

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2014.S0.036

乳清蛋白中性蛋白酶解物对 Caco-2 细胞铁吸收的影响*

高茜 刘云竹 梁建芬

(中国农业大学食品科学与营养工程学院,北京 100083)

摘要:采用体外消化与 Caco-2 细胞模型相结合的方法,研究了乳清蛋白浓缩物(WPC)中性酶解产物经超滤后获得的各组分对强化铁生物利用率的影响;采用 Sephadex G-25 凝胶层析法对 WPC 的中性酶解产物的消化产物进行分离,并用 Caco-2 细胞模型评价了分离后各组分对铁吸收的影响。结果表明,WPC 中性酶解产物的各组分中,低分子量的组分(分子量小于 10 kDa)可以有效提高铁的生物利用率。组分 3kR(分子量在 3~10 kDa 之间)和 3kF(分子量小于 3 kDa)与铁一起摄入时,铁的生物利用率分别达到 23.32%、24.23%,显著高于 WPC(2.58%)。铁的吸收率和生物利用率显著相关,而渗透率与生物利用率之间没有显著相关性;WPC 中性酶解产物消化产物的各组分中,分子量小于 1 kDa 的组分将铁的吸收率提高到 90.47%,显著高于空白(25.13%)。而分子量为 1~5 kDa 的一个组分会抑制铁的吸收。

关键词:铁 乳清蛋白 酶解产物 组分分离 吸收 生物利用率

中图分类号: TS201.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2014)S0-0225-05

引言

铁是人体中含量最多的微量营养素,在人体中发挥着重要的生理功能。铁缺乏又是全球,特别是发展中国家最主要的营养问题之一。研究表明,日常摄入不足和低生物利用率是造成铁缺乏的主要原因。影响铁生物利用率的因素主要包括促进因子,如维生素 C、酪蛋白磷酸肽、柠檬酸等,以及抑制因子,如植酸、纤维素、单宁等物质^[1-5]。如何改善人类的铁营养状况是目前全球面临的重要问题。

乳清是乳酪生产过程中的副产物,乳清蛋白约占牛乳蛋白质的 20%^[6]。乳清蛋白浓缩物(WPC)的主要成分有 α -乳白蛋白(α -La)、 β -乳球蛋白(β -Lg)、乳铁蛋白(Lf)、免疫球蛋白(IgG)、牛血清白蛋白(BSA)^[7],乳清蛋白的营养价值很高,是营养最全面的天然蛋白质之一,并且是一种功能性食品配料。研究表明,乳清蛋白酶解产物中的某些肽类会对铁的生物利用率产生影响。Ou 等研究了 WPC 的木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶酶解产物对于铁的生物利用率的影响,结果表明,WPC 的木瓜蛋白酶、中性蛋白酶酶解产物能够促进 Caco-2 细胞对铁的吸收,而碱性蛋白酶无明显影响^[8]。有研究发现一种从乳清的胃蛋白酶酶解物中得到的多

肽——乳铁蛋白肽,具有铁结合能力,有利于铁的吸收^[9-11]。Kim 等用 9 种不同的蛋白酶酶解处理乳清浓缩蛋白,研究了其酶解产物的铁结合能力,并对碱性蛋白酶酶解产物的多肽和氨基酸进行分析,进一步分离出了其中具有铁结合能力的多肽^[12]。Remondetto 等研究了乳清蛋白凝胶的微观结构和纤维颗粒对铁离子吸收转运的影响,结果表明纤维状凝胶可促进铁的吸收^[13]。

传统铁营养强化剂的生物利用率低下,对食品基质的风味、色泽等感官性状会产生不利影响,且对胃肠道有一定的刺激性,限制了铁强化剂的应用。同时,人类在膳食过程中本身会摄入很多铁,但可能在进入人体消化吸收系统后不能被小肠有效的吸收利用,因此,若有一种促进剂来促进人体内铁的吸收,将成为解决铁营养缺乏问题的有效手段。本文对乳清蛋白酶解产物及其消化产物中不同组分对铁吸收的影响进行研究,旨在找到对铁的生物利用率有显著促进作用的组分,从而为开发铁营养强化剂提供新的思路和理论基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

乳清蛋白粉(蛋白质质量分数 80.15%),北京银

收稿日期:2014-07-26 修回日期:2014-08-19

* 国家奶牛产业技术体系资助项目(CARS-37)

作者简介:高茜,硕士生,主要从事食品矿物质营养研究,E-mail: gaoqian1991@gmail.com

通讯作者:梁建芬,副教授,博士生导师,主要从事食品营养学和食品加工研究,E-mail: liangjf@cau.edu.cn

河路经贸有限公司;中性蛋白酶,诺维信公司;氢氧化钠(分析纯),七水硫酸亚铁(分析纯),北京化工厂;胃蛋白酶,脂肪酶,胰蛋白酶,胆盐,美国 sigma 公司;Caco-2 细胞,美国 ATCC 公司;DMEM 高糖干粉培养基,胎牛血清,Invitrogen 生命技术有限公司;非必需氨基酸,协和基础医学细胞中心;青链霉素混合液,Hank's 平衡盐溶液,Solarbio 科技有限公司;Sephadex G-25,蓝色葡聚糖-2000,法玛西亚公司;细胞培养板(12孔),Transwell(PC),美国 Corning 公司。

1.2 仪器与设备

中空纤维超滤膜(60、20、10 和 3 kDa),中国科学院生态环境研究中心;超滤杯(Stirred Cell 8050 型),美国 Millipore 公司;细胞电阻仪(MERS 00001 型),美国 Millipore 公司;倒置生物显微镜(AE31 型),Motic 医疗诊断系统有限公司;微波消化炉(MARS 5 型),美国 CEM 公司;电感耦合等离子发射仪(Optima 2000 DV 型),美国 Perkin Elmer 有限公司。

1.3 实验设计

对强化铁吸收的影响:将乳清蛋白酶解产物通过超滤分离得到的各组分进行铁强化后的体外消化与 Caco-2 细胞吸收实验。

对内生铁吸收的影响:将乳清蛋白酶解产物进行体外消化后,通过凝胶过滤层析分离得到的各组分进行铁强化后的 Caco-2 细胞吸收实验。

1.4 方法

1.4.1 乳清蛋白酶解产物的制备

制备方法参照 Ou 等的方法^[6]。将乳清蛋白浓缩物用去离子水溶解,在 85℃ 恒温水浴中加热 15 min 使其水化,在室温下冷却至酶解所需温度(50℃),用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0,加入中性蛋白酶(酶活 3 000 U/g),置于 50℃ 恒温振荡水浴(110 r/min)中,酶解 1 h,在其反应过程中用 5 mol/L NaOH 溶液不断调节 pH 值,使其保持在 7.0。酶解完成后置于沸水浴中 10 min,对蛋白酶进行灭活处理。冷却,冷冻干燥,干燥品保存于密封容器中备用。

1.4.2 乳清蛋白酶解液的超滤分离

超滤分离方法参照 Ou 等的方法^[6]。将乳清蛋白酶解液离心处理(4 000 r/min, 15 min),取上清液,经 60 kDa 膜进行超滤,将透过液进一步经 20 kDa 超滤膜超滤,透过液再按照上述方法依次经 10 kDa、3 kDa 膜进行超滤,分别将各级截留液置于 -20℃ 保存备用,3 kDa 膜的透过液经冷冻干燥进行浓缩,以达到一定蛋白含量,备用。超滤膜分离获

得不同分子量的 7 个组分:WPC(乳清蛋白溶液)、WH(乳清蛋白酶解液)、60kR(分子量大于 60 kDa)、20kR(分子量 20 ~ 60 kDa)、10kR(分子量 10 ~ 20 kDa)、3kR(分子量 3 ~ 10 kDa)、3kF(分子量小于 3 kDa)。

1.4.3 各组分的铁强化

配制 0.2 mg/mL 的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液,按每千克蛋白添加 57.14 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的添加量对 WPC 酶解产物各组分溶液进行铁的添加,并按每千克蛋白添加 4 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的添加量对 WPC 酶解产物消化液各组分溶液进行铁的添加。

1.4.4 体外消化

参照 Ou^[6]、Glahn^[5] 等方法。将乳清蛋白酶解产物及强化铁后的各组分,用 4 mol/L HCl 调节 pH 值至 4.0,加入胃酶,置于 37℃ 恒温振荡水浴中 1 h,然后用固体 NaHCO_3 调节 pH 值至 6.0,加入胰液,在 37℃ 恒温振荡水浴中继续消化 30 min,取出迅速冷却,离心(4 800 r/min, 25 min),用 0.45 μm (强化铁后的各组分)或 0.22 μm 微孔滤膜过滤,滤液于 -20℃ 冷冻保存备用。

1.4.5 凝胶过滤层析

乳清蛋白酶解液经体外消化后,进行凝胶过滤层析。凝胶柱规格:长 1 m,内径 2 cm。洗脱液:超纯水,流速 0.78 mL/min,上样量 5 mL,样品质量浓度 0.03 g/mL。将洗脱出的各峰分别收集,多次层析并将得到的相同洗脱体积的洗脱峰收集在一起,进行冷冻干燥浓缩。经过凝胶层析分离后,乳清蛋白中性蛋白酶 1 h 酶解液的体外消化产物大致可洗脱出 4 个组分。第 I 组分,分子量大于 5 kDa;第 II、III 组分,分子量在 1 ~ 5 kDa 之间;第 IV 组分,分子量小于 1 kDa。

1.4.6 Caco-2 细胞的培养、吸收实验

Caco-2 细胞的培养、吸收实验参照 Ou^[6]、Glahn^[5] 等方法。Caco-2 细胞传代至 20 ~ 50 代时使用。培养基为 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium; 含有 4.5 g/L D-葡萄糖,2.0 g/L NaHCO_3),其中加入 10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素。细胞培养环境为 5% CO_2 、37℃。细胞以 10^5 个/ cm^2 的密度接种于 Transwell 板上进行培养,当 Caco-2 细胞在 Transwell 板上培养到 14 ~ 21 d 时,测定其跨单层细胞电阻值,如果大于 500 Ω/cm^2 ,表明其已具有足够的紧密性和完整性,可用来进行吸收实验。

在 Transwell 板上层加入 0.5 mL 待吸收的样品溶液,下层加入 1.5 mL Hank's 液,将 Transwell 板置于培养箱中,1.5 h 后取出,吸出上层和下层的液

体,分别收集,最后用 0.5 mL 1 mol/L NaOH 清洗细胞层 2 次,单独收集。各孔所收集的上、中、下 3 层液体分别于 -20℃ 冷冻保存,进行铁含量的检测。

1.4.7 铁含量的测定

测定方法参照 Ou 等的方法^[6]。将乳清蛋白溶液、酶解液、各组分溶液、体外消化后的渗透液和 Caco-2 细胞吸收后的溶液采用湿法微波消化,再用电感耦合等离子体原子发射光谱(ICP-AES)检测各液体中铁的含量。铁的生物利用率、渗透率和吸收率公式分别为

$$B = \frac{R}{T} \times 100\%$$

$$D = \frac{I}{T} \times 100\%$$

$$A = \frac{R}{I} \times 100\%$$

式中 B ——铁的生物利用率

D ——铁的渗透率

A ——铁的吸收率

R ——细胞吸收后透过到下层及保留在细胞中的铁量

T ——总强化铁量

I ——体外消化后滤出液中的铁量

1.4.8 数据分析

实验数据采用 SPSS 16.0 进行单因素方差分析,显著性水平为 0.05,采用 LSD 法对不同组分进行两两比较,并采用 Bivariate 进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 WPC 酶解产物对强化铁吸收及利用的影响

本研究中,铁的渗透率反映了经消化酶消化后可溶出的铁的比例,吸收率反映了经小肠上皮细胞吸收的铁的比例,生物利用率则反映最终被人体吸收利用的铁占最初摄入的比例。

2.1.1 铁渗透率

铁的可溶性和可渗透性是其得以被小肠吸收的前提^[14-15],即铁与其他食物成分一起摄入时,经胃肠消化后,只有可以溶出和渗析的部分才是可能被小肠吸收的部分^[16],这部分也就是本研究中经过体外消化后可渗透出的部分。不同分子量分布的 WPC 酶解产物对铁渗透率的影响如图 1 所示。

