

常见高蛋白运动补充剂中蛋白质体外水解评价

许金淇¹, 董文霞², 田成新², 李文博¹, 宫金华¹, 李斌¹, 赵艳荣^{2*}, 李艳¹

(1. 环境食品学教育部重点实验室, 华中农业大学食品科学技术学院, 湖北武汉 430070)

(2. 上海迈向胜利健康技术有限公司, 上海 200120)

摘要: 运动营养除了强调多元化营养素的补充, 也逐渐重视营养补充的时序性。蛋白补充剂是运动营养的重要来源, 目前市面上相关产品多为蛋白粉, 也有部分液体饮品, 这些产品中蛋白质的消化水解情况尚未见报道。该文从蛋白质类型和剂型角度, 挑选五种高蛋白运动补充剂及三种高蛋白食品, 采用体外消化模型评价其胃肠道消化行为和蛋白质水解度。结果表明: 蛋白粉产品冲泡后粒径较液体饮品大, 且易分层。所有产品都具有 pH 值敏感性, 但对胃部 pH 值降低的缓冲能力存在差异, 酪蛋白含量较高的液体饮品 pH 值降低较慢。所有产品在胃部易形成聚集体, 液体饮品黏弹性快速增加进而下降或趋于平缓, 蛋白粉产品流变性相对稳定。在胃消化 30 min 后, 其中一款液体饮品的蛋白质水解度最高(约 29%), 为三款粉剂产品的 1.5、1.4、1.4 倍; 胃肠消化结束后各产品蛋白质水解度在 60%~80%, 高于鸡肉、牛肉等食品。结论: 蛋白质类型和剂型会影响高蛋白运动补充剂的蛋白质水解, 液体剂型以及浓缩牛奶蛋白可能更有利于蛋白质水解。该研究结果可为精准设计开发高蛋白运动补充剂提供数据支撑。

关键词: 运动食品; 蛋白质; 消化; 摄食时间; 蛋白质水解

文章编号: 1673-9078(2025)01-17-27

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.1.1532

In Vitro Evaluation of Protein Hydrolysis of High-protein Sport Supplements

XU Jinqi¹, DONG Wenxia², TIAN Chengxin², LI Wenbo¹, GONG Jinhua¹, LI Bin¹, ZHAO Yanrong^{2*}, LI Yan^{1*}

(1. Key Laboratory of Environmental Food Science Ministry of Education; College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(2. Shanghai M-Action Health Technology Co. Ltd., Shanghai 200120, China)

Abstract: Sports nutrition emphasizes not only the diversity of nutrients, but also their timing intake. Protein supplements are important sources for the requirements of sports nutrition. Currently, the leading products on the market are mainly protein powders, although some liquid beverages are available. However, no previous studies have reported their gastrointestinal digestive behavior and protein hydrolysis profiles. In this paper, five commercially available high-protein sport supplements and three high-protein foods were selected based on protein type and formulations. Their gastrointestinal digestive behavior and protein hydrolysis were evaluated using an *in vitro* digestion model. The results showed that the water dispersion of powder products had large particle size and were apt to form sediments. All products were sensitive to pH, but they showed different buffering capacity against pH reduction during the *in vitro* gastric digestion. Products with higher

引文格式:

许金淇,董文霞,田成新,等.常见高蛋白运动补充剂中蛋白质体外水解评价[J].现代食品科技,2025,41(1):17-27.

XU Jinqi, DONG Wenxia, TIAN Chengxin, et al. *In vitro* evaluation of protein hydrolysis of high-protein sport supplements [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(1): 17-27.

收稿日期: 2023-12-21

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32372325)

作者简介: 许金淇(1999-),女,硕士研究生,研究方向:营养递送体系, E-mail: xu15007168135@163.com

通讯作者: 赵艳荣(1972-),女,硕士,正高级工程师,研究方向:食品科学与营养健康, E-mail: zhaoyanrong@mengniu.cn; 共同通讯作者:

李艳(1983-),女,博士,教授,研究方向:食品乳液构建及其消化行为研究, E-mail: yanli@mail.hzau.edu.cn

casein content showed a slower pH reduction. All samples tended to form aggregates in the simulating stomach environment. During gastric digestion, the viscoelasticity of the liquid products increased rapidly and decreased or reached a plateau, while the rheological properties of powder products remained constant. One of the liquid products had the highest protein hydrolysis degree (approximately 29%) after 30 min of mimicked gastric digestion, which was 1.5, 1.4, and 1.4 times higher than that of the selected powder products. At the end of gastrointestinal digestion, the protein hydrolysis of each product was in the range of 60%~80%. The hydrolysis degree of proteins in these sports supplements was higher than that in chicken and beef. In conclusion, protein types and product formulations affect the hydrolysis of high-protein sport supplements. The application of liquid formulation and concentrated milk protein might be more favorable for protein absorption than powders. The results in this study may provide data support for the precise design and development of high-protein sport supplements.

Key words: sports food; protein; digestion; feeding time; hydrolysis of protein

运动营养食品有助于及时补充人在运动过程中消耗的能量及各种营养素, 由此不同种类的运动营养食品应运而生。根据我国《食品安全国家标准 运动营养食品通则》(GB 24154-2015), 运动营养食品主要包括补充能量类、补充蛋白质类等。补充蛋白质类产品主要以蛋白质或蛋白质水解物为主要成分, 以满足机体生长和修复需求。此外有研究表明运动可能引起机体胃肠道不适, 引发头晕、腹泻等症状^[1,2]。因此, 运动人群的营养需求除能量、蛋白质外, 还包括多肽、益生元、维生素等功能性成分。运动营养除了强调多元化营养素的补充, 也逐渐重视补充的时序性。在大量或高强度运动后, 调控肌体摄入能量的时间和某些营养素的比例可促进组织恢复, 增强肌肉蛋白质合成, 并改善情绪状态^[3]。有研究表明, 肌体的合成代谢活性在运动后 30 min 达到峰值, 随后 45 min 开始下降或代谢窗关闭^[4], 这说明运动后, 特别是 30 min 内, 营养的补充至关重要。因此, 评价运动产品中营养组分(特别是蛋白质)的消化吸收效果至关重要。

植物蛋白与动物蛋白是运动人群的优质蛋白质来源, 其体内水解主要通过胃蛋白酶和胰蛋白酶对蛋白质的分解作用实现。然而蛋白质消化吸收与蛋白质类型、结构、浓度、消化条件、加工方式等因素有关^[5-9]。例如乳清蛋白和酪蛋白主要源于牛奶, 均为高营养价值蛋白质, 但二者对蛋白酶的敏感性不同。乳清蛋白主要含有 β -乳球蛋白和 α -乳白蛋白, 酪蛋白主要含有 α_{s1} -、 α_{s2} -、 β -和 κ -酪蛋白。研究表明, 酪蛋白可在胃部完全水解, 而未变性的乳清蛋白则可抵抗水解^[10], 因为乳清蛋白的分子结构比较紧密, 而酪蛋白分子结构相对松散^[11]。尽管如此, 实际摄食过程中蛋白质的消化水解还受蛋白质变性、pH 诱导聚集、其他组分等因素影响^[12]。故可以通过调节食品加工工艺来控制营养素组分的消化吸收效率,

以保证运动人群对营养的及时补充。目前市面上补充蛋白质类运动营养产品多为粉剂, 也有液体饮品陆续进入市场。这些产品以乳清蛋白为主, 其他蛋白质如大豆蛋白、水解胶原蛋白、酪蛋白、牛奶蛋白等也逐渐得到关注和使用。然而鲜有研究关注这些运动产品中蛋白质的消化水解行为。

