

Obtención de un bioestimulante agronómico/ambiental mediante hidrólisis enzimática de okara

Obtaining an agronomic/environmental biostimulant by enzymatic hydrolysis of okara

A. Orts^{1,*}, A. Garcia-Quintanilla¹, P. Caballero¹, J.M. Orts¹, M. Tejada²,
L. Martin-Presas¹ & J. Parrado¹

¹ Dept. Biochemistry and Molecular Biology, University of Seville, C/ Profesor García González 2, 41012 Seville, Spain

² Department Crystallography, Mineralogy and Agricultural Chemistry, E.T.S.I.A., University of Seville, Crta. de Utrera km. 1, 41013 Seville, Spain
(*E-mail: josortgom2@alum.us.es)

<https://doi.org/10.19084/rca.28447>

RESUMEN

En el presente trabajo se ha desarrollado un proceso enzimático destinado a la valorización de la okara, mediante su conversión en un producto bioestimulante agronómico/ambiental altamente biodisponible y con alto contenido en C, N, P, K. La okara es un subproducto insoluble resultante en el proceso de obtención de la leche de soja y tofu. Aunque tiene un alto valor nutricional (proteínas, fibra y lípidos) destaca su composición en compuestos bioactivos, como isoflavonas, vitaminas y oligoelementos, presenta problemas de utilización, por su alto contenido en agua que lo convierte en un producto muy perecedero y fácilmente fermentable. Todo ello lo convierte en un sustrato idóneo para la obtención de compuestos agronómico/ambientales. El proceso se basa en el uso de diferentes enzimas hidrolíticas, que conducen a la solubilización e hidrólisis de las moléculas orgánicas (proteínas y azúcares) e inorgánicas (P y K) El proceso enzimático diseñado consiste en una hidrólisis multienzimática secuencial donde actúan proteasas, fitasas y carbohidrolasas. El extracto enzimático ha sido caracterizado químicamente, destacando su alto contenido en péptidos y aminoácidos libres (contenido orgánico soluble compuesto en un 64% por moléculas de <1 KDa, solubilización de un 61% del total de proteínas), así como en fosfato de origen orgánico (solubilización de un 79,1% del total de P), K (solubilización de un 86,6% del total de K) y glucosa libre.

Palabras clave: Bioestimulante, enzimas, peptidos, Okara, NPK.

ABSTRACT

In the present work, an enzymatic process has been developed for the valorization of okara, through its conversion into an agronomic/environmental biostimulant product with high bioavailability and high content in C, N, P and K. Okara is an insoluble by-product resulting from the process of obtaining soy milk and tofu. Although it has a high nutritional value (proteins, fiber and lipids), where its composition of bioactive compounds such as isoflavones, vitamins and trace elements stands out, it presents problems of utilization due to its high water content, which makes it a very perishable and easily fermented product. All this makes it an ideal substrate for obtaining agronomic/environmental compounds. The process is based on the use of different hydrolytic enzymes, which lead to the solubilization and hydrolysis of organic (proteins and sugars) and inorganic (P and K) molecules. The enzymatic process designed consists of a sequential multi-enzymatic hydrolysis involving proteases, phytases and carbohydrases. The enzymatic extract has been chemically characterized, highlighting its high content in peptides and free amino acids (soluble organic content composed of 64% of molecules <1 KDa, solubilization of 61% of total proteins), as well as in organic phosphate (solubilization of 79.1% of total P), K (solubilization of 86.6% of total K) and free glucose.

Keywords: Biostimulant, enzymes, peptides, Okara, NPK.

INTRODUCCIÓN

Okara es un subproducto obtenido durante el proceso de fabricación de leche de soja, presenta un alto valor nutricional debido a su riqueza en proteínas, grasas, carbohidratos y contenido en compuestos bioactivos (isoflavonas, vitaminas y oligoelementos) (O'Toole, 1999). Destaca su alto contenido proteico 31,1%, de lípidos 24,6 y de carbohidratos, fundamentalmente fibra insoluble (celulosas y hemicelulosas) de un 38,9%. Respecto a los microelementos, presenta un alto contenido en fósforo (5,3 g/kg) y potasio (11,5 g/kg).

En cuanto al componente inorgánico, el contenido de cenizas es 4.1%. (Tablas 1 y 2).

