

超声辅助酶解对绿豆肽结构和抗氧化性的影响

胡锦涛¹, 曹荣安¹, 陈洪生¹, 刁静静^{2*}

¹黑龙江八一农垦大学食品学院 黑龙江大庆 163319

²黑龙江八一农垦大学 国家杂粮工程技术研究中心 黑龙江大庆 163319

摘要 采用超声辅助酶解绿豆蛋白以提高肽的得率及抗氧化能力,促进植物蛋白在食品中的应用。研究单独超声处理、超声-酶解处理对绿豆蛋白结构特性,以及对绿豆肽结构和抗氧化活性的影响,结果表明,采用超声功率 400 W,超声时间 15 min,选择碱性蛋白酶,酶解 4 h 的方法提高了绿豆肽的得率、氮溶指数、水解度和抗氧化活性,与未超声处理的酶解产物相比,其分别提高了 17.8%,11.1%,5.8%,14.7%,表明超声预处理显著提高了绿豆蛋白的酶解效率和活性。结构分析表明,超声预处理产生的高剪切、机械能和空化效应改变了绿豆蛋白的分子构象,使超声辅助酶解处理组的二级结构中 α -螺旋和 β -折叠含量降低, β -转角和无规则卷曲含量增加,平均粒径降低了 89%, ζ 电位值提高了 4.4 倍,且蛋白颗粒明显减小。与单一酶解产物相比,超声辅助酶解产物的分子质量显著降低,说明该方法是提高绿豆蛋白利用率的有效方法之一,研究结果可为绿豆蛋白在食品加工中的应用提供理论依据。

关键词 绿豆蛋白; 绿豆肽; 超声处理; 抗氧化活性

文章编号 1009-7848(2025)01-0239-13 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2025.01.023

绿豆是我国主要的传统豆科作物,营养价值较高。其含有蛋白质、淀粉、纤维素、矿物质、人体所需的必需氨基酸和铁等微量元素,是当前欧美地区最受消费者欢迎的食品之一^[1]。绿豆蛋白含量占籽粒的 19.5%~33.1%,约为小麦、玉米蛋白的 2~3 倍^[2],且绿豆蛋白易消化,不易诱发过敏反应^[3],因此欧盟食品安全局将绿豆蛋白列入新型食品,并将其推荐作为婴幼儿和中老年食品的补充剂^[4]。而绿豆的工业化利用多以生产淀粉制品为主,绿豆蛋白因溶解性较差,提取效率低等弊端,多作为副产物而被低值化处理,这造成优质资源的严重浪费^[5]。近年来,研究发现酶解是一种提高蛋白利用率的有效途径,既可改善绿豆蛋白的加工特性,又可极大地提升蛋白质的营养价值。Chunkao 等^[6]发现酶解可以有效提高绿豆蛋白 ACE 抑制活性和抗氧化活。Kusumah 等^[7]发现酶法得到的绿豆蛋白水解物的生物活性显著优于未酶解蛋白。刁静静^[7]发现绿豆肽具有调节机体免疫活

性的能力,其通过诱导巨噬细胞激活细胞因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的表达,抑制 LPS 诱导产生 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等细胞因子,发挥双向调节机体免疫活性的能力。以上研究结果表明酶法得到的绿豆蛋白水解物的生物活性显著优于未酶解蛋白。

超声波作为一种安全环保的技术,在食品工业中得到广泛应用。超声波处理是一种新的非热辐射技术,在声场作用下,介质间通过相互作用产生热效应、机械效应和空化效应使蛋白质等生物大分子构象发生改变^[8]。仲志峰^[9]研究发现超声处理会改变绿豆蛋白的结构,引起界面活性和乳化功能的增加。肖雪等^[10]研究发现超声处理改变了草鱼鳞胶原蛋白的分子结构,使更多亲水基团暴露,有利于底物与风味蛋白酶的结合,促进草鱼鳞蛋白的水解程度。常慧敏等^[11]发现超声波辅助酶解可促进木瓜蛋白酶裂解位点的暴露,水解时间减少 1 h,酶用量减少 1.4 倍,米糠蛋白的水溶性提高了近 2 倍。然而,超声处理绿豆蛋白酶解产物的生物活性及酶解效率还不清楚。结合课题组前期筛选得到的绿豆蛋白最优酶解工艺条件,本文优化超声辅助酶解绿豆蛋白的工艺,研究其结构和抗氧化活性的变化,探讨超声辅助酶法对绿豆蛋白水解物结构和抗氧化活性的影响,为绿豆蛋

收稿日期: 2024-01-24

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(SS2022C002); 黑龙江省“百千万”工程科技重大专项(2021ZX12B06)

第一作者: 胡锦涛,男,硕士

通信作者: 刁静静 E-mail: diaojing62@163.com

白的高值化利用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

绿豆蛋白粉(蛋白质量分数 82%), 山东优承生物科技(烟台)有限公司; 胃蛋白酶(3 000 U/mg)、胰蛋白酶(250 U/mg)、中性蛋白酶(100 U/mg)、碱性蛋白酶(200 U/mg)、L-组氨酸、铁氰化钾(分析纯级), 上海麦克林生化科技有限公司; 复合蛋白酶(120 U/mg), 上海源叶生物科技有限公司; 硫代硫酸钠(五水, 分析纯级)、抗坏血酸钠、2,2-联苯基-1-苦基肼基(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)、2-硫代巴比妥酸(2-Thiobarbituric acid, TBARS)、三氯乙酸-盐酸溶液(TCA-HCL), 济南博航生物技术有限公司; 菲洛嗪(分析纯级)、邻二氮菲(分析纯级)、硫酸亚铁、氯化亚铁、氯化铁, 北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

JY99-IIDN 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; FA2204B 电子天平, 济南好来宝医疗器材有限公司; JC-UT2000 紫外可见分光光度计、FE28-Standard 数显 pH 检测仪、GL-25M 高速冷冻离心机, 湖南湘仪离心机仪器有限公司; SCIENTZ-10N 冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; QP-1910 实验室超纯水仪, 滕州卓普分析仪器有限公司; Thermo Nicolet iS5 傅里叶红外变换光谱分析仪(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR), 美国赛默飞公司; V388s 氨基酸分析仪, 德国曼默博尔。

1.3 方法

1.3.1 超声预处理绿豆蛋白 将 10 g 绿豆蛋白粉末溶于 100 mL 去离子水中, 用 1 mol/L 的 NaOH 溶液调 pH 值至 7.0。采用超声波细胞粉碎机, 设置相应的超声功率(200, 300, 400, 500, 600 W)和超声时间(5, 10, 15, 20, 25 min)对绿豆蛋白溶液进行超声处理。并设定温度 25 °C, 间歇时间 5 s/5 s。

1.3.2 绿豆蛋白酶解物的制备 在超声得到的绿豆蛋白中加入适量去离子水, 配成 7% 的蛋白溶液。放于 95 °C 水浴锅中预热 10 min, 静置到室温, 用 1 mol/L 的 NaOH 溶液将蛋白质溶液 pH 值调至各种酶(胃蛋白酶、复合蛋白酶、中性蛋白酶、胰

蛋白酶、碱性蛋白酶)的最适 pH 值。添加 2% 的蛋白酶, 在最适酶反应温度下进行酶解试验。酶解过程中用 1 mol/L 的 NaOH 溶液或者 1 mol/L 的盐酸溶液保持体系的 pH 值恒定。酶解反应结束后, 升温至 95 °C 保持 10 min 灭酶。将上述酶解液以 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用。

1.3.3 绿豆蛋白酶解物的理化指标测定

1.3.3.1 肽得率 利用双缩脲试剂法^[12]测量酶解液中的可溶性蛋白含量。取 1 mL 酶解液于试管中, 加入 4 mL 双缩脲试剂, 在涡旋振荡器上混匀, 室温放置 30 min, 于波长 540 nm 处测定吸光度。利用凯氏定氮仪测定绿豆总蛋白含量。利用公式(1)计算肽得率。

$$\text{肽得率}(\%) = \frac{C \times V \times 10}{m} \times 100 \quad (1)$$

式中: C 为蛋白酶解物的含量, mg/g; V 为蛋白酶解物的体积, mL; m 为绿豆总蛋白含量, g。

1.3.3.2 氮溶指数(Nitrogen soluble index, NSI)

