陈秋杏, 董志昊, 张智, 等. 体外模拟消化米糠蛋白结构及其消化产物免疫活性的影响 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(7): 151−158. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040050

CHEN Qiuxing, DONG Zhihao, ZHANG Zhi, et al. Effect of *in Vitro* Simulated Digestion of Rice Bran Protein Structure and Immune Activity of Its Digestion Products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(7): 151−158. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040050

·研究与探讨·

体外模拟消化米糠蛋白结构及其消化产物免疫活性的影响

陈秋杏[1], 董志昊[1], 张　智[2], 左　锋[1,3,*]

（1.黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319;
2.黑龙江省北大荒米业有限公司, 黑龙江哈尔滨 150090;
3.粮食副产物加工与利用教育部工程研究中心, 黑龙江大庆 163319）

摘　要: 为研究米糠蛋白在胃肠消化过程中结构变化及其胃肠消化产物的免疫调节活性，本研究以米糠蛋白（rice bran protein，RBP）为原料，分析了在体外模拟胃肠道消化不同阶段过程中米糠蛋白的分子量、微观结构、氨基酸组成变化；以小鼠巨噬细胞 RAW264.7 为细胞模型评价米糠蛋白胃肠模拟消化产物（RBPI）的免疫调节活性。结果表明，米糠蛋白经胃肠模拟消化后绝大多数消化产物分子量小于 10 kDa；*β*-折叠的含量由 33.66% 增加至 46.50%，*α*-螺旋含量由 22.38% 减少至 15.80%；必需氨基酸总量（EAA）占 40.33%；必需氨基酸/非必需氨基酸（NEAA）的比值为 0.68；胃肠模拟消化后蛋白微观结构改变，消化产物表面呈细密颗粒状；50~600 μg/mL 的 RBPI 能够显著提高 RAW264.7 细胞的细胞活力，除此之外，还能显著提高 RAW264.7 细胞的吞噬能力、一氧化氮（NO）分泌量，同时能显著刺激巨噬细胞分泌细胞因子白介素（interleukin，IL）-1*β*、IL-10 和肿瘤坏死因子-*α*（tumor necrosis factor -*α*，TNF-*α*），表现出良好的免疫增强活性。以上结果表明，米糠蛋白经体外模拟消化后，具有良好的营养价值，且具有激活巨噬细胞增强机体免疫力的潜在作用，为米糠蛋白胃肠消化产物在功能食品和保健食品行业的应用提供数据支撑。

关键词: 米糠蛋白, 体外模拟消化, 氨基酸组成, 免疫调节, 巨噬细胞 RAW264.7
中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)07−0151−08
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025040050
本文网刊:

Effect of *in Vitro* Simulated Digestion of Rice Bran Protein Structure and Immune Activity of Its Digestion Products

CHEN Qiuxing[1], DONG Zhihao[1], ZHANG Zhi[2], ZUO Feng[1,3,*]

（1.College of Food, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China;
2.Bei Da Huang Heilongjiang Rice Co., Ltd., Harbin 150090, China;
3.Engineering Research Center of Grain By-product Processing and Utilization, Ministry of Education, Daqing 163319, China）

Abstract: This study aimed to investigate the structural changes of rice bran protein during gastrointestinal digestion and the immunomodulatory activity of its digestive products. Rice bran protein (RBP) was used as the raw material. Changes in molecular weight, microstructure, and amino acid composition were analyzed at different stages of *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. The immunomodulatory activity of RBP digestion products (RBPI) was evaluated using RAW264.7 murine macrophage cells as a model. Most of the digestive products exhibited a molecular weight below 10 kDa

收稿日期: 2025−04−07
基金项目: 黑龙江省“双一流”学科协同创新成果项目（LJGXCG2024-P37）; 国家重点研发计划项目（2021YFD2100904）。
作者简介: 陈秋杏（1999−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工及贮藏工程, E-mail: 2438112895@qq.com。
*** 通信作者:** 左锋（1979−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 植物蛋白及农副产品加工利用, E-mail: zuofeng-518@126.com。

after simulated gastrointestinal digestion. The *β*-sheet content increased from 33.66% to 46.50%, while the *α*-helix content decreased from 22.38% to 15.80%. Essential amino acids (EAA) accounted for 40.33% of the total amino acid content, with an EAA to non-essential amino acid (NEAA) ratio of 0.68. Digestion changed the microstructural of the protein, and the surface of the digestive products appeared finely granular. RBPI, at concentrations of 50~600 μg/mL, significantly enhanced the viability of RAW264.7 cells and notably increased their phagocytic capacity and nitric oxide production. Furthermore, RBPI significantly stimulated the secretion of the cytokines interleukin (IL)-1*β*, IL-10, and tumor necrosis factor-*α* (TNF-*α*) by macrophages, indicating strong immunoenhancing activity. These findings indicated that RBP, after *in vitro* simulated digestion, had good nutritional value and potential to activate macrophages and boost immune function, it was expected to provide data support for the application of gastrointestinal digestion products of rice bran protein in the functional food and health food industries.

Key words: rice bran protein; *in vitro* simulated digestion; amino acid composition; immunomodulation; RAW264.7 macrophages

米糠是稻米加工的主要副产物，我国每年米糠产量超 1200 万吨[1]，米糠蛋白质含量为 12%~18%，必需氨基酸分类齐全且组成接近 FAO/WHO 推荐的氨基酸最佳配比模式[2]。米糠蛋白经过酶水解、体外模拟消化等方式可获得小分子肽，这些小分子肽具有抗氧化、抗癌、降血压、降血糖以及免疫调节等多重生理功能[3]。例如，代国信等[4] 通过优化酶解工艺制备米糠蛋白肽，证实其水解产物能通过清除自由基和螯合金属离子显著提升抗氧化活性。HATANAKA 等[5] 发现米糠蛋白酶解物能有效抑制二肽基肽酶Ⅳ（DPP-Ⅳ）活性，具备调控餐后血糖的潜力；邹智鹏等[6] 通过超滤膜分级米糠蛋白肽发现，分子量小于 3 kDa 的组分对血管紧张素转化酶（ACE）抑制率高达 82.6%，具有血压调节的功能活性。KANNAN 等[7] 从米糠中分离出特异性五肽，该成分可通过诱导细胞周期阻滞选择性抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖活性。近年来，植物来源免疫调节肽因具有增强机体免疫、预防癌症等功能且具有原料来源广、安全性高等优点而得到国内外学者的广泛研究[8]。

