李淋滋, 周敏, 荣菡, 等. 不同乳粉和大豆粉体外消化特性及对婴儿肠道菌群的调节作用比较 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(12): 446−454. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060123

LI Linzi, ZHOU Min, RONG Han, et al. Comparison of *in Vitro* Digestibility Characteristics and Regulatory Effects on Infant Intestinal Flora between Different Milk Powders and Soybean Powder[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(12): 446−454. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060123

·营养与保健·

不同乳粉和大豆粉体外消化特性及对婴儿肠道菌群的调节作用比较

李淋滋[1], 周　敏[2], 荣　菡[3], 叶发银[1,4], 赵国华[1,4,5], 雷　琳[1,4,*]

（1.西南大学食品科学学院, 重庆 400715;
2.陆军军医大学军事预防医学系军队营养与食品卫生学教研室, 重庆 400038;
3.北京理工大学珠海学院材料与环境学院, 广东珠海 519088;
4.川渝共建特色食品重庆市实验室, 重庆 400715;
5.四川师范大学生命科学学院, 四川成都 610101）

摘　要: 为探究不同来源的乳粉在婴儿胃肠道中的消化特性及其对肠道菌群的影响，本文以牛奶粉（cow milk powder，CM）、山羊奶粉（goat milk powder，GM）、绵羊奶粉（sheep milk powder，SM）和大豆粉（soybean powder，SB）为研究对象，通过体外模拟婴儿连续胃肠消化与体外发酵，分析其蛋白质水解程度、短链脂肪酸及肠道菌群结构的变化。结果表明，GM 与 CM 的体外蛋白质水解程度显著高于 SM 和 SB（P<0.05），且三种动物乳粉在体外发酵过程中使丁酸和戊酸的浓度分别提高 4~7 倍和 1~2 倍。肠道菌群分析显示，CM 和 SM 的菌群结构与纯母乳喂养婴儿较为接近，能显著提高厌氧球菌属（*Anaerococcus*）的丰度（P<0.05），促进丁酸的产生。SB 体外蛋白质消化率较低，显著提高乙酸浓度并破坏肠道菌群稳态，降低双歧杆菌属（*Bifidobacterium*）和梭状芽孢杆菌属（*Clostridium_sensu_stricto*_1）等有益菌的丰度。相关性分析进一步证实，乙酸的产生与 *Bifidobacterium* 丰度呈极显著负相关（P<0.01）。综上，山羊乳粉及绵羊乳粉更宜作为婴儿配方乳粉的原料，为婴幼儿配方基粉的科学选择提供了实验依据。

关键词: 乳粉, 大豆粉, 体外模拟胃肠消化, 蛋白质消化, 短链脂肪酸, 肠道菌群

中图分类号: TS201.4　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)12−0446−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060123　　本文网刊:

Comparison of *in Vitro* Digestibility Characteristics and Regulatory Effects on Infant Intestinal Flora between Different Milk Powders and Soybean Powder

LI Linzi[1], ZHOU Min[2], RONG Han[3], YE Fayin[1,4], ZHAO Guohua[1,4,5], LEI Lin[1,4,*]

（1.College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2.Department of Military Nutrition and Food Hygiene, Military Preventive Medicine, Army Medical University, Chongqing 400038, China;
3.School of Materials and Environment, Beijing Institute of Technology Zhuhai College, Zhuhai 519088, China;
4.Chongqing Key Laboratory of Speciality Food Co-built by Sichuan and Chongqing, Chongqing 400715, China;
5.College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China）

Abstract: To investigate the digestive characteristics of milk and soybean powders from different sources in the infant gas-

收稿日期: 2025−06−11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目（32472330）; 重庆市技术创新与应用发展项目-重点项目（CSTB2022TIAD-KPX0092）。

作者简介: 李淋滋（2002−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品化学与营养学, E-mail: lilinzi0920@126.com。

*** 通信作者:** 雷琳（1986−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品化学与营养学, E-mail: leilinsky@swu.edu.cn。

trointestinal tract and their effects on gut microbiota, this study compared cow milk powder (CM), goat milk powder (GM), sheep milk powder (SM), and soybean powder (SB). An *in vitro* continuous infant gastrointestinal digestion model combined with fecal fermentation was established to evaluate protein hydrolysis, short-chain fatty acid (SCFA) production, and gut microbial composition. Results showed GM and CM exhibited significantly higher *in vitro* protein hydrolysis rates than SM and SB (P<0.05). During *in vitro* fecal fermentation, the three animal milk powders increased butyric acid and valeric acid concentrations by 4~7 times and 1~2 times, respectively. Microbiota analysis revealed that CM and SM generated gut microbial profiles more similar to those of breastfed infants, significantly increasing the abundance of *Anaerococcus* (P<0.05), which was associated with butyrate production. In contrast, SB showed lower protein digestibility, significantly elevated acetic acid levels and disrupted microbial homeostasis. It was characterized by a marked reduction in the abundance of beneficial genera such as *Bifidobacterium* and *Clostridium_sensu_stricto*_1. Correlation analysis further confirmed a strong negative correlation between acetic acid concentration and *Bifidobacterium* abundance (P<0.01). In summary, goat-milk powder and sheep-milk powder were more suitable raw materials for infant formula, offering scientific evidence to inform the rational selection of base powders in infant formula development.

Key words: milk powder; soybean powder; *in vitro* simulated gastrointestinal digestion; protein digestion; short-chain fatty acids; gut microbiota

婴儿期是肠道功能与肠道微生态系统建立和发育的关键窗口期，此阶段合理的营养摄入不仅直接关系到婴儿的生长发育，也对其免疫系统的构建和肠道健康具有长远影响。母乳作为天然食物含有丰富的生物活性成分和免疫因子，被广泛认可为婴儿最适合的营养来源。然而，实际中由于母乳供应不足或母亲健康因素的限制，婴儿配方奶粉成为了临床实践中不可或缺的母乳替代营养来源。根据 GB/T 10765-2021《食品安全国家标准 婴儿配方食品》，婴儿配方奶粉主要以牛奶、山羊奶、绵羊奶和大豆为主要基料，通过补充维生素、矿物质、益生元等功能性成分实现其营养价值的优化。然而，不同基料来源的蛋白质类型及其组成特征可能显著影响婴儿对配方奶粉的消化吸收效率，并进一步调节肠道微生态结构与代谢功能。

