



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TAHIS REGINA BAÚ

EXTRATOS DE SOJA:

INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES PROCESSOS DE
OBTENÇÃO, OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO PARA
CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS EM AGLICONAS E
FERMENTAÇÃO COM CULTURA DE KEFIR

TAHIS REGINA BAÚ

EXTRATOS DE SOJA:

INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES PROCESSOS DE
OBTENÇÃO, OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO PARA
CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS EM AGLICONAS E
FERMENTAÇÃO COM CULTURA DE KEFIR

Tese apresentada ao Programa de Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elza Louko Ida

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B337e Baú, Tahis Regina.

Extratos de soja : influência dos diferentes processos de obtenção, otimização do processo para conversão de isoflavonas em agliconas e fermentação com cultura de Kefir / Tahis Regina Baú. – Londrina, 2015.

172 f. : il.

Orientador: Elza Iouko Ida.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Soja – Produtos – Teses. 2. Alimentos fermentados – Teses. 3. Isoflavonas – Teses. 4. Oligossacarídeos – Teses. 5. Compostos bioativos – Teses. 6. Soja – Processamento – Teses. I. Ida, Elza Iouko. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 664.6/.7

TAHIS REGINA BAÚ

EXTRATOS DE SOJA: INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES PROCESSOS DE OBTENÇÃO, OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO PARA CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS EM AGLICONAS E FERMENTAÇÃO COM CULTURA DE KEFIR

Tese apresentada ao Programa de Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elza Louko Ida
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dr^a. Mercedes Concordia Carrão Panizzi
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
– Embrapa

Prof^a. Dr^a. Michele Rigon Spier
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Prof^a. Dr^a. Sandra Helena Prudêncio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Louise Emy Kurozawa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 10 de abril de 2015.

Aos meus pais, Claudete e Sérgio, que não mediram
esforços para garantir a educação de seus filhos.
Aos meus irmãos, Luciana, Denise e Sérgio Júnior, pelo
incentivo e auxílio nos momentos difíceis.
Ao meu esposo Lucas, pelo carinho e compreensão.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Elza Louko Ida, pela orientação exemplar, compreensão, confiança no meu trabalho e valiosos ensinamentos.

A todos os Professores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos pelos ensinamentos e em especial a Prof^a Dr^a Sandra Garcia pela colaboração e amizade.

Aos servidores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias desta Instituição, pela ajuda dispensada.

À UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela concessão de afastamento parcial para realização da pós-graduação e utilização dos laboratórios para realização de alguns dos experimentos.

Ao IFSC – Instituto Federal de Santa Catarina pelas concessões que oportunizaram a realização do Doutorado.

À Cooperativa Sementes Paraná e SL Alimentos pela doação da cultivar de soja para desenvolvimento desta pesquisa de Doutorado.

À empresa Clerici-Sacco®, pela doação da cultura starter de kefir.

Às amigas Marinês Paula Corso e Marianne Ayumi Shirai pela amizade sincera, apoio e carinho.

Ao amigo e Doutorando Fernando Sanches de Lima pela amizade, auxílio na utilização do cromatógrafo líquido e pelos inúmeros momentos de convivência e descontração que fizeram toda a diferença.

Aos amigos que tive a felicidade de encontrar e que sempre serão lembrados como uma parte importante de minha trajetória: Angélica Ishikawa, Cintia Ladeira Handa, Danielle C. Barreto Honorato, Gislaine Silveira Simões, Maria Rita Alaniz Porto e Raissa Curti Bonfante.

Aos demais colegas e estagiários do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, pela amizade e pelos agradáveis momentos durante o Doutorado.

A todos aqueles que colaboraram e torceram para que mais uma etapa da minha vida fosse vencida.

*Para obter algo que você nunca teve,
precisa fazer algo que você nunca fez (Chico Xavier).*

BAÚ, T.R. **Extratos de soja:** influência dos diferentes processos de obtenção, otimização do processo para conversão de isoflavonas em agliconas e fermentação com cultura de kefir. 2015. 172 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina – PR.

RESUMO

O processo de obtenção do extrato de soja pode influenciar a composição do produto. O objetivo desta investigação foi avaliar a influência dos diferentes processos de obtenção de extrato de soja e otimizar o processo para conversão de isoflavonas em agliconas. Ainda, aplicou-se a cultura de kefir no extrato de soja visando a fermentação e hidrólise de oligossacarídeos e isoflavonas. Para obtenção de extratos de soja foram avaliadas cinco tipos de processamento e os extratos foram caracterizados quanto ao pH, tonalidade cromática, viscosidade, composição química, inibidores de tripsina, teor de diferentes formas de isoflavonas e aceitabilidade. Foi otimizado o processamento do extrato de soja para conversão de isoflavonas em agliconas, aplicando o delineamento composto central rotacional 22 e avaliada a atividade de β -glicosidase e teor das diferentes formas de isoflavonas. No extrato de soja foi empregada a cultura de kefir para fermentação a 25 °C por 30 h e avaliada a hidrólise dos oligossacarídeos e isoflavonas. Foi realizada a contagem de bactérias lácticas, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* sp e leveduras. Também foram determinados pH, acidez, atividade de α -galactosidase e β -glicosidase, teor de açúcares e de diferentes formas de isoflavonas. As diferentes condições de processamento para obtenção de extratos de soja influenciaram as características físicas, químicas e teor das diferentes formas de isoflavonas e na aceitação sensorial não foi detectada diferença. A maceração dos grãos de soja a 5 °C por 16 h, homogeneização por 3 min com água destilada a 25 °C, filtração e tratamento térmico a 90 °C por 30 min possibilitou obter extrato de soja com maior teor de proteínas, lipídios, cinzas, isoflavonas totais e agliconas. A otimização do processo de obtenção de extrato de soja com máxima conversão das isoflavonas na forma de β -glicosídeos em agliconas ocorreu quando os grãos foram macerados a 5 °C por 14 h na proporção 1:3 (soja:água; p:v), homogeneizados na proporção 1:8 (soja macerada:água; p:v) e o homogenato incubado a 50 °C por 2,7 h. A estabilidade térmica a 97 °C por 25 min das isoflavonas do extrato de soja foi mantida com relação ao teor de isoflavonas agliconas (daidzeína e genisteína), enquanto que ocorreu um aumento no teor de gliciteína e β -glicosídeos (daidzina e genistina) e uma redução no teor de malonilglicosídeos. O extrato de soja fermentado com cultura de kefir a 25 °C por 30 h apresentou atividade de α -galactosidase com hidrólise de 100 % de rafinose e 92 % de estaquiose, após o esgotamento de galactose, glicose e sacarose. Apresentou também atividade de β -glicosidase, com bioconversão de 100 % de daidzina e glicitina e 89 % de genistina em agliconas correspondentes, além de favorecer a redução do pH, aumento da acidez e viabilidade celular.

Palavras-chave: Soja. Processamento de extrato de soja. Compostos bioativos. Oligossacarídeos.

BAÚ, T.R. **Soymilk**: influence of different processing conditions, process optimization for isoflavone conversion in aglycone and fermentation with kefir culture. 2015. 172 p. Thesis (Doctor's degree in Food Science) - University State of Londrina. Londrina – PR.

ABSTRACT

The process to obtain the soymilk influences composition of the product. The objective of this investigation was evaluating different processes for obtaining soymilk and optimize the process for converting isoflavone in aglycone. Furthermore, was applied the kefir culture to soymilk fermentation, by evaluating oligosaccharide and β -glucoside isoflavone hydrolysis. To obtain soymilk, five different processing conditions were applied. The soymilks were analyzed for pH, hue, viscosity, chemical composition, trypsin inhibitors, contents of different forms of isoflavones and acceptability. Soymilk processing was optimized for conversion isoflavone into aglycons by applying central composite design 22 and β -glucosidase activity and different forms of isoflavone content. Soymilk was fermented with kefir culture at 25 °C for 30 h and assessed hydrolysis of oligosaccharides and isoflavones. Counts of lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* sp and yeasts were performed. Furthermore was carried of pH, acidity, α -galactosidase and β -glucosidase activity measurements. The different processing conditions to obtain soymilk influenced the physical and chemical properties and isoflavone content. However, no differences in sensory acceptance were found. Soaking of soybeans at 5 °C for 16 h, homogenization for 3 min with distilled water at 25 °C with filtration and heat treatment at 90 °C for 30 min produced soymilk with a higher content of protein, fat, ash, total and aglycone isoflavones. The optimization process with the maximum conversion of β -glucosides into aglycone isoflavones occurred when the soybeans were soaked at 5 °C for 14 h in a 1: 3 ratio (soybean: water; w:v), homogenised in a 1:8 ratio (soybean macerated: water; w:v), and the slurry was incubated at 50 °C for 2.7 h. Thermal stability of isoflavones in soymilk at 97 °C for 25 min was maintained with respect to aglycone isoflavones (genistein and daidzein), while there was an increase in glycitein content and β -glucosides (genistin and daidzin) and malonylglucoside content decreased. The fermented soymilk with kefir culture at 25 °C for 30 h showed α -galactosidase activity, and 100 % raffinose and 92 % stachyose hydrolysis was observed after the depletion of galactose, glucose and sucrose. This soymilk also presented β -glucosidase activity, resulting in 100 % bioconversion of glycitin and daidzin and 89 % bioconversion of genistin into the corresponding aglycones and favors, pH reduction, increased acidity and cell viability.

Keywords: Soybean. Soymilk processing. Bioactive compounds. Oligosaccharides

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química dos oligossacarídeos da soja.....	23
Figura 2. Estrutura química das isoflavonas agliconas, β -glicosídeos, acetilglicosídeos e malonilglicosídeos encontradas na soja	25
Figura 3. Estrutura molecular das isoflavonas e similaridade com o equol e 17β -estradiol	27
Figura 4. Processos A, B, C, D e E de obtenção de extratos de soja	48
Figura 5. Processo de obtenção do extrato de soja com maior teor de isoflavonas agliconas e avaliação da estabilidade térmica	54
Figura 6. Processo de obtenção de extrato de soja fermentado com cultura de kefir	57

ARTIGO CIENTÍFICO 2: SOYMILK PROCESSING WITH HIGHER AGLYCONES ISOFLAVONES CONTENT

Figura 1. Response surfaces as a function of time and temperature in soymilk treatment: (a) β -GLU (β -glucosidase activity), (b) DAI (Daidzin), (c) GEN (Genistin), (d) MDAI (Malonyldaidzin), (e) MGLI (Malonylglicitin) and (f) MGEN (Malonylgenistin).....	134
Figura 2. Response surfaces as a function of time and temperature in soymilk treatment: (a) ADAI (Daidzein), (b) AGLI (Glicitein), and (c) AGEN (Genistein)	135

ARTIGO CIENTÍFICO 3: KEFIR CULTURE FOR SOYMILK FERMENTATION AND OLIGOSACCHARIDE AND B-GLUCOSIDE ISOFLAVONE HYDROLYSIS

Figura 1. Growth of lactic acid bacteria (●), <i>Lactococcus lactis</i> (■), <i>Leuconostoc</i> spp (◆) and yeast (▲) in soymilk fermented with kefir culture for 30 h at 25°C.....	163
Figura 2. pH (●) and acidity (■) of soymilk fermented with kefir culture for 30 h at 25°C.....	163

- Figura 3.** Typical chromatogram for the separation of sugars using high-performance anion-exchange chromatography associated with pulsed-amperometric detection (HPAEC-PAD) - (A) Sugar standard and (B) sugar in soymilk fermented with kefir culture.....164
- Figura 4.** (A) Raffinose (●) and Stachyose (■) contents and α -galactosidase activity (▲) and (B) Conversion of total β -glucosides (●) into total aglycones (■) and β - glucosidase activity (▲) in soymilk fermented with kefir culture for 30 h at 25°C.....164

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teor dos constituintes químicos da soja	19
Tabela 2. Delineamento composto central rotacional 22 com os níveis reais e codificados das variáveis independentes para obtenção de extratos de soja.....	53

ARTIGO CIENTÍFICO 1: EFFECT OF SOYMILK PROCESSING ON ITS PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES AND ACCEPTABILITY

Tabela 1. Physical characteristics of soymilk obtained by different processes.....	105
Tabela 2. Chemical composition and trypsin inhibitor activity of soymilk obtained by different processes.....	106
Tabela 3. Isoflavone profile of soymilk obtained by different processes.....	107
Tabela 4. Correlation coefficients between physical and chemical properties of the obtained soymilk (A, B, C, D and E) obtained by different processes.....	108
Tabela 5. Sensory acceptance of soymilk obtained by diferente processes	109

ARTIGO CIENTÍFICO 2: SOYMILK PROCESSING WITH HIGHER AGLYCONES ISOFLAVONES CONTENT

Tabela 1. The central composite design 22 (CCD) with the coded and real levels for the independent variables and response functions	136
Tabela 2. An analysis of variance (ANOVA) for the models obtained by applying response surface methodology to the experimental data.....	137
Tabela 3. The effect of a thermal treatment at 97 ± 2 °C on soymilk with maximum isoflavone aglycone contents.....	138

ARTIGO CIENTÍFICO 3: KEFIR CULTURE FOR SOYMILK FERMENTATION AND
OLIGOSACCHARIDE AND B-GLUCOSIDE ISOFLAVONE
HYDROLYSIS

Tabela 1. Sugar contents of soymilk fermented with kefir culture for 30 h at 25 °C	165
Tabela 2. Isoflavone contents of soymilk fermented with kefir culture for 30 h at 25 °C	166

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHA	<i>American Heart Association</i>
a*	Componente vermelho-verde
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
b*	Componente amarelo-azul
BAPNA	Benzoil-DL-arginina- <i>p</i> -nitroanilida
CCD	Delineamento composto central rotacional
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
H*	Hue – Tonalidade cromática
HPAEC	Cromatografia de troca iônica de alta eficiência
L*	Luminosidade
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
p-NP	p-nitrofenol
RDC	Resolução da diretoria colegiada
UA	Unidade de atividade
UFC	Unidade formadora de colônia
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>
UIT	Unidade inibidora de tripsina
UT	Unidade de tripsina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DA SOJA	18
2.2	CONSTITUINTES QUÍMICOS DA SOJA	19
2.2.1	Proteínas	21
2.2.2	Oligossacarídeos	22
2.2.3	Isoflavonas.....	24
2.3	<i>BEANY FLAVOR</i> E FATORES ANTINUTRICIONAIS DA SOJA	28
2.4	CARACTERÍSTICAS GERAIS DO EXTRATO DE SOJA.....	30
2.5	PROCESSAMENTO DO EXTRATO DE SOJA E EFEITO SOBRE OS CONSTITUINTES QUÍMICOS	32
2.5.1	Seleção da Cultivar de Soja.....	32
2.5.2	Branqueamento	33
2.5.3	Maceração	34
2.5.4	Trituração dos Grãos	35
2.5.5	Separação do Resíduo	36
2.5.6	Tratamento Térmico.....	37
2.6	FERMENTAÇÃO DO EXTRATO DE SOJA.....	38
2.7	CULTURA DE KEFIR.....	41
3	OBJETIVOS	44
3.1	OBJETIVO GERAL	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	MATÉRIA-PRIMA, CULTURA STARTER E REAGENTES	45
4.2	INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE SOJA SOBRE AS PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS E ACEITABILIDADE.....	45
4.2.1	Caracterização das Propriedades Físicas dos Extratos de Soja	47
4.2.2	Composição Química.....	47
4.2.3	Determinação da Atividade de Inibidores de Tripsina.....	49

4.2.4	Extração e Quantificação de Isoflavonas.....	49
4.2.5	Análise das Condições Higiênico-Sanitárias.....	50
4.2.6	Teste de Aceitação do Extrato de Soja.....	50
4.2.7	Análise Estatística.....	51
4.3	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO DE SOJA SOBRE A ATIVIDADE DE B-GLICOSIDASE E CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS NA FORMA DE B-GLICOSÍDEOS EM AGLICONAS E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA	51
4.3.1	Efeito da Temperatura e Tempo do Processo de Obtenção do Extrato de Soja sobre a Atividade de β -Glicosidase e Conversão de Isoflavonas na Forma de β - Glicosídeos em Agliconas	52
4.3.2	Avaliação da Estabilidade Térmica das Isoflavonas do Extrato de Soja Otimizado.....	55
4.3.3	Determinação da Atividade de β -Glicosidase	55
4.3.4	Extração e Quantificação das Isoflavonas.....	56
4.4	EXTRATO DE SOJA FERMENTADO COM CULTURA DE KEFIR PARA HIDRÓLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS E ISOFLAVONAS NA FORMA DE B-GLICOSÍDEOS EM AGLICONAS.....	56
4.4.1	Obtenção do Extrato de Soja.....	56
4.4.2	Preparo do Inoculo.....	56
4.4.3	Fermentação do Extrato de Soja com Cultura de Kefir.....	57
4.4.4	Determinação da Viabilidade Celular.....	58
4.4.5	Determinação de pH e Acidez	58
4.4.6	Extração e Quantificação de Isoflavonas.....	58
4.4.7	Extração e Quantificação de Açúcares	58
4.4.8	Determinação da Atividade de β -Glicosidade	60
4.4.9	Determinação da Atividade de α -Galactosidase	60
4.4.10	Análise Estatística.....	61
	REFERENCIAS.....	61
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
5.1	ARTIGO CIENTÍFICO 1: EFFECT OF SOYMILK PROCESSING ON ITS PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES AND ACCEPTABILITY	81
5.2	ARTIGO CIENTÍFICO 2: SOYMILK PROCESSING WITH HIGHER AGLYCONES ISOFLAVONES CONTENT.....	110

5.3	ARTIGO CIENTÍFICO 3: KEFIR CULTURE FOR SOYMILK FERMENTATION AND OLIGOSACCHARIDE AND B-GLUCOSIDE ISOFLAVONE HYDROLYSIS.....	139
6	CONCLUSÕES	167
	ANEXOS	168
	ANEXO 1 – Termo de Aprovação do Projeto do Comitê de Ética.....	169
	ANEXO 2 – Coleta de Dados do Julgador	170
	ANEXO 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido na Forma de Convite para os Julgadores do Extrato de soja no Teste de Aceitação.....	171
	ANEXO 4 – Ficha para Avaliação Sensorial: Teste de Aceitação.....	172

1 INTRODUÇÃO

A soja é mundialmente cultivada devido o seu elevado teor de proteínas e lipídios. Estudos tem confirmado os efeitos benéficos da soja para a saúde e isto tem estimulado os consumidores a incorporar mais a soja na dieta humana, devido componentes nutricionais importantes, como as isoflavonas, proteínas, oligossacarídeos e fibra alimentar (CHEN et al., 2010; MA et al., 2015). Assim, o Brasil é um grande produtor e exportador de soja, elevando sua participação no mercado a cada ano (USDA, 2014).

A soja contém os oligossacarídeos rafinose, estaquiose, melibiose e verbascose que também são componentes nutricionais importantes (CHEN et al., 2010). Estes compostos são benéficos por promoverem o aumento da população de bifidobactérias no cólon (MIDDELBOSS; FAHEY, 2008), o que acarreta na supressão da atividade de bactérias putrefativas e patogênicas, e promovendo um balanço na microbiota intestinal e diminuindo as infecções gastrointestinais (CHEN et al., 2000; LIU, 2004).

As isoflavonas são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonoides e representam um dos principais compostos bioativos presentes na soja e derivados (TORO-FUNES et al., 2012). As isoflavonas são encontradas em diferentes formas, divididas em quatro grupos conforme a sua estrutura química: agliconas ou formas livres (daidzeína, genisteína e gliciteína), 7-O- β -D-Glicosídeos ou β -glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina), 6''-O-Acetil-7-O- β -D-Glicosídeos ou acetilglicosídeos (acetildaidzina, acetilgenistina e acetilglicitina) e 6''-O-Malonil-7-O- β -D-Glicosídeos ou malonilglicosídeos (malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina) (LIU, 2004; WANG, 2008). As isoflavonas agliconas possuem maior efeito benéfico sobre a saúde humana (MESSINA; MESSINA, 2000). As isoflavonas podem ser convertidas em diferentes conjugados com efeitos significativos na biodisponibilidade, sendo que as agliconas são absorvidas mais facilmente do que os conjugados glicosilados (XU et al., 2000).

O extrato de soja é tradicionalmente obtido após maceração dos grãos, drenagem da água, homogeneização com água, filtração e tratamento térmico do extrato (LIU, 2004) e as condições de processamento podem influenciar o teor dos compostos presentes (IWUOHA; UMUNNAKWE, 1997; KAO et al., 2004; JUNG; MURPHY; SALA, 2008). Vários fatores afetam a composição e o rendimento do

extrato de soja, tais como a cultivar de soja, tempo de maceração dos grãos, proporção de soja:água, trituração, filtração antes ou após o tratamento térmico, tempo e temperatura de tratamento térmico (CAI et al., 1997), além de emprego de outras etapas como utilização de enzimas, fermentação e outras (CHUN; KIM; KIM, 2008; DONKOR; SHAH, 2008; ISMAIL; HAYES, 2005; JUNG; MURPHY; SALA, 2008). A influência do processamento do extrato de soja sobre as suas características físicas e químicas tem sido amplamente investigada, porém há poucos estudos sobre modificações do processo de obtenção do extrato de soja que visam o aumento do teor de isoflavonas agliconas e aplicação de cultura de kefir para fermentação.

Assim, considerando a possibilidade de modificação do processo de obtenção do extrato de soja com aumento no teor de compostos bioativos e fermentação com cultura de kefir, este trabalho objetivou avaliar a influência dos diferentes processos de obtenção de extrato de soja e otimizar o processo para conversão de isoflavonas em agliconas, bem como aplicar a cultura de kefir no extrato de soja para fermentação e hidrólise de oligossacarídeos e isoflavonas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA SOJA

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma cultura nativa do norte e leste da Ásia, onde foi domesticada há mais de cinco mil anos e há séculos tem sido cultivada devido ao elevado teor de proteínas e lipídios (LIU et al., 2008; MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2014). A soja é amplamente utilizada no oriente e a planta foi introduzida somente em 1712 na Europa, onde seu cultivo sempre foi limitado. A soja foi introduzida na América no final do século XVIII, porém o seu cultivo em larga escala começou por volta de 1920, nos Estados Unidos, sendo destinada basicamente para a alimentação animal (HYMOWITZ, 2008). No Brasil, a partir de 1960 e impulsionada pela política de subsídios ao trigo, a soja se estabeleceu na região sul como uma cultura economicamente importante (FAO, 2015), sendo que a maior produção de soja ocorre no Mato Grosso do Sul (CONAB, 2015).

Um número crescente de estudos confirmaram os efeitos benéficos da soja para a saúde e isto tem estimulado os consumidores a incorporar mais a soja na alimentação. Os países orientais utilizam a soja para a produção de alimentos tradicionais, como o extrato de soja, *shoyo*, *tempeh*, *miso*, *tofu* e *natto*, sendo que nos países ocidentais a soja é processada principalmente para obtenção do óleo e ração animal (MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2014). Contudo, novos produtos também têm sido desenvolvidos e consumidos pela população que busca uma alimentação mais saudável. A soja é mundialmente reconhecida devido o seu elevado teor de proteínas e lipídios e contém componentes benéficos à saúde, como as isoflavonas, proteínas, oligossacarídeos e fibra alimentar, o que ocasiona um aumento na produção e consumo de produtos à base de soja (CHEN et al., 2010; MA et al., 2015).

Na safra de 2013/2014, a produção global foi de 285,3 milhões de toneladas, sendo que os Estados Unidos foram os maiores produtores, com 91,4 milhões de toneladas, seguido do Brasil com 86,7 milhões de toneladas. A previsão para a safra de 2014/2015 é atingir o recorde de 312,8 milhões de toneladas (USDA, 2015). De acordo com os dados fornecidos pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a produção brasileira manteve o ritmo de crescimento nas últimas safras e na safra de 2014/2015 foram colhidas 91,7 milhões de toneladas (CONAB, 2015). O

Brasil vem consolidando sua posição de grande produtor e exportador de soja, elevando sua participação no mercado a cada ano, com expectativa de assumir a liderança mundial do fornecimento de soja até 2022, com previsão de produção de 105,39 milhões de toneladas (USDA, 2014).

2.2 CONSTITUINTES QUÍMICOS DA SOJA

Os grãos de soja são constituídos, em base seca, de 40 % de proteína, 34 % de carboidratos, 21 % de lipídios e 5 % de cinzas. Os principais componentes do grão de soja são a casca, cotilédones e eixo embrionário, que representam 8 %, 90 % e 2 % do peso do grão, respectivamente. A composição química do grão e de seus componentes é influenciada por diversos fatores como cultivar, época da semeadura, localização geográfica, condições climáticas e estresse ambiental (LIU, 2004; MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2014; REDONDO-CUENCA et al., 2007). O teor aproximado dos constituintes químicos é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Teor dos constituintes químicos dos componentes da soja

Componentes	Constituintes químicos (g.100g ⁻¹ , em base seca)			
	Proteína	Lipídios	Carboidratos	Cinzas
Grão	40	21	34	5
Casca	9	1	86	4
Cotilédone	43	23	29	5
Eixo embrionário	41	11	44	4

Fonte: Adaptado de Medic, Atkinson e Hurburgh (2014).

Os lipídios da soja representam economicamente um dos componentes mais importante e o óleo de soja representa 29 % da produção mundial de gordura (GOLBITZ, 2007). Os lipídios da soja contêm 15 % de ácidos graxos saturados e 85 % de insaturados (LIU, 2004), sendo que os principais são o oleico (C18:1n-9), linoleico (C18:2n-6) e o α -linolênico (C18:3n-3). Os ácidos graxos insaturados auxiliam na redução do colesterol de baixa densidade (LDL - *Low Density Lipoprotein*), diminuem o risco de doenças cardíacas, auxiliam na prevenção de aterosclerose e na supressão de processos inflamatórios (BAHRAMI, 2009; DECKELBAUM; TORREJON, 2012; GOLBITZ; JORDAN, 2006). Ainda, a soja

apresenta ácidos graxos saturados, como o ácido palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) (GERDE; WHITE, 2008).

Os carboidratos da soja podem ser divididos em solúveis e insolúveis. Os grãos maduros de soja apresentam 10 % de carboidratos solúveis, incluindo 4-5 % de sacarose, 1-2 % de rafinose, 3,5-4,5 % de estaquiose e em quantidade menor a verbascose, além de traços dos monossacarídeos glicose, frutose e arabinose (GOLBITZ; JORDAN, 2006; WANG; CHEN; ZHANG, 2014). Os carboidratos insolúveis incluem a celulose, hemicelulose e pectina, que são encontrados principalmente na parede celular e nos materiais intersticiais e são classificados como fibra alimentar (LIU, 1997). A soja contém de 19,7 a 24,4 % de fibra alimentar total e a celulose é o principal constituinte (MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2014; REDONDO-CUENCA et al., 2007). As fibras tem um papel importante na redução dos níveis de colesterol em alguns indivíduos hiperlipidêmicos, aumenta a tolerância à glicose em indivíduos diabéticos, tem efeito positivo sobre a prisão de ventre, além de possuir efeitos antiinflamatórios e anticancerígenos (CHANDALIA et al., 2000; CHEN et al., 2012; SCHEPPACH et al., 2004).

A soja contém 5 % de minerais sendo de 0,2 a 2,1 % de potássio, fósforo, magnésio, enxofre, cálcio e sódio (REDONCO-CUENCA et al., 2007). Também estão presentes em menor concentração o silício, ferro, zinco, manganês, cobre, molibdênio, flúor, cromo, selênio, cobalto, cádmio, chumbo, arsênio, mercúrio e iodo em concentrações que variam de 0,01 a 140 mg kg⁻¹ de soja, em base seca. A soja também é fonte de vitaminas hidrossolúveis, como a tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantotênico, biotina e ácido fólico e, vitaminas lipossolúveis, como a vitamina A (β -caroteno) e E (tocoferol) (GOLBITZ; JORDAN, 2006; LIU, 2004). Além disso, a soja e derivados apresentam compostos como as isoflavonas, saponinas e ácido fítico que são compostos antioxidantes (WARDHANI, VÁZQUEZ e PANDIELLA, 2010).

As proteínas, isoflavonas e oligossacarídeos, de componentes com benefícios para a saúde (REN et al., 2006) estão presentes na soja em quantidades elevadas e serão abordados a seguir.

2.2.1 Proteínas

As proteínas de soja representam a fonte comercial de proteína vegetal mais consumida no mundo, apresenta baixo custo e alto valor nutricional (MA et al., 2015; SPERONI; ANÓN, 2013). A soja é a única espécie vegetal que apresenta composição proteica com valor biológico semelhante às proteínas de origem animal devido à presença de aminoácidos essenciais (FISCHER, 2001). A soja é rica em aminoácidos como leucina e lisina, mas limitada em aminoácidos contendo enxofre como metionina, cisteína e cistina (CARRÃO-PANIZZI, 2000; LIU, 2004; MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2014).

As principais frações proteicas da soja são as 2S, 7S, 11S e 15S conforme os coeficientes de sedimentação obtidos por ultracentrifugação, após a dissolução em pH 7,6 e força iônica 0,5. A fração 2S representa 15 % do total e é composta por proteínas biologicamente ativas, inibidores de protease e globulinas. A fração 7S representa 34 % e é composta pelas enzimas β -amilase e lipoxigenase, hemaglutinina, citocromo C e pela globulina conhecida como β -conglícinina. A fração 11S é representada principalmente por glicinina, totalizando 41,9 % (LIU et al., 2007; MUJOO; TRINH; NG, 2003). A fração 15S representa 9,1 % do total e é um dímero da glicinina (11S) ou pode ser formada pela associação da glicinina em estruturas poliméricas (ACHOURI et al., 2010; TAY; XU; PERERA, 2005).

A glicinina (11S) e β -conglícinina (7S) são as duas principais proteínas de reserva da soja e representam 70 % do total (LIU et al., 2007; MUJOO; TRINH; NG, 2003). Além disso, estas frações conferem propriedades funcionais tecnológicas às proteínas da soja, uma vez que a fração 7S possui uma maior solubilidade e uma melhor capacidade emulsificante do que a fração 11S, enquanto que esta forma géis mais fortes devido ao grande número de grupos sulfidrila e tende a ser mais eficiente na formação de filmes na interface ar/água (HERMAN, 2005; MANION; CORREDIG, 2006).

Além das propriedades funcionais tecnológicas, estudos comprovaram a eficiência das proteínas da soja em diminuir o colesterol plasmático e com isso reduzir o risco de doenças do coração (CHEN et al., 2006; YANG et al., 2008). A soja também pode ser fonte de peptídeos bioativos, quem possuem propriedade de redução de hipertensão, colesterol e apresentam atividade antioxidante (SINGH; VIJ; HATI, 2014).

O FDA (*Food and Drug Administration*), órgão oficial dos Estados Unidos, aprovou em 1999 a alegação de que a ingestão de 25 g de proteínas de soja por dia aliada à um baixo consumo de gordura saturada e colesterol pode reduzir o risco de doenças coronarianas (FDA, 1999). A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) também autoriza descrições similares na rotulagem de alimentos contendo proteínas de soja, sendo considerado um ingrediente com alegação de propriedade funcional (BRASIL, 2015). Desde a aprovação da alegação pela FDA tem ocorrido um aumento considerável na produção, comercialização e consumo de soja e derivados (XIAO, 2008).

Apesar das alegações de saúde associadas as proteínas de soja serem aprovadas por órgãos reguladores como FDA e ANVISA, ainda não está bem elucidada a relação entre a ingestão de proteína de soja e a redução do nível de colesterol de baixa densidade no sangue. Sendo assim, as alegações adotadas pela FDA tem sido questionada por organizações como AHA (*American Heart Association*) e EFSA (*European Food Safety Authority*) que afirmam que os resultados obtidos até o momento não são conclusivos (EFSA, 2010; GIRGIH et al., 2013).

2.2.2 Oligossacarídeos

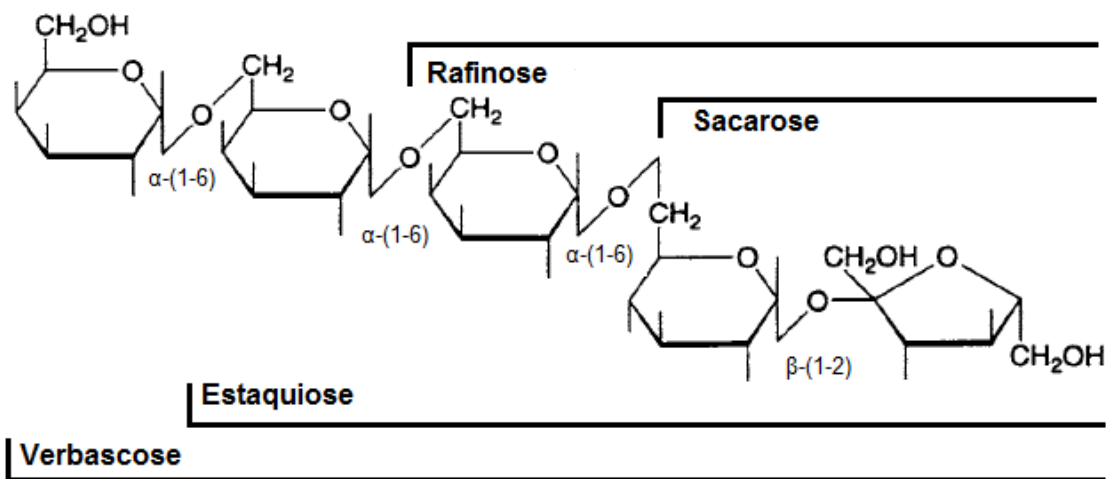
A soja contém os oligossacarídeos rafinose, estaquiose e verbascose que também são componentes nutricionais importantes (CHEN et al., 2010). Estes compostos são sintetizados a partir da sacarose e se acumulam nas sementes de soja nas fases finais de maturação e dessecação devido sua ação osmoprotetora, além de proporcionarem uma fonte de carboidratos facilmente metabolizáveis durante a germinação (NISHIZAWA-YOKOI; YABUTA; SHIGEOKA, 2008; OBENDORF et al., 2008).

Estes oligossacarídeos são açúcares não redutores que contém frutose, glicose e unidades de galactose. A rafinose é um trissacararídeo que contém em sua estrutura química uma galactose ligada em α -(1-6) a uma molécula de sacarose. A estaquiose é um tetrassacarídeo constituído por uma molécula de galactose ligada em α -(1-6) à galactose terminal da rafinose. Ainda, a soja pode conter traços de verbascose, que é um pentassacarídeo constituído por uma molécula de galactose ligada em α -(1-6) à galactose terminal da estaquiose (Figura 1) (LIU, 2004). A soja

pode conter também traços de melibiose, geralmente formada pela hidrólise de outros oligossacarídeos, e contém em sua estrutura química uma galactose ligada em α -(1-6) a uma molécula de glicose.

Os oligossacarídeos da soja foram considerados por muitos pesquisadores como indesejáveis por causarem flatulência, cólicas e diarreia (BRASIL et al., 2010; GIBSON, 2004; WANG; CHEN; ZHANG, 2014). O desconforto ocorre devido a ausência da enzima α -galactosidase (EC 3.2.1.22) na mucosa do intestino delgado humano, que é responsável pela hidrólise desses açúcares. No intestino grosso, estes são fermentados por micro-organismos anaeróbios com produção de gases, como dióxido de carbono, hidrogênio, metano, entre outros e ácidos que podem ocasionar flatulência, inchaço e diarreia (KARR-LILIENTHAL et al., 2005; MIDDELBOS; FAHEY, 2008).

Figura 1. Estrutura química dos oligossacarídeos da soja



Fonte: Adaptado de LIU (2004).

Apesar do efeito negativo, a rafinose e a estaquiiose apresentam características prebióticas e são considerados como ingredientes seguros (GRAS - *Generally Recognized As Safe*) pelo FDA (ZHOU et al., 2012). Estes oligossacarídeos são benéficos por promoverem o aumento da população de bifidobactérias no cólon (MIDDELBOS; FAHEY, 2008). Isto acarreta na supressão da atividade de bactérias putrefativas e patogênicas e promove um balanço na microbiota intestinal e diminui as infecções gastrointestinais (CHEN et al., 2000; LIU, 2004). Os oligossacarídeos da soja são fibras solúveis que, quando fermentados no

organismo humano, resultam na formação de ácidos graxos de cadeia curta, como o acetato, propionato e butirato (GIL; BENGMARK, 2006). A absorção destes ácidos graxos de cadeia curta no cólon estimula a absorção de sódio e de água, aumenta a produção de energia metabólica e estimula o sistema nervoso autônomo (GIL; BENGMARK, 2006; MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2005).

Segundo Qiang, Yonglie e Qianbing (2009), a rafinose e a estaquiose apresentam características prebióticas que também são relacionadas a diminuição do nível de colesterol no sangue e prevenção de alguns tipos de câncer. Ainda, tem sido investigada a possível ação destes oligossacarídeos na prevenção de doenças como o câncer, osteoporose, aterosclerose, distúrbios da menopausa e efeito protetor contra danos no miocárdio (ESPINOSA-MARTOSY; RUPÉREZ, 2006; MATEOS-APARICIO et al., 2008; MENG; SHANGLANG; JIANGWEI, 2015). Apesar dos benefícios descritos, mais estudos são necessários para elucidação dos mecanismos de ação destes compostos sobre a saúde humana. Além disso, a ANVISA não autoriza qualquer alegação de propriedade funcional e/ou de saúde no rótulo dos alimentos que contêm oligossacarídeos da soja

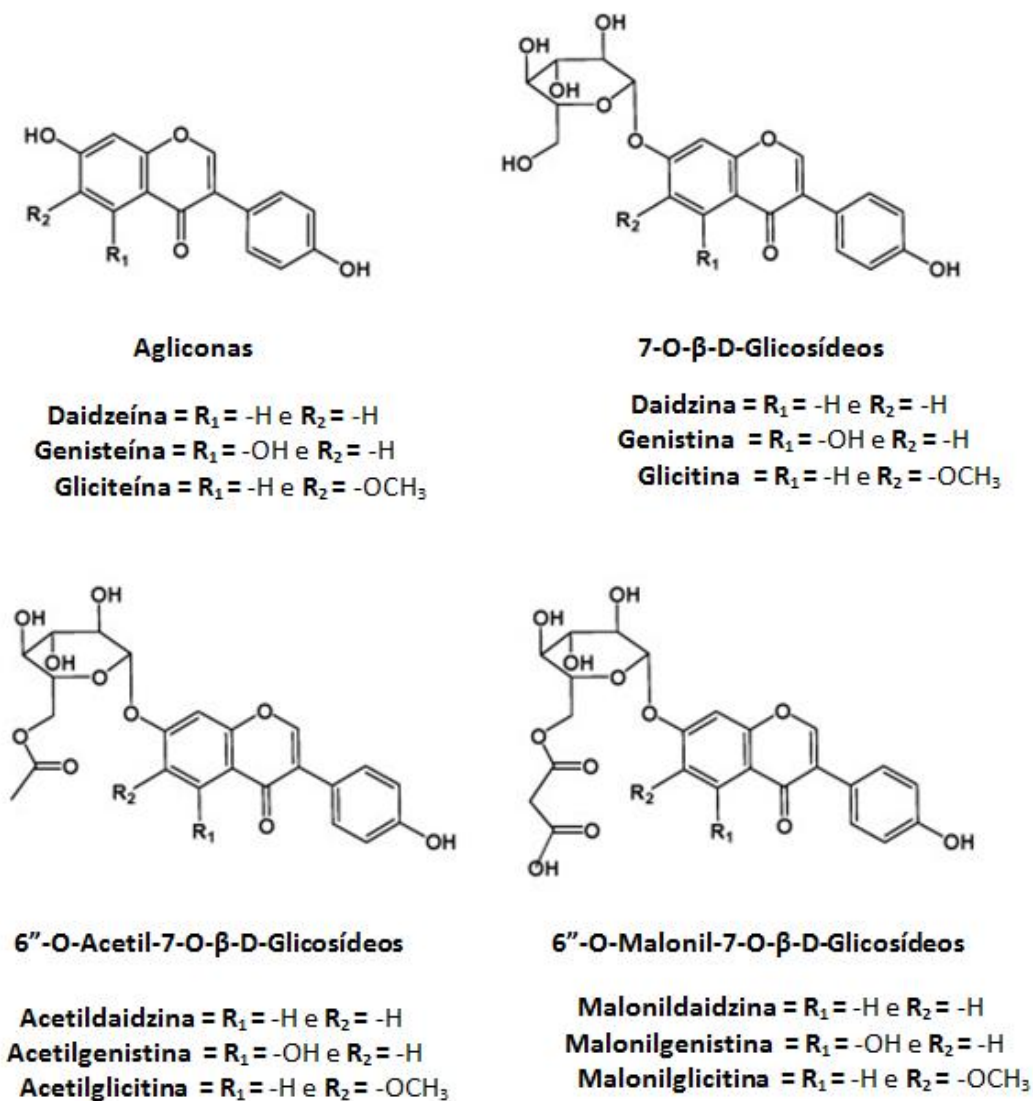
2.2.3 Isoflavonas

As isoflavonas são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonoides e representam um dos principais compostos bioativos presentes na soja e derivados (TORO-FUNES et al., 2012). Estes compostos são originários do metabolismo secundário e podem ser sintetizados nas plantas devido às condições ambientais desfavoráveis, como ataque de pragas, seca e falta de nutrientes (HOWITZ; SINCLAIR, 2008; WILDMAN, 2001). O acúmulo de isoflavonas nas sementes de soja ocorre entre 35 e 60 dias após a floração, que é o período de enchimento dos grãos e seu teor é predominante no hipocótilo, situado no eixo embrionário, que contém quantidade de 4 a 6 vezes maior do que nos cotilédones, e o menor teor é observado na casca (KIM et al., 2007; KUDOU et al., 1991; SILVA et al., 2012).

As isoflavonas são encontrados em diferentes formas, que estão divididas em quatro grupos conforme a sua estrutura química: agliconas ou formas livres (daidzeína, genisteína e gliciteína), 7-O- β -D-Glicosídeos ou β -glicosídeos (daidzina, genistina e glicitina), 6''-O-Acetil-7-O- β -D-Glicosídeos ou acetilglicosídeos (acetildaidzina, acetilgenistina e acetilglicitina) e 6''-O-Malonil-7-O- β -D-Glicosídeos

ou malonilglicosídeos (malonildaidzina, malonilgenistina e malonilglicitina) (LIU, 2004; WANG, 2008). As isoflavonas diferem entre si na constituição dos radicais R_1 e R_2 , conforme apresentado na Figura 2.

Figura 2. Estrutura química das isoflavonas agliconas, β -glicosídeos, acetilglicosídeos e malonilglicosídeos encontradas na soja



Fonte: Adaptado de Liu (2004) e Shao et al. (2009)

A soja contém, em base seca, 0,2 a 4,2 mg de isoflavonas por g de grão (MESSINA; NAGATA; WU, 2006; WANG; MURPHY, 1994b). O teor de isoflavonas

nos grãos de soja é muito amplo e pode variar em função de fatores como: cultivar de soja, safra e condições ambientais como o solo, temperatura, época, local de cultivo, índice pluviométrico, condições de estocagem, e outros (CARRÃO-PANIZZI et al., 2009; CALDWELL, BRITZ e MIRECKI, 2005; YUAN et al., 2009; WANG; MURPHY, 1994a).