采用廖小微^[13]的方法, 将样品配成 1% 的溶液, 在 30 °C 下振荡 2 h 后, 4 000 r/min 离心 20 min。测定上清液中的蛋白含量。用凯氏定氮法测定绿豆总蛋白含量。利用公式(2)计算 NSI。

$$\text{NSI}(\%) = \frac{N_1}{N_2} \times 100 \quad (2)$$

式中: N_1 为上清液中的蛋白含量, g; N_2 为绿豆总蛋白含量, g。

1.3.3.3 水解度(Degree of hydrolysis, DH) 参考刘恩岐^[14]的方法, 使用 pH-stat 法测定样品的 DH。依据酶解过程酸/碱添加量, 按照公式(3)计算:

$$\text{DH}(\%) = \frac{B \times c}{\alpha \times h_{\text{tot}} \times m} \times 100 \quad (3)$$

式中: B 为加酸/碱量, mL; c 为酸/碱的浓度, mol/L; α 为正常酶解温度、中性 pH 值下, 蛋白氨基酸的平均解离度; h_{tot} 为每克蛋白质底物具有的肽键毫摩尔数, 绿豆蛋白为 7.9 mmol/g; m 为样品蛋白含量, g。

1.3.4 绿豆蛋白及其酶解物的抗氧化活性测定

1.3.4.1 DPPH 自由基清除能力测定 参考刘妍兵等^[15]的研究方法。0.0125 g 的 DPPH 粉末与 400 mL 无水乙醇充分混匀后, 定容至棕色容量瓶(500 mL)中, 既配制得到 DPPH 溶液。将 2 mL 样品溶液与 8 mL DPPH 溶液充分混合, 在黑暗中放置

30 min。取适量上述混合液于比色皿中,用紫外可见分光光度计测定吸光度(517 nm),记为 A_s 。2 mL无水乙醇代替样品溶液测得吸光度记为 A_0 。使用公式(4)计算样品的DPPH自由基清除能力。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = (1 - \frac{A_s}{A_0}) \times 100 \quad (4)$$

1.3.4.2 羟自由基清除能力测定 选用邻二氮菲法测定绿豆蛋白及其羟自由基清除能力^[16]。取配制好的邻二氮菲溶液(0.75 mmol/L)1 mL,与磷酸缓冲液(0.1 mol/L,2 mL)、绿豆蛋白或绿豆酶解物样品溶液(1 mL)充分混合,之后再加入现配制的硫酸亚铁溶液1 mL,混匀后,加入过氧化氢水溶液(1.74 g/L)1 mL,将匀浆置于恒温水浴锅中(37 ℃)加热60 min。取适量上述混合液于比色皿中,用紫外可见分光光度计测定吸光度(536 nm),记为 A_s ;1 mL蒸馏水代替绿豆蛋白或绿豆酶解物样品溶液,记为 A_0 ;1 mL蒸馏水代替过氧化氢水溶液,记为 A_H 。按公式(5)计算蛋白及其酶解物的羟自由基清除率。

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = \frac{A_s - A_0}{A_H - A_0} \times 100 \quad (5)$$

1.3.4.3 硫代巴比妥酸(Thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)值的测定 参考Vhangani等^[17]的方法并稍作修改。准确称量4.4736 g的氯化钾和0.3880 g的L-组氨酸,定容至500 mL容量瓶中,配制成组氨酸-KCl溶液(pH 6.8)。取上述溶液于烧杯中并加入5 g大豆卵磷脂,4 ℃下利用超声波处理45 min,既得卵磷脂溶液。取5 mL卵磷脂溶液,0.1 mL 50 mmol/L的氯化铁溶液与0.1 mL 10 mmol/L的抗坏血酸钠溶液充分混合后,加入绿豆蛋白或绿豆酶解物样品溶液1 mL,混合均匀后,置于水浴(37 ℃)加热60 min。

反应结束凉至室温后,取0.5 mL上述混合液,加入TCA-HCl溶液(8.5 mL)和TBARS溶液(1.5 mL)混匀,置于沸水浴中加热30 min。冷却至室温后,加入 CHCl_3 溶液(10.5 mL),充分摇匀后3 500 r/min离心10 min,取适量上述混合液于比色皿中,用紫外可见分光光度计测定吸光度(532 nm),记为 A_s 。利用公式(6)计算蛋白酶解物的TBARS值。

$$\text{TBARS}(\text{mg/L}) = \frac{A_s}{V} \times 9.48 \quad (6)$$

式中: V 为样品体积,mL;9.48为常数。

1.3.4.4 还原能力的测定 参考张江涛等^[18]的方法。取5 mL的0.2 mol/L的磷酸液缓冲溶液与5 mL质量分数为1%的铁氰化钾溶液充分混合后,加入绿豆蛋白或绿豆酶解物样品溶液5 mL,混合均匀后,将匀浆置于恒温水浴锅中(50 ℃)加热20 min,凉至室温后,加入三氯乙酸溶液(100 g/L,2.5 mL)和 FeCl_3 溶液(0.5 mL),混合均匀后静置10 min,取适量上述混合液于比色皿中,用紫外可见分光光度计测定吸光度(700 nm),以吸光度表示绿豆蛋白及其酶解物的还原能力。

1.3.4.5 Fe^{2+} 螯合能力的测定 参考Akindoyeni等^[19]的方法,并稍作修改。取4 mL浓度为2 mmol/L的 FeCl_2 溶液和4 mL浓度为0.5 mmol/L的非洛嗪溶液于10 mL离心管中,加入1 mL的绿豆蛋白或其酶解样品溶液,混匀后静置10 min,取适量上述混合液于比色皿中,用紫外可见分光光度计测定吸光度(562 nm)记为 A_s ;1 mL蒸馏水代替样品溶液的吸光度记为 A_0 。按公式(7)计算绿豆蛋白及其酶解物的 Fe^{2+} 螯合率。

$$\text{Fe}^{2+}\text{螯合能力}(\%) = (1 - \frac{A_s}{A_0}) \times 100 \quad (7)$$

1.3.5 绿豆蛋白及其酶解物结构性质的测定

1.3.5.1 氨基酸组成的测定 氨基酸组成采用Liu等^[20]的方法,略作修改。将冻干的绿豆蛋白及其酶解产物(100 mg)溶解在2 mL的去离子水中。用12 mL HCl溶液(6 mol/L),加入3~4滴苯酚后冷冻5 min,在110 ℃,氮气气氛下酶解22 h。酶解产物冷却至室温后,用双层滤纸过滤,得到的酶解物用超纯水稀释并定容至50 mL。稀释后的溶液用0.22 μm 膜过滤器过滤,然后用氨基酸自动分析仪进行分析。

1.3.5.2 傅里叶红外光谱的测定 将干燥的样品充分研磨后,过200目筛,取10 mg粉末与100 mg溴化钾混合,压成1 mm的薄片。采集背景后,扫描每个样本(500~4 000 cm^{-1})。测量分辨率为4 cm^{-1} ,扫描32次。

1.3.5.3 粒径和 ζ 电位的测定 用磷酸缓冲液与样品充分混合,制备质量浓度为1 mg/mL的样品

溶液,吸取 1 mL 于测试皿中采用激光粒度仪测定样品的粒径和 ζ 电位。

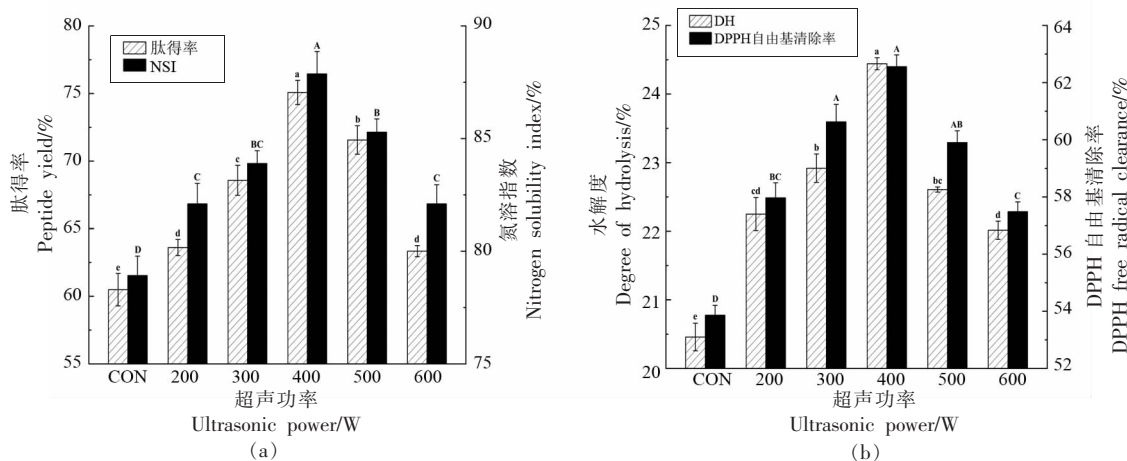
1.3.5.4 相对分子质量分布的测定 采用高效液相色谱法测定绿豆蛋白组分和绿豆蛋白酶解物组分的相对分子质量分布,为避免堵塞 TSK-GEL G4000 SWXL 排阻色谱柱,将 10 μ L 的样品溶液经 0.45 μ m 膜过滤后,再进行上样检测。以 Na_2SO_4 (0.1 mol/L, pH 7.0) 和磷酸盐缓冲液 (0.1 mmol/L, pH 7.0) 作为流动相,流速 1.0 mL/min,检测波长 220 nm 下的洗脱物。