研究表明，婴儿配方粉中蛋白质的组成与含量差异可直接影响其胃肠道内的消化速率与消化产物类型。Ye 等[1] 通过体外动态婴儿胃消化模型发现，以山羊奶为基础的配方奶粉由于酪蛋白与乳清蛋白比例不同，其蛋白质在胃部的水解速度显著快于牛奶基奶粉。此外，蛋白质在肠道中的消化产物不仅可作为婴儿营养的直接来源，还可通过改变肠道菌群的组成和功能，调节短链脂肪酸（Short-chain fatty acids, SCFAs）等肠道代谢产物的生成，影响婴儿肠道健康状态[2]。目前，基于不同基粉蛋白质消化特性对肠道微生态系统调控作用的研究尚不系统，亟待通过更全面的分析进一步揭示其机制。

本研究以纯牛奶粉（cow milk powder, CM）、纯山羊奶粉（goat milk powder, GM）、纯绵羊奶粉（sheep milk powder, SM）和纯大豆粉（soybean powder, SB）四种典型婴儿配方粉基料，通过体外模拟婴儿连续胃肠消化与体外发酵，探讨各配方基粉蛋白质的水解程度、SCFAs 生成特征及肠道菌群多样性变化。本研究旨在从蛋白质消化特性与肠道菌群调控两个角度，评价不同基料婴儿配方粉的营养生理效应，为婴儿配方粉的科学优化与精准开发提供理论基础与实践指导。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

CM（脂肪含量 29%，碳水化合物含量 35%，蛋白质含量 25%）　内蒙古欧世蒙牛乳制品有限公司；GM（脂肪含量 26%，碳水化合物含量 39%，蛋白质含量 26%）、SM（脂肪含量 32%，碳水化合物含量 28%，蛋白质含量 30%）　菲仕兰食品配料（北京）有限公司；SB（脂肪含量 23%，碳水化合物含量 25%，蛋白质含量 40%）　永和食品（中国）股份有限公司；尼罗红、固绿、胃蛋白酶（S10027，≥30000 U/g）　上海源叶生物科技有限公司；米根脂肪酶（80612，≥30 U/mg）、胰脂肪酶（L3126，≥125 U/mg）　美国 Sigma 公司；胰蛋白酶（T105532，≥250 U/mg）　上海阿拉丁生化科技股份有限公司；Bradford 蛋白浓度测定试剂盒（P0006）　上海碧云天生物技术股份有限公司；考马斯亮蓝快速染色液　安徽白鲨生物科技有限公司；其他试剂均为国产分析纯。

H1850R 高速台式冷冻离心机　湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；DHG-9240A 电热恒温鼓风干燥箱　上海齐欣科学仪器有限公司；TU-1950 双光束紫外分光光度计　北京普析通用仪器有限责任公司；LSM 800 激光共聚焦显微镜　德国卡尔蔡司公司；Scientz-10ND 真空冷冻干燥机　宁波新芝生物科技股份有限公司；ZWY-2102C 恒温振荡培养箱　上海智城分析仪器制造有限公司；GIPP-DCY-36Y 氮吹仪　上海继谱电子科技有限公司；GC-6890N 气相色谱仪　美国安捷伦公司；Phenom Pro10102 扫描电镜　复纳科学仪器（上海）有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　体外模拟婴儿胃肠消化

1.2.1.1　体外模拟胃消化　体外模拟胃消化参考 Ménard 等[3] 的方法并进行适当调整。将样品以

50 ℃ 蒸馏水充分溶解(15 g/100 mL),并于 37 ℃ 水浴中预热 10 min。取 5 mL 乳液于 50 mL 离心管中,加入 2.94 mL 模拟胃液(含 24.1 mg/mL 胃蛋白酶和 1.7 mg/mL 米根脂肪酶),涡旋混匀后,使用 1 mol/L HCl 溶液调整 pH 至 5.3。随后将混合物置于 37 ℃ 恒温摇床(50 r/min)消化 60 min,模拟婴儿胃部消化过程。在胃消化 0 min(不含酶)和 60 min 分别取样,记为 G0 和 G60,立即沸水浴灭酶 5 min 终止反应。消化液随后在 4 ℃ 以 4700×g 离心 20 min,上清液和粉渣分别收集后,置−20 ℃ 保存待测。

1.2.1.2 体外模拟连续胃肠消化 体外模拟连续胃肠消化参考 Ménard 等[3] 的方法并进行适当调整。称取 3 g 样品,按照 1.2.1.1 节所述方法进行体外模拟胃消化 60 min 后,用 NaOH 溶液(1 mol/L)将消化液 pH 调节至 7.0,再加入 4.87 mL 模拟肠液(含 1.9 mg/mL 胰脂肪酶、0.17 mg/mL 胰蛋白酶和 3.1 mmol/L 猪胆盐),涡旋混匀。随后用 NaOH 溶液(1 mol/L)将混合体系 pH 调节至 6.6,于 37 ℃ 恒温摇床中(50 r/min)消化 60 min,以模拟婴儿肠道消化过程。在肠消化进行 60 min 后取样,记为 G60+I60,迅速置于沸水浴中灭酶 5 min 终止反应。随后将消化液在 4 ℃ 条件下以 4700×g 离心 20 min,分别收集上清液和粉渣,于−20 ℃ 保存,待后续检测。

1.2.1.3 游离氨基酸含量测定 采用邻苯二甲醛法(OPA)测定连续胃肠消化过程中不同时间点(G0、G60 和 G60+I60)样品中上清液游离氨基酸含量[4]。取消化上清液样品 20 μL,与 OPA 试剂 200 μL 充分混合反应后,利用紫外分光光度计在 340 nm 波长处测定其吸光度值。以甘氨酸为标准物质绘制标准曲线,所得标准曲线为 y=0.2478x-0.0018,(R^2=0.9997)。根据标准曲线算出不同消化阶段样品上清液的游离氨基酸含量,并按以下公式计算不同消化阶段样品上清液的游离氨基酸总量及释放率:

$$游离氨基酸总量(mmol) = C \times V \quad 式(1)$$

$$游离氨基酸释放率(\%) = \frac{M_1 - M_0}{M_0} \times 100 \quad 式(2)$$

式中:C 为不同消化阶段样品上清液的游离氨基酸含量,mmol/mL;V 为不同消化阶段样品上清液的体积(G0 和 G60 阶段为 7.94 mL,G60+I60 阶段为 12.81 mL),mL;M_1 为 G60 或 G60+I60 阶段样品上清液中游离氨基酸的总量,mmol;M_0 为 G0 阶段样品上清液中游离氨基酸的总量,mmol。