本研究从蛋白质类型和产品剂型两方面, 选择市场上常见的五款高蛋白运动补充剂, 采用体外消化模型(INFOGEST 模型)评价产品中蛋白质的胃肠道消化行为, 包括蛋白质聚集行为及水解速度与程度。同时对比蛋白质补充剂与常见高蛋白食物(鸡蛋、牛肉、鸡肉)的蛋白质水解度。本研究可为这类产品的蛋白质消化吸收提供数据支撑, 为蛋白质补充剂的设计开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

液体蛋白饮品 M20 (蛋白质含量 20 g/300 mL, 配料含浓缩牛奶蛋白、胶原蛋白肽, M20 只含维生素 D₃)、液体蛋白饮品 M25 (蛋白质含量 25 g/300 mL, 配料含浓缩牛奶蛋白、乳清蛋白粉、胶原蛋白肽、酪蛋白酸钙, M25 含有 14 种维生素矿物质)、产品 KBT (蛋白质含量 88 g/100 g, 配料含浓缩乳清蛋白、小麦蛋白)、产品 SB (蛋白质含量 75 g/100 g, 配料含浓缩乳清蛋白粉、分离乳清蛋白粉、水解乳清蛋白粉、乳清蛋白粉- α 乳白蛋白、牛乳初粉)、产品 TCBJ (蛋白质含量 80 g/100 g, 配料含大豆分离蛋白、浓缩乳清蛋白、大豆磷脂)以上均为粉剂冲泡产品, 以上产品由上海迈向胜利健康技术有限公司提供。即食鸡肉(蛋白质 26.8 g/100 g)和牛肉(蛋白质 20.9 g/100 g)产品购置于当地中百罗森超市; 水煮熟鸡蛋(取蛋清), 购置于中百超市。

氯化钠 (99.5%, AR)、氯化钾 (99.5%, AR)、二水合氯化钙 (99.0%, AR)、六水合氯化镁 (98.0%, AR)、磷酸二氢钾 (99.5%, AR)、碳酸铵 (AR)、盐酸 (AR)、硫酸铜 (99%, AR)、硫酸钾 (99%, AR)、硫酸 (AR)、硼酸 (95.5%, AR)、氢氧化钠 (96%, AR), 国药集团化学试剂有限公司; 粘蛋白 (Type II)、胃蛋白酶 (250 U/mg)、胆盐 (200 g/mol)、胰脂肪酶 (100~500 U/mg)、胰酶 (USP 级, 200 U/mg), 阿拉丁试剂有限公司; SDA-PAGE 凝胶快速配制试剂盒, 碧云天生物技术有限公司; 彩色预染蛋白 Marker, 赛默飞世尔科技公司; 葡萄糖内酯, 上海源叶生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

FE20-Five easy 型 pH 计, 梅特勒-托利多国际有限公司; DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器, 武汉德力祥仪器设备有限公司; pH- 滴定仪, 瑞士万通; WE-2 型水浴恒温振荡器, 天津市欧诺仪器仪表有限公司; Malvern2000 型激光粒度分析仪, 英国 Malvern 公司; EX31 型光学显微镜, 舜宇光学科技(集团)有限公司; FV3000 型激光共聚焦显微镜, 日本 OLYMPUS 公司; K9840 型半自动凯氏定氮仪, 海能未来技术集团股份有限公司; DYCZ-24DN 型电泳槽, 北京六一生物技术有限公司; DYY-10C 型电泳仪电源, 北京六一生物技术有限公司; 凝胶成像系统 *GelDoc XR+, 美国伯乐。

1.3 实验方法

1.3.1 样品处理

液体蛋白直接或稀释使用, 粉末样品按照产品冲泡方式进行处理。根据凯氏定氮法测得各样品初始蛋白质含量, 在消化试验前, 所有样品蛋白质含量设定在 50 mg/mL。

1.3.2 模拟胃消化过程样品特性表征

1.3.2.1 pH值测定

取液体产品及粉剂冲泡样品, 在 37 °C 条件下, 首先将样品初始 pH 值均调为 7.0, 进而加入适量胃蛋白酶 (2 000 U/mL) 和葡萄糖内酯 (2 wt.%), 混合 10 s 后, 采用全自动电位滴定仪测定并记录样品 pH 值。葡萄糖内酯 (GDL) 水解产生葡萄糖酸降低 pH 值, 以模拟胃部 pH 值的动态变化过程。在样品处理过程中取少许样品观察微观结构, 2 h 后取出样品进行外观拍照。

1.3.2.2 流变特性表征

参考 Lin 等^[13]的方法, 利用光学微流变仪来检测样品在加入胃蛋白酶以及葡萄糖内酯后的流变学特性。先将设备的温度设置成 37 °C, 将样品按照冲泡方式配置成系列溶液, 预热至 37 °C, 加入胃蛋白酶 (2 000 U/mL) 和 GDL (2 wt.%) 后, 快速搅匀, 立即取 20 mL 样品于微流变仪专用样品池中, 即运行程序, 检测样品凝胶过程中均方根位移 (Mean Square Displacement, MSD)、弹性因子 (Elastic Index, EI) 及黏性因子 (Microscopy Viscosity Index, MVI)。每隔 1 min 采集一次数据, 测定时间 2 h。

1.3.3 体外消化模型

参考并修改 Brodkorb 等^[14]的方法开展体外模拟胃肠道消化试验。首先按照以下浓度配制模拟消化液母液: 37.3 g/L KCl、68 g/L KH₂PO₄、117 g/L NaCl、30.5 g/L MgCl₂(H₂O)₆、48 g/L (NH₄)₂CO₃、6 mol/L HCl, 另外单独配制 44.1 g/L CaCl₂。口腔模拟液 (SSF)、胃模拟液 (SGF) 和小肠模拟液 (SIF) 按照表 1 所列体积配制。

表 1 口腔模拟液 (SSF)、胃模拟液 (SGF) 和小肠模拟液 (SIF) 配制表 (mL/400 mL)

Table 1 Preparation of simulated salivary fluid (SSF), simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF)

	SSF	SGF	SIF
KCl	15.10	6.90	6.80
KH ₂ PO ₄	3.70	0.90	0.80
NaCl	2.72	18.05	30.85
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0.50	0.40	1.10
(NH ₄) ₂ CO ₃	0.06	0.50	—
HCl	0.09	1.30	0.70

口腔消化: 取一定量的粘蛋白溶于口腔模拟液中, 使其质量浓度为 3.75 mg/mL (现配现用)。取 45 mL 样品 (其中蛋白质含量为 50 mg/mL) 与 4 mL SSF (含粘蛋白) 混合, 加入 25 μL CaCl₂ 溶液和 0.975 mL 蒸馏水, 然后在 37 °C、180 r/min 条件下搅拌 1 min。

胃部消化: 取一定量的胃蛋白酶溶于蒸馏水中, 使其在胃部消化时总酶活为 2 000 U/mL (现配现用)。将 50 mL 口腔消化物与 40 mL SGF 混合, 加入 25 μL CaCl₂ 溶液, 调节 pH 值至 3.0, 然后加入 10 mL 含胃蛋白酶溶液开始胃部消化, 持续 30 min。整个实验在 37 °C、180 r/min 条件下进行, 胃部消化样品总体积为 100 mL。在胃部消化 0、10、20、30 min 分别取 10 mL 样品进行后续实验。