1.3.6 数据处理 所有试验重复 3 次,数据使用 Statistix 8.0 软件包(FL,USA)进行统计学分析。结果用“平均值 \pm 标准差”表示。采用 Tukey's HSD 检验来比较样本间的平均值($P < 0.05$)。所有数据均使用 Origin 2018 软件 (OriginLab,MA,USA)绘图。

2 结果与分析

2.1 超声辅助酶解制备绿豆蛋白酶解产物工艺的优化

2.1.1 不同超声功率对绿豆蛋白酶解产物水解效



注:CON 指未超声处理的绿豆蛋白酶解物(绿豆蛋白经碱性蛋白酶水解 3 h),不同小写字母和大写字母代表各组差异显著, $P < 0.05$,下同。

图 1 不同超声功率对绿豆蛋白酶解产物水解效果和抗氧化活性的影响

Fig.1 Effect of different ultrasonic power on the hydrolysis effect and antioxidant activity of mung bean proteolytic products

2.1.2 不同超声时间对绿豆蛋白酶解产物水解效果和抗氧化活性的影响 图 2 为不同超声时间对绿豆蛋白酶解产物水解效果和抗氧化能力的影响。

果和抗氧化活性的影响 图 1 为不同超声功率处理对绿豆蛋白酶解产物水解效果和抗氧化能力的影响。设定超声时间 15 min,酶解时间 3 h,采用碱性蛋白酶对绿豆蛋白进行水解,分别选择 200, 300,400,500,600 W 共 5 个超声功率,对绿豆蛋白进行处理,再进行酶解反应,最后测定肽得率、NSI、水解度和 DPPH 自由基清除率如图 1a 和 1b 所示。结果可知,不同超声功率处理后,绿豆蛋白酶解产物的肽得率、NSI、水解度和 DPPH 自由基清除能力均发生了显著变化,在超声功率 400 W 以下,绿豆蛋白酶解物的水解效果和抗氧化能力均随着超声功率的增加而增加,在 400 W 时,其肽得率和 NSI 较未超声蛋白酶解物增加了 14.586% 和 8.951%,水解度和 DPPH 自由基清除率也增加了 3.983% 和 8.695%;在超声功率高于 400 W 时,其水解效果和抗氧化能力又发生显著降低,而仍高于未超声处理绿豆蛋白酶解物,这是由于较高的功率产生的热效应导致部分蛋白发生聚集,这与 Wang 等^[21]的研究结果相似。因此,选择最佳超声功率为 400 W。

响。设定超声功率为 400 W,酶解时间 3 h,采用碱性蛋白酶水解绿豆蛋白,分别考察 5,10,15,20, 25 min 共 5 个超声时间处理的绿豆蛋白酶解产物

水解效果和抗氧化能力的变化。结果发现,随着超声时间的延长,其水解效果和抗氧化能力逐渐增大,超声时间为 15 min 时,其肽得率、NSI 较未超声处理蛋白酶解物提高了 14.586% 和 8.951%,抗氧化活性增加了 8.695%,这表明超声预处理可以破坏蛋白结构,提高其水解程度,促进生物活性大

分子的暴露;当超声时间超过 15 min,其水解效果和抗氧化能力均发生了不同程度的降低,25 min 时,其抗氧化能力降低了 3.381%,这表明,超声时间的延长导致蛋白发生聚集,使具有抗氧化活性的功能基团再次被包埋^[21]。因此,选择最佳超声时间为 15 min。

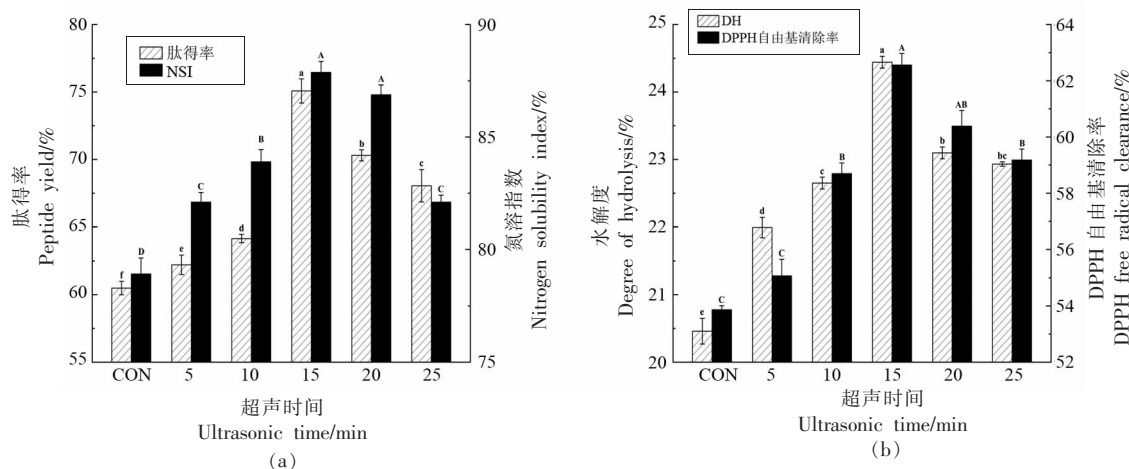
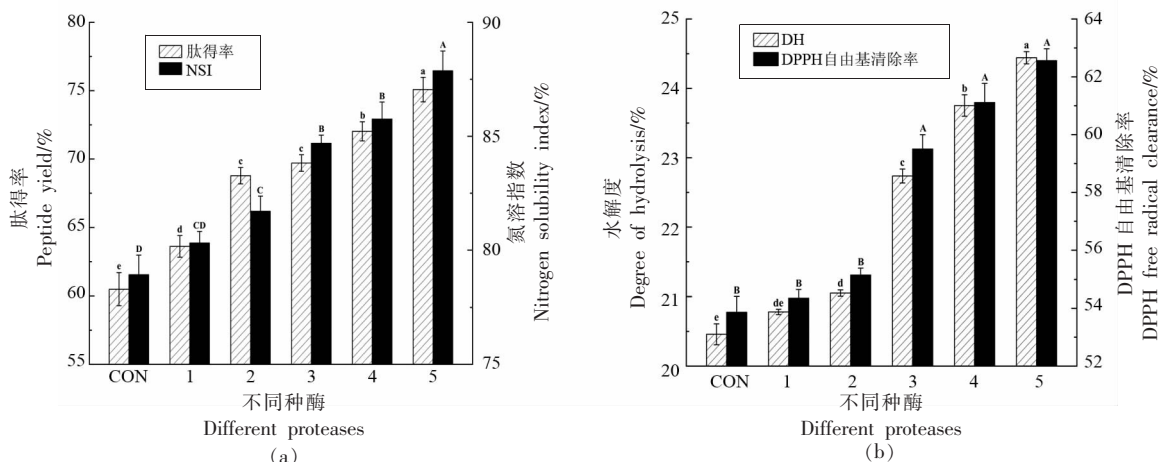


图 2 不同超声时间对绿豆蛋白酶解产物水解效果和抗氧化活性的影响

Fig.2 Effect of different sonication times on the hydrolysis effect and antioxidant activity of mung bean proteolytic products

