

分类号：
学号：20222111029

密级：内部1年
单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



多重改性处理对核桃蛋白质结构、理化特性的影响及增溶作用研究

学位申请人	赵书桐
指导教师	毛晓英 教授
申请学位门类级别	专业硕士
学科、专业名称	生物与医药
研究方向	植物蛋白科学技术
所在学院	食品学院

中国·新疆·石河子
2025年6月

分类号：
学 号：20222111029

密 级：内部 1 年
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



多重改性处理对核桃蛋白质结构、理化特性的影响及增溶作用研究

学 位 申 请 人	赵书桐
指 导 教 师	毛晓英 教授
申请学位门类级别	工学硕士
学 科、专 业 名 称	生物与医药
研 究 方 向	植物蛋白科学技术
所 在 学 院	食品学院

中国·新疆·石河子

2025 年 6 月

**Study on the effects of multiple modification treatments on the
structure, physicochemical properties and solubilization of walnut
proteins**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Engineering

By

Zhao Shutong

(Food Science)

Dissertation Supervisor: Prof. Mao Xiaoying

June, 2025

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：赵书桐

时间 2025 年 5 月 23 日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：赵书桐

时间：2025 年 5 月 23 日

导师签名：李恩英

时间：2025 年 5 月 23 日

摘要

我国核桃种质资源丰富，其栽培面积与株数居世界第一，新疆作为核桃种植第二大产区，每年因核桃加工产生大量副产物，其中核桃粕因富含优质蛋白资源而具有重要开发价值。然而核桃蛋白资源利用存在显著局限性——传统提取技术导致蛋白利用率偏低，加之其天然溶解度差的特性，严重制约了核桃蛋白在植物基乳制品、蛋白饮料等高附加值食品工业领域的应用。针对这一产业瓶颈，本研究构建“超声预处理-限制性酶解-糖基化修饰”的多模式协同改性技术，旨在突破核桃蛋白得率与溶解性的双重制约，推动核桃加工副产物的产业化应用。论文主要研究内容与结论如下：

(1) 超声波辅助核桃蛋白提取工艺优化及结构表征。以核桃粕为研究对象，得率为指标，将核桃粕过 300 目筛后，采用 Box-Behnken 响应面法优化超声提取工艺。确定最佳工艺参数为在室温下条件下，采用超声功率 400 W、超声时间 25 min、液料比 25:1 (w/w)、pH 10.5，此时蛋白得率达 $79.68 \pm 5.63\%$ ，较传统方法得率提升 9.23%。随后使用多种表征手段，进一步探究超声功率对蛋白结构的影响。动态光散射与扫描电镜分析表明，超声空化效应产生的机械剪切力有效解聚蛋白聚集体，使粒径分布更均匀，多分散性指数显著降低。傅里叶变换红外光谱与荧光光谱分析揭示，超声处理促使蛋白三级结构解折叠，表现为内源荧光强度增加，同时表面疏水性提升 25.72%。结果表明，超声通过双重路径提升得率：直接效应通过减小聚集体尺寸增加蛋白与分散体系接触面积，间接效应通过结构松散化进而提高核桃蛋白在分散体系中的溶解性。

(2) 高溶解度核桃蛋白制备工艺研究。针对核桃蛋白溶解度差的特点，建立了限制性酶解联合糖基化改性工艺技术。具体而言，以溶解度为响应值，通过 Plackett-Burman 试验、最陡爬坡试验、Box-Behnken 等试验通过设计与响应面优化，建立了酶解-糖基化联合修饰的最佳工艺及参数：选择胰蛋白水解核桃蛋白，酶解 30 min 后，将酶解产物与麦芽糊精 2:1 (w/w) 混合，在 pH 11，温度 70°C 时，糖基化反应 35 min，在此条件下制备的产物溶解度为 $92.68 \pm 3.12\%$ ，较传统产物溶解度提高 44.98%。

