

Obtención y caracterización de un hidrolizado de proteína de *Vigna radiata* L. (frijol mungo) con potencial Bioestimulante

F.C. Arámbula-Castillo, M. Zegbe-Rodríguez, C. Rivas-Morales, D.G. García-Hernández y E.D. Cabello-Ruiz*

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

*ethel.cabellorz@uanl.edu.mx

RESUMEN

La agricultura enfrenta el desafío de gran demanda alimenticia en un entorno desfavorable, debido al cambio climático. Los Bioestimulantes abarcan sustancias y microorganismos que "estimulan" el crecimiento y desarrollo de las plantas, mejoran la calidad del cultivo y la resistencia al estrés. Los Hidrolizados de Proteínas (HP) son "una mezcla de péptidos, oligopéptidos y aminoácidos, producto de digestión enzimática y/o química de harinas proteicas". *Vigna radiata* L. (Frijol Mungo) es una legumbre importante en países asiáticos y las actividades biológicas de los Hidrolizados de Proteína del Frijol Mungo (HPFM) han sido estudiadas con fines medicinales y/o nutricionales. El objetivo de este estudio fue obtener un HP de la Harina de *V. Radiata*, el cual posee potencial como Bioestimulante. La proteína fue extraída mediante la técnica "pH-Shift"; el producto se llevó a una hidrólisis enzimática y el Grado de Hidrólisis (GH%) se determinó con la reacción con ninhidrina, mostrando un 5.43% final. La Longitud de Cadena Polipeptídica mostró que el HPFM, tenía péptidos entre 11 y 18 AA (1,21kDa-1,98 kDa). Con lo anterior, es necesario optimizar las condiciones de extracción y reacción de hidrólisis. Este trabajo es una base para la evaluación de actividad como "bioestimulante" de esta leguminosa.

Palabras clave: *Vigna radiata* L., hidrolizado de proteína, bioestimulante

ABSTRACT

Agriculture have the challenge of high food demand in an unfavorable environment due to climate change. Biostimulants include substances and microorganisms that "stimulate" the growth and development of plants, improve crop quality and resistance to stress. Protein Hydrolysates (HP) are "a mixture of peptides, oligopeptides and amino acids, product of an enzymatic and/or chemical digestion of protein flours". *Vigna radiata* L. (Mung Bean) is an important legume in Asian countries and the biological activities of Mung Bean Protein Hydrolysates (HPFM) have been studied for medicinal and/or nutritional purposes. The objective of this study was to obtain a HP of *V. radiata* flour, which has potential as a Biostimulant. The protein was extracted using the "pH-Shift" technique; the product was taken to an enzymatic hydrolysis and the Degree of Hydrolysis (GH%) was determined with the reaction with ninhydrin, showing a final 5.43%. The Polypeptide Chain Length showed that the HPFM had peptides between 11 and 18 AA (1,21kDa-1,98kDa). With the above, it is necessary to optimize the extraction and hydrolysis reaction conditions. This work is a basis for the evaluation of activity as a "biostimulant" of this legume.

Keywords: *Vigna radiata* L., protein hydrolysates, biostimulants

INTRODUCCIÓN

Ante una tendencia de crecimiento que prevé una sobrepoblación mundial para el año 2050, una de las mayores preocupaciones es la seguridad alimentaria y la demanda por energía y recursos. Como respuesta a esta problemática, la búsqueda de sustancias que puedan ser una alternativa a los agroquímicos utilizados en la actualidad está en aumento.

En este sentido, la Biotecnología ha respondido a esta problemática ofreciendo diferentes tecnologías que buscan introducir la “sostenibilidad” a las prácticas agrícolas tradicionales. Por ejemplo, los “Bioestimulantes” son sustancias y/o microorganismos que ‘estimulan’ el crecimiento y el desarrollo de las plantas, además de mejorar la calidad del cultivo e incrementar la resistencia a estrés biótico y abiótico (Shahrajabian *et al.*, 2021).