1.2.1.4 蛋白质组分分析 参考 Ren 等[5] 的方法,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析消化后样品上清液和粉渣中的主要蛋白质组成。对消化后的上清液,首先采用 Bradford 法蛋白质测定试剂盒测定各样品的蛋白质浓度,然后将胃消化阶段上清液稀释至与肠消化阶段上清液相同的蛋白浓度。取稀释后的上清液样品 2 μL,加入 NuPAGE LDS 样品缓冲液 5 μL、NuPAGE 样品还原剂2 μL 及去离子水 13 μL 混合均匀,于 70 ℃ 加热处理10 min,取 10 μL 处理后的样品进行电泳。将消化后的粉渣冷冻干燥 48 h,称 0.3 mg 样品加入 25 μL NuPAGE LDS 样品缓冲液、10 μL NuPAGE 样品还原剂和 65 μL 去离子水,室温下以 2000 r/min 离心1 min,于 70 ℃ 加热 10 min,取 10 μL 上清液进行电泳分析。

电泳分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 5%,电泳条件设置为 120 V 恒压,电泳时间 90 min。电泳结束后,将凝胶置于考马斯亮蓝快速染色液中染色 30 min,随后用蒸馏水充分脱色,最后利用凝胶成像分析系统进行拍照并记录结果。

1.2.1.5 粉渣的微观结构 参照 Grasso 等[6] 的方法并进行适当调整,采用激光共聚焦显微镜(CLSM)观察样品的微观结构,尼罗红用于标记脂质,固绿用于标记蛋白质。CLSM 观察前,将 10 mL 尼罗红溶液(质量浓度为 0.01%,溶解于异丙醇中)和 30 mL 固绿溶液(质量浓度为 0.01%,溶解于蒸馏水中)混合均匀。将 50 μL 混合染液滴加于预先置有样品的载玻片上,于室温条件下静置染色 15 min。染色完成后,使用蒸馏水洗涤 3 次,去除多余染料。尼罗红和固绿分别在 488 nm 和 633 nm 波长下进行激发并成像。采用 20×物镜对样品进行观察,并利用 Imaris Viewer 图像分析软件(9.5.1, Bitplane AG 公司)对获取的图像进行结构分析。

1.2.2 体外发酵 实验所用婴儿粪便样本来源于 4 名健康婴儿(年龄 1~6 个月,2 名男婴、2 名女婴),均为顺产且纯母乳喂养。所有受试婴儿在采样前至少 1 个月内无胃肠道疾病史,且未摄入抗生素、益生元或益生菌。粪便样本均征得婴儿法定监护人同意后采集,并在实验前签署书面知情同意书,实验内容遵守相关法律法规及伦理准则(伦理审核批准号 HF20240501)。新鲜粪便样本在排出后立即从尿布中采集,尽快转移至实验室−80 ℃ 冰箱中冷冻保存。实验前将粪便样本在室温下解冻后,按 3∶10(W/V)比例加入无菌磷酸盐缓冲液(0.1 mol/mL,pH7.4),充分混匀后通过四层灭菌纱布过滤,收集滤液供体外发酵实验使用。基础培养基配制参考 Yao 等[7] 的方法进行。将连续体外胃肠消化后的粉渣冻干 48 h,取 0.1 g 粉渣,加入至 50 mL 灭菌离心管中,再依次加入9 mL 基础生长培养基和 1 mL 粪浆滤液,涡旋混匀 15 s 后通氮气 30 s 进行厌氧处理,密封后置于 37 ℃、125 r/min 恒温摇床中进行厌氧发酵培养。分别在 0、6、12 和 24 h 取样,立即于 4 ℃ 条件下以12000 r/min 离心 5 min,收集上清液用于 pH 和短链脂肪酸(SCFAs)测定。取体外发酵 24 h 的沉淀物(含肠道菌群)迅速保存于−80 ℃ 冷冻箱中,用于后续 16S rDNA 测序分析。

1.2.3 SCFAs 测定 参考 Zhao 等[8] 的方法并稍作

改进，对发酵上清液 SCFAs 进行测定，色谱柱为 CP-FFAP-CB，检测器和进样口温度均设置为 240 ℃，氮气、氢气、空气的流量分别为 20、30、300 mL/min，进样量为 5 μL，混标定性，以内标法（2-乙基丁酸）定量。升温程序如表 1 所示。

表 1　短链脂肪酸测定的气相升温程序

Table 1　Gas chromatography temperature program for short-chain fatty acid determination

升温速度（℃/min）	保留时间（min）	温度（℃）
–	1	50
15	–	150
5	–	170
15	–	240
–	11.67	240

注：“–”表示无数据。

1.2.4　微生物多样性分析　使用 E.Z.N.A.TMMag-Bind soil DNA 试剂盒从 1.2.2 节中发酵 24 h 获得的肠道菌群沉淀中提取 DNA。采用引物 338F（5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3′）和 806R（5′-GGACTACHVGGGT-WTCTAAT-3′）扩增 16S rRNA 基因 V3~V4 区域的高变异区。PCR 扩增条件：95 ℃ 预变性 3 min，95 ℃ 变性 30 s，55 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸 30 s，27 个循环，然后 72 ℃ 稳定延伸 10 min，最后在 4 ℃ 进行保存。PCR 反应体系：模板 DNA 10 ng，5×TransStart FastPfu 缓冲液 4 μL，2.5mM dNTPs 2 μL，上、下游引物各 0.8 μL，TransStart FastPfu DNA 聚合酶 0.4 μL，后补足至 20 μL。所有扩增产物均由上海美吉生物医药科技有限公司分析，并在其生物信息平台上进行 Illumina Miseq PE300 测序数据的处理与分析。对肠道菌群的结构和相对丰度进行定量分析，并使用 QIIME 2 中的 Naive Bayes 分类器对获得的 ASVs 进行物种分类学分析。此外，利用 Mothur（版本 1.30.2）软件计算样品的 α-多样性指数，包括 Shannon、Simpson、Ace、Chao1 和 Sobs 指数。β-多样性基于 Binary-Euclidean 距离进行主坐标分析。通过线性判别分析效应大小（LEfSe，LDA≥3.0），在 5 组肠道菌群中筛选出 27 个差异显著的物种。