Dentre as isoflavonas, os malonilglicosídeos estão presentes em maior quantidade nos grãos de soja, seguido dos β -glicosídeos, agliconas e acetilglicosídeos (HSIEH; KAO; CHEN, 2005). Geralmente, a genistina e daidzina e seus conjugados são mais frequentes, sendo que a glicitina e derivados compreendem 5-10 % do conteúdo total de isoflavonas da soja (MESSINA, 2010). As isoflavonas malonilglicosídeos e acetilglicosídeos são suscetíveis ao calor e podem ser convertidos a β -glicosídeos que são mais estáveis e, portanto, as condições de processamento podem afetar a composição de isoflavonas da soja e produtos (TORO-FUNES et al., 2012; WANG; MURPHY, 1994b).

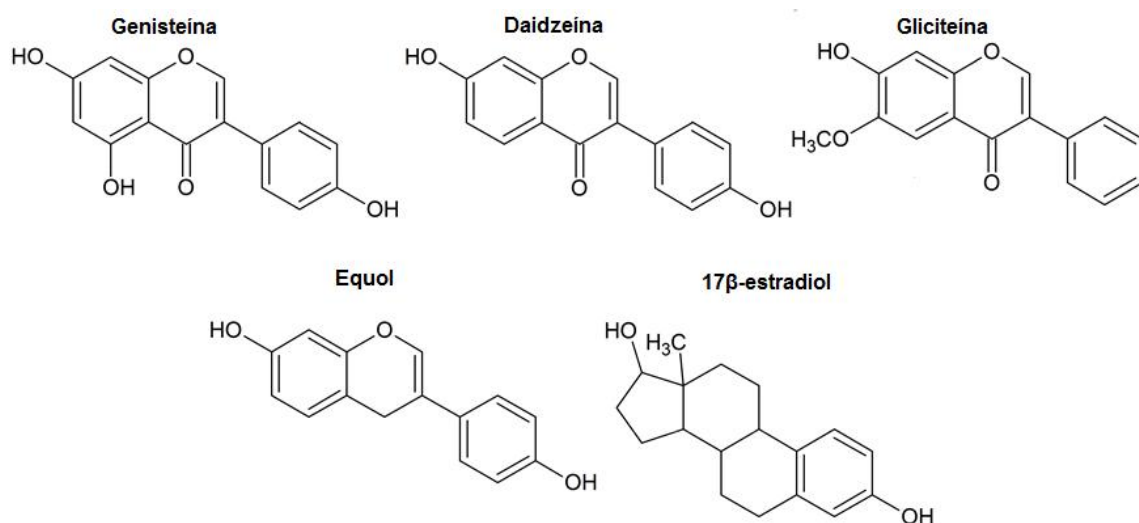
As isoflavonas podem ser convertidas em diferentes formas químicas de conjugados com efeitos significativos na biodisponibilidade, sendo que as agliconas são absorvidas mais facilmente do que os conjugados glicosilados devido a baixa massa molecular que melhora a sua difusão e absorção no organismo humano (XU et al., 2000). Após a ingestão, o tempo necessário para atingir as concentrações plasmáticas máximas é de 4-7 h para isoflavonas agliconas, sendo que para os correspondentes β -glicosídeos o tempo necessário é de 8-11 h (CEDERROTH; NEF, 2009), indicando que a hidrólise da molécula de glicose é uma etapa importante para a absorção das isoflavonas.

Para que as isoflavonas glicosiladas sejam absorvidas no intestino, estas devem ser previamente hidrolisadas a agliconas por meio da enzima β -glicosidase (EC 3.2.1.21) (MESSINA, 2010). As isoflavonas na forma de β -glicosídeos são hidrolisadas por β -glicosidases bacterianas na parede intestinal, resultando nas correspondentes agliconas. Ainda, a daidzeína pode ser metabolizada para equol (Figura 3), sendo que este metabólito é biologicamente mais ativo (CEDERROTH; NEF, 2009). A eficácia clínica das isoflavonas está relacionada com a capacidade de produção de equol a partir da daidzeína, entretanto, somente de 30 a 50 % dos indivíduos possuem esta capacidade (TSENG et al., 2013).

As isoflavonas têm sido amplamente investigadas devido aos benefícios que conferem a saúde humana (MESSINA, 2010). As isoflavonas agliconas possuem

estrutura química semelhante ao hormônio feminino 17β -estradiol (Figura 3) e podem apresentar atividade estrogênica ou antiestrogênica, sendo classificados como fitoestrógenos (CEDERROTH; NEF, 2009; LEE et al., 2015). Alguns de seus metabólitos secundários podem interagir com os receptores de estrogênio, sendo capazes de exercer efeitos protetores contra distúrbios hormonais e aliviar os sintomas da menopausa (ANDERSON et al., 1999; MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2014).

Figura 3. Estrutura molecular das isoflavonas e similaridade com o equol e 17β -estradiol



Fonte: Adaptado de Cederroth e Nef (2009).

As isoflavonas também desempenham um papel essencial na prevenção de certos tipos de câncer e muitos estudos têm demonstrado que estes compostos em combinação com as proteínas de soja podem ocasionar redução do risco de doença cardiovascular, pela diminuição dos níveis de colesterol de baixa densidade e triglicérides, além de aumentar a estabilidade oxidativa do colesterol (LEE; AHN; CHUNG, 2003; MURPHY, 2008). Destacam-se ainda pela redução da perda de massa óssea, atividade antioxidante, redução no aparecimento de aterosclerose, hipertensão, inflamação intestinal e efeito protetor contra o desenvolvimento de câncer de mama e de próstata (ALEKEL et al., 2000; ANDRES; DONOVAN; KUHLENSHMIDT, 2009; DONG et al., 2013; HUBERT et al., 2008; MESSINA, 2010;

PARK et al., 2005; WADA et al., 2013; WISEMAN, 2006). Estudos sugerem que as isoflavonas também podem afetar o metabolismo de glicose e de lipídios, podendo ser benéfica para a prevenção da obesidade e diabetes (CHENG et al., 2004; VELASQUEZ; BHATHENA, 2007). Cheng et al. (2004) ao avaliarem o efeito da ingestão de isoflavonas em mulheres pós-menopausa verificaram que os níveis de glicose e insulina foram reduzidos com a ingestão de 100 mg de isoflavonas por dia. Ainda, Huang et al. (2008) avaliaram o efeito das isoflavonas agliconas na proteção a pele contra os danos oxidativos, ocasionados pela radiação UVB e observaram que a genisteína e daidzeína podem atuar como captadores de radicais livres e proteger as células da pele. Entretanto, alguns fatores podem afetar a biodisponibilidade e os efeitos das isoflavonas no organismo humano, como a microbiota intestinal, matriz alimentar, tempo de transito intestinal, quantidade e composição de isoflavonas ingerida na dieta, entre outros (CEDERROTH; NEF, 2009).

Apesar dos estudos indicarem os efeitos benéficos à saúde humana associados ao consumo de isoflavonas, a ANVISA não autoriza qualquer alegação de propriedade funcional e/ou de saúde no rótulo de produtos de soja. Segundo a ANVISA, as isoflavonas são consideradas medicamentos fitoterápicos que auxiliam na redução do colesterol e alívio nos sintomas da menopausa, sendo que não existe comprovação científica suficiente para justificar seu uso em relação a redução de câncer, osteoporose, doenças cardiovasculares e outros (ANVISA, 2015).

2.3 *BEANY FLAVOR* E FATORES ANTINUTRICIONAIS DA SOJA

As propriedades sensoriais dos produtos tem um grande impacto na sua escolha pelos consumidores e isto determina a sua aceitação e decisão de compra (ANDRÉS; TENÓRIO; VILLANUEVA, 2015). Embora estudos tenham evidenciado o aumento no consumo de produtos de soja, ainda há limitações tecnológicas especialmente no que concerne as características sensoriais, devido a percepção de sabores indesejáveis da soja ou formação de compostos durante o processamento de produtos como o extrato de soja (CRUZ et al., 2009).

A soja possui alguns fatores limitantes ao consumo, como a presença de compostos antinutricionais e seu sabor característico denominado *beany flavor*, que pode ser devido a presença de aldeídos, álcoois, cetonas e furanos (KANEKO;

KUMAZAWA; NISHIMURA, 2011; MA et al., 2015). O *beany flavor* é originado da associação de compostos carbonílicos de cadeia curta com a fração proteica. Estes compostos são produtos finais de uma série de reações que se inicia com a hidroperoxidação de ácidos graxos poli-insaturados, catalisada por lipoxigenases (EC 1.13.11.12) (LIU, 2004; MONTEIRO et al., 2004). Segundo Iassonova et al. (2009) a lipoxigenase é a principal responsável pelo desenvolvimento de sabor indesejável da soja. As lipoxigenases representam de 1 a 2 % das proteínas da soja e podem catalisar a oxidação de ácidos graxos que apresentam isomeria geométrica no sistema *cis*, *cis*-1,4-pentadieno (KUMAR; RANI; CHAUHAN, 2010; WANG; ZHOU; CHEN, 2008). Dentre os compostos voláteis formados, o hexanal é descrito como o principal responsável pelo sabor característico atribuído aos produtos de soja (MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2014). Entretanto, Lv et al. (2011), verificaram que também existem outros compostos voláteis que podem contribuir para o sabor indesejável dos produtos de soja. As lipoxigenases podem ser inativadas pela ação do calor, como o branqueamento e tratamento térmico, entretanto, este processo não é vantajoso para a indústria, além de ocasionar a insolubilização de proteínas, diminuição de sólidos solúveis e mudanças na coloração (WANG; ZHOU; CHEN, 2008). Além destas alternativas, o melhoramento genético pode ajudar a obter genótipos com sabor suave, pela supressão de lipoxigenases (MA et al., 2015; MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2014), como a cultivar de soja BRS 257.

Além do *beany flavor*, outros compostos podem conferir sabor amargo e adstringente aos produtos de soja. Os principais compostos responsáveis são os ácidos fenólicos, isoflavonas, saponinas (HENG et al., 2006; MA et al., 2015). Entretanto, não é interessante a remoção destes compostos da soja devido as suas propriedades benéficas a saúde de regulação do metabolismo de lipídios e propriedades antioxidantes (SUGANO, 2006). Ainda, estudos indicam que as proteínas, embora possuam propriedades funcionais, podem estar associadas ao gosto amargo do extrato de soja, devido a hidrólise de polipeptídeos, além de estar relacionada com uma alteração desfavorável na cor devido a reação de *Maillard* (KWOK; MACDOUGALL; NIRANJAN, 1999).

Dentre os fatores antinutricionais da soja destacam-se os inibidores de protease e as fitohemaglutininas ou lectinas (BAJPAI; SHARMA; GUPTA, 2005). Os inibidores de protease da soja são o inibidor de tripsina e quimotripsina de Bowman-

Birk e o inibidor de tripsina de Kunitz, que podem representar até 6 % das proteínas da soja e ligam-se às enzimas tripsina e quimotripsina e as impedem de atuar na digestão das proteínas dos alimentos (MEDIC; ATKINSON; HURBURGH, 2014). Este processo estimula o pâncreas a processar mais tripsina, causando hipertrofia do mesmo. Entretanto, foi evidenciado que os inibidores de tripsina são degradados com o tratamento térmico, infra-vermelho e alta pressão (CHEN et al., 2014; YALCIN; BASMAN, 2015; GUERRERO-BELTRÁN et al., 2009), além de apresentarem propriedades anticarcinogênicas (SUGANO, 2006).

As lectinas são moléculas proteicas que apresentam a propriedade de aglutinar os glóbulos vermelhos e células da mucosa intestinal por meio de interações com compostos glicídicos (LIENER, 1994; RIZZI et al., 2003). De acordo com Liener (1994), em humanos não há evidência da hemaglutinação, pois as lectinas são inativadas pela pepsina gástrica, além de serem inativadas pelo calor úmido.

2.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO EXTRATO DE SOJA

O extrato de soja é uma bebida de consumo milenar no oriente. Em 1910, Li Yu-ying registrou uma patente para a produção do extrato de soja, porém não obteve sucesso comercial. Em 1930, o Dr. Harry W. Miller reintroduziu o extrato de soja na China na tentativa de melhorar o estado nutricional da população (BERK, 1992). A partir daí, vários métodos foram desenvolvidos ao longo dos anos, na tentativa de obter um extrato com elevado valor nutricional e com boas características.

O extrato de soja é uma bebida proteica muito apreciada em países asiáticos e seu consumo têm aumentado em países ocidentais devido aos aspectos positivos para a saúde (CHEN et al., 2014; MA et al., 2015; TORO-FUNES et al., 2014). Além dos benefícios nutricionais da soja, o extrato de soja é um alimento adequado para pessoas com intolerância à lactose, alergia às proteínas do leite ou vegetarianos e estes fatores têm contribuído significativamente para o aumento no consumo deste produto (LIU, 2008; REILY et al., 2006; SINGH; VIJ; HATI, 2014).

No Brasil tem ocorrido um aumento no consumo de extrato de soja, sendo que em 2007 o consumo foi de 2,20 L de bebida de soja hab⁻¹ ano⁻¹ e em 2010 aumentou para 2,80 L hab⁻¹ ano⁻¹ (ABIR, 2011). No Brasil, o extrato de soja e a

proteína isolada de soja são as principais fontes de proteínas utilizadas para a elaboração industrial de bebidas de soja, que podem ser saborizadas ou apresentar o sabor original, que geralmente é adicionado de aromatizantes de baunilha e leite.

O extrato de soja é o produto resultante da extração aquosa de vários constituintes da soja, tais como lipídios, proteínas, carboidratos, minerais e outros componentes e possui aparência e composição similar ao leite animal (LIU, 2008; JINAPONG; SUPHNTHARIKA; JAMNONG, 2008; RINGGENBERG; CORREDIG; ALEXANDER, 2012). O extrato de soja contém de 8 a 12 % de sólidos totais, dependendo da proporção soja:água utilizada no processamento, sendo que geralmente apresentam 3,6 % de proteínas, 2,0 à 3,2 % de lipídios, 2,9 à 3,9 % de carboidratos e 0,5 % de cinzas (LIU, 2008). Além disso, o extrato de soja possui ferro, ácidos graxos insaturados e outros nutrientes (SINGH; VIJ; HATI, 2014). O extrato de soja pode ser comercializado na forma líquida ou em pó e deve apresentar no mínimo 3 e 40 g de proteína por 100 g de produto em base úmida e seca, respectivamente (BRASIL, 2005).

Apesar de ser uma importante fonte de nutrientes, o consumo de extrato de soja ainda é limitado devido a presença de compostos com sabor indesejável da soja ou formados durante o processamento do produto, que afeta suas propriedades sensoriais (CRUZ et al., 2009). Neste sentido, várias instituições e a indústria de alimentos buscam desenvolver novos produtos de soja ou modificar os processos de obtenção existentes, visando melhorar os atributos sensoriais, nutricionais e funcionais (SAKHALE; PAWAR; RANVEER, 2012). De acordo com Berk (1992), várias abordagens têm sido utilizadas para minimizar o problema do sabor indesejável no extrato de soja. As principais medidas adotadas são a inativação térmica das lipoxigenases, no grão inteiro seco ou durante a trituração úmida, a produção do extrato a partir de material desengordurado (farinha de soja desengordurada, proteína isolada ou concentrada de soja), a remoção dos compostos responsáveis pelo sabor indesejável por evaporação (desodorização), a utilização de aromatizantes e saborizantes para mascarar as características indesejáveis e o desenvolvimento de novas variedades de soja desprovidas de lipoxigenases.

2.5 PROCESSAMENTO DO EXTRATO DE SOJA E EFEITO SOBRE OS CONSTITUINTES QUÍMICOS

Existem vários métodos de processamento de extrato de soja descritos na literatura. Para a obtenção do extrato de soja tradicional, geralmente são empregadas as etapas de seleção da cultivar de soja, branqueamento, maceração e trituração dos grãos em água, separação do resíduo, tratamento térmico, envase e armazenamento (PENG; GUO, 2015; RIAZ, 2006).

O extrato de soja obtido industrialmente também pode ser elaborado a partir da limpeza e seleção dos grãos, remoção do tegumento, branqueamento, eliminação da água e lavagem com água quente, centrifugação para separação da porção insolúvel, desodorização, padronização, formulação, fortificação, tratamento térmico UHT (*Ultra High Temperature*), resfriamento e envase asséptico (FAO, 1992). Além disso, existem métodos que não utilizam o grão inteiro, partindo da soja pré-processada, em forma de flocos ou pó, que possui rápida hidratação e diminui algumas etapas do processo.

Iwuoha e Umunnakwe (1997) avaliaram o efeito de diferentes métodos de processamento do extrato de soja e verificaram diferenças nas características físicas, químicas e sensorial dos produtos obtidos. Dessa forma, a seguir serão apresentadas as principais etapas de obtenção de extrato de soja tradicional e como estas etapas interferem na composição do produto.

2.5.1 Seleção da Cultivar de Soja

As cultivares de soja podem ser selecionados para a produção de extrato de soja em função de características como teor proteico, rendimento, características sensoriais como aroma e sabor, cor do extrato obtido (claro, amarelo, escuro), além de outros fatores (RIAZ, 2006). Ma et al. (2015) avaliaram a influência de 70 genótipos de soja e verificaram que as características químicas distintas dos genótipos afetam as propriedades sensoriais de extrato de soja. Os referidos autores verificaram que cultivares com maior rendimento, proporção de frações protéicas 11S:7S, óleo e sólidos solúveis e com menor teor de gliciteína e proteína total, possivelmente serão mais aceitos pelos consumidores e indústrias processadoras.

Entretanto, o estudo apontou que consumidores com diferentes hábitos alimentares, como os ocidentais e chineses, apresentam aceitação sensorial distinta.

As propriedades sensoriais do extrato de soja podem ser melhoradas selecionando-se o cultivar de soja com as características mais apropriadas (MA et al., 2015). Por meio das técnicas de melhoramento genético, tem sido desenvolvidos cultivares de soja especial, como é o caso da BRS 257, desenvolvida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), que é isenta das enzimas lipoxigenases (EMBRAPA, 2014) e, por isso, apresenta sabor menos acentuado.

Após a seleção da cultivar de soja mais apropriada para a obtenção do extrato de soja, os grãos são selecionados com remoção dos grãos danificados e materiais estranhos. Ainda, os grãos de soja podem ser descascados ou utilizados integralmente, seguidos de lavagem para remoção de impurezas. Posteriormente, são submetidos ao processo de branqueamento e maceração em água.

2.5.2 Branqueamento

O branqueamento refere-se a imersão dos grãos de soja em água em ebulição ou vapor, visando inativar enzimas e reduzir a carga microbiana (GOWEN et al., 2007). Esta etapa pode ou não ser utilizada no processamento de extrato de soja, sendo que geralmente é realizada antes da maceração dos grãos em água.

O branqueamento visa principalmente a inativação da enzima lipoxigenase, que está associada a formação do *beany flavor* (LV et al., 2011). Esta etapa também pode reduzir o desenvolvimento de micro-organismos mesófilos durante a maceração e afetar a taxa de absorção de água dos grãos durante a maceração. Gowen et al. (2007) relataram que, durante o processo de branqueamento, o tegumento da semente da soja é plasticizado, permitindo rápida absorção de umidade durante o processo subsequente da maceração.

O branqueamento dos grãos pode ser efetuado entre 5 e 20 min, utilizando proporção de grãos de soja:água de 1:3 a 1:5 e temperatura entre 85 e 100 °C, sendo que um longo tratamento pode reduzir a solubilidade proteica e o rendimento (ACHOURI; BOYE; ZAMANI, 2007; NELSON; STEINBERG; WEI, 1976; RIAZ, 2006; PRABHAKAM; PERERA, 2006). O branqueamento realizado com solução de bicarbonato de sódio a 80 °C é um método eficaz na inativação de lipoxigenase (LV et al., 2011). É comum a adição de sais para aumentar a alcalinidade da água, como

o bicarbonato de sódio (GOWEN et al., 2007). A adição de bicarbonato de sódio na etapa de branqueamento, maceração ou trituração a quente é indicada, pois além de desfavorecer a ação de enzimas como lipoxigenases e β -glicosidasas, está associada a maior solubilidade protéica (GIRI; MANGARAJ, 2012; RIAZ, 2006).

O branqueamento também pode afetar as características nutricionais do extrato de soja. Song, An e Kim (2003) observaram que durante o branqueamento dos grãos de soja pode ocorrer redução no teor de nutrientes como açúcares, aminoácidos e vitaminas, mesmo que em pequena proporção. Saldivar, Wang e Chen (2010), verificaram que o branqueamento de soja tipo hortaliça, colhida do estádio R6, em água a 100 °C por 10 min ocasionou redução no teor de glicose, frutose, sacarose e rafinose, devido a lixiviação destes compostos. Lv et al. (2011) avaliaram o efeito do branqueamento sobre os compostos voláteis causadores do *beany flavor* em extrato de soja, utilizando temperaturas entre 80 e 100 °C por até 10 min e verificaram que em até 6 min houve redução significativa no teor destes compostos, bem como na atividade de lipoxigenase. Durante o branqueamento, temperaturas elevadas também podem ocasionar a insolubilização das proteínas da soja (SHIN; KIM; KIM, 2013) e, com isso, reduzir o seu teor no extrato de soja.

2.5.3 Maceração

A maceração ou hidratação dos grãos de soja é utilizada para promover o amaciamento dos grãos e, conseqüentemente, facilitar o cozimento e a trituração (PAN; TANGRATANAVALEE, 2003; VISHWANATHAN; SINGH; SUBRAMANIAN, 2011). A proporção utilizada entre os grãos de soja e água de maceração geralmente varia de 1:3 a 1:5 (soja:água). O tempo desta etapa também é variável e comumente os grãos de soja são macerados de 3 a 16 h em água ou solução contendo bicarbonato de sódio (ACHOURI; BOYE; ZAMANI, 2007; KIM; WICKER, 2005; JUNG; MURPHY; SALA, 2008; NELSON; STEINBERG; WEI, 1976; STANOJEVIC et al., 2012; ZHANG et al., 2012; YAN-CHUN et al., 2011). Nas indústrias de alimentos, esta etapa geralmente é eliminada ou reduzida, devido o elevado tempo requerido que não é compatível com os processos industriais.

A maceração dos grãos de soja em água fria requer tempo prolongado, podendo induzir, em alguns casos, a algumas reações indesejáveis e favorecer o crescimento microbiano (RIAZ, 2006). Neste processo pode ocorrer uma diminuição

de 4 a 10 % no teor de isoflavonas, além de outros compostos que podem ser reduzidos, como os oligossacarídeos (OETTERER et al., 2006). Pan e Tangratanavalle (2003) verificaram que cerca de 1 % de sólidos solúveis foi lixiviado nos primeiros 30 min de maceração da soja, chegando até 5,7 % de perda em 8 h de imersão a 40 °C. Lima, Kurozawa e Ida (2014), ao avaliarem as diferentes condições de maceração da soja (25 a 70 °C por até 7 h) verificaram que o teor de isoflavonas totais e proteínas solúveis foram melhor preservados nas temperaturas de 25 e 40 °C de maceração, quando comparados com 55 e 70 °C. Isto ocorreu devido o aumento na taxa de transferência de massa com a temperatura que resultou na lixiviação de compostos como oligossacarídeos, isoflavonas e proteínas de forma mais intensa do que na maceração a frio (OETTERER et al., 2006; PAN; TANGRATANAVALEE, 2003). Por outro lado, a maceração a quente possui a vantagem de requerer tempo menor, além de eliminar as reações enzimáticas indesejáveis (RIAZ, 2006).

A maceração dos grãos tem sido utilizada para reduzir ou aumentar o teor de compostos de interesse. Lima e Ida (2014) verificaram que a maceração dos grãos de soja em temperaturas próximas a 55 °C por 6 h pode estimular a atividade de β -glicosidase endógena da soja e, dessa forma, favorecer a conversão de isoflavonas na forma de β -glicosídeos em agliconas.

2.5.4 Trituração dos Grãos

A trituração ou homogeneização dos grãos de soja visa o rompimento das células vegetais para liberação dos corpos proteicos e lipídicos na água, obtendo um extrato com elevado teor de proteínas e que possa ser facilmente separado do resíduo (RIAZ, 2006).

A trituração geralmente ocorre entre 1 e 5 min e pode ser realizada em diferentes equipamentos com temperaturas que variam de 25 a 100 °C e proporção de grãos de soja:água que pode variar de 1:6 até 1:10 (ACHOURI; BOYE; ZAMANI, 2007; JUNG; MURPHY; SALA, 2008; NELSON; STEINBERG; WEI, 1976; RIAZ, 2006; PRABHAKAM; PERERA, 2006; YAN-CHUN et al., 2011). Em processos industriais os grãos de soja geralmente são triturados a frio, entre 3 a 40 °C e tempo de 3 a 20 min ou a quente, em temperaturas entre 60 a 95 °C e tempo de 3 a 20 min (MIZUTANI; HASHIMOTO, 2004; FERRAGUT et al., 2014).

Durante a trituração a frio, na presença de lipoxigenases, pode ocorrer a oxidação de lipídios e formação de sabores indesejáveis ao extrato de soja (VISHWANATHAN; SINGH; SUBRAMANIAN, 2011). Assim como ocorre na etapa de maceração, a trituração dos grãos de soja em água pode favorecer a ação da β -glicosidase endógena da soja que hidrolisa as isoflavonas na forma de β -glicosídeos e conseqüentemente reduz o seu teor, aumentando o teor das agliconas correspondentes (LIMA; IDA, 2014; WANG; MURPHY, 1996).

2.5.5 Separação do Resíduo

A separação do resíduo do extrato de soja visa a eliminação do material insolúvel que pode ocasionar sensação de arenosidade ao produto (ROSENTHAL et al., 2003). Esta etapa pode ser realizada por meio de centrifugação ou filtração em materiais com porosidade distinta, que pode afetar a quantidade de sólidos totais do extrato de soja.

O método de separação do resíduo pode afetar a composição do extrato de soja em virtude do tamanho das partículas que foram separadas, bem como a eficiência do processo. Além disso, a separação pode ocorrer antes ou após o tratamento térmico (ACHOURI; BOYE; ZAMANI, 2007; HAYTA; ALPASLAN; CAKMAKLI, 2006; KAO et al., 2004; KIM; WICKER, 2005; JUNG; MURPHY; SALA, 2008; NELSON; STEINBERG; WEI, 1976; PRABHAKAM; PERERA, 2006; STANOJEVIC et al., 2012; YAN-CHUN et al., 2011). Rosenthal et al. (2003) avaliaram a hidrólise enzimática visando a redução do tamanho das partículas em suspensão e verificaram que esta etapa poderia substituir a filtração em extrato de soja.

O resíduo obtido após a filtração do extrato de soja é denominado na linguagem japonesa de *okara*, sendo que devido ao aumento no consumo de extrato de soja ocorreu um intenso aumento na produção de *okara* (LU et al., 2013). O *okara* é tratado como um resíduo com pouco valor de mercado em função do curto tempo de validade, apesar de conter uma parte considerável dos componentes da soja. O *okara* em base seca, possui cerca de 30 % de proteínas, 8,5 % de lipídios, 3,8 % de carboidratos, 3,0 % de cinzas e 55,5 % de fibras (VILLANUEVA et al., 2010). Ainda, pode conter aproximadamente um terço do conteúdo das isoflavonas

presentes na soja, além de compostos como saponinas, fitatos e outros compostos (JACKSON et al., 2002; LU et al., 2013).

2.5.6 Tratamento Térmico

A obtenção de extrato de soja envolve processos térmicos, que aumentam a validade do produto por eliminar micro-organismos e pode inativar fatores antinutricionais presentes na soja, como os inibidores de proteases e as lectinas (TORO-FUNES et al., 2015). O binômio tempo-temperatura empregado no tratamento térmico é determinante para a inativação dos inibidores de proteases, sendo que Kwok, Liang e Niranjana (2002) recomendaram as seguintes condições de tratamento térmico para a inativação de 90 % destes constituintes: 93 °C/60 min; 100 °C/40 min; 121 °C/5 a 10 min; 143 °C/62 s ou 154 °C/29 s. O tratamento térmico convencional geralmente é realizado entre 90 e 100 °C e de 5 a 30 min (MIZUTANI; HASHIMOTO, 2004; FERRAGUT et al., 2014; JUNG; MURPHY; SALA, 2008; KAO et al., 2004; YAN-CHUN et al., 2011). A indústria de alimentos geralmente utiliza o processo UHT. As condições elevadas de tratamento térmico podem ocasionar a desnaturação e agregação das proteínas de soja com conseqüente insolubilização (NIK et al., 2009).

Ainda, durante o tratamento térmico pode ocorrer modificação no perfil de alguns componentes, como as isoflavonas. Segundo Jackson et al. (2002), as isoflavonas malonilglicosídeos são termicamente instáveis e o seu teor diminui com a intensidade do tratamento térmico, aumentando o teor dos β -glicosídeos ou acetilglicosídeos correspondentes. Entretanto, as isoflavonas agliconas apresentaram estabilidade ao tratamento térmico realizado a 100 °C por até 30 min (KAO et al., 2004).

O tratamento térmico do extrato de soja favorece a reação de *Maillard* e pode causar perda na qualidade nutricional do produto, por reduzir a disponibilidade de lisina (FERRAGUT et al., 2014; SEIQUER et al., 2006; TORO-FUNES et al., 2015). Dessa forma, recentemente tem sido investigado o uso de alta pressão combinado ou não com o uso de temperaturas elevadas, como uma alternativa ao tratamento térmico convencional (FERRAGUT et al., 2014; GUERRERO-BELTRÁN et al., 2009; SMITH; MENDONÇA; JUNG, 2009; TORO-FUNES et al., 2015). Segundo Ferragut et al. (2014), o emprego de alta pressão foi eficaz devido à força de cisalhamento e

cavitação que atuaram sobre o alimento líquido ao passar sobre uma válvula de alta pressão, sendo que os principais efeitos foram a redução do tamanho das partículas, destruição de micro-organismos e aumento da estabilidade física do produto. Ainda, de acordo com Guerrero-Beltrán et al. (2009) este processo pode inativar os inibidores de proteases em extrato de soja.

2.6 FERMENTAÇÃO DO EXTRATO DE SOJA

A fermentação é um bioprocesso eficiente e utilizado para melhorar as propriedades funcionais dos alimentos (LAI et al., 2013). O extrato de soja é uma bebida que pode ser fermentada por diferentes micro-organismos, sendo um substrato adequado para o crescimento de bactérias lácticas que são utilizadas no preparo de produtos como iogurtes, queijos e bebidas (CUENCA; QUICAZÁN, 2004; GARRO; VALDEZ; GIORI, 2004; LAI et al., 2013; ZHAO; SHAH, 2014).

A fermentação do extrato de soja por vários micro-organismos, em especial as bactérias lácticas, tem sido utilizada para melhorar o sabor e aumentar a sua aceitabilidade (BEASLEY; TUORILA; SARIS, 2003; BLAGDEN; GILLILAND, 2005; DENKOVA; MURGOV, 2005). Dessa forma, a fermentação do extrato de soja pode tornar este produto mais aceitável ao consumidor, por melhorar as características sensoriais e as propriedades benéficas à saúde. Em produtos fermentados de soja, os metabólitos primários como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e sais podem melhorar a qualidade sensorial, sendo que metabólitos secundários como isoflavonas, saponinas e oligossacarídeos podem contribuir para melhorar as propriedades funcionais e antioxidantes dos produtos de soja (LEE et al., 2014; (WARDHANI, VÁZQUEZ e PANDIELLA, 2010). Os produtos formados durante a fermentação láctica aumentam a preferéncia dos produtos de soja, além de ocorrer a formação de rede de gel no extrato de soja, com modificação na textura (DONKOR et al., 2007; PENG; GUO, 2015).

A fermentação do extrato de soja geralmente visa reduzir o conteúdo de rafinose, estaquiose e saponinas e aumentar o teor de isoflavonas agliconas e a atividade antioxidante (FAVARO TRINDADE et al., 2001; LAI et al., 2013; ZHAO; SHAH, 2014). Também, durante a fermentação do extrato de soja, ocorre aumento do número de micro-organismos iniciadores presentes, com redução de pH e aumento da acidez (BAÚ; GARCIA; IDA, 2014; CHUN et al, 2007; DONKOR et al.,

2007; MARAZZA; GARRO; GIORI, 2009; ZHAO; SHAH, 2014). Os principais constituintes assimilados pelos micro-organismos durante a fermentação são as proteínas e os açúcares (YANG et al., 2014). As fontes de carbono mais utilizadas pelos micro-organismos são a glicose e sacarose, entretanto, estudos relataram que os principais oligossacarídeos da soja, rafinose e estaquiase, também podem ser hidrolisados por bactérias e fungos (CHUN et al, 2007; DONKOR et al., 2007; MARAZZA; GARRO; GIORI, 2009; YANG et al., 2014).

Os micro-organismos são capazes de hidrolisar a rafinose e estaquiase devido a produção da enzima α -galactosidase durante o processo fermentativo (MARAZZA; GARRO; GIORI, 2009; YANG et al., 2014). Apesar dos oligossacarídeos da soja apresentarem características prebióticas (ZHOU et al., 2012), a redução do teor de rafinose e estaquiase em extrato de soja poderia aumentar a aceitabilidade do produto, uma vez que o consumo de produtos contendo elevado teor destes oligossacarídeos pode ocasionar efeitos de desconforto abdominal indesejáveis (YANG et al., 2014).

O teor de algumas vitaminas também pode ser reduzido ou aumentado durante a fermentação de extrato de soja (YANG et al., 2014). Zhao e Shah (2014) verificaram alteração no conteúdo de ácido ascórbico, α -tocoferol, riboflavina e tiamina durante a fermentação de extrato de soja com diferentes espécies de *Lactobacillus*.

A presença de micro-organismos fermentadores com elevada atividade proteolítica em produtos de soja é interessante, pois além de produzir aminoácidos e peptídeos para seu consumo devido a hidrólise de proteínas, esta atividade também pode contribuir para a liberação de peptídeos antioxidantes, além de compostos fenólicos associados com as proteínas da soja (ALU'DATT et al., 2013; ROBLET et al., 2012; ZHAO; SHAH, 2014). Em geral, o teor de compostos fenólicos como o ácido ferúlico, clorogênico e gálico aumentam com a redução do pH do extrato de soja para 4,0, seguido de redução após determinado período (ZHAO; SHAH, 2014). Esta redução pode ocorrer porque alguns compostos fenólicos podem ser metabolizados por bactérias (RODRIGUEZ-ROQUE et al., 2013).

Zhao e Shah (2014) ao fermentarem o extrato de soja com *L. acidophilus* CSCC 2400, *L. paracasei* CSCC 279, *L. zae* ASCC 15820 e *L. rhamnosus* WQ2 verificaram que a capacidade antioxidante do produto pode ser aumentada estendendo a fermentação por um tempo maior, até atingir o pH inferior (3,8) ao

obtido tradicionalmente em produtos como o iogurte e similares (4,5). Por outro lado, Marazza et al. (2012) relacionaram o aumento da atividade antioxidante de extrato de soja fermentado com *L. rhamnosus* CRL981 com a maior quantidade de isoflavonas agliconas. No referido estudo, as isoflavonas obtidas de extrato de soja fermentado foram capazes de inibir a oxidação do DNA induzida pelo reagente de Fenton. Xiao et al. (2015) também fermentaram o soro de extrato de soja com *Lactobacillus plantarum* B1-6 e verificaram um aumento na atividade antioxidante e teor de isoflavonas agliconas.

O perfil de isoflavonas pode ser modificado em extrato de soja fermentado, devido a presença da enzima β -glicosidase endógena da soja ou produzida por micro-organismos (YEOM et al., 2012), possibilitando a obtenção de produtos de soja fermentados com teor elevado de isoflavonas agliconas. Vários estudos demonstraram que alguns micro-organismos foram capazes de produzir β -glicosidase e aumentar o teor de isoflavonas agliconas em extrato de soja (CHUN et al, 2007; DONKOR; SHAH, 2008; MARAZZA; GARRO; GIORI, 2009; REKHA; VIJAYALAKSHMI, 2011; ZHAO; SHAH, 2014). Entretanto, apesar de muitos estudos quantificarem a atividade de β -glicosidase e relacionarem com a bioconversão de isoflavonas, existem outras enzimas não específicas que podem ser produzidas por micro-organismos, como a β -galactosidase, que também pode realizar esta hidrólise (ZHAO; SHAH, 2014).

A produção de enzima com atividade de β -glicosidase por micro-organismos pode variar em função do tempo de incubação, presença de compostos indutores no meio e quantidade de nutrientes e minerais disponível (PALMA-FERNANDEZ; GOMES; SILVA, 2002). Assim, as enzimas β -glicosidase produzidas pelos micro-organismos podem apresentar diferentes especificidades e características ideais de atuação. A β -glicosidase produzida por *L. rhamnosus* CRL981 foi caracterizada e apresentou atividade máxima entre 30 e 45 °C, sendo que em temperaturas superiores a 50 °C não foi detectado atividade enzimática (MARAZZA; GARRO; GIORI, 2009). Por outro lado, Grimaldi, Bartowski e Jiranek (2005) observaram que a atividade β -glicosidase produzida por espécies de *Lactobacillus* e *Pediococcus* foi reduzida em temperatura superior a 60 °C, demonstrando que os micro-organismos podem produzir enzimas com características distintas.

Durante a fermentação do extrato de soja, maior hidrólise das isoflavonas na forma de β -glicosídeos geralmente ocorre na fase de crescimento exponencial dos

micro-organismos, sendo que quando o extrato de soja atinge pH reduzido (4,0), a atividade de β -glicosidase também é reduzida devido a desnaturação (MARAZZA; GARRO; GIORI, 2009; ZHAO; SHAH, 2014). Marazza, Garro e Giori (2009) verificaram que em extrato de soja fermentado com *L. rhamnosus* CRL981 a 37 °C por até 24 h, o teor de isoflavonas na forma de β -glicosídeos diminuiu entre 6 h de fermentação e foi totalmente hidrolisado até 12 h de fermentação, com aumento das isoflavonas agliconas correspondentes. Comportamento similar foi verificado por Chun et al. (2007) ao avaliarem diferentes espécies de bactérias lácticas em extrato de soja fermentado, com maior taxa de hidrólise das isoflavonas na forma de β -glicosídeos durante 6 h de fermentação, que atingiu conversão de 90 e 100 % de daidzina e genistina, respectivamente. Entretanto, Yang et al. (2014) fermentaram o extrato de soja com o cogumelo *Grifola frondosa* e verificaram que o teor de daidzeína aumentou rapidamente enquanto que o teor de genisteína reduziu.

Dentre os micro-organismos utilizados na fermentação de extrato de soja, também pode ser empregado a cultura de kefir, uma vez que o extrato de soja revelou-se um substrato adequado para o desenvolvimento satisfatório das bactérias e leveduras que compõe esta cultura (BAÚ; GARCIA; IDA, 2014) e não há relatos na literatura da utilização deste micro-organismos para bioconversão de isoflavonas e hidrólise de oligossacarídeos.

2.7 CULTURA DE KEFIR

Kefir é uma bebida tradicional obtida por meio de fermentação do leite por uma mistura de micro-organismos que podem produzir dióxido de carbono, etanol, ácido láctico e acético (FAO/WHO, 2014; NALBANTOGLU et al., 2014; YOYANOUDI et al., 2013). O conjunto de micro-organismos que compõe o kefir normalmente é encontrado sob a forma de um pequeno aglomerado (grão), mantido unido por uma matriz de polissacarídeos e proteínas (LOPITZ-OTSOA et al., 2006). Os grãos de kefir são formados por misturas complexas de leveduras e bactérias lácticas e acéticas que existem em simbiose (LEITE et al., 2013; NALBANTOGLU et al., 2014; YOYANOUDI et al., 2013).

A composição de micro-organismos dos grãos de kefir pode variar muito em função da origem dos grãos, armazenamento e da forma de obtenção da bebida (LEITE et al., 2013; MAGALHÃES et al., 2010; ZHOU et al., 2009). Uma grande

variedade de espécies de *Lactobacillus* foram isolados da bebida e grãos de kefir, como *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefirgranum* e *Lactobacillus parakefiri* (LEITE et al., 2013). Além disso, pode conter outras bactérias lácticas como *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* spp, bactérias acéticas como *Acetobacter* e leveduras, que podem ser fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Torula*) ou não fermentadoras (*Saccharomyces cerevisiae*) (IRIGOYEN et al., 2005; PIERMARIA; CANAL; ABRAHAM, 2008).

A diversidade de micro-organismos garante a bebida de kefir um aroma exótico e sabor ligeiramente ácido e refrescante (LEITE et al., 2013; ONER et al., 2010). O principal produto formado a partir do metabolismo microbiano é o ácido láctico, seguido de compostos como acetaldeído e diacetil, que conferem sabor, sendo que as leveduras produzem etanol e dióxido de carbono (LOPITZ-OTSOA et al., 2006). Devido a diversidade e complexidade da cultura de kefir, a produção de uma bebida comercial estável e uniforme é desfavorável (FARNWORTH, 2005). Dessa forma, a cultura de kefir liofilizada é comercializada para obtenção de um produto estável, uma vez que contém micro-organismos selecionados dos grãos de kefir, que conferem características desejáveis para o produto final (YOVANOUDI et al., 2013).

Os micro-organismos dos grãos de kefir se mantêm unidos e se propagam por meio de uma matriz de proteínas e polissacarídeos, sendo que o kefiran é o principal polissacarídeo produzido pela ação de *Lactobacillus* homofermentativos (NALBANTOGLU et al., 2014; YOVANOUDI et al., 2013). O kefiran é um glucogalactano solúvel em água, que tem sido reportado por possuir atividade antibacteriana e antitumoral, por modular o sistema imunológico e proteger as células epiteliais contra *Bacillus cereus* (PIERMARIA; CANAL; ABRAHAM, 2008). Além disso, outros exopolissacarídeos produzidos durante a fermentação do leite com grãos de kefir foram investigados e apresentaram elevada atividade antioxidante (CHEN et al., 2015).

A produção e consumo do kefir são crescentes em todo o mundo, devido seus benefícios a saúde (CHIFIRIUC et al., 2011; FARNWORTH; MAINVILLE, 2003). Algumas propriedades benéficas podem ser citadas, como ação antimicrobiana, antiinflamatória, anti-tumoral, cicatrizante, antialérgica e de auxílio na modulação do sistema imune (LEE et al., 2007; GAO et al., 2012; GAO et al., 2013; RIZK;

MAALOUF; BAYDOUN, 2009; RODRIGUES et al., 2005; SILVA et al., 2009; VINDEROLA et al., 2005). As bebidas de kefir também foram indicadas à pacientes em tratamento de doenças gastrintestinais, doenças metabólicas, hipertensão, isquemia do coração e alergia (FARNWORTH; MAINVILLE, 2003). Ainda, algumas espécies de *Lactobacillus* e leveduras presentes no kefir demonstraram efeito positivo na colonização do intestino (KUMURA et al., 2004).