Un tipo de bioestimulantes son precisamente los Hidrolizados de Proteínas (HP), los cuales son obtenidos a partir de residuos agropecuarios. Estos contienen una mezcla de aminoácidos, péptidos y polipéptidos que influyen en la fisiología vegetal de planta a causa de los diversos mecanismos de acción que ejercen en diferentes etapas del ciclo de vida de la planta. Estos suelen ser aplicados en todas las etapas de crecimiento de la planta por medio de hojas, raíces y/o como tratamientos de semilla (Yakhin *et al.*, 2017). Después de su aplicación se cree que tanto péptidos como aminoácidos, entran por medio de poros en la membrana celular, estomas y/o de transportadores en la raíz (Nardi *et al.*, 2016). Una vez dentro de la planta, viajan por medio del sistema vascular y llegan hasta el “sitio de acción”, donde participan en diferentes procesos (Yakhin *et al.*, 2017) (Fig. 1).

El estudio de los HP, y en especial de sus componentes, ha derivado en que estos sean utilizados en las formulaciones de productos que se encuentran ya en el mercado. Tal es el caso de las leguminosas, especialmente, de la Soya (*Glycine max* L.) quien es el más estudiado hasta la fecha. La compañía Italtollina™ sacó al mercado un bioestimulante de origen vegetal hecho a partir de la hidrólisis enzimática de proteínas de leguminosas, conocido como Trainer® (Caruso *et al.*, 2019). El contenido de este producto y sus efectos, han sido estudiados en *Zea mays* L., *Pisum sativum* L., y *Solanum lycopersicum* L., mostrando una actividad hormonal como auxina y giberelina (Colla, Roupael, Canaguier *et al.*, 2014).

Trainer® contiene un péptido pequeño de 12 aminoácidos que promueve el crecimiento de la raíz al aumentar y elongar el número de vellos. Este péptido es conocido como “Péptido Promotor de los Vellos Absorbentes” y previamente, fue identificado en HP de Soya (*Glycine max* L.) (Colla, Roupael, Canaguier *et al.*, 2014; Matsumiya & Kubo, 2011).

Vigna radiata L., mejor conocido como Frijol Mungo (FM), es un cultivo de gran importancia cultural y económica pues es utilizado ampliamente por la medicina tradicional, en la

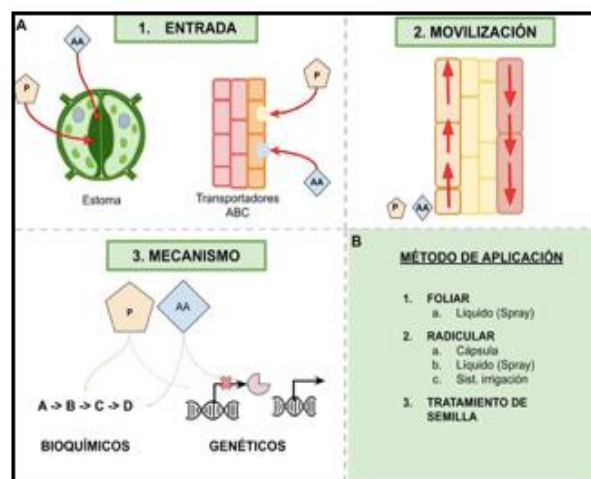


Figura 1. Resumen de los métodos de aplicación de los HP (B) y representación de la entrada (A1) de los aminoácidos y péptidos al tejido vegetal, su transportación por el sistema vascular de la planta (A2) y los mecanismos (A3) realizados una vez que se encuentran dentro del tejido vegetal. AA = Aminoácido, P = Péptidos.

nutrición, para la elaboración de fitofármacos, así como de alimentos funcionales y/o nutraceuticos. Sin olvidar que también son usados por la cosmética y formar parte de productos para el cuidado de la piel (Tang *et al.*, 2014). Hoy en día, se sabe que tiene actividades biológicas como la antioxidante, antidiabética, antimicrobiana, antihipertensiva y antiinflamatoria, entre otras (Ganesan & Xu, 2018). Estas actividades están adjudicadas a compuestos bioactivos encontrados en las semillas, hojas y tallos (Bai *et al.*, 2016) como lo son los polisacáridos y péptidos (Hou *et al.*, 2019).

Tabla I: Péptidos con actividades biológicas encontrados en el HPFM.