(3) 多模式协同改性体系改善核桃蛋白溶解性的可能作用方式研究。研究表明，协同作用显著改善了核桃蛋白的溶解性（超声预处理提升 59.02%，限制性酶解再增 13.85%，糖基化改性使总溶解度再提高 5.52%）。糖基化改性主要改善了核桃蛋白在分散体系中的稳定性，经检测 ζ -电位绝对值增加 12.7 mV，多分散性指数从 0.92 优化至 0.39。表面疏水性测定值由初始的 1001.45 ± 27.79 降至 114.30 ± 1.41 ，结合接触角结果，证实了蛋白表面发生了亲水化修饰。通过内源荧光、傅里叶变换红外光谱以及 X-射线光电子能谱等方法揭示了处理方式之间具有协同增效作用：超声预处理通过物理场效应破碎大分子聚集体，改变了核桃蛋白构象，增大了蛋白与酶之间的接触。酶解修饰选择性切断特定肽键暴露活性位点，加深了蛋白与多糖的接枝程度，随后的糖基化反应则通过共价接枝与分子间作用实现蛋白表面亲水化修饰。热重分析证实多重改性产物热稳定性增强，分子间作用网络的形成有效抑制热分解过程。最后采用分子对接和等温滴定量热法研究了核桃蛋白和麦芽糊精之间的分子作用方式，结果表明，糖基化反应是一个自发的过程，伴随着热量的吸收，疏水作用主导糖链与蛋白的结合过程，而氢键网络稳定亲水表面构象。

关键词：核桃蛋白；超声波辅助提取技术；多模式协同改性技术；溶解性

Abstract

China is rich in walnut germplasm resources, with the largest area and number of walnut trees in the world. Xinjiang, as the second largest walnut production area, generates a large amount of by-products from walnut processing every year. Among them, walnut meal, which is rich in high-quality protein resources, has significant development value. However, the utilization of walnut protein resources is significantly limited. Traditional extraction techniques result in low protein utilization rates, and its natural poor solubility severely restricts the application of walnut protein in high-value-added food industries such as plant-based dairy products and protein beverages. To address this industrial bottleneck, this study constructed a multi-mode synergistic modification technology of "ultrasonic pretreatment - limited enzymatic hydrolysis - glycosylation modification", aiming to break through the dual constraints of walnut protein yield and solubility and promote the industrial application of walnut processing by-products. The main research contents and conclusions of the paper are as follows:

(1) Optimization of the ultrasound-assisted extraction process and structural characterization. Using walnut meal as the research object and yield as the key indicator, the ultrasound-assisted extraction process was optimized through Box-Behnken response surface methodology after sieving the walnut meal through a 300-mesh screen. The optimal parameters were determined to be power 400 W, time 25 min, liquid to material ratio 25:1, and pH 10.5, and the actual protein yield reached $79.68\pm 5.63\%$, which was 9.23% higher than that of the traditional method. The effect of ultrasound power on protein structure was further explored using various characterization tools. Dynamic light scattering and scanning electron microscopy analyses showed that the mechanical shear force generated by the cavitation effect of ultrasound effectively depolymerized the protein aggregates, resulting in a more homogeneous particle size distribution and a significant decrease in polydispersity index (PDI). Fourier transform infrared spectroscopy and fluorescence spectroscopy analyses revealed that ultrasonication contributed to the unfolding of the protein tertiary structure, which was manifested by an increase in the endogenous fluorescence intensity, along with an enhancement of the surface hydrophobicity by 25.72%. The results show that ultrasound enhances the yield through a dual pathway: the direct effect increases the contact area between the protein and the dispersed system by decreasing the aggregate size, and the indirect effect improves the solubility by improving the solubilization characteristics of the protein through structural loosening.

(2) Investigation on the preparation process of high solubility walnut protein. In view of the poor solubility of walnut protein, the restricted enzymatic hydrolysis combined glycosylation modification process technology was established: with solubility as the response value, the optimal process and parameters of enzymatic hydrolysis-glycosylation combined modification were established through design and response surface optimization by the Plackett-Burman test, the steepest-climbing test, and the Box-Behnken et al. test: pancreatic protein was selected to hydrolyze walnut protein, and the enzymatic hydrolysis was carried out for 30 min, and the enzymatic hydrolysis product was mixed with maltodextrin 2:1 (w/w). After 30 min of digestion, the enzymatic product was mixed with maltodextrin 2:1 (w/w), and the glycosylation reaction was carried out for 35 min at pH 11 and 70°C. The solubility of the product prepared under this condition was $92.68\pm 3.12\%$, which was 44.98% higher than that of the traditional product.

(3) Multimodal synergistic modification system to improve the solubility of walnut proteins was investigated for possible modes of action. The results showed that the synergistic action significantly improved the solubility of walnut protein (ultrasonic pretreatment enhanced 59.02%, restriction enzyme digestion increased another 13.85%, and glycosylation modification increased the total solubility by another 5.52%). The glycosylation modification mainly improved the stability of walnut protein in the dispersed system, and the absolute value of ζ -potential was detected to increase by 12.7 mV, and the polydispersity index was optimized from 0.92 to 0.39. The measured value of the surface hydrophobicity was decreased from the initial value of 1001.45 ± 27.79 to 114.30 ± 1.41 , which, combined with the results of the contact angle, confirmed that hydrophilic modification of the surface of the protein had occurred. A synergistic effect between treatments was revealed by endogenous fluorescence, Fourier transform infrared spectroscopy, and X-ray photoelectron spectroscopy: ultrasonic pretreatment changed the walnut protein conformation by breaking the macromolecular aggregates through the physical field effect, increasing the contact between protein and enzyme. Enzymatic modification selectively severed specific peptide bonds to expose the active site, deepening the grafting degree between protein and polysaccharide, while the subsequent glycosylation reaction achieved hydrophilic modification of the protein surface through covalent grafting and intermolecular interactions. Thermogravimetric analysis confirmed the enhanced thermal stability of the multi-modified products, and the formation of an intermolecular interaction network effectively inhibited the thermal decomposition process. Finally, molecular docking and isothermal titration calorimetry were used to investigate the mode of molecular interaction between walnut protein and maltodextrin, and the results showed that the glycosylation reaction was a spontaneous process accompanied by heat uptake, and that hydrophobic interactions dominated the bonding process between the sugar chains and the protein, while the hydrogen bonding network stabilized the hydrophilic surface conformation.

Key words: Walnut protein; Ultrasound-assisted extraction technique; Multimodal synergistic modification technique; Solubility

目录

摘要.....	I
Abstract.....	II
第 1 章 绪论.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.1.1 新疆核桃资源概述.....	1
1.1.2 核桃加工利用现状.....	1
1.1.3 核桃蛋白的价值与潜力.....	2
1.1.4 核桃蛋白提取与改性.....	3
1.2 研究目的与意义.....	6
1.3 研究内容.....	7
1.4 技术路线.....	8
第 2 章 超声波辅助核桃蛋白制备工艺优化及结构表征.....	9
2.1 前言.....	9
2.2 实验材料及设备.....	9
2.2.1 实验材料.....	9
2.2.2 实验试剂.....	9
2.2.3 实验仪器与设备.....	10
2.3 实验方法.....	10
2.3.1 脱脂核桃粉的制备.....	10
2.3.2 核桃蛋白的制备.....	11
2.3.3 蛋白质得率的计算.....	11
2.3.4 超声辅助核桃蛋白制备工艺优化.....	11
2.3.5 超声波处理对核桃蛋白结构特性的影响研究.....	12
2.3.6 数据处理与分析.....	13
2.4 结果与讨论.....	13
2.4.1 超声辅助核桃蛋白制备工艺优化.....	13
2.4.2 超声处理对核桃蛋白结构的影响.....	17
2.5 小结.....	24
第 3 章 限制性酶解联合糖基化改性核桃蛋白工艺研究.....	26
3.1 前言.....	26
3.2 实验试剂.....	27
3.3 实验方法.....	27
3.3.1 核桃蛋白的制备.....	27
3.3.2 核桃蛋白的改性.....	27
3.3.3 数据处理与分析.....	30
3.4 结果与讨论.....	30
3.4.1 酶的筛选.....	30
3.4.2 多糖种类的筛选.....	31

3.4.3 糖基化改性单因素试验结果分析	32
3.4.4 响应面试验分析	34
3.5 小结	38
第 4 章 核桃蛋白增溶作用研究	39
4.1 前言	39
4.2 实验材料及设备	39
4.2.1 实验试剂	39
4.2.2 实验仪器	40
4.3 实验方法	40
4.3.1 核桃蛋白的制备	40
4.3.2 限制性酶解联合糖基化改性核桃蛋白	40
4.3.3 不同改性方式对核桃蛋白功能特性的影响	41
4.3.4 不同改性方式对核桃蛋白结构特性的影响	41
4.3.5 数据处理与分析	43
4.4 结果与讨论	43
4.4.1 不同改性处理对核桃蛋白功能特性的影响	43
4.4.2 不同改性处理对核桃蛋白结构特性的影响	45
4.4.3 分子间相互作用	55
4.4.4 蛋白质溶解度改善的潜在作用方式研究	58
4.5 小结	60
第 5 章 结论与展望	62
5.1 结论	62
5.2 创新点	63
5.3 展望	63
参考文献	64
致谢	75
作者简介	76