Algumas bactérias lácticas e várias cepas de leveduras encontradas no kefir apresentam resistência a sais biliares e ao baixo pH, propriedade de adesão, capacidade de inibição de alguns patógenos intestinais e produção de bacteriocinas (GOLOWCZYC et al., 2008; MIAO et al., 2014; ROMANIN et al., 2010; ZANIRATI et al., 2015), podendo ser uma fonte adequada de micro-organismos com potencial probiótico (ROMANIN et al., 2010). Entretanto, além do kefir possivelmente conter micro-organismos probióticos, o kefir e o kefiran podem atuar como uma matriz ou substrato eficaz para o veículo de micro-organismos probióticos, como o *Bifidobacterium bifidum* (SERAFINI et al., 2014).

Além da utilização dos micro-organismos do kefir para a produção de bebida de leite, outras possibilidades de uso tem sido investigadas, como a produção de queijo (DIMITRELLOU et al., 2007), bebida de soro de leite (ATHANASIADIS et al., 2004), bebida de leite de nozes (CUI et al., 2013) e fermentação de produtos de panificação visando o aumento da vida útil (MANTZOURANI et al., 2014). Apesar de vários estudos indicarem as propriedades benéficas do kefir, existem poucos estudos relacionados com a utilização de cultura de kefir na fermentação do extrato de soja, bem como seu efeito nas propriedades do produto (BAÚ, GARCIA e IDA, 2013; BOTELHO et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar a influência dos diferentes processos de obtenção de extrato de soja e otimizar o processo para conversão de isoflavonas em agliconas.
- Aplicar a cultura de kefir no extrato de soja para fermentação e hidrólise de oligossacarídeos e isoflavonas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os diferentes processos de obtenção de extrato de soja analisando as propriedades físicas, químicas, microbiológicas e aceitabilidade.
- Otimizar o processo de obtenção de extrato de soja na conversão de isoflavonas β -glicosídeos em agliconas.
- Avaliar a estabilidade térmica das diferentes formas de isoflavonas em extrato de soja a 97°C por até 25 min.
- Aplicar a cultura de kefir para fermentação de extrato de soja e avaliar a capacidade de produção de α -galactosidase e β -glicosidase para hidrólise de oligossacarídeos e isoflavonas β -glicosídeos em agliconas.
- Avaliar a viabilidade celular, pH, acidez, teor de isoflavonas, teor de açúcares, atividade de β -glicosidase e atividade de α -galactosidase durante a fermentação do extrato de soja com cultura de kefir.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA, CULTURA STARTER E REAGENTES

O extrato de soja foi preparado com a cultivar de soja [*Glycine Max* (L.) Merr.] BRS 257, livre de lipoxigenases, doada pela empresa Sementes Paraná Ltda, com sede em Mauá da Serra, Paraná, safra 2011/2012. Esta cultivar apresenta, em média, 10,3 g/100g de umidade, 4,7 g/100g de cinzas, 38,8 g/100g de proteínas e 16,9 g/100g de lipídios.

Para fermentação do extrato de soja foi utilizada uma cultura starter de kefir liofilizada (Lyofast MT 036 LV, Clerici-Sacco, Brasil), composta por linhagens mistas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* spp *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Para cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) e construção das respectivas curvas de calibração, foi utilizado os seguintes padrões de isoflavonas: 6''-O-acetilglicosídeos e 6''-O-malonilglicosídeos (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japão), β -glicosídeos e agliconas (Sigma-Aldrich Co., Estados Unidos). Para cromatografia de troca iônica de alta performance (HPAEC) e construção das respectivas curvas de calibração, foi utilizado os seguintes padrões de açúcares: galactose, glicose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiase (Sigma-Aldrich Co., Estados Unidos). Para determinação da atividade de β -glicosidase e α -galactosidase foram utilizados os substratos p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo e p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), respectivamente. Para determinação da atividade de inibidores de tripsina foi utilizado o substrato benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida e a enzima tripsina (Sigma-Aldrich Co., Estados Unidos). Os demais reagentes foram de grau analítico ou específicos para cromatografia líquida.

4.2 INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE SOJA SOBRE AS PROPRIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS E ACEITABILIDADE

Para obtenção dos diferentes extratos de soja, em triplicata, foi utilizado 50 g de grãos inteiros com casca que foram previamente selecionados e limpos

manualmente, com remoção das sujidades. Para a obtenção de cinco diferentes extratos de soja, a proporção de soja: água na maceração (1:3; p:v) e homogeneização (1:8; p:v) foram mantidas. Na homogeneização a quantidade de água adicionada foi calculada pela subtração da quantidade de água absorvida pelos grãos macerados. A seguir serão descritos os cinco processos de obtenção de extrato de soja (Figura 4):

Processo A – O extrato de soja foi obtido conforme descrito pela Embrapa (2005). Assim, os grãos de soja foram macerados a 25 °C por 12 h em solução 0,5 % de bicarbonato de sódio, drenados e lavados em água corrente. Os grãos foram cozidos a 100 °C por 10 min em solução aquosa contendo 0,25 % de bicarbonato de sódio. Após a cocção, os grãos foram drenados, lavados em água corrente e homogeneizados em liquidificador (Arno Clic´Lav LN70, Brasil) por 3 min com água destilada a 90 °C. O homogenato foi filtrado com tecido tipo malha (150 mesh) e obtido o extrato de soja A que foi transferido para frascos de vidro apropriados e efetuado o tratamento térmico a 98 °C por 10 min.

Processo B – O extrato de soja foi obtido conforme descrito por Illinois (2012). Os grãos de soja foram macerados em água contendo 0,25 % de bicarbonato de sódio a 100 °C por 5 min, drenados e lavados em água fervente. A maceração com água quente foi realizada duas vezes. Os grãos macerados foram homogeneizados em liquidificador (Arno Clic´Lav LN70, Brasil) por 3 min com água destilada a 90 °C. O homogenato foi filtrado com tecido tipo malha (150 mesh) e obtido o extrato de soja B que foi transferido para frascos de vidro apropriados e efetuado o tratamento térmico a 98 °C por 20 min.

Processo C - O extrato de soja foi obtido conforme descrito por Kwok e Nirajan (1995) e Kwok, Basker e Niranjan (2000) com algumas modificações. Os grãos de soja foram macerados em água a 5 °C por 16 h, drenados e lavados em água corrente. Os grãos macerados foram homogeneizados em liquidificador (Arno Clic´Lav LN70, Brasil) por 3 min com água destilada a 25 °C. O homogenato foi filtrado com tecido tipo malha (150 mesh) e obtido o extrato de soja C que foi transferido em frascos de vidro apropriados e efetuado o tratamento térmico a 90 °C por 30 min.

Processo D - A obtenção do extrato de soja por este processo diferiu do processo C a partir da filtração do homogenato. O homogenato foi tratado termicamente a 90 °C

por 30 min segundo Kwok e Nirajan (1995) e Kwok, Basker e Nirajan (2000) e seguido de filtração com tecido tipo malha (150 mesh) e obtido o extrato de soja D.

Processo E - O extrato de soja foi obtido conforme descrito por Achouri, Boye e Zamani (2007). Os grãos de soja foram macerados em solução tampão de acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0) a 40 °C por 3 h, drenados e lavados em água corrente. Os grãos macerados foram homogeneizados em liquidificador (Arno Clic´Lav LN70, Brasil) por 3 min com água destilada a 90 °C. O homogenato foi transferido para frascos de vidro apropriados e efetuado o tratamento térmico a 116 °C aplicando pressão de 15 psi por 3 min. Foi realizada a filtração com tecido tipo malha (150 mesh) e obtido o extrato de soja E.

4.2.1 Caracterização das Propriedades Físicas dos Extratos de Soja

O pH dos extratos de soja A, B, C, D e E obtidos por diferentes processos, em triplicata, foi determinado em potenciômetro digital (Hanna HI 223, São Paulo, BR).

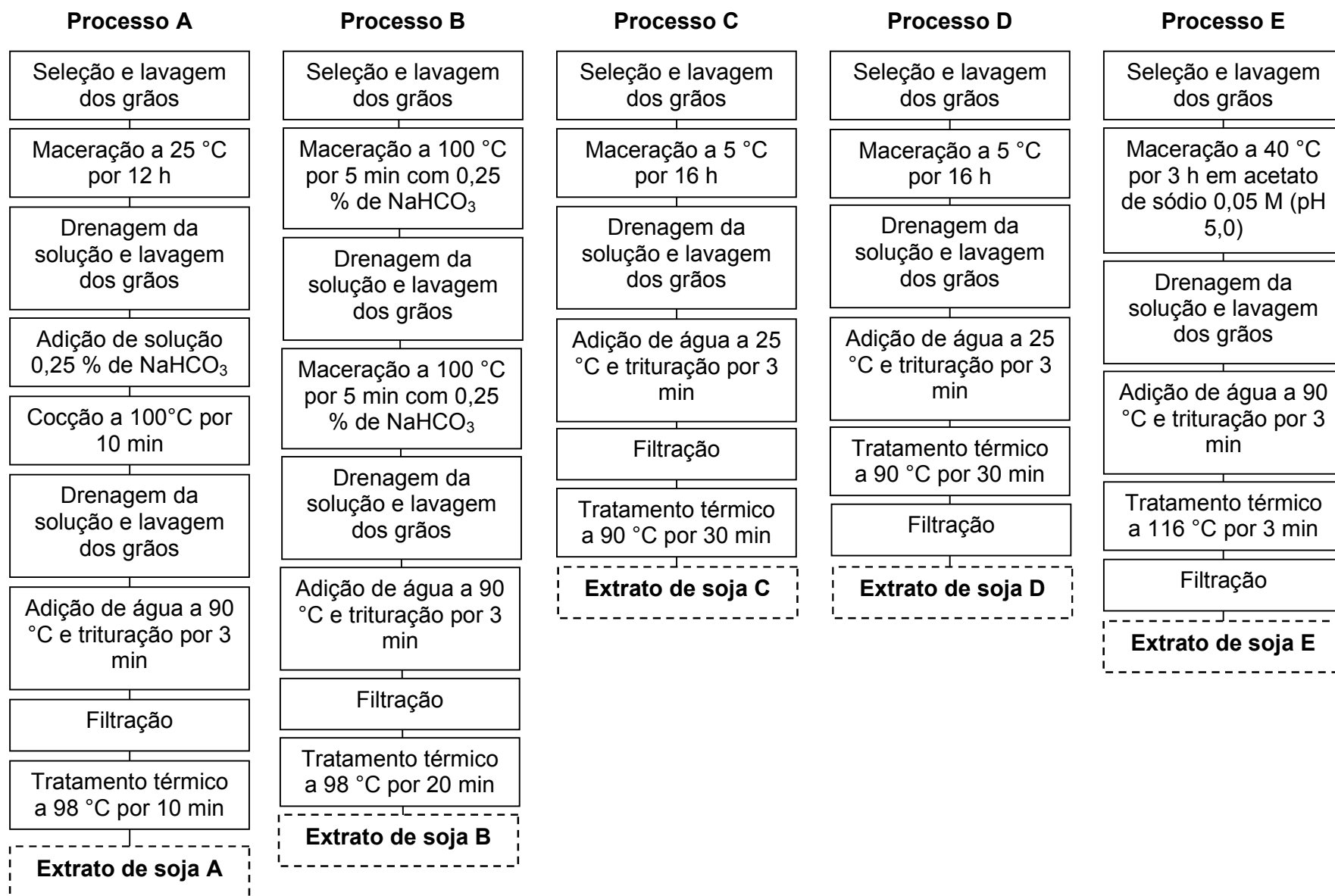
A cor foi medida em colorímetro (Konica Minolta Sensing CR-400, Japão), com iluminante D65 e conforme o sistema CIELAB (L^* , a^* e b^*). Os resultados da luminosidade (L^*) foram expressos considerando que 0 representa o preto e 100 representa o branco. Os também resultados foram expressos como ângulo da tonalidade cromática (H^*), calculada pela equação $H^* = \arctan(b^*/a^*)$, onde o ângulo de 0° refere-se à tonalidade vermelha; 90° a tonalidade amarela; 180° a tonalidade verde e 270° a tonalidade azul.

A viscosidade dos cinco extratos de soja foi determinada utilizando o viscosímetro digital (Alemmar *Brookfield* DVII+, Estados Unidos), com *spindle* 1, velocidade de 100 rpm, em 600 mL de extrato de soja a $10 \pm 2^\circ\text{C}$. A viscosidade foi expressa em *centipoise* (cP).

4.2.2 Composição Química

O teor de umidade, cinzas, proteínas e lipídios dos extratos de soja foi determinado em triplicata, conforme descrito pela AOAC (2006). O teor de carboidratos foi obtido por diferença.

Figura 4. Processos A , B , C, D e E de obtenção de extratos de soja



4.2.3 Determinação da Atividade de Inibidores de Tripsina

Os inibidores de tripsina foram extraídos conforme descrição de Liu e Markakis (1989) no extrato de soja previamente liofilizado a -50°C a 0,040 mbar (Liofilizador Christ Alpha 1-4 plus LSC, Reino Unido). Assim, 500 mg de extrato de soja liofilizado e desengordurado com hexano por 1 h a temperatura ambiente, foi extraído com 50 mL de água deionizada com agitação orbital a 200 rpm (Marconi MA570, Brasil) a 25°C por 30 min. Em seguida, a suspensão foi filtrada (Millex-GV, PVDF, membrana hidrofílica, $0,45\ \mu\text{m}$) e diluída até a obtenção de inibição de 40 a 60 % de tripsina.

A atividade dos inibidores de tripsina foi determinada conforme Kakade et al. (1974) e foi utilizado o benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA) como substrato. Foi definido arbitrariamente que uma unidade de tripsina (UT) correspondeu ao aumento de 0,01 unidades de absorvância a 410 nm por 10 mL do meio de reação. Uma unidade inibidora de tripsina (UIT) correspondeu a inibição de uma unidade de tripsina. Os resultados foram expressos como UIT por mg de extrato de soja, em base seca.

4.2.4 Extração e Quantificação de Isoflavonas

Os extratos de soja liofilizados previamente a -50°C a 0,040 mbar (Liofilizador Christ Alpha 1-4 plus LSC, Reino Unido), foram desengordurados com hexano (1:10, p/v) por 1 h à temperatura ambiente com agitação. A extração das isoflavonas foi realizada com 300 mg de amostra e 6,0 mL de solvente extrator composto por água, etanol e acetona (1:1:1, v/v/v) (YOSHIARA et al., 2012), por 1 h à temperatura ambiente e agitação em vórtex a cada 15 min. Após 1 h de extração, as amostras foram colocadas em banho ultrassônico à temperatura ambiente por 15 min, centrifugadas a 468 g por 15 min a 4°C (Eppendorf 5804 R, Alemanha) e o sobrenadante foi filtrado (Millex-GV, PVDF, membrana hidrofílica, $0,20\ \mu\text{m}$)

A separação e quantificação das diferentes formas de isoflavonas foram realizadas simultaneamente por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) conforme descrito Handa et al. (2014). Assim, alíquotas de $1,4\ \mu\text{L}$, em triplicata, foram injetadas automaticamente no cromatógrafo líquido UPLC[®] (Water, Estados Unidos). A separação e quantificação das isoflavonas foram conduzidas em coluna

de fase reversa (modelo Acquity – UPLC BEH C18 (Waters, Estados Unidos) com dimensão de 2,1 mm x 50 mm e tamanho da partícula de 1,7 μm). A eluição foi realizada com gradiente não linear, utilizando fase móvel A com água acidificada em pH 3,0 ajustado com ácido acético glacial e B com acetonitrila com fluxo de 0,7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a 35 °C. O gradiente foi iniciado com 90 % de eluente A e 10 % de eluente B e em 8 min de eluição, o gradiente atingiu a proporção de 0 % de A e 100 % de B e as condições iniciais retornaram em 9 min. O tempo total de corrida foi de 10 min. O detector utilizado foi de arranjo de diodos (Waters) com comprimento de onda ajustado para 260 nm. A identificação de cada forma química de isoflavona nos cromatogramas foi realizada por comparação dos espectros de absorção e tempos de retenção dos seus respectivos padrões. A quantificação das isoflavonas foi realizada por integração das áreas dos picos e padronização externa (área x concentração) usando cada padrão comercial como referência, sendo que o teor de gliciteína foi determinado com ajuste da curva de calibração com base na diferença de peso molecular da glicitina. Os resultados foram expressos em μmol de isoflavona por g de amostra ($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$), em base seca.

4.2.5 Análise das Condições Higiênico-Sanitárias

As análises microbiológicas dos extratos de soja foram realizadas em triplicata, como critério higiênico-sanitário para posterior submissão das amostras à análise sensorial.

Foram considerados os padrões exigidos para bebidas a base de extrato de soja, conforme a Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001). Foram realizadas Contagem de Coliformes a 45 °C, Contagem de *Bacillus cereus* e Pesquisa de *Salmonella* sp, seguindo a metodologia descrita na Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003).

4.2.6 Teste de Aceitação do Extrato de Soja

O projeto de pesquisa antes da execução foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, conforme parecer nº 221/2012 e CAAE 11278112.0.0000.5231 (Anexo 1).

A avaliação sensorial dos extratos de soja foi realizada, em cabines individuais, com luz branca e as amostras foram servidas em copos plásticos de coloração branca, com quantidades padronizadas de aproximadamente 30 mL, refrigeradas a 10 ± 2 °C e codificadas com números aleatórios de três dígitos. As formulações foram avaliadas após assegurar que os níveis de patógenos estavam abaixo do padrão estabelecido pela legislação vigente (BRASIL, 2001).

Participaram da avaliação sensorial 80 julgadores não treinados, de ambos os sexos, constituídos de alunos, professores e funcionários da UEL. A ficha referente a coleta de dados do julgador e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido encontram-se, respectivamente, nos Anexo 2 e 3.

A análise sensorial foi realizada utilizando o teste de aceitação de atributos, onde os julgadores receberam cinco amostras de extrato de soja monadicamente e de forma seqüencial. Entre as amostras foi disponibilizado aos julgadores água mineral e biscoito tipo água e sal para limpeza da cavidade bucal. Os julgadores foram instruídos a apontarem o quanto gostaram ou desgostaram do produto em relação aos atributos de cor, aroma, textura, sabor e aceitação global, utilizando uma escala hedônica de nove pontos estruturados variando de “Desgostei Extremamente (1)” a “Gostei Extremamente (9)” (STONE; SIDEL, 2004). A ficha utilizada encontra-se no Anexo 4.

4.2.7 Análise Estatística

Foram realizados a análise de variância (ANOVA), teste de homogeneidade de variâncias e normalidade dos resíduos e, posteriormente, teste de Tukey para comparação de médias ($p < 0,05$). Ainda, foi efetuada a análise de correlação entre os resultados utilizando o software Statistica 7.0, que foi aplicado aos resultados de caracterização física, química e teor de diferentes formas de isoflavonas.

4.3 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO DE SOJA SOBRE A ATIVIDADE DE B-GLICOSIDASE E CONVERSÃO DE ISOFLAVONAS NA FORMA DE B-GLICOSÍDEOS EM AGLICONAS E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA

4.3.1 Efeito da Temperatura e Tempo do Processo de Obtenção do Extrato de Soja Sobre a Atividade de β -Glicosidase e Conversão de Isoflavonas na Forma de β -Glicosídeos em Agliconas

Para obtenção do extrato de soja, foram realizadas adaptações no processo de obtenção de extrato de soja, e a definição do tempo de maceração por meio de uma curva de hidratação dos grãos a 5°C. Assim, os grãos previamente selecionados e limpos foram macerados em água destilada na proporção de 1:3 (p:v) (grãos de soja:água) a 5 °C por 14 h. Os grãos foram drenados e lavados em água corrente e em seguida, adicionou-se água destilada na proporção de 1:8 (p:v) (grãos macerados:água). O material foi homogeneizado em liquidificador (Philco All In One, São Paulo, BR) por 2 min na temperatura ambiente de 25 °C e obtido o homogenato.

Para avaliar o efeito da temperatura (X_1) e tempo (X_2) no processo de obtenção do extrato de soja sobre a atividade de β -glicosidase e conversão de isoflavonas na forma de β -glicosídeos em agliconas, foi aplicado o delineamento composto central rotacional 2^2 (CCD) com 4 pontos axiais e 3 replicatas no ponto central, totalizando 11 ensaios que foram realizados aleatoriamente. A Tabela 2 apresenta os níveis codificados e reais das variáveis independentes X_1 (temperatura) e X_2 (tempo).

Para cada ensaio foi utilizado um frasco de vidro contendo 150 mL do homogenato e incubado em banho-maria com agitação orbital em diferentes temperaturas ($X_1=36, 40, 50, 60$ e 64 °C) e tempos ($X_2=0,58, 1, 2, 3$ e $3,42$ h) conforme o CCD (Tabela 2). Após a incubação o homogenato foi rapidamente resfriado em banho de gelo, filtrado com tecido tipo malha (150 mesh) e obtido o extrato de soja. Em paralelo aos ensaios, foi obtido um controle (C) de extrato de soja, em triplicata, no qual não se aplicou as variáveis do processo X_1 (temperatura) e X_2 (tempo). O extrato de soja foi congelado e liofilizado para avaliação da atividade da β -glicosidase e conversão de isoflavonas na forma de β -glicosídeos em agliconas. A Figura 5 ilustra o processo de obtenção do extrato de soja otimizado.

Tabela 2. Delineamento composto central rotacional 2^2 com os níveis reais e codificados das variáveis independentes para obtenção de extratos de soja

Ensaio	Variáveis Independentes			
	Codificadas		Decodificadas	
	x_1	x_2	X_1	X_2
01	-1	-1	40,0	1,0
02	-1	1	40,0	3,0
03	1	-1	60,0	1,0
04	1	1	60,0	3,0
05	-1,41	0	36,0	2,0
06	+1,41	0	64,0	2,0
07	0	-1,41	50,0	0,58
08	0	+1,41	50,0	3,42
09	0	0	50,0	2,0
10	0	0	50,0	2,0
11	0	0	50,0	2,0

* x_1 e x_2 são os níveis codificados das variáveis independentes X_1 (temperatura em °C) e X_2 (tempo em h).

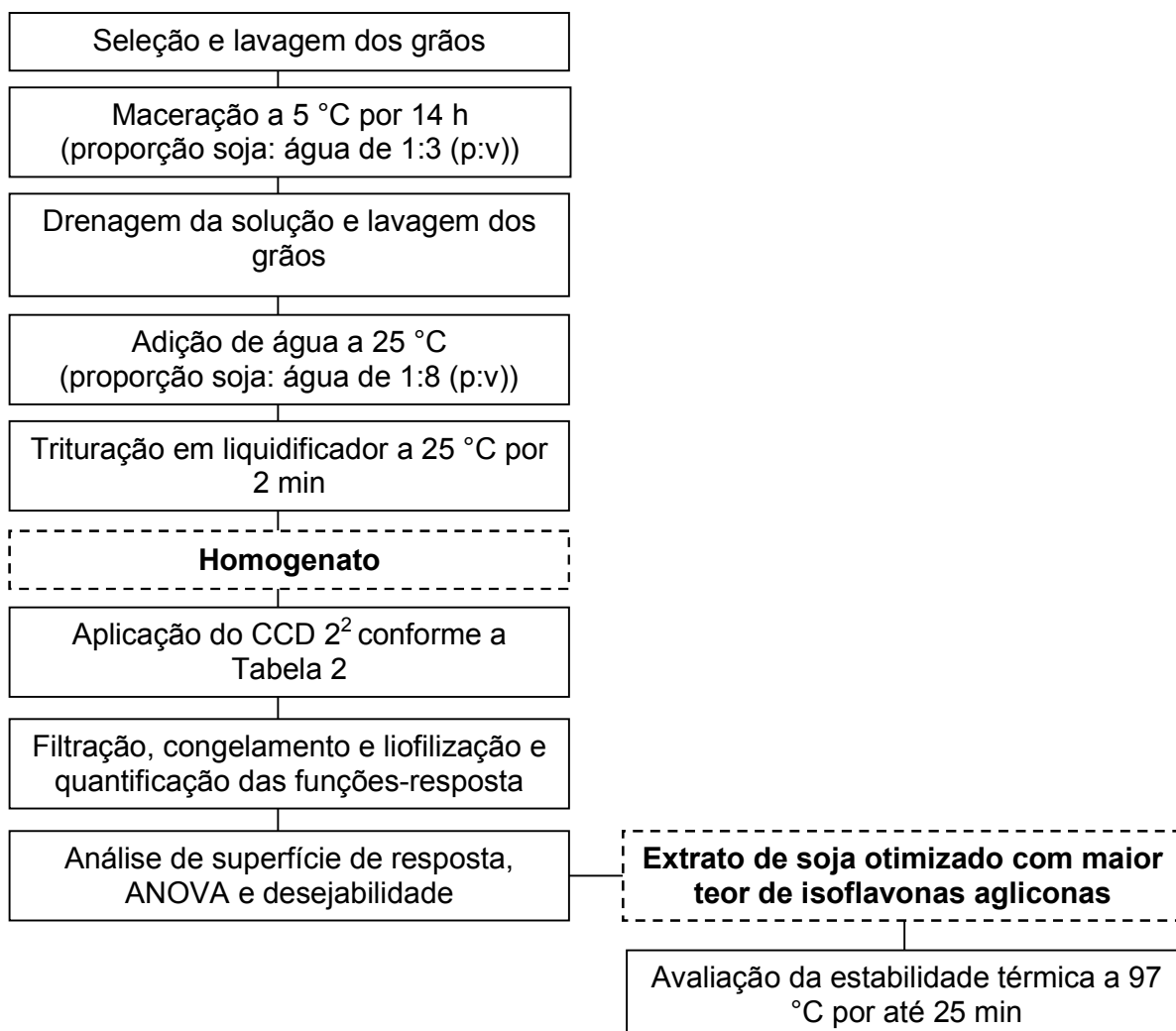
As funções respostas investigadas no extrato de soja foram β -GLU (Atividade de β -glicosidase) e teor de isoflavonas DAI (Daidzina), GEN (Genistina), MDAI (Malonildaidzina), MGLI (Malonilglicitina), MGEN (Malonilgenistina), ADAI (Daidzeína), AGLI (Gliciteína), AGEN (Genisteína). A partir das funções respostas foram realizadas a análise de regressão para avaliar os efeitos das variáveis independentes (x_1 e x_2) e suas interações.

A análise de variância (ANOVA) da regressão e coeficiente de determinação (R^2) foram realizados para verificar o ajuste do modelo aos dados experimentais. As funções respostas foram ajustadas conforme o modelo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + e \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, Y = função resposta, x_1 e x_2 = níveis das variáveis codificadas, β = coeficientes estimados para cada termo do modelo de superfície de resposta e e = erro puro.

Figura 5. Processo de obtenção do extrato de soja visando maior teor de isoflavonas agliconas e avaliação da estabilidade térmica



Os gráficos de superfície de resposta e parâmetros de desejabilidade foram gerados para avaliar a condição de atividade da β -glicosidase e máxima conversão de isoflavonas na forma de β -glicosídeos em agliconas. Os cálculos, construção dos gráficos das superfícies de resposta e desejabilidade foram realizados utilizando o programa Statistica 7.0.

O modelo proposto foi validado após obtenção de um extrato de soja em triplicata na condição de temperatura e tempo onde ocorreu a máxima conversão das isoflavonas na forma de β -glicosídeos em agliconas. O teor de agliconas totais deste extrato de soja foi quantificado e comparado com a função resposta estimada pelo modelo utilizando o teste t-Student ($p < 0,05$).

4.3.2 Avaliação da Estabilidade Térmica das Isoflavonas do Extrato de Soja Otimizado

A estabilidade térmica das diferentes formas de isoflavonas do extrato de soja otimizado foi avaliada a 97 ± 2 °C por 0, 5, 10, 15, 20 e 25 min. Foram utilizados frascos de vidro, em triplicata, contendo 200 mL do extrato de soja otimizado e após o tratamento térmico foram resfriados rapidamente em banho de gelo, congelados e liofilizados para quantificação das diferentes formas de isoflavonas.

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas aplicando posteriormente o teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.3.3 Determinação da Atividade de β -Glicosidase

A enzima β -glicosidase foi extraída a partir de 200 mg de extrato de soja liofilizado com 3,0 mL de tampão citrato 0,05 M (pH 4,5) contendo NaCl 0,1 M e agitados a cada 15 min por 1 h à temperatura ambiente (CARRÃO-PANIZZI; BORDIGNON, 2000). Em seguida, as misturas foram centrifugadas a $8200 \times g$, a 4 °C por 15 min (Eppendorf 5804R, Alemanha) e os sobrenadantes filtrados (Millex-GV, PVDF, membrana hidrofílica, 0,22 μ m) e utilizados como extratos enzimáticos para os ensaios de atividade da enzima β -glicosidase.

A atividade de β -glicosidase foi determinada conforme descrição de Matsuura e Obata (1993), com algumas modificações propostas por Lima e Ida (2014). Assim, o substrato p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo (0,8 mL; 1 mM) foi diluído em tampão citrato-fosfato (0,1 M; pH 5,0) e colocado em tubos de ensaio e incubados a 30 °C por 10 min em banho-maria. Em seguida, 0,2 mL do sobrenadante filtrado foram adicionados aos tubos de ensaio e mantidos a 30 °C por 30 min. A reação foi interrompida com a adição de 1,0 mL de solução 0,5 M de carbonato de sódio e o conteúdo centrifugado $6800 \times g$, a 25 °C por 15 min (Eppendorf 5804 R, Alemanha) para a eliminação de qualquer turbidez antes da leitura em espectrofotômetro (Biochrom Libra S22, Reino Unido) a 420 nm. Para cada amostra de determinação da atividade da enzima foi utilizado um controle de cor em paralelo, sem adição do substrato. A absorbância real foi obtida pela diferença entre a absorbância da amostra e do seu respectivo controle de cor. A concentração de p-nitrofenol (p-NP), produto da reação enzimática, foi determinada por meio da construção de uma curva

de calibração a partir do padrão de p-NP (0,04 a 0,32 μmol). Uma unidade de atividade (UA) foi definida como sendo a quantidade de enzima requerida para liberar 1 μmol de produto por minuto nas condições do ensaio. Os resultados foram expressos em UA por g de amostra em base seca ($\text{UA}\cdot\text{g}^{-1}$).

4.3.4 Extração e Quantificação das Isoflavonas

A extração e quantificação das isoflavonas foram realizadas conforme descrito no item 4.2.4.

4.4 EXTRATO DE SOJA FERMENTADO COM CULTURA DE KEFIR PARA HIDRÓLISE DE OLIGOSSACARÍDEOS E ISOFLAVONAS NA FORMA DE B-GLICOSÍDEOS EM AGLICONAS

4.4.1 Obtenção do Extrato de Soja

Os grãos de soja foram previamente selecionados, eliminando os danificados, manchados ou qualquer material estranho. Para a elaboração do extrato de soja, os grãos, usando proporção soja:água de 1:3 (p:v), foram macerados em água destilada a 5 °C por 14 h, drenados e lavados em água corrente. Os grãos macerados foram adicionados de água destilada na proporção 1:8 (p:v) e homogeneizados em liquidificador (Philco All In One, BR) por 2 min a 25 °C. O homogenato foi filtrado (malha 150 mesh) e submetido ao tratamento térmico a 97 ± 2 °C por 15 min e obtido o extrato de soja.

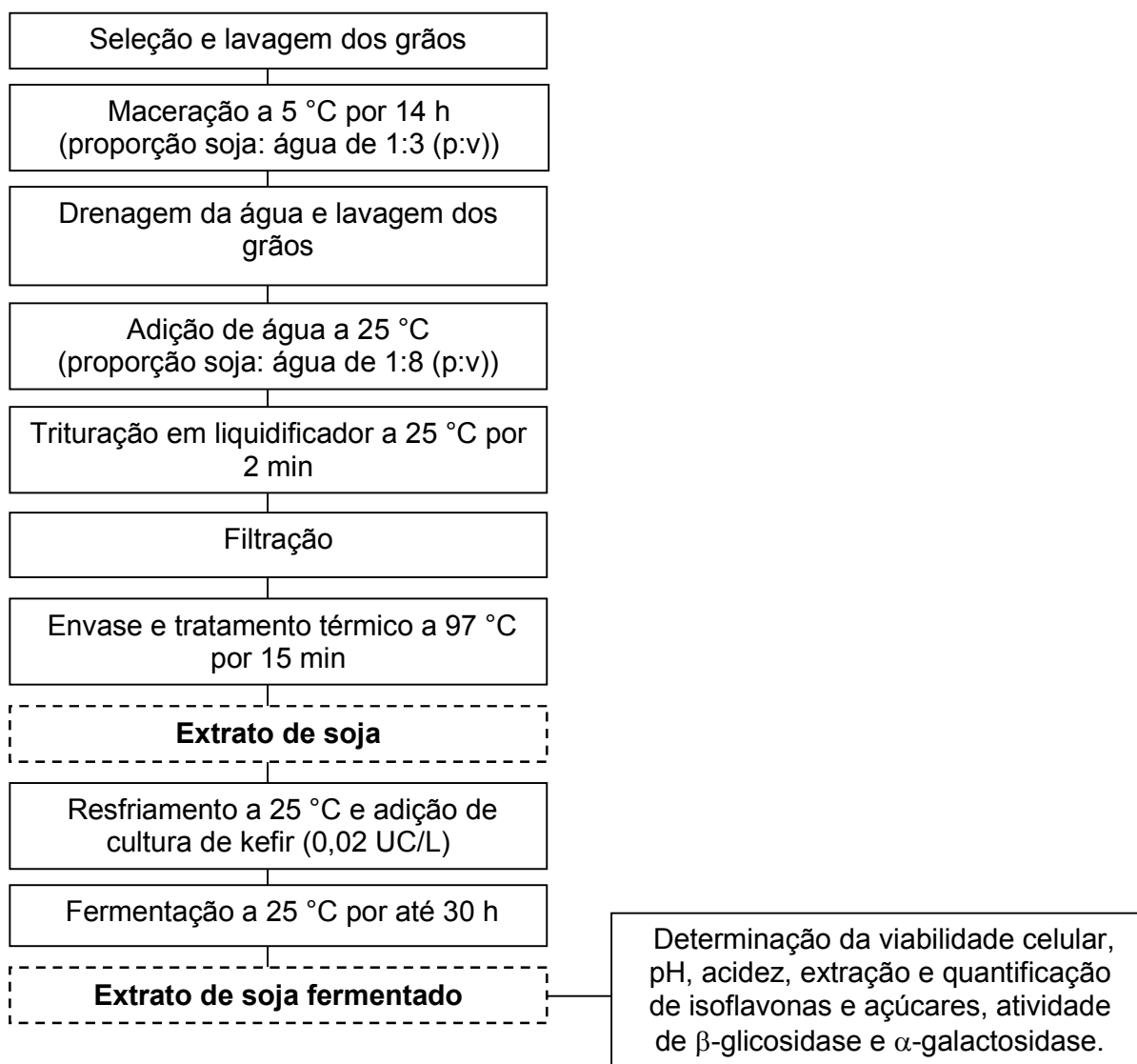
4.4.2 Preparo do Inóculo

A cultura comercial de kefir foi preparada seguindo as instruções do fabricante para casos de utilização em volume inferior aos recomendados no envelope. O extrato de soja foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min. Depois de resfriado (~ 10 °C), foi adicionado a cultura de kefir (1 envelope de 5 UC para 1 L de extrato de soja), homogeneizado e distribuído em recipientes de 10 mL, sendo que em cada recipiente havia cultura suficiente para ser utilizada em 5 L de extrato de soja. Os recipientes foram congelados a -18 °C, até o momento da utilização.

4.4.3 Fermentação do Extrato de Soja com Cultura de Kefir

O extrato de soja a 25 °C foi inoculado com cultura de kefir (0,02 UC.L⁻¹) e fermentado em estufa BOD a 25 °C por até 30 h, sendo que até 15 h foram coletadas amostras em intervalos de 2,5 h e de 15 a 30 h em intervalos de 5 h. No extrato de soja controle não foi realizada a fermentação com cultura de kefir. O fluxograma de obtenção e fermentação do extrato de soja está apresentado na Figura 6.

Figura 6. Processo de obtenção de extrato de soja fermentado com cultura de kefir



4.4.4 Determinação da Viabilidade Celular

A contagem de bactérias lácticas foi realizada em meio MRS (pH $6,5 \pm 0,2$), suplementado com Cicloheximida (200 mg.L^{-1}). Foi realizada semeadura em superfície e as placas foram incubadas a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 72 h, em jarra de anaerobiose (IRIGOYEN et al., 2005).

A contagem de *Lactococcus lactis* foi realizada em meio M17 (pH $7,2 \pm 0,2$), suplementado com cicloheximida (200 mg.L^{-1}), por meio da semeadura em superfície e com incubação das placas a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h, em jarra de anaerobiose (IRIGOYEN et al., 2005).

A contagem de *Leuconostoc* spp foi realizada em meio MSE por meio de semeadura em superfície e as placas foram incubadas a $22 \text{ }^\circ\text{C}$ por 4 dias (FONTÁN et al., 2006).

A contagem de leveduras foi realizada em Ágar Extrato de Levedura Glicose Cloranfenicol (YEGC) por semeadura em superfície e as placas incubadas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 dias, em aerobiose (FONTÁN et al., 2006).

Todos os resultados das contagens microbiológicas foram expressos em $\log \text{ UFC.g}^{-1}$ de extrato de soja fermentado.

4.4.5 Determinação de pH e Acidez

O pH dos extratos de soja fermentados foi determinado em potenciômetro digital (Hanna, HI 223) e a acidez por titulação com NaOH 0,1 M e expresso em g de ácido láctico. 100g^{-1} de amostra.

4.4.6 Extração e Quantificação de Isoflavonas

A extração e quantificação das isoflavonas no extrato de soja fermentado foram realizadas conforme descrito no item 4.2.4.

4.4.7 Extração e Quantificação de Açúcares

Os extratos de soja fermentados foram liofilizados e desengordurados com hexano (1:10, p/v) por 1 h à temperatura ambiente, sob agitação. A extração dos

açúcares foi realizada com 1 g de amostra desengordurada e 40 mL de etanol 80% que foram agitados em homogeneizador Turrax (Marconi MA102, São Paulo, BR), velocidade 5 por 2 min. Em seguida, foram centrifugadas a 2070 g, por 10 min a 25°C (Eppendorf 5804 R, Alemanha) e o sobrenadante foi filtrado (Millex-GV, PVDF, membrana hidrofílica, 0,20 µm). Alíquota de 0,5 mL do filtrado foi evaporada sob nitrogênio (2 psi), seguido de ressuspensão com 20 mL de água ultra-pura (18,2 MΩ cm). A solução foi novamente filtrada e analisada por cromatografia de troca iônica de alta eficiência (HPAEC).

A separação e quantificação dos açúcares foram realizadas com Cromatógrafo de troca iônica de alta eficiência (ICS 5000, Dionex Canadá Ltda, Thermo Scientific Canadá). Alíquotas de 10 µL do extrato ressuspenso foram automaticamente injetadas no cromatógrafo utilizando a coluna analítica CarboPac® PA1 (250 mm x 4 mm, 10 µm de tamanho de partícula) precedida pela coluna de guarda CarboPac® PA1 (50 mm x 4 mm) de mesmo material de empacotamento. Foi utilizado um sistema de detecção amperométrica pulsada (PAD, célula com eletrodo de trabalho de ouro e eletrodo de referência pH-Ag/AgCl; Dionex/Thermo Scientific) e bomba peristáltica com gradiente (modelo SP-5). Para eluição com gradiente foi utilizado água ultra-pura (18,2 MΩ cm, eluente A) e 0,25 mol.L⁻¹ de NaOH (eluente B) com fluxo de 1,0 mL min⁻¹ a 30 °C. A eluição com o gradiente iniciou-se com 93,2 % de eluente A e 6,8 % de eluente B até 8 min. A partir de 8 min até 35 min de eluição o gradiente atingiu a proporção de 56 % de eluente A e 44 % de eluente B onde os açúcares foram separados conforme o seu tempo de retenção. A transição do gradiente de eluição da condição de 56 % de eluente A e 44 % de eluente B para 20 % de eluente A e 80 % de eluente B ocorreu em 1 min. Esta condição foi mantida por 10 min para remoção de impurezas. Uma nova transição de gradiente de eluição da condição de 20 % de eluente A e 80 % de eluente B para 93,2 % de eluente A e 6,8 % de eluente B ocorreu em 1 minuto. Esta condição foi mantida por 15 min para estabilizar a coluna. Os frascos de polipropileno contendo fases móveis foram continuamente pressurizados com gás nitrogênio para minimizar a incorporação e interação do gás carbônico do ar. O sistema de oxidação e redução foi estabelecido no eletrodo de trabalho por meio da utilização de uma forma de onda (E = potencial, t = duração) com os seguintes parâmetros: E₁ = +0,1 V, t₁ = 400 ms; E₂ = -2,0 V, t₂ = 20 ms; E₃ = +0,6, t₃ = 10 ms; E₄ = -0,10, t₄ = 70 ms. A integração ocorreu de 200 ms a 400 ms durante a aplicação do potencial E₁. Para calibração externa, foram

utilizadas soluções dos padrão de galactose, glicose, frutose, sacarose, rafinose e estaquiose para identificar os açúcares com os seus respectivos tempos de retenção. Para confirmar e identificar cada açúcar nas amostras, adicionou-se padrões de cada tipo de açúcar nos extratos para injeção. Para quantificação dos açúcares individuais separados conforme os cromatogramas, foi utilizado o software Chromeleon versão 6.8 (Dionex Corporation). As concentrações de açúcares foram expressas em g de açúcares.100g⁻¹ de amostra em base seca.

4.4.8 Determinação da Atividade de β -Glicosidade

A extração e determinação da atividade de β -glicosidade do extrato de soja fermentado foram realizadas conforme descrito no item 4.3.3.

4.4.9 Determinação da Atividade de α -Galactosidase

A enzima α -galactosidase foi extraída conforme procedimento descrito por Shankar e Mulimani (2007) com modificações. A extração da enzima foi realizada com 500 mg de extrato de soja fermentado liofilizado e 5,0 mL de tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 4,8) com agitação orbital a 200 rpm (Marconi MA570, Brasil) por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, as misturas foram centrifugadas a 2070 x g, a 4 °C, por 10 min (Eppendorf 5804 R, Alemanha) e o sobrenadante filtrado (Millex-GV, PVDF, membrana hidrofílica, 0,45 μ m). O filtrado foi utilizado para a determinação da atividade de α -galactosidase.

A atividade de α -galactosidase foi determinada conforme Scalabrini et al. (1998), e o substrato p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo (1,0 mL; 5 mM) foi diluído em tampão McIlvaine (0,1 M de Ácido cítrico e 0,2 M de Na₂HPO₄, pH 5,8) e colocado em tubos de ensaio e incubados a 37 °C por 10 min em banho-maria. Em seguida, 0,5 mL do sobrenadante filtrado foram adicionados aos tubos de ensaio e mantidos a 37 °C por 10 min. A reação foi interrompida com a adição de 1,0 mL de solução 1,0 M de carbonato de sódio e o conteúdo centrifugado 6800 x g, a 25 °C por 15 min (Eppendorf 5804 R, Alemanha) para a eliminação de qualquer turbidez antes da leitura em espectrofotômetro (Biochrom Libra S22, Reino Unido) a 410 nm. Para cada amostra de determinação da atividade da enzima foi utilizado um controle de cor em paralelo, sem adição do substrato. A absorbância real foi obtida pela

diferença entre a absorbância da amostra e do seu respectivo controle de cor. A concentração de p-nitrofenol (p-NP), produto da reação enzimática, foi determinada por meio da construção de uma curva de calibração a partir do padrão de p-NP (0,016 a 0,128 μmol). Uma unidade de atividade (UA) foi definida como sendo a quantidade de enzima requerida para liberar 1 μmol de produto por minuto nas condições do ensaio. Os resultados foram expressos em UA por g de amostra em base seca ($\text{UA}\cdot\text{g}^{-1}$).