肠部消化：取一定量的胆盐溶于 SIF 中，使其在小肠消化时浓度为 10 mmol/L，另取一定量的胰蛋白酶和脂肪酶分别溶于 SIF 中，使其在小肠消化时总酶活分别为 100 U/mL 和 2 000 U/mL（现配现用）。将 60 mL 胃部消化物与 24 mL SIF 混合，依次加入 120 μ L CaCl_2 溶液、9 mL 胆盐溶液、9 mL 蒸馏水，调节 pH 值至 7.0 后，依次加入 9 mL 胰蛋白酶和 6 mL 脂肪酶，开始小肠消化实验，持续 120 min。整个实验在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下进行，小肠消化样品总体积为 120 mL。在肠部消化 0、5、10、15、20、30、60、120 min 分别取出 10 mL 样品进行后续实验。

为了避免取样中蛋白质的进一步消化，对样品进行灭酶处理。胃部所取样品采用酶抑制剂法，向 10 mL 样品中加入 100 μ L 胃蛋白酶抑制剂，从而抑制胃蛋白酶活性。小肠所取样品采用高温灭酶法，即取样后立即至于沸水浴中加热 5 min 使酶失活^[15]。用于拍摄激光共聚焦的样品不做灭酶处理，待其在冰水浴中冷却后直接放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱储存，并立即拍摄；用于蛋白质水解度测定的样品，灭酶后立即加入等体积 24 wt.% 三氯乙酸溶液，并在 10 614 \times g，4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 10 min，取其上清液用于后续实验；而用于 SDS-PAGE 的样品灭酶后直接冻存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ ，用于后续试验。

1.3.4 粒径测量

使用激光粒度分析仪测定粒径。选取湿样进样器进样，样品用蒸馏水稀释至遮光度为 4.5% 时进行测定，以消除多重光散射效应。测量时连续相水的折射率为 1.33，液体蛋白饮品分散相椰子油的折射率为 1.449，蛋白粉分散液的折射率为 1.34。颗粒尺寸测量结果用表面积平均粒径 (d_{32}) 和体积平均粒径 (d_{43}) 表示。

1.3.5 微观结构

光学显微镜：取 10 μ L 样品置于载玻片上，盖好盖玻片后在 40 \times 物镜下观察样品的微观结构。

激光共聚焦显微镜：用固绿 (FCF, 1 wt.% 溶于无水乙醇，激发 / 发射波长 = 494/518 nm) 标记蛋白质。取 10 μ L 样品置于载玻片，盖好盖玻片后在 100 \times 或 20 \times 物镜下观察蛋白质的分布。

1.3.6 蛋白质水解度测定

蛋白质水解度测定参考 GB 5009.5-2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》中的凯氏定

氮法并略作修改。胃及肠消化的样品灭酶后立即加入等体积 24 wt.% 的三氯乙酸溶液以沉淀大分子物质，并在 10 614 \times g，4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 10 min，取其上清液。称取上清液 8 g 左右，精确至 0.001 g 至消化管中，再加入 0.2 g 硫酸铜、3 g 硫酸钾及 9 mL 硫酸于石墨消化炉进行消化。当石墨消化炉温度达到 420 $^{\circ}\text{C}$ 且液体呈蓝绿色并澄清透明后，再继续加热 0.5 h，取出冷却后用蒸馏水定容至 100 mL。于凯氏定氮仪（使用前加入氢氧化钠溶液，蒸馏水以及含有混合指示剂 B 的硼酸溶液）上实现蒸馏过程，并用 0.05 mol/L HCl 进行滴定，记录滴定数据。其中蛋白质系数为 6.38。蛋白质水解度 (Hydrolysis Degree, DH) 的计算方式如下：

$$D = \frac{C_0}{C} \times 100\% \quad (1)$$

式中：

D ——蛋白质水解度 (DH)，%；

C_0 ——为消化一定时间后试样中的蛋白质含量，mg/100 mL；

C ——消化前试样中的总蛋白质含量，mg/100 mL。

1.3.7 SDS-PAGE实验

采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测定分析消化样品中蛋白质水解情况。使用 12 wt.% 的分离胶和 5 wt.% 浓缩胶对样品进行分析。消化后的样品与蛋白上样缓冲液 (5 \times , 还原型) 按照 4:1 的比例混合后，于 100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水中加热 10 min，以达到充分变性蛋白质目的，9 168 \times g 条件下离心 5 min，最后取 15 μ L 上清液加入到凝胶泳道中，同时使用 5 μ L 彩色预染蛋白 Marker 作为蛋白质分子质量标准。电泳程序设置为 80 V，30 min，待条带压缩至分离胶时转 120 V，60 min。电泳结束后，将凝胶取出用去离子水充分清洗 10 min (摇床)，置于含有考马斯亮蓝 R-250 染色盒中，染色 40~60 min，脱色 60 min，并采用凝胶成像系统 *GelDoc XR+(Bio-Rad) 进行成像处理。

1.4 数据处理

所有定量试验平行测 3 次，数据以均值 \pm 标准偏差表示。采用单因素方差分析 (ANOVA) 和邓肯 (Duncan) 多重比较分析数据的显著性差异 ($P < 0.05$)。

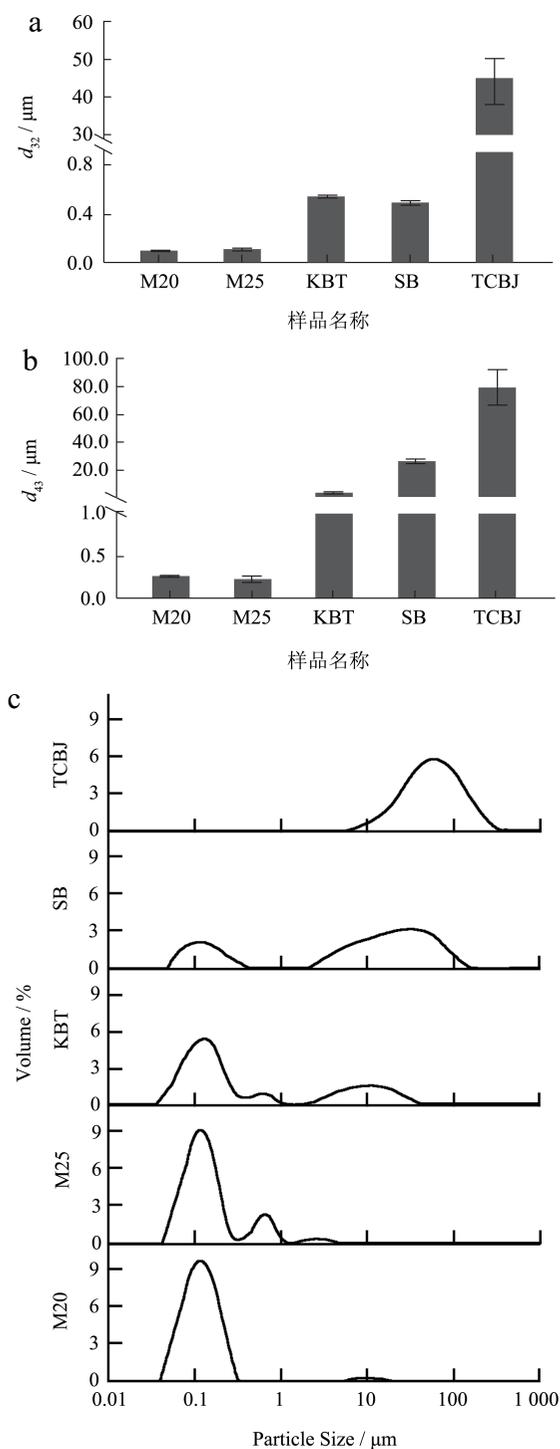


图1 样品粒径 (a、b) 及粒径分布图 (c)

