

# 婴幼儿配方全羊乳蛋白消化多肽肽谱及其免疫原性

连严慧<sup>1</sup>, 孟毅<sup>2</sup>, 贺宝元<sup>3</sup>, 谈雅琳<sup>1</sup>, 韩晶晶<sup>1</sup>, 薛海燕<sup>1\*</sup>

(1. 陕西科技大学食品科学与工程学院, 陕西西安 710021) (2. 陕西金牛乳业有限公司, 陕西渭南 714000) (3. 陕西科技大学轻工科学与工程学院, 陕西西安 710021)

**摘要:** 该研究通过体外模拟成人与婴幼儿胃肠道消化, 比较羊乳酪蛋白 (Casein, CN)、乳清蛋白 (Whey Protein, WP) 以及最接近母乳比例 (40:60, *m/m*) 的 CN 与 WP 的混合蛋白的消化特性。结果显示, 在模拟成人与婴幼儿体外消化过程中, 四种蛋白的消化率逐渐增加, 其中婴幼儿胃消化 120 min 后混合蛋白的消化率达到最大值 20.28%, 显著高于羊乳 ( $P<0.05$ ), 表明混合蛋白提高 CN 的比例后更易于被消化。在胃肠联合消化中, 婴幼儿混合蛋白在胃肠联合消化 30 min 时肽含量释放最多为 58.0 mg/mL, 且在婴幼儿胃肠联合消化终点中对二肽基肽酶-4 (Dipeptidyl Peptidase-4, DPP-IV) 抑制活性相对较强, 而 CN 在婴幼儿胃肠联合消化中表现出最高的抗氧化活性为 34.11%。免疫原性分析表明, 混合蛋白在婴幼儿胃肠消化中均呈现最低的免疫原性, 其更不易引起过敏反应。可见, 接近母乳比例的 CN 与 WP 混合蛋白有更好的消化性、更多的肽含量和较低的免疫原性, 且具有一定的抗氧化活性。这些发现为优化婴幼儿配方全羊乳粉的蛋白质来源和比例提供了重要的数据支撑。

**关键词:** 婴幼儿; 配方全羊乳; 模拟消化; 多肽肽谱; 免疫原性

文章编号: 1673-9078(2025)03-34-43

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.3.0159

## Digestible Peptide Profiles and Immunogenicity of Proteins in Whole Goat Milk-based Infant Formula

LIAN Yanhui<sup>1</sup>, MENG Yi<sup>2</sup>, HE Baoyuan<sup>3</sup>, TAN Yalin<sup>1</sup>, HAN Jingjing<sup>1</sup>, XUE Haiyan<sup>1\*</sup>

(1. School of Food Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China) (2. Shaanxi Jinniu Dairy Co. Ltd., Weinan 714000, China) (3. School of Light Industry Science and Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

**Abstract:** The digestibility of goat milk, casein (CN), whey protein (WP), and a mixture of CN and WP with a ratio similar to that in human breast milk (40:60, *m/m*) were assessed through *in vitro* simulation of digestion in the gastrointestinal tracts of adults and infants. The digestibility of all four proteins gradually increased during adult and infant *in vitro* digestion simulations. Mixed protein digestibility reached a maximum of 20.28% after 120 min of simulated infant gastric digestion, significantly higher than that of goat milk ( $P<0.05$ ), suggesting that the mixed protein with a higher CN proportion was more easily digested. The mixed protein released up to 58.0 mg/mL peptide after 30 min of simulated infant

引文格式:

连严慧,孟毅,贺宝元,等.婴幼儿配方全羊乳蛋白消化多肽肽谱及其免疫原性[J].现代食品科技,2025,41(3):34-43.

LIAN Yanhui, MENG Yi, HE Baoyuan, et al. Digestible peptide profiles and immunogenicity of proteins in whole goat milk-based infant formula [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(3): 34-43.

收稿日期: 2024-02-03

基金项目: 陕西省关键核心技术攻关项目 (2024NC-GJHX-17); 陕西省科技计划项目 (2022GY-361; 2022KXJ-011); 陕西科技大学科研启动基金项目 (2023BJ-20); 中国博士后科学基金项目 (2020M673605XB); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (2021JQ-543)

作者简介: 连严慧 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品分子营养与安全, E-mail: lianyanhui1999@163.com

通讯作者: 薛海燕 (1979-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品分子营养与安全, E-mail: xuehaiyan@sust.edu.cn

gastrointestinal co-digestion. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitory activity was relatively strong at the endpoint for the simulated infant gastrointestinal co-digestion. CN demonstrated the highest antioxidant activity of 34.11% during simulated infant gastrointestinal co-digestion. The mixed protein presented the lowest immunogenicity in simulated infant gastrointestinal digestion, indicating that the mixed protein is less likely to cause allergic reactions. Hence, the mixed protein combining CN and WP in a ratio similar to that in human breast milk provides improved digestibility, increased peptide content, reduced immunogenicity, and specific antioxidant activities. These findings provide important data to aid in the optimization of protein sources and ratios in whole goat milk-based infant formulas.

**Key words:** infant; whole goat milk-based formula; simulated digestion; peptide profile; immunogenicity

母乳是提供新生儿生长发育的蛋白质、脂肪、碳水化合物、维生素和矿物质等的最佳来源<sup>[1]</sup>，如果由于特殊原因不能获得母乳就由婴幼儿配方奶粉提供营养。羊乳<sup>[2,3]</sup>营养成分非常接近母乳，营养丰富、致敏性低、易消化吸收，还具有抗氧化、抑菌、抗病毒等多种生物活性，被称为“乳中之王”，因此羊乳又可以作为婴幼儿配方乳粉的新兴乳源，国内外对羊乳产品的安全性和营养价值研究也逐渐增加<sup>[3]</sup>。羊乳蛋白主要由 CN 和 WP 组成，两者的比例约为 30:70，与牛乳（20:80）相比，更接近人乳比例（40:60）。CN 主要为 A2 型  $\beta$ -CN，其次为  $\alpha$ s-CN 和  $\kappa$ -CN，对人体，尤其是婴幼儿的营养和健康更有益，WP 主要为  $\beta$ -乳球蛋白（ $\beta$ -Lactoglobulin,  $\beta$ -Lg）和  $\alpha$ -乳白蛋白（ $\alpha$ -Lactalbumin,  $\alpha$ -La）<sup>[4,5]</sup>。有研究表明<sup>[6]</sup>，羊乳在婴儿胃消化后的蛋白质消化行为与人乳最相似。

羊乳中所含的活性物质，如超氧化物歧化酶和上皮细胞生长因子，具有抵御病毒入侵的特性，同时也能降低结核感染的风险，表现出极高的安全性。基于羊乳的婴幼儿配方乳粉具有降低过敏反应、提高消化率、增进脂肪吸收效率以及降低胆固醇水平的功能特性<sup>[7]</sup>。在食品蛋白质中，乳蛋白是外源性生物活性肽的主要来源，通常用作消化实验中的合适模型。目前对人类和动物在摄入乳制品后的胃肠道腔内是否存在乳源性肽进行了一些研究，所报告的数据尽管至关重要，但仍然很少<sup>[8]</sup>。近年来，肽组学分析技术进展迅速，多用在食源性活性多肽的制备分析、纯化鉴定、质量控制等方面，并从分子层面上为揭示食源性蛋白质酶解调控机制、多肽释放特性等提供了重要的理论与技术支持<sup>[9]</sup>。有研究表明<sup>[10]</sup>，抗微生物相关肽大多在山羊乳肠道消化物中发现。Sanchon 等<sup>[8]</sup>通过鼻胃管收集口服 CN 和 WP 后的人空肠消化，并使用标准化的方法将蛋白质降解和肽释放情况与相同底物的消化系统进行比