2.1.3 不同蛋白酶对超声处理绿豆蛋白酶解产物水解效果和抗氧化活性的影响 图 3 为不同种酶对绿豆蛋白酶解产物水解效果和抗氧化能力的影响。设定超声功率为 400 W,超声时间 15 min,酶解时间 3 h,考察胃蛋白酶、复合蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶 5 种酶处理的绿豆蛋白

酶解产物水解效果和抗氧化能力的变化。结果发现,碱性蛋白酶酶解物的水解效果和抗氧化能力最强 ($P < 0.05$),这是由于不同酶解物的作用位点不同,其释放的产物不同。Dada 等^[22]研究发现不同种酶水解白桂木果肉蛋白得到的产物活性不同。根据试验结果可以看出超声辅助酶解绿豆蛋白酶



注: 1. 胃蛋白酶, 2. 复合蛋白酶, 3. 中性蛋白酶, 4. 胰蛋白酶, 5. 碱性蛋白酶。

图 3 不同蛋白酶对绿豆蛋白酶解产物水解效果和抗氧化活性的影响

Fig.3 Effect of different proteases on the hydrolysis effect and antioxidant activity of mung bean proteolytic products

解物的肽得率、NSI、水解度和 DPPH 自由基清除率分别达到 75.079%, 87.875%, 24.442%, 62.56%, 较未超声处理蛋白酶解物增加了 14.586%, 8.951%, 3.961%, 8.695%。这可能是由于超声处理促进了蛋白结构展开, 增强了酶解效果。因此, 选择最佳蛋白酶为碱性蛋白酶。

2.1.4 不同酶解时间对超声处理绿豆蛋白酶解产物水解效果和抗氧化活性的影响 图 4 为不同酶解时间对绿豆蛋白酶解产物水解效果和抗氧化能力的影响。设定超声功率为 400 W, 超声时间为 15 min, 利用碱性蛋白酶水解绿豆蛋白, 选取酶解时间 1, 2, 3, 4, 5 h, 对绿豆蛋白进行酶解时间条件优化。结果可知, 随着酶解时间的延长, 样品的水

解效果和抗氧化活性随之增加, 在 1~4 h 时, 随着酶解时间的延长, 肽得率、NSI、水解度和 DPPH 羟自由基清除率升高明显, 并在酶解时间为 4 h 时达到最高。其中肽得率、NSI、水解度和 DPPH 羟自由基清除率较未超声处理蛋白酶解物分别增加了 11.536%, 6.826%, 5.798%, 14.412%。这表明超声促进了水解效果的增加, 水解后具有抗氧化活性的肽段被大量释放, 使酶解物的抗氧化活性提高。当酶解时间大于 4 h 时, 绿豆蛋白的水解效果和抗氧化活性趋于平缓并略有下降, 这可能是由于水解时间过长, 使肽段被过度降解, 促进了小分子肽段发生交联, 引起水解物活性下降。因此, 选择最佳酶解时间为 4 h。

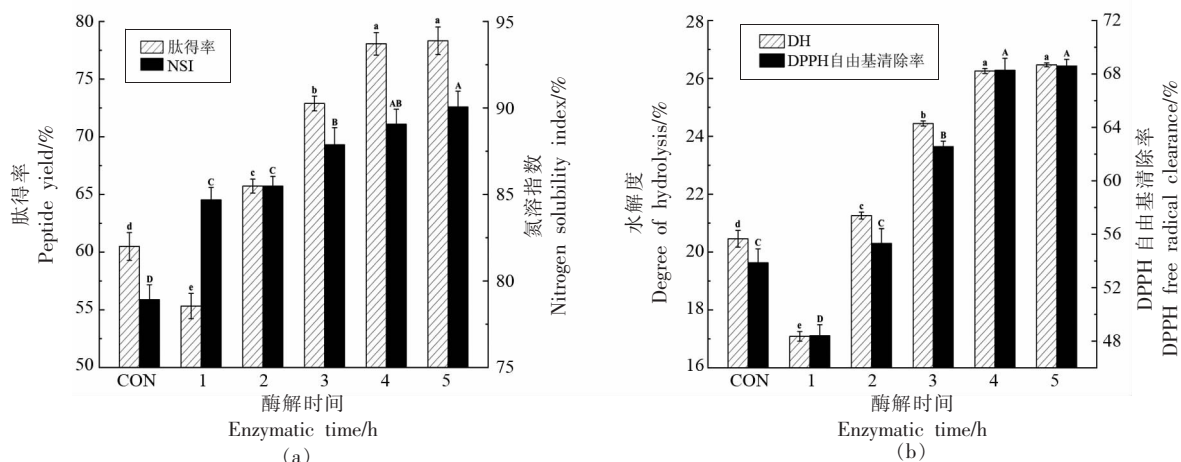


图 4 不同酶解时间对绿豆蛋白酶解产物水解效果和抗氧化活性的影响

Fig.4 Effect of different enzymatic times on the hydrolysis effect and antioxidant activity of mung bean proteolytic products

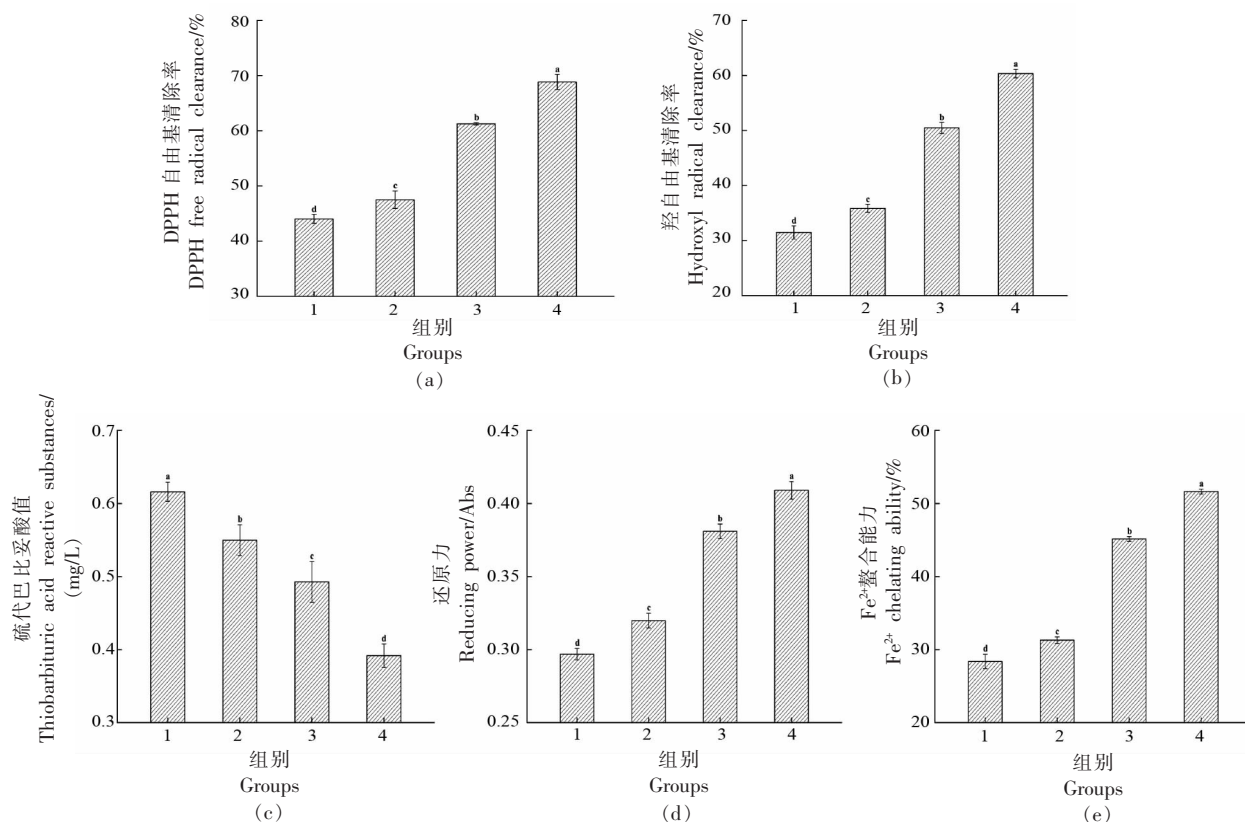
2.2 绿豆蛋白及其酶解物的抗氧化活性

图 5 为超声处理绿豆蛋白酶解产物的抗氧化活性。由图可知, 不同处理组样品的抗氧化活性显著不同, 与未处理绿豆蛋白相比, 超声处理绿豆蛋白的抗氧化能力均表现出增加的趋势, 其 DPPH 自由基清除率、羟基自由基清除率、 Fe^{2+} 螯合能力和还原能力分别提高了 3.462%, 4.386%, 2.931% 和 0.023 Abs, TBARS 值降低了 0.066 mg/L, 这可能是由于超声处理产生的剪切力, 使蛋白暴露出更多的反应基团, 从而增强了绿豆蛋白的抗氧化能力。与单一酶解产物相比, 超声处理绿豆蛋白的酶解产物的抗氧化能力得到了显著提高, DPPH 自由基清除率、羟基自由基清除率、 Fe^{2+} 螯合能力和