4.4.10 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), teste de homogeneidade de variâncias e normalidade dos resíduos e, posteriormente, teste de Tukey para comparação de médias ($p < 0,05$) utilizando o software Statistica 7.0.

REFERENCIAS

ABIR - Associação das Indústrias Brasileiras de Refrigerantes e Bebidas não Alcoólicas. **Dados de mercado de 2011**. Consumo de todas as bebidas comerciais 2005-2010. 2011. Disponível em: <<http://abir.org.br/2011/10/24/dados-de-mercado-2011/>>. Acesso em 05.01.2015.

ACHOURI, A.; BOYE, J.I.; BELANGER, D.; CHIRON, T.; YAYLAYAN, V.A.; YEBOAH, F.K. Functional and molecular properties of calcium precipitated soy glycinin and the effect of glycation with κ -carrageenan. **Food Research International**, v.43, n.5, p. 1494-1504, 2010.

ACHOURI, A.; BOYE, J.I.; ZAMANI, Y. Changes in somilk quality as a functional of composition and storage. **Journal of Food Quality**, v. 30, p. 31-744, 2007.

ALEKEL, D.L.; GERMAIN, A.S.; PETERSON, C.T., HANSON, K.B.; STEWART, J.W.; TODA, T. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuate bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, p. 844–852, 2000.

ALU'DATT, M.H.; RABABAH, T.; EREIFEJ, K.; BREWER, S.; ALLI, I. Phenolic-protein interactions in oilseed protein isolates. **Food Research International**, v. 52, p. 178–184, 2013.

ANDERSON, J.J.B.; ANTHONY, M.S.; CLINE, J.M.; WASHBURN, S.A.; GARNER, S.C. Health potential of soy isoflavones for menopausal women. **Public Health Nutrition**, v. 2, p. 489–504, 1999.

ANDRES, A.; DONOVAN, S.M.; KUHLENSHMIDT, M.S. Soy isoflavones and virus infections. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, n.8, p. 563-569, 2009.

ANDRÉS, V.; TENÓRIO, M.D.; VILLANUEVA, M.J. Sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content in milk- and soy-juice based beverages. **Food Chemistry**, v. 173, p. 1100–1106, 2015.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Sistema de perguntas e respostas – FAQ**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/faqdinamica/index.asp?Secao=Usuario&usersecoes=36&userassunto=136>>. Acesso em: 09.01.2015.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International** - Volume I and II, 18th. Edition, Rev. 1, 2006.

ATHANASIADIS, I.; PARASKEVOPOULOU, A.; BLEKAS, G.; KIOSSEOGLOU, V. Development of a novel whey beverage by fermentation with kefir granules effect of various treatments. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 1091–1095, 2004.

BAHRAMI, G. **Trans and other fatty acids: effects on endothelial functions**. In: WATSON, R. (ed) Fatty acids in health promotion and disease causation. AOCS Press, Urbana, 2009.

BAJPAI, S.; SHARMA, A.; GUPTA, M.N. Removal and recovery of antinutritional factors from soybean flour. **Food Chemistry**, v.89, n.4, p.497-501, 2005.

BAÚ, T.R.; GARCIA, S.; IDA, E.I. Evaluation of a functional soy product with addition of soy fiber and fermented with probiotic kefir culture. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n.3, 402-409, 2014.

BAÚ, T.R.; GARCIA, S.; IDA, E.I. Optimization of a fermented soy product formulation with a kefir culture and fiber using a simplex-centroid mixture design. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 64, n.8, 929-935, 2013.

BEASLEY, S.; TUORILA, H.; SARIS, P.E.J. Fermented soymilk with a monoculture of *Lactococcus lactis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n.2, p. 159–162, 2003.

BERK, Z. **Technology of production of edible flours and protein products from soybeans**. FAO agricultural services bulletin Nr 97. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 186 p. 1992.

BLAGDEN, D.; GILLILAND, S.E. Reduction of levels of volatile components associated with the “beany” flavor in soymilk by *Lactobacilli* and *Streptococci*. **Journal of Food Science**, v. 70, n.3, p. 186–189, 2005.

BOTELHO, P.S.; MACIEL, M.I.S.; BUENO, L.A.; MARQUES, M.F.F.; MARQUES, D.N.; SILVA, T.M.S. Characterisation of a new exopolysaccharide obtained from fermented kefir grains in soymilk. **Carbohydrate Polymers**, v. 107, p. 1-6, 2014.

BRASIL, A.P.R.; REZENDE, S.T.; PELÚZIO, M.C.G.; GUIMARÃES, V.M. Removal of oligosaccharides in soybean flour and nutritional effects in rats. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p.251-255, 2010.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 268, de 22 de setembro de 2005 – Aprova o Regulamento Técnico para produtos proteicos de origem vegetal. **Diário Oficial da União**. Brasília, 23 set. 2005.

BRASIL. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água (Anexo I), Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**. Brasília, 18 de Setembro de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. IX – Lista das alegações de propriedades funcionais aprovadas. Disponível em: <http://anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em 12 jan 2015.

BRASIL. Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos, Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2 de Janeiro de 2001.

CAI, T. D.; CHANG, K. C.; SHIH, M. C.; HOU, H. J.; JI, M. Comparison of bench and production scale methods for making soymilk and tofu from 13 soybean varieties. **Food Research International**, v. 30, p. 659–668, 1997.

CALDWELL, C.R., BRITZ, S.J. AND MIRECKI, R.M. Effect of temperature, elevated carbon dioxide, and drought during seed development on the isoflavone content of dwarf soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] grown in controlled environments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1125-1129, 2005.

CARRÃO-PANIZZI, M. C. Melhoria genética da soja para a obtenção de cultivares mais adequados ao consumo humano. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 15, n. 2, p. 330-340, 2000.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BERHOW, M.; MANDARINO, M.G.; OLIVEIRA, M.C.N. Environmental and genetic variation of isoflavone content of soybean seeds grown in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.11, p. 1444-1451, 2009.

CARRÃO-PANIZZI, M. C.; BORDIGNON, J. R. Activity of beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 873-878, 2000.

CEDERROTH, C.R.; NEF, S. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 304, n. 1-2, p. 30–42, 2009.

CHANDALIA, M.; GARG, A.; LUTJOHANN, D.; BERGMANN, K.; GRUNDY, S.M.; BRINKLEY, L.J. Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type 2 diabetes mellitus. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n.19, p. 1392-1398, 2000.

CHEN, H.; LI-JUN, L.; JIAN-JUN, Z.; BO, X.; RUI, L. Chemical composition analysis of soybean oligosaccharides and its effect on ATPase activities in hyperlipidemic

rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 2, p. 229-231, 2010.

CHEN, H.L.; LU, Y.H.; LIN, J.; KO, L.Y. Effects of fructooligosaccharide on bowel function and indicators of nutritional status in constipated elderly men. **Nutrition Research**, v.20, p. 1725–1733, 2000.

CHEN, K.-I.; ERH, M.-H.; SU, N.-W.; LIU, W.-H.; CHOU, C.-C.; CHENG, K.-C. Soyfoods and soybean products: from traditional use to modern applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 9–22, 2012.

CHEN, S.T.; YANG, H.Y.; HUANG, H.Y.; PENG, S.J.; CHEN, J.R. Effects of various soya protein hydrolysates on lipid profile, blood pressure and renal function in five-sixths nephrectomized rats. **British Journal of Nutrition**, v. 96, p. 435–441, 2006.

CHEN, Y.; XU, Z.; ZHANG, C.; KONG, X.; HUA, Y. Heat-induced inactivation mechanisms of Kunitz trypsin inhibitor and Bowman-Birk inhibitor in soymilk processing. **Food Chemistry**, v.154, p. 108–116, 2014.

CHEN, Z.; SHI, J.; YANG, X.; NAN, B.; LIU, Y.; WANG, Z. Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. **International Dairy Journal**, v.43, p. 15-21, 2015.

CHENG, S.Y.; SHAW, N.S.; TSAI, K.S.; CHEN, C.Y. The hypoglycemic effects of soy isoflavones on postmenopausal women. **Journal of Womens Health**, v. 13, p. 1080-1086, 2004.

CHIFIRIUC, M.C.; CIOACA, A.B.; LAZAR, V. *In vitro* assay of the antimicrobial activity of kefir against bacterial and fungal strain. **Anaerobe**, v. 17, p. 433–435, 2011.

CHUN, J.; KIM, G.; LEE, K.; CHOI, D.; KWON, G.H.; PARK, J.Y.; JEONG, S.J.; KIM, J.S.; KIM, J.H. Conversion of isoflavone glucosides to aglycones in soymilk by fermentation with lactic acid bacteria. **Journal of Food Science**, v. 72, n.2, p. M39–M44, 2007.

CHUN, J.; KIM, J.S.; KIM, J.H. Enrichment of isoflavone aglycones in soymilk by fermentation with single and mixed cultures of *Streptococcus infantarius* 12 and *Weissella* sp. **Food Chemistry**, v. 109, n.2, p. 278-284, 2008.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Safra 2014/2015. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_11_13_09_19_35_boletim_graos_novembro_2014.pdf. Acesso em 05 jan 2015.

CRUZ, N.S.; CAPELLAS, M.; JARAMILLO, D.P.; TRUJILLO, A.J.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Soymilk treated by ultra high-pressure homogenization: Acid coagulation properties and characteristics of a soy-yogurt product. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n.2, p. 490-496, 2009.

- CUENCA, M. M.; QUICAZÁN, M. C. Comparación de la fermentación de bebida de soya e leche de vaca utilizando un cultivo láctico comercial. **Ingeniería y competitividad**, v. 5, n.2, p. 16-22, 2004.
- CUI, X-H.; CHEN, S-J.; WANG, Y.; HAN, J-R. Fermentation conditions of walnut milk beverage inoculated with kefir grains. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n.1, p. 349–352, 2013.
- DECKELBAUM, R. J.; TORREJON, C. The omega-3 fatty acid nutritional landscape: health benefits and sources. **The Journal of Nutrition**, v. 142, p. 587S–591S, 2012.
- DENKOVA, Z.R.; MURGOV, I.D. Soy milk yoghurt. **Biotechnology and Biotechnology Equipment**, v. 19, n.1, p. 193–195, 2005.
- DIMITRELLOU, D.; KOURKOUTAS, Y.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A.A. Whey cheese production using freeze-dried kefir culture as a starter. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 1170–1183, 2007.
- DONG, X.; XU, W.; SIKES, R. A.; WU, C. Combination of low dose of genistein and daidzein has synergistic preventive effects on isogenic human prostate cancer cells when compared with individual soy isoflavone. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1923-1933, 2013.
- DONKOR, O.N.; NILMINI, S.L.I.; STOLIC, P.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 657–665, 2007.
- DONKOR, O.N.; SHAH, N.P. Production of β -glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soymilk. **Journal of Food Science**, v. 73, n.1, p. M15–M20, 2008.
- EFSA – European Food Safety Authority. Scientific opinion on the substantiation of a health claim related to soy protein and reduction of blood cholesterol concentrations pursuant to article 14 of the Regulation (EC) No 1924/2006. **EFSA Journal**, v. 8, n.7, p. 1688, 2010.
- EMBRAPA, 2014. **Soja em números (safra 2010/2011)**. Disponível em: http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=294ecod_pai=16. Acesso em 30 out. 2014.
- EMBRAPA. Manual de produção de extrato de soja para Agroindústria de pequeno porte. FELBERG, I.; ANTONIASSI, R.; DELIZA, R. **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, Rio de Janeiro, 2005.
- ESPINOSA-MARTOSY, I.; RUPÉREZ, P. Soybean oligosaccharides. Potential as new ingredients in functional food. **Nutrición Hospitalaria**, v. 21, p. 92–96, 2006.
- FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 11 jan. 2015.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Soymilk and related products. In: FAO Agricultural Services Bulletin n. 97. Technology of production of edible flours and protein products from soybeans. Rome, 1992.

FAO/WHO. **CODEX Standard for Fermented Milks**. Disponível em http://www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS_243e.pdf. Acesso em 15 dez. 2014.

FARNWORTH, E.R. **Kefir - a Complex Probiotic**. Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods, 2, International Food Information Service Publishing, 2005.

FARNWORTH, E.R.; MAINVILLE, I. Kefir: a fermented milk product. In E.R. FARNWORTH (Ed.), **Handbook of Fermented Functional Foods**, CRC Press, Boca Raton, FL, 2003.

FAVARO TRINDADE, C. S.; TERZI, S.C.; TRUGO, L.C.; DELLA MODESTA, R. C.; COURI, S. Development and sensory evaluation of soy milk based yoghurt. **Archivos Lationamericanos de nutrición**, v. 51, n. 1, p. 100-104, 2001.

FDA - Food and Drug Administration (1999). **FDA approves new health claim for soy protein and coronary heart disease**. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em 16 jul. 2014.

FERRAGUT, V.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; BORRAS-SUAREZ, M.; GONZÁLEZ-LINARES, J.; VIDAL-CAROU, M. C.; GUAMIS, B. Ultra-high-pressure homogenization (UHPH) system for producing high-quality vegetable-based beverages: physicochemical, microbiological, nutritional and toxicological characteristics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, p. 10–12, 2014.

FISCHER, M. Enzymatic extractability of soybean meal proteins and carbohydrates: heat and humidity effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n.9, p. 4463-4469, 2001.

FONTÁN, M.C.G.; MARTÍNEZ, S.; FRANCO, I.; CARBALLO, J. Microbiological and chemical changes during the manufacture of Kefir made from cows' milk, using a commercial starter culture. **International Dairy Journal**, v.16, n.7, 2006.

GAO, J.; GU, F.; RUAN, H.; CHEN, Q.; HE, J.; HE, G. Culture Conditions Optimization of Tibetan Kefir Grains by Response Surface Methodology. **Procedia Engineering**, v.37, p. 132–136, 2012.

GAO, J.; GU, F.Y.; RUAN, H.; CHEN, Q.; HE, J.; HE, G.Q. Induction of apoptosis of gastric cancer cells SGC7901 in vitro by a cell-free fraction of Tibetan kefir. **International Dairy Journal**, v. 30, p. 14–18, 2013.

GARRO, M. S.; VALDEZ, G. F.; GIORI, G. S. Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in pure and mixed cultures grown in soymilk. **Food Microbiology**, v. 21, p. 511–518, 2004.

GERDE, J.A.; WHITE, P.J. Lipids. In: JOHNSON, L.; WHITE, P.; GALLOWAY, R. (eds). **Soybeans: chemistry, production, processing, and utilization**. AOCS Press, Urbana, 2008.

GIBSON, G.R. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). **Clinical Nutrition Supplements**, v. 1, n.2, p. 25-31, 2004.

GIL, A.; BENGMARK, S. Control biológico y nutricional de la enfermedad: prebióticos, probióticos y simbióticos. **Nutrición Hospitalaria**, v. 21, p. 73-86, 2006.

GIRGIH, A. T.; MYRIE, S. B.; ALUKO, R. E.; JONES, P. J. H. Is category “A” status assigned to soy protein and coronary heart disease risk reduction health claim by the United States Food and Drug Administration still justifiable? **Trends in Food Science & Technology**, v. 30, p. 121–132, 2013.

GIRI, S. K.; MANGARAJ, S. Processing influences on composition and quality attributes of soymilk and its powder. **Food Engineering Reviews**, v. 4, p. 149–164, 2012.

GOLBITZ, P. Statistics. **Soya and Oilseed Bluebook**. Soyatech LLC: Bar Harbor, ME, 2007.

GOLBITZ, P.; JORDAN, J. Soyfoods: Market and Products. In: **Soy Applications in Food**. RIAZ, M. N., New York: CRC Press, 2006.

GOLOWCZYC, M.A.; GUGLIADA, M.J.; HOLLMANN, A.; DELFEDERICO, L.; GARROTE, G.L.; ABRAHAM, A.G.; SEMORILE, L.; ANTONI, G. Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: potential use as probiotic. **Journal of Dairy Research**, v.75, p. 211–217, 2008.

GOWEN, A.; ABU-GHANNAM, N.; FRIAS, J.; OLIVEIRA, J. Influence of pre-blanching on the water absorption kinetics of soybeans. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n.3, p. 965–971, 2007.

GRIMALDI, A.; BARTOWSKY, E.; JIRANEK, V. Screening of *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 1061–1069, 2005.

GUERRERO-BELTRÁN, J.A.; ESTRADA-GIRÓN, Y.; SWANSON, B.G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Pressure and temperature combination for inactivation of soymilk trypsin inhibitors. **Food Chemistry**, v.116, n.3, p. 676-679, 2009.

HANDA, C.L.; COUTO, U.R.; VICENSOTI, A.H.; GEORGETTI, S.R.; IDA, E.I. Optimisation of soy flour fermentation parameters to produce b-glucosidase for bioconversion into aglycones. **Food Chemistry**, v. 152, p. 56–65, 2014.

HAYTA, M.; ALPASLAN, M.; CAKMAKLI, U. Physicochemical and Sensory Properties of Soymilk-incorporated Bulgur. **Journal of Food Science**, v.68, p. 2800-2803, 2003.

HENG, L.; VINCKEN, J. P.; VAN KONINGSVELD, G.; LEGGER, A.; GRUPPEN, H.; BOEKEL, T.; ROOZEN, J.; VORAGEN, F. Bitterness of saponins and their content

in dry peas. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 1225–1231, 2006.

HERMAN, E. Soybean allergenicity and suppression of the immunodominant allergen. **Crop Science**, v. 45, p. 462–467, 2005.

HOWITZ, K.T.; SINCLAIR, D.A. Xenohormesis: sensing the chemical cues of other species. **Cell**, v. 133, p. 387–391, 2008.

HSIEH, H. C.; KAO, T. H.; CHEN, B. H. A Fast HPLC Method for Analysis of Isoflavones in Soybean. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 27, n. 2, p. 315-324, 2005.

HUANG, Z-R.; HUNG, C-F.; LINC, Y.K.; FANGA, J-Y. In vitro and in vivo evaluation of topical delivery and potential dermal use of soy isoflavones genistein and daidzein. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 36–44, 2008.

HUBERT, J.; BERGER, M.; NEPVEU, F.; PAUL, F.; DAYDÉ, J. Effects of fermentation on the phytochemical composition and antioxidant properties of soy germ. **Food Chemistry**, v. 109, n.4, p. 709–721, 2008.

HYMOWITZ, T. History of the Soybean. In: JOHNSON. L.; WHITE. P.; GALLOWAY, R. (eds). **Soybeans: chemistry, production, processing, and utilization**. AOCS Press, Urbana, 2008.

IASSONOVA, R.; JOHNSON, L.A.; HAMMOND, E.G.; BEATTIE, S.E. Evidence of an enzymatic source of off flavors in “lipoxygenase-null” soybeans. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 86, p. 59–64, 2009.

ILLINOIS. **Soy at home series n°2: Make your own soymilk – International Soybean Program National Soybean Research Laboratory**. Disponível em <http://www.nsrll.illinois.edu/nutrition/multimedia/At%20Home%20soymilk.pdf>. Acesso em 13 dez. 2012.

IRIGOYEN, A.; ARANA, I.,CASTIELLA, M.; TORRE, P.; IBÁÑEZ, F.C. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. **Food Chemistry**, v. 90, n.4, p.613-620, 2005.

ISMAIL, B.; HAYES, K. β -Glycosidase activity towards different glycosidic forms of isoflavones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4918–4924, 2005.

IWUOHA, C.I.; UMUNNAKWE, K.E. Chemical, physical and sensory characteristics of soymilk as affected by processing method, temperature and duration of storage. **Food Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 373-379, 1997.

JACKSON, C.J.C.; DINI, J.P.; LAVANDIER, C.; RUPASINGHE, H.P.V.; FAULKNER, H.; POYSA, V.; BUZZELL, D.; DEGRANDIS, S. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1117 – 1123, 2002.

- JINAPONG, N.; SUPHNTHARIKA, M.; JAMNONG, P. Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 2, p. 194-205, 2008.
- JUNG, S.; MURPHY, P.; SALA, I. Isoflavone profiles of soymilk as affected by high-pressure treatments of soymilk and soybeans. **Food Chemistry**, v. 111, p. 592–598, 2008.
- KAKADE, M.L.; RACKIS, J.J.; MCGHEE, J.E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, v. 51, p. 376-382, 1974.
- KANEKO, S.; KUMAZAWA, K.; NISHIMURA, O. Studies on the key aroma compounds in soy milk made from three different soybean cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 12204–12209, 2011.
- KAO, T.H.; LU, Y.F.; HSIEH, H.C.; CHEN, B.H. Stability of isoflavone glucosides during processing of soymilk and tofu. **Food Research International**, v. 37, p. 891–900, 2004.
- KARR-LILIENTHAL, L. K.; KADZERE, C. T.; GRIESHOP, C. M.; FAHEY JR., G. C. Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: a review. **Livestock Production Science**, v. 97, p.1-12, 2005.
- KIM, J.; HONG, S.B.; JUNG, W.S.; YU, C.Y.; MA, K.H.; GWAG, J.G.; CHUNG, I.M. Comparison of isoflavones composition in seed, embryo, cotyledon and seed coat of cooked-with-rice and vegetable soybean (*Glycine max L.*) varieties. **Food Chemistry**, v. 102, p. 738–744, 2007.
- KIM, Y.; WICKER, L. Soybean cultivars impact quality and function of soymilk and tofu. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 15, p. 2514–2518, 2005.
- KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D.; UCHIDA, T.; KITAMURA, K.; OKUBO, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max MERRILL*). **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, p. 2227–2233, 1991.
- KUMAR, V.; RANI, A.; CHAUHAN, G.S. Nutritional Value of Soybean. In: SINGH, G. **The Soybean: Botany, Production and Uses**. CABI Head Office: India, 2010.
- KUMURA, K.; TANOUE, Y.; TSUKAHARA, M.; TANAKA, T.; SHIMAZAKI, K. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 4050–4056, 2004.
- KWOK, K.C.; BASKER, D.; NIRANJAN, K. Kinetics of sensory quality changes in soymilk during thermal processing, by parametric and non-parametric data analyses. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 595-600, 2000.

KWOK, K.C.; LIANG, H.H.; NIRANJAN, K. Optimizing conditions for thermal processes of soy milk. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 4834-4838, 2002.

KWOK, K.C.; MACDOUGALL, D.B.; NIRANJAN, K. Reaction kinetics of heat-induced colour changes in soymilk. **Journal of Food Engineering**, v. 40, n.1-2, p. 15-20, 1999.

KWOK, K.C.; NIRANJAN, K. Review: effect of thermal processing on soymilk. **International Journal Food Science Technology**, v. 30, p. 263-295, 1995.

LAI, L-R.; HSIEH, S-C.; HUANG, H-Y.; CHOU, C-C. Effect of lactic fermentation on the total phenolic, saponin and phytic acid contents as well as anti-colon cancer cell proliferation activity of soymilk. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 5, p. 552–556, 2013.

LEE, M. Y.; AHN, K. S.; KWON, O. K.; KIM, M. J.; KIM, M. K.; LEE, I. Y.; OH, S. R.; LEE, H. K. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model. **Immunobiology**, v. 212, n. 4, p. 647-654, 2007.

LEE, M.J.; CHUNG, I-M.; KIM, H.; JUNG, M.Y. High resolution LC–ESI-TOF-mass spectrometry method for fast separation, identification, and quantification of 12 isoflavones in soybeans and soybean products. **Food Chemistry**, v.176, p. 254–262, 2015.

LEE, S.Y.; LEE, S.; LEE, S.; OH, J.Y.; JEON, E.J.; RYU, H.S. Primary and secondary metabolite profiling of doenjang, a fermented soybean paste during industrial processing. **Food Chemistry**, v. 165, p. 157–166, 2014.

LEE, W. Y; AHN, J.K; CHUNG, J.M. Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones. **Field Crops Research**, v. 81, p. 181–192, 2003.

LEITE, A.M.O.; LEITE, D.C.A.; DEL AGUILA, E.M.; ALVARES, T.S.; PEIXOTO, R.S.; MIGUEL, M.A.L.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M.F. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 4149–4159, 2013.

LIENER, I.E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.34, n.1, p.31-67, 1994.

LIMA, F.S.; IDA, E.I. Optimisation of soybean hydrothermal treatment for the conversion of b-glucoside isoflavones to aglycones. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, p. 232-239, 2014.

LIMA, F.S.; KUROZAWA, L.E.; IDA, E.I. The effects of soybean soaking on grain properties and isoflavones loss. **LWT – Food Science and Technology**, v.59, n. 2, p. 1274-1282, 2014.

LIU, C.; WANG, H.; CIU, Z.; HE, X.; WANG, X.; ZENG, X.; MA, H. Optimization of extraction and isolation for 11S and 7S globulins of soybean seed storage protein, **Food Chemistry**, v. 102, n.4, p.1310-1316, 2007.

LIU, K. Food Use of Whole Soybeans. In: JOHNSON, L.; WHITE, P.; GALLOWAY, R. (eds). **Soybeans: chemistry, production, processing, and utilization**. AOCS Press, Urbana, 2008.

LIU, K. **Soybeans as functional foods and ingredients**. Champaign, Illinois: AOCS Press. 2004.

LIU, K.; MARKAKIS, P. An improved colorimetric method for determining antitryptic activity in soybean products. **Cereal Chemistry**, v. 66, p. 415-422, 1989.

LIU, K.S. **Soybeans: Chemistry, technology and utilization**. New York: Chapman & Hall, 1997.

LIU, X.; JIN, J.; WANG, G.; HERBERT, S.J. Soybean yield physiology and development of high-yielding practices in Northeast China. **Field Crops Research**, v. 105, n.3, p.157-171, 2008.

LOPITZ-OTSOA, F.; REMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; GARAIZAR, J. Kefir: Asymbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.23, p.67-74, 2006.

LU, F.; ZUI, Z.; LIU, Y.; LI, B. The Effect of Okara on the Qualities of Noodle and Steamed Bread. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 5, n.7, p. 960-968, 2013.

LV, Y. C.; SONG, H. L.; LI, X.; GUO, S. T. Influence of blanching and grinding process with hot water on beany and non-beany flavor in soymilk. **Journal of Food Science**, v. 76, p. S20-S25, 2011.

MA, L.; LI, B.; HAN, F.; YAN, S.; WANG, L.; SUN, J. Evaluation of the chemical quality traits of soybean seeds, as related to sensory attributes of soymilk. **Food Chemistry**, v. 173, p. 694–701, 2015.

MAGALHAES, K.T.; PEREIRA, M.A.; NICOLAU, A.; DRAGONE, G.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J.A.; ALMEIDA SILVA, J.B.; SCHWAN, R.F. Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: Evaluation of morphological and microbial variations. **Bioresource Technology**, v.102, p.8843–8850, 2010.

MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. **Alimentos, nutrição e dietoterapia**, 11^a Ed. Editorial Roca: São Paulo, 2005.

MANION, B.; CORREDIG, M. Interactions between whey protein isolate and soy protein fractions at oil-water interfaces: effects of heat and concentration of protein in the aqueous phase. **Journal of Food Science**, v.71, p.343-349, 2006.

MANTZOURANI, I.; PLESSAS, S.; SAXAMI, G.; ALEXOPOULOS, A.; GALANIS, A.; BEZIRTZOGLU, E. Study of kefir grains application in sourdough bread regarding rope spoilage caused by *Bacillus* spp. **Food Chemistry**, v. 143, p. 17–21, 2014.

- MARAZZA, J.A.; GARRO, M.S.; GIORI, G.S. Aglycone production by *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 during soymilk fermentation. **Food Microbiology**, v. 26, n.3, p. 333–339, 2009.
- MARAZZA, J.A.; NAZARENO, M.A.; GIORI, G.S.; GARRO, M.S. Enhancement of the antioxidant capacity of soymilk by fermentation with *Lactobacillus rhamnosus*. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n.3, p. 594–601, 2012.
- MATEOS-APARICIO, I.; REDONDO-CUENCA, A.; VILLANUEVA-SUÁREZ, M.J.; ZAPATA-REVILLA, M.A. Soybean, a promising health source. **Nutrición Hospitalaria**, v. 23, p. 305–312, 2008.
- MATSUURA, M.; OBATA, A. D-glucosidases from soybeans hydrolyse daidzin and genistin. **Journal Food Science**, v. 58, p. 144–147, 1993.
- MEDIC, J.; ATKINSON, C.; HURBURGH, C. R. Current knowledge in soybean Composition. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, p. 363–384, 2014.
- MENG, Z.; SHANGLANG, C; JIANGWEI, M. Evaluation of cardio-protective effect of soybean oligosaccharides. **Gene**, v. 555, n.2, p. 329–334, 2015.
- MESSINA, M. Soybean isoflavone exposure does not have feminizing effects on men: a critical examination of the clinical evidence. **Fertility and Sterility**, v. 93, n.7, p. 2095–2104, 2010.
- MESSINA, M.; MESSINA, V. Soyfoods, soybean isoflavones, and bone health: a brief overview. **Journal of Renal Nutrition**, v. 10, p. 63–68, 2000.
- MESSINA, M.; NAGATA, C.; WU, A.H. Estimated Asian adult soy protein and isoflavone intakes. **Nutrition and Cancer**, v. 55, p. 1–12, 2006.
- MIAO, J.; GUO, H.; OU, Y.; LIU, G.; FANG, X.; LIAO, Z.; KE, C.; CHEN, Y.; ZHAO, L.; CAO, Y. Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China. **Food Control**, v.42, p. 48–53, 2014.
- MIDDELBOS, I.S.; FAHEY, G.C.J. Soybean carbohydrates. In: JOHNSON. L.; WHITE. P.; GALLOWAY, R. (eds) **Soybeans: chemistry, production, processing, and utilization**. AOCS Press, Urbana, 2008.
- MIZUTANI, T.; HASHIMOTO, H. Effect of grinding temperature on hydroperoxide and off-flavor contents during soymilk manufacturing process. **Journal of Food Science**, v. 69, p. SNQ112–SNQ116, 2004.
- MONTEIRO, M.R.P.; COSTA, N.M.B.; OLIVEIRA, M.G.A.; PIRES, C.V.; MOREIRA, M.A. Qualidade protéica de linhagens de soja com ausência do Inibidor de Tripsina Kunitz e das isoenzimas Lipoxigenases. **Revista Nutrição**, v.17, n.2, p. 195-205, 2004.

- MUJOO, R.; TRINH, D.T.; NG, P.K.W. Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture. **Food Chemistry**, v.82, p. 265–273, 2003.
- MURPHY, P. Soybean proteins. In: JOHNSON, L.; WHITE, P.; GALLOWAY, R. (eds) **Soybeans: chemistry, production, processing, and utilization**. AOCS Press, Urbana, 2008.
- NALBANTOGLU, U.; CAKAR, A.; DOGAN, H.; ABACI, N.; USTEK, D.; SAYOOD, K.; CAN, H. Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains. **Food Microbiology**, v.41, p. 42–51, 2014.
- NELSON, A. I.; STEINBERG, M. P.; WEI, L. S. Illinois process for preparation of soymilk. **Journal of Food Science**, v. 41, n.1, p. 57 - 61, 1976.
- NIK, A.M.; TOSH, S.M.; WOODROW, L.; POYSA, V.; CORREDIG, M. Effect of soy protein subunit composition and processing conditions on stability and particle size distribution of soymilk. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, p.1245-1252, 2009.
- NISHIZAWA-YOKOI, A.; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S. The contribution of carbohydrates including raffinose family oligosaccharides and sugar alcohols to protection of plant cells from oxidative damage. **Plant Signaling Behavior**, v.3, n.11, p. 1016–1018, 2008.
- OBENDORF, R. L.; ZIMMERMAN, A. D.; ORTIZ, P. A.; TAYLOR, A. G.; SCHNEBLY, S. R. Imbibitional chilling sensitivity and soluble carbohydrate composition of low raffinose, low stachyose soybean seed. **Crop Science**, v. 48, p. 2396–2403, 2008.
- OETTERER, M.; REGITANO-d'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Manole: São Paulo, 2006. 612p.
- ÖNER, Z.; KARAHAN, A.G.; ÇAKMAKÇ, M.L. Effects of different milk types and starter cultures on kefir. **Gıda**, v. 35, p. 177–182, 2010.
- PALMA-FERNANDEZ, E.R.D.; GOMES, E.; SILVA, R. Purification and characterization of two β -glucosidase from thermophilic fungus *Thermophilicus aurantiacus miehe*. **Folia Microbiologica**, v. 47, n.6, p. 685-690, 2002.
- PAN, Z.; TANGRATANAVALEE, W. Characteristics of soybean as affected by soaking conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 143-151, 2003.
- PARK, E.; SHIN, J.I.; PARK, O.J.; KANG, M.H. Soy isoflavone supplementation alleviates oxidative stress and improves systolic blood pressure in male spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 51, n.4, p. 254–259, 2005.
- PENG, X.; GUO, S. Texture characteristics of soymilk gels formed by lactic fermentation: A comparison of soymilk prepared by blanching soybeans under different temperatures. **Food Hydrocolloids**, v. 43, 58–65, 2015.

- PIERMARIA, J.A.; CANAL, M.L.; ABRAHAM, A.G. Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. **Food Hydrocolloids**, v.22, p.1520-1527, 2008.
- PRABHAKARAN, M. P.; PERERA, C.O. Effect of extraction methods and UHT treatment conditions on the level of isoflavones during soymilk manufacture. **Food Chemistry**, v. 99, p. 231– 237, 2006.
- QIANG, X.; YONGLIE, C.; QIANBING, W. Health Benefit application of functional oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v.77, n.3, p.435-441, 2009.
- REDONDO-CUENCA, A.; VILLANUEVA-SUÁREZ, M.J.; RODRÍGUEZ-SEVILLA, M.D.; MATEOS-APARICIO, I. Chemical composition and dietary fibre of yellow and green commercial soybeans (*Glycine max*). **Food Chemistry**, v. 101, n.3, p.1216–1222, 2007.
- REILLY, J.K.; LANOU, A.J.; BARNARD, N.D.; SEIDL, K.; GREEN, A.A. Acceptability of soymilk as a calcium-rich beverage in elementary school children. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 106, n.4, p. 590–593, 2006.
- REKHA, C.R.; VIJAYALAKSHMI, G. Isoflavone phytoestrogens in soymilk fermented with β -glucosidase producing probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.62, n.2, p. 111-120, 2011.
- REN, H.; LIU, H.; ENDO, H.; TAKAGI, Y.; HAYASHI, T. Anti-mutagenic and anti-oxidative activities found in Chinese traditional soybean fermented products furu. **Food Chemistry**, v. 95, p. 71–76, 2006.
- RIAZ, M. N. **Soy Applications in Food**. CRC Press, Boca Ranton, USA. 2006. 288p.
- RINGGENBERG, E.; CORREDIG, M.; ALEXANDER, M. Physico-chemical characterization of soymilk particles as a function of their volume fraction: comparison with theoretical systems. **Food Biophysics**, v. 7, p. 244–257, 2012.
- RIZK, S.; MAALOUF, K.; BAYDOUN, E. The Antiproliferative Effect of Kefir Cell-Free Fraction on HuT-102 Malignant T Lymphocytes. **Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia**, v. 9, p.198-203, 2009.
- RIZZI, C.; GALEOTO, L.; ZOCCATELLI, G.; VINCENZI, S.; CHIGNOLA, R.; PERUFFO, A.D.B. Active soybean lectin in foods: quantitative determination by ELISA using immobilised asialofetuin. **Food Research International**, v. 36, n. 8, p.815-821, 2003.
- ROBLET, C.; AMIOT, J.; LAVIGNE, C.; MARETTE, A.; LESSARD, M.; JEAN, J.; RAMASSAMY, C.; MORESOLI, C.; BAZINET, L. Screening of in vitro bioactivities of a soy protein hydrolysate separated by hollow fiber and spiral-wound ultrafiltration membranes. **Food Research International**, v. 46, p. 237–249, 2012.
- RODRIGUES, K. L.; CAPUTO, L. R. G.; CARVALHO, J. C. T.; EVANGELISTA, J. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, n. 20, p. 404-408, 2005.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M.J.; ROJAS-GRAÜ, M.A.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELLOSO, O. Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles throughout in vitro gastrointestinal digestion of a blended fruit juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 1859–1867, 2013.

ROMANIN, D.; SERRADELL, M.; MACIEL, D.G.; LAUSADA, N.; GARROTE, G.L.; RUMBO, M. Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, n.2-3, p.102-108, 2010.

ROSENTHAL, A.; DELIZA, R.; CABRAL, L.M.C.; CABRAL, L.C.; FARIAS, C.A.A.; DOMINGUES, A.M. Effect of enzymatic treatment and filtration on sensory characteristics and physical stability of soymilk. **Food Control**, v. 14, n.3, p. 187-192, 2003.

SAKHALE B.K; PAWAR, V.N.; RANVEER, R.C. Studies on the development and storage of whey based RTS beverage from mango cv. Kesar. **Journal of Food Processing and Technology**, v. 3, p. 148, 2012.

SALDIVAR, X.; WANG, Y-J.; CHEN, P.; MAUROMOUSTAKOS, A. Effects of blanching and storage conditions on soluble sugar contents in vegetable soybean. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n.9, p. 1368–1372, 2010.

SCALABRINI, P.; ROSSI, M.; SPETTOLI, O.; MATTEUZZI, D. Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 213-219, 1998.

SCHEPPACH, W.; LUEHRS, H.; MELCHER, R.; GOSTNER, A.; SCHAUBER, J.; KUDLICH, T.; WEILER, F.; MENZEL, T. Antiinflammatory and anticarcinogenic effects of dietary fibre. **Clinical Nutrition Supplements**, v. 1, n. 2, p. 51–58, 2004.

SEIQUER, I.; DÍAZ-ALGUACIL, J.; DELGADO-ANDRADE, C.; LÓPEZ-FRÍAS, M.; HOYOS, A.M.; GALDÓ, G.; NAVARRO, M.P. Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent males aged 11–14 y. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 8, p.1082–1088, 2006.

SERAFINI, F.; TURRONI, F.; RUAS-MADIEDO, P.; LUGLI, G.A.; MILANI, C.; DURANTI, S.; ZAMBONI, N.; BOTTACINI, F.; SINDEREN, D.V.; MARGOLLES, A.; VENTURA, M. Kefir fermented milk and kefiran promote growth of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 and modulate its gene expression. **International Journal of Food Microbiology**, v. 178, p. 50–59, 2014.

SHANKAR, S.K.; MULIMANI, V.H. α -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v.98, n. 4, p. 958–961, 2007.

SHAO, S.; DUNCAN, A.M.; YANG, R.; MARCONE, M.F.; RAJCAN, I.; TSAO, R. Tracking isoflavones: From soybean to soy flour, soy protein isolates to functional soy bread. **Journal of Functional Foods**, v.1, n. 1, p. 119–127, 2009.

SHIN, D.-J.; KIM, W.; KIM, Y. Physicochemical and sensory properties of soy bread made with germinated, steamed, and roasted soy flour. **Food chemistry**, v. 141, p. 517–523, 2013.

SILVA, K.R.; RODRIGUES, S.A.; XAVIER, L.; LIMA, A.S. Antimicrobial Activity of Broth Fermented with Kefir Grains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.152, p. 316-325, 2009.

SILVA, C.E.; CARRÃO-PANIZZI, M.C.; MANDARINO, J.M.G.; LEITE, R.S.; MÔNACO, A.P.M. Teores de isoflavonas em grãos inteiros e nos componentes dos grãos de diferentes cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Brazilian Journal of Food Technology**, v.15, n.2, p. 150-156, 2012.

SINGH, B.P.; VIJ, S.; HATI, S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptides**, v. 54, p. 171–179, 2014.

SMITH, K.; MENDONÇA, A.; JUNG, S. Impact of high-pressure processing on microbial shelf-life and protein stability of refrigerated soymilk. **Food Microbiology**, v.26, p. 794-800, 2009.

SONG, J.Y.; AN, G.H.; KIM, C.J. Color, texture, nutrient contents, and sensory values of vegetable soybeans [*Glycine max* (L.) Merrill] as affected by blanching. **Food Chemistry**, v. 83, p. 69–74, 2003.

SPERONI, F.; ANÓN, M.C. Cold-set gelation of high pressure-treated soybean proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 33 (1), p. 85–91, 2013.

STANOJEVIC, S. P.; BARAC, M. B.; PESIC, M. B.; VUCELI-RADOVIC, B. V. Composition of proteins in okara as a byproduct in hydrothermal processing of soy milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 9221–9228, 2012.

STONE, H.; SIDEL, J.L. **Sensory Evaluation Practices**. 3^o ed. Academic Press, New York, NY. 2004. 408p.

SUGANO, M. Nutritional implications of soy. In: SUGANO, M. **Soy in health and disease prevention**. CRC Press: Boca Raton, p. 1–16, 2006.

TAY, S.L.; XU, G.Q.; PERERA, C.O. Aggregation profile of 11S, 7S and 2S coagulated with GDL. **Food Chemistry**, v.91, n. 3, p. 457-462, 2005.

TORO-FUNES, N.; BOSCH-FUSTÉ, J.; LATORRE-MORATALLA, M.L.; VECIANA-NOGUÉS, M.T. ; VIDAL-CAROU, M.C. Isoflavone profile and protein quality during storage of sterilised soymilk treated by ultra high pressure homogenisation. **Food Chemistry**, v. 167, p. 78-83, 2015.

TORO-FUNES, N.; BOSCH-FUSTÉ, J.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; VIDAL-CAROU, M.C. Changes of isoflavones and protein quality in soymilk pasteurised by ultra-high-pressure homogenisation throughout storage. **Food Chemistry**, v. 162, p. 47–53, 2014.

TORO-FUNES, N.; ODRIÓZOLA-SERRANO, I.; BOSCH-FUSTÉ, J.; LATORRE-MORATALLA, M.L.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VODAL-CAROU, M.C. Fast simultaneous determination of free and conjugated isoflavones in soy milk by UHPLC–UV. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2832–2838, 2012.

TSENG, M.; BYRNE, C.; KURZER, M. S.; FANG, C. Y. Equol-producing status, isoflavone intake, and breast density in a sample of U.S. Chinese women. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 22, p. 1975–1983, 2013.

USDA – United States Department of Agriculture. **World Agricultural Supply and Demand Estimates**. Disponível em: <<http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>>. Acesso em: 10 jan 2015.

USDA – United States Department of Agriculture. **World Agricultural Production**. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acesso em: 23 dez 2014.

VELASQUEZ, M.T.; BHATHENA, S.J. Role of Dietary Soy Protein in Obesity. **International Journal of Medical Sciences**, v. 4, p. 72-82, 2007.

VILLANUEVA, M.J.; YOKOYAMA, W.H.; HONG, Y.J.; BARTTLEY, G.E.; RUPÉREZ, P. Effect of high-fat diets supplemented with okara soybean by-product on lipid profiles of plasma, liver and faeces in Syrian hamsters. **Food Chemistry**, v. 124, p.72-79, 2010.