Fig.1 Particle size (a, b) and particle size distribution (c) of products

2 结果与分析

2.1 样品粒径及其分布

本研究主要对比分析了五种运动型蛋白产品的粒径及粒径分布,分别为两款液体蛋白饮品(M20、M25)和三款蛋白粉冲泡样品(KBT、SB、

TCBJ)。在样品原始状态下,液体蛋白饮品外观更均匀,蛋白粉冲泡后样品易发生沉淀,特别是TCBJ(图1a)。粒径结果显示,液体蛋白饮品粒径 d_{32} 为180~200 nm, KBT和SB样品在500 nm左右,TCBJ接近45 μm (图1a)。因此TCBJ样品更容易发生分层。相比 d_{32} 结果,液体蛋白饮品 d_{43} 变化幅度较小,而蛋白粉冲泡样品的变化幅度相对较大,由此说明蛋白粉冲泡样品的聚集更显著,不利于样品稳定(图1b)。样品的粒径分布与 d_{43} 结果一致,液体蛋白饮品粒径分布主要是单峰分布,主峰在100 nm附近(图1c)。蛋白粉冲泡样品,除TCBJ为单峰分布(主峰在80 μm)外,另两款样品均为双峰分布。因此,小粒径有利于维持液体蛋白饮品的均匀性和稳定性。

2.2 模拟动态胃部消化过程中样品pH值变化及流变特性

不同样品初始pH值存在一定差异,液体蛋白饮品初始pH值在6.7~7.0。其他三款样品均用蒸馏水按照产品说明进行冲泡,SB和TCBJ分散液初始pH值为7.0, KBT分散液初始pH值为5.9。这可能是由于所选KBT产品(酸奶味)含有脱脂风味酸奶发酵粉。所有样品在消化结束后静置均出现沉淀分层现象(图2a)。考虑到人体胃肠道消化环境的pH值变化,所有样品初始pH值均调至7.0,然后加入胃蛋白酶和GDL后测定样品pH值变化。图2b显示,随时间延长,样品pH值先快速下降再趋于平稳。20 min后样品pH值下降逐渐缓慢, M20样品的pH值下降最缓慢,蛋白粉产品pH值低于液体产品。120 min后, M20样品的pH值约为4.5,而其他四款样品的pH值在3.8~4.1。以上结果表明不同样品在胃消化过程中对pH值变化的响应性存在差异,这可能与样品组分、样品前处理、样品微观结构等有关。Li等^[16]研究结果表明均质和热处理可减缓山羊奶在动态胃消化过程中pH值的下降。消化120 min后,均质和热处理的山羊奶的pH值均高于4,而未处理的山羊奶的pH值低于3,因为均质和热处理使得酪蛋白形成的聚结物发生一定程度瓦解和碎片化。相比乳清蛋白,酪蛋白具有一定的pH缓冲能力^[17],且酪蛋白水解物可进一步提升pH缓冲能力。在pH值下降过程中,各样品出现不同程度聚集,样品KBT和SB中蛋白质聚集程度弱于样品M20和M25,聚集程度随时间延长变得更松散。这是因为前者富含乳清蛋白,其具有球状的紧密结构,后者富含酪蛋白,其具有开放且

柔性的分子构象,能形成酪蛋白胶束的有序结构。因此在胃部酸性条件下乳清蛋白的溶解性高于酪蛋白^[5]。样品 TCBJ 初始含有微胶囊结构,在消化过程中蛋白质的水解导致微胶囊结构发生一定程度瓦解(图 2c)。

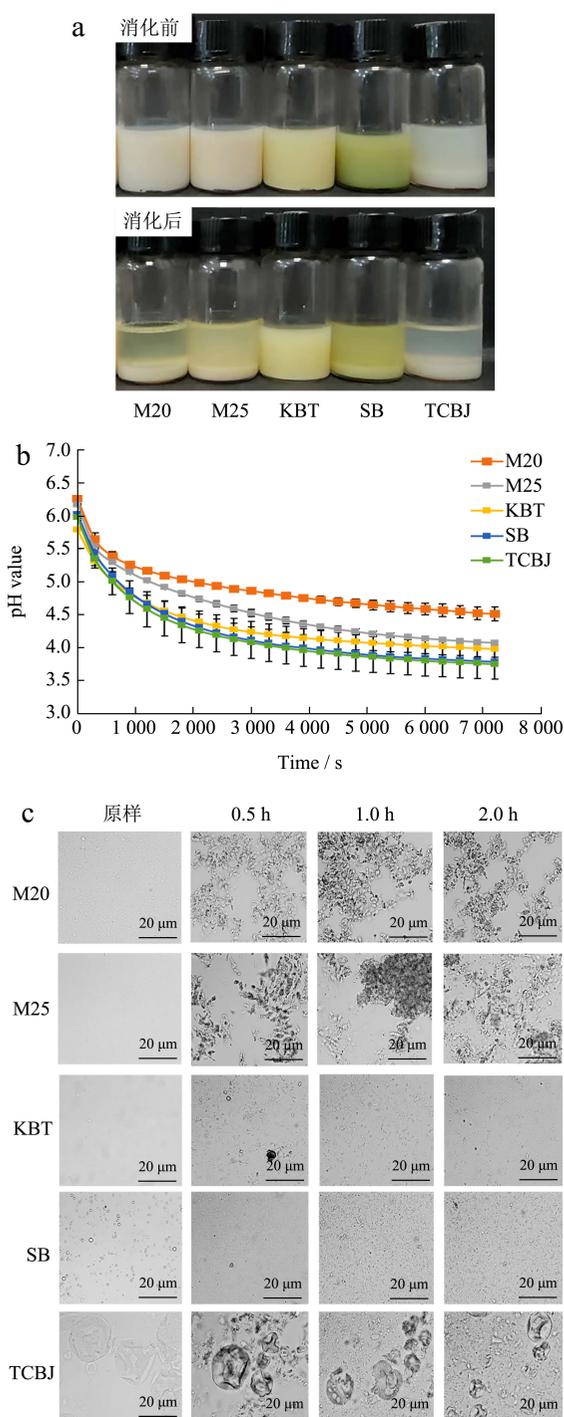


图 2 胃部消化样品的外观 (a)、pH 值变化曲线 (b) 及微观结构 (c)

Fig.2 Visual images (a), pH reduction profile (b) and microstructure (c) of products under simulated gastric digestion

为进一步研究液体蛋白饮品和蛋白粉冲泡样品在胃部消化中的特性变化,采用多重光微流变仪表征各样品黏弹指数的变化。图 3a 显示,胃消化初期,各样品均方根位移 MSD 随去相关时间保持直线关系,说明样品表现很弱的黏弹性。随胃蛋白酶水解和 pH 值下降,样品的黏弹性呈现不同变化趋势,这与其微观结构的变化相关(图 2c)。液体蛋白饮品 MSD 曲线由直线逐渐转变为接近 S-型曲线,这可能是因为 pH 值下降导致酪蛋白聚集形成凝乳。随处理时间进一步延长,曲线末端逐渐回缩,这可能是因为蛋白质水解使得样品不均匀所致。为避免样品不均匀引起的结果偏差,选择 30 min 内的弹性/黏性指数进行对比。图 3b 和 3c 显示液体蛋白饮品黏/弹性指数均快速增加, M20 黏/弹性指数先增加后降低,而 M25 黏/弹性指数下降最缓慢,且黏性指数高于 M20,这可能与样品的其他配料或组分互动相关^[18],考虑到产品组分的复杂性,后续需要进一步研究。蛋白粉冲泡样品 MSD 曲线一直保持直线状态,说明黏弹性较弱,与图 2 结果中样品的状态及微观结构一致,与乳清蛋白在酸性环境溶解性较好相关。TCBJ 样品的 MSD 曲线在 30 min 后曲线逐渐出现平台区,这可能是因为样品所含微胶囊结构逐步瓦解,组分溶出所致,与微观结构结果一致(图 2c)。