Tabla 1 - Composición química de Okara

OKARA	%
Humedad (%)	0
Materia Seca (%)	100
C (%)	50.1
N (%)	5.1
C/N	9.8
Proteínas (N x 6.25)	31.9
Microelementos (g/Kg)	
K	11.5
P	5.3

Los resultados son expresados en porcentaje (p/p) en relación con material seca

Tabla 2 - Composición química básica del Okara. (Análisis Aenor. Julio de 2016) Los resultados expresados como % (p / p) son tres valores promedio de análisis. Datos referidos a materia seca material

Okara	(%)
Grasas (%)	24.6 ± 1.7
Proteínas (% N*6.25)	31.9 ± 1.2
Cenizas (%)	4.1 ± 0.2
Carbohidratos (%)	38.9 ± 2.4
Fibra Soluble	2.9 ± 0.8
Fibra Insoluble	36 ± 0.9
Almidón	0.42 ± 0.05

Debido a su alta humedad la okara es un producto muy perecedero el cual, debe procesarse muy

rápidamente y, aunque existen formas de preservarlo, no son rentables debido a su alto coste energético (Mateos-Aparicio, 2011; Pérez-López, 2016). Actualmente se usa principalmente en países occidentales como alimento para animales o abono de lenta absorción. Actualmente existe una tendencia en alza de valorización de productos orgánicos industriales (Rodríguez-Morgado *et al.*, 2015), con la finalidad de transformarlos en bioestimulantes o fertilizantes orgánicos (Xu and Geelen, 2018). Okara puede ser valorizado en un bioestimulante rico en nutrientes de rápida absorción y con alto contenido en compuestos bioactivos (Bastida, 2008). Así pues, el presente trabajo tiene como objetivo desarrollar un proceso enzimático destinado a la valorización de la okara mediante su conversión en un producto bioestimulante agronómico/ambiental altamente biodisponible y con alto contenido en C, N, P, K.

MATERIALES Y MÉTODOS

Características del proceso de hidrólisis enzimática y okara

OK fue suministrado por la empresa española Soria Natural S.A. Las características químicas de este subproducto se muestran en la Tabla 1 y la Tabla 2. El proceso de hidrólisis se realizó en un biorreactor siguiendo la metodología pH-stat (Adler-Nissen, 1977), utilizando una endoproteasa (Protamex, Novozymes), fitasa (Biocon) y Bioglucanasa ME (Biocon). Para el proceso de hidrólisis previamente se autoclavó okara a 130° 20min y 1atm. Seguidamente se eligió la incubación con 0.3% de enzimas (v/v) durante 8 horas cada enzima a 55°C con agitación.

Análisis de peso molecular de las proteínas solubles

El contenido de proteína de la fracción soluble de okara se estudió mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando un sistema FPLC ÄKTA-purificator (GE Healthcare), cromatografía de filtración y una columna Superdex Peptide 10 / 300GL, con un rango de exclusión entre 700 y 10.000 Da que discrimina péptidos y aminoácidos libres.

Análisis de las proteínas totales

Para analizar el contenido total de proteína se utilizó el método Lowry, el cual determina el nivel total de proteína en una solución.

Análisis de glucosa libre

El contenido de glucosa libre existente en el extracto con agua y el extracto enzimático, fue determinado mediante el KIT D-Glucose (GOPOD Format) K-gluc de Megazyme.

Análisis de fosfato soluble

El contenido de ortofosfato soluble se midió utilizando el ensayo de molibdato amónico (Nassiri, 2015).

Caracterización química extractos solubles

La caracterización química de los extractos solubles se determinó por ICP Spectro Blue, en los servicios de microanálisis de la Universidad de Sevilla. 10 / 300GL, con un rango de exclusión entre 700 y 10.000 Da que discrimina péptidos y aminoácidos libres

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la hidrólisis proteica se eligió la enzima Protamex de Novozymes debido a su mejor rendimiento por el pH natural de la okara (Tabla 3). Respecto a la solubilización de fosfato orgánico, se comparó la extracción con diferentes enzimas (Proteasas, lipasas, glucanasas y fitasas), obteniendo los mejores resultados con la enzima Fitasa de Biocon consiguiéndose extraer hasta un 92% del total de fosforo existente en okara y, su vez transformando todo el contenido de fitatos (macromolécula de alto contenido en fósforo no biodisponible) en fósforo orgánico libre (Tabla 4). Finalmente para la solubilización de los carbohidratos se eligió la enzima Glucanasa ME de Biocon, la cual es un complejo de múltiples carbohidrolasas. Tras la hidrólisis enzimática con éstas tres enzimas aplicadas secuencialmente, se obtuvo una solubilización de la okara del 60% (Tabla 5).