较，结果发现，蛋白质在整个消化道被胃肠道酶和刷状边界膜肽酶广泛水解，导致大量肽和游离氨基酸的释放。肽组学是评估蛋白质消化的相关工具；它不仅可用于追踪释放的肽，还可用于提供已鉴定肽的生物活性<sup>[11]</sup>。与牛乳配方乳粉相比，山羊乳配方乳粉的致敏性较低，可作为牛乳的替代品，降低牛乳过敏性疾病的发病风险<sup>[12,13]</sup>，但对其模拟母乳配方的蛋白质消化及抗原性变化报道较少。

该研究旨在通过体外模拟成人和婴幼儿消化比较羊乳、CN、WP 以及 CN 和 WP 混合蛋白（40:60）的消化率、消化分子量、抗氧化活性和 DPP-IV 抑制活性和免疫原性，并将体外模拟胃肠联合消化 30 min 的消化液进行液相色谱-串联质谱法（Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS）LC-MS/MS 检测，得到消化水解的肽段种类来源，为羊乳蛋白质的消化提供一定的理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

新鲜液态羊乳，陕西金牛乳业有限公司；胃蛋白酶、胰蛋白酶、DPPH（分析纯），均为美国 Sigma 公司；十二烷基硫酸钠（SDS），美国 Amersham 公司；TEMED，国药集团化学试剂有限公司；Tris，北京博奥拓达科技有限公司；考马斯亮蓝 R-250、溴酚蓝、西格列汀，上海源叶生物科技有限公司；碳酸氢钠、碳酸钠，天津市天力化学试剂有限公司；磷酸盐缓冲液干粉（PBS），西安赫特生物；单抗 IgG，上海友科生物科技有限公司；辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗兔 IgG，博士德生物工程有限公司；其余试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

FYDKH3 集热式恒温水浴锅，上海恒一科学仪器有限公司；电泳仪，北京百晶生物技术有限公司；

DK2-2 电热恒温振荡水槽, 上海精宏实验设备有限公司; 凝胶成像分析系统, 南京驰顺科技有限公司; HC-3018R 高速冷冻离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司; EV-2200 紫外可见分光光度计, 上海美普达仪器有限公司; 酶联免疫检测仪, 热电上海仪器有限公司。

### 1.3 模拟成人与婴幼儿体外消化

#### 1.3.1 模拟成人体外消化

模拟口腔消化阶段: 分别将 120 mL 羊乳、CN 溶液、WP 溶液及 CN 与 WP 混合溶液 (4:6) 调至 pH 值 6.8 (1 mol/L NaHCO<sub>3</sub>) 与 120 mg 粘蛋白混合, 不含淀粉酶, 因为样品中不含淀粉, 37 °C 振荡水浴中孵育 5 min。模拟胃消化阶段: 取 6.9 mL 37.3 g/L KCl 溶液、0.9 mL 68 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液、12.5 mL 84 g/L NaHCO<sub>3</sub> 溶液、11.8 mL 117 g/L NaCl 溶液、0.4 mL 30.5 g/L MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> 溶液、0.5 mL 48 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液配置为人工胃液储备液。羊乳、CN 溶液、WP 溶液及 CN 与 WP 混合溶液 (4:6) 与模拟胃液按照 1:1 (V/V) 添加, 混合均匀后添加 CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> 用 HCl 将溶液 pH 值调至 2.0, 放入震荡水浴器中预热 5 min, 按照 2 000 U/mL 添加胃蛋白酶并用人工胃液溶解, 预热结束后每管加入酶溶液 1 mL, 并将其置于 37 °C 的水浴振荡器中消化。设置消化时间为 0、10、30、60、90、120 min。取 6.8 mL 37.3 g/L KCl 溶液、0.8 mL 68 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液、42.5 mL 84 g/L NaHCO<sub>3</sub> 溶液、9.6 mL 117 g/L NaCl 溶液、1.1 mL 30.5 g/L MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> 溶液配置为人工肠液储备液。取胃消化 120 min 后样品, 按照 1:1 (V/V) 的比例添加人工肠液, 进一步的实验步骤与上文所述相同, 调节上述溶液 pH 值至 7.0。设置消化时间为 0、0.5、5、10、30、60 min。消化结束后, 将消化液放入水浴锅中加热 5 min (100 °C) 灭酶, 每管留样放入冰箱 -20 °C 冷冻保存。

#### 1.3.2 模拟婴幼儿体外消化

羊乳、CN 溶液、WP 溶液及 CN 与 WP 混合溶液 (4:6) 与模拟胃液按照 2:1 添加, 胃消化用 HCl 调节上述溶液 pH 值至 5.0, 胃肠联合消化按照酶/底物 (E/S) 1:62.5 添加胰蛋白酶 (m/m), 其余操作同 1.3.1。

#### 1.4 Tricine-SDS-PAGE

分别配制 16.5% 的分离胶 (m/m)、10% 的夹层胶 (m/m) 以及 4% 的浓缩胶 (m/m), 分析成人

与婴幼儿胃消化、胃肠联合消化的水解液。30 V 预电泳 10 min, 将样品加入点样孔后 30 V 电泳 1 h, 100 V 电泳至溴酚蓝到达胶底部后停止电泳, 溴酚蓝在上层胶和夹层胶时电压设置 30 V, 到达分离胶时设置 100 V, 当溴酚蓝到达距胶底 1 cm 时结束电泳, 剥胶后浸泡在固定液 [0.5% 戊二醛 (V/V)、30% 乙醇 (V/V)] 中 30 min, 考马斯 R-250 染色 1.5 h, 脱色液 (异丙醇 100 mL, 冰乙酸 100 mL, 加超纯水至 1 L) 脱色至背景干净。

#### 1.5 蛋白消化率的测定

参照唐登宇<sup>[14]</sup>的方法, 并有所修改, 用凯氏定氮法测定消化前后消化液中蛋白质的含量。消化率按式 (1) 计算:

$$D = \frac{M_0 - M_1}{M_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

- D——蛋白质体外消化率;
- M<sub>0</sub>——消化前蛋白质的含量;
- M<sub>1</sub>——消化后蛋白质的含量。

#### 1.6 水解液 DPPH 自由基清除率的测定

参照王战勇<sup>[15]</sup>的方法, 并有所修改。取水解液 2 mL 避光条件下与 2 mL DPPH 混匀, 静置 30 min, 517 nm 处测吸光度, DPPH 计算公式按式 (2) 计算:

$$Y = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

- Y——DPPH 自由基清除率;
- A<sub>i</sub>——样品吸光度值;
- A<sub>j</sub>——无水乙醇替换 DPPH 作空白对照组;
- A<sub>0</sub>——无水乙醇替换水解液作对照组。

#### 1.7 DPP-IV 抑制活性测定

细胞以每孔 5×10<sup>4</sup> 个细胞接种到黑色 96 孔板中, 培养至第 3 天后, 将培养液吸出, 使用 PBS 对孔板进行清洗, 加入 100 μL 的西格列汀 (10<sup>-6</sup> mol/L)、多肽溶液和 PBS, 培养 24 h, 之后吸出样品和 PBS, 并加入 100 μL 的荧光底物 Gly-Pro-AMC (50 μmol/L) 并孵育 10 min。在酶标仪中设置 350 nm 为激发波长, 480 nm 为发生波长, 测量荧光强度。