1.3　数据处理

除肠道细菌分析外，其余数据均表示为“平均值±标准差”（n=3），且实验结果均使用 Origin 8.0 和 SPSS 27.0 软件，进行数据处理和分析。采用单因素方差分析和 Duncan's multiple-range 检验对不同组间的 α-多样性指数、SCFAs 进行显著性差异统计。利用 Spearman 的相关性分析 27 个关键的 ASV 与各种代谢参数之间的相关性。P<0.05 认为差异显著，P<0.01 认为差异极显著。

2　结果与分析

2.1　体外模拟婴儿胃肠消化过程中蛋白质水解程度的分析

蛋白质在体外连续胃肠消化过程中的水解程度可通过游离氨基酸含量变化进行评估[9]。由表 2 所示，体外胃消化 60 min 后（G60），GM 和 CM 的游离氨基酸释放率显著高于 SM 和 SB（P<0.05），表明 GM 和 CM 的蛋白质在婴儿胃阶段具有较高的消化效率。体外连续胃肠消化 120 min 后（G60+I60），CM 和 GM 的游离氨基酸释放率无显著差异，但均显著高于 SM 和 SB（P<0.05），其中 SM 又显著高于 SB（P<0.05），这可能与样品在胃部低 pH 环境中的凝乳行为密切相关[10]。酪蛋白在酸性条件下易形成较坚硬、稠密的凝块，不利于胃蛋白酶的深入作用，而乳清蛋白在消化过程中形成的凝乳结构较为松软，具有更高的消化可及性[10]。相较于 CM 和 GM，SM 中酪蛋白和乳清蛋白含量最高，可能在一定程度上降低其蛋白质的消化速率[11]。大豆粉游离氨基酸释放量最低，其消化效率受限的原因可能有两方面：一是大豆蛋白与动物乳蛋白在结构上存在显著差异，其二级结构中含有更多疏水结构，易发生聚集，降低了蛋白酶的识别与切割效率；二是大豆中天然存在的抗营养因子（如胰蛋白酶抑制剂等）可能会抑制相关消化酶的活性，从而降低蛋白质的消化程度[12−13]。

2.2　体外模拟婴儿胃肠消化过程中蛋白质组分分析

图 1 展示了各样品经过体外模拟婴儿胃肠消化不同阶段后，消化上清液和粉渣的蛋白质组分差异。未经消化处理的上清液（A~D）和粉渣（E~H），蛋白质组成存在明显差异。CM 中酪蛋白主要以 α_s-酪蛋白（α_s-CN）和 β-酪蛋白（β-CN）为主；GM 中 β-CN 比例更高；SM 中同时富含 α_s-CN 与 β-CN。大豆粉中蛋白质主要包括 β-伴大豆球蛋白的三个亚基：α（76 kDa）、α'（72 kDa）、β（53 kDa）以及酸性多肽链（31~45 kDa）和碱性多肽链（18~20 kDa）。60 min 体

表 2　体外连续胃肠消化过程中的游离氨基酸总量及释放率

Table 2　Changes of the total amount and release rate of free amino acids during continuous *in vitro* digestion

样品	G0游离氨基酸总量（mmol）	G60游离氨基酸总量（mmol）	体外胃消化游离氨基酸释放率（%）	G60+I60游离氨基酸总量（mmol）	体外连续胃肠消化游离氨基酸释放率（%）
CM	109.68±2.85^{b}	214.63±7.04^{b}	95.66±2.19^{a}	313.94±17.84^{a}	186.08±9.05^{a}
GM	99.48±5.07^{c}	205.88±4.96^{b}	107.14±6.10^{a}	306.39±9.56^{a}	208.33±13.34^{a}
SM	145.39±7.39^{a}	259.59±7.41^{a}	78.79±8.67^{b}	336.80±20.30^{a}	131.58±2.74^{b}
SB	93.49±4.64^{c}	158.94±7.70^{c}	70.27±11.02^{b}	197.43±12.90^{b}	111.07±3.48^{c}