Tabla 3 - Solubilización de okara con diferentes proteasas

	% Solubilizado
Control	36,21
Papaína	41,08
Protamex	45,50
Subtilisina	41,86

Las proteínas representan la mayor fracción y en forma de proteínas hidrolizadas (Tabla 6), mayoritariamente péptidos con un tamaño molecular inferior a 1000dan (64%) en cambio la pequeña fracción de proteínas solubles de OK son de alto peso molecular superior a 1000da (72%).

Respecto a la extracción total de proteínas y glucosa libre en el extracto enzimático, se alcanzó una extracción del 40,9% del total de proteínas existente en la okara, frente al 22,02% en el extracto acuoso, y una extracción de 117,9 mg/kg de glucosa libre en el extracto enzimático, frente a 18,61 mg/kg que se obtienen en el extracto acuoso. Respecto a la composición química del extracto enzimático de la okara, se consigue extraer hasta un 76% del contenido total de nitrógeno, el 79,1% del total de fósforo y el 86,6% del total de potasio (Tabla 7).

Tabla 4 - Extracción del total de fósforo existente en okara mediante hidrólisis a 24h con diferentes enzimas

%	Fosfato	Fitato	Insoluble/ orgánico
Control	34,69	29,92	35,38
Papain	45,31	34,01	20,68
Protamex	65,23	18,11	16,66
Subtilisin	55,88	27,48	16,64
Phytase	92,70	0,00	7,30
β -Glucanase	60,88	23,50	15,62
Lipase	68,38	16,93	14,69

Tabla 5 - Solubilización de okara tras la hidrólisis multienzimática secuencial

	Solubilización %
Control	35,50
Secuencial	59,63

Tabla 6 - Distribución del contenido de proteínas solubles de Okara y el Extracto enzimático referidos a materia seca. Columna Superdex Peptide 10/300GL column

Peso Molecular (Da)	Okara sin hidrolizar (%)	Extracto enzimático (%)
10,000-1,000	72,34	35,60
<1,000	27,65	64,40

Tabla 7 - Solubilización de okara tras la hidrólisis multienzimática secuencial

	Okara Seco	Soluble Sin Tratamiento	Soluble Hidrolizado
pH	5,5	5,5	5,5
Materia Seca%	100%	100%	100%
C%	49,55%	41,80%	38,35%
N%	5,1%	0,82%	3,12%
P	5,3 g/kg	2,1 g/kg	4,19 g/kg
K	11,5 g/kg	4,5 g/kg	9,96 g/kg

CONCLUSIONES

Tras el proceso de hidrólisis multienzimática secuencial de la okara con proteasa, fitasa y carbohidrolasas, se consigue obtener un nuevo producto soluble con un contenido mayoritario en moléculas de bajo peso molecular muy biodisponible. Mediante esta técnica se consiguen extraer grandes proporciones de los contenidos nutricionales de la okara, siendo así el extracto enzimático soluble un buen candidato como bioestimulante agronómico/ambiental de rápida absorción.

REFERENCES

- Bastida, F.; Kandeler, E.; Moreno, J.L.; Ros, M.; García, C. & Hernández, T. (2008) - Application of fresh and composted organic wastes modifies structure, size and activity of soil microbial community under semiarid climate. *Applied Soil Ecology*, vol. 40, n. 2, p. 318–329. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.05.007>
- Mateos-Aparicio, I. (2011) - Beans by-products, potential sources for functional ingredients. In: Popescu, E. & Golubev, I. (Eds.) - *Beans: Nutrition, Consumption and Health*. p. 233-24. New York: Nova Publishers Inc.
- Nassiri, M. & Ariannejad, H. (2015) - Comparative Analysis of Peripheral Alkaline Phytase Protein Structures Expressed in *E. coli*. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, vol. 4, n. 1, p. 10-18.
- O'Toole, D.K. (1999) - Characteristics and use of okara, the soybean residue from soy milk production--a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47, n. 2p. 363-371. <https://doi.org/10.1021/jf980754l>
- Pérez-López, E.; Mateos-Aparicio, I. & Rupérez, P. (2016) - Okara treated with high hydrostatic pressure assisted by Ultraflo L: effect on solubility of dietary fibre. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 33, p. 32-37. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.12.017>
- Rodríguez-Morgado, B.; Gómez, I.; Parrado, J.; García-Martínez, A.M.; Aragón, C. & Tejada, M. (2015) - Obtaining edaphic biostimulants/biofertilizers from different sewage sludges. Effects on soil biological properties. *Environmental Technology*, vol. 36, n. 17, p. 2217-2226. <https://doi.org/10.1080/09593330.2015.1024760>
- Xu, L. & Geelen, D. (2018) - Developing biostimulants from agro-food and industrial by-products. *Frontiers in Plant Science*, vol. 9, art. 1567. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01567>