#### 1.8 肽含量的测定

采用双缩脲法对样品中肽含量进行测定<sup>[16]</sup>: 测定样品水解液的吸光度值, 代入标准曲线, 算出沉

淀后的肽含量，再乘以样品被稀释的倍数，即为水解液中的肽含量。通过图形绘制得出标准曲线为  $y=0.0395x-0.001667$ ， $R^2=0.9977$ ，计算公式按式(3)计算：

$$P = \frac{(A+0.001667) \times N}{0.0395} \quad (3)$$

式中：

$P$ ——酪蛋白水解液肽含量，mg/mL；

$A$ ——吸光度值；

$N$ ——样品稀释倍数。

### 1.9 LC-MS/MS的检测

采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析胃肠联合消化30 min的水解液，用样品溶解液[0.1%甲酸(V/V)、2%乙腈(V/V)]溶解，13 200 r/min，4℃离心20 min，取上清，进行质谱鉴定。

液相参数：色谱柱信息，300  $\mu\text{m}$  idx 5 mm, Acclaim PepMap RSLC C18, 5  $\mu\text{m}$ , 100Å, (Thermo, 160454)；Acclaim PepMap 75  $\mu\text{m}$  X 150 mm, C18, 3  $\mu\text{m}$ , 100 Å (Thermo, 160321)；流动相，A相为0.1%甲酸(V/V)，B相为0.1%甲酸(V/V)，80% CAN(V/V)；流速300 nL/min。使用体积分数的梯度洗脱程序：0~5 min, 5% B；5~45 min, 5%~50% B；45~50 min, 50%~90% B；50~55 min, 90% B；55~65 min, 90%~5% B。

分离后的肽段直接进入质谱仪 Thermo Scientific Q Exactive 进行在线检测，具体参数如下：一级质谱，Resolution, 70 000；AGC target, 3e6；Maximum IT, 100 ms；Scan range, 350~1 800  $m/z$ ；二级质谱，Resolution, 17 500；AGC target, 5e4；Maximum IT, 120 ms；TopN, 20；NCE/stepped NCE, 27。

数据库检索：质谱原始文件经过 MM File Conversion 软件处理转换，得到 MGF 格式文件，然后用 MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>) 检索 uniprot 数据库，得到结果。

### 1.10 水解液免疫原性的测定

ELISA 溶液配制参照孟轩夷<sup>[17]</sup>的方法，96孔酶标板中按照 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  包被四种蛋白消化液。将96孔酶标板置于4℃过夜。倒掉包被样品后，采用PBST洗涤3次，每次3~5 min。按照1:3 200 mg/mL添加单抗( $m/V$ ) 100  $\mu\text{L}$ ，置于37℃培养箱1 h。再次采用PBST洗涤。按照1:1 400 mg/mL添加酶

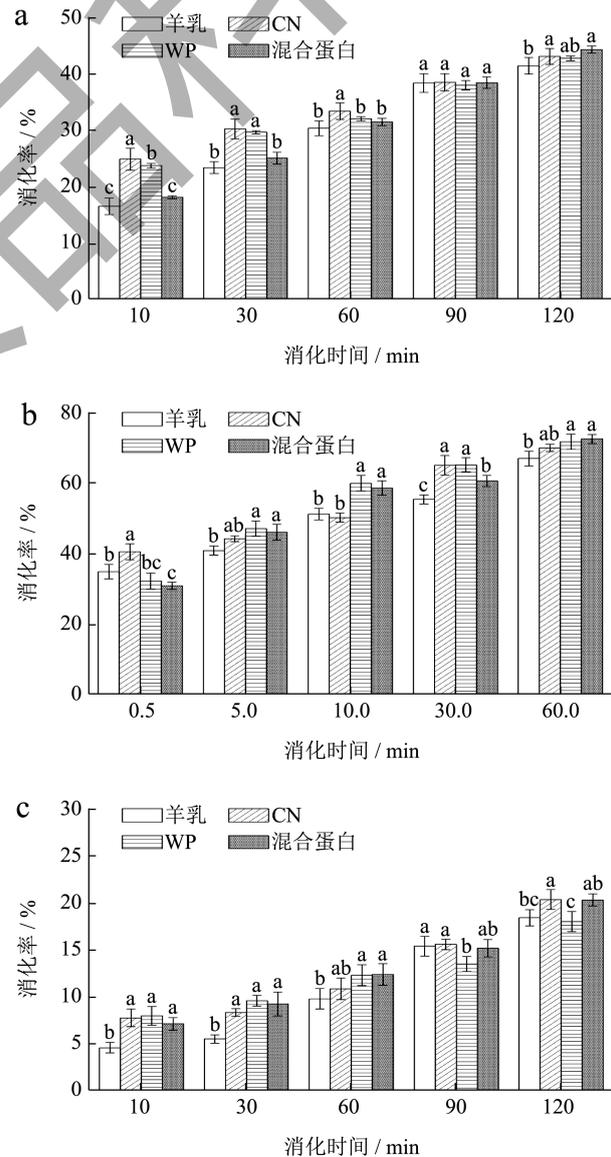
标二抗(HRP-羊抗兔IgG)( $m/V$ ) 100  $\mu\text{L}$ ，置于37℃培养箱1 h。再次采用PBST洗涤。加入100  $\mu\text{L}$ 显色液，于37℃的条件下显色15 min。加入50  $\mu\text{L}$ 终止液，反应5 min，之后使用酶标仪测定450 nm波长下吸光度值。

### 1.11 数据分析

使用 GraphPad Prism 6.01 软件以及 Origin 2021 软件将获得的数据可视化，并使用 SPSS 22.0 软件通过单向方差分析(ANOVA)进行显著性分析。试验均设置3次重复，不同小写字母表示样品间具有显著性差异( $P<0.05$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 乳蛋白胃肠消化率结果比较分析



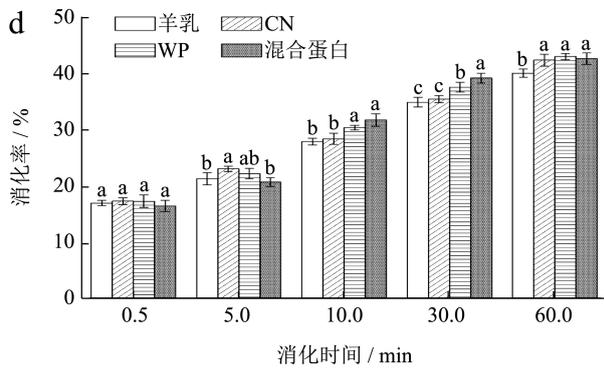


图1 模拟胃肠消化消化率图

Fig.1 Simulated gastrointestinal digestion digestibility chart

注: (a) 成人胃消化, (b) 成人胃肠联合消化, (c) 婴幼儿胃消化, (d) 婴幼儿胃肠联合消化。图中不同字母表示在同一时间点的样本间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 下同 4、6~8 同。

结合图 1a、1c 可知, 四种蛋白样品在模拟成人和婴幼儿体外胃消化过程中呈上升趋势。在婴幼儿胃消化过程中, CN 和混合蛋白的消化率在 120 min 时达到最大值, 为 20.33% 和 20.28%, 与羊乳蛋白均有显著差异 ( $P < 0.05$ )。随着消化时间增加, 蛋白结构发生改变, 螺旋结构展开, 使得结构更松散, 从而为水解酶提供更多结合位点, 因此提高了蛋白消化率<sup>[18]</sup>。混合蛋白提高了 CN 的比例, 而山羊奶中的 CN 在胃中通常更容易被有效消化<sup>[19]</sup>。如图 1b、1d 所示, 成人和婴幼儿胃肠联合消化 60 min 后, 四种蛋白的消化率均达到最大值, 其中婴幼儿 WP 消化率从 17.24% 增加到 42.97%, 混合蛋白的消化率从 16.41% 增至 42.60%, CN 消化率从 17.26% 增加至 42.33%, 均显著高于羊乳蛋白 ( $P < 0.05$ )。Arissara 等<sup>[20]</sup> 研究表明, 当 CN 与 WP 的比例为 40:60 时, CN 的胃凝血范围较小, 因此凝乳颗粒中的蛋白质和乳状液滴对消化酶的可及性较少受到限制, 此时蛋白质的消化率最高, 且与人乳最为相似。