Hidrolizado / Fracción	Actividad	Péptido (s)	Cita
Hidrolizado	Antihipertensiva (Inhibición de ECV)	KDYRL, VTPALR, KLPAGTLF	Li, Le <i>et al.</i> , 2005
Fracción (< 3 kDa)	Antioxidante	WGN, AW, RGWYE, GVPFW	Xia <i>et al.</i> , 2020

En este sentido, el FM tiene un alto contenido proteico (20.97%-31.32%) (Yi-shen *et al.*, 2018), el cual sobrepasa de otras legumbres. De este porcentaje, el 85% lo forman proteínas de reserva como las albuminas, globulinas y prolaminas, mientras que el restante está conformado por proteínas que no han sido identificadas hasta la fecha (Viernes *et al.*, 2012). De hecho, Sarkar *et al.* (2011) encontró que el peptidoma del FM, compuesto de péptidos con un tamaño de entre 3.0 a 5.0 kD, tenía la capacidad de inducir la división celular de *Allium cepa* L. A la fecha, han sido aislados pocos péptidos y proteínas de hidrolizados de proteínas de frijol mungo (HPFM) con actividades biológicas (Tabla I).

A pesar de que algunas de las actividades biológicas de los HP de *V. radiata* ya han sido determinadas, su posible aplicación como bioestimulante aún falta por evaluarse. Por ello, el propósito de este trabajo fue obtener un HP de *V. radiata* a partir de la semilla, utilizando la enzima Alcalasa 2.4L y determinar su Grado de Hidrolisis (GH) para su posible aplicación como BS en el crecimiento de plantas de importancia alimenticia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la harina de Frijol Mungo desengrasada (HFMD)

Las semillas de Frijol Mungo (FM) fueron compradas de un distribuidor local, lavadas con agua destilada y dejadas secar toda la noche. Después del lavado, las semillas fueron molidas en un procesador de alimentos para obtener una harina, a la cual se le denominó Harina de Frijol Mungo (HFMD).

Una vez conocido el contenido de proteína en la harina, se prosiguió a su desengrasado, para lo cual se agregó Hexano en una proporción 1:5, y se mantuvo en agitación constante a 4000 rpm x 12 h. Posteriormente, fue dejada en reposo por 72 h para eliminar el solvente. A la harina resultante se le llamó Harina Frijol Mungo Desengrasada (HFMD).

Determinación del contenido total de proteína de la HFMD

Para conocer el contenido de proteína total en la HFMD, se realizó un Monitoreo de Proteína Total (MPT) empleando el método de Kjeldahl. Para ello se agregó en un sobre de papel cera 8 g de la HFMD, 1.2 g de K_2SO_4 , 0.9 g de $CuSO_4$ y 0.01 g de HgO , el cual fue colocado al interior de un matraz Kjeldahl y puesto en la estufa para su carbonización. Después del cambio de color se retiró del fuego y se destiló. Posterior a esto, se llevó a cabo la titulación con Ácido Clorhídrico (HCl 0.1 N). Finalmente, se utilizaron dos fórmulas para conocer el Porcentaje de Nitrógeno (Ec. 1) y el Porcentaje de Proteína (Ec. 2) (Li *et al.*, 2014). El Factor de conversión específico utilizado fue de 6.40 (Estrella-Romo, 2008).

$$\text{Ec.1} \quad \% \text{ Nitrógeno} = \frac{(\text{mL de HCl})(\text{Factor de HCl})}{\text{g de muestra}}$$

$$\text{Ec.2} \quad \% \text{ Proteína} = (\% \text{ Nitrógeno})(\text{Factor de conversión específico})$$

Preparación del aislado de proteína de Frijol Mungo (APFM)

A partir de la HFMD, se realizó la extracción de proteínas por medio de la técnica pH-shift (Hou *et al.*, 2019). La HFMD fue disuelta en agua destilada (pH 9.0) en una proporción 1:10, bajo agitación constante durante 35 min. Después, la solución fue centrifugada a 4000 rpm x 20 min. En seguida, se recolectó el sobrenadante y se ajustó a pH 4.5 con HCl 2N para precipitar la proteína. Una vez precipitado, nuevamente fue centrifugado a 4000 rpm x 20 min, recuperando con ello el Aislado Proteína Frijol Mungo (APFM) (Valencia *et al.*, 2014), el cual fue resuspendido en agua destilada a pH 7 con NaOH 1N.