VINDEROLA, C.G.; DUARTE, J.; THANGAVEL, D.; PERDIGON, G.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Immunomodulating capacity of kefir. **Journal of Dairy Research**, v.72, p. 195-202, 2005.

VISHWANATHAN, K.H.; SINGH, V.; SUBRAMANIAN, R. Wet grinding characteristics of soybean for soymilk extraction. **Journal of Food Engineering**, v. 106, p. 28-34, 2011.

WADA, K.; NAKAMURA, K.; TAMAI, Y.; TSUJI, M.; KAWACHI, T.; HORI, A.; TAKEYAMA, N.; TANABASHI, S.; MATSUSHITA, S.; TOKIMITSU, N.; NAGATA, C. Soy isoflavone intake and breast cancer risk in Japan: from the Takayama study. **International Journal of Cancer**, v. 133, p. 952–960, 2013.

WANG, H.; MURPHY, P.A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 42, p. 1674–1677, 1994a.

WANG, H.J.; MURPHY, P.A. Isoflavone content in commercial soybean foods. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 42, p. 1666–1673, 1994b.

WANG, H.J.; MURPHY, P.A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 44, p. 2377-2383, 1996.

WANG, R.; ZHOU, X.; CHEN, Z. High pressure inactivation of lipoxygenase in soy milk and crude soybean extract. **Food Chemistry**, v. 106 (2), p. 603-611, 2008.

WANG, T. Minor Constituents and Phytochemicals of Soybeans. In: L.A. Johnson, P.J. White, R. Galloway (Eds.), **Soybeans: Chemistry, Production, Processing, and Utilization**. Urbana: AOCS Press, 2008.

WANG, Y.; CHEN, P.; ZHANG, B. Quantitative trait loci analysis of soluble sugar contents in soybean. **Plant Breeding**, v. 133, p. 493–498, 2014.

- WARDHANI, D.H.; VÁZQUEZ, J.A.; PANDIELLA, S.S. Optimisation of antioxidants extraction from soybeans fermented by *Aspergillus oryzae*. **Food Chemistry**, v. 118, p. 731–739, 2010.
- WILDMAN, R.E.C. (Ed.). **Handbook of nutraceuticals and functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2001. 542 p.
- WISEMAN, A. Crohn's disease leading to bowel cancer may be avoided by consumption of soya isoflavones: Adjunct-chemotherapy with oxaliplatin. **Medical Hypotheses**, v. 66, n. 5, p. 934–935, 2006.
- XIAO, C.W. Health effects of soy protein and isoflavones in humans. **Journal of Nutrition**, v. 138, p. 1244S–1249S, 2008.
- XIAO, Y.; WANG, L.; RUI, X.; LI, W.; CHEN, X.; JIANG, M.; DONG, M. Enhancement of the antioxidant capacity of soy whey by fermentation with *Lactobacillus plantarum* B1–6. **Journal of Functional Foods**, v.12, p. 33–44, 2015.
- XU, X.; WANG, H. J.; MURPHY, P. A.; HENDRICH, S. Neither background diet nor type of soy food affects short-term isoflavone bioavailability in women. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 798–801, 2000.
- YALCIN, S.; BASMAN, A. Effects of infrared treatment on urease, trypsin inhibitor and lipoxygenase activities of soybean samples. **Food Chemistry**, v. 169, p. 203–210, 2015.
- YAN-CHUN, L.; HUAN-LU, S.; XIN, L.; LIANG, W.; SHUN-TANG, G. Influence of Blanching and Grinding Process with Hot Water on Beany and Non-Beany Flavor in Soymilk. **Journal of Food Science**, v.76, n.1, 2011.
- YANG, H.; ZHANG, L.; XIAO, G.; FENG, J.; ZHOU, H.; HUANG, F. Changes in some nutritional components of soymilk during fermentation by the culinary and medicinal mushroom *Grifola frondosa*. **LWT - Food Science and Technology**, In Press, Corrected Proof, 2014.
- YANG, H-Y.; YANG, S-C.; CHEN, S-T.; CHEN, J-R. Soy protein hydrolysate ameliorates cardiovascular remodeling in rats with I-NAME-induced hypertension. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19 (12), p. 833–839, 2008.
- YEOM, S.J.; KIM, B.N.; KIM, Y.S.; OH, D.K. Hydrolysis of isoflavone glycosides by a thermostable β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 60, n. 6, p. 1535-1541, 2012.
- YOSHIARA, L. Y.; MADEIRA, T. B.; DELAROZA, F.; SILVA, J. B.; IDA, E. I. Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 9, p. 978-986, 2012.
- YOVANOU DI, M.; DIMITRELI, G.; RAPHAELIDES, S.N.; ANTONIOU, K.D. Flow behavior studies of kefir type systems. **Journal of Food Engineering**, v. 118, p. 41–48, 2013.

YUAN, J-P.; LIU, Y-B.; PENG, Juan; WANG, J-H.; LIU, X. Changes of isoflavone profile in the hypocotyls and cotyledons of soybeans during dry heating and germination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 9002-9010, 2009.

ZANIRATI, D.F.; ABATEMARCO JR, M.; SANDES, S.H.C.; NICOLI, J.R.; NUNES, A.C.; NEUMANN, E. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. **Anaerobe**, v.32, p. 70–76, 2015.

ZHANG, Y.; GUO, S.; LIU, Z.; CHANG, S. K. C. Off-flavor related volatiles in soymilk as affected by soybean variety, grinding, and heat-processing methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7457–7462, 2012.

ZHAO, D.; SHAH, N.P. Changes in antioxidant capacity, isoflavone profile, phenolic and vitamin contents in soymilk during extended fermentation. **LWT - Food Science and Technology**, v.58, n. 2, p. 454–462, 2014.

ZHOU, J.; LIU, X.; JIANG, H.; DONG, M. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**, v. 26, p. 770–775, 2009.

ZHOU, X.L.; KONG, X.F.; YANG, X.J.; YIN, Y.L. Soybean oligosaccharides alter colon short-chain fatty acid production and microbial population in vitro. **American Society of Animal Science**, v. 90, p. 37–39, 2012.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos foram redigidos na forma de três artigos científicos conforme seguem nas próximas páginas. Estes seguiram as normas de publicação dos respectivos periódicos.

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1

**EFFECT OF SOYMILK PROCESSING ON ITS PHYSICAL AND CHEMICAL
PROPERTIES AND ACCEPTABILITY**

Tahis Regina Baú e Elza Louko Ida

Situação: Submetido ao *Journal of Food Quality*

1 EFFECT OF SOYMILK PROCESSING ON ITS PHYSICAL AND CHEMICAL
2 PROPERTIES AND ACCEPTABILITY

3
4 BAÚ, T.R¹.; IDA, E. I.^{2*}

5
6 ¹Londrina State University, Department of Food Science and Technology, 86051-
7 990, Londrina city, Parana State, Brazil; *email: ¹tahisbau@gmail.com, ²elida@uel.br

8
9 ABSTRACT

10
11 The objective of this study was to evaluate the influence of different processing
12 conditions used to obtain soymilk on physical and chemical properties and
13 acceptability. Five processing conditions were applied to obtain soymilk and analyzed
14 for pH, hue, viscosity, chemical composition, trypsin inhibitors, isoflavones and
15 acceptability. The different processing conditions to obtain soymilk influenced the
16 physical and chemical properties and isoflavone content, but no differences in
17 sensory acceptance were found. From the processing, the soybeans soaked at 5 °C
18 for 16 h, homogenized for 3 min with distilled water at 25 °C with filtration and heat
19 treatment at 90 °C for 30 min produced soymilk with a higher content of protein, fat,
20 ash, total and aglycone isoflavones and lower viscosity and hue.

21
22 _____
23 * Corresponding author. Tel.: +55 43 3371 5971; fax: +55 43 3371 4080

24 E-mail address: elida@uel.br (E. I. IDA).

25

26 Keywords: Soymilk; processing conditions; principal component analysis;
27 isoflavones; protein.

28

29 1 INTRODUCTION

30

31 Soymilk is a turbid colloidal dispersion and contains part of the original
32 soybean components (Nik, Tosh, Woodrow & Poysa, 2009). Soymilk is traditionally
33 obtained from soaking the grains, draining the water, homogenizing, filtrating and
34 heat treatment. However, there have been many changes in the process due to
35 technological advances and to better meet the needs of consumers (Prabhakaran &
36 Perera, 2006).

37 There has been, in several countries, an increased consumption of
38 beverages and soybean products. This increase has been associated with beneficial
39 effects on human health, such as the prevention of coronary heart disease,
40 osteoporosis, postmenopausal symptoms and others (Pena et al., 2010). The
41 beneficial properties of soymilk were attributed mainly to protein and isoflavone
42 content (Pena et al., 2010). Isoflavones in soybeans occur in four distinct chemical
43 structures known as aglycones (daidzein, genistein and glycitein), β -glucosides
44 (daidzin, genistin and glicitin), 6''-O-acetylglucosides (acetyldaidzin, acetylgenistin
45 and acetylglicitin) and 6''-O-malonylglucosides (malonyldaidzin, malonylgenistin and
46 malonylglicitin) (Liu, Chang, Li-Te & Tatsumi, 2004). The processing conditions to
47 obtain soymilk influence the isoflavones profile, which may cause degradation or
48 conversion of conjugated forms to unconjugated forms (Nufer, Ismail & Hayes, 2009).

49 Soymilk has 2 % fat, 5 % protein, 2 % carbohydrates, 0.6 % ash and 9 % total
50 solids (Iwuoha & Umunnakwe, 1997). Chemical composition of soymilk can vary

51 depending on the obtaining conditions. The physical, chemical, sensory and yield of
52 soymilk depends on various factors such as the soybean cultivar, grain soaking time,
53 proportion of soybeans to water, homogenization, filtration, and time and temperature
54 of heat treatment (Cai, Chang, Shih, Hou & Ji, 1997; Iwuoha & Umunnakwe, 1997;
55 Jung, Murphy & Sala, 2008; Vishwanathan, Singh & Subramanian, 2011). Trypsin
56 inhibitors (Kunitz and Bowman-Birk) are considered anti-nutritional factors of
57 soybeans (Guerrero-Beltrán, Estrada-Girón, Swanson & Barbosa-Cánovas, 2009),
58 and their presence can cause a decrease in the digestibility and nutritional value of
59 the product (Poliseli-Scopel, Hernández-Herrero, Guamis & Ferragut, 2012). The
60 different processes for obtaining soy products have been used to reduce the activity
61 of trypsin inhibitors, but their inactivation depends on the time temperature for
62 heating, particle size and the physical condition of the product (Guerrero-Beltrán,
63 Estrada-Girón, Swanson & Barbosa-Cánovas, 2009).

64 The effect of different processing conditions to obtain soymilk with maximum
65 extraction of desirable constituents has not been fully explored. Therefore, the
66 objective of this study was to evaluate the influence of different processing conditions
67 to obtain soymilk on physical and chemical properties and acceptability.

68

69 2 MATERIAL AND METHODS

70

71 2.1 Material

72

73 To obtain different soymilk products, soybean variety BRS 257 of 2011/2012,
74 which is lipoxygenase-free, was donated by the Sementes Paraná company (Mauá
75 da Serra city, Parana State, Brazil).

76 For Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) and the
77 construction of calibration curves, the following standard isoflavones were used: 6''-
78 O-acetylglucosides and 6''-O-malonylglucosides (Wako Pure Chemical Industries,
79 Ltd., Osaka, Japan), β -glucosides and aglycones (Sigma-Aldrich Co., St. Louis,
80 USA). The reagents used in the analysis were of analytical grade or specific for
81 liquid chromatography.

82

83 2.2 Different processes for the soymilk production

84

85 For processing different soymilk products, 50 g of whole grains were used, in
86 triplicate, and the proportion of soybean to water for soaking (1:3; w:v) and
87 homogenizing (1: 8; w:v) were kept constant. During homogenizing, the amount of
88 water added was calculated by subtracting the amount of water absorbed by the
89 grain soaked. The following will describe the details of the five processes for
90 obtaining soymilk.

91 **Process A** – Soymilk was obtained according to the process described by Embrapa
92 (2005). Soybeans were soaked at 25 °C for 12 h in 0.5 % sodium bicarbonate
93 solution, and then drained and washed. Grains were boiled at 100 °C for 10 min in
94 0.25 % sodium bicarbonate solution. After cooking, soybeans were drained, washed
95 and homogenized in a blender (Arno Clic'Lav LN70, São Paulo, BR) for 3 min with
96 distilled water at 90 °C. The slurry was filtered (150 mesh) after cooling, and the
97 obtained soymilk A was transferred to the appropriate glass vials with semi-open
98 cover for heat treatment at 98 °C for 10 min.

99 **Process B** – Soymilk was obtained according to the process described by Illinois
100 (2012). Soybeans were soaked at 100 °C for 5 min in 0.25 % sodium bicarbonate

101 solution, and then drained and washed with boiling water. Soaking with hot water
102 was carried out twice. Soybeans were homogenized in a blender (Arno Clic´Lav
103 LN70, São Paulo, BR) for 3 min with distilled water at 90 °C . The slurry was filtered
104 (150 mesh) after cooling, and the obtained soymilk B was transferred to the
105 appropriate glass vials with semi-open cover for heat treatment at 98 °C for 20 min.

106 **Process C** - Soymilk was obtained according to the process described by Kwok and
107 Nirajan (1995) and Kwok, Basker and Niranjana (2000) with modifications. Soybeans
108 were soaked at 5 °C for 16 h in water, and then drained and washed. Soybeans were
109 homogenized in a blender (Arno Clic´Lav LN70, São Paulo, BR) for 3 min with
110 distilled water at 25 °C. The slurry was filtered (150 mesh) after cooling, and the
111 obtained soymilk C was transferred to the appropriate glass vials with semi-open
112 cover for heat treatment at 90 °C for 30 min.

113 **Process D** – Soymilk obtained by this process differed from procedure C only in the
114 filtered slurry. The slurry was transferred to the appropriate glass vials with semi-
115 open cover for heat treatment at 90 °C for 30 min according Kwok and Nirajan (1995)
116 and Kwok, Basker and Niranjana (2000) and then filtered (150 mesh) after cooling to
117 obtain soymilk D.

118 **Process E** - Soymilk was obtained according to the process described by Achouri,
119 Boye and Zamani (2007). Soybeans were soaked at 40 °C for 3 h in 0.05 M sodium
120 acetate buffer, and then drained and washed with water. Soybeans were
121 homogenized in a blender (Arno Clic´Lav LN70, São Paulo, BR) for 3 min with
122 distilled water at 90 °C. The slurry was transferred to the appropriate glass vials with
123 semi-open cover for heat treatment at 116 °C for 3 min. Filtration was then performed
124 (150 mesh) after cooling to obtain soymilk E.

125

126 2.3 Physical and chemical properties of soymilk

127

128 The pH analysis of soymilks A, B, C, D and E was carried out in triplicate in a
129 digital potentiometer (Hanna HI 223, São Paulo, BR). Color (5 replicates) was
130 measured with a Minolta CR-400 colorimeter (Konica Minolta Sensing, Incorporation)
131 with lighting D65 according to the system (L^* , a^* and b^*). The results are expressed
132 in hue (H^*), and were calculated by the equation $H^* = \arctan(b^*/a^*)$, where the 0°
133 angle refers to red, 90° to yellow, 180° to green and 270° to a blue hue. The viscosity
134 was determined using a Brookfield digital viscometer with spindle 1 and a speed of
135 100 rpm with a 600 mL sample at $10 \pm 2^\circ\text{C}$, and the results are expressed in
136 centipoise (cP).

137 The chemical composition analysis of soymilks A, B, C, D and E was carried
138 out in triplicate following AOAC methods (2006). Trypsin inhibitors were extracted as
139 described by Liu and Markakis (1989). Thus, extraction was performed with 500 mg
140 of lyophilized soymilk and 50 mL of deionized water, stirring at 200 rpm for 30 min at
141 25°C . The material was filtered (Millex filters $0.45 \mu\text{m}$) and used to determine the
142 trypsin inhibitor activity (Kakade, Rackis & McGhee, 1974) using benzoyl-DL-
143 arginine-p-nitroanilide as substrate. One trypsin unit (TU) is arbitrarily defined as an
144 increase of 0.01 absorbance units at 410 nm per 10 mL of the reaction medium. The
145 results are expressed as trypsin units inhibited (TUI) per mg of soymilk, on a dry
146 basis, and an inhibited unit corresponds to a unit of inhibiting trypsin.

147 The lyophilised soymilk samples were defatted with hexane (1:10; w:v) at 25
148 $^\circ\text{C}$ for 1 h by continuous rotary agitation (150 rpm), and the isoflavone extraction was
149 performed with 300 mg of sample and 6.0 mL of an extraction solution containing
150 ultra-pure water, acetone and ethanol (1:1:1, v/v/v) (Yoshiara, Madeira, Delaroza,

151 Silva & Ida, 2012) at 25 °C for 1 h and agitated by vortex for 15 min each. The
152 mixture was then placed in an ultrasonic bath at 25 °C for 15 min, centrifuged at 794
153 g at 4 °C for 15 min (Eppendorf 5804 R, Hamburg, GE) and filtered (Millex – LH –
154 0.20 µm). The separation and quantification of isoflavones were performed using
155 Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) as described by Handa,
156 Couto, Vicensoti, Georgetti and Ida (2014). The results are expressed in µmol of
157 isoflavones per g of sample on a dry basis (µmol.g⁻¹).

158

159 2.4 Sanitary conditions analysis

160

161 Before the sensory analysis, the samples were analyzed for coliform at 45 °C,
162 and for *Bacillus cereus* and *Salmonella* spp counts according to the method
163 described in Brazil (2003).

164

165 2.5 Sensory analysis

166

167 For sensory analysis, the study was approved by the Ethics Committee of
168 Institution (CAAE 11278112.0.0000.5231). The sensory analysis was performed by
169 an acceptance test with 80 untrained consumers, 40 were men and 40 were women,
170 aged between 15 and 50 years. The consumers received 30 mL of the product at 10
171 °C in plastic drinking cups coded with three-digit random numbers. The soymilk
172 samples A, B, C, D and E were evaluated for color, flavor, viscosity and overall
173 acceptability attributes. The panelists used a 9-point hedonic scale, ranging from
174 "dislike extremely (1)" to "like extremely (9)" (Stone & Sidel, 2004).

175

176 2.6 Data analysis

177

178 Data were submitted to an analysis of variance (ANOVA) and a Tukey's test (p
179 < 0.05). Correlation test was performed with Statistica 7.0 software, and was applied
180 to the physical properties, chemical properties and isoflavone content data.

181

182 3 RESULTS AND DISCUSSION

183

184 3.1 Physical and chemical characterization

185

186 Soymilk A, B, C, D and E (Table 1) had different pH values ($p < 0.05$) among
187 soymilk processes. The high pH of soymilks A ($\text{pH } 7.3 \pm 0.0$) and B ($\text{pH } 6.9 \pm 0.0$)
188 was due to the addition of sodium bicarbonate in the soaking solution. The lower pH
189 in soymilk E ($\text{pH } 6.6 \pm 0.0$) was due to soaking the grains in sodium acetate buffer
190 with a pH of 5.0. Soymilk with a pH of 6.6 was described by Mullin et al. (2001) and
191 Jung, Murphy and Sala (2008).

192 The color of a food product is a very important characteristic. The L^* indicates
193 brightness, where 0 is black and 100 is white. Soymilks A and B showed minor
194 brightness and did not differ ($p > 0.05$) with an average of 64.7. However, the soymilk
195 C, D and E present greater brightness and did not differ ($p > 0.05$) with an average of
196 68.7. The hue is the attribute by which to identify color, and the 0° angle is red, 90° is
197 yellow, 180° is green and 270° is blue. Soymilks A, C and D (Table 1) showed
198 intermediate tone and did not differ ($p > 0.05$) with an average of 79.9° . Soymilk B
199 (76.8 ± 0.1) had less of a yellow hue and differed from other extracts. Soymilk E
200 presented more yellow hue (83.8 ± 0.2) and differed from the other soymilks. The

201 more intense yellow hue of the soymilk was due to greater heat intensity because
202 according to Kwok, MacDougall and Niranjana (1999), the formation of pigment in
203 soymilk increases with the intensity of the heat due to the Maillard reaction. Hues of
204 76.8 to 83.8° found for soymilks A, B, C, D and E were similar to the five commercial
205 soymilks evaluated by Terhaag, Almeida and Benassi (2013).

206 The viscosity (Table 1) of soymilk E (35.4 ± 0.6 cP) was higher and differed
207 from soymilks A (32.7 ± 0.3 cP), B (25.6 ± 0.5 cP), C (23.7 ± 0.5 cP) and D ($24.1 \pm$
208 0.7 cP). The soymilk C and D not present differ ($p > 0.05$). The high viscosity of the
209 soymilk may be desirable in final product when it is intended to obtain soymilk without
210 the necessity of adding thickeners. This increase in viscosity, according Liu, Chang,
211 Li-Te and Tatsumi (2004), may be associated with the effect of denaturation of the
212 soymilk protein after intense heat treatment (116 °C for 3 min). The major proteins of
213 soybeans, β -conglycinin (7S) and glycinin (11S), denature between 65 - 75 °C and 85 -
214 95 °C, respectively (Kitabatake et al., 1990). In addition, increased viscosity of soy
215 protein dispersion may occur after heating, and produce irreversible change to the
216 "progel" state (Yamauchi, Yamagishi & Iwabuchi, 1991) and affect the quantity,
217 nature and particle size of the solids present, especially the proteins (Iwuoha &
218 Umunnakwe, 1997).

219 The chemical composition of soymilk depends on the soybean cultivar, the
220 climatic conditions and the crop management, and conditions such as grain soaking
221 time, soybean to water proportions, trituration, filtration, heat treatment time and
222 temperature, enzymatic hydrolysis, pressure, and others (Cai, Chang, Shih, Hou & Ji,
223 1997; Chun et al., 2008; Jung, Murphy & Sala, 2008). It has been seen that higher
224 protein content (Table 2) was found in soymilks A (41.49 ± 1.0 g.100 g⁻¹), B ($43.37 \pm$
225 1.1 g.100 g⁻¹), C (44.51 ± 0.1 g.100 g⁻¹) and D (46.04 ± 0.4 g.100 g⁻¹), which did not

226 differ ($p > 0.05$). However, the lowest protein content ($39.13 \pm 1.8 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$) was
227 observed in soymilk E, which did not differ from soymilk A ($41.49 \pm 1.0 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$).
228 The lower protein content of the soymilk can be attributed to the heat treatment of the
229 slurry ($116 \text{ }^\circ\text{C}$ for 3 min) and filtration conditions. According to Nik, Tosh, Woodrow
230 and Poysa (2009), heat treatment at this level can lead to denaturation and
231 aggregation of soy protein with subsequent insolubilization, wherein the filtration
232 process of the soymilk and a part of the denatured protein migrated with the residue
233 and thus was not recovered in soymilk. The protein content of the soymilk (44.0 to
234 $48.7 \text{ g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$) was obtained by soaking the soybeans at $13 \text{ }^\circ\text{C}$ for 22 h, followed by
235 trituration with water at $60 \text{ }^\circ\text{C}$ and filtration (Poysa & Woodrow, 2002). Cai, Chang,
236 Shih, Hou and Ji (1997) reported a protein content between 43.7 and 52.7 g per 100
237 g^{-1} in soymilk. A high protein content of 52.4 and 56.7 g per 100 g^{-1} was obtained by
238 Vishwanathan, Singh and Subramanian (2011).

239 The lipid content (Table 2) of soymilks C and D did not differ ($p > 0.05$), with
240 an average content of 24.03 g per 100 g^{-1} and was similar to that obtained by Cai,
241 Chang, Shih, Hou and Ji (1997) and Vishwanathan, Singh and Subramanian (2011).
242 The lipid content of soymilks A, B and E did not differ ($p > 0.05$), with an average
243 content of 15.98 g per 100 g^{-1} . The ash content (Table 2) of soymilks A, B, C, D and
244 E ranged from 4.62 ± 0.0 to $6.31 \pm 0.4 \text{ g per } 100 \text{ g}^{-1}$, and was higher in soymilks C, D
245 and E, which did not differ ($p > 0.05$), and had an average content of 6.09 g per 100
246 g^{-1} . Similar results were described by Cai, Chang, Shih, Hou and Ji (1997), who
247 found that the ash content of the soymilk varied between 4.9 and 6.4 $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$. The
248 high carbohydrate content (Table 2) was observed in soymilks A, B and E, which did
249 not differ ($p > 0.05$), and had an average content of 37.56 $\text{g}\cdot 100 \text{ g}^{-1}$. It should be
250 noted that carbohydrates can also increase the viscosity of soymilk. However, lower

251 carbohydrate content was observed in soymilks C and D, which did not differ ($p >$
252 0.05), and had an average content of $24.45 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$.

253 The activity of trypsin inhibitors (Table 2) in soymilks A, B and E did not differ
254 ($p > 0.05$), and the average value was $1.39 \text{ TUI} \cdot \text{mg}^{-1}$. Additionally, a low trypsin
255 inhibitor activity of $0.44 \text{ TUI} \cdot \text{mg}^{-1}$ was detected in commercial mixtures of powdered
256 milk with soymilk (Genovese & Lajolo, 1998). Low trypsin inhibitor activity in soymilks
257 A, B, C, D and E indicate that the heat treatment during processing of the extracts
258 was adequate. Low trypsin inhibitor activity in soymilks A and B may be due to the
259 time of heat treatment at 98°C , which was 10 to 20 min, respectively, or because the
260 soaking conditions. Further, soymilk E had low trypsin inhibitor activity, and a higher
261 temperature (116°C for 3 min) was applied during processing. Inactivation of trypsin
262 inhibitors increases with the pressure, temperature and time of heat treatment
263 (Guerrero-Beltrán, Estrada-Girón, Swanson & Barbosa-Cánovas, 2009). Trypsin
264 inhibitor activity of soymilks C and D did not differ ($p > 0.05$), and the average content
265 was $2.62 \text{ TUI} \cdot \text{mg}^{-1}$ because during processing the same heat treatment was applied
266 and its was less intense that others treatment employed. Because an anti-nutritional
267 factor it is desirable that soymilk presents less trypsin inhibitor activity. The different
268 values of trypsin inhibitors in soybeans and their derivatives may also be due to the
269 different ways of obtaining these products, and there is no set limit on their content in
270 foods.

271

272 3.2 Isoflavones profile

273

274 Soymilk C (Table 3) had higher total isoflavone content ($8.42 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$),
275 whereas soymilks B and D did not differ, and soymilks E and A did not differ, with

276 averages of $6.4 \mu\text{mol.g}^{-1}$ and $5.68 \mu\text{mol.g}^{-1}$, respectively. Total isoflavone contents
277 between 5.95 and $7.96 \mu\text{mol.g}^{-1}$ have been described in the soymilk obtained at
278 industrial scale by Prabhakaran and Perera (2006). Lower levels of total isoflavones
279 ($5.01 \mu\text{mol.g}^{-1}$) in soymilk were obtained by Jung, Murphy and Sala (2008). The
280 isoflavone content in soymilk may vary depending on the steps of the extraction
281 process, such as soaking, filtration or homogenization and centrifugation (Kao, Lu,
282 Hsieh & Chen, 2004). According to Wang and Murphy (1996), conditions for soaking
283 the grains in water favors lixiviation of isoflavones, changing the amount of total
284 isoflavones in soymilk. Furthermore, during processing to obtain soymilk and after
285 filtration, a part of the isoflavones may be retained in the residue (okara).

286 The content of β -glucosides isoflavones daidzin, genistin and glycitin (Table 3)
287 of soymilk E was higher than soymilks A, B, C and D. However, daidzin and genistin
288 contents were lower in soymilk C, and the glycitin content was lower in soymilk D.
289 These results were greater than the soymilk containing $0.29 \mu\text{mol.g}^{-1}$ daidzin, 0.12
290 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of glycitin and $0.30 \mu\text{mol.g}^{-1}$ of genistin as described by Jung, Murphy and
291 Sala (2008). The steps of soaking in water and mixing the soybeans may favor the
292 action of endogenous β -glucosidase, which hydrolyses the soybean β -glucoside
293 isoflavones and there by reduces its content (Lima & Ida, 2014; Wang & Murphy,
294 1996), due to formation of isoflavone aglycones.

295 The content of isoflavones malonyldaidzin, malonylglycitin and malonylgenistin
296 (Table 3) in soymilk C (1.65 ± 0.03 , 1.65 ± 0.03 and $3.68 \pm 0.06 \mu\text{mol.g}^{-1}$,
297 respectively) was higher than other soymilks. However, lower malonylglucosides
298 content was observed in soymilk E. Malonylglucosides isoflavones are thermally
299 unstable and their content decreases with the intensity of the heat treatment
300 (Jackson et al., 2002). Comparing the reduced content of malonylglucosides

301 isoflavones from soymilks A, B, C and D with the soymilk described by Jung, Murphy
302 and Sala (2008) revealed that the malonylglicitin ($0.25 \mu\text{mol.g}^{-1}$) and malonylgenistin
303 ($1.70 \mu\text{mol.g}^{-1}$) content was less, whereas the malonyldaidzin content ($2.02 \mu\text{mol.g}^{-1}$)
304 was greater than in soymilk E.

305 It is noteworthy that soymilk E was the only soymilk that had acetylgenistin
306 content ($0.07 \mu\text{mol.g}^{-1}$), and acetyldaidzin and acetylglicitin isoflavones were not
307 detected. Generally, acetylglicosides are formed by dry heating conditions (Kao, Lu,
308 Hsieh & Chen, 2004) due to decarboxylation of malonylglucosides to the formation of
309 significant amounts of acetylglicosides during heating (Barbosa, Lajolo & Genovese,
310 2006). In the soymilk, the higher temperature employed ($116 \text{ }^\circ\text{C}$) possibly favored the
311 de-esterification of malonylglucosides and acetylglicosides for respective β -
312 glucosides, which was also observed by Coward, Smith, Kirk and Barnes (1998). In
313 general, soy isoflavones are present in glucosylated form and their concentration
314 depends on the cultivar and processing conditions (Cai, Chang, Shih, Hou & Ji, 1997;
315 Chun et al., 2008; Jung, Murphy & Sala, 2008).

316 The isoflavones aglycone glycitein was not detected in soymilk (Table 3), and
317 the daidzein isoflavone was not detected in soymilks A, B and E. The isoflavone
318 genistein was detected in soymilk D, and higher levels were observed in the soymilk
319 C, which differed from soymilks A, B and E. The aglycones isoflavone content was
320 similar between samples at 0.05 and $0.51 \mu\text{mol.g}^{-1}$, similar to that observed by
321 Prabhakaran and Perera (2006) who compared the cold and hot milling methods with
322 different soymilk heat treatments. Moreover, Jung, Murphy and Sala (2008) detected
323 the presence of the three aglycones ($0.16 \mu\text{mol daidzein.g}^{-1}$, $0.05 \mu\text{mol glycitein.g}^{-1}$
324 and $0.12 \mu\text{mol genistein.g}^{-1}$ of soymilk), and their results were higher than soymilks A,
325 B, C, D and E. The processing conditions for obtaining the five soymilks favor the β -

326 glucosidase action to convert the β -glucosides to aglycones. Lima and Ida (2014)
327 found that soaking the soybeans at 55 °C for 6 h produced higher conversion of β -
328 glucosides to aglycones, wherein optimal activity of the enzyme occurs at 50 ° C.
329 Furthermore, in soaking and grinding in cold conditions, β -glucosidase activity was
330 also detected, wherein the heat treatment inactivated the enzyme, preventing
331 hydrolysis of the β -glucosides (Lima & Ida, 2014; Wang & Murphy, 1996).

332

333 3.3 Correlation between the soymilk characteristics

334

335 According the Table 4, the soymilks showed physical and chemical properties
336 that relate. Thus, can see that soymilk with high hue showed greater acetylgenistin
337 content, and this can be confirmed by the action of intense heat treatment applied to
338 soymilk, which affected these characteristics. In addition, soymilk with high fat had
339 higher brightness ($r = 0.91$). The viscosity was negatively correlated with protein
340 content ($r = -0.95$), but showed a good correlation with the carbohydrate content ($r =$
341 0.79).

342 With respect to protein content, this correlated positively with malonyldaidzin (r
343 $= 0.91$), malonylglicitin ($r = 0.88$), malonylgenistin ($r = 0.91$) and daidzein ($r = 0.81$)
344 isoflavones. According to Wang and Murphy (1996), the isoflavones are generally
345 associated with the proteins and, therefore, is presented highly correlated. However,
346 was negatively correlated with the β -glucosides daidzin ($r = 0.86$) and genistin ($r =$
347 0.85). Protease inhibitors are protein substances and showed good correlation with
348 the protein content ($r = 0.79$), indicating that the conditions that increase the protein
349 extraction can also increase the anti-nutritional compounds content.

350 The soymilk, the isoflavones the β -glucosides daidzin, glicitin and genistin
351 were highly correlated. The same was observed for manlonylglicosides isoflavones.
352 This indicates that, being compounds with similar chemical structure, are extracted in
353 similar conditions on the soymilk obtention.

354 Analyzing the correlations between the soymilk characteristics (Tabke 4) and
355 the data presented in tables 1, 2, 3 and 5, is observed that change in filtration steps
356 and heat treatment in obtaining soymilks C and D did not influence the general
357 characteristics of the soymilk. However, to obtain soymilk on an industrial scale, it
358 would be advantageous to recommend the process used for soymilk C. In addition to
359 having the best features of high protein content and total isoflavone content, the
360 process could ensure the microbiological safety of the product by filtration and then
361 heat treatment.

362 Soymilk E was characterized by higher hue, viscosity and isoflavone b-
363 glucosides and acetylgenistin. However, soymilks A and B had higher pH and lower
364 ash content. Thus, this process are disadvantageous compared to the processes for
365 soymilks C and D.

366

367 3.4 Microbiological conditions

368

369 The safety of soymilks A, B, C, D and E was ensured by the absence of
370 coliforms at 45 ° C and the absence of *Bacillus cereus* and *Salmonella* sp.

371

372

373

374

375 3.5 Sensory acceptance test

376

377 The sensory acceptance test indicated that the processing of soymilks A, B, C,
378 D and E did not influence the acceptance of the color, taste, viscosity or global
379 acceptance. The acceptance notes ranged from 7.1 to 7.5 for color, 5.7 to 6.4 for
380 flavor, 6.3 to 6.8 for viscosity and 5.9 to 6.5 for overall acceptance (Table 5). On the
381 hedonic scale, a 6 indicated that the judges "liked regularly" and a 7 indicated that
382 the judges "liked slightly". These results were superior to those described by
383 Rosenthal, Deliza, Cabral, Cabral, Farias and Domingues (2003) who obtained a 4.8
384 for global acceptance of soymilk obtained from soaking the grains at 100 °C for 5
385 min, dehulled, bleaching with 0.25 % sodium carbonate solution brought to boiling for
386 30 min, mixing the grains in boiling water, homogenizing at a pressure of 5000 psi
387 (60 °C) and filtrating, using a 9-point hedonic scale. Iwuoha and Umunnakwe (1997),
388 in a similar study with four soymilks obtained by different processing conditions,
389 received scores of 3.43 to 6.93 for global acceptance using a 9-point hedonic scale.
390 Overall acceptance was 3.8 and 4.4 for two soymilks described by Silva, Prudencio,
391 Felberg, Deliza and Carrão-Panizzi (2007), using a 9-point hedonic scale, that were
392 obtained from the soybean cultivar BRS 213 husked, bleached with 0.25 % sodium
393 bicarbonate solution, triturated in boiling water, homogenized and spray dried in a
394 drier, followed by reconstitution of 5 or 10 % in water. Therefore, the five different
395 processing conditions for obtaining soymilks A, B, C, D and E had no effect on
396 sensory acceptance.

397

398

399

400 4 CONCLUSION

401

402 The different processing conditions to obtain soymilk influence the physical
403 and chemical properties and isoflavone content, but differences in sensory
404 acceptance were not detected. From the processing, the soybeans soaked at 5 °C
405 for 16 h, homogenized for 3 min with distilled water at 25 °C with filtration and heat
406 treatment at 90 °C for 30 min produced soymilk with greater protein (44.51 g.100 g⁻¹),
407 fat (25.07 g.100 g⁻¹), ash (6.17 g.100 g⁻¹), total isoflavone (8.42 μmol.g⁻¹) and
408 aglycone isoflavone (0.56 μmol.g⁻¹) content and lower viscosity (23.7 cP) and hue
409 (79.9°).

410

411 ACKNOWLEDGEMENTS

412

413 This work was partially funded by the Fundação Araucária/CNPq, PRONEX
414 Program. EII would like to thank the CNPq Research Fellow.

415

416 DECLARATION OF INTEREST

417

418 The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible
419 for the content and writing of the paper.

420

421 REFERENCES

422

423 Achouri, A., Boye, J.I., & Zamani, Y. (2007). Changes in somilk quality as a functional
424 of composition and storage. *Journal of Food Quality*, 30, 31-744.

- 425 AOAC. (2006). *Official Methods of Analysis of AOAC International* - Volume I and II,
426 18th. Edition, Rev. 1.
- 427 Barbosa, A.C.L., Lajolo, F.M., & Genovese, M.I. (2006). Influence of temperature, pH
428 and ionic strength on the production of isoflavone-rich soy protein isolates. *Food*
429 *Chemistry*, 98 (4), 757-766.
- 430 Brazil. 2003. *Official Analytical Methods for Microbiological Analysis for Animal Origin*
431 *Products and Water Control* (Annex I), Normative Instruction No. 62, of August 26,
432 2003. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Official Diary of the Union.
433 Brasília, BR.
- 434 Cai, T.D., Chang, K.C., Shih, M.C., Hou, H.J., & Ji, M. (1997). Comparison of bench
435 and production scale methods for making soymilk and tofu from 13 soybean
436 varieties. *Food Research International*, 30 (9), 659-668.
- 437 Chun, J., Kim, J.S., & Kim, J.H. (2008). Enrichment of isoflavone aglycones in
438 soymilk by fermentation with single and mixed cultures of *Streptococcus infantarius*
439 12 and *Weissella* sp. *Food Chemistry*, 109 (2), 278-284.
- 440 Coward, L., Smith, M., Kirk, M., & Barnes, S. (1998). Chemical modification of
441 isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *The American Journal of*
442 *Clinical Nutrition*, 68, 1486S–1491S.
- 443 Embrapa. (2005). *Soymilk production handbook for small agribusiness*. Felberg, I.,
444 Antoniassi, R . & Deliza, R. Embrapa Agribusiness Food, Rio de Janeiro, BR.

- 445 Genovese, M.I. & Lajolo, F.M. (1998). Atividade inibitória de tripsina em produtos
446 derivados de soja (Glycine Max) consumidos no Brasil. *Food Science and*
447 *Technology*, 18 (3).
- 448 Guerrero-Beltrán, J.A., Estrada-Girón, Y., Swanson, B.G., & Barbosa-Cánovas, G.V.
449 (2009). Pressure and temperature combination for inactivation of soymilk trypsin
450 inhibitors. *Food Chemistry*, 116, 676-679.
- 451 Handa, C.L., Couto, U.R., Vicensoti, A.H., Georgetti, S.R., & Ida, E.I. (2014).
452 Optimisation of soy flour fermentation parameters to produce b-glucosidase for
453 bioconversion into aglycones. *Food Chemistry*, 152, 56–65.
- 454 Illinois. (2012). Soy at home series n°2: Make your own soymilk – International
455 Soybean Program National Soybean Research Laboratory. Available
456 in <http://www.nsrl.illinois.edu/nutrition/multimedia/At%20Home%20soymilk.pdf>.
- 457 Iwuoha, C.I. & Umunnakwe, K.E. (1997). Chemical, physical and sensory
458 characteristics of soymilk as affected by processing method, temperature and
459 duration of storage. *Food Chemistry*, 59 (3), 373-379.
- 460 Jackson, C.J.C., Dini, J.P., Lavandier, C., Rupasinghe, H.P.V., Faulkner, H., Poysa,
461 V., Buzzell, D., & DeGrandis, S. (2002). Effects of processing on the content and
462 composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Process*
463 *Biochemistry*, 37, 1117 – 1123.
- 464 Jung, S., Murphy, P., & Sala, I. (2008). Isoflavone profiles of soymilk as affected by
465 high-pressure treatments of soymilk and soybeans. *Food Chemistry*, 111, 592–598.

- 466 Kakade, M.L., Rackis, J.J., Mcghee, J.E., & Puski, G. (1974). Determination of trypsin
467 inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure.
468 *Cereal Chemistry*, 51, 376-382.
- 469 Kao, T.H., Lu, Y.F., Hsieh, H.C., & Chen, B.H. (2004). Stability of isoflavone
470 glucosides during processing of soymilk and tofu. *Food Research International*, 37,
471 891–900.
- 472 Kitabatake, N., Tahara, M., & Doi, E. (1990). Thermal denaturation of soybean
473 protein at low water contents. *Agriculture and Biological Chemistry*, 54, 2205–2212.
- 474 Kwok, K.C. & Niranjana, K. (1995). Review: effect of thermal processing on soymilk.
475 *International Journal of Food Science and Technology*, 30, 263-295.
- 476 Kwok, K.C., Basker, D., & Niranjana, K. (2000). Kinetics of sensory quality changes in
477 soymilk during thermal processing, by parametric and non-parametric data analyses.
478 *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 595-600.
- 479 Kwok, K.C., Macdougall, D.B., & Niranjana, K. (1999). Reaction kinetics of heat-
480 induced colour changes in soymilk. *Journal of Food Engineering*, 40 (1-2), 15-20.
- 481 Lima, F.S. & Ida, E.I. (2014). Optimisation of soybean hydrothermal treatment for the
482 conversion of β -glucoside isoflavones to aglycones. *LWT - Food Science and*
483 *Technology*, 56, 232-239.
- 484 Liu, K. & Markakis, P. (1989). An improved colorimetric method for determining
485 antitryptic activity in soybean products. *Cereal Chemistry*, 66, 415-422.

- 486 Liu, Z.S., Chang, S.K.C., Li-Te, L., & Tatsumi, E. (2004). Effect of selective thermal
487 denaturation of soybean proteins on soymilk viscosity and tofu's physical properties.
488 *Food Research International*, 37, 815–822.
- 489 Miura, E. M. Y., Silva, R.S.S.F., Mizubuti, I.Y., & Ida, E.I. (2005). Cinética de
490 inativação de Inibidores de Tripsina e de Insolubilização de Proteínas de diferentes
491 cultivares de soja. *Rev. Bras. Zoo.* 34 (5), 1659-1665.
- 492 Mullin, W.J., Fregeau-Reid, J.A., Butler, M., Poysa, V., Woodrow, L., Jessop, D.B., &
493 Raymond, D. (2001). An interlaboratory test of a procedure to assess soybean
494 quality for soymilk and tofu production. *Food Research International*, 34, 669-677.
- 495 Nik, A.M., Tosh, S.M., Woodrow, L., Poysa, V., & Corredig, M. (2009). Effect of soy
496 protein subunit composition and processing conditions on stability and particle size
497 distribution of soymilk. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 1245-1252.
- 498 Nufer, K.R., Ismail, B., & Hayes, K.D. (2009). The effects of processing and
499 extraction conditions on content, profile, and stability of isoflavones in a soymilk
500 system. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 1213-1218.
- 501 Pena, M.M., Salvia-Trujillo, L., Rojas-Grau, M.A., & Martín-Belloso, O. (2010). Impact
502 of high intensity pulsed electric field on antioxidant properties and quality parameters
503 of a fruit juice–soymilk beverage in chilled storage. *LWT-Food Science and*
504 *Technology*, 43, 872–881.
- 505 Polisel-Scopel, F.H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2012).
506 Comparison of ultra high pressure homogenization and conventional thermal
507 treatments on the microbiological, physical and chemical quality of soymilk. *LWT-*
508 *Food Science and Technology*, 46, 42-48.