## 2.2 乳蛋白胃肠消化分子量结果比较分析

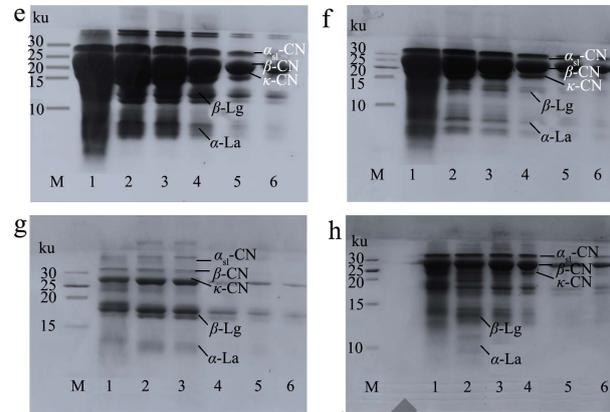
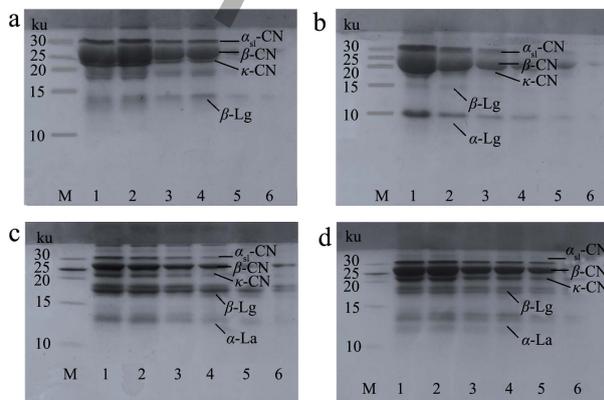


图2 胃消化 Tricine-SDS-PAGE 电泳图

Fig.2 Gastric digestion of Tricine-SDS-PAGE electropherograms

注: a~d 为成人, e~h 为婴幼儿。a~d 分别代表羊乳、CN、WP 和混合蛋白, e~h 同。M. Marker; 1. 未处理样品; 2~6 分别为体外模拟胃液消化 10、30、60、90、120 min 羊乳。

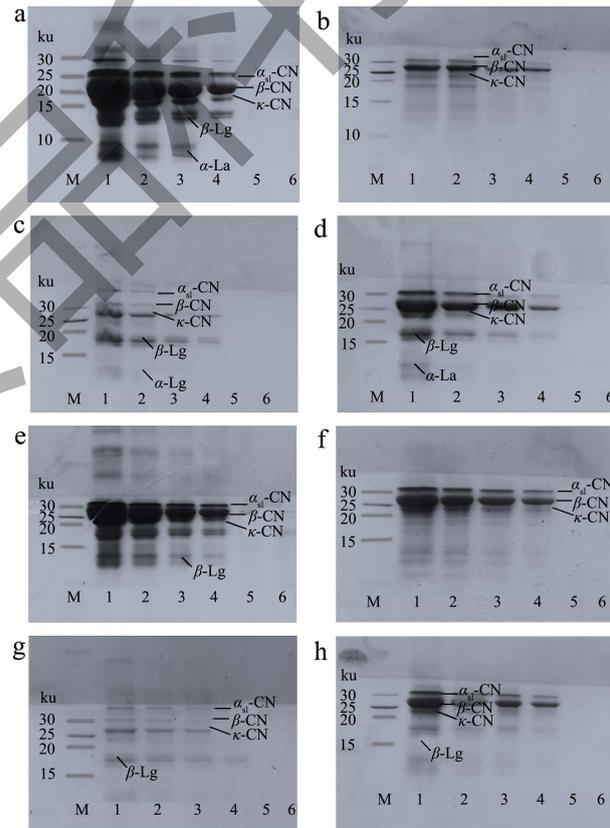


图3 胃肠联合消化 Tricine-SDS-PAGE 电泳图

Fig.3 Gastrointestinal co-digestion of Tricine-SDS-PAGE electropherograms

注: a~d 为成人, e~h 为婴幼儿。a~d 分别代表羊乳、CN、WP 和混合蛋白, e~h 同。M. Marker; 1. 未处理样品; 2~6 分别为体外模拟胃肠液消化 30 s、5、10、30、60 min 羊乳。

从图 2e~2h 看出, 婴幼儿胃液消化 30 min 后, WP 大部分被水解, 分子量主要集中在 15~20 ku。与  $\alpha$ -La 相比,  $\beta$ -Lg 更难被消化, 很难被降解为氨

基酸片段<sup>[21]</sup>。婴幼儿胃液消化 60 min 后, 大部分 CN 被迅速分解, 蛋白条带明显变窄且颜色变浅, 其分子量主要集中在 25 ku 以下, 山羊奶中 CN 在胃中快速降解可能是由于其丰度和低磷酸化水平所致<sup>[22]</sup>。与成人相比, 婴幼儿胃消化电泳条带颜色更深, 蛋白消化所需时间更长。有研究报道<sup>[23]</sup>, 随着婴幼儿年龄增长, 更高的胃蛋白酶活性和更松散的凝块结构有助于更快地消化 CN 和 WP。

结合图 3 发现, 成人与婴幼儿胃肠联合消化 30 min 后, 大部分的蛋白被水解, 蛋白质条带主要分布于 25 ku 以下, 随着水解时间延长蛋白质条带逐渐模糊, 甚至消失, 表明未被水解的蛋白逐步水解至完全消失<sup>[24]</sup>, 大多数肽段被降解为分子量极小的寡肽或游离氨基酸<sup>[25]</sup>。Thao 等<sup>[26]</sup>研究婴儿配方中 CN 的胃肠消化, 发现大多数 CN 在胃中消化 1 h 后仍保留, 但在肠中被蛋白酶完全消化。这是因为婴幼儿胃的 pH 值为 5.0, 接近 CN 的等电点 (pH4.6), 导致 CN 聚集, 阻止 CN 的胃蛋白酶敏感性。