注：不同小写上标字母表示不同样品具有显著性差异（P<0.05）。

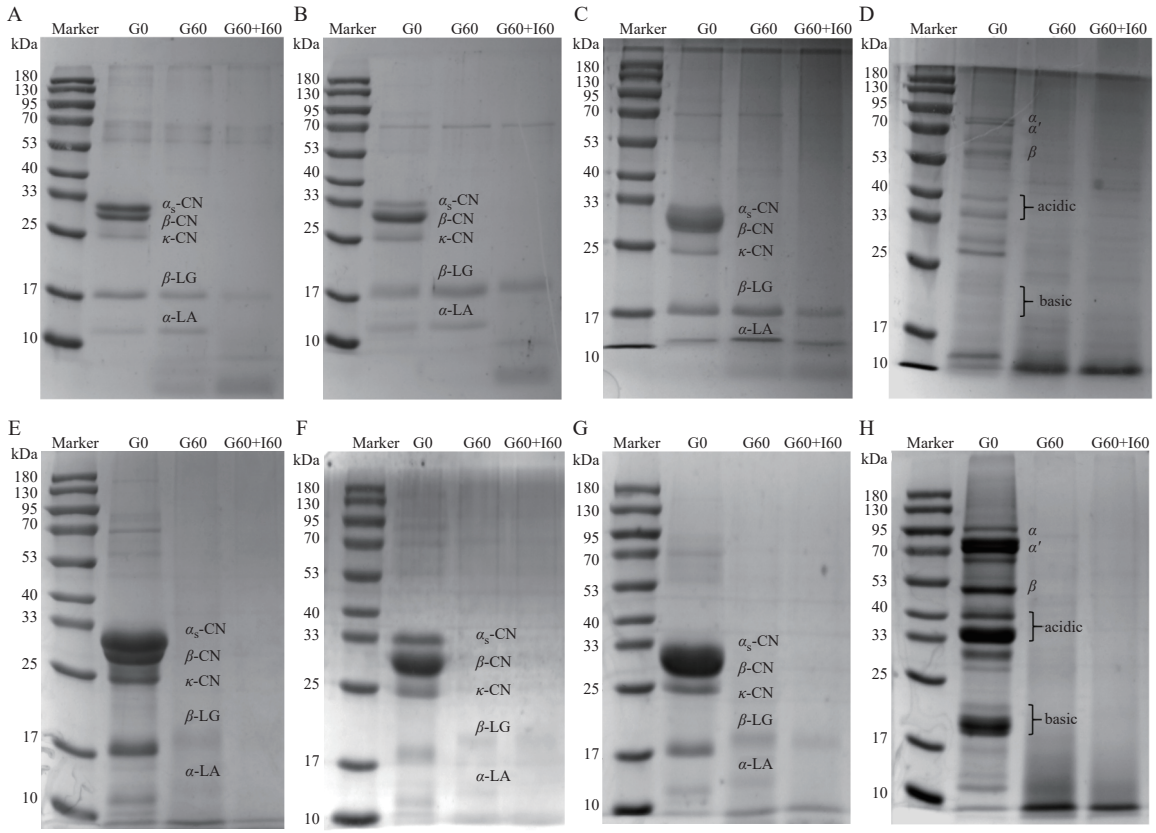


图 1 体外消化产物的 SDS-PAGE

Fig.1 SDS-PAGE of the *in vitro* digested products

注: A: CM 上清液; B: GM 上清液; C: SM 上清液; D: SB 上清液; E: CM 粉渣; F: GM 粉渣; G: SM 粉渣; H: SB 粉渣; α_s-CN: α_s-酪蛋白; β-CN: β-酪蛋白; κ-CN: κ-酪蛋白; β-LG: β-乳球蛋白; α-LA: α-乳白蛋白; α: α 亚基; α': α'亚基; β: β 亚基; acidic: 酸性多肽链; basic: 碱性多肽链。

外胃消化后(G60), 酪蛋白(包括 α_s-CN、β-CN 和 κ-CN)基本被完全水解, 条带几乎消失, 这是因为酪蛋白对胃蛋白酶高度敏感, 在胃消化阶段被迅速降解[14]。相反, α-乳清蛋白(α-LA)与 β-乳球蛋白(β-LG)条带仍较为清晰, 表明球状构象的乳清蛋白对胃蛋白酶具有较强抵抗力[15]。经体外模拟连续胃肠消化后(G60+I60), CM、GM 和 SM 中乳清蛋白的条带强度进一步减弱, 表明其在肠道阶段持续被水解。图 1D 和图 1H 显示, SB 主要组分——β-伴大豆球蛋白及其酸性/碱性亚基在胃肠消化过程中条带强度逐渐减弱[16]。

2.3 粉渣的微观结构

图 2 展示了各样品在体外模拟胃肠消化各阶段所得粉渣的微观结构变化。图像中绿色代表脂质, 红色代表蛋白质[6]。在体外胃消化前(G0), 样品中蛋白质与脂质含量均较高, 二者以较大颗粒形式分布。经过 60 min 胃蛋白酶作用后(G60), CM 与 GM 中的红色荧光信号明显减弱, 表明大部分蛋白质已被消化。相比之下, SM 与 SB 中仍可观察到大量蛋白质残留。在脂质方面, CM、GM、SM 与 SB 中脂肪含量均减少。经过体外连续胃肠消化后(G60+I60), 除大豆粉外, 其余三种样品中的蛋白质荧光信号几乎完全消失, 说明蛋白质已基本被完全消化。大豆粉中仍可见部分蛋白质残留, 进一步证实大豆蛋白在婴儿体外模拟消化体系中水解程度最低, 消化效率最差。上述结果与 2.1 节中游离氨基酸释放率所反映的蛋白质消化趋势一致。

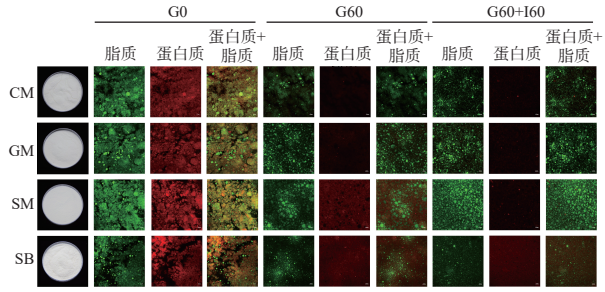


图 2 体外消化粉渣的微观结构

Fig.2 Microstructure of the *in vitro* digested residue

注: 绿色代表脂质, 红色代表蛋白质。

2.4 体外发酵过程中 pH 和 SCFAs 的变化

由图 3A 和图 3B 可知, SB 在发酵 24 h 后产生了大量的乙酸, 导致发酵体系 pH 最低。研究证明, SB 富含的低聚糖如棉籽糖、水苏糖和蔗糖可进入大肠, 被肠道菌群快速发酵, 主要产生乙酸[17−18]。肠道中过量乙酸会增强致病性大肠杆菌的黏附性与运动性, 提高其致病力, 同时刺激产生免疫球蛋白 A, 改变其对肠道菌群的识别与调控, 可能干扰肠道菌群的组

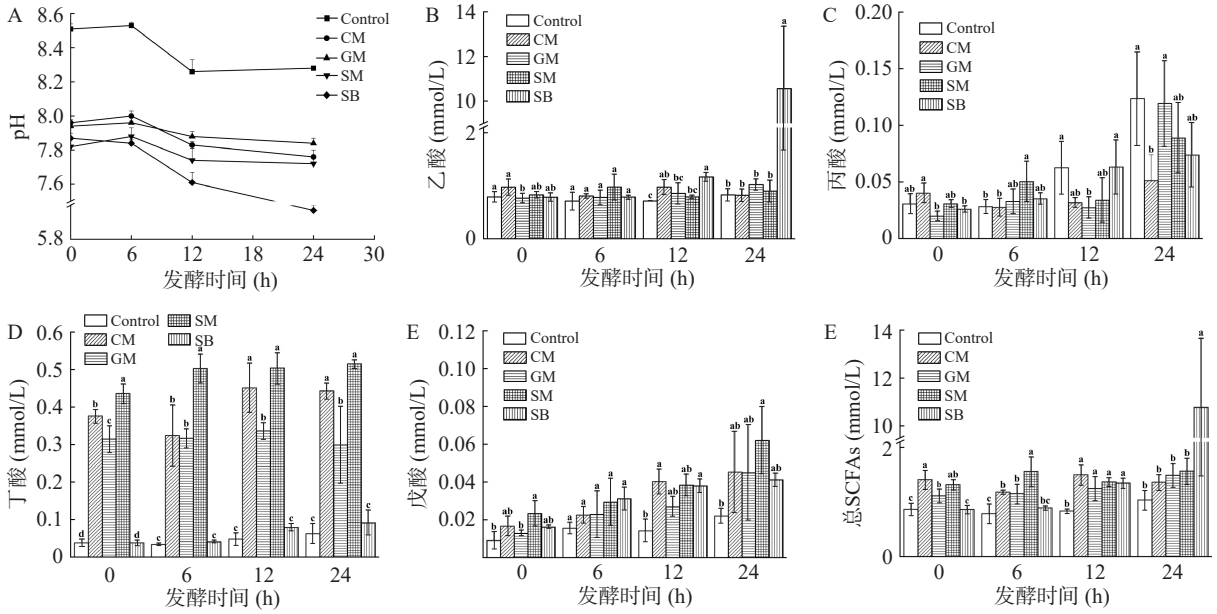


图 3　体外发酵上清液的 pH 及 SCFAs 的变化

Fig.3　Changes in pH and SCFAs of fecal supernatant at different fermentation times