- 509 Poysa, V. & Woodrow, L. (2002). Stability of soybean seed composition and its effect
510 on soymilk and tofu yield and quality. *Food Research International*, 35, 337-345.
- 511 Prabhakaran, M. P., & Perera, C.O. (2006). Effect of extraction methods and UHT
512 treatment conditions on the level of isoflavones during soymilk manufacture. *Food*
513 *Chemistry*, 99, 231– 237.
- 514 Rosenthal, A., Deliza, R., Cabral, L.M.C., Cabral, L.C., Farias, C.A.A., & Domingues,
515 A.M. (2003). Effect of enzymatic treatment and filtration on sensory characteristics
516 and physical stability of soymilk. *Food Control*, 14 (3), 187-192.
- 517 Silva, J.B., Prudencio, S.H., Felberg, I., Deliza, R., & Carrão-Panizzi, M.C. (2007).
518 Aceitabilidade de bebidas preparadas a partir de diferentes extratos hidrossolúveis
519 de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42 (12), 1779-1784.
- 520 Stone, H. & Sidel, J.L. (2004). *Sensory Evaluation Practices*. 3^o ed. Academic Press,
521 New York, NY.
- 522 Terhaag, M.M., Almeida, M.B., & Benassi, M.T. (2013). Soymilk plain beverages:
523 correlation between acceptability and physical and chemical characteristics. *Food*
524 *Science and Technology*, 33(2): 387-394.
- 525 Vishwanathan, K.H., Singh, V., & Subramanian, R. (2011). Wet grinding
526 characteristics of soybean for soymilk extraction. *Journal of Food Engineering*, 106,
527 28-34.
- 528 Wang, H., & Murphy, P.A. (1996). Mass balance study of isoflavones during soybean
529 processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2377–2383.

- 530 Yamauchi, F., Yamagishi, T., & Iwabuchi, S. (1991). Molecular understanding of
531 heat-induced phenomena of soybean protein. *Food Reviews International*, 7(3), 283–
532 322.
- 533 Yoshiara, L. Y., Madeira, T. B., Delaroza, F., Silva, J. B., & Ida, E. I. (2012).
534 Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-
535 centroid mixture design. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 9, 978–
536 98.

Table 1. Physical characteristics of soymilk (A, B, C, D and E) obtained by different processes

Physical characteristics	Soymilk				
	A	B	C	D	E
pH	7.3 ± 0.0 ^a	6.9 ± 0.0 ^b	6.8 ± 0.0 ^c	6.7 ± 0.0 ^d	6.6 ± 0.0 ^e
L*	65.2 ± 0.9 ^b	64.3 ± 0.4 ^b	69.6 ± 1.1 ^a	68.5 ± 0.5 ^a	68.0 ± 0.6 ^a
Hue (°)*	79.8 ± 0.2 ^b	76.8 ± 0.1 ^c	79.9 ± 0.3 ^b	79.9 ± 0.2 ^b	83.8 ± 0.2 ^a
Viscosity (cP)	32.7 ± 0.3 ^b	25.6 ± 0.5 ^c	23.7 ± 0.5 ^d	24.1 ± 0.7 ^d	35.4 ± 0.6 ^a

Mean values with the same letter in a line are not significantly different ($p < 0.05$) according to Tukey's test.

Soymilk A: Soaking at 25°C/12h; drainage; heat treatment at 100°C/10min (0.5 % sodium bicarbonate); drainage; homogenized with distilled water at 90°C/ 3min; filtration and heat treatment at 98°C/10 min.

Soymilk B: Soaking at 100°C/5min (0.25 % sodium bicarbonate); drainage; soaking and drainage repetition; homogenized with distilled water at 90°C/ 3min; filtration and heat treatment at 98°C/20 min.

Soymilk C: Soaking at 5°C/16h; drainage; soaking and drainage repetition; homogenized with distilled water at 25°C/ 3min; filtration and heat treatment at 90°C/30 min.

Soymilk D: Soaking at 5°C/16h; drainage; soaking and drainage repetition; homogenized with distilled water at 25°C/ 3min; heat treatment at 90°C/30 min and filtration.

Soymilk E: Soaking at 40°C/3h (acetate buffer); drainage; soaking and drainage repetition; homogenized with distilled water at 90°C/ 3min; heat treatment at 116°C/3 min and filtration.

L* indicates brightness, where 0 is black and 100 is white. * Hue: 0° angle refers to red, 90° to yellow, 180° to green and 270° to a blue hue;

Table 2. Chemical composition and trypsin inhibitor activity of soymilk (A, B, C, D and E) obtained by different processes

	Soymilk				
	A	B	C	D	E
Protein (g.100 g ⁻¹)	41.49 ± 1.0 ^{b,c}	43.37 ± 1.1 ^{a,b}	44.51 ± 0.1 ^a	46.04 ± 0.5 ^a	39.13 ± 1.8 ^c
Fat (g.100 g ⁻¹)	14.30 ± 1.1 ^b	15.57 ± 2.1 ^b	25.07 ± 1.1 ^a	23.00 ± 0.1 ^a	18.08 ± 0.5 ^b
Ash (g.100 g ⁻¹)	4.62 ± 0.0 ^b	4.95 ± 0.0 ^b	6.17 ± 0.1 ^a	6.31 ± 0.4 ^a	5.80 ± 0.3 ^a
Carbohydrate (g.100 g ⁻¹)	39.59 ± 1.7 ^a	36.11 ± 1.4 ^a	24.25 ± 0.8 ^b	24.66 ± 0.6 ^b	36.99 ± 2.1 ^a
Trypsin inhibitor activity (TUI.mg ⁻¹)	1.39 ± 0.05 ^b	1.37 ± 0.04 ^b	2.59 ± 0.04 ^a	2.66 ± 0.08 ^a	1.43 ± 0.03 ^b

Mean values with the same letter in a line are not significantly different ($p < 0.05$) according to Tukey's test. The results are expressed on a dry basis.

Soymilk A: Soaking at 25°C/12h; drainage; heat treatment at 100°C/10min (0.5 % sodium bicarbonate); drainage; homogenized with distilled water at 90°C/ 3min; filtration and heat treatment at 98°C/10 min.

Soymilk B: Soaking at 100°C/5min (0.25 % sodium bicarbonate); drainage; soaking and drainage repetition; homogenized with distilled water at 90°C/ 3min; filtration and heat treatment at 98°C/20 min.

Soymilk C: Soaking at 5°C/16h; drainage; soaking and drainage repetition; homogenized with distilled water at 25°C/ 3min; filtration and heat treatment at 90°C/30 min.

Soymilk D: Soaking at 5°C/16h; drainage; soaking and drainage repetition; homogenized with distilled water at 25°C/ 3min; heat treatment at 90°C/30 min and filtration.

Soymilk E: Soaking at 40°C/3h (acetate buffer); drainage; soaking and drainage repetition; homogenized with distilled water at 90°C/ 3min; heat treatment at 116°C/3 min and filtration.

Table 3. Isoflavone profile of soymilk (A, B, C, D and E) obtained by different processes

	Soymilk				
	A	B	C	D	E
β-glucosides					
Daidzin	0.50 ± 0.00 ^c	0.65 ± 0.01 ^b	0.44 ± 0.01 ^d	0.31 ± 0.01 ^e	0.79 ± 0.01 ^a
Glicitin	0.21 ± 0.00 ^c	0.26 ± 0.00 ^b	0.22 ± 0.00 ^c	0.18 ± 0.00 ^d	0.30 ± 0.00 ^a
Genistin	0.86 ± 0.01 ^c	1.03 ± 0.00 ^b	0.74 ± 0.01 ^d	0.56 ± 0.00 ^e	1.12 ± 0.02 ^a
Malonylglucosides					
M. Daidzin	0.98 ± 0.01 ^d	1.27 ± 0.01 ^c	1.65 ± 0.03 ^a	1.47 ± 0.00 ^b	0.82 ± 0.01 ^e
M. Glicitin	0.45 ± 0.00 ^d	0.73 ± 0.01 ^c	1.13 ± 0.02 ^a	1.03 ± 0.00 ^b	0.48 ± 0.01 ^d
M. Genistin	2.55 ± 0.04 ^d	2.84 ± 0.02 ^c	3.68 ± 0.06 ^a	3.28 ± 0.02 ^b	1.95 ± 0.02 ^e
Acetylglucosides					
A. Genistin	nd	nd	nd	nd	0.07 ± 0.00 ^a
Aglycones					
Daidzein	nd	nd	0.06 ± 0.00 ^b	0.08 ± 0.00 ^a	nd
Genistein	0.14 ± 0.00 ^b	0.05 ± 0.02 ^c	0.50 ± 0.01 ^a	nd	0.12 ± 0.00 ^b
Total	0.14 ± 0.00 ^b	0.05 ± 0.02 ^b	0.56 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.00 ^{b,c}	0.12 ± 0.00 ^b
Aglycones					
Total	5.69 ± 0.06 ^c	6.83 ± 0.02 ^b	8.42 ± 0.14 ^a	6.21 ± 0.03 ^b	5.67 ± 0.08 ^c
Isoflavones					

Mean values with the same letter in a line are not significantly different ($p < 0.05$) according to Tukey's test. The results of isoflavone content in soymilk are expressed in $\mu\text{mol.g}^{-1}$ (dry basis), nd=not detected.

Soymilk A: Soaking at 25°C/12h; drainage; heat treatment at 100°C/10min (0.5 % sodium bicarbonate); drainage; homogenized with distilled water at 90°C/ 3min; filtration and heat treatment at 98°C/10 min.

Soymilk B: Soaking at 100°C/5min (0.25 % sodium bicarbonate); drainage; soaking and drainage repetition; homogenized with distilled water at 90°C/ 3min; filtration and heat treatment at 98°C/20 min.

Soymilk C: Soaking at 5°C/16h; drainage; soaking and drainage repetition; homogenized with distilled water at 25°C/ 3min; filtration and heat treatment at 90°C/30 min.

Soymilk D: Soaking at 5°C/16h; drainage; soaking and drainage repetition; homogenized with distilled water at 25°C/ 3min; heat treatment at 90°C/30 min and filtration.

Soymilk E: Soaking at 40°C/3h (acetate buffer); drainage; soaking and drainage repetition; homogenized with distilled water at 90°C/ 3min; heat treatment at 116°C/3 min and filtration.

Table 4. Correlation coefficients between physical and chemical properties of the obtained soymilk (A, B, C, D and E) obtained by different processes

	pH	Hue	L*	Viscosity	Protein	Lipids	Ash	Carbohydrate	IT	Daidzin	Glicitin	Genistin	M.Daidzin	M.Glicitin	M.Genistin	A.Genistin	Daidzein	Genistein
pH	1.00	-0.44	-0.64	0.16	-0.08	-0.59	-	0.49	-0.39	-0.18	-0.34	-0.02	-0.18	-0.39	-0.02	-0.54	-0.39	0.01
Hue		1.00	0.56	0.67	-0.60	0.16	0.39	0.08	-0.02	0.34	0.39	0.22	-0.50	-0.31	-0.52	0.85*	-0.05	0.09
L*			1.00	-0.23	0.25	0.91*	0.93*	-0.77	0.78	-0.33	-0.17	-0.46	0.44	0.61	0.40	0.23	0.73	0.53
Viscosity				1.00	-0.95*	-0.62	-0.42	0.79	-0.73	0.68	0.58	0.66	-0.96*	-0.91*	-0.93*	0.74	-0.73	-0.23
Protein					1.00	0.61	0.43	-0.81	0.79	-0.86*	-0.79	-0.85*	0.91*	0.88*	0.91*	-0.79	0.83*	0.08
Lipids						1.00	0.93*	-0.96*	0.94*	-0.56	-0.39	-0.66	0.77	0.89*	0.72	-0.13	0.90*	0.52
Ash							1.00	-0.85*	0.83*	-0.36	-0.19	-0.51	0.54	0.72	0.45	0.17	0.81*	0.28
Carbohydrate								1.00	-0.98*	0.71	0.56	0.78	-0.88*	-0.96*	-0.84*	0.36	-0.96*	-0.39
IT									1.00	-0.79	-0.66	-0.87*	0.84*	0.92*	0.83*	-0.38	0.99*	0.38
Daidzin										1.00	0.98*	0.99*	-0.73	-0.69	-0.80	0.76	-0.83*	-0.13
Glicitin											1.00	0.94*	-0.61	-0.54	-0.70	0.79	-0.71	-0.03
Genistin												1.00	-0.73	-0.73	-0.78	0.64	-0.90*	-0.12
M.Daidzin													1.00	0.97*	0.98*	-0.68	0.81*	0.45
M.Glicitin														1.00	0.93*	-0.51	0.89*	0.42
M.Genistin															1.00	-0.76	0.80	0.49
A.Genistin																1.00	-0.40	-0.12
Daidzein																	1.00	0.24
Genistein																		1.00

*Significant values at $p < 0.01$.

Soymilk A: Soaking at 25°C/12h; drainage; heat treatment at 100°C/10min (0.5 % sodium bicarbonate); drainage; homogenized with distilled water at 90°C/ 3min; filtration and heat treatment at 98°C/10 min.

Soymilk B: Soaking at 100°C/5min (0.25 % sodium bicarbonate); drainage; soaking and drainage repetition; homogenized with distilled water at 90°C/ 3min; filtration and heat treatment at 98°C/20 min.

Soymilk C: Soaking at 5°C/16h; drainage; soaking and drainage repetition; homogenized with distilled water at 25°C/ 3min; filtration and heat treatment at 90°C/30 min.

Soymilk D: Soaking at 5°C/16h; drainage; soaking and drainage repetition; homogenized with distilled water at 25°C/ 3min; heat treatment at 90°C/30 min and filtration.

Soymilk E: Soaking at 40°C/3h (acetate buffer); drainage; soaking and drainage repetition; homogenized with distilled water at 90°C/ 3min; heat treatment at 116°C/3 min and filtration.

Table 5. Sensory acceptance of soymilk (A, B, C, D and E) obtained by different processes

	Soymilk				
	A	B	C	D	E
Color	7.4 ± 1.4 ^a	7.1 ± 1.6 ^a	7.5 ± 1.4 ^a	7.4 ± 1.4 ^a	7.2 ± 1.4 ^a
Flavor	6.3 ± 1.7 ^a	6.4 ± 1.9 ^a	5.8 ± 1.7 ^a	6.3 ± 1.9 ^a	5.7 ± 1.9 ^a
Viscosity	6.3 ± 1.8 ^a	6.4 ± 1.7 ^a	6.7 ± 1.6 ^a	6.8 ± 1.5 ^a	6.7 ± 1.6 ^a
Global acceptance	6.3 ± 1.7 ^a	6.3 ± 1.8 ^a	6.1 ± 1.6 ^a	6.5 ± 1.6 ^a	5.9 ± 1.8 ^a

Mean values with the same letter in a line are not significantly different ($p < 0.05$) according to Tukey's test.

Soymilk A: Soaking at 25°C/12h; drainage; heat treatment at 100°C/10min (0.5 % sodium bicarbonate); drainage; homogenized with distilled water at 90°C/ 3min; filtration and heat treatment at 98°C/10 min.

Soymilk B: Soaking at 100°C/5min (0.25 % sodium bicarbonate); drainage; soaking and drainage repetition; homogenized with distilled water at 90°C/ 3min; filtration and heat treatment at 98°C/20 min.

Soymilk C: Soaking at 5°C/16h; drainage; soaking and drainage repetition; homogenized with distilled water at 25°C/ 3min; filtration and heat treatment at 90°C/30 min.

Soymilk D: Soaking at 5°C/16h; drainage; soaking and drainage repetition; homogenized with distilled water at 25°C/ 3min; heat treatment at 90°C/30 min and filtration.

Soymilk E: Soaking at 40°C/3h (acetate buffer); drainage; soaking and drainage repetition; homogenized with distilled water at 90°C/ 3min; heat treatment at 116°C/3 min and filtration.

5.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2

SOYMILK PROCESSING WITH HIGHER AGLYCONES ISOFLAVONES CONTENT

Tahis Regina Baú e Elza Louko Ida

Situação: Publicado no *Food Chemistry*

1 SOYMILK PROCESSING WITH HIGHER AGLYCONES ISOFLAVONES CONTENT

2
3 BAÚ, T.R¹.; IDA, E. I.^{2*}4
5 ¹Londrina State University, Department of Food Science and Technology, 86051-
6 990, Londrina city, Parana State, Brazil; *email: ¹tahisbau@gmail.com, ²elida@uel.br7
8 ABSTRACT9
10 The objective of this work was to optimise soymilk processing for converting β -
11 glucoside isoflavones to aglycones and evaluating their thermal stability. The soymilk
12 was assessed for the time and temperature effects of incubating supplied to central
13 composite design 2². The response functions were investigated for β -glucosidase
14 activity and isoflavones content. The β -glucosidase activity was reduced through
15 soybean slurry incubation at approximately 64 °C and 3.42 h. The soymilk process
16 that resulted in the maximum conversion of β -glucosides into aglycone isoflavones
17 involved soaking the soybeans at 5 °C for 14 h at a 1:3 ratio (soybean:water; w:v)
18 and homogenising them at a 1:8 ratio (soybean soaked: water; w:v), and the slurry
19 was incubated at 50 °C for 2.7 h. In evaluation of thermal stability of isoflavones in
20 soymilk at 97 °C for 25 min, the daidzein and genistein aglycone contents were
21 maintained, the glycitein and β -glucosides contents increased and the
22 malonylglucoside content decreased.23 Keywords: Soymilk, Aglycone isoflavones, β -glucosidase, Thermal stability.24 _____
25 * Corresponding author. Tel.: +55 43 3371 5971; fax: +55 43 3371 4080

26 E-mail address: elida@uel.br (E. I. IDA).

27 Chemical compounds studied in this article:

28 Daidzin (PubChem CID: 107971); Genistin (PubChem CID: 5281377);
29 Malonyldaidzin (PubChem CID: 53442202); Malonylglicitin (PubChem CID:
30 23724657); Malonylgenistin (PubChem CID: 15934091); Daidzein (PubChem CID:
31 5281708); Glicitein (PubChem CID: 5317750); Genistein (PubChem CID: 5280961).

32

33 1 INTRODUCTION

34

35 Soybeans are appreciated by consumers because of their high protein
36 contents (Liu, 2004) and their bioactive compounds, such as isoflavones, saponins
37 and oligosaccharides. Soybean isoflavones have been widely investigated because
38 they provide benefits to human health in association with the prevention and
39 treatment of some disease types such as cancer, cardiovascular disease, bone loss
40 and relieving the symptoms of menopausal in women (Atteritano et al., 2009; Chan et
41 al., 2007; Liu, 2004). Isoflavones in soybeans occur in four distinct chemical
42 structures known as aglycones (daidzein, genistein and glycitein), β -glucosides
43 (daidzin, genistin and glicitin), 6''-O-acetylglucosides (acetyldaidzin, acetylgenistin
44 and acetylglicitin) and 6''-O-malonylglucosides (malonyldaidzin, malonylgenistin and
45 malonylglicitin) (Liu, 2004; Wang, 2008). In soybeans, aglycone isoflavones are
46 absent or only present at low concentrations (Paucar-Menacho, Berhow, Mandarino,
47 Chang & Mejia, 2010). Aglycone isoflavones have greater beneficial effects than other
48 types of isoflavones on human health (Messina & Messina, 2000). Isoflavones can
49 be converted to different conjugates, which has a significant effect on their
50 bioavailability. Aglycone forms are absorbed more easily than glycosylated
51 conjugates because their low molecular weight improves diffusion (Xu, Wang,

52 Murphy, & Hendrich, 2000). The aglycones in soymilk are more quickly absorbed
53 than the glycosylated forms (Kano, Takayanagi, Harada, Sawada & Ishikawa, 2006).

54 Isoflavones can be converted through the action of β -glucosidase, which
55 catalyses the hydrolysis of β -glucosides into aglycones (Wang & Murphy, 1994). β -
56 glucosidase is naturally present in soybeans and may also be produced by various
57 microorganisms (Yeom, Kim, Kim, & Oh, 2012). Considering the benefits of aglycone
58 isoflavones and the possibility of increasing its content due hydrolysis of β -
59 glucosides, there is growing interest in enriching soy products with aglycones (Chen
60 et al., 2013). Thus, some studies seek alternatives to enrich soy products with
61 aglycones, such as: hydrothermal treatment of soybeans to increase the β -
62 glucosidase activity (Góes-Favoni, Carrão-Panizzi, & Beleia, 2010; Lima & Ida, 2014;
63 Sutil, Mandarin, Laurindo, Benassi, Góes-Favoni & Petrus, 2008); production of soy
64 protein isolate with change in temperature, pH and ionic strength processing to
65 increase isoflavone extraction (Barbosa, Lajolo, & Genovese, 2003); soybean meal
66 fermentation with fungi (Handa, Couto, Vicensoti, Georgetti, & Ida, 2014); soymilk
67 fermentation with lactic acid bacteria (Chun, Kim, & Kim, 2008); soybean extract
68 enriched in β -glucosidase immobilized enzyme (Chen et al, 2013); and addition of
69 soy germ, soy protein isolate and bifidobacteria in soymilk (Tsangalis, Ashton,
70 Stojanovska, Wilcox, & Shah, 2004).

71 Soymilk is a turbid colloidal dispersion that contains part of the original
72 soybean component (Nik, Tosh, Woodrow, Poysa & Corredig, 2009). Soymilk is
73 traditionally obtained after soybean grains are soaked, the water is drained, and the
74 resulting is mixed, filtered and heat-treated (Liu, 2004). Processing conditions can
75 affect the content and composition of isoflavones, especially in the conversion to
76 non-conjugated forms (Kao, Lu, Hsieh, & Chen, 2004; Jung, Murphy & Sala, 2008).

77 Isoflavone content and conversion during processing is directly affected by the
78 chemical structure and other parameters such as the soybean cultivar, pH,
79 temperature and time of soaking and thermal treatment, soybean:water proportion,
80 filtration and factors affecting the β -glucosidase activity (Chun, Kim & Kim, 2008;
81 Ismail & Hayes, 2005; Jung, Murphy & Sala, 2008). Few investigators have proposed
82 modifications in the process to increase the aglycone content by increasing
83 endogenous β -glucosidase activity.

84 Therefore, considering the importance of aglycone isoflavones and the
85 possibility for obtaining soymilk with high aglycone contents by modifying some
86 processing stages, the objective of this work was to optimise soymilk processing to
87 convert β -glucoside isoflavones to aglycones and evaluate their thermal stability.

88

89 2 MATERIALS AND METHODS

90

91 2.1 Materials

92

93 The soymilk was prepared from soybean variety BRS 257 (2011/2012), which
94 is lipoxygenase-free, and it was donated by the Sementes Paraná company (Mauá
95 da Serra city, Parana State, Brazil).

96 For Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) and the
97 construction of calibration curves, the following standard isoflavones were used: 6''-
98 O-acetylglucosides and 6''-O-malonylglucosides (Wako Pure Chemical Industries,
99 Ltd., Osaka, Japan), β -glucosides and aglycones (Sigma-Aldrich Co., St. Louis,
100 EUA). The substrate p-nitrophenyl-b-D-glucopyranoside (p-NPG) (Sigma-Aldrich
101 Co., St. Louis, USA) was used to determine the β -glucosidase activity. The reagents

102 used in the analysis were of analytical grade or specific for liquid chromatography.

103

104 2.2 The effects of temperature and time on β -glucosidase activity and the conversion
105 of β -glucoside isoflavones to aglycones during soymilk processing

106

107 For soymilk processing, the soybeans that had been screened and washed
108 were soaked at a 1:3 ratio (w:v; soybeans:water) at 5 °C for 14 h. The soybeans were
109 drained and rinsed with water and added to distilled water at a ratio of 1:8 (w:v;
110 soybeans soaked: water). The material was homogenised in a blender (Philco All In
111 One, São Paulo, BR) for 2 min at 25 °C to obtain the slurry.

112 To evaluate the temperature (X_1) and time (X_2) effect on the β -glucosidase
113 activity and conversion of β -glucoside isoflavones to aglycones in the soymilk
114 preparation, a central composite design 2^2 (CCD) was applied with 4 axial points and
115 three replicates at the centre point, for a total of 11 randomised experiments. Table 1
116 presents the code and the real levels of independent variables X_1 (temperature, °C)
117 and X_2 (time, h). For each assay, a glass containing 150 mL of slurry was incubated
118 in a bath with orbital agitation at different temperatures ($X_1 = 36, 40, 50, 60$ and 64
119 °C) and times ($X_2 = 0.58, 1, 2, 3$ and 3.42 h) according to the CCD (Table 1). After
120 incubating, the slurry was rapidly cooled in an ice bath, filtered with cloth (150 mesh)
121 and soymilk was obtained. In parallel to the assays, a soymilk control (C) was
122 collected in triplicate, and it was not treated with process variables X_1 (temperature)
123 and X_2 (time). The soymilk was frozen (-26 °C) and lyophilised to evaluate the β -
124 glucosidase activity and isoflavones content. The response functions investigated in
125 soymilk were β -GLU (β -glucosidase activity) and the contents of isoflavones DAI
126 (Daidzin), GEN (Genistin), MDAI (Malonyldaidzin), MGLI (Malonylglicitin), MGEN

127 (Malonylgenistin), ADAI (Daidzein), AGLI (Glycitein) and AGEN (Genistein). Using
128 the response functions, regression analyses were performed to evaluate the effects
129 of the independent variables (x_1 and x_2) and their interactions. An analysis of
130 variance (ANOVA) and regression coefficient of determination (R^2) were performed to
131 check the fit of the model to the experimental data. The function response was
132 adjusted according to the model as follows: $Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 +$
133 $\beta_{12}x_1x_2 + e$, where Y = the function response, x_1 e x_2 = the levels of coded variables,
134 β = estimated coefficients on the response surface and e = pure error. The response
135 surfaces and desirability were analysed to assess the β -glucosidase activity and
136 maximum conversion of β -glucoside isoflavones to aglycones. Calculations, graphs
137 for the construction of the response surfaces and desirability were analysed using
138 Statistic 7.0 software. The proposed model was valid after soymilk processing, in
139 triplicate, at the temperature and time conditions with the maximum conversion of β -
140 glucoside isoflavones to aglycones. The total aglycone content in soymilk was
141 quantified and compared with the response function estimated by the model with
142 Student's t-test ($p < 0.05$).

143

144 2.3 Evaluating the thermal stability of isoflavones from optimised soymilk

145

146 The thermal stability of isoflavones was evaluated after optimised soymilk
147 reaching at 97 ± 2 °C for 0, 5, 10, 15, 20 and 25 min. Glass vials with semi-open
148 cover containing 200 ml of optimised soymilk that was collected in triplicates after
149 thermal treatment were rapidly cooled on ice, frozen and lyophilised to quantify the
150 isoflavone forms. The results were submitted to an analysis of variance (ANOVA) and
151 Tukey's test ($p < 0.05$).

152 2.4 β -glucosidase activity

153

154 β -glucosidase was extracted from 200 mg of soymilk that was lyophilised and
155 added with 3 mL of citrate buffer 0.05 mol.L⁻¹ (pH 4.5) containing NaCl 0.1 mol.L⁻¹
156 and shaken every 15 min for 1 h at 25 °C (Carrão-Panizzi & Bordignon, 2000).
157 Enzyme activity analysis was performed according to Matsuura and Obata (1993),
158 with minor modifications as proposed by Lima and Ida (2014). One activity unit (AU)
159 was defined as the quantity of enzyme necessary to release 1 μ mol of p-nitrophenol
160 per min under the experimental conditions. The results were expressed in UA at g of
161 sample on a dry basis (UA g⁻¹).

162

163 2.5 Isoflavone determinations

164

165 The lyophilised soymilk samples were defatted with hexane (1:10; w:v) at 25
166 °C for 1 h by continuous rotary agitation (150 rpm), and the isoflavone extraction was
167 performed with 300 mg of sample and 6.0 mL of an extraction solution containing
168 ultra-pure water, acetone and ethanol (1:1:1, v/v/v) (Yoshiara, Madeira, Delarozza,
169 Silva & Ida, 2012) at 25 °C for 1 h and agitated by vortex for 15 min each. The
170 mixture was then placed in an ultrasonic bath at 25 °C for 15 min, centrifuged at 794
171 g at 4 °C for 15 min (Eppendorf 5804 R, Hamburg, GE) and filtered (Millex – LH –
172 0.20 μ m).

173 The separation and quantification of isoflavones were realised using Ultra High
174 Performance Liquid Chromatography (UHPLC) as described by Handa, Couto,
175 Vicensoti, Georgetti and Ida (2014). The results are expressed in μ mol of isoflavones
176 per g of sample on a dry basis (μ mol.g⁻¹).

177 3 RESULTS AND DISCUSSION

178

179 3.1 β -glucosidase activity and isoflavone contents in soymilk

180

181 The total isoflavone content of the soymilk control obtained by soaking the
182 grains at 5 °C for 14 h, draining and washing the grains, homogenating them with
183 water at 25 °C and filtering was 8.27 $\mu\text{mol g}^{-1}$ soymilk (Table 1). This result was
184 similar to the result published by Prabhakaran and Perera (2006) who obtained 5.95
185 and 7.96 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of soymilk obtained of by mechanically stripping the soybeans,
186 adding water and grinding at 85 °C, separating the residue, and heat treating at 120
187 °C for 80 s. However, a lower level of total isoflavones of 4.86 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ soymilk was
188 described by Jung, Murphy and Hall (2008), who soaked the grains at room
189 temperature for 12 h and used a homogenisation ratio of 1:8 (soybean grains
190 macerated: water), and then performed filtration and heat treatment at 95 °C for 15
191 min. In processing, the characteristics of raw materials can affect the isoflavones
192 content in soymilk, and Tsangalis, Ashton, Stojanovska, Wilcox and Shah (2004)
193 have developed soymilk from soy germ and soy protein isolate for fermentation, and
194 the soymilk made from soy germ presented isoflavone content about eleven fold
195 higher that soymilk drawn up soy protein isolate.

196 Regarding the β -glucoside isoflavones, the soymilk control contained 0.98
197 $\mu\text{mol daidzin.g}^{-1}$ and 1.04 $\mu\text{mol genistin.g}^{-1}$ soymilk. The malonylglucoside isoflavone
198 contents were 2.18 $\mu\text{mol malonyldaidzin.g}^{-1}$, 0.59 $\mu\text{mol malonylglicitin.g}^{-1}$ and 3.30
199 $\mu\text{malonylgenistin.g}^{-1}$ soymilk. The β -glucoside and malonylglucoside isoflavone
200 contents in the soymilk control (Table 1) was higher than that reported by Jung,
201 Murphy and Hall (2008), who observed 0.29 $\mu\text{mol daidzin.g}^{-1}$, 0.12 $\mu\text{mol glicitin.g}^{-1}$,

202 0.30 $\mu\text{mol genistin.g}^{-1}$, 2.02 $\mu\text{mol malonyldaidzin.g}^{-1}$, 0.25 $\mu\text{mol malonylglicitin.g}^{-1}$ and
203 1.70 $\mu\text{mol malonylgenistin.g}^{-1}$ soymilk. The soymilk control only contained the
204 isoflavone aglycone daidzein, the content of which was 0.18 $\mu\text{mol daidzein.g}^{-1}$
205 soymilk. However, other forms of aglycone isoflavones in soymilk were reported by
206 Jung, Murphy and Sala (2008), who detected 0.16 $\mu\text{mol daidzein.g}^{-1}$, 0.05 μmol
207 glicitein.g^{-1} and 0.12 $\mu\text{mol genistein.g}^{-1}$ soymilk. Because it did not undergo heat
208 treatment, the soymilk control did not contain acetylglucoside isoflavones because
209 these compounds are generally formed under heating conditions (Kao, Lu, Hsieh, &
210 Chen, 2004). The isoflavone content of soy and derivatives such as soymilk depend
211 on the cultivar and processing conditions, such as the time of grain soaking, the
212 soybean: water proportions, grinding, filtration, temperature and time of heat
213 treatment, enzymatic hydrolysis, high pressure and others (Chun, Kim & Kim, 2008;
214 Jung, Murphy & Sala, 2008). Thus, the different processing conditions are important
215 variables for increasing the extraction and profile of different isoflavone forms in
216 soymilk.

217

218 3.2 The effects of temperature and time during soymilk processing on β -glucosidase
219 activity and the conversion of β -glucoside isoflavones to aglycones

220

221 According to the regression analysis and variance (ANOVA), the β -GLU
222 response function (Tables 1 and 2) showed significant linear and quadratic terms for
223 the x_1 variable (temperature). The x_2 variable (time) terms and the interaction ($x_1.x_2$)
224 were not significant and were maintained because of the contribution within the
225 equation for the adjusted model as follows: $\beta\text{-GLU} = 0.023 - 0.027x_1 + 0.021x_1^2 -$
226 $0.011x_2 + 0.008x_2^2 - 0.018x_1.x_2$. The β -GLU response function had a coefficient of

227 determination (R^2) of 0.87, indicating that the estimated model adequately fit the
228 experimental data. There is a reduction in the enzyme activity in the β -GLU response
229 surface (Fig. 1a), possibly because of an inactivation that occurred when the
230 temperature (X_1) and time (X_2) approached 64 °C and 3.42 h of slurry incubation,
231 respectively. Furthermore, according to Esen (2003), a reduction of β -glucosidase
232 activity may occur under some processing conditions or inhibition due of the products
233 formed during hydrolysis, such as glucose and aglycones. According to Matsuura
234 and Obata (1993), the β -glucosidase of soybeans was inactivated at 60 °C, whereas
235 the maximum activity in soymilk was observed at 45 °C. In soybeans and their
236 products, the optimal temperature of β -glucosidase activity was described as
237 approximately 50 °C (Góes-favoni, Carrão-Panizzi & Beleia, 2010; Wardhiani,
238 Vásquez & Pandiella, 2008), and the optimal pH was between 5.0 and 7.0 (Matsuura
239 & Obata, 1993; Sutil, Mandarino, Laurindo, Benassi, Góes-Favoni & Petrus, 2008).
240 The pH of all soymilk obtained in this study was 6.8 ± 0.2 , therefore the enzyme is at
241 its optimal pH of activity.

242 According to the regression analysis and variance (ANOVA), the DAI and GEN
243 response functions (Tables 1 and 2) showed significant linear and quadratic terms for
244 the x_1 variable (temperature), and the x_2 variable (time) and its interaction ($x_1.x_2$) was
245 not significant ($p > 0.05$). However, because of the contribution from the model fit, the
246 terms were maintained in the equations as follows: $DAI = 0.0 + 0.266x_1 + 0.220x_1^2 +$
247 $0.030x_2 + 0.060x_1.x_2$ and $GEN = 0.196 + 0.159x_1 + 0.240x_1^2 + 0.011x_2 + 0.005x_2^2 +$
248 $0.04.x_1.x_2$. The DAI and GEN response functions exhibited coefficients of
249 determination (R^2) of 0.97 and 0.90, respectively, indicating that the estimated model
250 adequately fit the experimental data. The DAI and GEN response surface (Fig. 1b
251 and 1c) indicated a tendency to reduce the daidzin and genistin contents between -1

252 and 0 temperature (x_1) or between 40 and 50 °C, respectively. These results
253 indicated that there was a greater conversion of β -glucosides in aglycone isoflavones
254 within this temperature range. Moreover, (Fig. 1a and 1b) indicated that a reduction
255 in the β -glucoside content occurred within this temperature range and after a longer
256 incubation period (3.42 h), indicating a possible action by endogenous β -glucosidase
257 from soybean. Kao, Lu, Hsieh, and Chen (2004) observed that the β -glucoside
258 content of soybeans that were soaked at 45 °C was also reduced when the time was
259 increased with a consequent increase in the corresponding aglycone isoflavones.
260 Lima and Ida (2014) observed lower β -glucosides and higher aglycone isoflavone
261 contents in soybeans soaked at 55 °C for 6 h because of the β -glucosidase activity.
262 The results of this study confirmed that samples treated at approximately 50 °C
263 showed higher enzyme activity and that β -glucoside isoflavones were the primary
264 substrates for enzyme performance involving conversions into aglycones.

265 According to the regression analysis and variance (ANOVA) to MDAI, the
266 MGLI and MGEN response functions (Tables 1 and 2) showed significant linear x_1
267 and x_2 variables. The equations for these analyses were as described: $MDAI = 1.907$
268 $- 0.203x_1 - 0.052x_1^2 - 0.139x_2 - 0.077x_1.x_2$; $MGLI = 0.562 - 0.067x_1 - 0.011x_1^2 -$
269 $0.038x_2 - 0.003x_2^2 - 0.027x_1.x_2$ and $MGEN = 2.965 - 0.272x_1 - 0.234x_2 - 0.128x_1.x_2$.
270 The MDAI, MGLI and MGEN response functions showed coefficients of
271 determination (R^2) of 0.96, 0.95 and 0.96, respectively, indicating that the estimated
272 model adequately fit the experimental data. In MDAI (Fig. 1d), MGLI (Fig. 1e) and
273 MGEN (Fig. 1f), the response surface showed a tendency to reduce the
274 malonylglucoside content when the temperature ($X_1= 64$ °C) and time ($X_2=3.42$ h)
275 increased for the incubating slurry, most likely because of the conversion of
276 malonylglucosides into β -glucoside isoflavones (Fig. 1). This conversion was most

277 likely not caused by β -glucosidase activity, and this enzyme reportedly did not
278 hydrolyse sugar that was esterified to malonyl or acetyl groups (Barbosa, Lajolo, &
279 Genovese, 2006; Ismail & Hayes, 2005). Furthermore, malonylglucoside degradation
280 may occur with an increased temperature and time of incubation because of its
281 conversion into aglycone or β -glucosides in soybeans that were soaking at 45 °C
282 (Kao, Lu, Hsieh, & Chen, 2004). The thermal instability of malonylglucosides was
283 also observed in temperatures near those used in this study, as in soybeans soaking
284 at 41-69 °C (Lima & Ida, 2014) and the production of isoflavone-rich soy protein
285 isolates at 45-60 °C (Barbosa, Lajolo, & Genovese, 2006).

286 According to the regression analysis and variance (ANOVA) to ADAI and
287 AGEN responses functions (Tables 1 and 2), there were significant linear and
288 quadratic terms for the x_1 variable (temperature), and the x_2 variable (time) terms
289 were not significant ($p > 0.05$), but were kept in the model. The x_1 (temperature) and
290 x_2 (time) variables showed significant effects for the AGLI response function (Tables
291 1 and 2). The interaction between temperature and time variables ($x_1.x_2$) was not
292 significant for response functions ADAI, AGLI and AGEN. The equations were as
293 follows: ADAI = $1.219 - 0.211x_1 - 0.181x_1^2 + 0.025x_2 - 0.052x_2^2$; AGLI = $0.207 -$
294 $0.022x_1 - 0.044x_1^2 + 0.018x_2 - 0.007x_2^2$; and AGEN = $1.382 - 0.146x_1 - 0.248x_1^2 +$
295 $0.076x_2$. The ADAI, AGLI and AGEN response functions had coefficients of
296 determination (R^2) of 0.90, 0.95 and 0.90, respectively, indicating that the estimated
297 model adequately fit the experimental data. In ADAI, AGLI and AGEN, the response
298 surface (Fig. 2a, 2b and 2c) had a region of maximum conversion for β -glucosides
299 into aglycone isoflavones. The ADAI response surface (Fig. 2a) showed that the
300 daidzein content increased at temperatures of approximately 43 °C and 2 h of slurry
301 incubation. For AGLI (Fig. 2b) and AGEN (Fig. 2c), a higher content was observed at

302 50 °C for 3.42 h. According to Matsuura, Obata and Fukushima (1989) and
303 Pandjaitan and Hettiarachy and Ju (2000), the ideal condition of β -glucosidase
304 activity occurs at 50 °C and, under this condition, the β -glucosidic bonds are
305 hydrolysed to release glucose and aglycones. Other studies have also investigated
306 the obtain of higher isoflavones aglycones content in some of the previous steps to
307 obtain soymilk, as Lima and Ida (2014) found that higher levels when soybean
308 soaked at 55 °C for 6 h. Góes-Favoni, Carrão-Panizzi, and Beleia (2010) indicate the
309 soybeans soaking at 50 °C for 12 h to increased formation of aglycones. These
310 studies also used endogenous β -glucosidase, but not prepared soymilk from
311 soybeans with higher aglycones content. Furthermore, during soymilk processing
312 significant losses of isoflavones may occur, including soaking, filtration and heat
313 treatment steps (Jackson et al., 2002). Some studies have evaluated the degradation
314 and conversion of isoflavones in soymilk (Jackson et al., 2002; Wang & Murphy,
315 1996), however, in the literature there is no optimization descriptions of the soymilk
316 processing.

317 This investigation of soymilk processing to produce higher total aglycone
318 contents used a combined response optimisation in Statistic software, largely to
319 determine desirability. Thus, when $x_1=0$ or $X_1=50$ °C and $x_2=0.707$ or $X_2=2.70$ h
320 occurred, there was a maximum conversion of β -glucosides to aglycones ($2.92 \mu\text{mol}$
321 $\text{total aglycones.g}^{-1}$). The proposed model was valid under the condition for the
322 maximum conversion, and the results were experimentally determined and showed
323 no significant differences. The soymilk present $2.90 \pm 0.28 \mu\text{mol total aglycones.g}^{-1}$
324 and this equals 13.99 mg total aglycones in 200 mL of soymilk portion. Therefore, a
325 simple modification of soymilk incubation at 50 °C for 2.7 h yielded isoflavone
326 aglycone contents that were 16.2 times higher than those of the soymilk control. This

327 process would be of great interest to the food industry because aglycones have been
328 highlighted for their high biological activity, including potential anticarcinogen and
329 antioxidant activity, and for use in the prevention and treatment of hormonal
330 disorders (Arora, Nair, & Strasburg, 1998; Messina & Messina, 2000).

331

332 3.3 Evaluating the thermal stability of isoflavones from optimised soymilk

333

334 The total isoflavone contents of optimised soymilk were not significantly
335 different in times of heat treatment at 97 °C in 5-25 min (Table 3), which indicates
336 that the isoflavones have been converted and not degraded. Drying soybeans using
337 infrared emissions at 50, 70, 130 and 150 °C showed that isoflavones are generally
338 more susceptible to conversion than they are under thermal degradation (Niamnuay,
339 Nachaisin, Poomsa-Ad, & Devahastin, 2012).