体外胃肠模拟消化是一种评估食源性蛋白功能特性的酶水解系统，胃蛋白酶和胰蛋白酶两步消化比商业水解酶更接近人体消化情况，体外模拟消化得到的水解物的生物活性也具有更好的适应性[9]。傅秋云等[10] 研究表明燕麦蛋白经体外模拟消化后，产物中含有刺激胆囊收缩素分泌的功能肽，且消化产物的氨基酸组成优于未消化的燕麦蛋白；韩荣欣等[11] 研究发现酸枣仁蛋白经模拟消化的消化液同样具有良好的氨基酸组成和抗氧化活性；CHO[12] 研究显示经胃肠消化后的米糠蛋白可分离出高抗氧化活性组分；已有研究揭示了米糠蛋白水解物具有一定的免疫调节作用[13−14]，但是对于消化过程中水解产物结构变化规律以及消化产物的免疫活性仍有待进一步的研究。

因此本研究将胃肠消化模型与细胞评价体系相结合：首先通过体外模拟消化系统解析米糠蛋白的结构演变规律，并以 RAW264.7 巨噬细胞为模型，系统评估米糠蛋白消化产物（RBPI）对细胞因子分泌的影响进而评价米糠蛋白消化产物的免疫调节活性。研究以期为米糠蛋白胃肠消化产物在功能食品和保健食品行业的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

米糠蛋白（蛋白含量 78%） 黑龙江省北大荒米业有限公司；胃蛋白酶（30000 U/g）、胰蛋白酶（2500 U/mg） 上海源叶生物科技有限公司；二甲基亚砜（DMSO）、噻唑兰（MTT） 北京索莱宝科技有限公司；小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中国科学院上海细胞库；青/链霉素、脂多糖（LPS） 美国西格玛奥德里奇公司；DMEM 培养基、磷酸盐缓冲液（PBS） 广州硕谱生物技术有限公司；胎牛血清 美国克拉克生物科技有限公司；NO 试剂盒 碧云天生物技术有限公司；细胞因子（IL-1*β*、IL-10 和 TNF-*α*）试剂盒 上海朗顿生物技术有限公司；氢氧化钠、盐酸等 辽宁泉瑞试剂有限公司；氯化钾、氯化钠、磷酸二氢钾等其他试剂均为分析纯。

U-2019 型紫外-可见分光光度计 日本 HITACHI 公司；1-4LDplus 冷冻干燥机 德国 CHRIST 公司；U3000 高效液相色谱仪 美国赛默飞公司；SHA-B 数显恒温振荡器 常州智博仪器制造有限公司；Nicoletis10 傅里叶红外光谱 德国 Matthaus 公司；5417R 离心机 德国 Eppendorf 公司；DYCZ-24K 型电泳仪 北京六一生物科技有限公司；S4800 场发射电子扫描显微镜 日本 Koizumi 公司；CBS-170CO_2 培养箱 德国 Binder 公司；DM750 光学显微镜 德国徕卡有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 体外模拟胃部消化 参考 MINEKUS 等[15] 的方法略作修改，将 RBP 溶解在 pH7.0 的 K_2HPO_4-KH_2PO_4 磷酸盐缓冲液中，配制成 50 mg/mL 的 RBP 缓冲溶液，将 RPB 缓冲溶液与模拟胃液（SGF）1∶1 等体积混合（模拟消化液具体配方见表 1），用 1 mol/L HCl 将溶液 pH 调至 3.0 后加入胃蛋白酶，浓度达到 2000 U/mL，将混合液置于 37 ℃ 恒温水浴振荡器转速 180 r/min 反应 120 min 以模拟胃消化，反应结束后置于 100 ℃ 水浴中 10 min 灭酶处理，胃部消化结

表 1　模拟消化液的化学成分[15]

Table 1　Chemical composition of the simulated digestive solution[15]

消化液成分(mol/L)	SGF(pH2)	SIF(pH7)
	mL	mL
0.5 KCl	6.9	6.8
0.5 KH_2PO_4	0.9	0.8
1 $NaHCO_3$	12.5	42.5
2 NaCl	11.8	9.6
0.15 $MgCl_2·6H_2O$	0.4	1.1
0.5 $(NH_4)_2CO_3$	0.5	–
6 HCl	1.3	0.7
H_2O	365.7	375.74
0.3 $CaCl_2$	0.0125	0.05

束将消化液 pH 调至 7.0。离心(12000 r/min、4 ℃、20 min)取上清液冷冻干燥，样品置于−20℃ 保存备用。

1.2.2　体外模拟胃肠连续消化　将 1.2.1 中模拟胃部消化米糠蛋白消化液与模拟肠液(SIF)1∶1 等体积混合，并将 pH 调节至 7.0 后加入胰蛋白酶，浓度达到 1500 U/mL，将混合液置于 37 ℃ 恒温水浴振荡器转速 180 r/min 反应 180 min 以模拟肠消化，反应结束后置于 100℃ 水浴中 10 min 灭酶处理，肠部消化结束将消化液 pH 调至 7.0，离心(12000 r/min、4 ℃、20 min)取上清液冷冻干燥，样品置于−20 ℃ 保存备用。

1.2.3　SDS-PAGE 电泳　参照 VERA 等[16] 的方法并略作修改。样品制备：将米糠蛋白及其消化产物样品制成质量浓度为 10 mg/mL 的溶液，按说明书比例加入十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)样品缓冲液(0.125 mol/L Tris-HCl 缓冲液)，煮沸 3 min 后进行电泳。上样量为 20 μL，凝胶电泳于恒压模式下进行，浓缩胶质量分数为 5%，电压保持在 80 V，分离胶质量分数为 12%，进入分离胶后电压增至 120 V。凝胶染色液采用质量分数为 0.25% 的考马斯亮蓝 R-250 溶液，使用乙醇-冰乙酸-水配制的脱色液进行脱色。

1.2.4　傅里叶红外光谱测定　称量蛋白及其消化产物冻干后样品，使用混样器与溴化钾 1∶50(质量比)混均匀，置于压片模具中压片。将测试样品放入样品舱，参数设置为 4 cm^{-1} 的分辨率和 32 次扫描(4000~500 cm^{-1})，间隔 0.1 s。

1.2.5　扫描电镜(SEM)　用牙签蘸取少量米糠蛋白及消化产物冻干后样品固定在电镜进样台上，真空条件下电镀喷金，固定在载物台上，调整好适宜位置并调整放大倍数(3000×、5000×)后扫描观察。