第1章 绪论

1.1 研究背景

1.1.1 新疆核桃资源概述

核桃 (*Juglans regia* L.)，又名胡桃，属胡桃科，广泛分布于中亚，西亚，南亚和欧洲^[1]。中国是世界上核桃起源中心之一，具有丰富的种质资源，是世界核桃生产第一大国，拥有最大的种植面积和产量，出口量也仅次于美国，居世界第二^[2]。中国地域辽阔，核桃种植历史悠久，产地广袤，共有六大主要核桃种植区。其中，新疆是中国核桃种植第二大省，仅次于云南省。根据新疆林业和草原局林果产业发展中心数据显示，截至2021年底，新疆核桃种植面积630.88万亩，产量113.22万吨。新疆有三大主要核桃种植产区，分别为阿克苏地区、喀什地区以及和田地区，经过近60年的发展，新疆先后选育出闻名全国的优良品种，三大主产主要栽植“新新2”、“温185”、“扎343”、“新丰”等优良品种^[3]。与国内其他主产区相比，新疆核桃具有果实大、饱满、质量优、高产和抗逆性强等突出特点。

2021年2月新疆维吾尔自治区第十三届人民代表大会第四次会议通过《新疆维吾尔自治区国民经济和社会发展第十四个五年规划和2035年远景目标纲要》提出要做强林果产业，“十四五”末，全区林果面积稳定在2200万亩左右，果品产量达到1200万吨左右。未来随着各项政策的落实，新疆核桃产业将持续扩大。

1.1.2 核桃加工利用现状

核桃作为典型的药食同源型坚果，兼具丰富的营养价值与保健功效。核桃全身都是宝，其果仁、叶片、花序、青皮及果壳等不同组织器官中，均含有多种生物活性成分，展现出广泛的开发利用潜力。核桃营养丰富，具有很强的抗氧化和抗炎功能。核桃仁富含抗氧化物质（如多酚、维生素E）以及大量的不饱和脂肪酸，肽，蛋白质，具有心血管保护、抗炎等特性^[4]。核桃叶提取物可用于生物农药开发，核桃壳则可以作为吸附材料或燃料^[5]。核桃油富含以亚油酸和油酸为主的不饱和脂肪酸成分，研究表明，这类脂肪酸有利于降低低密度脂蛋白含量，对于预防心脑血管疾病，防治动脉硬化等起到重要的作用^[6]。研究发现，长期摄入核桃可以改善大鼠和人类的认知功能和记忆力^[7]。中国核桃加工业已构建起涵盖初级加工与精深加工的全产业链体系。在初级加工领域，核桃仁、带壳核桃及核桃油等基础产品占据主要市场份额，具有较高的市场渗透率。而核桃

精深加工领域则呈现出高附加值特征，主要产品包括核桃乳、核桃粉、核桃酱等食品类制品，以及功能性食品（如核桃活性肽、核桃蛋白粉）和化妆品原料等延伸产品，但整体产业规模仍相对有限。值得关注的是，尽管产业体系日趋完善，我国核桃加工业仍面临关键技术瓶颈。与发达国家相比，国内标准化的核桃初级加工生产线建设起步较晚，在核心加工工艺与装备水平方面存在差距，因加工环节造成的核桃产后损失率已达到12%，因此，大多数核桃仍以旧其原始果实形式出售^[8]。近年来，核桃油因富含不饱和脂肪酸备受关注，但其加工量仅占核桃总量的0.65%，市场渗透率有待提升^[9]。工业生产中，核桃油主要采用物理压榨法制备，其中冷榨法通过施加高强度机械压力提取油脂，其生产工艺具有三个显著优势：首先，全程温度控制在低温区间且不使用有机溶剂，保障了油脂的食用安全性；其次，工艺流程相对简单且环境友好；再者，生产成本具有市场竞争力。这些特性使冷榨法成为当前核桃油生产的主流工艺。冷榨工艺产生的副产物核桃粕含有丰富的营养成分，其蛋白质含量可达40%以上，且保留了大量脂溶性营养物质。然而，目前核桃粕资源化利用存在明显不足，多数作为经济性较高的动物饲料实现循环利用，但仍有相当比例被直接填埋处理^[10]，这不仅造成优质植物蛋白资源的浪费，更与全球蛋白质短缺的现状形成矛盾。因此，将核桃粕中的蛋白质提取出来，应用于食品加工、生物医药、精细化工等领域，不仅可以减少资源浪费，而且可以有力的缓解全球蛋白资源紧张^[11]。

1.1.3 核桃蛋白的价值与潜力

世界人口持续增长对全球资源与环境带来的挑战已成为国际社会关注的焦点。据联合国《世界人口展望（2019年）》报告显示，全球人口预计将于2050年达到97亿，并于2100年攀升至109亿规模。这种指数型增长模式不仅加剧了粮食安全问题（2019年全球仍有8.2亿人口处于饥饿状态，20亿人面临隐性饥饿），更导致自然资源过度开发、温室气体排放激增以及生物多样性锐减等系统性危机^[12]。在此背景下，开发可持续食物资源及废弃物高值化利用技术已成为实现联合国可持续发展目标的关键路径。植物基食品的研发热潮源于其显著的生态效益和营养优势。相较于动物源性蛋白，植物蛋白不仅具有更低的碳足迹，更少的温室气体排放，其氨基酸组成也日益显示出替代潜力^[13]。有研究表明，当合理搭配谷物与豆类时，植物蛋白组合的必需氨基酸评分可达1.0，完全满足FAO/WHO推荐标准^[14]。值得注意的是，核桃蛋白作为优质植物蛋白资源，其营养价值已引起学界广泛关注。核桃蛋白的营养优势体现在其独特的氨基酸组成特征，它包含8种人体必需氨基酸，其中谷氨酸、精氨酸等功能性氨基酸含量显著。谷氨酸是影响人特别是青少年智力及记忆发育的重要功能物质，精氨酸可以转化为一氧化氮，抑制血小板粘附和聚集，是有效的血管扩张剂^[15]。与动物蛋白以及部分植物蛋白相比，核桃蛋白的氨基酸组成更加平衡，必需氨基酸含量较高，并且，核桃蛋白作为植物蛋白中的优

质资源，其生物价达 98.77%，优于大豆蛋白（BV 56.2%）和乳清蛋白（BV 64.1%）^[16]。不仅如此，核桃蛋白的药食同源特性使其具有多维健康效应。体外实验表明，核桃蛋白酶解物的 ABTS 自由基清除能力（0.50 mg/mL 时为 69.21±7.66%）显著高于玉米醇溶蛋白酶解物（1.00 mg/mL 时为 64.3%）^[17]。动物模型显示，每日摄入 500 mg/kg 核桃蛋白肽可使糖尿病大鼠空腹血糖降低 64.82%，作用机制涉及 IRS-1/PI3K/Akt 和 AMPK 通路激活以及 GLUT4 转位促进^[18, 19]。

核桃粕的低效利用现状与核桃蛋白的高营养价值及可持续特性形成显著反差，这使其成为极具开发潜力的新型植物蛋白资源^[20]。然而，目前核桃蛋白的工业化利用率仍旧存在不足，核心瓶颈在于核桃蛋白极端低下的溶解性。传统条件下核桃蛋白溶解性仅能达到 20-30%，低溶解性源于核桃蛋白的分子特征，作为一种疏水性植物蛋白，其亚基分子量集中在 14-66 kDa^[21]，根据 Osborne 分离，发现核桃蛋白包含 72.06% 碱溶性谷蛋白和 15.67% 盐溶性球蛋白，它们会在二硫键交联下会形成蛋白质聚集体，表面疏水性从而很高，导致水分子难以渗透，因此溶解性极低（在酸性 pH 条件下溶解度仅为 2.17%），远低于乳清蛋白和大豆分离蛋白^[22, 23]。这一缺陷极大限制了核桃蛋白在食品，化工，医药等行业的应用。

1.1.4 核桃蛋白提取与改性

1.1.4.1 核桃蛋白的提取

核桃蛋白常规提取法是碱溶酸沉法^[24]，该方法源于 20 世纪中叶建立的植物蛋白分离技术，通过经典的碱性萃取和酸性沉淀程序进化而来。其基本原理是利用蛋白质在碱性条件下的溶解特性，以及在等电点时发生沉淀的物理化学性质实现分离纯化。该法具有操作流程标准化、设备通用性强、适合大规模连续化生产等显著优势^[25]，但是该方法存在萃取效率低（部分结合态蛋白难以溶出）、能耗高（长时间高温搅拌）等固有缺陷^[26]。

针对传统方法的优化研究，张继文等人^[27]利用单因素结合响应试验优化碱溶酸沉法核桃蛋白提取工艺，最终得出在 50.45°C、pH 9.07、等电点 4.62 的工艺条件下，蛋白质得率可达到 44.5%。李亚萍^[28]采用碱溶酸沉法提取核桃蛋白，以榨油后烘干的脱脂核桃粉为原料，采用单因素结合正交试验的方法优化提取工艺，确定最优工艺参数为：料液比 1:30（g/mL），酸沉 pH 为 4.0，提取温度 50°C，核桃蛋白的得率可达 12.15%。值得注意的是，两位学者得率差异主要源于原料预处理方式不同——前者采用全脂原料而后者使用脱脂原料，这提示油脂残留量对蛋白提取具有显著影响。

为提高工业化生产的经济效益，研究者开始探索辅助提取技术。超声辅助提取法利用超声波（20-100 kHz）产生的空化效应、机械振动和热效应，通过以下机制提升效率：

(1) 空化气泡溃灭产生的微射流破坏细胞壁结构；(2) 高频振动增强传质速率；(3) 局部高温促进蛋白溶解。Moses Kwaku Golly 等人^[29]采用变幅杆式超声装置(功率 400 W, 频率 20 kHz)处理核桃浆液,发现超声处理 10 min 即可使提取率从 52.3%提升至 68.1%, 蛋白纯度由 78.4%增至 91.1%。更值得关注的是,超声处理使乳化稳定性指数从 142 min 提升至 191 min,这归因于超声波诱导蛋白分子展开暴露出更多疏水基团。相比之下,酶法辅助提取虽然理论上可通过蛋白酶(如碱性蛋白酶、风味蛋白酶)水解细胞壁多糖-蛋白复合物提高提取率,但实际应用存在明显局限。Andreas Fetzer 等人^[30]在油菜籽蛋白提取中发现,即便优化酶解条件(酶添加量 2%、50°C、pH 8.0 处理 4 h)获得 80.7% 的提取率,但酶制剂成本占生产总成本的 38%,且后续灭酶工序增加能耗。对于核桃蛋白提取而言,其特有的鞣酸等抗营养因子还会显著抑制酶活性,这进一步制约了酶法的工业化应用。综合技术经济性、操作便利性和适应性考量,本研究最终选择超声辅助提取作为工艺优化方向。

1.1.4.2 核桃蛋白的改性

常见的蛋白质改性手段有物理改性,酶法改性,化学改性等。

1.物理改性方法

物理改性方法包括高压均质,热处理,超声等。物理改性改变了蛋白质结构以及分子间的聚集方式,进而提高了蛋白的营养及功能特性,一般不会改变蛋白质的一级结构,即在可控条件下对蛋白质的定向改性^[31],其成本低,无毒副作用,时间短但改性效果不明显。因此常作为辅助手段。在物理改性方法中,超声波技术以其高效、环保、可控等优点在食品工业中得到了广泛的应用。蛋白质超声改性的作用机制包括空化效应引起的物理作用,机械作用和化学作用。空化气泡在达到临界尺寸后会破裂,从而产生剧烈的剪切力,湍流,高温和高压^[32],这些物理效应有助于改善液体体系的性质,加速化学反应的进行。在空化作用下,分解的水分子将产生高活性自由基,会与蛋白质发生交联^[33],并且,超声产生的热效应也会影响蛋白质的结构。研究发现,在低强度超声下,蛋白质的二级和三级结构改变,蛋白质分子部分展开形成较小的聚集体,从而改善蛋白质的功能,在较高强度超声下,蛋白质肽键可能被破坏,游离巯基会被氧化成较大的聚集体,反而会对蛋白质某些功能产生负效应^[34]。Zhao 等人^[35]使用高强度超声(600-2000 W)处理核桃蛋白后,发现超声破坏了蛋白质聚集体,同时蛋白质溶液的 ζ -电位值显著改变,荧光发射强度降低;Shi 等人^[36]比较了超声,加热,酶处理对核桃分离蛋白结构和乳化特性的影响,发现超声会使蛋白结构更加疏松,进而使蛋白 EAI(乳化活性)和 ESI(乳化稳定性)分别增加 1.57 和 2.67 倍。Min-Ji Kim^[37]使用 40 kHz, 350 W 的超声波处理黑豆蛋白,发现黑豆蛋白一级结构保持完整,但 α -Helix 和 β -Sheet 含量减少,Random coil 含量增加,埋藏的非极性氨基酸残基暴露,这些发现均表明超声处理可用于改善蛋

白质的功能特性。

2.化学改性方法

蛋白质化学改性技术通过选择性修饰蛋白质分子中的氨基、羧基和巯基等活性基团，可定向调控其功能特性，其中糖基化、琥珀酰化及磷酸化为主要改性方法^[38]。糖基化改性因兼具安全性和功能改良效果，在食品工业中应用尤为广泛。该反应基于美拉德反应机制，即蛋白质氨基与还原糖羰基在常温或加热条件下发生非酶褐变反应，通过缩合、聚合等复杂过程形成含还原酮类、醛类及杂环化合物的棕色大分子产物^[39]。根据反应体系差异，糖基化接枝可分为干法（低水分活度）和湿法（溶液体系）两类，两者在反应动力学及产物特性上呈现显著区别。研究表明，通过糖基化反应制备出的蛋白与多糖的衍生物^[40]，具有良好的乳化性，溶解性和稳定性。陈宇等人^[41]用核桃蛋白联合菊粉制备了核桃蛋白-菊粉共轭物，发现共轭物的溶解性相比核桃蛋白，提高了47%，起泡性、泡沫稳定性分别提高了49%和23%，乳化性指数增加了17%。说明糖基化显著改善了核桃蛋白的功能性质。这种功能提升源于糖链引入改变了蛋白质表面电荷分布与空间构象，进而优化其亲水-疏水平衡及分子柔性。相较于其他化学改性手段，糖基化反应的优势在于避免有毒试剂引入且不产生有害副产物，但其反应条件需精准调控，且存在接枝效率波动、产物均一性不足等技术瓶颈，制约了工业化应用。表1-1总结了一些油料类蛋白糖基化条件以及它们的功能概述。

表 1-1 不同反应条件下油料蛋白质与多糖的糖基化条件及其功能概述

Table. 1-1 Overview of glycosylation conditions and their functions of oilseed proteins and polysaccharides under different reaction conditions

蛋白	糖	比例 (W/W)	溶剂	类型	参数	性质
SFP-H	木糖	2:1	pH7.4, ddH ₂ O	湿法	120°C, 2 h	抗氧化能力增加, 口感变好 ^[42]
CPI	阿拉伯树胶	1:0.5/1/2	pH7, 0.2 MPBs	湿法	90°C, 0-60 min	溶解度增加 ^[43]
CPI	阿拉伯树胶	1:0.5	pH7, 0.2 MPBs	湿法	90°C, 15 min	粘度, EAI, ESI 提高 ^[44]
CPI	阿拉伯树胶	1:0.5	pH7, 0.2 MPBs	湿法	90°C, 15 min	热稳定性增加, 蛋白质聚集减少 ^[45]
RPI	葡聚糖 (20 KDa)	1:1	pH10, H ₂ O	湿法	90°C, 1-3 h	表面亲水性, 溶解性, EAI, 热稳定性提高 ^[46]
RPI	葡聚糖 (20 KDa)	1:1	pH10, H ₂ O	湿法	70-90°C, 0-60 min	溶解性, EAI, ESI 提高 ^[47]
SPC	麦芽糊精	1/2/3:	ddH ₂ O	干法	80°C, 24 h	溶解性, EAI 提高 ^[48]

(SFP-H-葵花籽蛋白水解物; CPI-卡诺拉分离蛋白; RPI-油菜籽分离蛋白; SPC-芝麻浓缩蛋白)

3.生物酶法改性

酶法改性作为蛋白质定向修饰的关键技术，其核心机理在于利用生物酶的特异性催化能力对蛋白质结构进行精准调控，通过酶与蛋白质表面特异性位点结合实现功能特性的定向优化。该技术通过精准切割肽链以降低分子量，促进疏水区域暴露并改变表面微环境，从而可以显著提升蛋白质溶解度^[49]。相较于化学改性，酶法改性的优势体现在反应条件温和（无需高温或极端 pH 环境）、副产物生成量少且反应进程可控性强，特别是酶催化固有的底物特异性可确保修饰过程的高效性与选择性。然而，该技术亦存在明显局限性：水解时间过长易引发过度水解，导致蛋白质肽键断裂并生成短肽及低分子量氨基酸，造成营养功能损失；此外，蛋白酶制剂的生产成本较高且回收困难，导致整体工艺经济性不足，难以满足工业化大规模生产需求。

4.多技术协同效应研究

糖基化过程会改善蛋白的功能特性，包括乳化性，溶解性，抗氧化性，热稳定性等。但是，糖基化反应条件复杂，反应过程长，难以控制，接枝效果也难以保证。目前，采用超声波技术辅助糖基化技术已经被应用到蛋白改性过程中，以期望得到性质更加稳定的蛋白接枝物。Zhang 等人^[50]通过超声处理和湿热美拉德反应，将大豆 β -伴大豆球蛋白（7S）与麦芽糖糊精偶联，发现超声处理可以加快偶联过程，与不加超声相比，反应速度快了一倍。Ma 等人^[51]利用超声处理和未处理的美拉德反应制备大豆分离蛋白和柑橘果胶与苹果果胶的偶联物，发现在 450 W 和 70°C 下，超声处理显著加速了大豆蛋白和果胶样品之间的结合过程，并导致更大的接枝程度。同时，超声在偶联过程中的应用显著增加了两种偶联物的表面疏水性和乳化特性。

单一改性技术在解决植物蛋白功能性差的方面具有各自的局限性与劣势，化学法存在副反应风险，酶法受限于成本因素，物理改性则难以实现深度结构修饰。基于此，联合改性手段通过整合不同技术的优势，在分子结构修饰、功能特性提升以及副产物控制等方面展现出显著优势，已成为突破单一改性技术瓶颈的核心策略。因此，联合不同手段开发出一种具有协同效应的复合改性技术弥补单一技术的缺陷，更加完善有效的改善植物蛋白的功能性^[52]，同时探索多重处理对溶解度的改善机制，对于在蛋白改性领域的实际应用，将具有指导意义。

1.2 研究目的与意义

本研究立足于新疆特色核桃种质资源高值化利用需求，聚焦纸皮核桃加工副产物——核桃粕的综合开发问题。新疆作为全球核桃主产区之一，具有纸皮核桃、野核桃和薄皮核桃等丰富的种质资源。其中“温 185”纸皮核桃因新疆独特的地理气候条件（年均日照长，昼夜温差大），具有种壳薄（0.8-1.2 mm）、出仁率高（58-64%）、油脂（58-60%）

与蛋白质（14-20%）含量丰富等优势^[53]，成为榨油工艺的优质原料。然而现行加工体系存在显著资源浪费：每吨核桃仁榨油后产生 500-580 kg 渣粕（核桃仁出油率 42%-48%），其中蛋白质含量高达 45-50%，但因其溶解性低等功能缺陷，90%以上渣粕仅作为饲料或填埋处理，造成植物蛋白资源利用率不足。针对这一产业痛点，本研究以核桃粕为对象，系统构建蛋白质定向修饰与功能化重组技术体系，重点突破蛋白溶解性差的核心技术瓶颈，系统构建核桃蛋白高值化利用技术体系。通过整合超声物理场效应，生物酶降解，化学修饰技术深入探讨蛋白质构效关系及改性机理，为植物蛋白资源的高值化利用提供理论依据和技术支撑，研究成果可为新疆特色林果资源精深加工提供理论依据。

1.3 研究内容

本研究以核桃粕为研究对象，研究内容如下：

（1）超声波辅助核桃蛋白制备工艺优化及其结构表征

使用超声波对核桃蛋白进行预处理，以得率为指标，采用 Box-Behnken 试验设计优化超声辅助碱溶酸沉工艺参数，通过二次多项式方程解析各因素交互作用，确定最佳工艺条件，以期能最大限度地提高蛋白产量。同时，采用动态光散射法研究了超声波对蛋白聚集体的影响，进一步研究了碱溶酸沉法和超声波辅助法制备的核桃蛋白的蛋白质组成和结构特征的差异，并且探究了超声波提升核桃蛋白产量的原因。

（2）多模式改性协同提升蛋白溶解度工艺研究

构建“酶解-糖基化”的蛋白质协同改性体系。首先通过 Plackett-Burman 设计筛选影响溶解度的关键因子（酶种类、底物浓度、温度、pH 等），随后采用最陡爬坡实验逼近最优响应区域，最终结合 Box-Behnken 响应面法建立溶解度的二次回归模型。主要包括以下几点：①在限制性酶解阶段，系统研究胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶和中性蛋白酶对核桃水解程度及溶解度的影响规律，并且通过控制水解度避免蛋白过度降解；②糖基化改性阶段，筛选葡聚糖、麦芽糊精、高脂果胶等不同多糖，通过邻苯二甲醛法测定氨基消耗率以计算接枝度，研究糖基化反应进程与溶解度的关系；③联合改性：通过监测接枝程度与溶解度的动态变化，解析限制性酶解-糖基化改性过程中的多因素交互作用，构建多模式协同改性的工艺参数优化模型。

（3）高溶解性核桃蛋白结构表征及增溶作用研究

综合运用多尺度分析技术系统解析改性蛋白的空间构效关系：①分子结构层面，通过 X 射线光电子能谱测定改性过程中蛋白基团变化，傅里叶变换红外光谱分析酰胺 I 带（1600-1700 cm^{-1} ）的二级结构变化；②空间构象层面，采用荧光光谱检测色氨酸微环境变化，激光粒度仪测定粒径分布，接触角测定仪评价表面亲疏水平衡；③功能特性层面，测定持水性和溶解性，通过 Zeta 电位分析溶液稳定性。通过分子对接技术 (Autodock