### 2.3 水解肽含量及肽段种类差异性结果分析

肽是一类具有多种生物活性特性的化合物, 它们源自食物蛋白质, 通常在消化系统中通过酶的水解或消化过程产生<sup>[27]</sup>。在图 4a、4c 中, 胃消化的肽含量没有明显的规律, 可能是胃消化时会产生凝乳块消化不充分, 对测定的结果产生一定的影响。四种蛋白经婴幼儿胃消化后的肽含量低于成人, 而在婴幼儿胃消化后四种蛋白没有显著性差异 ( $P > 0.05$ )。经过胃消化后被分解的肽段和氨基酸进入肠道, 肠道中的胰蛋白酶、肽酶等消化酶继续将蛋白质降解为更小的肽段和氨基酸。在这个阶段, 肽含量会达到一个高峰, 此时被释放的肽段较多。正如图 4b、4d 所示, 在胃肠联合消化中, 成人与婴幼儿肽含量结果的总体均呈先上升后下降的趋势, 在婴幼儿胃肠联合消化 30 min 时混合蛋白肽含量达到最高值为 58.0 mg/mL, 显著高于 CN 与羊乳 ( $P < 0.05$ )。从消化初始到消化终点, 混合蛋白肽含量从 40 mg/mL 增加到 44 mg/mL, 与羊乳和 CN 整体均具有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 这表明混合蛋白能更好地满足婴幼儿的营养需求并促进消化。Raquel 等<sup>[28]</sup>使用 INFOGEST 静态消化模型对  $\beta$ -Lg 消化, 发现  $\beta$ -Lg 在胃期结束时, 肽含量显著增加, 尤其是在 N 末端。在肠期之后, 仍鉴定出大量肽, 其中大多数来源于靠近 C 末端的两个区域, 并通过 SDS-PAGE 不再可见完整的蛋白质, 表明来自 WP

中的肽主要是  $\beta$ -Lg。在胃肠联合消化后期, 成人与婴幼儿肽含量降低, 随着消化过程的进行, 肽段和氨基酸会被小肠黏膜细胞吸收, 进入血液循环。同时, 在肠道内也会有一些肽段被肠道细菌进一步降解或者被排出体外。因此, 肽含量会逐渐减少, 直至最终消化完成, 大部分蛋白质被吸收利用<sup>[29]</sup>。

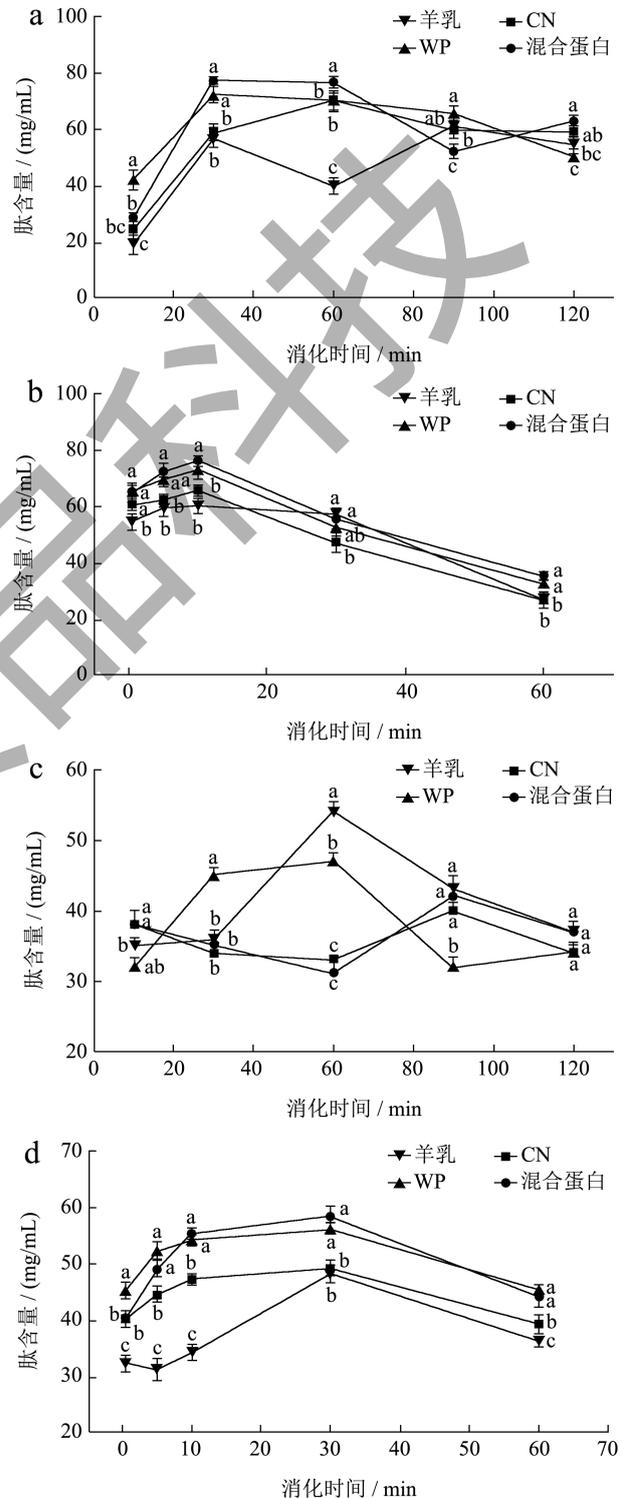


图 4 消化时间对肽含量的影响

Fig.4 Effect of digestion time on peptide content

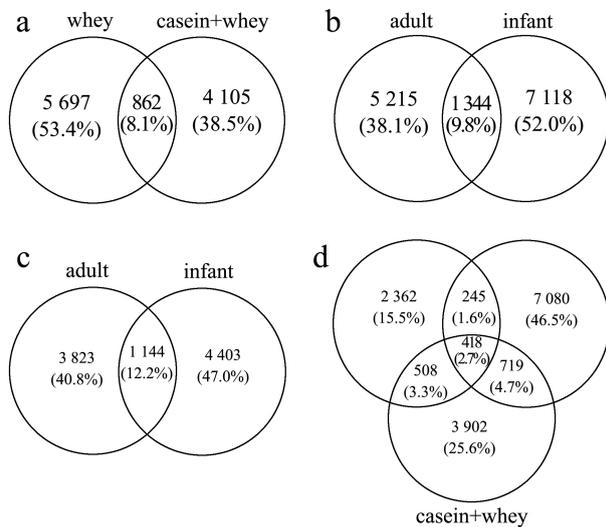


图5 水解肽段韦恩图

Fig.5 Wayne diagram of hydrolyzed peptides

注：a 为成人乳清与成人混合；b 为成人乳清与婴幼儿乳清；c 为成人混合与婴幼儿混合；d 为婴幼儿 CN、乳清与混合。

蛋白经过人体消化后，会被逐渐分解成不同长度的肽段和氨基酸，这些肽段的长度不一，从几个氨基酸残基到数十个氨基酸残基不等。利用 LC-MS/MS 分析四种蛋白经过成人与婴幼儿胃肠消化产生的肽段种类，见图 5a~5d 所示，对于成人，乳清水解肽段有 6 559 个，混合蛋白水解肽段有 4 967 个，对于婴幼儿，CN 水解肽段有 3 533 个，乳清水解肽段有 8 462 个，混合蛋白样品水解肽段有 5 547 个。与成人相比，婴幼儿 WP 和混合蛋白水解产生的肽段数量均高于成人，且婴幼儿乳清与婴幼儿混合样品共有的水解肽段数量更多，1 137 个肽段是共有的。由此表明，在婴幼儿体内水解肽段种类更多，有研究报道<sup>[30]</sup>，羊乳蛋白的消化是由 CN 与 WP 的比例决定的，这与 CN 和 WP 的结构特性有关，也正表明 CN 与 WP 的比例为 40:60 时更适合婴幼儿。