注: 不同小写上标字母表示不同样品具有显著性差异(P<0.05)。

成与平衡[19−20]。由图 3C 和图 3E 可知，在发酵 24 h 后，各组样品均可显著促进丙酸及戊酸生成(P<0.05)，从而导致 pH 整体呈下降趋势，提示其对肠道益生菌代谢活性具有促进作用。丙酸具有抗结肠炎生理活性，而戊酸具有抗癌、抗糖尿病、抗高血压、抗炎和免疫调节等功能[21−22]。由图 3D 可知，从发酵 0 h 到发酵 24 h，各组样品的丁酸含量增长幅度较小，且 CM、GM 和 SM 的丁酸含量均显著高于 SB(P<0.05)。由图 3C 和图 3E 可知，GM 和 SM 在体外发酵过程中更有利于促进丙酸和戊酸的生成，对维护肠道健康具有潜在积极作用。

2.5　不同基粉对肠道菌群的影响

2.5.1　微生物多样性分析　肠道菌群高通量测序分析得到 1620236 条优化序列，使用 QIIME 2 中的 Naive bayes 分类器进行物种分类学分析，得到 228 个 ASVs。由图 4A 和图 4B 可知，本研究的 α-稀释曲线趋于平缓，说明测序数据量和测序深度已足够覆盖样品中的主要微生物群落，确保了数据分析的准确性和代表性。由图 4C~图 4G 可知，与 Control 相比，SB 显著增加了 Simpson 指数(P<0.05)，降低了 Shannon、Ace、Chao1 和 Sobs 指数(P<0.05)，表明其肠道菌群的多样性低于母乳喂养的婴儿，丰度减少。相较而言，CM、GM 和 SM 的 Shannon、Simpson、Ace、Chao1 和 Sobs 指数与 Control 相似，表明动物乳粉对肠道菌群的多样性和丰富度影响较小，与母乳喂养组保持相似水平。β-多样性分析中，PCoA 主坐标分析结果如图 4H 所示，Control 与 SB 的群落结构存在明显分离，群落组成差异明显，而与动物乳粉组，特别是 GM 组和 SM 组之间的菌群结构表现出明显重叠，说明后两者在调节婴儿肠道菌群方面更接近于母乳。

2.5.2　肠道菌群物种组成分析　如图 5A 所示，Control、CM、GM 和 SM 肠道菌群在属水平上主要包括双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)和梭状芽孢杆菌属(*Clostridium_sensu_stricto*_1)。与 Control 相比，SB 显著增加了未分类肠杆菌科(unclassified_f_Enterobacteriaceae)和肠杆菌属(*Enterobacter*)的相对丰度图(P<0.05)。这可能是大豆蛋白在胃肠道中消化不完全，进入大肠后被肠道菌群进一步发酵，导致菌群结构失调[23]。值得注意的是，unclassified_f_Enterobacteriaceae 和 *Enterobacter* 已被认为是克罗恩病及肥胖等疾病的潜在生物标志物[24]。由图 5B~图 5D 可知，与 Control 相比，SB 显著降低了 *Bifidobacterium*、*Clostridium_sensu_stricto*_1 和厌氧球菌属(*Anaerococcus*)相对丰度(P<0.05)。*Bifidobacterium* 为婴儿肠道中最具代表性的有益菌属，能增强肠道免疫力、抑制有害菌生长、保护肠道上皮屏障、降低炎症水平[25]。*Clostridium_sensu_stricto*_1 能发酵膳食纤维产生丁酸，并参与 L-谷氨酸的降解，对维持宿主能量代谢与肠道稳态具有积极作用，这与图 3D 中 SB 发酵 24 h 后丁酸产量较低的结果一致[26−27]。相反，由图 5D 得，CM、GM 和 SM 使 *Anaerococcus* 的相对丰度增加了 20%~75%。该菌具备产丁酸能力，与动物乳粉发酵 24 h 后丁酸产量提升 4~7 倍的结果一致[28]。综上所述，动物乳粉(特别是 CM 和 SM)在调节肠道菌群结构、促进有益菌生长及丁酸生成方面更接近母乳，具备潜在益生作用，而大豆蛋白可能因消化率较低、代谢产物变化等因素，不利于维持婴儿肠道菌群稳定。

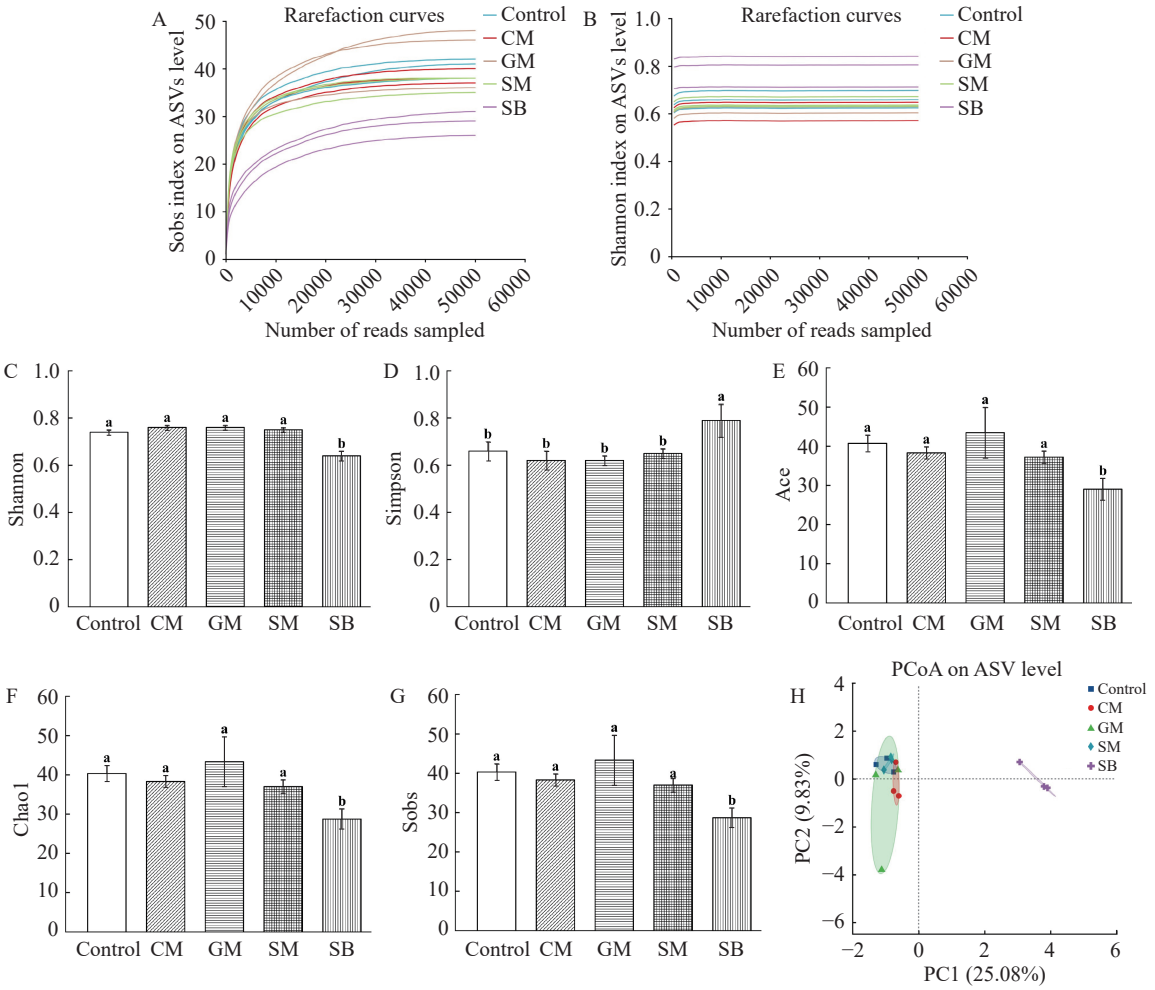


图 4　体外发酵 24 h 肠道菌群的稀释曲线、*α*-多样性和 *β*-多样性分析

Fig.4　Rarefaction curves, alpha diversity, and beta diversity analyses of the gut microbiota after 24 h of *in vitro* fermentation

注: 不同小写上标字母表示不同样品具有显著性差异(P<0.05)。

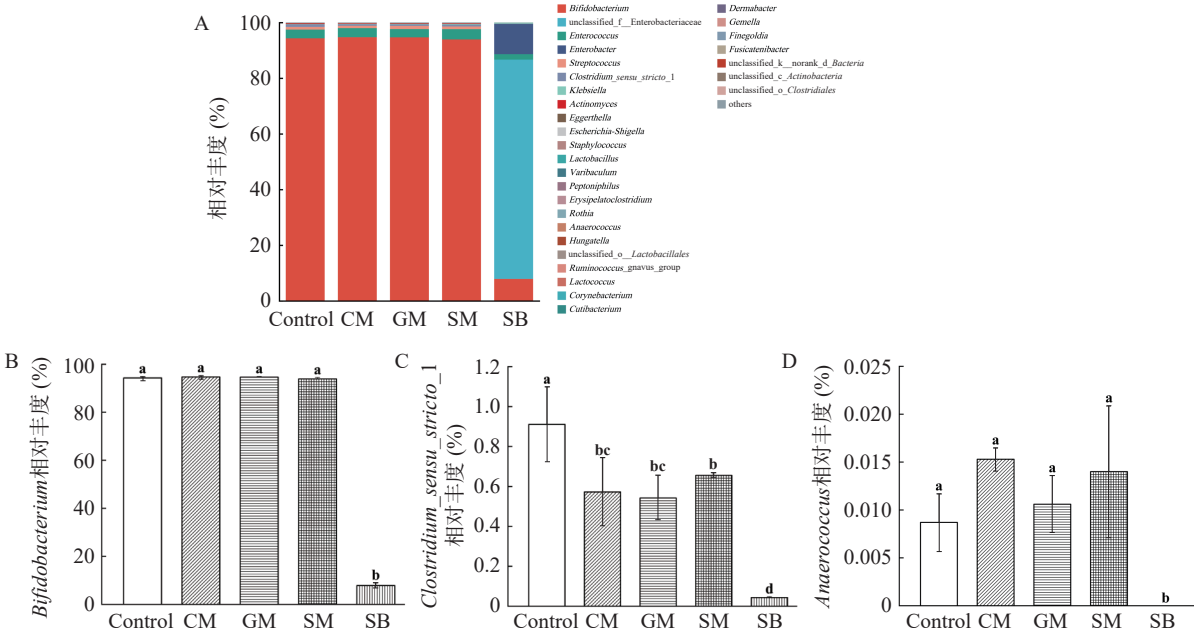


图 5　体外发酵 24 h 肠道菌群的变化

Fig.5　Changes at the level of genus for 24 h of *in vitro* fermentation

注: 不同小写上标字母表示不同样品具有显著性差异(P<0.05)。

2.5.3　肠道优势菌组成与生化指标的相关性分析

进一步探究肠道菌群在属水平上与 SCFAs 的相关性。如图 6 所示，*Bifidobacterium* 的相对丰度与乙酸和总 SCFAs 浓度呈极显著负相关(P<0.01)；*Anaero-*



图 6　体外发酵 24 h 微生物组成与 SCFAs 的相关性分析

Fig.6　Correlation analysis of microbial composition and SCFAs in 24h *in vitro* fermentation

注：*表示 $P<0.05$；**表示 $P<0.01$。

coccus 的相对丰度与丁酸浓度呈呈极显著正相关（$P<0.01$）。结合图 5 和图 3B 的结果表明，CM、GM 和 SM 在调节母乳喂养婴儿的肠道菌群结构方面影响较小，菌群构成与 Control 相似，有助于维持肠道菌群稳态。相比之下，SB 显著扰乱肠道菌群结构，抑制 *Bifidobacterium* 等有益菌生长，并过度促进乙酸产生，可能对婴儿肠道健康造成不利影响。