2.3 静态消化模型下样品微观结构变化

胃肠消化道不仅存在环境条件如 pH、盐离子强度等变化,还存在各种不同类型蛋白酶的水解作用。上述结果显示,受胃蛋白酶和 pH 值下降的影响,各样品呈现不同的 pH 值和黏弹性变化趋势。因此,本研究进一步采用 INFOGEST 三步静态消化模型监测各样品的消化行为及蛋白质的水解情况。胃部消化过程中液体蛋白饮品和 TCBJ 样品的沉淀物多于 KBT 和 SB 样品(图 4, 插图),这可能是造成样品在消化过程中黏弹性不一样的原因。进入肠部消化,各样品的沉淀量远少于胃部,归因于小肠中胰蛋白酶对蛋白质的快速水解^[19,20]。激光共聚焦显微镜下可以清晰看到样品与胃液共混后蛋白质出现明显的聚集(图 4)。在胃部消化 30 min 后,液体蛋白饮品中蛋白聚集体变得更松散, KBT 和 SB 样品中蛋白质分布变化不明显, TCBJ 中微胶囊结构出现一定程度瓦解。这是因为 KBT 和 SB 样品所含乳清蛋白在胃部的溶解性更高,而液体饮品 M20 和 M25 样品所含酪蛋白易在胃部聚结形成凝乳^[5,21]。

当样品进入小肠消化，蛋白质聚集显著减少。TCBJ 仍可以看到较大的微囊结构，但微囊在消化过程中逐渐减小。M20 和 M25 蛋白质聚集显著减少，荧光强度大幅下降。激光共聚焦显微镜结果与图 2 结果一致。各样品胃部聚集行为取决于蛋白质类型及组分相互作用。液体蛋白饮品富含浓缩牛奶蛋白，因此酪蛋白含量较高，导致其在胃部的形成凝结构

多于富含乳清蛋白的 KBT 和 SB^[22]。未经处理的酪蛋白所形成凝结构的结构相对紧致导致其水解度下降，因此酪蛋白通常称为“慢消化”蛋白。但凝结构结构受酪蛋白前处理工艺影响，比如钙去除、热加工、均质可增加凝结构松散度，有利于其水解^[16,22,23]。图 2b 显示 M20 样品 pH 值下降最慢，这可能是因为均质和热加工提升酪蛋白水解能力所致。

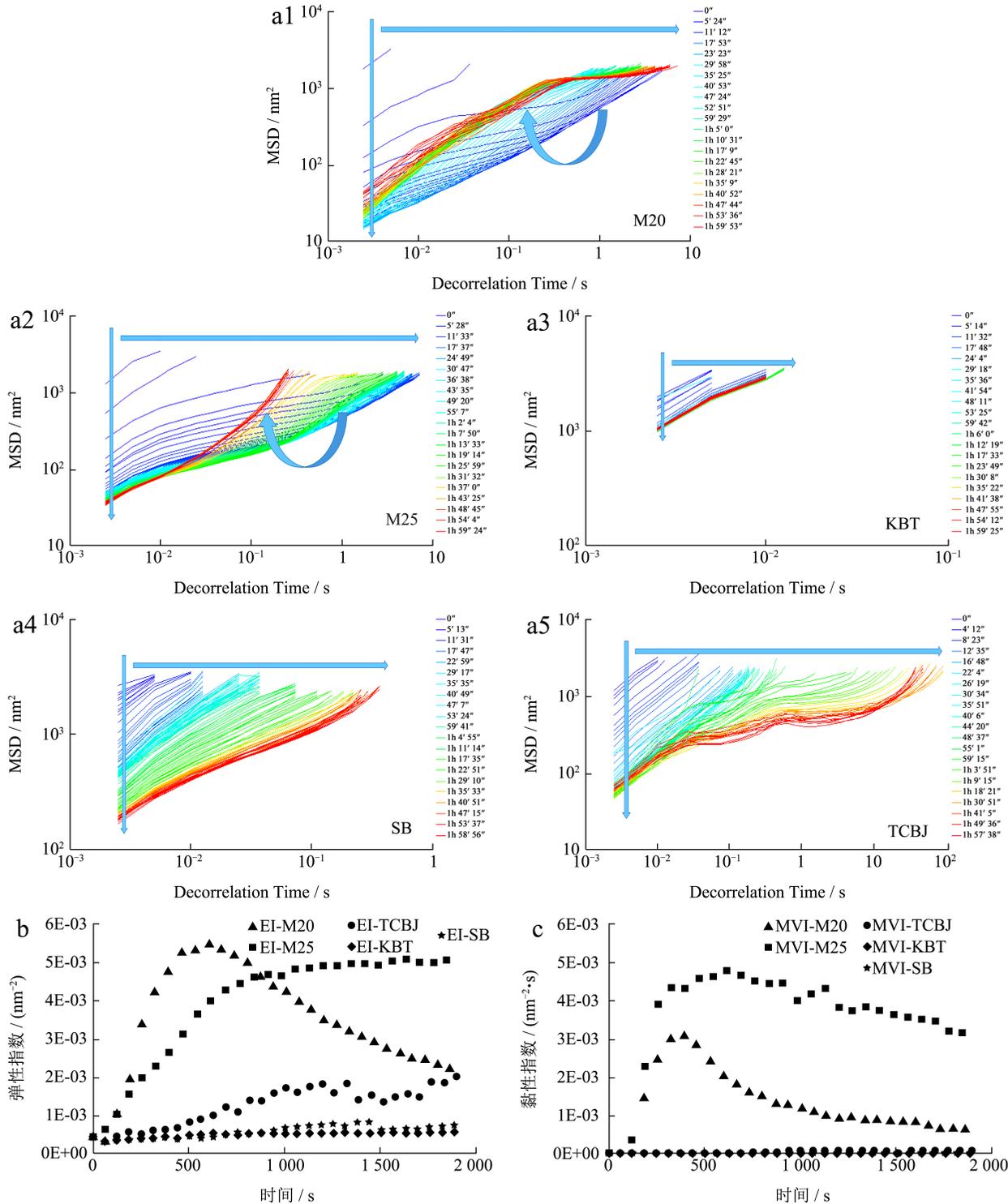


图 3 样品的 MSD 图谱 (a)、弹性指数 (b) 与黏性指数 (c) 的变化

Fig.3 MSD profiles (a), elasticity index (b) and microscopy viscosity index (c) of products