340 The β -glucoside daidzin was not detected in optimised soymilk that was
341 treated at 97 °C for 10 min, whereas treating for 15 to 25 min increased the content
342 by 1.46 times. However, the β -glucoside genistein was detected when treated at 97
343 °C for only 5 min, and treating for 5 to 25 min increased the content by 2.45 times.
344 The malonyldaidzin and malonylglicitin isoflavone contents at time 0 min was $1.54 \pm$
345 $0.05 \mu\text{mol.g}^{-1}$ and $0.46 \pm 0.01 \mu\text{mol.g}^{-1}$ soymilk, respectively. The malonyldaidzin and
346 malonylglicitin contents for soymilk treated for 0, 5 and 10 min at 97 °C did not differ
347 amongst themselves, but at 15 and 20 min decrease of 0.77 and 0.82 times occurred
348 up to 25 min, respectively. The malonylgenistin isoflavone content of optimised
349 soymilk at time 0 min was $2.48 \pm 0.10 \mu\text{mol.g}^{-1}$ soymilk. However, samples treated for
350 0, 5 and 10 min at 97 °C did not differ, but there was a reduction at 15 min that
351 continued to decrease by 0.85 times in 20 and 25 min. Therefore, it is confirmed that

352 the malonylglucoside isoflavones are thermally unstable at 97 °C. A
353 malonylglucoside content reduction was also described after the thermal treatment of
354 soymilk at 95 °C for 7 min by Wang and Murphy (1996). The same was also
355 observed in soybean grains and soymilk that was heat treated by Jackson et al.
356 (2002), Kao, Lu, Hsieh, and Chen (2004) and Mahungu, Diaz-Mercado, Li, Schwek,
357 Singletary and Faller (1999), who reported that the ester linkages of
358 malonylglucosides may be cleaved, giving rise to the corresponding β -glucosides.
359 The malonylglucoside content reduction can also be attributed to its conversion to
360 aglycone or β -glucoside forms no due to β -glucosidase action (Kao, Lu, Hsieh, &
361 Chen, 2004; Xu, Sam, & Chang, 2008). When optimised and treated at 97 °C, the
362 soymilk did not experience malonylglucoside decarboxylation to their corresponding
363 acetyl derivatives (Table 3), as observed by Coward, Barnes, Setchell and Barnes
364 (1993) and Mahungu, Diaz-Mercado, Li, Schwek, Singletary and Faller (1999).
365 Moreover, according to Kao, Lu, Hsieh, and Chen (2004), acetylglucosides are
366 generally formed by dry heat.

367 In optimised soymilk that was treated at 97 °C for 5 min, the daidzein and
368 genistein aglycone isoflavone contents increased 1.19 and 1.13 times, respectively,
369 and did not differ during other heat treatment times. The glycitein aglycone isoflavone
370 content at 97 °C increased by 1.27 times in 5 min and did not in differ at 20 and 25
371 min. Optimised soymilk samples that were subjected to heat treatment did not exhibit
372 β -glucosidase activity; however, there may have been little β -glucosidase activity
373 from 0 to 5 min before the heat inactivation could occur. Thus, the increased glycitein
374 content at 25 min may have been caused by a reduction in the malonylglicitin
375 content. These results confirm data described by Chien, Hsieh, Kao and Chen (2005)
376 and Jung, Murphy and Sala (2008), who showed that the malonylglucosides at high

377 temperatures of 200 °C and 95 °C were converted directly into aglycone isoflavones.
378 Similar results were reported by Kao, Lu, Hsieh, and Chen (2004) in soymilk treated
379 at 100 °C for 10, 20 and 30 min in which the aglycone content did not change, but
380 there was a decreased malonylglucoside content and increased β -glucoside content.
381 However, Huang, Liang and Kwok (2006) subjected soymilk to 95 °C for 60 min, and
382 the daidzein content decreased by 23 % and the genistein and glicitein contents
383 remained the same.

384 The total isoflavone content of optimised soymilk at time zero was 7.71 ± 0.26
385 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ soymilk at 97 °C and did not differ with increases of 1.11 times at 5, 10, 15,
386 20 and 25 min. This increase in total isoflavone content can be explained by the soy
387 isoflavones when associated with globular proteins in relation to their stability during
388 processing and their extraction capacity as influenced by protein denaturation
389 (Achouri, Boye, & Belanger, 2005; Nufer, Ismail, & Hayes, 2009), and the level of
390 protein denaturation is also influenced by the temperature and time of process. In
391 high temperatures, the dissociation of the protein-isoflavone interaction can occur
392 with the release of isoflavones in the extracting solvent and consequently increases
393 the isoflavone content (Nufer, Ismail, & Hayes, 2009).

394

395 4 CONCLUSIONS

396

397 The β -glucosidase activity was reduced in response to a soybean slurry
398 incubation of approximately 64 °C and 3.42 h. The soymilk process with the
399 maximum conversion of β -glucosides into aglycone isoflavones occurred when the
400 soybeans were soaked at 5 °C for 14 h in a 1: 3 ratio (soybean: water; w:v),
401 homogenised in a 1:8 ratio (soybean macerated: water; w:v), and the slurry was

402 incubated at 50 °C for 2.7 h. In evaluation of thermal stability of isoflavones in
403 soymilk at 97 °C for 25 min, the daidzein and genistein aglycone contents were
404 maintained, the glycitein and β -glucosides contents increased and the
405 malonylglucoside content decreased.

406

407 ACKNOWLEDGEMENTS

408

409 This work was partially funded by the Fundação Araucária/CNPq, PRONEX
410 Program. EII would like to thank CNPq Research Fellow.

411

412 DECLARATION OF INTEREST

413

414 The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible
415 for the content and writing of the paper.

416

417 REFERENCES

418

419 Achouri, A., Boye, J. I., & Belanger, D. (2005). Soybean isoflavones: efficacy of
420 extraction conditions and effect of food type on extractability. *Food Research*
421 *International*, 38, 1199–1204.

422 Arora, A., Nair, M. G., & Strasburg, G. M. (1998). Antioxidant activities of isoflavones
423 and their biological metabolites in a liposomal system. *Archives of Biochemistry and*
424 *Biophysics*, 356, 133-141.

- 425 Atteritano, M., Mazzaferro, S., Frisina, A., Cannata, M. L., Bitto, A., D'anna, R.,
426 Squadrito, F., Macrì, I., Frisina, N., & Buemi, M. (2009). Genistein effects on
427 quantitative ultrasound parameters and bone mineral density in osteopenic
428 postmenopausal women. *Osteoporosis International*, 20 (11), 1947-54.
- 429 Barbosa, A.C.L., Lajolo, F.M., & Genovese, M.I. (2006). Influence of temperature, pH
430 and ionic strength on the production of isoflavone-rich soy protein isolates. *Food*
431 *Chemistry*, 98 (4) 757-766.
- 432 Carrão-Panizzi, M. C., & Bordignon, J. R. (2000). Activity of beta-glucosidase and
433 levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment.
434 *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35, 873-878.
- 435 Chan, Y.H., Lau, K-K., Yiu, K-H., Li, S-W., Chan, H-T., Tam, S., Shu, X-O., Lau, C-P.,
436 & Tse, H-F (2007). Isoflavone intake in persons at high risk of cardiovascular events:
437 implications for vascular endothelial function and the carotid atherosclerotic burden.
438 *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86, 938-945..
- 439 Chen, K.-I., Lo, Y.-C., Liu, C.-W., Yu, R.-C., Chou, C.-C., & Cheng, K.-C. (2013)
440 Enrichment of two isoflavone aglycones in black soymilk by using spent coffee
441 grounds as an immobiliser for b-glucosidase. *Food Chemistry*, 139, 79-85.
- 442 Chien, J.T., Hsieh, H.C., Kao, T.H., & Chen, B.H. (2005). Kinetic model for studying
443 the conversion and degradation of isoflavones during heating. *Food Chemistry*, 91,
444 425 -434.

- 445 Chun, J., Kim, J.S., & Kim, J.H. (2008). Enrichment of isoflavone aglycones in
446 soymilk by fermentation with single and mixed cultures of *Streptococcus infantarius*
447 12 and *Weissella* sp. *Food Chemistry*, 109 (2), 278-284.
- 448 Coward, L., Barnes, N. C., Setchell, K. D.R., & Barnes, S. (1993). Genistein
449 daidzein, and their β -glucoside conjugates: Antitumor isoflavones in soy-bean foods
450 from American and Asian diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41 (11),
451 1961-1967.
- 452 Esen, A. (2003). β -glucosidase. In J. R. Whitaker, A. G. J. Vorgen, D. W. S. Wong
453 (Eds.), *Handbook of Food Enzymology* (pp. 774-786). New York: Marcel Dekker Inc.
- 454 Góes-Favoni, S.P., Carrão-Panizzi, M.C., & Beleia, A. (2010). Changes of isoflavone
455 in soybean cotyledons soaked in different volumes of water. *Food Chemistry*, 119,
456 1605–1612.
- 457 Handa, C.L., Couto, U.R., Vicensoti, A.H., Georgetti, S.R., & Ida, E.I. (2014).
458 Optimisation of soy flour fermentation parameters to produce β -glucosidase for
459 bioconversion into aglycones. *Food Chemistry*, 152, 56–65.
- 460 Huang, H., Liang, H., & Kwok, C-K. (2006). Effect of thermal processing on genistein,
461 daidzein and glycitein content in soymilk. *Journal of the Science of Food and*
462 *Agriculture*, 86, 1110–1114.
- 463 Ismail, B., & Hayes, K. (2005). β -Glycosidase activity towards different glycosidic
464 forms of isoflavones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4918–4924.
- 465 Jackson, C.J.C., Dini, J.P., Lavandier, C., Rupasinghe, H.P.V., Faulkner, H., Poysa,
466 V., Buzzell, D., & DeGrandis, S. (2002). Effects of processing on the content and

- 467 composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Process*
468 *Biochemistry*, 37, 1117 – 1123.
- 469 Jung, S., Murphy, P., & Sala, I. (2008). Isoflavone profiles of soymilk as affected by
470 high-pressure treatments of soymilk and soybeans. *Food Chemistry*, 111, 592–598.
- 471 Kano M, Takayanagi T, Harada K, Sawada S, & Ishikawa F. (2006). Bioavailability of
472 isoflavones after ingestion of soy beverages in healthy adults. *Journal of Nutrition*,
473 136 (9), 2291-2296.
- 474 Kao, T.H., Lu, Y.F., Hsieh, H.C., & Chen, B.H. (2004). Stability of isoflavone
475 glucosides during processing of soymilk and tofu. *Food Research International*, 37,
476 891–900.
- 477 Lima, F.S., & Ida, E.I. (2014). Optimisation of soybean hydrothermal treatment for the
478 conversion of b-glucoside isoflavones to aglycones. *LWT - Food Science and*
479 *Technology*, 56, 232-239.
- 480 Liu, K. (2004). *Soybeans as functional foods and ingredients*. Champaign: AOCS
481 Press.
- 482 Mahungu, Sm., Diaz-Mercado, S., Li, J., Schwenk, M., Singletary, K., & Faller, J.
483 (1999) Stability of isoflavones during extrusion processing of corn/soy mixture.
484 *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 279–284.
- 485 Matsuura, M., & Obata, A. (1993). D-glucosidases from soybeans hydrolyse daidzin
486 and genistin. *Journal Food Science*, 58, 144–147.

- 487 Matsuura, M., Obata, A., & Fukushima, D. (1989). Objectionable flavor of soy milk
488 developed during the soaking of soybeans and its control. *Journal Food Science*, 54,
489 602–605.
- 490 Messina, M., & Messina, V. (2000). Soyfoods, soybean isoflavones, and bone health:
491 a brief overview. *Journal of Renal Nutrition*, 10, 63–68.
- 492 Niamnuy, C., Nachaisin, M., Poomsa-Ad, N., & Devahastin, S. (2012). Kinetic
493 modelling of drying and conversion/degradation of isoflavones during infrared drying
494 of soybean. *Food Chemistry*, 133, 946-952.
- 495 Nik, A.M., Tosh, S.M., Woodrow, L., Poysa, V., & Corredig, M. (2009). Effect of soy
496 protein subunit composition and processing conditions on stability and particle size
497 distribution of soymilk. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 1245-1252.
- 498 Nufer, K.R., Ismail, B., & Hayes, K.D. (2009). The effects of processing and
499 extraction conditions on content, profile, and stability of isoflavones in a soymilk
500 system. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 1213-1218.
- 501 Pandjaitan, N., Hettiarachy, N., & Ju, Z.Y. (2000). Enrichment of genistein in soy
502 protein concentrate with β -glucosidase. *Journal of Food Science*, 65, 401-407.
- 503 Paucar-Menacho, L. M., Berhow, M. A., Mandarino, J. M. G., Chang, Y. K., & Mejia,
504 E. G. (2010). Effect of time and temperature on bioactive compounds in germinated
505 Brazilian soybean cultivar BRS 258. *Food Research International*, v. 43, n. 7, p.
506 1856-1865.

- 507 Prabhakaran, M. P., & Perera, C.O. (2006). Effect of extraction methods and UHT
508 treatment conditions on the level of isoflavones during soymilk manufacture. *Food*
509 *Chemistry*, 99, 231– 237.
- 510 Sutil, G. A., Mandarino, J. M., Laurindo, J. B., Benassi, V., Góes-Favoni, S., &
511 Petrus, J. C. C. (2008). Effect of hydrothermal treatment and pH on the formation of
512 aglycones in soybean. *European Food Research Technology*, 227, 1729-1731.
- 513 Tsangalis, D., Ashton, J.F., Stojanovska, L., Wilcox, G., & Shah, N. P. (2004).
514 Development of an isoflavone aglycone-enriched soymilk using soy germ, soy protein
515 isolate and bifidobacteria. *Food Research International*, v. 37, n. 4, p. 301–312.
- 516 Wang, H., & Murphy, P.A. (1994). Isoflavone Composition of American and Japanese
517 Soybeans in Iowa: Effects of Variety, Crop Year, and Location. *Journal of Agriculture*
518 *and Food Chemistry*, 42(8), 1674–1677.
- 519 Wang, H., & Murphy, P.A. (1996). Mass balance study of isoflavones during soybean
520 processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2377–2383.
- 521 Wang, T. (2008). Minor Constituents and Phytochemicals of Soybeans. In: L.A.
522 Johnson, P.J. White, R. Galloway (Eds.), *Soybeans: Chemistry, Production,*
523 *Processing, and Utilization* (pp. 297-330). Urbana: AOCS Press.
- 524 Wardhani, D. H., Vazquez, J. A., & Pandiella, S. S. (2008). Kinetics of daidzin and
525 genistin transformations and water absorption during soybean soaking at different
526 temperatures. *Food Chemistry*, 111, 13-19.

- 527 Xu, X., Wang, H. J., Murphy, P. A., & Hendrich, S. (2000). Neither background diet
528 nor type of soy food affects short-term isoflavone bioavailability in women. *Journal of*
529 *Nutrition*, 130, 798–801.
- 530 Xu, B., Sam, K., & Chang, C. (2008). Total phenolics, phenolic acids, isoflavones,
531 and anthocyanins and antioxidant properties of yellow and black soybeans as
532 affected by thermal processing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56,
533 7165–7175.
- 534
- 535 Yeom, S.J., Kim, B.N., Kim, Y.S., & Oh, D.K. (2012). Hydrolysis of isoflavone
536 glycosides by a thermostable β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*. *Journal of*
537 *Agriculture and Food Chemistry*, 60 (6), 1535-1541.
- 538
- 539 Yoshiara, L. Y., Madeira, T. B., Delaroza, F., Silva, J. B., & Ida, E. I. (2012).
540 Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-
541 centroid mixture design. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 9, 978-
542 986.

Figures Caption

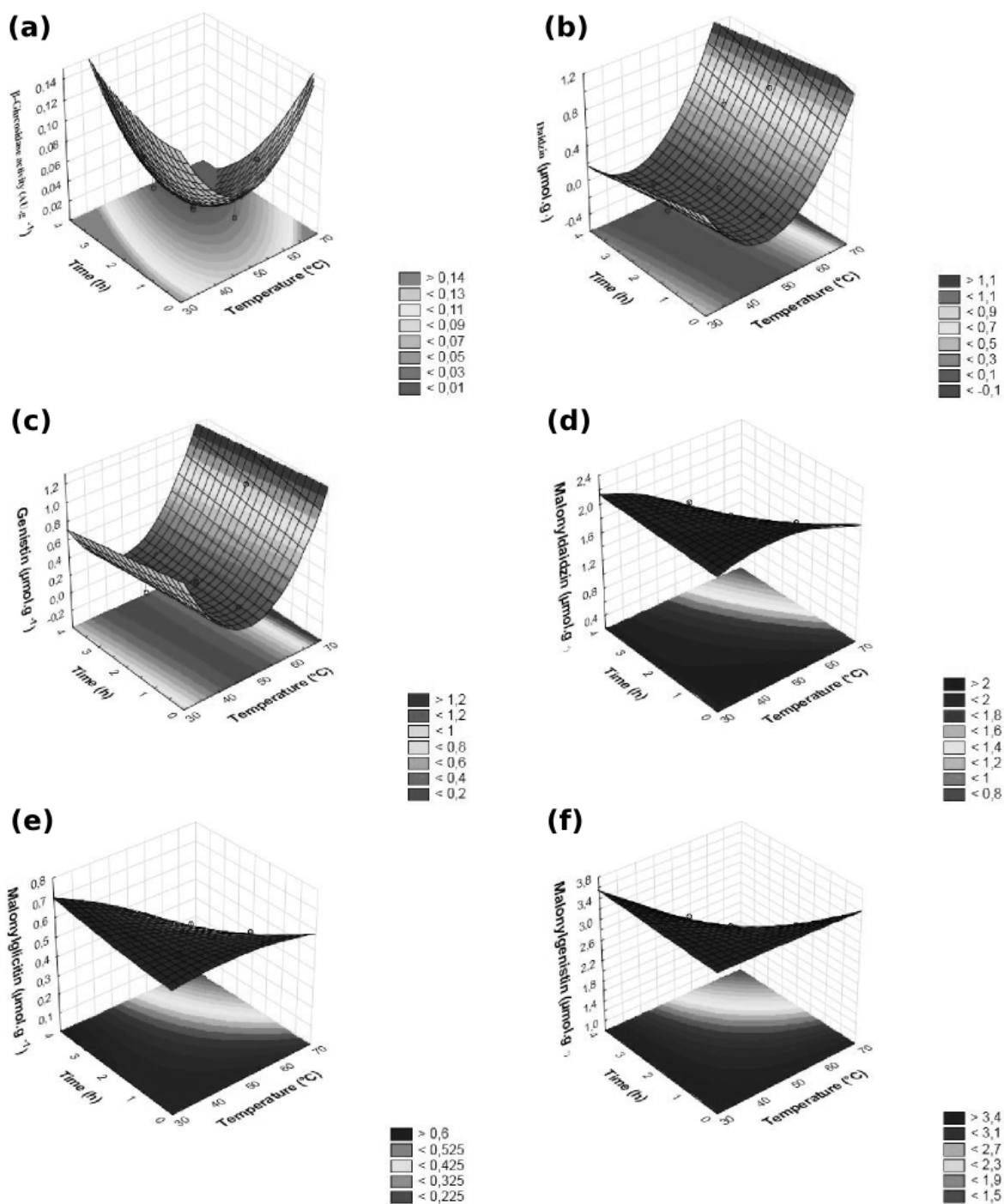


Figure 1. Response surfaces as a function of time and temperature in soymilk treatment: (a) β -GLU (β -glucosidase activity), (b) DAI (Daidzin), (c) GEN (Genistin), (d) MDAI (Malonyldaidzin), (e) MGLI (Malonylglicitin) and (f) MGEN (Malonylgenistin).

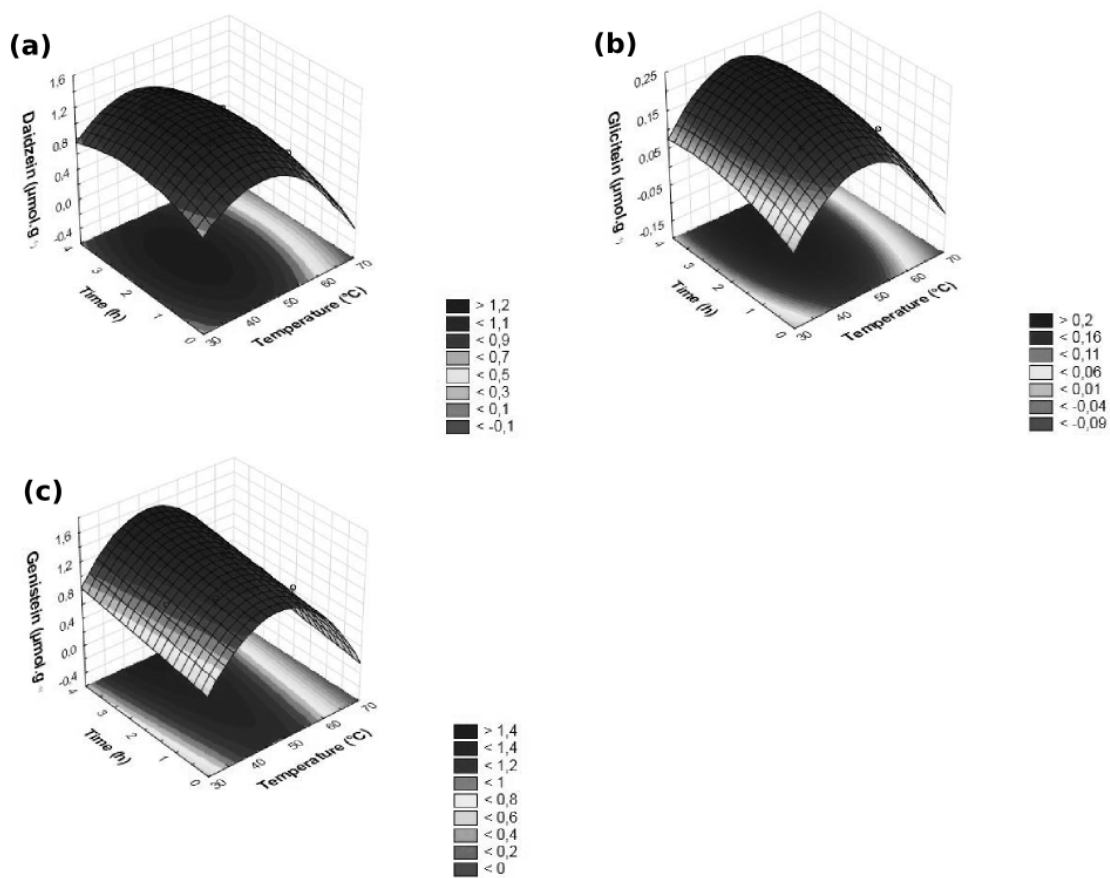


Figure 2. Response surfaces as a function of time and temperature in soymilk treatment: (a) ADAI (Daidzein), (b) AGLI (Glicitein), and (c) AGEN (Genistein).

Table 1. The central composite design 2² (CCD) with the coded and real levels for the independent variables and response functions

Assays	Independent variables and coded levels		Response functions*								
	x ₁ (X ₁)	x ₂ (X ₂)	β-GLU (AU.g ⁻¹)	DAI (μmol.g ⁻¹)	GEN (μmol.g ⁻¹)	MDAI (μmol.g ⁻¹)	MGLI (μmol.g ⁻¹)	MGEN (μmol.g ⁻¹)	ADAI (μmol.g ⁻¹)	AGLI (μmol.g ⁻¹)	AGEN (μmol.g ⁻¹)
01	-1 (40)	-1 (1)	0.087	0.00	0.37	2.08	0.63	3.28	1.33	0.17	1.33
02	-1 (40)	1 (3)	0.097	0.00	0.35	1.90	0.59	3.00	1.27	0.19	1.30
03	1 (60)	-1 (1)	0.072	0.32	0.43	1.89	0.58	3.09	0.76	0.13	0.99
04	1 (60)	1 (3)	0.010	0.56	0.57	1.40	0.43	2.30	0.83	0.14	1.00
05	-1.41 (35.86)	0 (2)	0.093	0.00	0.34	2.17	0.65	3.46	1.03	0.15	1.05
06	+1.41 (64.14)	0 (2)	0.009	0.88	1.04	1.51	0.42	2.55	0.55	0.08	0.68
07	0 (50)	-1.41 (0.58)	0.038	0.00	0.23	2.08	0.60	3.27	0.98	0.15	1.09
08	0 (50)	+1.41 (3.42)	0.013	0.00	0.21	1.76	0.52	2.70	1.12	0.23	1.53
09	0 (50)	0 (2)	0.030	0.00	0.18	1.92	0.56	2.98	1.14	0.21	1.40
10	0 (50)	0 (2)	0.019	0.00	0.21	1.94	0.56	3.00	1.27	0.21	1.43
11	0 (50)	0 (2)	0.021	0.00	0.20	1.91	0.56	2.98	1.25	0.21	1.41
C**	-	-	0.054	0.98	1.04	2.18	0.59	3.30	0.18	0.00	0.00

x₁ and x₂ are the coded levels of the X₁ (temperature in °C) and X₂ (time in h) independent variables

*Response functions: β-GLU (β-glucosidase activity), DAI (Daidzin), GEN (Genistin), MDAI (Malonyldaizin), MGLI (Malonylglicitin), MGEN (Malonylgenistin), ADAI (Daidzein), AGLI (Glicitein) and AGEN (Genistein)

** Control soymilk = the central composite design was not applied

Table 2. An analysis of variance (ANOVA) for the models obtained by applying response surface methodology to the experimental data

Variation source	Degrees of freedom	β -GLU		DAI		GEN		MDAI		MGLI	
		SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value
X ₁	1	0.006	17.56*	0.564	118.487*	0.202	14.933*	0.329	75.701*	0.036	68.518*
X ₁ ²	1	0.002	7.11*	0.273	57.400*	0.326	24.156*	0.019	4.253	0.000	1.079
X ₂	1	0.000	2.75	0.007	1.512	0.001	0.077	0.157	36.168*	0.011	21.953*
X ₂ ²	1	0.000	1.08	0.000	0.000	0.000	0.013	0.001	0.379	0.000	0.066
X ₁ . X ₂	1	0.001	3.74	0.014	3.024	0.006	0.474	0.024	5.521	0.003	5.787
Error	5	0.001		0.024		0.067		0.021		0.003	
Total	10	0.012		0.909		0.629		0.551		0.053	
Variation source	Degrees of freedom	MGEN		ADAI		AGLI		AGEN			
		SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value	SS	F-value		
X ₁	1	0.592	72.239*	0.355	30.071*	0.004	24.583*	0.171	13.896*		
X ₁ ²	1	0.001	0.071	0.186	15.728*	0.011	69.996*	0.376	30.511*		
X ₂	1	0.439	53.624*	0.005	0.438	0.002	16.153*	0.046	3.729		
X ₂ ²	1	0.002	0.275	0.016	1.325	0.001	1.798	0.006	0.519		
X ₁ . X ₂	1	0.065	7.929*	0.003	0.285	0.000	0.389	0.000	0.033		
Error	5	0.041		0.059		0.001		0.062			
Total	10	1.140		0.608		0.018		0.667			

x₁ and x₂ are the coded levels of the X₁ (temperature in °C) and X₂ (time in h) independent variables. SS = Sum square

*significant ($p < 0.05$).

Table 3. The effect of a thermal treatment at $97 \pm 2^\circ\text{C}$ on soymilk with maximum isoflavone aglycone contents

Time (min)	Daidzin	Genistin	Malonyldaidzin	Malonylglicitin	Malonylgenistin	Daidzein	Glicitein	Genistein	Total Isoflavones
0	0.00 ± 0.00^d	0.00 ± 0.00^f	$1.54 \pm 0.05^{a, b}$	$0.46 \pm 0.01^{a, b}$	$2.48 \pm 0.10^{a, b}$	1.38 ± 0.03^b	0.22 ± 0.01^c	1.52 ± 0.02^b	7.71 ± 0.26^b
5	0.00 ± 0.00^d	0.29 ± 0.01^e	1.59 ± 0.01^a	0.48 ± 0.00^a	2.66 ± 0.02^a	1.63 ± 0.02^a	0.26 ± 0.00^b	1.73 ± 0.02^a	8.68 ± 0.10^a
10	0.00 ± 0.00^d	0.40 ± 0.00^d	1.47 ± 0.01^b	0.45 ± 0.00^b	2.47 ± 0.01^b	1.63 ± 0.01^a	0.26 ± 0.00^b	1.72 ± 0.01^a	8.41 ± 0.05^a
15	0.37 ± 0.01^c	0.51 ± 0.00^c	1.35 ± 0.01^c	0.42 ± 0.00^c	2.29 ± 0.01^c	1.63 ± 0.01^a	0.26 ± 0.00^b	1.71 ± 0.01^a	8.58 ± 0.05^a
20	0.45 ± 0.00^b	0.60 ± 0.00^b	1.29 ± 0.01^c	0.40 ± 0.00^c	$2.19 \pm 0.01^{c, d}$	1.67 ± 0.00^a	0.26 ± 0.00^b	1.73 ± 0.00^a	8.59 ± 0.02^a
25	0.54 ± 0.01^a	0.71 ± 0.00^a	1.19 ± 0.01^d	0.38 ± 0.00^d	2.03 ± 0.02^d	1.66 ± 0.02^a	0.28 ± 0.00^a	1.73 ± 0.02^a	8.57 ± 0.12^a

The results for isoflavone contents in soymilk were expressed in $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ (d.b.). Mean values with the same letter in a row are not significantly different ($p < 0.05$) according to Tukey's test.

5.3 ARTIGO CIENTÍFICO 3

**KEFIR CULTURE FOR SOYMILK FERMENTATION AND OLIGOSACCHARIDE
AND β -GLUCOSIDE ISOFLAVONE HYDROLYSIS**

Tahis Regina Baú, Sandra Garcia e Elza louko Ida

Situação: Submetido ao *International Journal of Food Science and Nutrition*

1 **KEFIR CULTURE FOR SOYMILK FERMENTATION AND OLIGOSACCHARIDE**
2 **AND β -GLUCOSIDE ISOFLAVONE HYDROLYSIS**

3
4 BAÚ, T.R.¹; GARCIA, S.²; IDA, E. I. ^{3*}

5
6 ^{1,2,3}Londrina State University, Department of Food Science and Technology, 86051-
7 990, Londrina City, Parana State, Brazil; email: ¹tahisbau@gmail.com,
8 ²sgarcia@uel.br, ³elida@uel.br. *Correspondent author

9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24 *Corresponding author. Tel.: +55 43 3371 5971; fax: +55 43 3371 4080

25 E-mail address: elida@uel.br (E. I. IDA).

26 **Keywords:** Bioconversion, probiotic, aglycone isoflavones, raffinose, stachyose.

27

28 **Abstract**

29

30 The objective of this study was to apply kefir culture to soymilk fermentation and to
31 evaluate oligosaccharide and β -glucosides isoflavones hydrolysis. Soymilk was
32 fermented with kefir culture at 25 °C for 30 h. The counts of lactic acid bacteria,
33 *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* sp and yeasts; measurements of pH, acidity, α -
34 galactosidase and β -glucosidase activity, as well sugar and isoflavone contents were
35 performed at intervals of 2.5 h to 15 h, from 15 to 30 h, in 5 h intervals. In the
36 fermented soymilk, α -galactosidase was produced, with 100 % raffinose and 92 %
37 stachyose hydrolysis being observed after the depletion of galactose, glucose and
38 sucrose. Kefir culture showed a good ability to hydrolyse β -glucosides in fermented
39 soymilk, resulting in 100 % bioconversion of glycitin and daidzin and 89 %
40 bioconversion of genistin into the corresponding aglycones.

41

42 **Introduction**

43

44 The consumption of soybeans and their derivatives provides benefits to
45 human health due to the presence of proteins, isoflavones, oligosaccharides, and
46 other constituents (Shao and Oszmianski, 2009). The oligosaccharides raffinose and
47 stachyose are not digested in the human intestinal tract because of the absence of α -
48 galactosidase (Donkor et al. 2008). These sugars are metabolised by bacteria in the
49 large intestine, resulting in the formation of gas, causing undesirable discomfort
50 (Tsangalis and Shah, 2004). Moreover, the use of probiotic micro-organisms that are

51 able to use the raffinose and stachyose can confer upon oligosaccharides prebiotic
52 properties. In fermented soymilk, certain types of micro-organisms that produce α -
53 galactosidase and are able to hydrolyse raffinose and stachyose may be used
54 (Marazza et al. 2009; Scalabrini et al. 1998).

55 Isoflavones occur in soybeans in four distinct chemical structures, known as
56 aglycones (daidzein, genistein and glycitein), β -glucosides (daidzin, genistin and
57 glicitin), 6''-O-acetylglucosides (acetyldaidzin, acetylgenistin and acetylglicitin) and
58 6''-O-malonylglucosides (malonyldaidzin, malonylgenistin and malonylglicitin) (Liu,
59 2004; Wang, 2008). Aglycone isoflavones have greater beneficial effects on human
60 health than other types of isoflavones (Messina and Messina, 2000). Aglycone forms
61 are absorbed more easily than glycosylated conjugates because their low molecular
62 weight improves diffusion and absorption in the human body (Izumi et al. 2000;
63 Zheng et al. 2003; Zubik e Meydani, 2003; Xu et al. 2000). Isoflavones can be
64 converted through the action of β -glucosidase, which catalyses the hydrolysis of β -
65 glucosides into aglycones (Wang and Murphy, 1994). β -glucosidase is naturally
66 present in soybeans and may also be produced by various microorganisms (Yeom et
67 al. 2012) to obtain fermented soymilk with a high aglycones content.

68 Hydrolysis of isoflavones, raffinose and stachyose is observed in soymilk
69 fermented by lactic bacteria producing the enzymes β -glucosidase and α -
70 galactosidase (Chun et al. 2007; Donkor et al. 2008; Marazza et al. 2009; Pyo et al.
71 2005; Rekha and Vijayalakshmi, 2011; Scalabrini et al. 1998; Wang et al. 2003).
72 Among the microorganisms used in soymilk fermentation, those employed in kefir
73 culture can be highlighted, which consist of a bacteria and yeast mixture that can be
74 used for acid and alcohol fermentation (Baú et al. 2013). The kefir microorganisms
75 co-exist in a symbiotic association and confer on these cultures beneficial properties

76 such as antimicrobial, anti-inflammatory, healing and anti-allergic effects (Lee et al.
77 2007; Rodrigues et al. 2005). In addition, some kefir microorganisms are resistant to
78 bile salts and low pH levels and exhibit adhesion properties and the capacity to inhibit
79 some intestinal pathogens, which confers potential probiotic properties on kefir
80 (Romanin et al. 2010). Soymilk is a suitable substrate for the development of kefir
81 culture (Baú et al. 2014), though there is no literature addressing the fermentation of
82 soymilk with kefir culture to achieve oligosaccharide and β -glucoside isoflavone
83 hydrolysis. Therefore, the objective of this study was to apply kefir culture to soymilk
84 fermentation and evaluate oligosaccharides and β -glucosides isoflavones hydrolysis.

85

86 **Materials and methods**

87

88 **Materials**

89

90 Soymilk was prepared from the soybean variety BRS 257 of 2011/2012, which
91 is lipoxygenase-free and was donated by the Sementes Paraná company (Mauá da
92 Serra city, Parana State, Brazil).

93 For ultra high-performance liquid chromatography (UHPLC) and the
94 construction of calibration curves, the following standard isoflavones were used: 6''-
95 O-acetylglucosides and 6''-O-malonylglucosides (Wako Pure Chemical Industries,
96 Ltd., Osaka, Japan), β -glucosides and aglycones (Sigma-Aldrich Co., St. Louis,
97 USA). For high-performance ion exchange chromatography (HPAEC) and the
98 construction of calibration curves, the following standard sugars were used:
99 galactose, glucose, fructose, sucrose, raffinose and stachyose (Sigma-Aldrich Co.,
100 St. Louis, USA). The substrates p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside and p-nitrofenil-

101 α -D-galactopiranosídeo (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) were employed to
102 determine β -glucosidase and α -galactosidase activity, respectively. The reagents
103 used in the analysis were of analytical grade or specific for liquid chromatography.

104 For fermentation, a lyophilised kefir starter culture (Sacco®-Lyofast TM 036
105 LV) composed of a mixed stock of *Lactococcus lactis* spp *lactis*, *Lactococcus lactis*
106 spp *lactis diacetylactis*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc* spp and *Saccharomyces*
107 *cerevisiae* was used.

108

109 Soymilk preparation

110

111 Soymilk was prepared after soybean screening and washing. Soybeans at a
112 ratio of 1:3 (w:v; soybean grains: water) were soaked at 5 °C for 14 h, then drained
113 and rinsed in water. The soaked soybeans were mixed with distilled water soybeans
114 in a ratio of 1:8 and homogenised in a blender (Philco All In One, Brazil) for 2 min at
115 25 °C. The slurry was filtered (150 mesh) and subjected to heat treatment at 97 ± 2
116 °C for 15 min, and soymilk was obtained.

117

118 Application of kefir culture for soymilk fermentation

119

120 Kefir culture (0.02 UC/L) was applied to the soymilk at 25°C, followed by
121 fermentation at 25 °C for 30 h in BOD incubator. At 15 h, samples were collected at
122 2.5 h intervals and, from 15 to 30 h, in 5 h intervals. In the soymilk control, kefir
123 culture was not applied.

124

125

126 Determination of cell viability

127

128 Cell counts for lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis* (Irigoyen et al. 2005),
129 *Leuconostoc* spp and yeast (Fontán et al. 2006) were carried out, and the results
130 were expressed as log CFU.g⁻¹ of the fermented product.

131

132 Determination of pH and acidity

133

134 The pH of the fermented products was determined with a digital potentiometer
135 (Hanna Instruments HI 223, USA). The lactic acid content was measured via titration
136 with NaOH (0.1 mol/L) and expressed in g lactic acid per 100 g of sample.

137

138 Determination of α -galactosidase and β -glucosidase activity

139

140 The enzyme α -galactosidase was extracted according Shankar and Mulimani
141 (2007) with some modifications. Enzyme extraction was performed with 500 mg of
142 fermented soymilk, which was lyophilised and treated with 5.0 mL of 0.2 M sodium
143 acetate buffer (pH 4.8), with shaking at 200 rpm (Marconi MA570, São Paulo, BR)
144 every 1 h at room temperature. The extract was centrifuged (2070 g, 4 °C for 10 min)
145 (Eppendorf 5804 R, Hamburg, GE), and the supernatant was filtered (Millex filter 0.45
146 μ m). The filtrate was used for the determination of α -galactosidase activity according
147 to Scalabrini et al. (1998). One activity unit (AU) was defined as the quantity of
148 enzyme necessary to release 1 μ mol of p-nitrophenol per min under the experimental
149 conditions. The results were expressed in AU per g of sample on a dry basis (AU.g⁻¹).

150 β -glucosidase was extracted from 200 mg of soymilk that was lyophilised and
151 treated with 3 mL of 0.05 mol.L⁻¹ citrate buffer (pH 4.5) containing 0.1 mol.L⁻¹ NaCl,
152 with shaking every 15 min for 1 h at 25°C (Carrão-Panizzi and Bordingnon, 2000).
153 Enzyme activity analysis was performed according to Matsuura and Obata (1993),
154 with minor modifications as proposed by Lima and Ida (2014), with the realization of
155 color control. One activity unit was defined as the quantity of enzyme necessary to
156 release 1 μ mol of p-nitrophenol per min under the experimental conditions. The
157 results were expressed in AU per g of sample on a dry basis (AU. g⁻¹).

158

159 Determination of sugar contents

160

161 The lyophilised soymilk samples were defatted with hexane (1:10; w:v) at 25
162 °C for 1 h via continuous rotary agitation (150 rpm). For sugar extraction, 1 g of a
163 sample and 40.0 mL of 80 % ethanol were utilised, which were homogenised in a
164 Turrax (Marconi MA102, Sao Paulo, BR) at speed 5 for 2 min. The mixture was
165 centrifuged at 10414 g for 10 min at 25°C (Eppendorf 5804 R, Hamburgo, GE) and
166 then filtered (Millex – LH – 0.20 μ m). A 0.5 mL aliquot of the filtrate was evaporated
167 under nitrogen (2 psi), followed by resuspension in 20 mL of ultra-pure water (18.2
168 M Ω cm). The solution was filtered again and analysed.

169 Sugar separation and quantification were carried out through HPAEC. Aliquots
170 of 10 μ L of the resuspended extract were automatically injected into a chromatograph
171 (Thermo Scientific ICS 5000, Dionex Canadá Ltda, Oakville, Canadá) with a
172 CarboPac[®] PA1 column (250 mm x 4 mm, 10 μ m particle size), preceded by a
173 CarboPac[®] PA1 guard column (50 mm x 4 mm) with the same packing material, and
174 equipped with a gradient pump (Model SP-5), using pulsed amperometric detection

175 (PAD, cell with disposable working gold electrode and pH-Ag/AgCl reference
176 electrode, Dionex/Thermo Scientific). For the elution gradient, ultra-pure water (18.2
177 MΩ cm, eluent A) and 0.25 mol.L⁻¹ NaOH (eluent B) were used, at a flow rate of 1.0
178 mL.min⁻¹ at 30 °C. The elution gradient started with 93.2 % eluent A and 6.8 % eluent
179 B for 8 min. From 8 min to 35 min, the gradient elution ratio reached 56 % eluent A
180 and 44 % eluent B, with the sugars being separated according to their retention time.
181 The transition of elution conditions from 56 % eluent A and 44 % eluent B gradient to
182 20 % eluent A and 80 % eluent B gradient occurred in 1 minute. These conditions
183 were maintained for 10 min to remove impurities. New transition conditions from
184 gradient elution with 20 % eluent A and 80 % eluent B to 93.2 % eluent A and 6.8 %
185 eluent B occurred within 1 minute. These conditions were maintained for 15 min to
186 stabilise the spine and apply the sample. The polypropylene bottles containing the
187 mobile phases were continuously pressurised with nitrogen gas to minimise the
188 development and interaction of carbon dioxide from the air. A quadruple potential
189 waveform was applied (E = potential, t = duration) using the following settings: E₁ =
190 +0.1 V, t₁ = 400 ms; E₂ = -2.0 V, t₂ = 20 ms; E₃ = +0.6, t₃ = 10 ms; E₄ = -0.10, t₄ = 70
191 ms. Integration occurred from 200 ms to 400 ms during the application of E₁. External
192 calibrations were prepared from standard solutions of galactose, glucose, fructose,
193 sucrose, raffinose and stachyose sugars to identify their respective retention times.
194 Carbohydrate standards were also used to identify the different sugars on the basis
195 of their retention times. Furthermore, each sample was spiked with carbohydrate
196 standards and run separately to confirm its identity. Chromatogram analysis was
197 carried out using Chromeleon version 6.8 software (Dionex Corporation). The sugar
198 contents were expressed in g per 100 g of sample on a dry basis (g.100 g⁻¹).
199

200 Determination of isoflavone contents

201

202 The lyophilised soymilk samples were defatted with hexane (1:10; w:v) at 25
203 °C for 1 h via continuous rotary agitation (150 rpm), and isoflavone extraction was
204 performed using 300 mg of sample and 6.0 mL of an extraction solution containing
205 ultra-pure water, acetone and ethanol (1:1:1, v/v/v) (Yoshiara et al. 2012) at 25 °C for
206 1 h, with agitation by vortexing every 15 min. The mixture was subsequently placed in
207 an ultrasonic bath at 25 °C for 15 min, centrifuged at 794 g at 4 °C for 15 min
208 (Eppendorf 5804 R, Hamburg, GE) and filtered (Millex – LH – 0.20 µm).