Hidrólisis del APFM con la enzima Alcalasa 2.4 L

Se partió de una solución al 2% de APFM y agua destilada, la cual fue dejada reposar en una incubadora hasta alcanzar una temperatura interna de 55°C. Posteriormente, fue ajustada a pH 8.0 con NaOH 1N y tomada una muestra de 2 mL como control. En seguida, se agregaron 55.5 µL de Alcalasa 2.4L e introducida nuevamente a la incubadora. La reacción se dejó correr a 55°C x 120 min. Cada 20 min (incluyendo el tiempo 0) se tomaron alícuotas de 2 mL para determinar el Grado de Hidrólisis, para lo cual cada muestra fue puesta en un baño de agua a 90°C x 20 min (Sbroggio *et al.*, 2016).

Determinación del grado de hidrólisis (GH%)

Se prepararon soluciones estándar de 50 µM de Prolina y Leucina con Ácido acético (0.05%), a partir de las cuales se prepararon disoluciones de 0.00 µmol/mL hasta 2.00 µmol/mL, con la finalidad de obtener la curva patrón de estos aminoácidos.

Después, se agregó 1 mL de Ninhidrina (2%) en tubos de ensaye de cada una de las soluciones preparadas previamente. Los tubos fueron puestos en un baño de agua a 90°C x 10 min y dejados enfriar a temperatura ambiente. En seguida, se agregaron 5 mL de Etanol (95%) a cada uno de los tubos y se llevaron a realizar las lecturas en el espectrofotómetro, en donde primeramente fue calibrado con un control negativo que contenía 2

mL de agua destilada y 1 mL de Ninhidrina, posteriormente las muestras y el control fueron leídas a 570 y 440 nm. Con ello fueron obtenidas las curvas de calibración y consecuentemente las ecuaciones de la recta.

Las muestras recolectadas en los tiempos 0, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 min junto con los controles fueron centrifugados a 1000 rpm x 15 min, con el fin de recuperar el sobrenadante. Estos últimos se agregaron en tubos de ensayo, además de 1 mL de Ninhidrina. En seguida, los tubos fueron puestos en un baño de agua a 90°C x 10 min y transcurrido este tiempo, dejados enfriar a temperatura ambiente (Sonklin *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2020). Después, se agregaron 5 mL de Etanol (95%) a cada uno de los tubos y fueron leídos a 570 y 440 nm.

Finalmente para conocer el Grado de Hidrólisis (GH%), se utilizó la metodología ya reportada (Leni *et al.*, 2020; Sonklin *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2020). Las absorbancias fueron corregidas con la obtenida del control positivo, el cual contenía Ninhidrina y 2 mL de proteína (2%). Para conocer la cantidad de aminoácidos liberados se empleó la siguiente fórmula (Ec.3):

$$\text{Ec. 3} \quad h = \frac{(A \times b)}{m}$$

En el que h indica los equivalentes de enlaces peptídicos hidrolizados, A es la suma de las absorbancias a 570 y 440 nm para cada tiempo, y b es la pendiente y m es el intercepto obtenido de la ecuación de la recta.

Para calcular el Grado de Hidrólisis (GH%) se usó la Ec. 4

$$\text{Ec. 4} \quad GH\% = \frac{h}{h_{tot}} \times 100$$

En donde h es el valor obtenido anteriormente, h_{tot} es número total de enlaces peptídicos. En este caso se utilizó 8 amino mEq/g de proteína.

Determinación de la Longitud de la Cadena Polipeptídica (LCP)

Finalmente, se utilizó el GH% obtenido anteriormente para conocer el LCP empleando la Ec. 5:

$$\text{Ec. 5} \quad LCP = \frac{100}{GH\%}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de HFMD

Por diferencia de peso, se encontró que después de la eliminación del hexano la HFMD contenía un 83% menos de lípidos. Esto significa que no fueron removidos por completo los lípidos de la HFM.