### 2.4 DPP-IV抑制活性结果分析

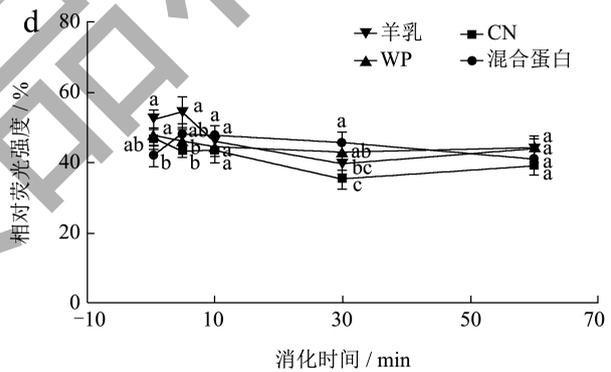
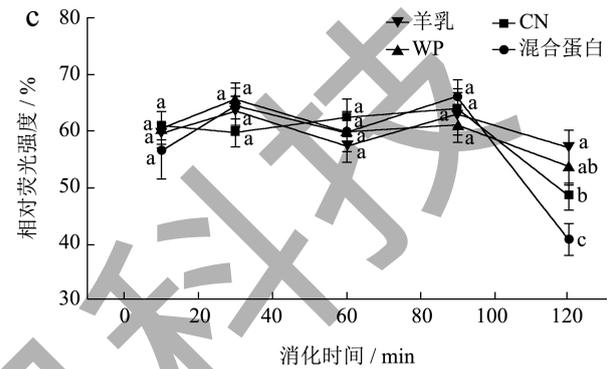
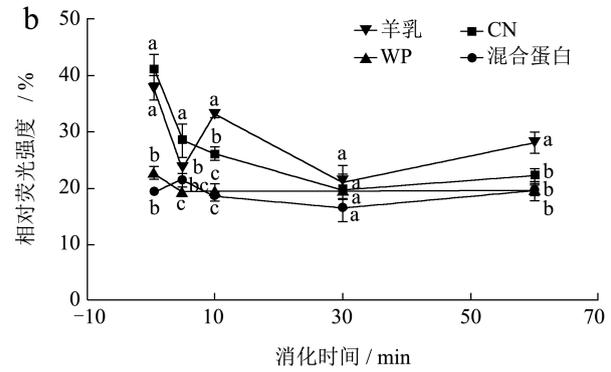
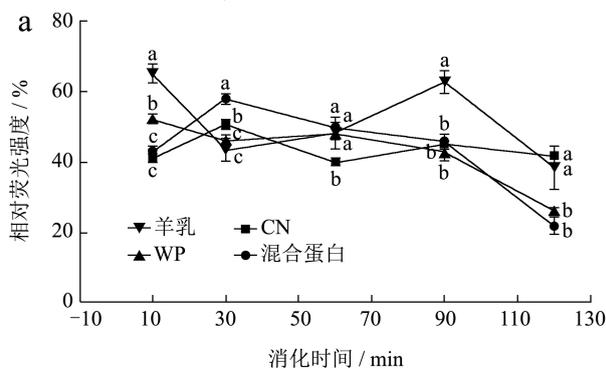


图6 消化时间对 DPP-IV 抑制活性的影响

Fig.6 Effect of digestion time on the inhibitory activity of DPP-IV

DPP-IV 是一种外肽酶，主要存在于肝脏、肾脏和肠道的上皮组织中，它的主要功能是分解肽段<sup>[31]</sup>。相对荧光强度越高，DPP-IV 抑制活性越弱。从图 6a、6c 可看出，在胃消化 30 min 后，四种蛋白样品对成人 DPP-IV 的抑制活性高于婴幼儿。在婴幼儿胃消化 60~90 min 内，混合蛋白和羊乳对 DPP-IV 抑制活性均呈上升趋势；在胃消化结束后，由于胃酸和胃蛋白酶等消化液的作用可能会部分地降解或中和 DPP-IV 抑制剂，DPP-IV 抑制活性逐渐增加，混合蛋白在成人与婴幼儿体内的 DPP-IV 抑制活性均显著高于其余三种蛋白 ( $P < 0.05$ )，相对荧光强度为 40.77%。如图 6b、6d 所示，在胃肠联合消化中，成人和婴幼儿经过胃肠消化 10 min 后，DPP-IV 抑

制活性呈现出相对稳定的趋势,在消化 30 min 时混合蛋白在成人胃肠联合消化中对 DPP-IV 抑制活性最强,而婴幼儿则表现出最弱的 DPP-IV 抑制活性 45.59%,与羊乳和 CN 具有显著差异 ( $P < 0.05$ )。在婴幼儿胃肠联合消化 30~60 min 内,羊乳、CN 和 WP 呈上升趋势,而混合蛋白呈下降趋势,但胃肠联合消化终点四种蛋白无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。综上结果表明混合蛋白在模拟婴幼儿胃肠消化结束后保持着对 DPP-IV 的有效抑制作用。与成人相比,四种蛋白对婴幼儿 DPP-IV 抑制活性较弱。DPP-IV 抑制效果增强可能是经过胃肠联合消化又产生部分具有 DPP-IV 抑制活性的肽段。随消化时间增加,免疫活性肽又有部分被水解成小分子的肽或游离氨基酸,使 DPP-IV 抑制效果减弱。Alberto 等<sup>[32]</sup>研究牛 WP 胃肠消化在肠道中的作用,发现胃肠道消化后的所有乳清样品都抑制了 DPP-IV 的活性。

## 2.5 抗氧化活性结果分析

羊乳蛋白质中含有丰富的抗氧化肽,具有一定的抗氧化活性,羊乳蛋白经过胃肠消化后可被胃蛋白酶、胰蛋白酶等分解产生多种可溶性肽,具有显著的清除超氧自由基的能力<sup>[33]</sup>。胃消化时间对四种蛋白抗氧化性的影响如图 7a、7c 所示,在成人与婴幼儿胃消化终点,CN 对 DPPH 自由基的清除率最高,明显高于其余三种蛋白 ( $P < 0.05$ )。在婴幼儿胃消化终点,混合蛋白对 DPPH 自由基的清除率较高,在胃消化 30、120 min 时,混合蛋白对 DPPH 自由基的清除率均显著高于羊乳 ( $P < 0.05$ )。结合图 7b、7d,在成人与婴幼儿胃肠联合消化阶段,CN 的整体 DPPH 自由基的清除率最高,在婴幼儿胃肠联合消化 30 min 时有最高清除率 34.11%。在婴幼儿胃肠联合消化终点混合蛋白对 DPPH 自由基的清除率最低为 16.69%。CN 是羊乳中数量最高的自由基清除剂,具有高含量的抗氧化氨基酸,如酪氨酸、色氨酸和磷酸丝氨酸,并通过氧化这些氨基酸猝灭自由基<sup>[34]</sup>,且 CN 浓度与 DPPH 自由基的清除能力成正比<sup>[35]</sup>。混合蛋白提高了 CN 的比例,但在胃肠联合消化后期对 DPPH 自由基的清除率却下降了可能是由于肽含量的降低,会导致混合蛋白中的抗氧化肽被进一步降解。

