白质营养价值在消化后无法得到良好的利用。相比之下,EF的DIAAS-3最低值为苏氨酸 $15.06 \pm 1.34$ ,苏氨酸或为该奶粉的第一限制氨基酸;组氨酸的得分为 $67.34 \pm 6.86$ ,为第二限制氨基酸。Maathuis等<sup>[7]</sup>的研究中,发现牛乳中可消化的组氨酸含量为人乳的88.23%,略高于本试验中的结果。总体而言,EF在其它氨基酸的得分均在75以上,可认为其蛋白质质量良好,且比SF更接近BM的消化情况。

### 3 结论

本研究在同一试验条件下研究了EF、SF和BM之间蛋白质的消化吸收情况,更直接地反映了奶粉与母乳之间的差异,同时对两种奶粉蛋白质质量进行了评价。研究发现,奶粉和母乳在蛋白质组成和含量上的差异造成了其蛋白质消化特性的差异。EF具有更多小分子的蛋白或肽链,在体外模拟婴幼儿胃肠道消化后,发现该EF比SF更易

表4 两种婴幼儿配方奶粉的氨基酸评分

Table 4 Amino acid score of infant formula

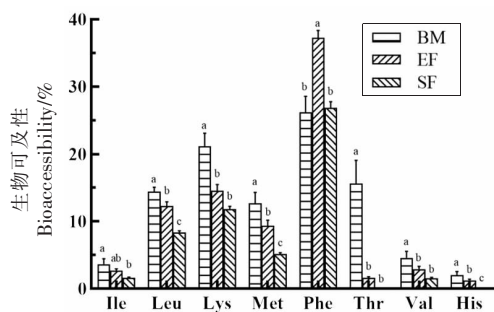
氨基酸	AAS	AAS-2	DIAAS	DIAAS-2	DIAAS-3
EF					
Ile	$94.87 \pm 1.62$	$126.67 \pm 2.17$	$2.54 \pm 0.21$	$3.39 \pm 0.28$	$93.11 \pm 7.61$
Leu	$129.17 \pm 1.65$	$115.02 \pm 1.47$	$15.88 \pm 0.59$	$14.14 \pm 0.53$	$97.92 \pm 3.67$
Lys	$140.24 \pm 1.89$	$143.51 \pm 1.93$	$20.43 \pm 1.03$	$20.91 \pm 1.05$	$98.65 \pm 4.97$
SAA	$89.96 \pm 2.24$	$121.06 \pm 3.02$	$5.41 \pm 0.36$	$7.27 \pm 0.48$	$81.31 \pm 5.42$
AAA	$53.75 \pm 1.22^*$	$112.62 \pm 2.55$	$24.26 \pm 0.50$	$50.83 \pm 1.04$	$125.65 \pm 2.57$
Thr	$125.34 \pm 1.98$	$146.48 \pm 2.31$	$2.01 \pm 0.18$	$2.35 \pm 0.21$	$15.06 \pm 1.34$
Val	$114.36 \pm 2.00$	$122.51 \pm 2.15$	$3.34 \pm 0.40$	$3.58 \pm 0.42$	$77.76 \pm 9.20$
His	$103.57 \pm 1.68$	$108.35 \pm 1.76$	$1.30 \pm 0.130$	$1.36 \pm 0.14$	$67.34 \pm 6.86$
SF					
Ile	$93 \pm 0.71$	$124.17 \pm 0.95$	$1.54 \pm 0.05$	$2.05 \pm 0.07$	$56.31 \pm 1.88$
Leu	$128.56 \pm 1.37$	$114.48 \pm 1.22$	$10.74 \pm 0.28$	$9.56 \pm 0.25$	$66.2 \pm 1.74$
Lys	$133.87 \pm 1.08$	$136.99 \pm 1.11$	$15.85 \pm 0.48$	$16.22 \pm 0.49$	$76.5 \pm 2.33$
SAA	$90.58 \pm 1.43$	$121.9 \pm 1.92$	$3.2 \pm 0.1$	$4.31 \pm 0.13$	$48.2 \pm 1.46$
AAA	$60.22 \pm 0.95^*$	$126.18 \pm 1.99$	$18.02 \pm 0.45$	$37.76 \pm 0.94$	$93.34 \pm 2.34$
Thr	$117.77 \pm 1.08$	$137.63 \pm 1.27$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$
Val	$120.45 \pm 0.19$	$129.03 \pm 0.21$	$1.91 \pm 0.13$	$2.04 \pm 0.14$	$44.29 \pm 3.07$
His	$110.69 \pm 1.28$	$115.8 \pm 1.34$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$

注:\*为第一限制氨基酸。英文缩写:Ile为异亮氨酸(Isoleucine),Leu为亮氨酸(Leucine),Lys为赖氨酸(Lysine),AAA为芳香族氨基酸(Aromatic amino acid),SAA为含硫氨基酸(Sulfur-containing amino acid),Thr为苏氨酸(Threonine),Val为缬氨酸(Valine),His为组氨酸(Histidine)。

表 5 两种婴幼儿配方奶粉与母乳消化后的游离氨基酸  
Table 5 Free amino acids of infant formula and human milk after digestion

氨基酸	EF	SF	BM
Ile*	1.40 ± 0.11	0.85 ± 0.03	1.50 ± 0.35
Leu*	15.25 ± 0.57	10.31 ± 0.27	15.57 ± 1.13
Lys*	14.10 ± 0.71	10.93 ± 0.33	14.29 ± 1.53
Met*	1.78 ± 0.12	1.06 ± 0.03	1.77 ± 0.26
Cys	-	-	-
Tyr	10.55 ± 0.32	7.33 ± 0.26	11.34 ± 1.11
Phe*	12.25 ± 0.15	9.61 ± 0.22	6.81 ± 0.88
Thr*	0.89 ± 0.08	-	5.88 ± 1.32
Val*	1.84 ± 0.22	1.05 ± 0.07	2.37 ± 0.60
His*	0.27 ± 0.03	-	0.41 ± 0.11
Asp	-	-	1.87 ± 1.49
Glu	1.49 ± 0.03	1.17 ± 0.00	20.19 ± 6.14
Ser	0.56 ± 0.05	0.11 ± 0.03	2.36 ± 0.41
Gly	0.49 ± 0.01	0.47 ± 0.02	1.85 ± 0.49
Arg	11.40 ± 0.54	9.92 ± 0.19	15.63 ± 1.25
Ala	-	-	3.10 ± 0.96
Pro	-	-	-

注:结果表示为 mg/g 蛋白质。\*, 必需氨基酸;- 含量低于仪器检测限。



注:不同小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

图 3 氨基酸的生物可及性

Fig.3 Bioaccessibility of amino acids

吸收,其蛋白质吸收率可达到母乳的 78%。根据 DIAAR-3 的结果,发现该奶粉必需氨基酸(除苏氨酸和组氨酸外)的可消化利用情况均能达到母乳的 75%,认为其蛋白质质量良好。以上研究结果表明,本试验采用的含部分水解蛋白的婴幼儿配方奶粉比未添加部分水解蛋白的标准婴幼儿配方奶粉具有良好的消化吸收性能,与母乳更为接近。未来可在动物实验中进一步证实其与母乳蛋白质

消化利用的相似性,为婴幼儿配方奶粉的开发提供更多的科学依据。

## 参 考 文 献

- [1] 宫春颖,王青云,粘靖祺,等. 婴幼儿配方食品中氨基酸模式的研究进展[J]. 中国乳业, 2020(7): 59-63.  
GONG C Y, WANG Q Y, NIAN J Q, et al. Research progress of amino acid composition in infant formula[J]. China Dairy, 2020(7): 59-63.
- [2] 刘爽,陈志永. 蛋白水解产物对婴幼儿成长的作用[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(2): 363-367.  
LIU S, CHEN Z Y. Effect of proteolysis products on infant growth[J]. Journal of Food Safety and Quality Testing, 2020, 11(2): 363-367.
- [3] CORRIGAN B, BRODKORB A. The effect of pre-treatment of protein ingredients for infant formula on their *in vitro* gastro-intestinal behaviour[J]. International Dairy Journal, 2020, 110: 104810.
- [4] 齐晓彦,苏米亚,刘翠平,等. 水解配方乳粉的抗过敏性研究进展及其市场开发应用[J]. 食品工业, 2015, 36(9): 247-251.  
QI X Y, SU M Y, LIU C P, et al. A review of whey hydrolysate formula in anti allergic research and market applications[J]. Food Industry, 2015, 36(9): 247-251.
- [5] Dietary protein quality evaluation in human nutrition. Report of an FAO Expert Consultation[M]. FAO Food and Nutrition Paper, 2013, 92: 1-66.
- [6] HAVENAAR R, MAATHUIS A, DE JONG A, et al. Herring roe protein has a high digestible indispensable amino acid score (DIAAS) using a dynamic *in vitro* gastrointestinal model[J]. Nutrition Research, 2016, 36(8): 798-807.
- [7] DING Q A, NIE S P, HU J L, et al. *In vitro* and *in vivo* gastrointestinal digestion and fermentation of the polysaccharide from *Ganoderma atrum*[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 63: 646-655.
- [8] HU J L, NIE S P, MIN F F, et al. Artificial simulated saliva, gastric and intestinal digestion of polysaccharide from the seeds of *Plantago asiatica* L. [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 92(2): 1143-1150.
- [9] MÉNARD O, BOURLIEU C, DE OLIVEIRA S C, et al. A first step towards a consensus static *in vitro*



- model for simulating full-term infant digestion[J]. Food Chemistry, 2018, 240: 338-345.
- [10] DUPONT D, MANDALARI G, MOLLE D, et al. Comparative resistance of food proteins to adult and infant *in vitro* digestion models[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2010, 54(6): 767-780.
- [11] NGUYEN T T P, BHANDARI B, CICHERO J, et al. A comprehensive review on *in vitro* digestion of infant formula[J]. Food Research International, 2015, 76: 373-386.
- [12] BRODKORB A, EGGER L, ALMINGER M, et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion[J]. Nature Protocols, 2019, 14(4): 991-1014.
- [13] MINEKUS M, ALMINGER M, ALVITO P, et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus[J]. Food & Function, 2014, 5(6): 1113-1124.
- [14] EGGER L, MENARD O, DELGADO-ANDRADE C, et al. The harmonized INFOGEST *in vitro* digestion method: From knowledge to action[J]. Food Research International, 2016, 88: 217-225.
- [15] ADLER-NISSEN J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1979, 27(6): 1256-1262.
- [16] LORIEAU L, HALABI A, LIGNEUL A, et al. Impact of the dairy product structure and protein nature on the proteolysis and amino acid bioaccessibility during *in vitro* digestion[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 82: 399-411.
- [17] MAATHUIS A, HAVENAAR R, HE T, et al. Protein digestion and quality of goat and cow milk infant formula and human milk under simulated infant conditions[J]. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 2017, 65(6): 661-666.
- [18] COSTA F, BRITO M A, FURTADO M A, et al. Microfluidic chip electrophoresis investigation of major milk proteins: Study of buffer effects and quantitative approaching[J]. Analytical methods, 2014, 6(6): 1666-1673.
- [19] 张玉梅, 石羽杰, 张健, 等. 母乳 $\alpha$ -乳清蛋白 $\beta$ -酪蛋白与婴幼儿健康的研究进展[J]. 营养学报, 2020, 42(1): 78-82.
- ZHANG Y M, SHI Y J, ZHANG J, et al. Advances in studies of the relation between breast milk  $\alpha$ -lactalbumin,  $\beta$ -casein and health of infants and toddlers[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2020, 42(1): 78-82.
- [20] MARTIN C R, LING P R, BLACKBURN G L. Review of infant feeding: Key features of breast milk and infant formula[J]. Nutrients, 2016, 8(5): 279.
- [21] 杨博睿, 张富新, 邵玉宇, 等. 牛乳、羊乳和人乳中的蛋白质组成及消化特性研究[J]. 中国乳品工业, 2020, 48(8): 4-9.
- YANG B R, ZHANG F X, SHAO Y Y, et al. Study on the composition and digestive properties of protein in cow milk, goat milk and breast milk[J]. China Dairy Industry, 2020, 48(8): 4-9.
- [22] 郭艳红, 苏米亚, 刘翠平, 等. 婴幼儿配方奶粉中蛋白质体外模拟消化率比较研究[J]. 食品工业, 2015, 36(8): 209-212.
- GUO Y H, SU M Y, LIU C P, et al. Comparison of *in vitro* proteins digestion in infant formula and children formula[J]. The Food Industry, 2015, 36(8): 209-212.
- [23] 董学艳, 姜铁民, 刘继超, 等. 母乳和不同婴儿配方乳粉中蛋白质消化性研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(17): 28-32.
- DONG X Y, JIANG T M, LIU J C, et al. Research of digestibility of protein in human milk and different infant formula[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(17): 28-32.
- [24] 刘翠, 潘健存, 李媛媛, 等. 人乳营养成分及其生理功能[J]. 食品工业科技, 2019, 40(1): 286-291.
- LIU C, PAN J C, LI Y Y, et al. Nutrients and physiological functions of human milk[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(1): 286-291.
- [25] 张雪, 葛武鹏, 郗梦露, 等. 不同基料的婴幼儿配方奶粉蛋白质营养评价[J]. 食品工业科技, 2019, 40(13): 257-263.
- ZHANG X, GE W P, XI M L, et al. Protein nutrition evaluation of infant formula with different base materials[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(13): 257-263.

## ***In Vitro* Digestion of Infant Formula Containing Partially Hydrolyzed Protein**

Zhang Shanshan<sup>1</sup>, Hu Jielun<sup>1</sup>, Peng Xiaoyu<sup>2</sup>, Pan Lina<sup>2</sup>, Dong Ling<sup>2</sup>, Jiang Yikang<sup>2</sup>,  
Wang Jiaqi<sup>2</sup>, Nie Shaoping<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*State Key Laboratory of Food Science and Technology, China-Canada Joint Lab of Food Science and Technology,  
Nanchang University, Nanchang 330047*

<sup>2</sup>*Ausnutria Dairy (China) Co., Ltd, Ausnutria Institute of Food and Nutrition, Changsha 410005*

**Abstract** The dairy protein hydrolysis process can hydrolyze large molecule proteins into small molecule proteins and peptides. Infant formulas with partially hydrolyzed proteins may be beneficial to the digestion and absorption of infants, but the comparison between them and breast milk is unclear. In this study, a commercially available infant formula (EF) containing partially hydrolyzed protein was used to compare the *in vitro* digestion and absorption characteristics with standard infant formula (SF) and breast milk (BM), and the amino acid score and digestible indispensable amino acid score were calculated based on the total amino acid pattern and digested amino acid pattern, respectively, to evaluate the protein quality. The results showed that the protein content of the two formulas was higher than that of BM, and the amino acid composition was close to that of BM. The *in vitro* protein digestibility was  $(33.50\pm 0.39)\%$ ,  $(33.07\pm 0.83)\%$  and  $(38.49\pm 0.51)\%$  for EF, SF and BM, respectively, with the absorption rate of EF up to 78% of the BM. The results of digestible indispensable amino acid score showed that the limiting amino acids of EF were threonine and histidine, while all other amino acids scored above 75, which can be considered as good protein quality. Therefore, the infant formula containing partially hydrolyzed protein used in this study has better digestibility and absorption properties than the control formula and is closer to breast milk. This study can provide data to support the digestion and absorption characteristics of infant formula containing partially hydrolyzed protein and provide a theoretical basis for *in vitro* research methods for protein evaluation.

**Keywords** infant formula; partial hydrolysis; breast milk; *in vitro* protein digestion; amino acid score