Determinación del contenido total de proteína de la HFMD

Las semillas del FM poseen un gran contenido proteico, en especial de proteínas de reserva (Yi-Shen *et al.*, 2018). Los resultados de la determinación por medio del método de Kjeldahl de la HFMD mostraron algo diferente, ya que se obtuvo un 15% de Proteína Cruda (PC). Este porcentaje también difiere con lo obtenido por Prachansuwan *et al.* (2019) quienes utilizando el mismo método, encontraron que la Harina de Frijol Mungo contenía un 26% de proteína cruda. En este último trabajo utilizaron un Factor de Conversión (FC) de N₂ a Proteína de 6.25, el cual subestima el contenido y la forma real en la que se encuentra el N₂ (Mæhre *et al.*, 2018). Por esta razón, se decidió utilizar el FC de 6.40 corregido por Estrella-Romo (2008), que toma en cuenta tanto el contenido de N₂ proteico como el no proteico y la forma anhidra de los AA en la cadena polipeptídica.

Aun con la diferencia del FC, es notable el contraste del porcentaje de PC oscilando en casi el 9%. Dicha diferencia puede deberse a que el contenido de PC fluctúa en función de la variedad o el cultivar de *V. radiata* (Li *et al.*, 2010) e inclusive por el mismo manejo postcosecha que pudo haber tenido la semilla, ya que el contenido nutricional cambia en esta etapa (Yousaf *et al.*, 2016).

Por otro lado, la diferencia del contenido de proteína puede verse afectado por la manipulación durante la preparación de la muestra, puesto que una buena molienda de la muestra permitiría una mayor lisis celular y por tanto una mayor liberación de proteínas (Lee, 2017).

Preparación APFM

El APFM contenía 2.7 g de proteína, con lo cual se obtuvo un rendimiento del 90%. Este porcentaje es mayor a lo obtenido por Wang *et al.* (2011) quien obtuvo un rendimiento promedio de 77.60%. Los resultados mostrados en este trabajo podrían deberse a que el pH utilizado para la solubilización y extracción (Ni *et al.*, 2020) favorecieron la extracción. Ciertamente un pH alcalino permite que los radicales de los aminoácidos interactúen con las moléculas de agua, mientras que un pH ácido impide esto último, permitiendo que los AA sean desionizados y precipiten (Yi-shen *et al.*, 2018; Zheng *et al.*, 2020).

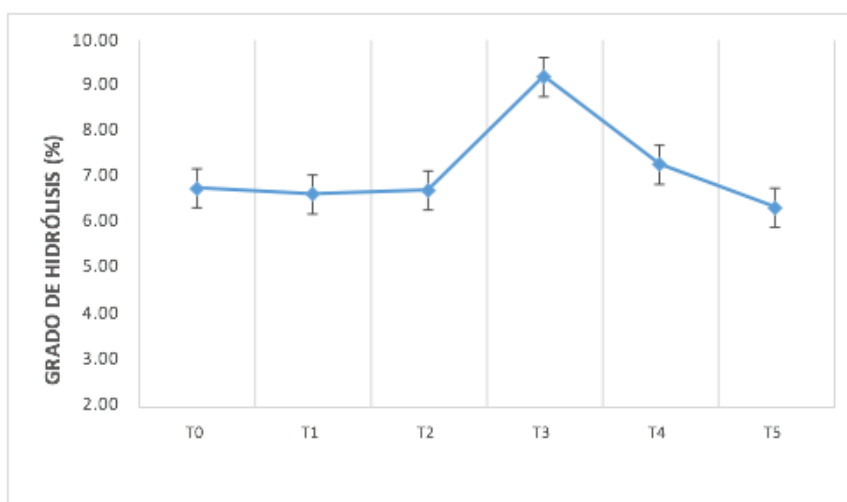


Figura 2. Reacción enzimática de la Alcalasa 2.4 L sobre el APFM. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes

Hidrólisis del APFM con la enzima Alcalasa 2.4 L

En la Fig. 2 se muestra la gráfica resultante de la hidrólisis del APFM con la Alcalasa 2.4L y es posible observar que muestra un comportamiento atípico. En el trabajo de Li *et al.* (2005) encontraron que la hidrólisis de una

HFMD con la enzima Alcalasa presentaba un crecimiento exponencial durante las primeras 2 h, llegando a la zona “meseta” después de este tiempo; además que no mostraba un GH inicial, como fue observado en el T0.

Después del GH inicial (5.96%), la reacción se mantuvo estable durante el T1 (5.79%) y T2(5.90%). Es posible que a lo largo de estos tiempos parte del sustrato se encontrara todavía en su forma “nativa”, lo cual impediría a la Alcalasa formar el complejo enzima-sustrato y por lo tanto hidrolizar (Benítez *et al.*, 2008).

El punto máximo de la reacción fue alcanzado en el T3 (8.99%) después del cual la reacción comenzó a decaer, como puede ser apreciado en el tiempo T4 (6.60%) y T5 (5.43%).

Determinación del grado de hidrólisis (GH%)

Como fue mencionado anteriormente, el inicio de la reacción (T0) mostró un cierto GH%. El autor Benítez *et al.*, (2008) explica que esto ocurre ya que, al principio de la reacción la enzima se encuentra en “exceso” y todo el sustrato está “disponible” para ser hidrolizado. Además, la muestra podría ya tener un cierto GH% debido al mismo proceso de extracción puesto que, los cambios en el pH afectan la conformación de las proteínas (Valenzuela *et al.*, 2013).

El mayor número de enlaces peptídicos fueron hidrolizados en el T3 (Fig.2). Benítez *et al.*, (2008) explica que aumentó la disponibilidad de sitios de acción para ser hidrolizados. Esto implicaría también que ocurrieron cambios estructurales en las proteínas puesto que, los AA hidrofóbicos se encuentran en el interior de la proteína (Malleshappa- Gowder *et al.*, 2014) y como fue mencionado anteriormente, la Alcalasa actúa AA hidrofóbicos (Benítez *et al.*, 2008).

El decaimiento de la reacción de hidrólisis a partir del T4 podría estar asociado con la presencia de polifenoles en la muestra puesto que, la extracción de proteínas por medio de la técnica “pH-shift” propicia también su extracción (Li *et al.*, 2014) y podrían estar participando en la reacción de hidrólisis al unirse con la proteasa e inactivarla (Ni *et al.*, 2020) o bien pudo haber ocurrido una inhibición por los mismos péptidos resultantes de la hidrólisis (Awuor *et al.*, 2017).

Determinación de la Longitud de la Cadena Polipeptídica (LCP)

La Longitud de la Cadena Polipeptídica (LCP) nos da una idea de la cantidad de AA que componen los péptidos resultantes de la hidrólisis (Benítez *et al.*, 2008). En este caso, se obtuvieron péptidos pequeños de entre 11 y 18 AA (1.21 kDa -1.98 kDa) (Tabla II), lo cual está acorde a lo mencionado por (Famuwagun *et al.*, 2021) al mencionar que la Alcalasa produce péptidos de cadenas cortas.

En el trabajo de (Chunkao *et al.*, 2020) encontraron péptidos de entre 0.19 kDa y 6.59 kDa en fracciones de *V. radiata* hidrolizadas con Alcalasa. Si bien son necesarios mayores estudios, es importante conocer el tamaño de los péptidos puesto que, existe una relación entre este parámetro y su actividad biológica (Bumrungsart & Duangmal, 2019; Famuwagun *et al.*, 2021).

Tabla II: Promedio y distribución de la LCP en función del GH%.

Tiempo	LCP	
	AA	kDa
T0	17	1.87
T1	17	1.87
T2	17	1.87
T3	11	1.21
T4	15	1.65
T5	18	1.98

CONCLUSIÓN

La HFM, realizada a partir de semillas de FM, fue desengrasada un 83% con Hexano logrando obtener de esta manera una HFMD. La HFMD contiene un 15% de Proteína Cruda, determinado por medio del método de Kjeldahl. De este porcentaje se logró extraer un 90% de proteína (2.7 g) con lo cual se obtuvo un APFM.

La hidrólisis del APFM con la Alcalasa 2.4L y la determinación del GH% con la Ninhidrina permitió tener un hidrolizado con un GH% final de 5.43%, a pesar de observar una curva atípica. Además, el HPFM contenía péptidos de entre 11 y 18 AA (1.21 kDa -1.98 kDa), los cuales podrían ser los responsables de algunas actividades biológicas ya reportadas.

Si bien se obtuvieron buenos resultados, es necesario la optimización de los parámetros empleados para la precipitación de proteínas para aumentar el porcentaje de extracción, así como las condiciones de la reacción enzimática para favorecer la hidrólisis de la proteína.

Tomando en cuenta lo anterior, este trabajo funge como base para el próximo estudio de la actividad bioestimulante del HPFM, específicamente, sobre el crecimiento (germinación) de plantas de importancia alimenticia.

BIBLIOGRAFÍA

- Awuor, O. L., Edward Kirwa, M., Betty, M., & Jackim, M. F. (2017). Optimization of Alcalase hydrolysis conditions for production of Daga (*Rastrineobola argentea*) Protein hydrolysate with antioxidative properties. *Industrial Chemistry*, 03(01). <https://doi.org/10.4172/2469-9764.1000122>
- Bai, Y., Xu, Y., Chang, J., Wang, X., Zhao, Y., & Yu, Z. (2016). Bioactives from stems and leaves of mung beans (*Vigna radiata* L.). *Journal of Functional Foods*. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.009>
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: Procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227–236.
- Bumrungsart, N., & Duangmal, K. (2019). Optimization of Enzymatic Hydrolysis Condition for Producing Black Gram Bean (*Vigna mungo*) Hydrolysate with High Antioxidant Activity. In *Food and Applied Bioscience Journal* (Issue 7).
- Caruso, G., de Pascale, S., Cozzolino, E., Giordano, M., El-Nakhel, C., Cuciniello, A., Cenvinzo, V., Colla,

- G., & Roupshael, Y. (2019). Protein hydrolysate or plant extract- based biostimulants enhanced yield and quality performances of greenhouse perennial wall rocket grown in different seasons. *Plants*, 8(7), 1–18. <https://doi.org/10.3390/plants8070208>
- Chunkao, S., Youravong, W., Yupanqui, C. T., Alashi, A. M., & Aluko, R. E. (2020). Structure and function of mung bean protein- derived iron-binding antioxidant peptides. *Foods*, 9(10), 1–17. <https://doi.org/10.3390/foods9101406>
- Colla, G., Roupshael, Y., Canaguier, R., Svecova, E., & Cardarelli, M. (2014). Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Frontiers in Plant Science*, 5(September), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00448>
- Estrella-Romo, D. A. (2008). *Amino acid composition and nitrogen to protein conversion factors for three legumes and two pseudo-cereals*.
- Famuwagun, A. A., Alashi, A. M., Gbadamosi, S. O., Taiwo, K. A., Oyedele, D., Adebooye, O. C., & Aluko, R. E. (2021). Effect of protease type and peptide size on the in vitro antioxidant, antihypertensive and anti-diabetic activities of eggplant leaf protein hydrolysates. *Foods*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/foods10051112>
- Ganesan, K., & Xu, B. (2018). *Food Science and Human Wellness*, 7, 11–33.
- Hou, D., Yousaf, L., Xue, Y., Hu, J., Wu, J., Hu, X., Feng, N., & Shen, Q. (2019). Mung bean (*Vigna radiata* L.): Bioactive polyphenols, polysaccharides, peptides, and health benefits. In *Nutrients* (Vol. 11, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu11061238>
- Lee, C. H. (2017). A simple outline of methods for protein isolation and purification. *Endocrinology and Metabolism*, 32(1), 18–22. <https://doi.org/10.3803/EnM.2017.32.1.18>
- Leni, G., Soetemans, L., Caligiani, A., Sforza, S., & Bastiaens, L. (2020). Degree of hydrolysis affects the techno-functional properties of lesser mealworm protein hydrolysates. *Foods*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/foods9040381>
- Li, G. H., Le, G. W., Liu, H., & Shi, Y. H. (2005a). Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Food Science and Technology International*. <https://doi.org/10.1177/1082013205056781>
- Li, W., Shu, C., Yan, S., & Shen, Q. (2010). Characteristics of sixteen mung bean cultivars and their protein isolates. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(6), 1205–1211. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02259.x>
- Li, X., Huang, J., Wang, Z., Jiang, X., Yu, W., Zheng, Y., Li, Q., & He, N. (2014). Alkaline extraction and acid precipitation of phenolic compounds from longan (*Dimocarpus longan* L.) seeds. *Separation and Purification Technology*, 124, 201–206. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.01.030>
- Mæhre, H. K., Dalheim, L., Edvinsen, G. K., Elvevoll, E. O., & Jensen, I. J. (2018). Protein determination—method matters. *Foods*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/foods7010005>
- Mallesappa Gowder, S., Chatterjee, J., Chaudhuri, T., & Paul, K. (2014). Prediction and analysis of surface hydrophobic residues in tertiary structure of proteins. *The Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/971258>
- Matsumiya, Y., & Kubo, M. (2011). Soybean Peptide: Novel Plant Growth Promoting Peptide from Soybean. *Soybean and Nutrition*, 215–230. <https://doi.org/10.5772/32009>
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Schiavon, M., & Ertani, A. (2016). Plant biostimulants: Physiological responses induced by protein hydrolyzed-based products and humic substances in plant metabolism. *Scientia Agricola*, 73(1), 18–23. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0006>

- Ni, H., Hayes, H., Stead, D., Liu, G., Yang, H., Li, H., & Raikos, V. (2020). Interaction of whey protein with polyphenols from salal fruits (*Gaultheria shallon*) and the effects on protein structure and hydrolysis pattern by Flavourzyme®. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(3), 1281–1288. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14394>
- Prachansuwan, A., Kriengsinyos, W., Judprasong, K., Kovitvadhi, A., & Chundang, P. (2019). Effect of different pre-boiling treatment on in vitro protein and amino acid digestibility of mung beans [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. *Malaysian Journal of Nutrition*, 25(3), 361–375. <https://doi.org/10.31246/mjn-2019-0046>
- Sbroggio, M. F., Montilha, M. S., Figueiredo, V. R. G. de, Georgetti, S. R., & Kurozawa, L. E. (2016). Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity of okara protein hydrolysates. *Food Science and Technology*, 36(2), 375–381. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.000216>
- Sonklin, C., Laohakunjit, N., & Kerdchoechuen, O. (2011). Physicochemical and flavor characteristics of flavoring agent from mungbean protein hydrolyzed by bromelain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(15), 8475–8483.
- Tang, D., Dong, Y., Ren, H., Li, L., & He, C. (2014). A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common food mung bean and its sprouts (*Vigna radiata*). In *Chemistry Central Journal*. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-8-4>
- Valencia, P., Pinto, M., & Almonacid, S. (2014). Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry*, 49(2), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.11.012>
- Valenzuela, C., Abugoch, L., Tapia, C., & Gamboa, A. (2013). Effect of alkaline extraction on the structure of the protein of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) and its influence on film formation. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 843–849. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12035>
- Viernes, L. B. G., Garcia, R. N., Torio, M. A. O., & Angelia, M. R. N. (2012). Antihypertensive peptides from vicilin, the major storage protein of mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). *Journal of Biological Sciences*, 12(7), 1–7. <https://doi.org/10.3923/jbs.2012.393.399>
- Wang, M., Jiang, L., Li, Y., Liu, Q., Wang, S., & Sui, X. (2011). Optimization of extraction process of protein isolate from mung bean. *Procedia Engineering*, 15, 5250–5258. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.08.973>
- Xia, J., Song, H., Huang, K., Li, S., & Guan, X. (2020). Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of mungbean protein. *Journal of Food Science*, 85(6), 1735–1741. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15139>
- Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., Yakhin, I. A., & Brown, P. H. (2017). Biostimulants in plant science: A global perspective. *Frontiers in Plant Science*, 7(January), 2049. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>
- Yi-shen, Z., Shuai, S., & Fitzgerald, R. (2018). Mung bean proteins and peptides: nutritional, functional and bioactive properties. *Food & Nutrition Research*, 62, 1–11. <https://doi.org/10.29219/fnr.v62.1290>
- Yousaf, Z., Saleh, N., Ramazan, A., & Aftab, A. (2016). Postharvesting Techniques and Maintenance of Seed Quality. *New Challenges in Seed Biology - Basic and Translational Research Driving Seed Technology*. <https://doi.org/10.5772/64994>
- Zheng, Z., Wang, M., Li, J., Li, J., & Liu, Y. (2020). Comparative assessment of physicochemical and antioxidative properties of mung bean protein hydrolysates. *RSC Advances*, 10(5), 2634–2645. <https://doi.org/10.1039/c9ra06468k>