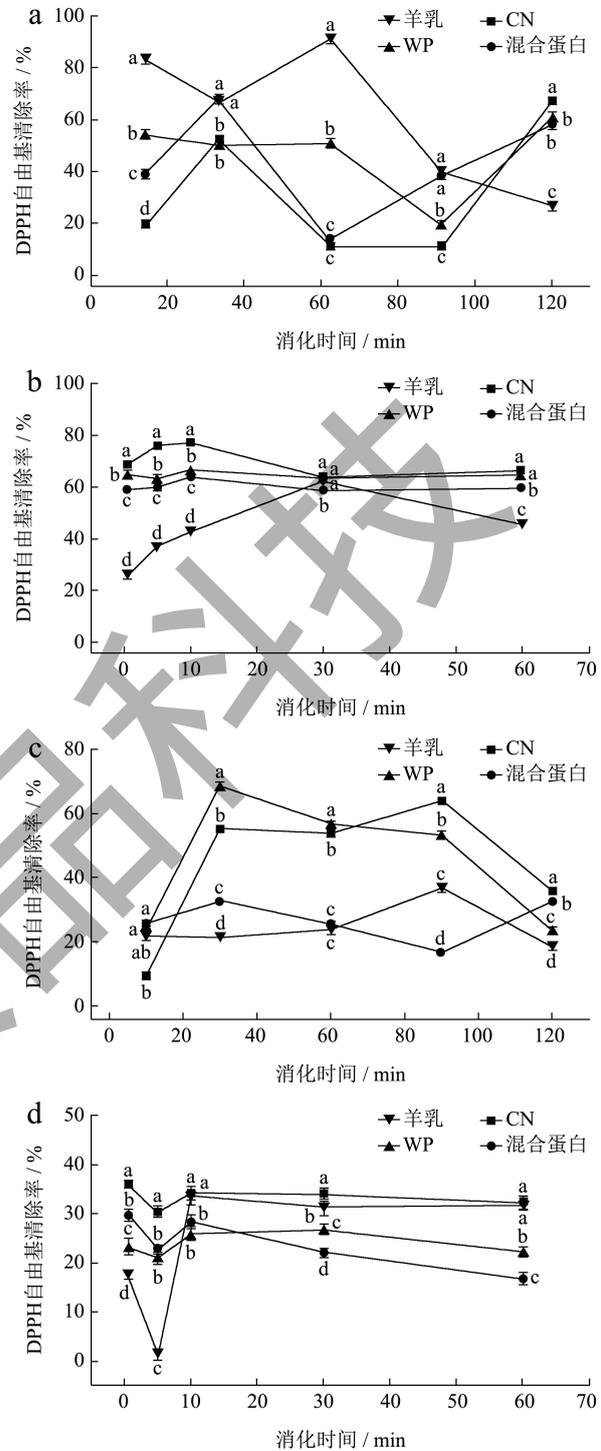


图 7 消化时间对抗氧化活性的影响

Fig.7 Effect of digestion time on antioxidant activity

## 2.6 免疫原性结果分析

利用 ELISA 测定四种蛋白的免疫原性,从图 8a、8c 可知,在成人与婴幼儿胃消化 60 min 后,乳蛋白与 IgG 的结合能力提高,可能是胃消化的消化程度较低, $\beta$ -lg 耐水解,在胃消化 60 min 之后

与其相关的抗原肽被释放出来，从而使得免疫原性增强。在婴幼儿胃消化中，混合蛋白均保持着最低的免疫原性。经过胃肠联合消化后，免疫原性均为先上升后下降。原因可能是，经过胃肠联合消化又产生了部分免疫活性肽，之后随消化时间增加，部分免疫活性肽被水解成小分子的肽或游离氨基酸，从而导致免疫原性减弱。比较图 8b、8d，混合蛋白在婴幼儿胃肠联合消化的免疫原性整体明显低于羊乳、CN 和 WP ( $P < 0.05$ )，而在胃肠联合消化终点达到最低值，其 OD<sub>450</sub> 值为 0.129，表明将 CN 与 WP 按比例混合进行婴幼儿胃肠联合消化能够进一步的促进抗原肽的水解，使得混合蛋白在婴幼儿体内更不易过敏，与刘甜甜<sup>[36]</sup>研究复配牛乳蛋白（其中 CN 与 WP 的比值为 4:6）经过水解后致敏性降低这一结果相似。

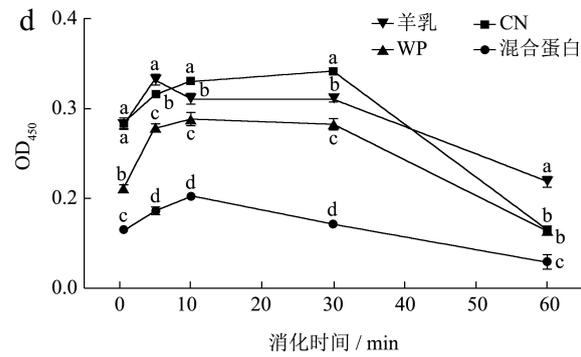
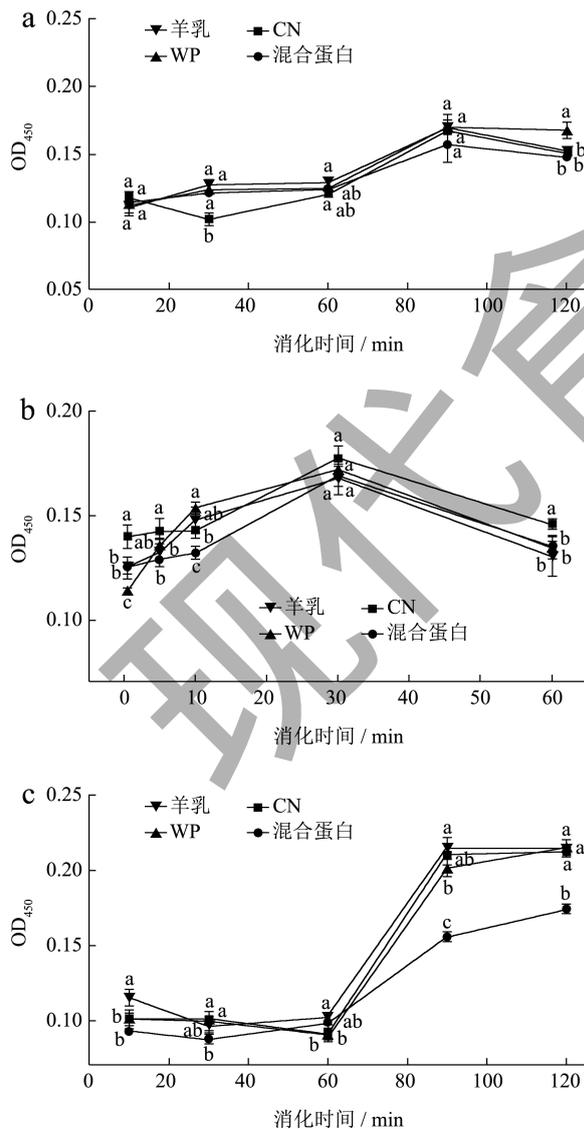


图 8 消化时间对免疫原性的影响

Fig.8 Effect of digestion time on immunogenicity

### 3 结论

婴儿配方乳粉模型中 CN 与 WP 的比例对于蛋白质在体外消化过程中的水解至关重要。以最接近母乳比例 (40:60) 将 CN 与 WP 混合，在经过婴幼儿模拟胃消化后，混合蛋白的消化率达到最高值为 20.28%，且胃肠联合消化后婴幼儿混合蛋白消化率从 17.24% 增加到 42.97%。混合蛋白在婴幼儿胃肠联合消化 30 min 时肽含量释放最多，与成人相比，婴幼儿混合蛋白水解肽段种类更高，且在婴幼儿胃肠联合消化中 DPP-IV 抑制活性最弱。通过抗氧化性分析，发现婴幼儿 CN 在胃肠消化中抗氧化性最高，在胃肠联合消化 30 min 达到最大值为 34.11%。由此可知，提高 CN 的比例后会增加更多的抗氧化基团。在婴幼儿胃肠联合消化中，混合蛋白相较于 CN、WP 和羊乳，其免疫原性最低。以上结果表明，接近母乳比例的 CN 与 WP 混合蛋白具有更好的消化性以及更低的免疫原性，该结果有助于开发更接近母乳的婴幼儿配方乳粉，以更好地满足婴幼儿的营养需求和健康成长。此外，通过模拟婴幼儿或成人消化道胃液或肠液，可以简单评估全羊乳蛋白在消化过程中的易吸收和消化特性，具有操作简便、时间和成本相对较低等优势。但婴幼儿体内消化液的成分和作用机制非常复杂，同时还受到其他因素的影响，如胃肠道生理状态和个体差异等。因此，为探究婴幼儿配方全羊乳蛋白在婴幼儿体内的消化和吸收的特性，后续还需进一步结合动物或细胞实验等更多维度的数据来进行解释和验证。

### 参考文献

[1] GALLIER S, VOCKING K, POST J A, et al. A novel infant milk formula concept: Mimicking the human

- milk fat globule structure [J]. Colloids and Surfaces, B. Biointerfaces, 2015, 136(1): 329-339.
- [2] 高佳媛,邵玉宇,王毕妮,等.羊奶及其制品的研究进展[J].中国乳品工业,2017,45(1):34-38.
- [3] 冯莉,武莹敏,刘璇璇,等.山羊乳蛋白的营养特性及其生物活性研究进展[J].食品研究与开发,2023,44(22):168-173.
- [4] 高婧昕,毛学英.羊乳组成及功能特性研究进展[J].中国乳业,2019,8:160-164.
- [5] 李艾黎,刘串,马艺鸣,等.山羊乳及其制品营养与功能特性的研究进展[J].食品科学,2023,44(5):212-221.
- [6] XIAO T, ZENG J P, ZHAO C D, et al. Comparative analysis of protein digestion characteristics in human, cow, goat, sheep, mare, and camel milk under simulated infant condition [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71: 15035-15047.
- [7] 马玉琴,宋礼,崔广智,等.羊乳作为婴幼儿配方乳粉乳源的研究进展[J].乳业科学与技术,2019,42(2):50-54.
- [8] SANCHON J, FERNANDEZ-TOME S, MIRALLES B, et al. Protein degradation and peptide release from milk proteins in human jejunum. Comparison with *in vitro* gastrointestinal simulation [J]. Food Chemistry, 2018, 239(Jan.15): 486-494.
- [9] 范丽琪,郁晓艺,刘磊,等.肽组学分析技术及其在食品研究中的应用进展[J].现代食品科技,2023,39(8):352-359.
- [10] MA Y, HOU Y M, HAN B S, et al. Peptidome comparison following gastrointestinal digesta of bovine versus caprine milk serum [J]. Journal of dairy science, 2021, 104(1): 47-60.
- [11] ROSE P, AGATA G, LUIGIA D S, et al. A comprehensive peptidomic approach to characterize the protein profile of selected durum wheat genotypes: implication for coeliac disease and wheat allergy [J]. Nutrients, 2019, 11(10): 2321-2321.
- [12] 潘琪浩,仁青措姆,高腾云,等.羊奶的营养价值、生物学功能及应用[J].动物营养学报,2023,35(12):1-11.
- [13] 姜玉池,赵怡晴,谢奎,等.山羊乳与牛乳配方乳粉的致敏性比较[J].食品科学,2022,43(7):96-104.
- [14] 唐登宇.热处理方式对全蛋液感官特性与营养价值影响的研究[D].咸阳:西北农林科技大学,2021.
- [15] 王战勇.牛乳酪蛋白ACE抑制肽的Caco-2细胞水平转运吸收机制研究[D].西安:陕西科技大学,2017.
- [16] 刘聃.花生蛋白肽的检测及抗氧化活性研究[D].重庆:西南大学,2013.
- [17] 孟轩夷.十八碳不饱和脂肪酸对牛乳 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白致敏性的影响[D].南昌:南昌大学,2019.
- [18] JIANG J, ZHANG Z P, ZHAO J, et al. The effect of non-covalent interaction of chlorogenic acid with whey protein and casein on physicochemical and radical-scavenging activity of *in vitro* protein digests [J]. Food Chemistry, 2018, 268(Dec.1): 334-341.
- [19] ALISON J H, OLIVIA A M W, IRINA B, et al. Gastric digestion of cow and goat milk: Impact of infant and young child *in vitro* digestion conditions [J]. Food Chemistry, 2018, 245(Apr.15): 275-281.
- [20] ARISSARA P, JAYANI C, THOM H, et al. *In vitro* digestion of infant formula model systems: Influence of casein to whey protein ratio [J]. International Dairy Journal, 2021, 117: 105008.
- [21] MICHAEL Z, THOM H, ALAN K. Effect of high-pressure treatment on *in-vitro* digestibility of  $\beta$ -lactoglobulin [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2008, 9(1): 62-69.
- [22] MA Y, HOU Y M, XIE K, et al. Digestive differences in immunoglobulin G and lactoferrin among human, bovine, and caprine milk following *in vitro* digestion [J]. International Dairy Journal, 2021, 120: 105081.
- [23] JULIE M, SHANNA B-N, TAMARA H, et al. Gastric clot formation and digestion of milk proteins in static *in vitro* infant gastric digestion models representing different ages [J]. Food Chemistry, 2024, 432: 137209.
- [24] 冯立芳,张阔,周瑜桥,等.不同水解度牛乳蛋白婴儿配方奶粉体外消化特性研究及对小鼠生长发育影响[C]//中国食品科学技术学会第十五届年会论文集,2018:495-496.
- [25] 周欣慧.山羊乳 $\beta$ -乳球蛋白改性及其消化产物多肽组学研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2021.
- [26] THAO T P N, BHESH B, JULIE C, et al. *In vitro* digestion of infant formulations with hydrolysed and non-hydrolysed proteins from dairy and soybean [J]. Food & Function, 2016, 7(12): 4908-4919.
- [27] KAJA K, ANNA J. Bioactive peptides obtained from legume seeds as new compounds in metabolic syndrome prevention and diet therapy [J]. Foods, 2022, 11(20): 3300.
- [28] RAQUEL S, RETO P, SÉBASTIEN D, et al. Protein digestion of different protein sources using the INFOGEST static digestion model [J]. Food Research International, 2020, 130: 108996.1-108996.11.
- [29] EDWIN T M. Gastric digestion of protein through pancreozyme action optimizes intestinal forms for absorption, mucin formation and villus integrity [J]. Animal Feed Science and Technology, 2016, 221 (Pt.B): 284-303.
- [30] REN Q, MATTIA B, HE T, et al. Heating affects protein digestion of skimmed goat milk proteins with different casein:whey ratios under simulated infant conditions [J]. Food Hydrocolloids, 2024, 148: 109452.
- [31] BHAWNA P, SUNITA M, SATHISH K M H, et al. Encapsulation and assessment of antidiabetic potential of  $\alpha$ -Lactalbumin-derived hydrolysates [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(14): 5547-5553.
- [32] ALBERTO R C, ELENA A, IVANO D N, et al. Intestinal health benefits of bovine whey proteins after simulated gastrointestinal digestion [J]. Journal of Functional Foods, 2018, 49: 526-535.
- [33] AHMED, S A, TAWFIK E B, LAILA M E, et al. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk proteins [J]. Food Research International, 2015, 74 (Aug.): 80-88.
- [34] DAVIDE T, SERENA M, SHERIF S, et al. Biological activities and peptidomic profile of *in vitro*-digested cow, camel, goat and sheep milk [J]. International Dairy Journal, 2018, 81: 19-27.
- [35] SHU H C, CHI Y C. Antioxidant properties of caseins and whey proteins from colostrums [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2020, 13(7): 57-63.
- [36] 刘甜甜.深度水解婴儿配方奶粉及其致敏性研究[D].天津:天津科技大学,2022.