1.2.6　游离氨基酸　参考刘少华[17] 的方法进行前处理，称取 0.1 g 米糠蛋白及消化产物冻干后样品于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 50% 乙醇后超声 30 min，将滤液在 80 ℃ 下旋干，最后用蒸馏水复溶并定容至 1 mL。吸取 200 μL 样品溶液置于 2 mL 离心管中，加入衍生试剂(A：1∶4(v/v)的三乙胺-乙腈溶液、B：1∶80(v/v)的异硫氰酸苯酯-1% 乙腈溶液，各 100 μL)，摇匀，室温静置 1 h，加入正己烷 400 μL，充分振摇后静置 10 min 使其分层。取下层溶液，用 0.22 μm 滤膜过滤后进样到高效液相色谱仪中进行测定。高效液相色谱仪流动相分别为：A.乙酸铵、B.甲醇、C.乙腈；洗脱梯度程序：0 min 时，流动相 A∶B∶C=93∶6∶1；10 min 时，流动相 A∶B∶C=90∶2∶8；25 min 时，流动相 A∶B∶C=88∶2∶10；31 min 时，流动相 A∶B∶C=84∶0∶16；32 min 时，流动相 A∶B∶C=82∶0∶18；47 min 时，流动相 A∶B∶C=68∶0∶32；50 min 时，流动相 A∶B∶C=42∶0∶58；53 min 时，流动相 A∶B∶C=42∶0∶58；55 min 时，流动相 A∶B∶C=93∶6∶1。色谱柱为 Acclaim™ 120 C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm，5 μm)；柱温为 40±2 ℃；检测波长为 254 nm；流速为 1.0 mL/min；进样量为 2 μL。

1.2.7　RBPI 对 RAW264.7 细胞的免疫调节作用　选取小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 进行免疫调节分析，将 RAW264.7 细胞进行复苏，于 DEME 完全培养基(10% 胎牛血清，1% 青链霉素)中培养传代，取生长至对数期细胞进行后续实验。

1.2.7.1　细胞活力检测　基于经济成本考虑，细胞活力检测常选择 MTT 法[18]，选取对数生长期的细胞接种至 96 孔板，每孔加入 100 μL 的细胞悬液，于 37 ℃，5% CO_2 饱和湿度条件下过夜培养，弃去上清液，分别加入 100 μL 用培养基配制的浓度为 50、100、200、400、600、800、1200 μg/mL 的 RBPI 溶液，同时设置空白组(不接种细胞)和对照组(接种细胞只加入培养基)，设 4 个复孔，于相同培养条件下过夜培养，加入 100 μL 1 mg/mL 的 MTT 工作液，于培养箱继续培养 4 h，弃去上清，加入 100 μL DMSO 轻微振荡于室温下放置 10 min，使用酶标仪测定其在 570 nm 波长处的吸光度，并按下式计算细胞活力：

$$细胞活力(\%)=\frac{样品组A_{570}值-空白组A_{570}值}{对照组A_{570}值-空白组A_{570}值}\times 100$$

式(1)

1.2.7.2　中性红法检测细胞吞噬能力　将 RAW264.7 细胞接种在 96 孔板中过夜培养，弃培养基，每孔中加入 100 μL 样品继续培养 24 h，之后每孔中加入 20 μL 0.1% 中性红溶剂培养 30 min 后弃除，用无菌 PBS 洗涤三次后继续加入 100 μL 细胞裂解液(乙醇∶冰乙酸=1∶1，v/v)振荡，室温下静置 120 min，同时设置空白组(不接种细胞)、对照组(接种细胞只加入培养基)，1 μg/mL LPS 脂多糖组为阳性对照组。使用酶标仪测定其在 540 nm 波长处的吸光度，并按如下公式计算吞噬率：

$$中性红吞噬率(\%)=\frac{样品组A_{540}值-空白组A_{540}值}{对照组A_{540}值-空白组A_{540}值}\times 100$$

式(2)

1.2.7.3 NO 分泌水平测定 将 RAW264.7 巨噬细胞接种至 96 孔板过夜培养；弃培养基，同时设置对照组（接种细胞只加入培养基），1 μg/mL LPS 脂多糖组为阳性对照组，每孔中加入 100 μL 样品继续培养 24 h，每个样品设 4 个复孔，吸取上清液，按照 NO 检测试剂盒说明进行检测。

1.2.7.4 细胞因子分泌水平测定 细胞按 2×10^5 细胞/mL 的密度接种至 96 孔板过夜培养，同时设置对照组（接种细胞只加入培养基），1 μg/mL LPS 脂多糖组为阳性对照组，按组别加样预孵 12 h，取 100 μL 培养基上清液，按照试剂盒说明书测定上清中细胞因子（TNF-α、IL-1β、IL-10）分泌水平。

1.3 数据处理

所有样品均重复实验三次，数据以均数±标准差表示，采用 SPSS 26 进行方差分析，组间差异显著性采用 Duncan's ANONA 进行多重比较（$P<0.05$），利用 Origin 2022 绘图。

2 结果与分析

2.1 米糠蛋白及其胃肠模拟消化产物 SDS-PAGE 电泳

SDS-PAGE 电泳分析可以观察到米糠蛋白在模拟消化过程中不同消化阶段的分子质量变化。由图 1 可见，经胃部消化阶段后，35 kDa 亚基条带强度降低，并在 25~15 kDa 及 15~10 kDa 区间出现弥散条带，可能是由于胃部酸性环境激活胃蛋白酶，能够特异性切割米糠蛋白特定区域，使大分子蛋白结构展开，部分降解为小分子肽段。在胃肠联合消化阶段，高分子量条带（>15 kDa）几乎完全消失，而 10 kDa 附近的条带强度明显增加，表明胰蛋白酶通过特异性切割精氨酸和赖氨酸残基[19]，进一步降解胃消化产物。最终消化液中大部分组分分子量低于 10 kDa，这与 PHONGTHAI 等[20] 采用 HPLC-MS 检测到的米糠消化肽段分子量分布（主要集中于 0.5~8 kDa）形成相互印证。

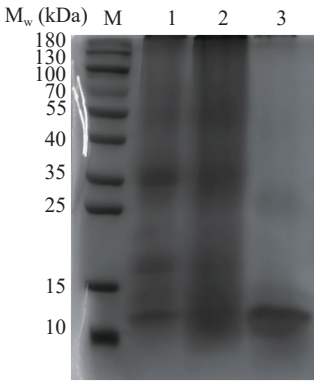


图 1 米糠蛋白及其胃肠消化产物 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.1 SDS-PAGE electrophoresis analysis of rice bran protein and its gastrointestinal digestion products