还原能力分别提高了 7.569%, 9.845%, 6.696% 和 0.028 Abs, TBARS 值降低了 0.101 mg/L。Tanaskovic 等^[23]的研究结论同样发现, 超声辅助酶解处理使乳清蛋白的抗氧化活性明显增强。这可能是由于超声诱导的空化和机械作用破坏了蛋白质的致密结构, 暴露出更多的靶区, 使蛋白质与蛋白酶的结合同位点增多, 促进蛋白酶解, 从而得到更多具有抗氧化活性的肽段。由 DPPH 自由基清除能力和羟自由基清除能力的结果得出, 超声处理绿豆蛋白酶解产物较单一酶解产物提高了 7.569% 和 9.845% (图 5a 和 5b), 由图 5c 可以看出, 超声处理绿豆蛋白酶解产物的 TBARS 值显著低于单一酶解物, 这可能是由于在同样的酶解条件下, 超声

处理绿豆蛋白所得酶解产物中的小分子肽增多,可以在卵磷脂周围形成致密的保护层,从而抑制样品的氧化程度^[15]。超声处理绿豆蛋白酶解产物的还原能力和 Fe^{2+} 螯合能力显著高于单一酶解产物(图 5d 和 5e),这是由于超声处理蛋白得到的酶

解产物结构发生改变,使得具有抗氧化活性的基团更易与反应体系中 Fe^{2+} 结合形成螯合物,从而提高 Fe^{2+} 螯合能力^[23]。综上研究得出,在同等酶解处理条件下,超声处理绿豆蛋白酶解产物具有更好的抗氧化活性。



注:1. 对照组(未处理的绿豆蛋白);2. 超声预处理组;3. 酶解处理组;4. 超声辅助酶解处理组。

图 5 绿豆蛋白及其酶解物的抗氧化活性

Fig.5 Antioxidant activity of the mung bean protein and its hydrolysates

2.3 绿豆蛋白酶解产物的结构表征

2.3.1 绿豆蛋白酶解产物游离氨基酸组成 氨基酸数量和组成是影响食物蛋白质营养价值的主要因素^[24]。表 1 为未超声与超声处理的绿豆蛋白及其酶解物的游离氨基酸组成。由表 1 可知,超声处理绿豆蛋白酶解产物的疏水氨基酸(苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、缬氨酸、脯氨酸、丙氨酸、甘氨酸)含量是 27.92 g/100 g,与未超声酶解产物相比显著提高。现在研究已证实^[25],蛋白酶解物的抗氧化能力与其疏水性氨基酸在一定范围内呈正比,疏水性氨基酸含量高时,其清除自由基的能力更强。其中 Fan 等^[25]的研究发现低分子质量的核

桃蛋白水解物中疏水性氨基酸的含量最高为 22%,自由基清除能力更强。表 1 研究结果发现超声处理绿豆蛋白酶解产物中的疏水性氨基酸较单一酶解产物高,结合图 5a 和 5b,其具有更好的清除自由基能力,这表明超声处理绿豆蛋白酶解产物中的疏水氨基酸增多,赋予了其较强的清除自由基能力。另外,酶解物的自由基清除能力与芳香族氨基酸含量也呈正相关^[26],当酶解物中含有较高的酪氨酸和苯丙氨酸残基时也会有较高的抗氧化能力^[27]。与对照组相比,超声预处理组、酶解处理组、超声辅助酶解处理组的芳香族氨基酸分别提高了 1.22%,2.13%,3.10%。天冬氨酸和谷氨酸

能提高样品的抗氧化能力,超声预处理组、酶解处理组和超声辅助酶解处理组中的天冬氨酸的含量分别是 8.52,8.98,9.11 g/100 g,谷氨酸的含量分别

是 13.08,15.01,15.53 g/100 g。以上研究结果表明,具有较高的抗氧化能力的超声处理绿豆蛋白酶解产物与其游离氨基酸组成及含量有关。

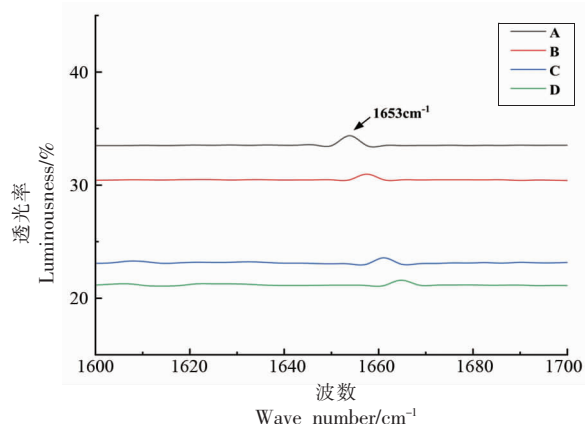
表 1 绿豆蛋白及其酶解物的游离氨基酸组成(g/100 g)

Table 1 Free amino acid composition of mung bean proteins and their enzymes (g/100 g)

氨基酸	对照组	超声预处理组	酶解处理组	超声辅助酶解处理组
天冬氨酸	8.25 ± 0.23 ^b	8.52 ± 0.21 ^b	8.98 ± 0.24 ^a	9.11 ± 0.17 ^a
谷氨酸	12.52 ± 0.31 ^c	13.08 ± 0.29 ^b	15.01 ± 0.33 ^a	15.53 ± 0.25 ^a
丝氨酸	3.02 ± 0.06 ^a	2.96 ± 0.04 ^a	1.88 ± 0.02 ^b	1.66 ± 0.05 ^c
甘氨酸	2.91 ± 0.03 ^d	3.11 ± 0.10 ^c	3.29 ± 0.04 ^b	3.61 ± 0.07 ^a
组氨酸	2.16 ± 0.04 ^b	2.19 ± 0.05 ^b	2.25 ± 0.05 ^a	2.27 ± 0.01 ^a
苏氨酸	2.87 ± 0.02 ^a	2.65 ± 0.03 ^b	2.18 ± 0.02 ^c	2.01 ± 0.04 ^d
丙氨酸	3.05 ± 0.09 ^a	2.90 ± 0.03 ^b	2.65 ± 0.06 ^c	2.46 ± 0.01 ^d
精氨酸	6.45 ± 0.12 ^a	6.40 ± 0.14 ^a	6.36 ± 0.13 ^a	6.30 ± 0.19 ^a
脯氨酸	3.56 ± 0.10 ^a	3.87 ± 0.07 ^b	4.48 ± 0.11 ^c	4.93 ± 0.13 ^d
酪氨酸	2.62 ± 0.06 ^a	2.51 ± 0.09 ^a	2.39 ± 0.03 ^b	2.28 ± 0.05 ^b
缬氨酸	4.09 ± 0.15 ^b	4.11 ± 0.11 ^b	4.21 ± 0.12 ^{ab}	4.41 ± 0.15 ^a
蛋氨酸	0.71 ± 0.01 ^b	0.71 ± 0.01 ^b	0.73 ± 0.02 ^b	0.77 ± 0.01 ^a
半胱氨酸	1.09 ± 0.01 ^a	0.83 ± 0.03 ^b	0.55 ± 0.01 ^c	0.44 ± 0.02 ^d
异亮氨酸	3.12 ± 0.11 ^a	3.09 ± 0.13 ^a	3.06 ± 0.10 ^{ab}	2.88 ± 0.07 ^b
亮氨酸	5.24 ± 0.13 ^a	4.95 ± 0.17 ^b	4.55 ± 0.14 ^c	4.39 ± 0.12 ^c
苯丙氨酸	3.93 ± 0.09 ^a	4.12 ± 0.19 ^{ab}	4.30 ± 0.13 ^{bc}	4.47 ± 0.15 ^c
赖氨酸	5.51 ± 0.14 ^a	5.20 ± 0.17 ^b	5.08 ± 0.17 ^{bc}	4.83 ± 0.15 ^c
疏水氨基酸	26.61	26.86	27.27	27.92
芳香族氨基酸	6.55	6.63	6.69	6.75
总氨基酸	71.1	71.2	71.95	72.35