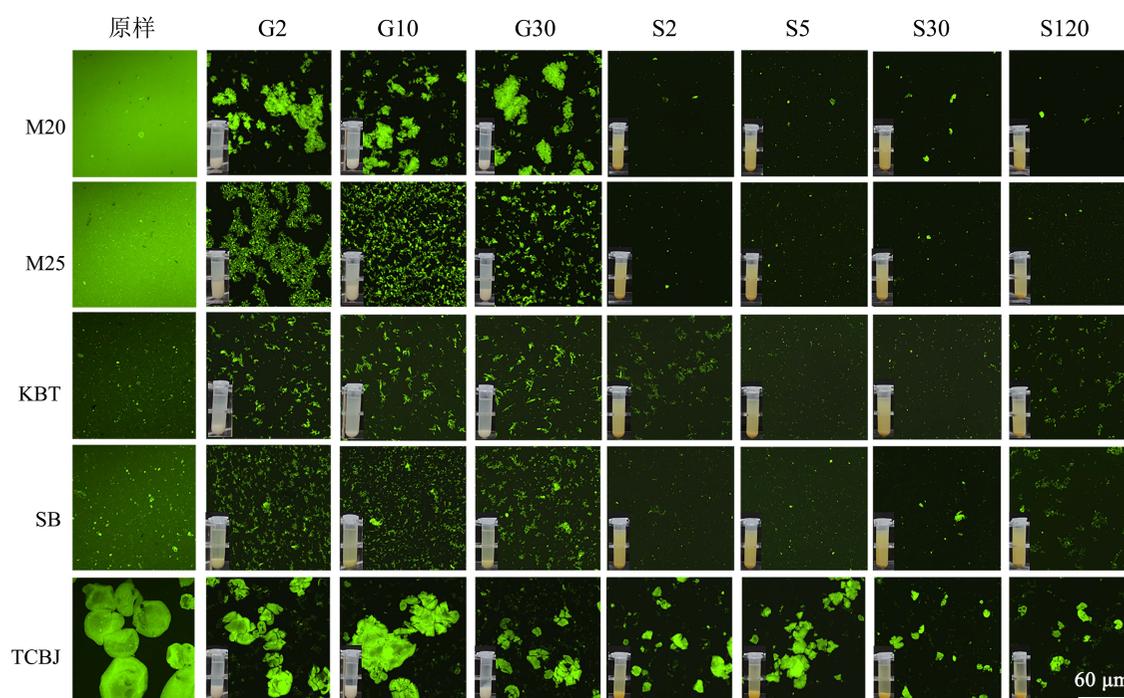


图4 不同样品消化前及胃肠道消化过程中激光共聚焦图片(20×)

Fig.4 CLSM images of different products before (original products) or after gastro-intestinal digestion

表2 不同样品在胃肠消化过程中蛋白质水解度变化(%)

Table 2 Hydrolysis degree of protein from different products during gastrointestinal digestion (%)

项目	M20	M25	KBT	SB	TCBJ
G2	16.77 ± 0.00 ^{Da}	15.61 ± 1.20 ^{Db}	13.44 ± 0.39 ^{Cc}	14.10 ± 0.80 ^{Dc}	11.68 ± 0.87 ^{Dd}
G10	23.16 ± 1.19 ^{Ca}	17.53 ± 0.64 ^{Cbc}	18.04 ± 0.97 ^{Bb}	17.11 ± 0.20 ^{Cbc}	15.19 ± 0.35 ^{Cd}
G20	27.01 ± 0.85 ^{Ba}	22.03 ± 0.48 ^{Bb}	18.49 ± 0.97 ^{Bd}	18.12 ± 0.60 ^{Bde}	17.26 ± 0.51 ^{Be}
G30	29.08 ± 0.84 ^{Aa}	24.76 ± 0.51 ^{Ab}	19.46 ± 0.19 ^{Ad}	20.55 ± 1.00 ^{Ac}	20.64 ± 0.34 ^{Ac}
S2	65.64 ± 1.69 ^{Db}	65.83 ± 1.37 ^{Da}	66.08 ± 0.39 ^{Fb}	56.74 ± 0.79 ^{Cc}	52.16 ± 3.62 ^{Ed}
S5	71.04 ± 9.67 ^{Ca}	68.87 ± 1.71 ^{ABCb}	71.77 ± 1.17 ^{Ea}	58.58 ± 2.02 ^{BCc}	53.44 ± 0.68 ^{Ed}
S10	72.34 ± 0.68 ^{Ba}	69.30 ± 4.76 ^{ABCa}	71.94 ± 0.78 ^{Ea}	58.31 ± 2.40 ^{Cb}	57.75 ± 1.94 ^{Db}
S15	71.77 ± 0.33 ^{BCb}	67.58 ± 1.03 ^{CDCc}	74.47 ± 1.94 ^{Da}	61.05 ± 2.42 ^{ABc}	63.19 ± 0.34 ^{Cd}
S20	76.58 ± 1.01 ^{Aa}	67.75 ± 1.02 ^{BCDb}	78.20 ± 1.94 ^{BCa}	61.03 ± 1.97 ^{ABd}	63.69 ± 1.05 ^{Cc}
S30	76.24 ± 0.68 ^{Ab}	67.48 ± 0.68 ^{CDCc}	78.93 ± 1.17 ^{Ba}	60.83 ± 0.78 ^{ABf}	69.29 ± 0.35 ^{Ad}
S60	76.48 ± 0.34 ^{Ab}	70.41 ± 0.34 ^{Ad}	81.04 ± 1.55 ^{Aa}	62.14 ± 0.81 ^{Af}	66.30 ± 1.03 ^{Be}
S120	76.88 ± 1.01 ^{Aa}	70.20 ± 0.34 ^{ABc}	76.91 ± 0.77 ^{Ca}	63.38 ± 2.79 ^{Ae}	67.69 ± 1.05 ^{ABd}

注: 不同大写字母表示同一样品不同时间差异显著, 不同小写字母表示同一时间不同样品差异显著 ($P < 0.05$)。

2.4 胃肠消化过程中蛋白质水解度变化

运动后营养的补充不仅在于营养素的多元化, 而且营养补给的时序性也非常重要, 特别是运动后30 min 内的营养补给^[4,24,25]。除此之外, 研究表明运动过程中血液流向肌肉, 从而引起人体胃肠道的不适或损伤^[1,2,26]。因此, 运动后肌体补充优质且吸收效率高的蛋白质非常重要。基于此, 研究蛋白质

在胃消化30 min 和肠消化120 min 的水解情况至关重要。由表2可知, 随着胃部消化时间延长, 各样品蛋白质水解度增加, 30 min 后, 蛋白质水解度范围在19%~29%。液体蛋白饮品M20和M25中蛋白质水解度显著高于其他样品。以M20为例, 其蛋白水解度在10 min 约为23%, 远高于KBT、SB和TCBJ在30 min 时的蛋白质水解度; 其在30 min 时

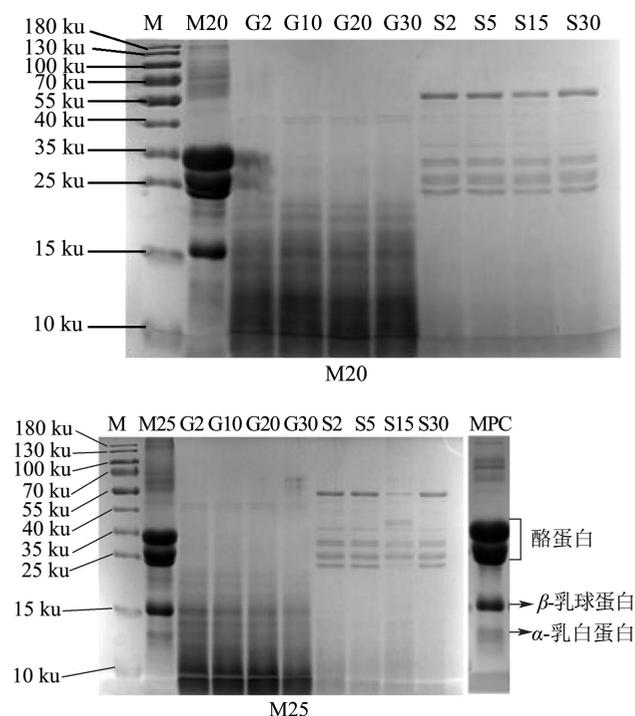
蛋白质水解度约为 29%，依次是同时间 KBT、SB 及 TCBJ 蛋白质水解度的 1.5、1.4、1.4 倍。M20 主要以牛奶蛋白为主，已有研究报道热加工有利于牛奶蛋白、羊奶蛋白的水解^[16,22]，与前面 pH 值下降结果一致（图 2b）。当样品进入小肠后，由于胰蛋白酶的水解，蛋白质水解度快速增加，升至 50% 以上，随小肠消化时间延长，蛋白质水解度逐渐增加，并趋于稳定，且小肠消化终点各样品蛋白质水解度在 60%~80%，差异性不明显（表 2）。蛋白质的快速水解使得聚集结构被削弱（图 4）。样品从胃部进入小肠，由于 pH 值快速提升，胰蛋白酶对蛋白质的水解效率更高，所以胃部蛋白质聚集体在小肠快速碎片化，有助于蛋白质水解^[27,28]。因此，经胃肠消化后，以牛奶蛋白为主的液体蛋白饮品，其蛋白质水解度可与以乳清蛋白为主的粉剂样品接近。

除了高蛋白补充剂，鸡蛋、肉类亦是优质蛋白质来源，因此本研究同步测定了这三类食品的蛋白质水解度。相比鸡蛋清（13%@30 min 胃，55%@120 min 肠）、牛肉（18%@30 min 胃，49%@120 min 肠）、鸡胸肉（18%@30 min 胃，55%@120 min 肠），蛋白补充剂可显著提升蛋白质的水解度。例如胃消化 30 min 后，M20 蛋白质水解度依次为鸡蛋清、牛肉和鸡肉的 2.2、1.6 和 1.6 倍。鸡肉、牛肉富含肌纤维蛋白、肌浆蛋白和一定量脂肪，从而对消化酶具有一定抵抗性^[18,29]，此外，蛋白质的种类及其与其他组分的互作也会影响蛋白质水解度^[30]。综合以上结果，液体蛋白饮品的消化效果优于所选三款蛋白粉冲泡样品及三种常见富含蛋白质的食品。

2.5 静态消化模型下样品蛋白质分子量变化

在上述蛋白质水解结果基础上，进一步采用 SDS-PAGE 表征不同样品在胃肠消化后蛋白质组成及分子量变化。如图 5 所示，初始液体蛋白饮品中蛋白质的主要条带为酪蛋白、 β -乳球蛋白，因其样品中所含蛋白主要来自浓缩牛奶蛋白，富含酪蛋白和乳清蛋白。KBT 和 SB 样品中蛋白质主要条带为 β -乳球蛋白和 α -乳白蛋白，主要来自于样品中乳清蛋白，TCBJ 样品中蛋白质主要条带除了 β -乳球蛋白和 α -乳白蛋白，还含有 7S 和 11S 球蛋白条带，来自于样品中大豆分离蛋白。图谱显示样品在消化前后条带发生明显变化。液体蛋白饮品 M20 和 M25 在加入胃蛋白酶后，酪蛋白特征条带在 10 min 颜色

几乎消失，且 β -乳球蛋白条带逐渐变淡，同时在分子量低于 15 ku 处出现很多条带，说明蛋白质经胃蛋白酶逐渐水解为不同分子量的肽段。在小肠消化过程中，M20 和 M25 样品的图谱几乎看不见上述蛋白质的条带，表明蛋白质的进一步快速水解，该结果与表 2 一致。对于其他三款蛋白粉冲泡样品，可以清晰看到在胃消化过程中 β -乳球蛋白条带颜色几乎不变化， α -乳白蛋白条带逐渐变淡或消失，这是因为未经处理 β -乳球蛋白因其球状结构对胃蛋白酶水解具有抵抗性^[31]。相比之下，液体蛋白饮品中 β -乳球蛋白条带在液体饮品胃部时快速消失，而在蛋白粉冲泡样品中基本不变化，这可能与两种类型产品加工工艺相关。比如液体蛋白饮品需要经过热加工处理，高温变性有利于 β -乳球蛋白被胃蛋白酶水解^[10,32]。蛋白粉冲泡样品在与小肠中胰蛋白酶接触后大部分蛋白质被消化，但仍能观察到部分低分子量条带，KBT 和 SB 在 15 min 后蛋白质条带几乎消失，而 TCBJ 仍能观察到部分条带，可能因为该样品的微观结构主要是大粒径的微胶囊结构所致，这与图 3 中微流变结果一致，样品在处理 30~40 min 以后黏弹性才逐渐发生变化。以上结果表明，富含牛奶蛋白的蛋白饮品较富含乳清蛋白的蛋白粉具有更好的蛋白质水解效率。综合样品剂型、蛋白质类型及加工方式，在蛋白质补充剂开发过程中可以考虑加入一些可能有利于蛋白质水解的加工条件，比如高温、超声或脉冲电场等^[8,33]。



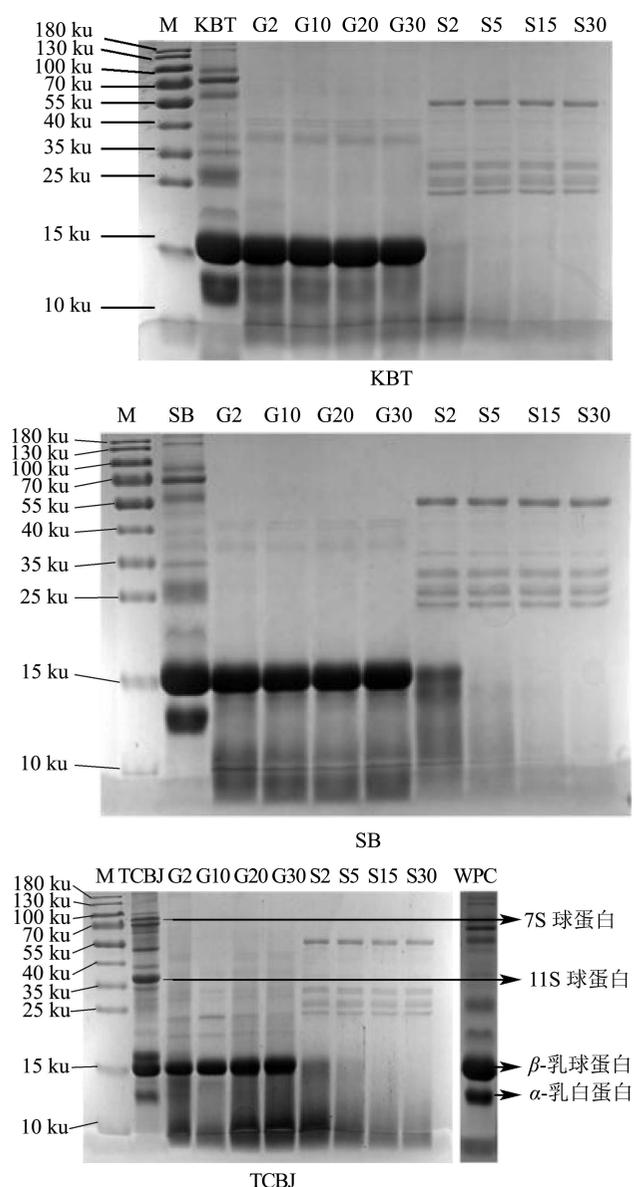


图5 不同样品消化前及胃肠道消化0~30 min的 SDS-PAGE 图谱

Fig.5 SDS-PAGE patterns (under reducing conditions) of different products before (original products) or after (0~30 min) gastric digestion and (0~30 min) intestinal digestion by *in vitro* digestion modal

3 结论

本研究主要评价了五款高蛋白运动补充剂的消化行为和蛋白质水解度，并以三种常见的高蛋白食品为对照。结果表明蛋白质的水解取决于样品自身组分组成、加工工艺、样品结构、样品形态等。相比蛋白粉冲泡样品，液体蛋白饮品的粒径更小（180~200 nm），且颗粒分布相对均匀，不易分层。在模拟动态胃消化过程中，所有样品都出现不同程