注：M 为 Maker 蛋白，1 为米糠蛋白，2 为米糠蛋白胃部消化 2 h 产物，3 为米糠蛋白胃肠模拟消化 3 h 产物。

2.2 米糠蛋白及其胃肠模拟消化产物 MIR-FTIR 以及二级结构分析

使用 Feakfit4.2 对 FTIR 的酰胺 I 区域进行二阶拟合，酰胺 I 带内所对应的二级结构分别为 1610~1640 cm^{-1} 对应于 β-折叠、1640~1650 cm^{-1} 对应于无规卷曲、1650~1660 cm^{-1} 对应于 α-螺旋和 1660~1700 cm^{-1} 对应于 β-转角[21]。图 2 为米糠蛋白及其胃肠消化产物傅里叶红外光谱图。表 2 显示了米糠蛋白二级结构相对含量在消化前后发生的变化，各指标间差异显著（$P<0.05$）。α-螺旋含量由消化前的 22.38% 先增加至 23.62% 后在肠部消化阶段减少至 15.80%，这可能是因为在胃部消化过程中，胃蛋白酶作用下暴露内部 α-螺旋结构或形成临时螺旋构象[22]；经过肠道消化后，胰蛋白酶对螺旋结构的彻底切割，导致其解旋并转化为其他构象[23]；β-折叠在胃部消化 2 h 时由 33.66% 先减少至 32.53% 后经历肠部消化阶段增加至 46.50%，可能是因为米糠蛋白在胃部酸性环境下破坏了部分氢键网络，导致部分 β-折叠解离；在肠道消化过程中一些无序区域或其他结构转变为 β-折叠，以形成更稳定的构象；在胃肠消化过程中，无规则卷曲结构先增加后减少，可能是由于在胃部消化过程中酶切导致大分子蛋白断裂，暴露出更多无序区域导致无规则卷曲结构增加。经过胃肠连续消化后产生的部分肽段可能由于疏水作用[23]、静电作用，发生聚集或重新折叠形成新的有序结构，从而使无规则卷曲结构减少[24]。

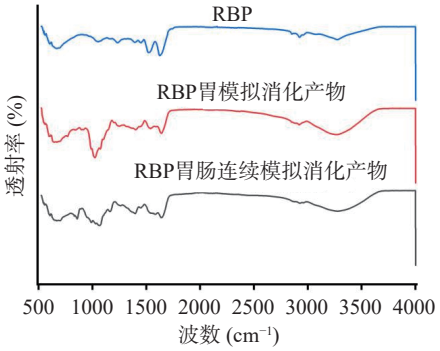


图 2 米糠蛋白及其胃肠消化产物傅里叶红外光谱图

Fig.2 FITR of rice bran protein and its gastrointestinal digestion products

表 2 米糠蛋白及消化产物二级结构组成百分比（%）

Table 2 Percentage of secondary structure composition of rice bran protein and digestion products (%)

蛋白种类	α-螺旋	β-折叠	β-转角	无规则卷曲
米糠蛋白（RBP）	22.38±0.03^b	33.66±0.04^b	16.63±0.03^a	27.33±0.02^b
RBP模拟胃部消化（2 h）	23.62±0.01^a	32.53±0.01^c	13.44±0.05^c	30.41±0.03^a
RBP模拟肠道消化（3 h）	15.80±0.03^c	46.50±0.02^a	13.89±0.01^b	23.81±0.02^c

注：同一列相同字母表示差异不显著，不同字母表示差异显著（$P<0.05$）。

2.3 米糠蛋白及其胃肠模拟消化产物 SEM 分析

如图 3 所示，通过 3000 倍和 5000 倍的扫描电

镜观察，直观反映米糠蛋白及其消化产物的微观结构和消化程度。在未消化状态下，米糠蛋白（图 3A、D）呈现较为规则的颗粒形态，具有相对光滑的表面和一定的聚集状态。经过模拟胃部消化，由于胃酸环境的影响，蛋白表面的微观结构（图 3B、E）发生了显著变化。原本较为规则的絮状结构被破坏，表面出现细小的凸起，这是由于胃蛋白酶对米糠蛋白的肽键进行了水解作用[25]，将大分子蛋白切割成较小的多肽片段。当模拟消化进入肠部阶段，由于胰蛋白酶的作用，消化产物的表面（图 3C、F）颗粒被进一步水解成更小的碎片、多肽甚至氨基酸等小分子物质，原本相对聚集的蛋白颗粒结构变得松散，出现更多细小、不规则的颗粒和絮状物。

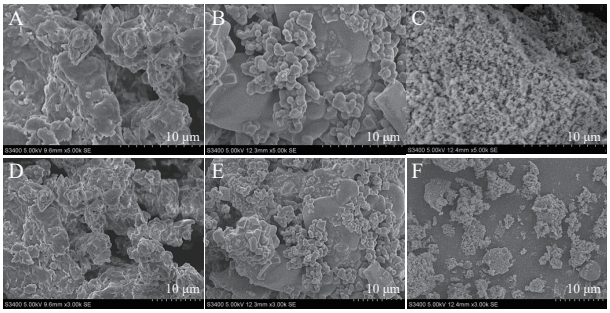


图 3　米糠蛋白及不同阶段胃肠模拟消化产物扫描电镜图

Fig.3　Scanning electron micrographs of rice bran protein and simulated gastrointestinal digestion products at different stages

注：米糠蛋白（A：5000×，D：3000×），模拟胃部消化 2 h（B：5000×，E：3000×），模拟肠道消化 3 h（C：5000×，F：3000×）。

2.4　米糠蛋白胃肠模拟消化产物游离氨基酸含量变化分析

米糠蛋白及其胃肠模拟消化产物游离氨基酸含量测定结果见表 3，米糠蛋白经胃肠消化后消化产物氨基酸种类齐全，除色氨酸外，其他必需氨基酸均能检出。总氨基酸含量较未消化的米糠蛋白增加 1.34 倍，必需氨基酸含量增加 1.38 倍，RBPI 的必需氨基酸/非必需氨基酸为 0.68，必需氨基酸/总氨基酸达到 40.33%；其中与抗氧化、免疫调节活性密切相关的芳香族氨基酸（Phe+Tyr）、含硫氨基酸（Met+Cys）的含量分别达到 263.19 和 85.97 mg/100 g，根据 YOU 等[26] 研究发现，胃肠模拟消化中，胃蛋白酶破坏肽键释放疏水氨基酸和芳香族氨基酸，在抗氧化性能以及免疫调节活性中发挥一定的作用，这与本文研究结果相同。并且米糠蛋白胃肠模拟消化产物游离 Arg 含量由 25.95 mg/100 g 显著增加到 97.83 mg/100 g（P<0.05），已有研究发现精氨酸在免疫调节中发挥关键的作用[27−28]。