由图 1 可知,乳清蛋白经中性蛋白酶 1 h 酶解后,铁的渗透率并没有显著变化,均为 65% 左右,而不同组分的铁渗透率有所不同。分子量大于 60 kDa 和 20~60 kDa 的部分铁渗透率有显著提高($p < 0.05$),分别为 99.85% 和 91.92%; 分子量为 10~

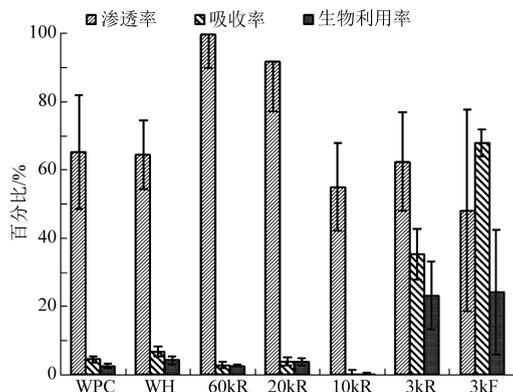


图 1 不同分子量分布的 WPC 酶解产物对铁渗透率、吸收率和生物利用率的影响

Fig. 1 Effect of different components of WPC neurase hydrolysates on iron dialyzability, absorption and bioavailability

20 kDa、3~10 kDa 和小于 3 kDa 的组分与原酶解液和乳清蛋白相比没有显著性差异。由此可以推测,在乳清蛋白(WPC)及其中性蛋白酶 1 h 酶解产物(WH)中存在某种蛋白或多肽组分,可与铁形成复合物,不能被消化酶分解,从而降低了其渗透率,不能透过小肠粘膜进一步被吸收。

2.1.2 铁吸收率

不同分子量分布的 WPC 酶解产物对铁吸收率的影响如图 1 所示。

由图 1 可以看出,乳清蛋白经过中性蛋白酶 1 h 酶解后,酶解产物中铁的吸收率比乳清蛋白中铁的吸收率略有提高,分别为 6.75% 和 4.56%,但差异不显著($p > 0.05$)。酶解产物各组分中,分子量大于 60 kDa、20~60 kDa 和 10~20 kDa 的 3 个组分铁的吸收率与原酶解产物相比有所降低,其中分子量大于 60 kDa 和 10~20 kDa 的 2 个组分差异显著($p < 0.05$),而分子量小于 10 kDa 的 2 个组分(3kR 和 3kF)铁的吸收率有显著提高($p < 0.05$),分别为 35.36% 和 67.95%。由此可以推断,分子量小于 10 kDa 的组分经体外消化后的产物含有可以促进铁吸收的物质。这与 Argyri 等的研究结果一致,他们将牛奶经体外消化后的产物用 Sephadex G-25 凝胶色谱进行分离,得到分子量在 1~5 kDa 之间的 2 个组分对 Caco-2 细胞的铁吸收有明显的促进效果^[17]。Swain 等的研究也表明,牛肉经胃肠消化后得到的多肽中 1~7 kDa 的组分对非血红素铁的吸收会有促进作用^[18]。而促进铁吸收的原因可能是这种低分子量的多肽物质可以与铁形成可溶性的复合物,使其在小肠碱性环境中不会形成沉淀,从而有助于被小肠吸收;另一个可能的原因是该组分中的某种物质具有还原性,可以使铁保持在二价铁的状态

态,有利于其吸收。

2.1.3 铁生物利用率

不同分子量分布的 WPC 酶解产物对铁生物利用率的影响如图 1 所示。

由图 1 可知,乳清蛋白浓缩产物与铁一起摄入时,铁的生物利用率约为 2.58%,而经中性蛋白酶 1 h 酶解后,生物利用率略有提高,达到 4.31%,但差异不显著($p > 0.05$)。将酶解产物按分子量分级后,其中 60 kR、20 kR、10 kR 组分,即分子量大于 10 kDa 的部分,其铁的生物利用率与酶解产物相比略有降低,尤其 10 kR 组分,其与铁一起摄入时,铁的生物利用率只有 0.53% 左右。分子量小于 10 kDa 的组分 3 kR 和 3 kF 与铁一起摄入时,铁的生物利用率显著高于其他组分,分别达到 23.32% 和 24.23%。由此可见,WPC 酶解产物中,高分子量的组分对铁的生物利用无明显影响,而低分子量组分(3 kR、3 kF)对铁的生物利用起到促进作用。这与 Etcheverry 等的研究结果一致,他们的研究表明,细胞中铁蛋白的形成与低分子量乳清蛋白组分有关,而与高分子量乳清蛋白组分无关^[17,19]。

对各组分铁的渗透率、吸收率和生物利用率进行相关性分析,结果表明,渗透率与生物利用率之间没有显著相关性($r = -0.474, p > 0.05$),而吸收率和生物利用率显著相关($r = 0.935, p < 0.01$)。这说明小肠上皮细胞的吸收是对铁生物利用率起主要作用的阶段,而之前经胃肠消化酶消化及溶出对铁的生物利用率影响不大。Miller 等的研究证明,仅根据在模拟胃肠道条件下得到的铁溶出率不能准确预测所有情况下铁的利用率^[20]; Perales 等的研究也表明,尽管铁的溶出率和渗透率可以代表能提供给小肠吸收的铁的量(又称为生物可给性),但这 2 个值与铁经 Caco-2 细胞吸收的吸收率的相关系数很低,所以强调了将 Caco-2 细胞吸收模型结合进铁的生物利用率评价的重要性^[16]。本研究的结果也证实了这一观点,表明了体外消化和 Caco-2 细胞吸收相结合的模型是评价铁的生物利用率的重要手段。

2.2 WPC 酶解产物的消化产物对内源铁吸收的影响

将 WPC 酶解产物的消化产物分离得到的 4 个组分分别进行铁强化后的 Caco-2 细胞吸收实验,以模拟乳清蛋白酶解产物经人体消化后的不同组分对人体内的铁在小肠中吸收的影响,所得吸收率分别为:组分 I, $(57.52 \pm 2.30)\%$; 组分 II, $(8.53 \pm 4.31)\%$; 组分 III, $(35.02 \pm 13.30)\%$; 组分 IV, $(90.47 \pm 15.48)\%$; DWPC, $(39.05 \pm 12.27)\%$;

DWH, $(80.23 \pm 21.51)\%$; 空白, $(25.13 \pm 1.70)\%$ 。

空白组以水为介质,不含任何多肽组分。乳清蛋白的消化产物(DWPC)中铁的吸收率与空白相比没有显著提高($p > 0.05$),分别为 39.05% 和 25.13%,而乳清蛋白中性蛋白酶酶解物的体外消化产物(DWH)中铁的吸收率比空白组的铁吸收率有了显著提高($p < 0.05$),达到 80.23%,与乳清蛋白的消化产物(DWPC)相比也有显著提高($p < 0.05$),说明乳清蛋白酶解物的消化产物中含有可促进铁吸收的成分。

由于体外消化得到的产物是一个混合体系,为了研究其中起作用的主要成分,将其分为了分子量不同的 4 个组分,可以看出,组分 I (分子量大于 5 kDa)、组分 IV (分子量小于 1 kDa) 的铁吸收率与空白组相比都有显著提高,分别为 57.52% 和 90.47%,但组分 I 与乳清蛋白消化产物相比没有显著差异,组分 IV 中的铁吸收率最高。组分 II (分子量在 1 ~ 5 kDa 之间) 中铁的吸收率只有 8.53%,显著低于空白组的吸收率,说明该组分会抑制铁的吸收。由上述结果可知,在人体对铁利用的第二步,小肠上皮细胞对铁的吸收中,小于 1 kDa 的组分(组分 IV)对于铁吸收的促进作用最为明显。这与 Lee 等的研究结果有相似性,他们从猪血浆蛋白中分离得到了一种铁结合肽,并通过质谱和氨基酸测序鉴定其为九肽,分子量为 1 055 Da^[21]。由此可以推断分子量为 1 kDa 左右或小于 1 kDa 的小肽可能会促进铁的吸收。由此可见,虽然乳清蛋白酶解物的体外消化产物对铁的吸收有促进作用,但并不是其中的任何成分都会发挥促进作用,有些成分甚至会起到抑制作用,如果能分别找出其中起促进作用和抑制作用的组分,将有促进作用的组分分离出来,或将有抑制作用的组分去除,将有效提高铁的吸收率。

3 结束语

对 WPC 酶解产物及其消化产物进行了有效的分离,分别确定了其对强化铁和内源铁的生物利用有显著促进作用的组分。

WPC 中性酶解产物的各组分中,低分子量的组分(分子量小于 10 kDa)可以有效提高铁的生物利用率。组分 3kR(分子量在 3 ~ 10 kDa 之间)和 3kF(分子量小于 3 kDa)与铁一起摄入时,铁的生物利用率分别达到 23.32%、24.23%,显著高于 WPC (2.58%),具有作为强化铁助剂的可能性。铁的吸收率和生物利用率显著相关,而渗透率与生物利用率之间没有显著相关性,表明小肠上皮细胞的吸收是对铁的生物利用率起主要作用的阶段。

WPC 中性酶解产物的消化产物的各组分中, 分子量小于 1 kDa 的组分将铁的吸收率提高到 90.47%, 显著高于空白(25.13%), 具有开发为铁

营养改善助剂的可能性; 而分子量为 1~5 kDa 的一个组分会抑制铁的吸收。

参 考 文 献

- 1 Hunt J R, Gallagher S K, Johnson L K. Effect of ascorbic acid on apparent iron absorption by women with low iron stores[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1994, 59(6): 1381-1385.
- 2 Gargari B P, Razavieh S V, Mahboob S, et al. Effect of retinol on iron bioavailability from Iranian bread in a Caco-2 cell culture model[J]. *Nutrition*, 2006, 22(6): 638-644.
- 3 Huh E C, Hotchkiss A, Brouillette J, et al. Carbohydrate fractions from cooked fish promote iron uptake by Caco-2 cells[J]. *The Journal of Nutrition*, 2004, 134(7): 1681-1689.
- 4 Glahn R P, Wien E M, Van Campen D R, et al. Caco-2 cell iron uptake from meat and casein digests parallels in vivo studies: use of a novel in vitro method for rapid estimation of iron bioavailability[J]. *The Journal of Nutrition*, 1996, 126(1): 332-339.
- 5 Glahn R P, Lee O A, Yeung A, et al. Caco-2 cell ferritin formation predicts nonradiolabeled food iron availability in an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model[J]. *The Journal of Nutrition*, 1998, 128(9): 1555-1561.
- 6 McIntosh G H, Royle P J, Le Leu R K, et al. Whey proteins as functional food ingredients? [J]. *International Dairy Journal*, 1998, 8(5-6): 425-434.
- 7 Walzem R L, Dillard C J, German J B. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2002, 42(4): 353-375.
- 8 Ou K, Liu Y, Zhang L, et al. Effect of neutrase, alcalase, and papain hydrolysis of whey protein concentrates on iron uptake by Caco-2 cells[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(8): 4894-4900.
- 9 Wakabayashi H, Takase M, Tomita M. Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2003, 9(16): 1277-1287.
- 10 Vegarud G E, Langsrud T, Svenning C. Mineral-binding milk proteins and peptides; occurrence, biochemical and technological characteristics[J]. *British Journal of Nutrition*, 2000, 84(Supp. 1): 91-98.
- 11 Feng M, Van Der Does L, Bantjes A. Preparation of apolactoferrin with a very low iron saturation[J]. *Journal of Dairy Science*, 1995, 78(11): 2352-2357.
- 12 Kim S B, Seo I S, Khan M A, et al. Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis[J]. *International Dairy Journal*, 2007, 17(6): 625-631.
- 13 Remondetto G E, Beyssac E, Subirade M. Iron availability from whey protein hydrogels: an in vitro study[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(26): 8137-8143.
- 14 Lee Y S, Noguchi T, Naito H. Phosphopeptides and soluble calcium in the small intestine of rats given a casein diet[J]. *British Journal of Nutrition*, 1980, 43(3): 457-467.
- 15 Sato R, Lee Y S, Noguchi T, et al. Iron solubility in the small intestine of rats fed egg yolk protein[J]. *Nutrition Reports International*, 1984, 30: 1319-1326.
- 16 Perales S, Barberó R, Lagarda M J, et al. Availability of iron from milk-based formulas and fruit juices containing milk and cereals estimated by in vitro methods (solubility, dialysability) and uptake and transport by Caco-2 cells[J]. *Food Chemistry*, 2007, 102(4): 1296-1303.
- 17 Argyri K, Miller D D, Glahn R P, et al. Peptides isolated from in vitro digests of milk enhance iron uptake by Caco-2 cells[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(25): 10221-10225.
- 18 Swain J H, Tabatabai L B, Reddy M B. Histidine content of low-molecular-weight beef proteins influences nonheme iron bioavailability in Caco-2 cells[J]. *The Journal of Nutrition*, 2002, 132(2): 245-251.
- 19 Etcheverry P, Miller D D, Glahn R P. A low-molecular-weight factor in human milk whey promotes iron uptake by Caco-2 cells [J]. *The Journal of Nutrition*, 2004, 134(1): 93-98.
- 20 Miller D D, Berner L A. Is solubility in vitro a reliable predictor of iron bioavailability? [J]. *Biological Trace Element Research*, 1989, 19(1-2): 11-24.
- 21 Lee S H, Song K B. Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein[J]. *Process Biochemistry*, 2009, 44(3): 378-381.

xylooligosaccharides producing from corn cobs. To utilize that biorefinery waste, biodegradable seeding pots were prepared using XPSW as main ingredient through dry thermo-compression molding method. The most economical formula of raw powders for XPSW based seeding pots was screened out as XPSW: wheat bran: adhesive: release agent = 68:26:6.3:1 by weight. Also the molding parameters were optimized by orthogonal test, and the optimal compression temperature, compression pressure and holding time was 180°C, 180 MPa and 4.5 s, respectively. Under those conditions, the dry compress strength of XPSW based seeding pots was 2 251 N, and wet compress strength was 417 N. Compare to corn cobs, higher lignin content and lower hemicellulose content of XPSW made the XPSW based seedling pots had better mechanical strength and lower water absorption. Fungal-growth test showed that the XPSW based seedling pots had good biodegradability.

Key words: Xylooligosaccharides producing solid waste Biodegradable seedling pots Dry thermo-compression molding Compress strength

(上接第 229 页)

Effect of Components of WPC Neutrase Hydrolysates on Iron Uptake by Caco-2 Cells

Gao Qian Liu Yunzhu Liang Jianfen

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Neutrase hydrolysis of WPC produces hydrolysates that were proved to enhance iron uptake by Caco-2 cells. The objectives of this study were to investigate effects of components of hydrolysates and digestion products of hydrolysates of neutrase-treated WPC on iron uptake. The hydrolysates of WPC treated with neutrase were separated by ultrafiltration. Effect of different components of hydrolysates on iron uptake was studied by in vitro digestion combined with Caco-2 cell model. The results showed that low molecular components (below 10 kDa) enhanced iron bioavailability significantly ($p < 0.05$). The components of 3 kR (3 ~ 10 kDa) and 3kF (below 3 kDa) increased iron bioavailability to 23.32% and 24.23%, respectively, compared to untreated WPC (2.58%). Bioavailability of iron from ferrous sulfate added with different components of the hydrolysates was significantly associated with iron absorption ($r = 0.935$, $p < 0.01$), while there was no significant relation between iron dialyzability and bioavailability. The hydrolysates of neutrase-treated WPC was digested by pepsin and trypsin gradually to obtain the digestion products, and then separated into four components of different molecular weight by Sephadex G-25. Iron absorption was studied by Caco-2 cells. The results suggested that the components at molecular weight no more than 1 kDa significantly ($p < 0.05$) increased iron absorption to 90.47% compared with 25.13% in the control, while the components with molecular weight at 1 ~ 5 kDa acted as inhibitor.

Key words: Iron WPC Hydrolysates Separation of components Absorption Bioavailability