度聚集行为，表现不同的流变行为，且消化结束后发生分层现象。液体蛋白饮品 M20 更能抵抗胃部消化 pH 值的下降，具有更好的 pH 缓冲能力。在三步静态模拟胃肠道消化过程中，各样品在胃部同样表现不同程度聚集，进入小肠后聚集程度大幅下降或微胶囊尺寸大幅减小。胃消化 30 min 后，液体蛋白饮品 M20 具有最高的蛋白质水解度，胃消化 30 min 后，M20 蛋白质水解度为同时间 KBT、SB、TCBJ、鸡蛋清、牛肉和鸡肉蛋白质水解度的 1.5、1.4、1.4、2.2、1.6 和 1.6 倍。蛋白粉冲泡样品中 β -乳球蛋白的消化较慢，但肠部消化后各样品蛋白质水解度均在 60%~80%，高于鸡蛋、牛肉和鸡肉。本文结果表明不同蛋白质补充剂产品的设计会影响其胃肠消化行为及蛋白质消化水解程度，这可为蛋白质补充剂产品的开发提供指导方案，比如样品的剂型设计（液体剂、粉剂等）、蛋白质类型的筛选与复配、加工方式的组合等。

参考文献

- [1] CHANTLER S, GRIFFITHS A, MATU J, et al. The effects of exercise on indirect markers of gut damage and permeability: A systematic review and meta-analysis [J]. Sports Medicine, 2021, 51(1): 113-124.
- [2] OLIVEIRAliveira E P D, BURINI R C. Food-dependent, exercise-induced gastrointestinal distress [J]. Journal of the International Society of Sports Nutrition, 2011, 8(1): 12.
- [3] KERKSICK C M, ARENT S, SCHOENFELD B J, et al. International society of sports nutrition position stand: nutrient timing [J]. Journal of the International Society of Sports Nutrition, 2017, 14(1): 33.
- [4] IVY J. Nutrient timing: The Future of Sports Nutrition [M]. Basic Health Publications, Inc, 2004.
- [5] MULET-CABERO A-I, TORCELLO-GÓMEZ A, SAHA S, et al. Impact of caseins and whey proteins ratio and lipid content on *in vitro* digestion and *ex vivo* absorption [J]. Food Chemistry, 2020, 319: 126514.
- [6] LOVEDAY S M. Protein digestion and absorption: the influence of food processing [J]. Nutrition Research Reviews, 2023, 36(2): 544-559.
- [7] PICARIELLO G, SIANO F, STASIO L D, et al. Structural properties of food proteins underlying stability or susceptibility to human gastrointestinal digestion [J]. Current Opinion in Food Science, 2023, 50: 100992.
- [8] KAUR L, MAO B, BENIWAL A S, et al. Alternative proteins vs animal proteins: The influence of structure and processing on their gastro-small intestinal digestion [J].

- Trends in Food Science & Technology, 2022, 122: 275-286.
- [9] 郭蔚波,赵燕,徐明生,等.不同处理方式下蛋白质结构变化与体外消化性关系研究进展[J].食品科学,2019,40(1): 327-333.
- [10] TUNICK M H, REN D X, HEKKEN D L V, et al. Effect of heat and homogenization on *in vitro* digestion of milk [J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(6): 4124-4139.
- [11] GUO M R, FOX P F, FLYNN A, et al. Susceptibility of β -Lactoglobulin and sodium caseinate to proteolysis by pepsin and trypsin [J]. Journal of Dairy Science, 1995, 78(11): 2336-2344.
- [12] LIESHOUT G A A V, LAMBERS T T, BRAGT M C E, et al. How processing may affect milk protein digestion and overall physiological outcomes: A systematic review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 60(14): 2422-2445.
- [13] LIN Q Q, OUYANG C Y, LUO N, et al. Coagulation of model infant formulae: Impact on their *in vitro* dynamic gastric digestion [J]. Food Hydrocolloids, 2023, 141: 108667.
- [14] 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.
- [15] 张珊珊,胡婕伦,彭小雨,等.含部分水解蛋白婴儿配方奶粉的体外消化特性[J].中国食品学报,2023,23(4):86-95.
- [16] LI S Q, YE A Q, PAN Z, et al. Dynamic *in vitro* gastric digestion behavior of goat milk: Effects of homogenization and heat treatments [J]. Journal of Dairy Science, 2022, 105(2): 965-980.
- [17] SALAÜN F, MIETTON B, GAUCHERON F. Buffering capacity of dairy products [J]. International Dairy Journal, 2005, 15(2): 95-109.
- [18] DING M Z, HUANG Z X, HUANG Z J, et al. Proteins from different sources in a high-fat food matrix influence lipid hydrolysis through bolus coalescence and interactions with bile salts [J]. Food Hydrocolloids, 2023, 141: 108748.
- [19] SINGH H, YE A Q, FERRUA M J. Aspects of food structures in the digestive tract [J]. Current Opinion in Food Science, 2015, 3: 85-93.
- [20] 钱兢菁,郑淋,赵谋明.酪蛋白体外消化过程中DPP-IV抑制活性的变化规律及其机制分析[J].食品科学,2020, 41(15):186-193.
- [21] YE A Q, CUI J, DALGLEISH D, et al. Formation of a structured clot during the gastric digestion of milk: Impact on the rate of protein hydrolysis [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 52: 478-486.
- [22] WANG X, YE A Q, LIN Q Q, et al. Gastric digestion of milk protein ingredients: Study using an *in vitro* dynamic model [J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(8): 6842-6852.
- [23] WADA Y, LÖNNERDAL B. Effects of different industrial heating processes of milk on site-specific protein modifications and their relationship to *in vitro* and *in vivo* digestibility [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(18): 4175-4185.
- [24] CRIBB P J, HAYES A. Effects of supplement timing and resistance exercise on skeletal muscle hypertrophy [J]. Medicine & Science in Sports & Exercise, 2006, 38(11): 1918-1925.
- [25] ZOOROB R, PARRISH M-E E, O'HARA H, et al. Sports nutrition needs: before, during, and after exercise [J]. Primary Care: Clinics in Office Practice, 2013, 40(2): 475-486.
- [26] SAMBORSKI P, CHMIELARZ-CZARNOCIŃSKA A, GRZYMISŁAWSKI M. Exercise-induced vomiting [J]. Gastroenterology Review/Przegląd Gastroenterologiczny, 2013, 8(6): 396-400.
- [27] 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.
- [28] LIU Z D, SUOLANG Q P, WANG J J, et al. Formation of structured clots, gastric emptying and hydrolysis kinetics of yak milk during *in vitro* dynamic gastrointestinal digestion: Impact of different heat treatments [J]. Food Research International, 2022, 162: 111958.
- [29] LUO J Q, TAYLOR C, NEBL T, et al. Effects of macro-nutrient, micro-nutrient composition and cooking conditions on *in vitro* digestibility of meat and aquatic dietary proteins [J]. Food Chemistry, 2018, 254: 292-301.
- [30] ORLIEN V, AALAEI K, POOJARY M M, et al. Effect of processing on *in vitro* digestibility (IVPD) of food proteins [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023, 63(16): 2790-2839.
- [31] SARKAR A, GOH K K T, SINGH R P, et al. Behaviour of an oil-in-water emulsion stabilized by β -lactoglobulin in an *in vitro* gastric model [J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(6): 1563-1569.
- [32] YE A Q, CUI J, DALGLEISH D, et al. Effect of homogenization and heat treatment on the behavior of protein and fat globules during gastric digestion of milk [J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(1): 36-47.
- [33] ZHONG M M, SUN Y F, SUN Y D, et al. Dynamic gastric stability and *in vitro* lipid digestion of soybean protein isolate and three storage protein-stabilized emulsions: Effects of ultrasonic treatment [J]. Food Research International, 2021, 149: 110666.