表 3　米糠蛋白及其胃肠模拟消化产物游离氨基酸组成（mg/100 g）

Table 3　Composition of free amino acids in rice bran protein and its gastrointestinal simulated digestion products (mg/100 g)

氨基酸种类	RBP	RBP模拟胃部消化（2 h）	RBP模拟肠道消化（3 h）
天冬氨酸Asp	21.18±0.22^{c}	39.61±0.26^{b}	64.10±0.24^{a}
谷氨酸Glu	14.72±0.23^{c}	16.09±0.29^{b}	54.76±0.24^{a}
天冬酰胺Asn	8.10±0.15^{c}	12.86±0.20^{b}	17.32±0.16^{a}
丝氨酸Ser	33.39±0.31^{a}	32.51±0.61^{b}	26.78±0.21^{c}
谷氨酰胺Gln	14.07±0.19^{c}	39.12±0.71^{b}	49.30±0.28^{a}
甘氨酸Gly	2.97±0.06^{c}	12.30±0.20^{b}	14.28±0.21^{a}
组氨酸His	14.04±0.16^{c}	26.37±0.65^{b}	29.20±0.25^{a}
精氨酸Arg	25.95±0.33^{c}	70.98±0.80^{b}	97.83±0.32^{a}
苏氨酸Thr*	6.04±0.12^{c}	24.77±0.65^{b}	51.60±0.24^{a}
丙氨酸Ala	17.02±0.20^{b}	14.66±0.25^{c}	97.02±0.90^{a}
脯氨酸Pro	18.84±0.22^{b}	48.86±0.35^{a}	20.63±0.22^{b}
茶氨酸The	70.96±0.68^{c}	172.35±2.03^{b}	190.57±0.71^{a}
酪氨酸Tyr	18.88±0.23^{c}	55.50±0.65^{b}	81.41±0.30^{a}
缬氨酸Val*	10.61±0.17^{c}	28.21±0.50^{b}	39.69±0.24^{a}
甲硫氨酸Met*	43.72±1.46^{b}	66.08±1.06^{a}	40.08±0.21^{c}
胱氨酸Cys	73.07±2.58^{a}	32.02±0.60^{c}	45.89±0.24^{b}
异亮氨酸Ile*	22.33±0.28^{c}	35.94±0.45^{b}	42.41±0.23^{a}
亮氨酸Leu*	69.95±1.63^{a}	62.19±1.21^{b}	53.15±0.25^{c}
苯丙氨酸Phe*	40.21±0.33^{c}	68.57±2.60^{b}	181.78±1.63^{a}
赖氨酸Lys*	65.47±0.42^{c}	68.48±1.00^{b}	87.68±0.26^{a}
总氨基酸	551.52±9.88^{c}	927.47±15.07^{b}	1255.48±7.38^{a}
总必需氨基酸	212.86±4.41^{c}	364.24±7.47^{b}	506.39±3.06^{a}
必需氨基酸/非必需氨基酸	0.63	0.65	0.68
必需氨基酸/总氨基酸（%）	38.59	39.27	40.33

注：*为必需氨基酸，同一行相同字母表示差异不显著，不同字母表示差异显著（P<0.05）。

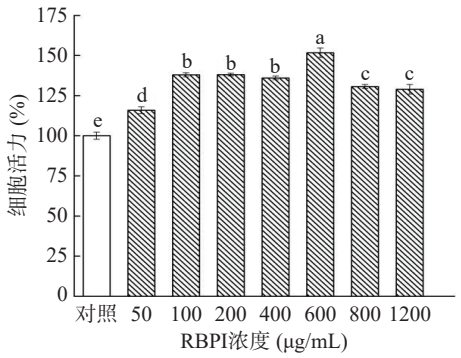


图 4　不同浓度 RBPI 对 RAW264.7 细胞活力的影响

Fig.4　Effect of different concentrations of RBPI on the viability of RAW264.7 cells

注：相同字母表示差异不显著，不同字母表示差异显著（P<0.05），图 5~图 7 同。

2.5　RBPI 对 RAW264.7 细胞免疫活性分析

2.5.1　RBPI 对巨噬细胞 RAW264.7 细胞活力影响

不同浓度梯度 RBPI 对巨噬细胞 RAW264.7 细胞活力的影响如图 4 所示。与对照组相比，RAW264.7 细胞活力随 RBPI 浓度的升高整体呈现先上升后下降的趋势，在 RBPI 浓度 600 μg/mL 时，细胞活力达到最高，当 RBPI 浓度达到 800 μg/mL 时，细胞活力显著降低（P<0.05），这可能是因为 RBPI 浓度增加会对巨噬细胞产生一定的抑制作用，导致细胞增殖活力降低[29]，因此基于细胞增殖效果及安全性考虑，本研究选择 50、100、200、400、600 μg/mL 质量浓度梯

度的 RBPI 溶液，在确保对细胞活力没有影响的情况下进行后续实验。

2.5.2 RBPI 对巨噬细胞 RAW264.7 细胞吞噬作用 不同浓度梯度 RBPI 对巨噬细胞 RAW264.7 细胞吞噬功能影响见图 5。巨噬细胞的吞噬作用是评价巨噬细胞免疫活性的一个重要指标[30]，中性红吞噬实验是评价细胞吞噬活性的常用实验方法[31]。吞噬实验结果显示，与对照组相比，LPS 阳性对照组刺激后，巨噬细胞的中性红吞噬率显著增强（$P<0.05$）。50~400 μg/mL 浓度样品对细胞吞噬作用的影响随浓度的增加而呈现剂量依赖性关系，除 50 μg/mL 样品浓度外均对吞噬活性有显著的改善作用（$P<0.05$）。当 RBPI 浓度为 400 μg/mL 时，细胞的吞噬作用最高，样品浓度达到 600 μg/mL 时吞噬率略有降低但仍显著高于对照组（$P<0.05$），这可能是因为 LPS 通过激活巨噬细胞成熟分化，增强巨噬细胞的吞噬作用，但也可能使吞噬功能性细胞产生过度活化，导致炎症发生，吞噬率下降[32]。前人研究发现从米糠中提取的 Oryzatensin 多功能肽具有免疫调节活性，且对细胞吞噬作用明显，吞噬率为空白对照组的 1.5 倍[33]。