2.3.2 绿豆蛋白酶解产物傅里叶红外光谱图 傅里叶红外光谱可以反映出蛋白分子结构中的化学键和官能团。由图 6 可以看出,绿豆蛋白和超声处理的绿豆蛋白在酰胺 I 带(1 700~1 600 cm^{-1})的峰值分别是 1 653 cm^{-1} 和 1 657 cm^{-1} ,说明超声处理绿豆蛋白的红外光谱发生轻微红移,且酰胺 I 带吸收峰的强度降低,这表明超声处理后蛋白质的二级结构发生了不同程度的改变。Kingwaschara-pong 等^[28]也发现超声处理会改变孟买蝗虫蛋白的二级结构。酶解处理组和超声辅助酶解处理组的特征吸收峰分别是 1 661 cm^{-1} 和 1 664 cm^{-1} ,这可能是因为蛋白质-肽链的重排,改变了绿豆蛋白的酰胺 I 带峰值,从而使绿豆蛋白的二级结构发生改变。

利用去卷积分析得到 4 个样品的二级结构近似分布如表 2 所示。与对照组相比,超声预处理引起了绿豆蛋白的 α -螺旋 β -折叠 β -转角和无规



注:A. 对照组;B. 超声组;C. 酶解组;D. 超声辅助酶解组。

图 6 绿豆蛋白及其酶解物的傅里叶红外光谱图

Fig.6 Fourier infrared spectra of mung bean proteins and their enzymatic digests

则卷曲含量的变化,这表明超声预处理过程可以改变绿豆蛋白二级结构。与酶解处理组相比,超声辅助酶解处理组的 α -螺旋和 β -折叠含量显著降

低, β -转角和无规则卷曲含量显著增加, 这可能是由于超声产生的机械作用使绿豆蛋白结构趋于松散, 削弱了维系蛋白结构稳定的氢键作用力 (α -螺旋和 β -折叠的主要作用力), 增加了底物与酶的结合位点, 使有序的蛋白结构在水解后向无序形式转变。也可能是由于超声辅助酶解处理组得到的产物为分子质量更小的肽段, 无法形成较稳定

的 α -螺旋和 β -折叠。 α -螺旋和 β -折叠含量的减少会导致疏水基团位点暴露, 使绿豆蛋白抗氧化能力提高。Zhao 等^[29]的研究也证实超声预处理鹅肝蛋白的抗氧化能力升高与其 α -螺旋结构的降低有关。该研究结果表明超声处理绿豆蛋白酶解产物二级结构的变化, 是抗氧化能力提升的主要原因之一。

表 2 绿豆蛋白及其酶解物的二级结构

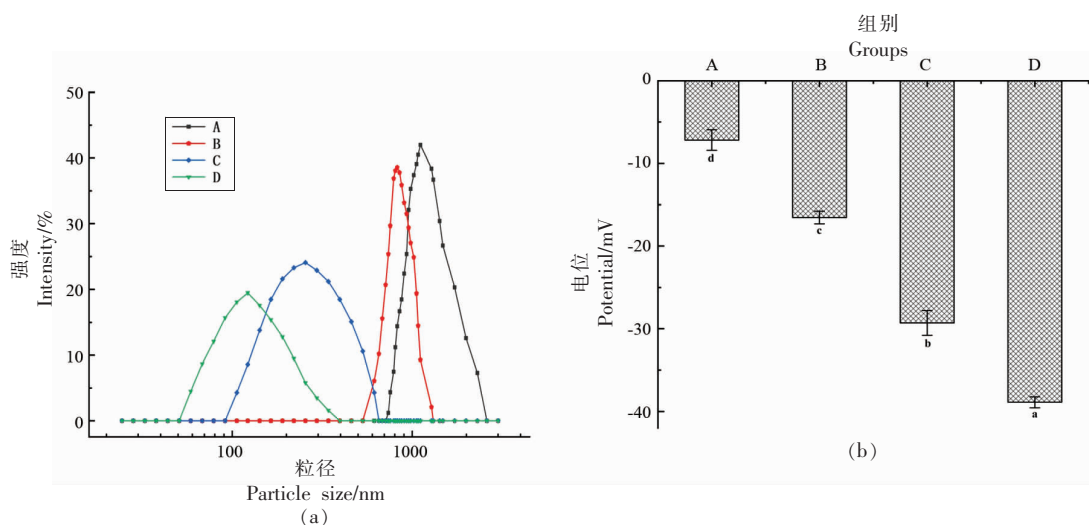
Table 2 Secondary structures of mung bean proteins and their enzymatic digests

样品	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规则卷曲
对照组	15.35 \pm 0.17 ^a	44.52 \pm 0.25 ^a	23.39 \pm 0.98 ^c	16.74 \pm 1.15 ^c
超声预处理组	13.63 \pm 0.34 ^b	41.18 \pm 0.56 ^b	22.14 \pm 1.01 ^c	23.05 \pm 0.49 ^a
酶解处理组	12.94 \pm 0.13 ^c	39.47 \pm 0.04 ^c	26.77 \pm 0.64 ^b	20.82 \pm 0.11 ^b
超声辅助酶解处理组	9.91 \pm 0.21 ^d	37.45 \pm 0.16 ^d	29.38 \pm 0.78 ^a	23.26 \pm 0.56 ^b

注: 不同小写字母代表各组差异显著, $P < 0.05$ 。

2.3.3 绿豆蛋白酶解产物粒径和 ζ 电位 粒径和 ζ 电位是表征分散体系中粒子表面的物理和化学性质的重要指标。如图 7a 和 7b 所示, 对照组、超声预处理组、酶解处理组、超声辅助酶解处理组的平均粒径和 ζ 电位分别是 1110, 825, 255, 122 nm 和 -7.17, -16.54, -29.31, -38.90 mV。绿豆蛋白经超声处理后, 平均粒径降低, ζ 电位显著增强。有研究表明, 超声波处理可以显著降低紫苏分离蛋白的粒径, 这与本研究结果相似^[30]。这可能是由于超声处理破坏了蛋白质的分子结构, 从而使其分子

颗粒尺寸减小。绿豆蛋白酶解后平均粒径显著降低, 此时大分子的蛋白质被酶解为小分子的多肽, 进一步使分散体系中粒子表面所带的电荷增加。而超声辅助酶解处理组的粒径与酶解处理组相比显著降低, 其粒径比未处理组降低了 89%, ζ 电位提高了 4.4 倍。这可能是由于超声处理引发的空化效应使绿豆蛋白分子展开, 暴露了更多的反应基团, 从而增加酶与蛋白质的接触位点和接触几率, 进一步促进酶解过程。Chen 等^[31]研究发现超声波预处理后的蛋白对蛋白酶更敏感, 最终使酶解



注: A. 对照组; B. 超声预处理组; C. 酶解处理组; D. 超声辅助酶解处理组。

图 7 绿豆蛋白及其酶解物的粒径和 ζ 电位Fig.7 Particle size and ζ -potential of mung bean proteins and their enzymatic digests

效率得以提高。Wang 等^[32]也发现超声波处理可以减小山核桃蛋白质的粒径,从而更有利于碱性蛋白酶酶解。

2.3.4 绿豆蛋白酶解产物的分子质量分布 分子质量分布从一定程度上可反映蛋白酶解的程度,以及酶解液中小分子质量肽段的含量。由表 3 可以看出蛋白分子质量主要分布在大于 2 000 u,而经酶解处理后(酶解处理组和超声辅助酶解处理组)分子质量主要分布于小于 1 000 u,这就意味着绿豆蛋白酶解后得到较多小分子质量的多肽。与对照组相比,超声预处理组大于 10 000 u 的分子质量从 35.73%降低到 20.17%,这些数据表明超声处理可能会引起空化效应,导致蛋白结构破坏,从而产生更多小分子物质,这与粒径和 ζ 电位的研究结果相同。同时,Yu 等^[33]和 Gu 等^[34]也得出