3　结论

本研究通过体外模拟婴儿胃肠消化与体外发酵模型，系统比较了 CM、GM、SM 与 SB 在蛋白质消化特性、SCFAs 代谢产物及肠道菌群结构方面的差异。结果表明，动物乳粉尤其是 GM 和 SM 在胃肠道中具有较高的蛋白质水解效率，能有效促进丁酸和戊酸等有益 SCFAs 的生成，并维持与母乳喂养婴儿相似的肠道菌群结构，具备良好的消化性能与潜在益生调节作用。相反，SB 的蛋白质消化效率最低，易导致肠道中乙酸过量累积，显著扰乱肠道菌群组成，抑制 *Bifidobacterium* 等有益菌的生长，可能对婴儿肠道微生态平衡产生不利影响。相关性分析进一步揭示了 *Bifidobacterium* 的相对丰度与乙酸和总 SCFAs 呈极显著负相关（$P<0.01$），而 *Anaerococcus* 的相对丰度与丁酸呈极显著正相关（$P<0.01$），强调了关键菌属在 SCFAs 代谢调控中的重要作用。综上所述，GM 和 SM 在婴儿肠道消化适应性和微生态稳态方面表现出优良特性，为婴幼儿乳源蛋白配方的优化与开发提供了重要的理论依据与实验参考。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] YE A, CUI J, CARPENTER E, et al. Dynamic *in vitro* gastric digestion of infant formulae made with goat milk and cow milk: Influence of protein composition[J]. International Dairy Journal, 2019, 97: 76−85.

[2] DIETHER N E, WILLING B P. Microbial fermentation of dietary protein: An important factor in diet(-)microbe(-)host interaction[J]. Microorganisms, 2019, 7(1): 19.

[3] MENARD 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.

[4] NIELSEN P M, PETERSEN D, DAMBMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. Journal of Food Science, 2001, 66(5): 642−646.

[5] REN Q, BOIANI M, 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.

[6] GRASSO N, ROOS Y H, CROWLEY S V, et al. Composition and physicochemical properties of commercial plant-based block-style products as alternatives to cheese[J]. Future Foods, 2021, 4: 100048.

[7] YAO D, WU M, DONG Y, et al. *In vitro* fermentation of fructooligosaccharide and galactooligosaccharide and their effects on gut microbiota and SCFAs in infants[J]. Journal of Functional Foods, 2022, 99: 105329.

[8] ZHAO G, NYMAN M, JONSSON J A. Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography[J]. Biomed Chromatogr, 2006, 20(8): 674−682.

[9] MULET-CABERO A, RIGBY N M, BRODKORB A, et al. Dairy food structures influence the rates of nutrient digestion through different *in vitro* gastric behaviour[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 67: 63−73.

[10] CLAEYS W L, VERRAES C, CARDOEN S, et al. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits[J]. Food Control, 2014, 42: 188−201.

[11] 何湘丽，陈立韬，刘洋，等. 绵羊乳营养组成及消化特性研究

进展[J]. 中国乳业, 2024(10): 110−116,122. [HE X L, CHEN L T, LI Y, et al. Research progress on nutritional composition and digestive characteristics of sheep milk[J]. China Dairy, 2024(10): 110−116,122.]

[12] NGUYEN T, BHANDARI B, CICHERO J, et al. Gastrointestinal digestion of dairy and soy proteins in infant formulas: An *in vitro* study[J]. Food Research International, 2015, 76(Pt 3): 348-358.

[13] CARBONARO M, MASELLI P, NUCARA A. Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: A fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study[J]. Amino Acids, 2012, 43(2): 911−921.

[14] JIANG H, XU Y, CHEN G, et al. Digestive properties and peptide profiles exhibited significant differences between skim camel milk and bovine milk powder after static *in vitro* simulated infant gastrointestinal digestion[J]. Food Research International, 2024, 178: 113860.

[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. [ZHANG S S, HU J L, PENG X Y, et al. *In vitro* digestion of infant formula containing partially hydrolyzed protein[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(4): 86−95.]

[16] 杨秀芝. 低致敏豆基婴儿配方粉的制备及工厂设计[D]. 南昌: 南昌大学, 2019. [YANG X Z. Preparation and factory design of low-allergen soy-based infant formula powder[D]. Nanchang: Nanchang University, 2019.]

[17] CUMMINGS J H, MACFARLANE G T. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon[J]. Journal of Applied Bacteriology, 1991, 70(6): 443−459.

[18] WANG Y, LI C, SHAN Z, et al. *In vitro* fermentability of soybean oligosaccharides from wastewater of Tofu production[J]. Polymers (Basel), 2022, 14(9): 1704.

[19] TAKEUCHI T, MIYAUCHI E, KANAYA T, et al. Acetate differentially regulates IgA reactivity to commensal bacteria[J]. Nature, 2021, 595(7868): 560−564.

[20] YANG F, YANG L, CHANG Z, et al. Regulation of virulence and motility by acetate in enteropathogenic *Escherichia coli* [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2018, 308(7): 840−847.

[21] KUMARI B, KUMARI U, SINGH D K, et al. Molecular targets of valeric acid: A bioactive natural product for endocrine, metabolic, and immunological disorders[J]. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets, 2024, 24(13): 1506-1517.

[22] AL-LAHHAM S H, PEPPELENBOSCH M P, ROELOFSEN H, et al. Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1801(11): 1175−1183.

[23] GILBERT M S, IJSSENNAGGER N, KIES A K, et al. Protein fermentation in the gut; implications for intestinal dysfunction in humans, pigs, and poultry[J]. American journal of physiology-gastrointestinal and liver physiology, 2018, 315(2): 159−170.

[24] HUANG H, KRISHNAN H B, PHAM Q, et al. Soy and gut microbiota: Interaction and implication for human health[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(46): 8695−8709.

[25] YAO S, ZHAO Z, WANG W, et al. *Bifidobacterium Longum*: Protection against inflammatory bowel disease[J]. Journal of Immunology Research, 2021, 2021: 8030297.

[26] LÜ N, CAI G, PAN X, et al. pH and hydraulic reention time regulation for anaerobic fermentation: Focus on volatile fatty acids production/distribution, microbial community succession and interactive correlation[J]. Bioresource Technology, 2022, 347: 126310.

[27] WEI X, YU L, ZHANG C, et al. Prebiotic activity of chitooligosaccharides and their ability to alleviate necrotizing enterocolitis in newborn rats[J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 299: 120156.

[28] IMAI K, YAMADA K, TAMURA M, et al. Reactivation of latent HIV-1 by a wide variety of butyric acid-producing bacteria [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2012, 69(15): 2583−2592.