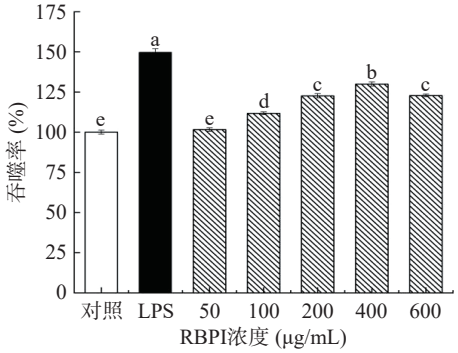


图 5 不同浓度 RBPI 对 RAW264.7 细胞中性红吞噬率的影响

Fig.5 Effect of different concentrations of RBPI on the neutral red phagocytic rate in RAW264.7 cells

2.5.3 RBPI 对巨噬细胞 RAW264.7 细胞 NO 分泌水平影响 NO 分泌水平是反映巨噬细胞免疫调节活性的有效指标[34]。不同浓度 RBPI 对 RAW264.7 细胞 NO 分泌水平的影响结果如图 6 所示。结果显示，LPS 阳性对照组刺激后的巨噬细胞 NO 释放量显著增加（$P<0.05$），说明阳性对照组使 RAW264.7 细胞产生了炎症反应[35]。与对照组比较，不同浓度 RBPI 的处理使细胞 NO 分泌量显著增加（$P<0.05$），且在 600 μg/mL 时达到最大，RBPI 可以促进巨噬细胞分泌 NO 杀死有害物质并且具有一定剂量依赖性[36]。王亚非等[37] 的研究发现，不同质量浓度鹰嘴豆多肽作用巨噬细胞后，NO 释放量与多肽的浓度存在剂量效应关系，且浓度在 400 μg/mL 时，生成的 NO 水平接近 LPS 阳性对照组。

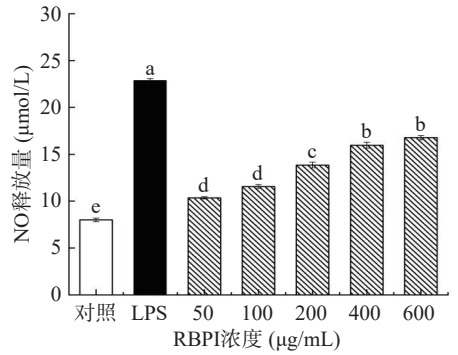


图 6 不同浓度 RBPI 对 RAW264.7 细胞 NO 分泌水平的影响

Fig.6 Effect of different concentrations of RBPI on NO secretion levels in RAW264.7 cells

2.5.4 RBPI 对巨噬细胞 RAW264.7 细胞因子分泌水平的影响 IL-10、TNF-α、IL-1β 是巨噬细胞常见的免疫指标，这些细胞因子的表达和调控是相互作用、相互协调的。不同浓度 RBPI 对 RAW264.7 细胞炎症因子分泌水平的影响如图 7（A~C）所示。与

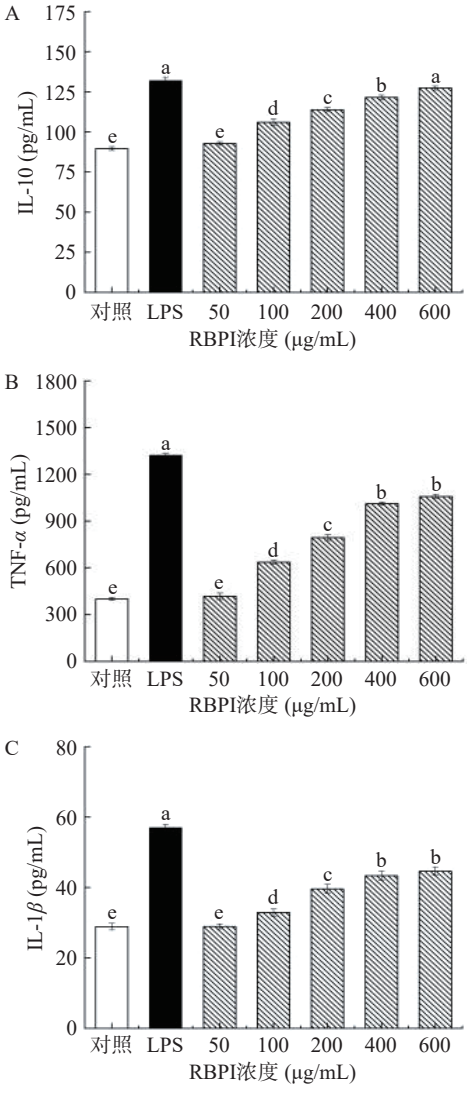


图 7 不同浓度 RBPI 对 RAW264.7 细胞因子分泌水平的影响

Fig.7 Effect of different concentrations of RBPI on the secretion level of cytoinflammatory factors in RAW264.7 cells

注：A：IL-10；B：TNF-α；C：IL-1β。

对照组相比，LPS 阳性对照组刺激后的巨噬细胞因子分泌水平显著提升（P<0.05）；IL-10、TNF-α、IL-1β 的分泌量在 RBPI 浓度为 100~600 μg/mL 范围内显著增加（P<0.05）且呈剂量依赖，50 μg/mL 低剂量刺激时无显著变化，在 600 μg/mL 高质量浓度时达到细胞因子分泌水平最大值，这说明 RBPI 溶液能够显著促进巨噬细胞 RAW264.7 细胞分泌细胞因子（P<0.05），进而起到免疫调节作用，当受到病理刺激或损伤的刺激时，被激活的巨噬细胞通过分泌细胞因子，进而起到免疫调节作用[38]。葛婧仪等[39] 研究发现汉麻活性肽在无 LPS 刺激下，能够激活 RAW264.7 细胞并提高 IL-10、IL-1β、TNF-α 细胞因子的分泌水平，显著改善巨噬细胞的免疫功能。本实验得到了类似的研究结果。

3　结论

本研究以米糠蛋白为原料，分析了在体外模拟胃肠道消化不同阶段过程中米糠蛋白的分子量、微观结构、氨基酸组成并以小鼠巨噬细胞 RAW264.7 为细胞模型评价米糠蛋白及其胃肠模拟消化产物的免疫调节活性，电泳分析显示，米糠蛋白经胃肠模拟消化后，消化产物分子量降至 10 kDa 以下，同时蛋白酶作用于二级结构，β-折叠含量增加、α-螺旋含量减少，微观结构改变，表面形成更利于吸收的细密颗粒状结构；消化后的米糠蛋白必需氨基酸总量为 40.33%，且必需氨基酸与非必需氨基酸比值达 0.68，其中具有免疫活性的精氨酸含量显著提升。细胞实验结果表明 50~600 μg/mL 的 RBPI 能够显著提高 RAW264.7 细胞的细胞活力，除此之外，还能显著提高 RAW264.7 细胞的吞噬能力、一氧化氮（NO）分泌量，同时能显著刺激巨噬细胞分泌细胞因子（IL-10、TNF-α、IL-1β），表现出良好的免疫调节活性。这一研究结果表明，米糠蛋白经模拟胃肠消化后，未损失其营养价值，且消化产物表现出良好的免疫调节功效。本研究为开发基于米糠蛋白的功能性食品和免疫调节剂提供了理论依据，对米糠蛋白高值化利用具有重要实践意义。

© 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] 左英秀，沈军. 稻米加工副产物米糠综合利用的研究[J]. 粮食与食品工业，2020，27(6)：11−14. [ZUO Y X, SHEN J. Research on the comprehensive utilization of rice bran, a byproduct of rice processing[J]. Cereal & Food Industry, 2020, 27(6): 11−14.]

[2] 龙慧，黄傲，邓秀蝶，等. 米糠蛋白的提取及其应用研究进展[J]. 食品工程，2024(1)：5−7,41. [LONG H, HUANG A, DENG X D, et al. Progress in the extraction and application of rice bran protein[J]. Food Engineering, 2024(1): 5−7,41.]

[3] 肖勇生，包珍，张良，等. 米糠蛋白肽的制备及其生物活性研究进展[J]. 食品工业，2022，43(2)：243−246. [XIAO Y S, BAO Z, ZHANG L, et al. Research progress on preparation and bioactivities of rice bran peptide: A review[J]. The Food Industry, 2022, 43(2): 243−246.]

[4] 代国信，魏永忠，吴酉芝，等. 米糠蛋白肽的酶法制备及其抗氧化性能的研究进展[J]. 现代食品科技，2025，41(2)：407−416. [DAI G X, WEI Y Z, WU Y Z, et al. Progress in the enzymatic preparation of rice bran protein peptide and its antioxidant properties[J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(2): 407−416.]

[5] HATANAKA T, INOUE Y, ARIMA J. et al. Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran[J]. Food Chemistry, 2012, 134(2): 797−802.

[6] 邹智鹏，王明洁，刘梦婷，等. 小米米糠蛋白水解物及其膜分离组分的降血压相关活性研究[J]. 中国粮油学报，2020，35(6)：31−38. [ZOU Z P, WANG M J, LIU M T, et al. Study on the blood pressure lowering activity of xiaomi rice bran protein hydrolysate and its membrane separation components[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2020, 35(6): 31−38.]

[7] KANNAN A, HETTIARACHCHY N S, LAY J O, et al. Human cancer cell proliferation inhibition by a pentapeptide isolated and characterized from rice bran[J]. Peptides, 2010, 31(9): 1629−1634.

[8] 刁静静，迟治平，孙迪，等. 绿豆肽对 RAW264.7 巨噬细胞的免疫调节作用[J]. 中国生物制品学杂志，2019，32(9)：950−957. [DIAO J J, CHI Z P, SUN D, et al. Immunomodulatory effect of mung bean protein peptides on RAW264.7 macrophages[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2019, 32(9): 950−957.]

[9] 石嘉怿，张太，梁富强. 体外模拟消化对大米谷蛋白结构及水解产物生物活性的影响[J]. 食品科学，2021，42(1)：59−66. [SHI J Y, ZHANG T, LIANG F Q. Effect of *in vitro* simulated digestion on the structure of rice glutelin and the biological activity of hydrolysates[J]. Food Science, 2021, 42(1): 59−66.]

[10] 傅秋云，方子韵，宋洪东，等. 燕麦分离蛋白消化特性和消化产物对 STC-1 细胞分泌胆囊收缩素的影响[J]. 食品科学技术学报，2021，39(6)：35−44. [FU Q Y, FANG Z Y, SONG H D, et al. Effect of oat isolated protein digestion properties and digestion products on cholecystokinin secretion by STC-1 cells[J]. Journal of Food Science and Technology, 2021, 39(6): 35−44.]

[11] 韩荣欣，张红印，周光鑫，等. 体外模拟消化对酸枣仁蛋白酶解产物抗氧化活性的影响[J]. 食品与机械，2021，37(7)：171−176. [HAN R X, ZHANG H Y, ZHOU G X, et al. Effect of *in vitro* simulated digestion on the antioxidant activity of proteolytic products of jujube kernel[J]. Food & Machinery, 2021, 37(7): 171−176.]

[12] CHO S. Changes in the antioxidant properties of rice bran protein isolate upon simulated gastrointestinal digestion[J]. LWT, 2020, 126(prepublish): 109206−109206.

[13] SAISAVOEY T, SANGTANOO P, REAMTONG O, et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory effects of defatted rice bran (*Oryza sativa* L.) protein hydrolysates on RAW264.7 macrophage cells[J]. Journal of Food Biochemistry, 2016, 40(6): 731−740.

[14] CHANPUT W, LAWYER R. The potential of fractionated rice bran protein hydrolysates as antioxidative and anti-inflammatory agents[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 2020, 66(Supplement): S349−S355.

[15] 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.

[16] VERA A, VALENZUELA M, YAZDANI-PEDRAM M, et al. Conformational and physicochemical properties of quinoa pro-

teins affected by different conditions of high-intensity ultrasound treatments[J]. Ultrasonics-Sonochemistry, 2019, 5(1): 186−196.
[17] 刘少华. 鹿角盘胶原蛋白的提取及血管紧张素转化酶(ACE)抑制肽活性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2015. [LIU S H. Extraction of antler disc collagen and inhibition of peptide activity by angiotensin converting enzyme (ACE)[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2015.]
[18] CORREA L J, ZAPATA E J, LEDESMA H B. Impact of alcalase hydrolysis and simulated gastrointestinal digestion on the release of bioactive peptides from erythrina edulis (chachafruto) proteins[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(17): 9290−9290.
[19] 肖竹钱, 赵优萍, 范煜, 等. 不同制备方法对米糠油品质影响及米糠蛋白的氨基酸组成分析[J]. 中国油脂, 2018, 43(11): 39−44,72. [XIAO Z Q, ZHAO Y P, FAN Y, et al. Effect of different preparation methods on the quality of rice bran oil and the amino acid composition of rice bran protein[J]. China Oils and Fats, 2018, 43(11): 39−44,72.]
[20] PHONGTHAI S, D'AMICO S, SCHOENLECHNER R, et al. Fractionation and antioxidant properties of rice bran protein hydrolysates stimulated by *in vitro* gastrointestinal digestion[J]. Food Chemistry, 2018, 24(01): 56−164.
[21] 李世敏. 应用营养学与食品卫生管理[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002. [LI S M. Applied nutrition and food hygiene management [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2002.]
[22] 毛小雨, 许馨予, 杨鹊隽, 等. 紫花芸豆蛋白体外消化产物的抗氧化活性及结构特征分析[J]. 食品科学, 2021, 42(3): 56−62. [MAO X Y, XU X Y, YANG H J, et al. Antioxidant activity and structural characteristics of *in vitro* digestion products of purple speckled kidney bean[J]. Food Science, 2021, 42(3): 56−62.]
[23] SHIRANG W, TENGYU W, YUE S, et al. Effects of high hydrostatic pressure pretreatment on the functional and structural properties of rice bran protein hydrolysates[J]. Foods, 2021, 11(1): 29.
[24] 焦斐, 杨倩, 杨超, 等. 陇藜 1 号藜麦清蛋白体外消化产物抗氧化活性及结构特征分析[J]. 食品科学技术学报, 2023, 41(3): 116−126. [JIAO F, YANG Q, YANG C, et al. Antioxidant activity and structural characteristics of *in vitro* digestion products of quinoa 1 [J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 41(3): 116−126.]
[25] 贾斌, 毛小雨, 许馨予, 等. 不同胃肠消化阶段紫花芸豆蛋白的抗氧化活性和结构特征[J]. 中国食品学报, 2022, 22(9): 63−73. [JIA B, MAO X Y, XU X Y, et al. Antioxidant activity and structural features of purple kidney bean protein in different gastrointestinal digestion stages[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(9): 63−73.]
[26] YOU L J. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2009, 10(10): 235−240.
[27] 李玖炎. 恶性变乳腺上皮细胞胞外精氨酸耗竭抑制巨噬细胞免疫活性的机制研究[D]. 长春: 吉林大学, 2023. [LI J Y. Study on the mechanism of extracellular arginine depletion in malignant mammary epithelial cells to suppress the immune activity of macrophages[D]. Changchun: Jilin University, 2023.]
[28] 李培佳, 陈冰, 李敏, 等. 高碳水化合物饲料添加精氨酸对杂交鳙的生长性能、抗氧化酶活性、肝脏免疫反应及糖代谢相关基因的影响[J]. 水产学报, 2024, 48(8): 171−183. [LI P J, CHEN B, LI M, et al. Effect of arginine supplementation in high carbohydrate feed on growth performance, antioxidant enzyme activity, hepatic immune response, and genes involved in glucose metabolism [J]. Journal of Fisheries of China, 2024, 48(8): 171−183.]
[29] 孙靖辰, 高永娇, 潘禹溪, 等. 发酵乳杆菌 GBJ 荚膜多糖结构、抗氧化及免疫活性研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2024, 36(1): 55−62. [SUN J C, GAO Y J, PAN Y X, et al. Study on structure, antioxidant and immune activity of capsular polysaccharides from *Lactobacillus fermentum* GBJ[J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2024, 36(1): 55−62.]
[30] FROMENTIN G, DARCEL N, CHAUMONTET C, et al. Peripheral and central mechanisms involved in the control of food intake by dietary amino acids and proteins[J]. Nutrition Research Reviews, 2012, 25(1): 29−39.
[31] CHEN P B, WANG H C, LIU Y W, et al. Immunomodulatory activities of polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa* in a mouse model of Parkinson's disease[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 11: 103−113.
[32] GAO R, SHU W, SHEN Y, et al. Peptide fraction from sturgeon muscle by pepsin hydrolysis exerts anti-inflammatory effects in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via MAPK and NF-κB pathways[J]. Food Science and Human Wellness, 2021, 10(1): 103−111.
[33] LIU X, XIE J, JIA S, et al. Immunomodulatory effects of an acetylated *Cyclocarya paliurus* polysaccharide on murine macrophages RAW264.7[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 9(8): 576−581.
[34] TAKAHASHI M, MORIGUCHI S, YOSHIKAWA M, et al. Isolation and characterization of oryzatensin: a novel bioactive peptide with ileum-contracting and immunomodulating activities derived from rice albumin.[J]. Biochem Mol Biol Int, 1994, 33(6): 1151−1158.
[35] 李锦弘, 郑慧珍, 陈慧, 等. 牡蛎肽对 RAW264.7 巨噬细胞的免疫调节作用[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(22): 49−56. [LI J H, ZHENG H Z, CHEN H, et al. Immunomodulatory effects of oyster peptide on RAW264.7 macrophages[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(22): 49−56.]
[36] LEE K Y, JEON Y J. Macrophage activation by polysaccharide isolated from *Astragalus membranaceus*[J]. International Immunopharmacology, 2005, 5(7-8): 1225−1233.
[37] 王亚非, 于森森, 于悦, 等. 鹰嘴豆多肽的免疫活性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2021, 49(12): 127−136. [WANG Y F, YU M M, YU Y, et al. Immunological activity of chickpea polypeptides[J]. Journal of Northwest A& F University (Natural Science Edition), 2021, 49(12): 127−136.]
[38] YU Q, NIE S P, LI W J, et al. Macrophage immunomodulatory activity of a purified polysaccharide isolated from *Ganoderma atrum*[J]. Phytotherapy Research, 2013, 27(2): 186−191.
[39] 葛婧仪, 张正海, 魏连会, 等. 汉麻活性肽对 RAW264.7 巨噬细胞的免疫调节作用[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(8): 90−96. [GE J Y, ZHANG Z H, WEI L H, et al. Immunomodulatory effect of bioactive peptides from hemp seeds on RAW264.7 macrophages [J]. Food Research and Development, 2025, 46(8): 90−96.]