类似的结果。与酶解处理组相比超声辅助酶解处理组中分子质量大于 2 000,1 000~2 000,500~1 000 u 组分含量呈减少趋势,分子质量在 180~500 u 和小于 180 u 的组分含量明显增加。这也进一步证明超声预处理促进了绿豆蛋白的酶解。Lucia 等^[35]的研究也得出了相似的结论,其研究结果表明在酶解之前进行超声处理能够提高酶解液中小肽的生成量,这可能是由于超声处理后埋藏在绿豆蛋白内部的疏水性残基或基团暴露,导致碱性蛋白酶的作用位点增加,从而产生更多小分子肽。Tao 等^[36]采用碱性蛋白酶酶解辣木叶蛋白,结果表明分子质量较小的肽段具有更强的抗氧化活性。因此通过超声辅助酶解处理绿豆蛋白,可以得到较多的小分子质量肽段,也有利于其能够在机体中发挥更好的生物功效。

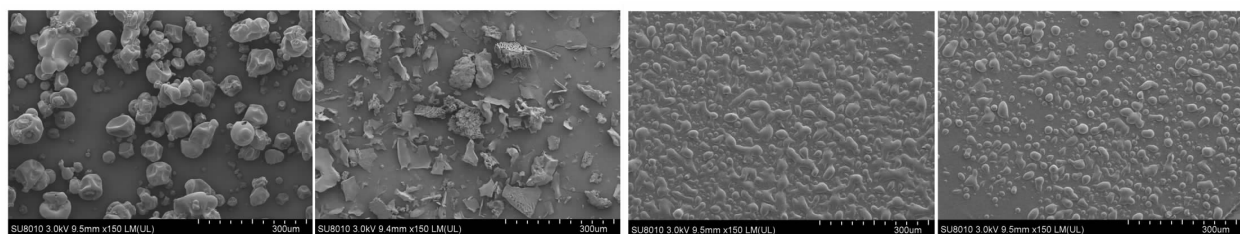
表 3 绿豆蛋白及其酶解物的分子质量分布

Table 3 Molecular weight distribution of mung bean protein and its hydrolysates

分子质量/u	含量/%			
	对照组	超声预处理组	酶解处理组	超声辅助酶解处理组
>10 000	35.73	20.17	0.2	0.09
10 000~5 000	18.79	26.7	0.75	0.38
5 000~2 000	16.03	42.85	3.22	2.65
2 000~1 000	14.12	1.03	12.22	10.75
1 000~500	3.98	0.78	30.59	30.17
500~180	7.01	3.27	46.01	48.69
<180	4.43	5.2	7.01	7.27

2.3.5 微观结构 图 8 是不同处理条件下绿豆蛋白及其酶解产物的微观结构变化。可以直观看出,绿豆蛋白是一种具有光滑表面的不规则球形结构(图 8a),超声处理得到的绿豆蛋白结构松散,呈碎片状、多孔状分布(图 8b)。Li 等^[37]发现南极磷虾蛋白经超声处理后,极大地破坏了磷虾蛋白质的天然分布和排列,蛋白样品显示出更无序的结构

和不规则的片段,这一结果与本研究类似。这可能是由于超声诱导的微射流和流体动力冲击将蛋白质聚集体解离出更多的孔状结构和更小的片段。酶解对不同处理绿豆蛋白的结构的影响如图 8c 和 8d 所示,单一酶解处理得到的绿豆蛋白酶解产物表面出现稠密、不规则的点状结构;超声辅助酶解处理得到的酶解产物则表现为较均一的球形液



(a)对照组(放大倍数 150) (b)超声预处理组(放大倍数 150) (c)酶解处理组(放大倍数 150) (d)超声辅助酶解处理组(放大倍数 150)

图 8 绿豆蛋白及其酶解物的微观结构

Fig.8 Microstructure of mung bean proteins and their enzymatic digests

滴状结构,且蛋白颗粒小于单一酶解产物,这可能是由于绿豆蛋白经超声后产生的多孔结构暴露出明显的酶切作用位点,使隐藏在蛋白质深处的疏水性氨基酸逐渐暴露,大大提高了酶解反应效果,因此在同等酶解条件下超声处理绿豆蛋白酶解产物的分子颗粒更小,抗氧化能力更强。

3 结论

本文探索制备具有较强抗氧化能力和较高水解效率的方法,研究得出超声辅助酶法可获得较高得率的酶解产物。通过单因素实验得出超声酶解工艺条件为:超声功率 400 W,超声时间 15 min,选择碱性蛋白酶,酶解时间 4 h。通过对酶解产物的抗氧化能力和结构表征结果得出,超声辅助酶解较未经超声得到的蛋白酶解物的抗氧化能力显著提高,并探明其原因在于超声处理使蛋白结构在酶解过程中的损坏程度加剧,破坏了蛋白的二级结构,使同一酶解条件下酶解物的粒径、分子质量均显著减小,且通过微观结构可直观看出超声辅助酶解得到的酶解物颗粒更小,暴露出更多的极性基团,从而提高了酶解物的抗氧化活性,该研究结果可为绿豆蛋白的综合开发应用提供新的方法和理论依据。

参 考 文 献

- [1] ZHAO T Y, MENG X, CHEN C, et al. Agronomic traits, fresh food processing characteristics and sensory quality of 26 mung bean (*Vigna radiata* L.) cultivars (Fabaceae) in China[J]. Foods, 2022, 11(12): 1687.
- [2] KUSUMAH J, HERNANDEZ L M R, MEJIA E G. Antioxidant potential of mung bean (*Vigna radiata*) albumin peptides produced by enzymatic hydrolysis analyzed by biochemical and in silico methods[J]. Foods, 2020, 9(9): 1241.
- [3] MA Y L, ZHOU S M, LU J. Metabolomic analysis reveals changes of bioactive compounds in mung beans (*Vigna radiata*) during γ -aminobutyric acid enrichment treatment[J]. Foods, 2022, 11(10): 1423.
- [4] ALI S, SINGH B, SHARMA, S. Response surface analysis and extrusion process optimisation of maize-mungbean-based instant weaning food[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2016, 51(10): 2301-2312.
- [5] DIAO J J, MIAO X, CHEN H S. Anti-inflammatory effects of mung bean protein hydrolysate on the lipopolysaccharide-induced RAW264.7 macrophages[J]. Food Science and Biotechnology, 2022, 31(7): 849-856.
- [6] CHUNKAO S, YOURAVONG W, YUPANQUI C T, et al. Structure and function of mung bean protein-derived iron-binding antioxidant peptides[J]. Foods, 2020, 9(10): 1406.
- [7] 刁静静. 绿豆肽对小鼠巨噬细胞免疫活性的影响及其作用机制[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2019. DIAO J J. Immunomodulatory activity and mechanism of mung bean peptides on macrophage [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2019.
- [8] ZHONG X Y, ZHANG S Y, WANG H, et al. Ultrasound-alkaline combined extraction improves the release of bound polyphenols from pitahaya (*Hylocereus undatus* (Foo-Lon) peel: composition, antioxidant activities and enzyme inhibitory activity[J]. Ultrason Sonochem, 2022, 90: 106213.
- [9] 仲志峰. 热超声处理对绿豆分离蛋白结构和界面活性及乳化功能的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2020. ZHONG Z F. The effect of thermosonication on structural, interfacial, and emulsifying properties of mung bean protein isolate[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.
- [10] 肖雪, 王金浩, 邵俊花, 等. 超声辅助酶法优化鸡肉蛋白水解工艺[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(2): 124-131. XIAO X, WANG J H, SHAO J H, et al. Optimization of ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of chicken protein[J]. Food Research and Development, 2023, 44(2): 124-131.
- [11] 常慧敏, 杨敬东, 田少君. 超声辅助木瓜蛋白酶改性对米糠蛋白溶解性和乳化性的影响[J]. 中国油脂, 2019, 44(4): 35-40. CHANG H M, YANG J D, TIAN S J, et al. Influence of ultrasound-assisted papain modification on solubility and emulsification of rice bran protein[J]. China Oils and Fats, 2019, 44(4): 35-40.
- [12] 张琳, 顾风云, 秦宇婷, 等. 浅谈蛋白质含量的测定[J]. 食品安全导刊, 2021, 322(29): 158-159. ZHANG L, GU F Y, QING Y T, et al. Discussion

- on the determination of protein content [J]. *China Food Safety Magazine*, 2021, 322(29): 158–159.
- [13] 廖小微. 水相体系中内源性蛋白酶酶解芝麻蛋白的行为及其应用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2022.
- LIAO X W. Hydrolyzing behaviors of endogenous proteases on sesame proteins in aqueous medium and the practical applications [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.
- [14] 刘恩岐. 黑豆蛋白酶解产物的生物活性研究与结构表征[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2013.
- LIU E Q. The biological and structural characterization of black soybean protein hydrolysates [D]. Xi'an: Northwest A&F University, 2013.
- [15] 刘妍兵, 陶阳, 苗雪, 等. 绿豆蛋白酶解物抗氧化活性与其结构、氨基酸组成的相关性[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(7): 50–58.
- LIU Y B, TAO Y, MIAO X, et al. Correlation between antioxidant activity and structure and amino acid composition of protease hydrolysates from mung bean [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(7): 50–58.
- [16] 郭莹, 虞夏晖, 陈碧宵, 等. 望江南子不同溶剂提取物体外抗氧化活性及抗脑缺血性损伤作用[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(11): 5168–5171.
- GUO Y, YU X H, CHEN B X, et al. Antioxidant activity and anti-cerebral ischemia injury of different solvent extracts from *Senmen occidentalis* *in vitro* [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2018, 33(11): 5168–5171.
- [17] VHANGANI N L, WYK J V. Antioxidant activity of Maillard reaction products (MRPs) in a lipid-rich model system [J]. *Food Chemistry*, 2016, 208(1): 301–308.
- [18] 张江涛, 冯晓文, 秦修远, 等. 海洋蛋白低聚肽的抗氧化与降血压作用[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(11): 69–76.
- ZHANG J T, FENG X W, QIN X Y, et al. Antioxidation and blood pressure lowering effects of marine protein oligopeptides [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(11): 69–76.
- [19] AKINDOYENI I A, OGUNSUYI O B, OBOH G, et al. Effect of selenium biofortification on phenolic content and antioxidant properties of Jute leaf (*Corchorus olitorius*) [J]. *Vegetos*, 2021, 35(1): 94–103.
- [20] LIU F F, LI Y Q, SUN G J, et al. Influence of ultrasound treatment on the physicochemical and antioxidant properties of mung bean protein hydrolysate [J]. *Ultrason Sonochem*, 2022, 84(1): 105964.
- [21] WANG T, CHEN K R, ZHANG X Z, et al. Effect of ultrasound on the preparation of soy protein isolate–maltodextrin embedded hemp seed oil microcapsules and the establishment of oxidation kinetics models [J]. *Ultrason Sonochem*, 2021, 77(7): 105700.
- [22] DADA S O, EHIE G C, OSUKOYA O A, et al. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties of *Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg (seedless breadfruit) fruit pulp protein hydrolysates [J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 1493.
- [23] TANASKOVIC S J, LUKOVIC N, GRBAVIC S, et al. Production of egg white protein hydrolysates with improved antioxidant capacity in a continuous enzymatic membrane reactor: Optimization of operating parameters by statistical design [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2018, 55(1): 128–137.
- [24] WANG S T, WANG P Y, CUI Y W, et al. Study on the physicochemical indexes, nutritional quality, and flavor compounds of *Trichiurus lepturus* from three representative origins for geographical traceability [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2022, 1(9): 1034868.
- [25] FAN L H, MAO X Y, WU Q Z. Purification, identification and molecular docking of novel antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates [J]. *Molecules*, 2022, 27(23): 8423.
- [26] 阴宏婕, 鞠化鹏, 钟利敏, 等. 核黄素结合肽的生物活性及结构表征[J]. *食品科学*, 2021, 42(9): 137–144.
- YING H J, JU H P, ZHONG L M, et al. Biological activity and structural characterization of riboflavin-binding peptide [J]. *Food Science*, 2021, 42(9): 137–144.
- [27] MARTINEZ C S, ALTERMAN C D C, VERA G, et al. Egg white hydrolysate as a functional food ingredient to prevent cognitive dysfunction in rats following long-term exposure to aluminum [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 1868.
- [28] KINGWASCHARAPONG P, CHAIJAN M, KARNJANAPRATUM S. Ultrasound-assisted extraction of protein from Bombay locusts and its impact on functional and antioxidative properties [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 17320.

- [29] ZHAO J, JUN H, DANG Y L. Ultrasound treatment on the structure of goose liver proteins and antioxidant activities of its enzymatic hydrolysate[J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 44(1): e13091.
- [30] YANG J, DUAN Y Q, GENG F, et al. Ultrasonic-assisted pH shift-induced interfacial remodeling for enhancing the emulsifying and foaming properties of perilla protein isolate[J]. Ultrason Sonochem, 2022, 89(10): 106108.
- [31] CHEN W Q, MA H, WANG Y Y. Recent advances in modified food proteins by high intensity ultrasound for enhancing functionality: Potential mechanisms, combination with other methods, equipment innovations and future directions[J]. Ultrason Sonochem, 2022, 85: 105993.
- [32] WANG Q, WANG Y, HUANG M G, et al. Ultrasound-assisted alkaline proteinase extraction enhances the yield of pecan protein and modifies its functional properties[J]. Ultrason Sonochem, 2021, 80: 105789.
- [33] YU Y L, LU X Y, ZHANG T H, et al. Tiger nut (*Cyperus esculentus* L.): nutrition, processing, function and applications [J]. Foods, 2022, 11(4): 601.
- [34] GU S, ZHU Q J, ZHOU Y, et al. Effect of ultrasound combined with glycerol-mediated low-sodium guring on the quality and protein structure of pork tenderloin[J]. Foods, 2022, 11(23): 3798.
- [35] LUCIA A G, EDUARDO C T, ANABERTA C M, et al. Production of ACE inhibitory peptides from whey proteins modified by high intensity ultrasound using bromelain[J]. Foods, 2021, 10(9): 2099.
- [36] TAO L, GU F, LIU Y, et al. Preparation of antioxidant peptides from *Moringa oleifera* leaves and their protection against oxidative damage in HepG2 cells[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 1062671.
- [37] LI Y F, ZENG Q H, LIU G, et al. Effects of ultrasound-assisted basic electrolyzed water (BEW) extraction on structural and functional properties of Antarctic krill (*Euphausia superba*) proteins[J]. Ultrason Sonochem, 2021, 71: 105364.

Impact of Ultrasound-Assisted Enzymatic Digestion on the Structure and Antioxidant Properties of Mung Bean Peptides

HU Jinrui¹, CAO Rong'an¹, CHEN Hongsheng¹, DIAO Jingjing^{2*}

¹College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang

²National Coarse Cereals Engineering Research Center, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang)

Abstract This study investigated the effects of ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis on mung bean proteins to enhance peptide yield, antioxidant capacity, and promote the application of plant proteins in food. To investigate the effects of sonication alone and ultrasound-enzymatic treatment on the structural properties of mung bean protein (MBP), as well as their influence on the structure and antioxidant activity of mung bean peptides. Results showed that using an ultrasound power of 400 W, ultrasound time of 15 min, alkaline protease, and enzymatic hydrolysis for 4 h significantly improved the yield, nitrogen solubility index, hydrolysis degree, and antioxidant activity of mung bean peptides. Compared to enzymatic products without ultrasound treatment, these parameters were increased by 17.8%, 11.1%, 5.8%, and 14.7%, respectively. This indicates that ultrasonic pretreatment effectively enhanced enzymatic efficiency and the activity of mung bean protein. Structural analysis revealed that the high shear, mechanical energy, and cavitation effects generated by ultrasound pretreatment altered the molecular conformation of mung bean protein. Specifically, the ultrasound-assisted enzymatic treatment group exhibited a decrease in α -helix and β -sheet content, an increase in β -turn and irregular curling in the secondary structure, an 89% reduction in average particle size, a 4.4-fold increase in ζ -potential value, and a significant decrease in protein particle. The molecular mass of the ultrasound-assisted enzymatic products was significantly lower than that of the single enzymatic products. These findings suggest that this method is an effective approach to enhance the utilization of mung bean protein. Furthermore, the results of this study provide a theoretical foundation for the application of mung bean protein in food processing.

Keywords mung bean protein; mung bean peptide; sonication; antioxidant activity