209 The separation and quantification of isoflavones were realised using ultra high-
210 performance liquid chromatography (UHPLC), as described by Handa et al. (2014).
211 The results were expressed in µmol of isoflavones per g of sample on a dry basis
212 (µmol.g⁻¹).

213

214 Data analysis

215

216 Analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test ($p < 0.05$) were performed
217 using Statistica 7.0 software.

218

219 **Results and discussion**

220

221 Microorganism counts, pH and acidity in soymilk fermented with kefir culture

222

223 The lactic acid bacteria counts in soymilk fermented at 25 °C (Figure 1)
224 increased from 7.64 log CFU.g⁻¹ to 9.07 log CFU.g⁻¹ after 15 h of fermentation. The

225 multiplication of these micro-organisms in the fermentation medium did not require an
226 induction period (lag phase). Soymilk fermented with lactic acid bacteria presented
227 counts of 7 to 9 log CFU.g⁻¹ (Chun et al. 2007; Marazza et al. 2009). Soymilk
228 fermented with kefir culture at 25 °C for 15 h with the addition of sucrose showed a
229 similar lactic acid bacterial count (Baú et al. 2014). In milk fermented with kefir grains
230 at 25 °C for 18 h and 24 h, the count of total lactic acid bacteria increased by 2 log
231 units, reaching 10 log CFU.g⁻¹ (Leite et al. 2013). However, Montanucci et al. (2012)
232 reported 13 log CFU.g⁻¹ in fermented whole milk with the same commercial culture of
233 kefir. This difference in counts between the maximum values in the soymilk and milk
234 can be attributed to the limiting characteristics of the soymilk, which does not contain
235 lactose as a carbon source for microorganisms, in addition to the fact that the kefir
236 culture used in this study is commercial.

237 After 2.5 h of incubation of the soymilk fermented at 25 °C (Figure 1), the
238 *Lactococcus lactis* count increased from 7.70 log CFU.g⁻¹ to 8.48 log CFU.g⁻¹ and
239 was maintained in this interval for 30 h of fermentation. Soymilk with added sucrose
240 fermented with kefir culture at 25 °C for 15 h showed a similar *Lactococcus lactis*
241 count (9.12 log CFU.g⁻¹) (Baú et al. 2014). *Lactococcus lactis* is a probiotic
242 microorganism, and under Brazilian legislation (Brazil, 2007), a fermented product
243 must exhibit a minimum count of 6 log CFU.g⁻¹.

244 At 7.5 h, in the soymilk fermented at 25 °C (Figure 1), the *Leuconostoc* sp
245 count increased from 7.28 log CFU.g⁻¹ to 8.26 log CFU.g⁻¹ and was maintained for 30
246 h of fermentation. For multiplication of these microorganisms in the fermentation
247 medium, 2.5 h of adaptation was required before the initiation of multiplication.
248 Similar counts of *Leuconostoc* sp (8.89 log CFU.g⁻¹) were obtained in soymilk
249 fermented with kefir (Baú et al. 2014).

250 The yeast count in soymilk fermented for 7.5 h at 25 °C reached a maximum
251 of 6.83 log CFU.g⁻¹ and then decreased to 6.01 log CFU.g⁻¹ after 30 h of
252 fermentation. However, in milk fermented with kefir grains, Leite et al. (2013)
253 observed that the yeast count peaked at 7.8 log CFU.g⁻¹ at 24 h of fermentation.
254 These differences can be attributed to the composition of yeasts between different
255 crops and substrates. Additionally, it was noted that the counts of lactic acid bacteria,
256 *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc* sp and yeasts (Figure 1) after the exponential
257 growth phase remained stable or slightly decreased. The highest counts of
258 microorganisms (Figure 1) follow the specifications of the FAO/WHO (2003),
259 recommending that kefir beverages must submit scores from 7 to 4 log CFU.g⁻¹ of
260 total lactic acid bacteria and yeast, respectively.

261 To control the end of the process, the pH of the fermented soymilk was
262 measured periodically. The soymilk with kefir culture exhibited an initial pH of 6.55,
263 which dropped to pH 4.97 after 25 h of fermentation (Figure 2). The initial acidity of
264 the soymilk fermented (Figure 2) with kefir culture was 0.19 g lactic acid.100 g⁻¹, and
265 12.5 h after fermentation, the content reached 0.34 g lactic acid.100 g⁻¹ (Figure 2). In
266 milk fermented with kefir grains, Leite et al. (2013) quantified and detected the
267 presence of lactic, acetic, citric, propionic and butyric acids and found that lactic acid
268 was predominant. Marazza et al. (2009) used *Lactobacillus rhamnosus* for soymilk
269 fermentation at 37 °C and observed that between 6 and 12 h, there was a greater
270 reduction in pH. However, soymilk with added sucrose fermented with kefir culture at
271 25 °C for 15 h showed a pH of 4.36 (Baú et al. 2014). This difference in pH in the
272 soymilk fermented with kefir culture was due to the addition of sucrose, which is
273 metabolised by micro-organisms (Zhao and Shah, 2014), whereas in milk fermented
274 with kefir grains at 25°C for 24 h, a pH of 4.85 was obtained (Leite et al. 2013). The

275 acid content in fermented soymilk increased up to 24 h (Marazza et al. 2009).
276 However, the acid content was higher (0.45 g lactic acid.100 g⁻¹) in soymilk
277 fermented with kefir culture at 25 °C for 15 h with the addition of sucrose (Baú et al.
278 2014). Rekha and Vijayalakshmi (2011) observed an acid content between 0.11 and
279 0.92 % for soymilk fermented for 48 h at 37 °C with *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L.*
280 *casei*, *L. plantarum* and *L. fermentum*.

281 In soymilk fermented with kefir culture, a decrease in pH and an increase in
282 lactic acid production were observed (Figure 2), which occurred in the exponential
283 growth phase, within 10 h of fermentation. During fermentation, the observed
284 decrease in pH was due to the growth of bacteria and lactic acid production (Lucey,
285 2001), and acid accumulation in the soymilk resulted in a decrease in microbial
286 growth (McCann et al. 2011). Soymilk fermented with different lactic acid bacteria
287 showed similar profiles regarding acid production and the growth of micro-organisms
288 (Donkor et al. 2008; Pham and Shah, 2008).

289

290 α -galactosidase activity and sugar content in soymilk fermented with kefir culture

291

292 Raffinose and stachyose can be hydrolysed by α -galactosidase produced by
293 some lactic acid bacteria (Wang et al. 2003). The reduction of the raffinose and
294 stachyose contents of the fermented soymilk (Table 1) indicated that the kefir culture
295 micro-organisms produced the α -galactosidase enzyme, which hydrolysed
296 oligosaccharides into simpler sugars that were consequently metabolised. These
297 results were confirmed (Figure 3 and Figure 4A) via observation of α -galactosidase
298 activity in the fermented soymilk, which ranged from 0.005 to 0.016 AU.g⁻¹ extract.
299 Furthermore, it was observed that α -galactosidase showed a maximum activity of

300 0.016 AU.g⁻¹ after 10 h of fermentation, which was when the decrease in
301 oligosaccharides began. Donkor et al. (2008) fermented soymilk with lactic acid
302 bacteria and also observed that after the exponential growth phase (10 h), α -
303 galactosidase activity was reduced. The control soymilk (without the addition of kefir
304 culture) showed no α -galactosidase activity or reduced sugar content, confirming that
305 the kefir culture microorganisms were responsible for these reductions. However,
306 Scalabrini et al. (1998) found that some lactic acid bacteria in yogurt do not
307 metabolise raffinose and stachyose in soymilk, due to the absence of α -
308 galactosidase production.

309 The contents of galactose, glucose, fructose, sucrose, raffinose and stachyose
310 in fermented soymilk (Table 1) were quantified via HPAEC (Figure 3). Low galactose,
311 glucose and fructose contents were observed, with the galactose content being
312 decreased 1.1 fold at 2.5 h, and galactose was not detected from 5 h of fermentation
313 onward. The glucose content decreased 5.8 fold in 10.0 h, and glucose was not
314 detected from 12.5 h of fermentation onward. However, the fructose content had
315 increased by 3 fold at 7.5 h and decreased by 10 fold at 15 h compared to 7.5 h of
316 fermentation, and fructose was not detected from 20 h of fermentation onward. The
317 increase in the fructose content observed after the initiation of fermentation was
318 associated with the hydrolysis of sucrose to glucose and fructose their release, with
319 the micro-organisms initially using glucose, followed by fructose. The sucrose content
320 was reduced 7.0 fold at 7.5 h, and sucrose was not detected from 10 h of soymilk
321 fermentation onward. It is noteworthy that in fermented soymilk, the kefir culture
322 micro-organisms initially use simple sources of carbon, such as galactose and
323 glucose, followed by sucrose and fructose. The raffinose content remained constant
324 up to 5 h and was reduced 128 fold at 20 h, and raffinose was not detected at 30 h of

325 fermentation. The stachyose content of the fermented soymilk remained constant at
326 7.5 h and was reduced 12.8 fold at 30 h of fermentation. The present study
327 demonstrated that the use of the oligosaccharides raffinose and stachyose from
328 soymilk occurred only after 7.5 and 10 h of fermentation at 25°C, respectively, which
329 coincided with decreases in the total consumption of glucose and sucrose (Table 1).
330 However, Wang et al. (2003) observed that in the soymilk fermented for up to 32 h
331 with lactic acid bacteria, hydrolysis of stachyose, raffinose and sucrose occurred, with
332 increased contents of galactose monosaccharides, glucose and fructose being
333 observed.

334

335 β -glucosidase activity and isoflavone contents in soymilk fermented with kefir culture

336

337 β -glucosidase is the enzyme responsible for catalysing the hydrolysis of β -
338 glucosides to aglycone isoflavones (Esaki et al. 2004). In soymilk fermented with kefir
339 culture, conversion of β -glucosides to aglycone isoflavones was detected (Figure
340 4B), confirming β -glucosidase production. Enzyme activity increased during the
341 exponential growth phase and was maximal ($0.0164 \text{ AU}\cdot\text{g}^{-1}$) at 12.5 h, followed by a
342 reduction thereafter. It was observed that in this fermentation period, there was a
343 higher rate of β -glucosidase activity and subsequent hydrolysis of β -glucosides to
344 aglycone isoflavones. This finding was confirmed by Chien et al. (2006) in soymilk
345 fermented with *Streptococcus thermophiles* BCRC 14085, *Lactobacillus*
346 *acidophilus* BCRC 14079, *Bifidobacterium infantis* BCRC 14633 and *B. longum* B6.

347 In the hydrolysis of β -glucosides to aglycone, glucose is released. However,
348 no increase in glucose was detected (Table 1), possibly due to the use of kefir culture
349 microorganisms. In soymilk fermented with several species of *Lactobacillus*, Rekha

350 and Vijayalakshmi (2011) also reported that most β -glucosidase activity occurred in
351 the exponential growth phase, followed by a significant decrease in the stationary
352 phase. Furthermore, Marazza et al. (2009) observed that in soymilk, when *L.*
353 *ramnhosus* was used, increased β -glucosidase activity occurred in the exponential
354 growth phase. In the interval between 10.0 and 12.5 h of fermentation (Figure 4B),
355 maximum β -glucosidase activity was detected, and within 15 hours, there was a
356 dramatic reduction in activity. In parallel with the activity of β -glucosidase, there was
357 an increase in genistein and daidzein contents, and the presence of glycitein was
358 detected (Table 2). It is noteworthy that in the soymilk fermented with kefir culture,
359 the growth of lactic acid bacteria was intense in the log phase (10 h) and resulted in
360 increased activity of β -glucosidase, which was also observed by Rekha and
361 Vijayalakshmi (2011). In soymilk fermented with *Lactobacillus*, Pham and Shah
362 (2008) observed higher isoflavone conversion within 12 h of fermentation, followed by
363 a decrease after this period.

364 The contents of the different forms of isoflavones were quantified via UPLC in
365 fermented soymilk (Table 2). The daidzin and glycitin isoflavone β -glucoside content
366 was reduced at 5 h, and these isoflavones were not detected from 7.5 h of
367 fermentation onward. Furthermore, the isoflavone genistin was predominant (1.50
368 $\mu\text{mol.g}^{-1}$), and its content remained 8.8 fold at 30 h of fermentation compared with the
369 beginning of fermentation. The rate of reduction of the isoflavone β -glucoside content
370 of soymilk fermented with kefir was higher at 5.0 and 7.5 h of fermentation (Table 2).
371 Marazza et al. (2009) also observed a greater reduction of soymilk β -glucosides in
372 the range 6-9 h of soymilk fermentation with *L. rhamnosus*. However, soymilk
373 fermented with different lactic acid bacteria species showed a greater reduction β -
374 glucosides after 6 h of fermentation with *Lactobacillus paraplantarum* KM,

375 *Enterococcus durans* KH, *Streptococcus salivarius* HM and *Weissella confusa* JY
376 (Chun et al. 2007).

377 At 7.5 h in soymilk fermented with kefir culture, 100 % bioconversion of the
378 isoflavones daidzin and glycitin was observed. However, at 30 h of fermentation, 89
379 % bioconversion of genistin was recorded. Similar results were obtained by Chun et
380 al. (2007), who reported that soymilk fermented with lactic acid bacteria showed 90 %
381 and 100 % bioconversion for daidzein and genistein, respectively. However, Pyo et
382 al. (2005) observed 100% bioconversion of daidzein and genistein in soymilk
383 fermented with isolated strains of *L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *B. brevis*
384 and *B. thermophilum*.

385 The contents of the isoflavones malonyldaidzin and malonylglycitin in
386 fermented soymilk were reduced from 1.1 to 1.0 fold, respectively, within 30 h of
387 fermentation. In the fermented soymilk, predominance of the isoflavone
388 malonylgenistin was observed ($3.84 \mu\text{mol.g}^{-1}$), and its content had decreased 1.1 fold
389 at 30 h of fermentation. This small reduction in the contents of malonylglycoside
390 isoflavones (5 to 8 %) in soymilk fermented with kefir culture for 30 h may have been
391 due to their instability and conversion to the corresponding β -glucosides. Ismail and
392 Hayes (2005) confirmed that the patterns of malonylglycoside isoflavones were not
393 optimal as substrates for β -glucosidase action, and when subjected to a temperature
394 of 37 °C, they were degraded approximately 4 to 8 % between 4 and 24 h. The
395 malonylglycoside content was reduced (Table 2), likely due to conversion to β -
396 glucosides, which in turn, were hydrolysed due to the action of β -glucosidase
397 produced by the kefir culture and converted into aglycones. In soymilk fermented with
398 kefir culture the presence of acetylglucosides was not detected.

399 The aglycone isoflavone glycitein (Table 2) was not detected in the soymilk
400 from 0 to 10 h of fermentation, and its content then increased by 1.8 fold compared to
401 10 h of fermentation. The content of the aglycone isoflavone daidzein had increased
402 9.0 fold at 10 h fermentation, while the genistein content had increased 4.8 fold at 20
403 h of fermentation. Pyo et al. (2005) observed that in soymilk fermented with isolated
404 strains of *L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *B. breve* and *B. thermophilum*,
405 the total amount of aglycone isoflavones increased 7.1 fold.

406 In the soymilk fermented with kefir culture at 25 °C for 30 h, the total content of
407 aglycone isoflavones was 3.62 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$, while that of the control soymilk was only
408 0.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$. This result also confirmed that the micro-organisms present in the kefir
409 culture produced β -glucosidase, which was responsible for the conversion of β -
410 glucosides to aglycone isoflavones. Therefore, it was found that kefir culture has a
411 strong ability to hydrolyse β -glucosides in fermented soymilk and produce a high
412 aglycone content, which is beneficial to the health of consumers.

413

414 **Conclusion**

415

416 In the soymilk fermented at 25 °C for 30 h, α -galactosidase was produced,
417 with 100 % raffinose and 92 % stachyose hydrolysis being observed after the
418 depletion of galactose, glucose and sucrose. Kefir culture showed a strong ability to
419 hydrolyse β -glucosides in fermented soymilk, resulting in 100 % bioconversion of
420 glycitin and daidzin and 89 % bioconversion of genistin into the corresponding
421 aglycones.

422

423 **Acknowledgments**

424

425 This work was partially funded by the Fundação Araucária/CNPq, PRONEX
426 Program. EII would like to thank CNPq Research Fellowship.

427

428 **Declaration of interest**

429 The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible
430 for the content and writing of the paper.

431

432 **References**

433

434 Baú TR, Garcia S, Ida EI (2013). Optimization of a fermented soy product formulation
435 with a kefir culture and fiber using a simplex-centroid mixture design. *Int. J. Food Sci.*
436 *Nutr.* 64 (8): 929-935.

437 Baú TR, Garcia S, Ida EI (2014). Evaluation of a functional soy product with addition
438 of soy fiber and fermented with probiotic kefir culture. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 57
439 (3): 402-409.

440 Brazil (2007). Ministry of Health. National Health Surveillance Agency. Foods with
441 claims and functional properties or health, novel foods / ingredients, bioactive
442 substances and. Updated in August 2007. IX - List of approved claims for functional
443 properties.<http://anvisa.gov.br/alimentos/comissões/tecnologia/tecnologia_lista_alega.htm>
444 Accessed 18.07.2010.

445 Carrão-Panizzi MC, Bordignon JR (2000). Activity of beta-glucosidase and levels of
446 isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. *Pesq. Agrop.*
447 *Bras.* 35: 873-878.

- 448 Chien HI, Huang HY, Chou CC (2006). Transformation of isoflavone phytoestrogens
449 during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food
450 Microbiol. 23: 772-778.
- 451 Chun J, Kim G, Lee K, Choi D, Kwon GH, Park JY, Jeong SJ, Kim JS, Kim JH
452 (2007). Conversion of isoflavone glucosides to aglycones in soymilk by fermentation
453 with lactic acid bacteria. J. Food Sci. 72 (2): M39–M44.
- 454 Donkor ON, Shah NP (2008). Production of β -glucosidase and hydrolysis of
455 isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and
456 *Lactobacillus casei* in soymilk. J. Food Sci. 73 (1): M15-M20.
- 457 Esaki H, Watanabe R, Hishikawa N, Osawa T, Kawakishi S (2004). Utility of
458 isoflavone preparations from soy sauce cake as antioxidant materials. Journal of Jap.
459 Soc. Food Sci. Technol. 51: 47–53.
- 460 FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health
461 Organization) (2003). Codex Standard for Fermented Milks. Codex Stan 243-2003.
462 2nd ed. FAO/WHO, Rome, Italy.
- 463 Fontán MCG, Martínez S, Franco I, Carballo J (2006). Microbiological and chemical
464 changes during the manufacture of Kefir made from cows' milk, using a commercial
465 starter culture. Int. Dairy J. 16 (7):762-767.
- 466 Handa CL, Couto UR, Vicensoti AH, Georgetti SR, Ida EI (2014). Optimisation of soy
467 flour fermentation parameters to produce β -glucosidase for bioconversion into
468 aglycones. Food Chem. 152: 56–65.

- 469 Irigoyen A, Arana I, Castiella M, Torre P, Ibáñez FC (2005). Microbiological,
470 physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. Food Chem.
471 90(4) 613-620.
- 472 Ismail B, Hayes K (2005). β -Glycosidase activity towards different glycosidic forms of
473 isoflavones. J. Agric. Food Chem. 53: 4918–4924.
- 474 Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y,
475 Kikuchi M (2000). Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher
476 amounts than their glucosides in humans. J Nutr. 130: 1695-1699.
- 477 Lee MY, Ahn KS, Kwon OK, Kim MJ, Kim MK, Lee IY, Oh SR, Lee HK (2007). Anti-
478 inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model.
479 Immunobiology 212 (4): 647-654.
- 480 Leite AMO, Leite DCA, Aguila EMD, Alvares TS, Peixoto RS, Miguel MAL, Silva JT,
481 Paschoalin VMF (2013). Microbiological and chemical characteristics of Brazilian
482 kefir during fermentation and storage processes. J. Dairy Sci., 96 (7): 4149–4159.
- 483 Lima FS, Ida EI (2014). Optimisation of soybean hydrothermal treatment for the
484 conversion of b-glucoside isoflavones to aglycones. LWT--Food Sci. Technol. 56:
485 232-239.
- 486 Liu K (2004). *Soybeans as functional foods and ingredients*. Champaign: AOCS
487 Press.
- 488 Lucey JA (2001). The relationship between rheological parameters and whey
489 separation in milk gels. Food Hydrocolloids 15: 603–608.

- 490 Marazza JA, Garro MS, Giori GS (2009). Aglycone production by *Lactobacillus*
491 *rhamnosus* CRL981 during soymilk fermentation. Food Microbiol. 26 (3): 333–339.
- 492 Matsuura M, Obata A (1993). D-glucosidases from soybeans hydrolyse daidzin e
493 genistin. J. Food Sci. 58: 144–147.
- 494 Mccann TH, Fabre F, Day L (2011). Microstructure, rheology and storage stability of
495 low-fat yoghurt structured by carrot cell wall particles. Food Res. Int. 44: 884-892.
- 496 Messina M, Messina V (2000). Soyfoods, soybean isoflavones, and bone health: a
497 brief overview. J. Renal Nutr. 10: 63–68.
- 498 Montanuci FD, Pimentel TC, Garcia S, Prudencio SH (2012). Effect of starter culture
499 and inulin addition on microbial viability, texture, and chemical characteristics of
500 whole or skim milk Kefir. Ciênc. Tecnol. Aliment. 32: 850-861.
- 501 Pham TT, Shah NP (2008). Skim milk powder supplementation affects lactose
502 utilization, microbial survival and biotransformation of isoflavone glycosides to
503 isoflavones aglycones in soymilk by *Lactobacillus*. Food Microb. 25 (5): 653-661.
- 504 Pyo Y-H, Lee T-C, Lee YC (2005). Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk
505 fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria. Food Res. Int. 38 (5):
506 551–559.
- 507 Rekha CR, Vijayalakshmi G (2011). Isoflavone phytoestrogens in soymilk fermented
508 with β -glucosidase producind probiotic lactic acid bacteria. Int. J. Food Sci. Nutr. 62
509 (2): 111-120.

- 510 Rodrigues KL, Caputo LRG, Carvalho JCT, Evangelista J (2005). Antimicrobial and
511 healing activity of kefir and kefir extract. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25 (20): 404-
512 408.
- 513 Romanin D, Serradell M, Maciel DG, Lausada N, Garrote GL, Rumbo M (2010).
514 Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated
515 from kefir. *Int. J. Food Microbiol.* 140: 102-108.
- 516 Scalabrini P, Rossi M, Spettoli O, Matteuzzi D (1998). Characterization of
517 *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 39:
518 213-219.
- 519 Shankar SK, Mulimani VH (2007). α -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae*
520 in solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 98 (4): 958–961.
- 521 Shao S, Oszmianski B (2009). Tracking isoflavones: From soybean to soy flour, soy
522 protein isolates to functional soy bread. *J. Funct. Foods* 1: 119–127.
- 523 Tsangalis D, Ashton JF, Stojanovska L, Wilcox G, Shah NP (2004). Development of
524 an isoflavone aglycone-enriched soymilk using soy germ, soy protein isolate and
525 bifidobacteria. *Food Res. Int.* 37: 301–312.
- 526 Wang H, Murphy PA (1994). Isoflavone Composition of American and Japanese
527 Soybeans in Iowa: Effects of Variety, Crop Year, and Location. *J. Agric. Food Chem.*
528 42(8): 1674–1677.
- 529 Wang T (2008). Minor Constituents and Phytochemicals of Soybeans. In: L.A.
530 Johnson, P.J. White, R. Galloway (Eds.), *Soybeans: Chemistry, Production,*
531 *Processing, and Utilization* (p. 297-330). Urbana: AOCS Press.

- 532 Wang YC, Yu RC, Yang HY, Chou CC (2003). Sugar and acid contents in soymilk
533 fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with bifidobacteria. Food
534 Microb. 20: 333–338.
- 535 Xu X, Wang HJ, Murphy PA, Hendrich S (2000). Neither background diet nor type of
536 soy food affects short-term isoflavone bioavailability in women. J. Nutr. 130: 798–
537 801.
- 538 Yeom SJ, Kim BN, Kim YS, Oh DK (2012). Hydrolysis of isoflavone glycosides by a
539 thermostable β -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*. J. Agric. Food Chem. 60 (6):
540 1535-1541.
- 541 Yoshiara LY, Madeira TB, Delarozza F, Silva JB, Ida EI (2012). Optimization of soy
542 isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture
543 design. Int. J. Food Sci. Nutr. 9: 978-986.
- 544 Zhao D, Shah NP (2014). Changes in antioxidant capacity, isoflavone profile,
545 phenolic and vitamin contents in soymilk during extended fermentation. LWT--Food
546 Sci. Technol. 58: 454-462.
- 547 Zheng Y, Hu J, Murphy PA, Alekel DL, Franke WD, Hendrich S. (2003). Rapid gut
548 transit time and slow fecal isoflavone disappearance phenotype are associated with
549 greater genistein bioavailability in women. J Nutr. 133: 3110–3116.
- 550 Zubik L, Meydani M (2003). Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and
551 glucoside forms in American women Am. J. Clin. Nutr. 77(6): 1459–1465.

Figures Captions

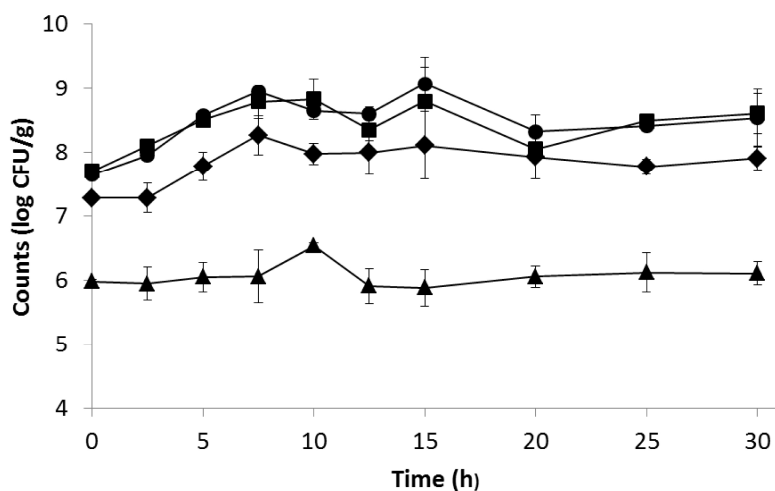


Figure 1. Growth of lactic acid bacteria (●), *Lactococcus lactis* (■), *Leuconostoc* spp (◆) and yeast (▲) in soymilk fermented with kefir culture for 30 h at 25°C.

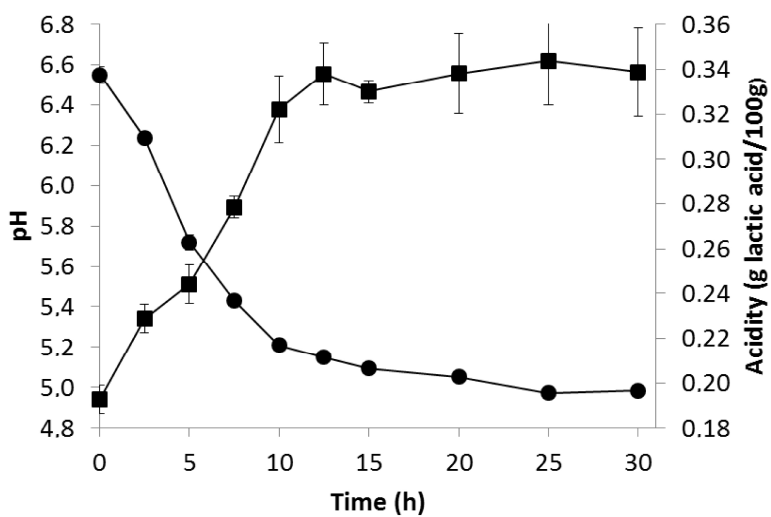


Figure 2. pH (●) and acidity (■) of soymilk fermented with kefir culture for 30 h at 25°C.

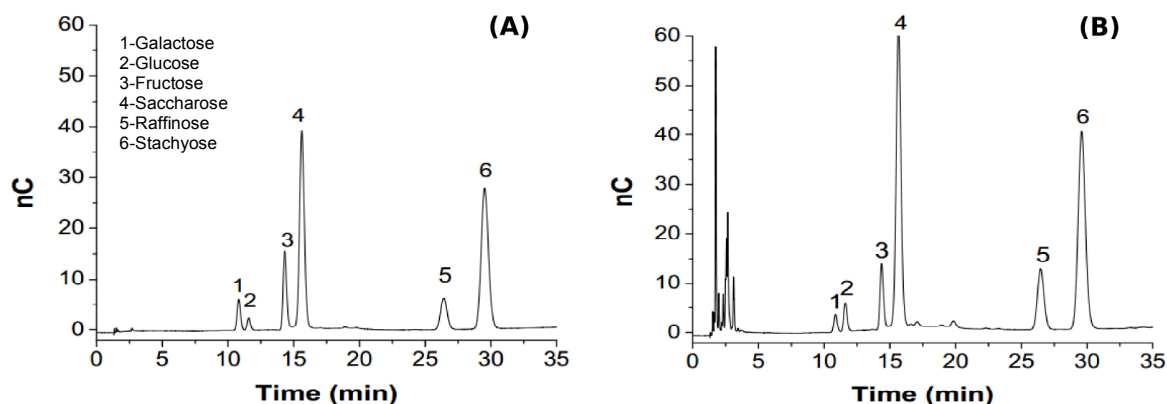


Figure 3. Typical chromatogram for the separation of sugars using high-performance anion-exchange chromatography associated with pulsed-amperometric detection (HPAEC-PAD) - (A) Sugar standard and (B) sugar in soymilk fermented with kefir culture.

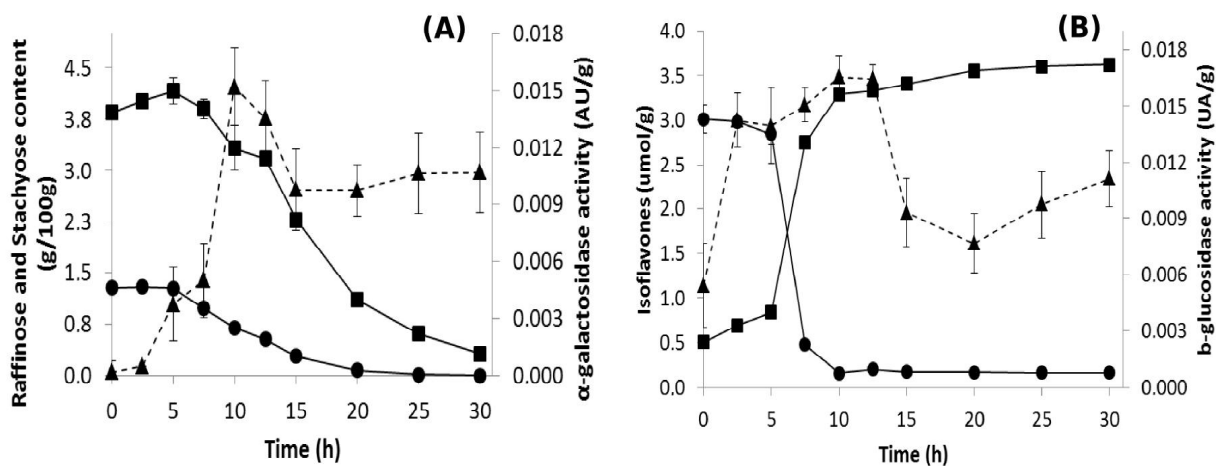


Figure 4. (A) Raffinose (●) and Stachyose (■) contents and α -galactosidase activity (▲) and (B) Conversion of total β -glucosides (●) into total aglycones (■) and β -glucosidase activity (▲) in soymilk fermented with kefir culture for 30 h at 25°C.

Table 1. Sugar contents of soymilk fermented with kefir culture for 30 h at 25°C

Time (h)	Galactose	Glucose	Fructose	Sucrose	Raffinose	Stachyose
0	0.15 ± 0.00 ^a	0.23 ± 0.00 ^a	0.35 ± 0.00 ^d	5.77 ± 0.02 ^a	1.28 ± 0.00 ^a	3.85 ± 0.01 ^{a,b}
2.5	0.14 ± 0.00 ^b	0.20 ± 0.05 ^{a,b}	0.68 ± 0.04 ^b	4.95 ± 0.08 ^b	1.29 ± 0.01 ^a	4.01 ± 0.02 ^a
5.0	ND	0.13 ± 0.04 ^b	0.70 ± 0.07 ^b	4.42 ± 0.43 ^b	1.27 ± 0.03 ^a	4.16 ± 0.19 ^a
7.5	ND	0.12 ± 0.00 ^b	1.02 ± 0.01 ^a	0.82 ± 0.02 ^c	0.98 ± 0.01 ^b	3.90 ± 0.14 ^a
10.0	ND	0.04 ± 0.00 ^c	0.52 ± 0.02 ^c	ND	0.70 ± 0.04 ^c	3.33 ± 0.33 ^{b,c}
12.5	ND	ND	0.16 ± 0.01 ^e	ND	0.53 ± 0.01 ^d	3.17 ± 0.08 ^c
15.0	ND	ND	0.10 ± 0.00 ^{e,f}	ND	0.28 ± 0.00 ^e	2.27 ± 0.00 ^d
20.0	ND	ND	ND	ND	0.08 ± 0.00 ^f	1.10 ± 0.05 ^e
25.0	ND	ND	ND	ND	0.01 ± 0.00 ^{f,g}	0.61 ± 0.01 ^{e,f}
30.0	ND	ND	ND	ND	ND	0.31 ± 0.00 ^f

The sugar contents of fermented soymilk are expressed in g.100 g⁻¹(d.b.). Mean values with the same letter in a row are not significantly different ($p < 0.05$) according to the Tukey test.

ND = Not detected

Table 2. Isoflavone contents of soymilk fermented with kefir culture for 30 h at 25°C

Time (h)	β-glucosides			Malonylglucosides			Aglycones		
	Daidzin	Glicitin	Genistin	Malonyl daidzin	Malonyl glicitin	Malonyl genistin	Daidzein	Glicitein	Genistein
0	1.24 ± 0.01 ^a	0.27 ± 0.00 ^a	1.49 ± 0.15 ^a	2.23 ± 0.02 ^a	0.61 ± 0.00 ^{b,c}	3.84 ± 0.00 ^a	0.18 ± 0.00 ^d	ND	0.33 ± 0.00 ^f
2.5	1.20 ± 0.00 ^b	0.26 ± 0.00 ^b	1.52 ± 0.02 ^a	2.21 ± 0.00 ^{a,b}	0.60 ± 0.00 ^c	3.79 ± 0.01 ^{a,b}	0.32 ± 0.05 ^c	ND	0.37 ± 0.00 ^f
5.0	1.10 ± 0.01 ^c	0.25 ± 0.00 ^c	1.50 ± 0.14 ^a	2.22 ± 0.02 ^a	0.61 ± 0.00 ^{b,c}	3.79 ± 0.05 ^{a,b}	0.36 ± 0.07 ^c	ND	0.48 ± 0.00 ^e
7.5	ND	ND	0.48 ± 0.02 ^b	2.19 ± 0.01 ^{a,b}	0.61 ± 0.00 ^{a,b,c}	3.75 ± 0.01 ^{a,b,c}	1.44 ± 0.00 ^b	ND	1.32 ± 0.00 ^d
10.0	ND	ND	0.16 ± 0.02 ^c	2.23 ± 0.01 ^a	0.62 ± 0.00 ^a	3.80 ± 0.02 ^{a,b}	1.57 ± 0.01 ^a	0.15 ± 0.00 ^e	1.56 ± 0.01 ^c
12.5	ND	ND	0.20 ± 0.00 ^c	2.22 ± 0.02 ^a	0.61 ± 0.00 ^{a,b}	3.77 ± 0.04 ^{a,b,c}	1.57 ± 0.02 ^a	0.17 ± 0.00 ^d	1.58 ± 0.02 ^c
15.0	ND	ND	0.18 ± 0.00 ^c	2.20 ± 0.00 ^{a,b}	0.61 ± 0.00 ^{a,b,c}	3.73 ± 0.02 ^{a,b,c}	1.59 ± 0.02 ^a	0.21 ± 0.00 ^c	1.60 ± 0.01 ^{b,c}
20.0	ND	ND	0.17 ± 0.00 ^c	2.20 ± 0.02 ^{a,b}	0.61 ± 0.00 ^{b,c}	3.72 ± 0.05 ^{b,c}	1.64 ± 0.04 ^a	0.26 ± 0.00 ^b	1.65 ± 0.03 ^{a,b}
25.0	ND	ND	0.16 ± 0.02 ^c	2.16 ± 0.01 ^b	0.60 ± 0.00 ^c	3.68 ± 0.01 ^c	1.67 ± 0.02 ^a	0.27 ± 0.00 ^a	1.66 ± 0.02 ^a
30.0	ND	ND	0.17 ± 0.00 ^c	2.09 ± 0.01 ^c	0.58 ± 0.00 ^d	3.54 ± 0.02 ^d	1.67 ± 0.00 ^a	0.28 ± 0.01 ^a	1.67 ± 0.01 ^a

The isoflavone contents of soymilk were expressed in $\mu\text{mol.g}^{-1}$ (d.b.). Mean values with the same letter in a row are not significantly different ($p < 0.05$) according to the Tukey test.

ND = Not detected. Acetylglucosides were not detected.

6 CONCLUSÕES

As diferentes condições de processamento para obtenção de extratos de soja influenciaram as características físicas, químicas e teor das diferentes formas de isoflavonas. Entretanto, não foi detectada diferença na aceitação sensorial dos extratos de soja.

A maceração dos grãos de soja por 16 h a 5 °C, homogeneização por 3 min com água destilada a 25 °C, filtração e tratamento térmico a 90 °C por 30 min possibilitou obter extrato de soja com maior teor de proteínas, lipídios, cinzas, isoflavonas totais e agliconas, menor tonalidade cromática e viscosidade.

O processo de obtenção de extrato de soja com máxima conversão das isoflavonas na forma de β -glicosídeos em agliconas foi otimizado quando os grãos foram macerados a 5 °C por 14 h na proporção 1:3 (soja:água; p:v), homogeneizados na proporção 1:8 (soja macerada:água; p:v) e o homogenato incubado a 50 °C por 2,7 h.

A estabilidade térmica a 97 °C por 25 min das isoflavonas do extrato de soja foi mantida com relação ao teor de isoflavonas agliconas (daidzeína e genisteína), enquanto que ocorreu um aumento no teor de gliciteína e β -glicosídeos (daidzina e genistina) e uma redução no teor de malonilglicosídeos.

O extrato de soja fermentado com cultura de kefir a 25 °C por 30 h apresentou atividade de α -galactosidase e hidrolisou 100 % de rafinose e 92 % de estaquiose, após o esgotamento de galactose, glicose e sacarose.

O extrato de soja fermentado com cultura de kefir a 25 °C por 30 h apresentou atividade de β -glicosidase bioconvertendo 100 % de daidzina e glicitina e 89 % de genistina em agliconas correspondentes, além de favorecer a redução do pH, aumento da acidez e viabilidade celular.

ANEXOS

ANEXO 1 - Termo de Aprovação do Projeto do Comitê de Ética



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina
Registro CONEP 5231

Parecer CEP/UEL:	221/2012
CAAE:	11278112.0.0000.5231
Pesquisador(a):	Tahis Regina Baú
Unidade/Órgão:	CCA - Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos

Prezado(a) Senhor(a):

O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

"OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EXTRATO DE SOJA, CARACTERIZAÇÃO E USOS DO OKARA."

Situação do Projeto: **Aprovado**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá ser encaminhado ao CEP/UEL relatório final da pesquisa, conforme prevê a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares.

Londrina, 18 de dezembro de 2012.

Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
 Universidade Estadual de Londrina



ANEXO 2 - Coleta de Dados do Julgador

Desejamos avaliar sensorialmente a aceitação de extrato de soja. Ser um julgador não tomará muito seu tempo e não envolverá nenhuma tarefa difícil. A prova será realizada no Laboratório de Análise Sensorial do DCTA, leva em torno de 10 minutos. Se você deseja participar do teste, por favor, preencha este formulário.

Dados Pessoais:

Nome _____

Telefone para contato: _____

E-mail: _____

1. Faixa etária:

- 15-25
 25-35
 35-50
 acima de 50 anos

2. Sexo

- masculino
 feminino

3. Ocupação:

- aluno _____
 funcionário
 professor
 outro _____

4. Escolaridade

- 1° grau
 2° grau
 3° grau
 Pós-graduação _____

5. Gosta/consome extrato de soja? Sim Não**6. Gosta/consome produtos de soja?** Sim Não**7. Frequência de consumo de produtos a base de soja:**

- Nunca
 Ocasionalmente - _____ vezes por ano
 Moderadamente - _____ vezes por mês
 Frequentemente - _____ vezes por semana

8. Frequência de consumo de bebidas de soja:

- Nunca
 Ocasionalmente - _____ vezes por ano
 Moderadamente - _____ vezes por mês
 Frequentemente - _____ vezes por semana

9. Frequência de consumo de extrato de soja:

- Nunca
 Ocasionalmente - _____ vezes por ano
 Moderadamente - _____ vezes por mês
 Frequentemente - _____ vezes por semana

10. Produtos que costuma consumir (7 e 8).

ANEXO 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido na Forma de Convite para os Julgadores do Extrato de soja no Teste de Aceitação

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa “*Extratos de soja: influência dos diferentes processos de obtenção, otimização do processo para conversão de isoflavonas em agliconas e fermentação com cultura de kefir*” realizada no Departamento de Ciência e Tecnologia de alimentos/UEL, Londrina/PR. o objetivo da pesquisa é desenvolver um extrato de soja com boas características nutricionais e que apresente boa aceitação sensorial. A sua participação é muito importante, e irá requerer cerca de 10 minutos. Você participará como julgador e irá consumir as bebidas e será solicitado a dar sua opinião sobre o quanto gostou dos produtos apresentados, avaliando os atributos cor, aroma, textura, sabor e aceitação global. Será realizada uma sessão e você poderá fazê-la no horário que tiver maior disponibilidade. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. A ingestão desse produto não traz riscos à saúde. Informamos que o senhor não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa. Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar (Prof^a Elza louko Ida, DCTA/UEL, elida@uel.br, (43) 3371- 4080), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371 – 2490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada e entregue a você.

Londrina, ___ de _____ de 2012.

Pesquisador Responsável

Elza louko Ida
Prof^a Orientadora

Tahis Regina Baú
Doutoranda

Eu, _____, tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura: _____

Data: _____

ANEXO 4 - Ficha para Avaliação Sensorial: Teste de Aceitação

TESTE DE ACEITAÇÃO

Nome: _____ Data: _____

Você está recebendo uma amostra de extrato de soja. Por favor, avalie a amostra com relação aos atributos cor, aroma, textura, sabor e aceitação global, segundo o grau de gostar ou desgostar, utilizando a escala abaixo:

- (9) gostei extremamente
- (8) gostei moderadamente
- (7) gostei regularmente
- (6) gostei ligeiramente
- (5) não gostei, nem desgostei
- (4) desgostei ligeiramente
- (3) desgostei regularmente
- (2) desgostei moderadamente
- (1) desgostei extremamente

AMOSTRA	COR	AROMA	TEXTURA	SABOR	ACEITAÇÃO GLOBAL

Comentários:
