



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

**DISEÑO DE BIOPROCESOS DE ECONOMÍA CIRCULAR
PARA LA OBTENCIÓN DE BIOESTIMULANTES
AMBIENTALES A PARTIR DE OKARA**

TESIS DOCTORAL
Ángel Orts Gómez
Sevilla, 2022

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE FARMACIA

**DISEÑO DE BIOPROCESOS DE ECONOMÍA CIRCULAR
PARA LA OBTENCIÓN DE BIOESTIMULANTES
AMBIENTALES A PARTIR DE OKARA**

Memoria presentada por **D. Ángel Orts Gómez**, para optar al título de doctor con mención "Doctorado Industrial".

Tesis realizada bajo la dirección de:

Dr. Juan Parrado Rubio

Dr. Pablo Caballero Jiménez

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla

Dr. Manuel Tejada Moral

Dpto. Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola, Universidad de Sevilla

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE FARMACIA

**DISEÑO DE BIOPROCESOS DE ECONOMÍA CIRCULAR
PARA LA OBTENCIÓN DE BIOESTIMULANTES
AMBIENTALES A PARTIR DE OKARA**

Memoria presentada por **D. Ángel Orts Gómez**, para optar al título de doctor con mención "Doctorado Industrial".

Tesis realizada en el programa de doctorado:
Recursos Naturales y Medioambiente (R.D. 99/2011)

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE FARMACIA

La Tesis Doctoral titulada "DISEÑO DE BIOPROCESOS DE ECONOMÍA CIRCULAR PARA LA OBTENCIÓN DE BIOESTIMULANTES AMBIENTALES A PARTIR DE OKARA", realizada por D. Ángel Orts Gómez, para optar al grado de Doctor en Bioquímica por la Universidad de Sevilla, se presenta bajo la modalidad de "Compendio de Publicaciones"

Los Directores de la Tesis

Fdo.: Juan Parrado Rubio

Fdo.: Manuel Tejada Moral

Fdo.: Pablo Caballero Jiménez

El Doctorando
Fdo.: Ángel Orts Gómez

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



Universidad de Sevilla
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Farmacia
C/Profesor García González, 2
41012 Sevilla (España)
Tlf. 954556755 Fax: 954556752

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



Dr. Juan Parrado Rubio, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Sevilla,

Dr. Manuel Tejada Moral, Catedrático del Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola de la Facultad de Química, de la Universidad de Sevilla, y

Dr. Pablo Caballero Jiménez, Doctor del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Sevilla.

Certifican que:

D. Ángel Orts Gómez, ha realizado en Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, bajo nuestra dirección, el trabajo de investigación "DISEÑO DE BIOPROCESOS DE ECONOMÍA CIRCULAR PARA LA OBTENCIÓN DE BIOESTIMULANTES AMBIENTALES A PARTIR DE OKARA", y que reúne las condiciones necesarias para ser presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Fdo.: Dr. Juan Parrado Rubio

Fdo.: Dr. Manuel Tejada Moral

Fdo. Dr. Pablo Caballero Jiménez

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

La presente Tesis Doctoral está compuesta por los siguientes artículos científicos:

Revistas científicas:

1.- Use of okara in the bioremediation of chlorpyrifos in soil: Effects on soil biochemical properties.

Orts A, Cabrera S, Gómez Parrales I, Parrado Rubio J, Rodríguez-Morgado B, Tejada M.

Applied Soil Ecology. 2017. Vol. 121. Pag. 172-176.

Índice de Impacto: 2,916

Ranking:

Categoría: Soil Science. 1º cuartil (8/34)

Citas: 11

2.- Protease technology for obtaining a soy pulp extract enriched in bioactive compounds: isoflavones and peptides.

Orts, A, Revilla E, Rodriguez-Morgado B, Castaño A, Tejada M, Parrado J, García-Quintanilla A.

Heliyon. 2019. Vol. 5. Núm. 6. 10.1016

Índice de Impacto: 3,776

Ranking:

Categoría: Multidisciplinary Sciences. 2º cuartil (28/73)

Citas: 8

3.- Production of biostimulants from okara through enzymatic hydrolysis and fermentation with Bacillus licheniformis: comparative effect on soil biological properties.

Orts A, Tejada M, Parrado J, García C, Hernández T, Gómez Parrales I. Environmental Technology. 2019. Vol. 40. Núm. 16. Pag. 2073-2084.

Índice de Impacto: 2,213

Ranking:

Categoría: Environmental Sciences. 3º cuartil (143/265)

Citas: 5



4.- Meeting-Abstract: Okara valorization process by fermentation with *Bacillus licheniformis*: Obtention of hydrolytic enzymes, bioactive compounds, and protein hydrolysates.

Orts, A, Parrado , J, Tejada, M, Rodríguez-Morgado, B, Caballero Jiménez, P.

Journal of Biotechnology. 2017. Vol. 256. 10.1016

Índice de Impacto: 3,595

Ranking:

Categoría: Biotechnology & Applied Microbiology. 2º cuartil (75/158)

Aportaciones a congresos:

Enzymatic Technology for Phosphate Recovery from Agro-Industrial Wastes.
Poster en Congreso.

Orts, A, Caballero Jiménez, P, Parrado , J, García-Quintanilla, A
4º Iberoamerican Congress of Biorrefineries. Jaen Spain. 2018

Design of a Bioprocess for Total Okara Conversion Into Agronomic
Application Products: Biostimulants and Biofertilizers. Poster en Congreso.

Orts A, García Martínez A, Caballero P, García-Quintanilla A, Tejada M.
4º Iberoamerican congres on biorefineries. Jaén. 2018

Diseño de un proceso biotecnológico para la obtención de productos con
funcionalidad ambiental a partir de un subproducto industrial
agroalimentario: OKARA.

Orts, A, Tejada, M, García-Quintanilla, A, Gómez Parrales, I, Parrado, J.
Comunicación en congreso. VIII Congreso Ibérico de la Ciencia del Suelo. -
San Sebastián. 2018

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



Okara valorization process by fermentation with Bacillus Licheniformis:
Obtention of hydrolytic enzymes, bioactive compounds, and protein hydrolyzates.

Orts A, Tejada M, Rodríguez-Morgado B, Caballero Jiménez P, Parrado J.
Poster en Congreso. European Biotechnology Congress. Duvrovnik, Croacia.
2017

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

Orts A, García-Quintanilla A, Caballero P, Orts JM, Tejada M, Martín-Presas L, Parrado J.

CICS 2022, Congreso Ibérico de las Ciencias del Suelo. Lisboa 2022.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

AGRADECIMIENTOS

En esta tesis doctoral no me doctoro realmente yo, sino mis padres, Juan Luis e Inmaculada, ya que con su esfuerzo durante años, a base de trabajo diario, han conseguido que su hijo haya llegado a este objetivo académico y tengan al menor, mi hermano, realizando lo mismo, por ello quiero agradecerles y dedicarles esta tesis doctoral.

Agradecer a mi hermano José María, que siempre ha estado ahí a cada problema que he tenido, espero que aprenda de mis errores y le sea el camino lo más fácil posible.

A mi tutor de tesis, Juan Parrado, por su eterna paciencia y por haberme dado la oportunidad de poder realizar éstos proyectos y ésta tesis, ya que no ha sido fácil formar a un geógrafo para doctorarse en procesos bioquímicos y agroindustriales.

A Manuel Tejada, mi director de tesis, por haberme abierto las puertas, formarme en la faceta docente y el mundo agronómico.

A Pablo Caballero, mi director de tesis, por haberme enseñado innumerables técnicas de laboratorio y guiarme en el desarrollo de ésta tesis.

A Isidoro, mi otro director no oficial, una gran persona, siempre atento, una persona que no duda en mostrar su ayuda.

Al equipo de Symborg, Jesús Juárez y Jesús Martínez, que confiaron en mí para realizar ésta tesis industrial y siempre he obtenido el mejor de los tratos posibles por una empresa. También a Beni, un gran apoyo en los desarrollos para la empresa y los proyectos, una gran persona.

A Angélica y Elisa, por su ayuda y colaboración en los trabajos que hemos realizado.



A Albert y Sandro, por apoyarme siempre, escucharme y hacerme creer en mí en los momentos difíciles.

A mis compañeros de laboratorio, Willy, Anita, Bruno y Sandra, siempre dispuestos a ayudar en cualquier problema.

Y no puedo olvidar a Juan Bautista, una persona que siempre creyó en mí. Un investigador incansable y el mejor docente que he conocido nunca.

Gracias a todos.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÍNDICE

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

ÍNDICE

RESUMEN -----	1
CAPÍTULO 1, DISEÑO DE BIOPROCESOS DE OBTENCIÓN DE BIOESTIMULANTES RICOS A PARTIR DE OKARA: ENZIMÁTICOS Y FERMENTATIVOS -----	5
Introducción -----	7
1.1. OKARA, SUBPRODUCTO DE LA AGROINDUSTRIA -----	9
1.2. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL OKARA -----	10
1.3. COMPUESTOS BIOACTIVOS DEL OKARA -----	11
1.4. EXTRACTOS OBTENIDOS DEL OKARA -----	12
1.4.1. Extractos proteicos -----	12
1.4.2. Extractos ricos en fibra y azúcares -----	12
1.4.3. Extractos de alto contenido en isoflavonas -----	13
1.5. TECNOLOGÍAS BIOLÓGICAS PARA LA OBTENCIÓN DE BIOESTIMULANTES -----	13
1.5.1. Introducción a los bioestimulantes -----	13
1.5.2. Tecnología enzimática directa -----	14
1.5.3. Tecnología fermentativa -----	17
1.6. HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS: COMPUESTOS BIOESTIMULANTES -----	17
2. Objetivos -----	23
3. Artículos -----	27
- Protease technology for obtaining a soy pulp extract enriched in bioactive compounds: isoflavones and peptides -----	29
- Okara valorization process by fermentation with Bacillus licheniformis: Obtention of hydrolytic enzymes, bioactive compounds, and protein hydrolysates -----	36
- Obtaining an agronomic/environmental biostimulant by enzymatic hydrolysis of okara -----	38
4. Resultados y discusión -----	43
5. Conclusiones -----	51



6. Bibliografía-----	55
----------------------	----

CAPÍTULO 2, EVALUACIÓN DE LA POTENCIA BIOESTIMULANTE EDAFOLÓGICA DE LOS PRODUCTOS BIESTIMULANTES OBTENIDOS A PARTIR DE OKARA -----	65
--	----

Introducción-----	67
-------------------	----

1. BIOESTIMULACIÓN EDÁFICA -----	69
----------------------------------	----

1.1. ASPECTOS GENERALES DE LOS BIOESTIMULANTES EDAFOLÓGICOS -----	70
---	----

1.2. TIPOS DE BIOESTIMULANTES EDAFOLÓGICOS -----	71
--	----

1.2.1. Bioestimulantes edafológicos inorgánicos -----	71
---	----

1.2.2. Bioestimulantes edafológicos orgánicos -----	71
---	----

1.3. BIOINDICADORES ESPECÍFICOS DE CALIDAD DEL SUELO-----	72
---	----

1.3.1. Actividades enzimáticas como parámetros de calidad del suelo-----	72
--	----

1.3.2. Indicadores de biomasa y biodiversidad microbiana -----	75
--	----

2. Objetivos -----	77
--------------------	----

3. Artículos -----	81
--------------------	----

- Production of biostimulants from okara through enzymatic hydrolysis and fermentation with Bacillus licheniformis: comparative effect on soil biological properties-----	83
---	----

4. Resultados y discusión-----	97
--------------------------------	----

5. Conclusiones -----	105
-----------------------	-----

6. Bibliografía -----	109
-----------------------	-----

CAPÍTULO 3, ESTUDIO DE LA POTENCIA BIOESTIMULANTE DEL HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE OKARA EN LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR CLORPIRIFOS -----	119
--	-----

Introducción-----	121
-------------------	-----

1. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL -----	123
----------------------------------	-----

1.1. CONTAMINACIÓN DE SUELOS POR PLAGUICIDAS -----	124
--	-----

1.2. BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS -----	125
---	-----

1.2.1. Efecto de la bioestimulación microbiana en el proceso de biorremediación de suelos contaminados -----	126
--	-----

1.2.2. Tipos de bioestimulantes utilizados en la biorremediación -	128
--	-----

1.2.3. Bioestimulantes en biorremediación de pesticidas -----	131
---	-----



2. Objetivos -----	133
3. Artículos -----	137
- Use of okara in the bioremediation of chlorpyrifos in soil: Effects on soil biochemical properties -----	139
4. Resultados y discusión -----	145
5. Conclusiones -----	151
6. Bibliografía -----	155
CAPÍTULO 4, ESTUDIO DE LA POTENCIA DEL BIOESTIMULANTE ENZIMÁTICO DE OKARA FRENTE AL ESTRÉS AMBIENTAL POR OZONO 163	
Introducción -----	165
1. CONTAMINACIÓN POR OZONO Y AGRICULTURA -----	167
1.1. MECANISMOS DE ACTUACIÓN DE LAS SUSTANCIAS OXIDANTES EN LAS PLANTAS -----	168
1.2. SÍNTOMAS Y DIAGNOSIS DE DAÑOS POR OZONO -----	170
1.3. PRODUCTOS QUÍMICOS EN LA AGRICULTURA PARA COMBATIR DAÑOS DE OZONO -----	171
2. Objetivos -----	173
3. Artículo -----	177
- Biostimulant capacity of an enzymatic extract from okara against ozone-induced damage in capsicum annum -----	179
4. Resultados y discusión -----	197
5. Conclusiones -----	201
6. Bibliografía -----	205
CONCLUSIONES FINALES -----	211



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

CAPÍTULO 1

DISEÑO DE BIOPROCESOS ENZIMÁTICOS Y FERMENTATIVOS PARA LA OBTENCIÓN DE BIOESTIMULANTES AMBIENTALES A PARTIR DE OKARA



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

1. INTRODUCCIÓN

{ 7 }

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

INTRODUCCIÓN

1.1. OKARA SUBPRODUCTO DE LA AGROINDUSTRIA

El okara es el residuo obtenido a partir de la elaboración de la leche de soja y tofu. Su producción a escala mundial es alta, produciéndose unas 800.000 toneladas en Japón, 310.000 de toneladas en Corea del Sur, 2.800.000 toneladas en China y 25.000 toneladas en España [1].

El proceso de elaboración de leche de soja y obtención de okara comienza con la selección del tipo de grano de soja, (ver figura 1 e imagen 1). La soja, sufre un pretratamiento térmico (95-100°C durante 5 minutos), con el objeto de desactivar las enzimas lipoxigenasa y tripsina. Posteriormente, se lleva a cabo una suspensión en agua, produciéndose una extracción por solubilización de biomoléculas que constituye la leche de soja. El proceso de extracción de la leche se realiza mediante prensado o filtración, separando por un lado la leche y por otro la pasta sobrante, siendo esta pulpa el okara, la cual se conserva en frío. Finalmente se deseca para conseguir harina o se le aplican los diferentes tratamientos según la finalidad que se le vaya a dar (Ver imagen 2).

Esquema de Proceso:

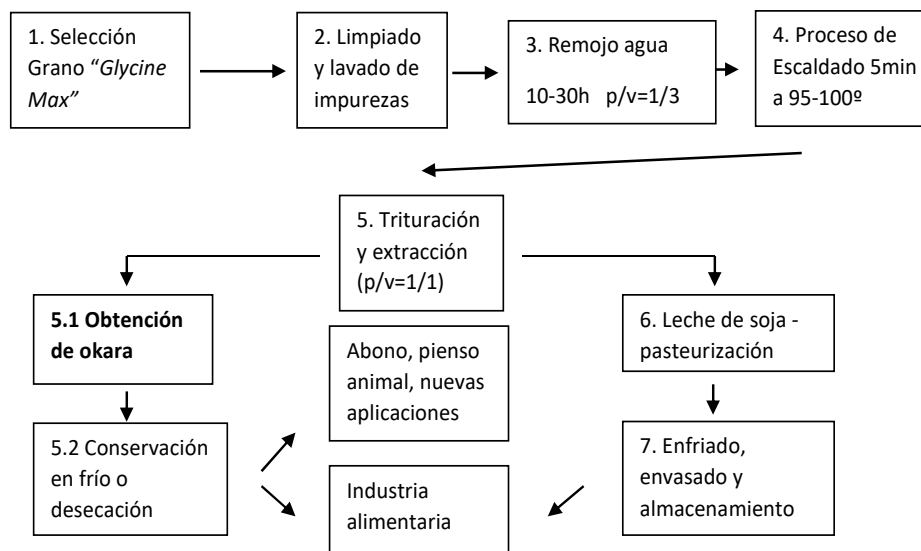


Figura 1: Diseño de proceso de obtención de leche de soja y okara.





Imagen 1: planta de producción de 2000 l de leche de soja base (Ysifood).

1.2. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL OKARA

Okara es un subproducto con gran valor nutricional, destacando su alto contenido en proteínas, junto a su contenido en grasas, carbohidratos, compuestos bioactivos y minerales [2].

La característica más destacable del okara es su alto contenido proteico (30-40%) que, por su calidad superior, en comparación con otros productos de soja se convierte, no solo en una interesante fuente directa de proteína, sino, además, en un sustrato que ha sido usado por numerosos autores para obtener compuestos de alto valor añadido, como péptidos bioactivos.

También se caracteriza por una importante presencia de componentes bioactivos, como isoflavonas, vitaminas y oligoelementos.

Sin embargo, su utilización es muy baja, debido a que su principal problema es su alta inestabilidad dado que este producto presenta una vida media corta debido a su alto contenido en agua (70-80%) que conduce a una rápida fermentación natural, con el consiguiente deterioro del producto unido a una producción localizada de grandes volúmenes.

Para evitar este problema, existen formas de preservar el okara, como técnicas de secado, liofilización o prensado, pero son poco rentables a escala industrial debido al coste energético que suponen [3]. Por ello, el



desarrollo de tecnologías que conduzcan a su estabilización o al desarrollo de nuevo productos de alto valor añadido son vitales para la valorización de okara.



Imagen 2. Okara obtenido después de la separación de la leche de soja.

1.3. COMPUESTOS BIOACTIVOS DE OKARA

Las plantas producen una gran variedad de fitoquímicos (compuestos bioactivos), beneficiosos para los microorganismos del suelo y las plantas. Estas sustancias actúan como sistema de defensas ante diferentes amenazas, así son inductores de parámetros de calidad de los frutos, como color, aroma y propiedades particulares. Así mismo, muestran propiedades biestimulantes al promover el crecimiento vegetal, participar en funciones de defensa frente a diversos estreses, promueven el enraizamiento, etc. [4].

Entre los principales compuestos bioactivos existentes en las plantas cabe destacar los folatos, vitaminas, terpenos y fenoles, entre otros, siendo éstos últimos de gran interés en éste capítulo de la tesis, debido a que la soja, y por ello también el okara, están presentes en altas concentraciones, como es el caso de las isoflavonas [5], pudiéndose extraer mediante técnicas básicas hasta un 40% del total de las isoflavonas de la soja,



dependiendo de los métodos de elaboración de los productos de soja obtenidos [6,7].

1.4. EXTRACTOS OBTENIDOS DEL OKARA

Durante los últimos años, se han desarrollado numerosos procesos enfocados a la revalorización del okara, mediante la extracción de algunos de sus componentes. A continuación, se introducen los diferentes extractos desarrollados a partir del okara, con diferentes tecnologías y finalidades.

1.4.1. Extractos proteicos

El okara presenta un alto contenido proteico, del 30-40%, dependiendo de los métodos de elaboración de leche de soja o tofu [8]. Éste está compuesto por proteínas globulares insolubles, presentando una baja biodisponibilidad.

Por ello, se han desarrollado múltiples técnicas de extracción y modificación de proteínas, con el objetivo de incrementar su biodisponibilidad, enfocado a un incremento de su solubilidad.

La extracción se realiza con técnicas físicas como filtración, estas han conseguido concentrar hasta el 80% de las proteínas existentes [9], también el uso de solventes como etanol han demostrado ser una técnica eficaz para la obtención del contenido proteico [10]. Por otra parte, existen técnicas más complejas como la hidrólisis química y enzimática, siendo ésta segunda donde se incluyen los procesos proteolíticos, los cuales transformarán proteínas de alto peso molecular en compuestos altamente biodisponibles como péptidos y aminoácidos. Por ello, es una tendencia en alza debido a su bajo coste y sus altos rendimientos, en las que mediante el uso de proteasas se consiguen extraer hasta un 35-50% de la cantidad de proteínas existentes en el okara, a la vez de incrementar el contenido de péptidos y aminoácidos [11].

1.4.2 Extractos ricos en fibra y azúcares



Durante los últimos años, debido a su alto contenido en carbohidratos, el okara es susceptible de numerosas investigaciones con el fin de revalorizar esta fracción molecular y aplicarla con fines dietéticos. Distintos ensayos han demostrado su potencial como fibra dietética y, mediante hidrólisis o tratamiento térmico, se ha conseguido la transformación de la fibra del okara en azúcares sencillos, como xilosa, arabinosa, glucosa, etc., con alta biodisponibilidad para alimentación y la industria agroalimentaria[2].

1.4.3 Extractos de alto contenido en isoflavonas

La obtención de extractos ricos en isoflavonas a partir de okara ha sido posible mediante diversas técnicas, como microfiltración, extracción con solventes orgánicos, etc. Actualmente, el proceso más eficiente ha sido la extracción de isoflavonas utilizando alcohol, pero es un proceso que podría ser caro y poco práctico para llevarlo a cabo a escala industrial dependiendo de la cantidad de solvente a utilizar. La utilización de un método sencillo que utilice agua como extractante es más adecuado a pesar del menor rendimiento respecto a otros extractantes, reduciendo innumerables costes si se realiza a escala industrial [10].

En ésta tesis planteamos la hipótesis de que la hidrólisis enzimática del okara con proteasas en soluciones acuosas, debido a la relación directa entre proteínas e isoflavonas demostrada por Janckoviak et al. 2014, mejoraría la extracción de isoflavonas y al mismo tiempo se obtendría un producto rico en péptidos bioactivos, contribuyendo así a la formulación asequible de un nuevo producto con mayor potencia antioxidante y mayor valor para la industria alimentaria y agronómica [10].

1.5 TECNOLOGÍAS BIOLÓGICAS PARA LA OBTENCIÓN DE BIOESTIMULANTES

1.5.1. Introducción a los bioestimulantes



Los bioestimulantes agronómicos incluyen diversas formulaciones de compuestos, sustancias y microorganismos que se aplican a plantas o suelos para regular y mejorar los procesos fisiológicos del cultivo, haciéndolos más eficientes

Los bioestimulantes actúan sobre la fisiología de las plantas a través de diferentes vías que los nutrientes convencionales para mejorar el vigor del cultivo, los rendimientos, la calidad y la vida útil/conservación después de la cosecha.

Hay una gran diferencia entre un bioestimulante y un fertilizante. Los fertilizantes aportan a la planta los nutrientes que ésta necesita para desarrollarse correctamente. En cambio, los bioestimulantes no le proporcionan nutrientes de forma directa, sino que estimulan los procesos fisiológicos de la propia planta para mejorar la disponibilidad y absorción de los nutrientes.

Para su obtención se necesitan fuentes orgánicas ricas en compuestos activos, o que potencialmente puedan ser convertidos en ellos, y procesos químicos o biológicos que actúan sobre estas fuentes, a continuación nos introducimos en dicha tecnología.

1.5.2. Tecnología enzimática directa

Existe una tendencia creciente de la bioconversión de residuos o subproductos orgánicos mediante el uso de enzimas comerciales u obtenidas a partir de fermentación bacteriana, para la obtención de bioestimulantes con fines agrícolas [12].

Esta tecnología se fundamenta en el uso de enzimas hidrolíticas para la obtención de bioestimulantes. Las enzimas son catalizadores producidos por organismos vivos, con el fin de aumentar la velocidad de una reacción química específica. Son proteínas altamente eficaces y específicas, funcionan en condiciones suaves de temperatura, presión y pH y son biodegradables [13].

Las enzimas pueden obtenerse a partir de tejidos animales, vegetales o mediante procesos de fermentación (bacterias y hongos). Para

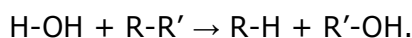


la obtención de enzimas a nivel industrial, es de gran importancia seleccionar el organismo adecuado, utilizando normalmente (bacterias, levaduras y hongos), ya que son una fuente apropiada de la mayoría de las enzimas industriales siendo fáciles de manipular y cultivar en grandes fermentadores. La mayoría de las enzimas industriales se obtienen de especies de *Bacillus*, que se caracterizan por ser bacterias Gram positivas, y de hongos filamentosos como *Aspergillus*, mientras que solo el 8% es de origen animal y el 4% de origen vegetal [14].

Actualmente se han desarrollado nuevas tecnologías de biotransformación de residuos con distintas finalidades, tanto en alimentación en ganadería, como en fines agrícolas, y también su uso en tecnologías de biorremediación de suelos contaminados [15]. En agricultura, estos compuestos formulados se denominan bioestimulantes, los cuales se caracterizan por contener péptidos de bajo peso molecular, polisacáridos, compuestos bioactivos, etc. [16]

Se entiende por hidrólisis enzimática, la que se produce mediante un grupo de enzimas llamadas hidrolasas.

Estas enzimas producen la ruptura de enlaces por agua:



Así, la molécula de agua reacciona con un sustrato, generándose dos subproductos, conteniendo uno el catión hidrógeno y el otro que contiene el catión hidroxilo.

Las hidrolasas se encuentran clasificadas dentro las categorías de enzimas como, EC3, con diferentes subclases identificadas por un segundo número, por ejemplo EC3.2, incluyen aquellas hidrolasas que actúan hidrolizando enlaces tipo glucosídico.

Para este proyecto son de gran interés aquellas hidrolasas que actúan hidrolizando enlaces glucosídicos (glucosidasas), ácidos carboxílicos (lipasas) y enlaces peptídicos (proteasas) dadas las características de la composición química del okara.

Las glucosidasas son enzimas que actúan rompiendo enlaces glucosídicos de los glicósidos, oligosacáridos y polisacáridos, y carbohidratos



complejos. Siendo una de las fuentes principales de aporte de carbono para los microorganismos del suelo [17].

Las proteasas son de vital importancia en los seres vivos. Estas enzimas hidrolizan las proteínas en compuestos de menor peso molecular como los péptidos y aminoácidos libres, los cuales presentan importantes propiedades funcionales muy beneficiosos para los microorganismos del suelo y las plantas [18].

Respecto a la vía de producción por hidrólisis enzimática, su finalidad es obtener un producto rico en péptidos y aminoácidos libres, así como otras moléculas bioactivas de rápida absorción tanto por los microorganismos del suelo como las plantas.

Esta técnica presenta una serie de ventajas frente a la hidrólisis química, destacando las siguientes:

— **Selectividad.** Las enzimas son específicas para un tipo determinado de enlace y, por tanto, no es frecuente la aparición de productos de degradación.

— **Condiciones moderadas de temperatura y pH.** La hidrólisis enzimática transcurre generalmente en el intervalo de 40° a 60°C y pH comprendido entre 4-8.

— **No se añaden sustancias químicas/xenobióticas.** Evidentemente no es así en los procesos de hidrólisis química, ya que tanto la producción como en la necesaria neutralización posterior eleva considerablemente el contenido en sales.

— **Integridad del producto.** No se produce degradación de las biomoléculas, así por ejemplo en las proteínas, la hidrólisis alcalina destruye los aminoácidos arginina y cisteína y, la hidrólisis ácida elimina el triptófano y desamina los aminoácidos serina y treonina [19].

Los principales problemas que presentan es su elevado coste de las enzimas y en algunos casos su baja productividad. No obstante, es una tecnología muy utilizada a escala industrial y rentable, siempre y cuando se optimicen los procesos [16].



1.5.3 Tecnología fermentativa

La tecnología fermentativa hace referencia al uso de bacterias u hongos para la bioconversión del subproducto orgánico, mientras que la tecnología enzimática hace referencia al uso de enzimas como agente biológico directo para la transformación del subproducto.

La base de la tecnología es la extracción enzimática producida por parte de los microorganismos. Durante la fermentación el metabolismo microbiano genera un espectro de enzimas hidrolíticas, que actúan sobre biomoléculas de distinta naturaleza, dando como resultado la solubilización y extracción de compuestos bioactivos.

Ambas tecnologías, la hidrólisis directa enzimática y la fermentación, se usan en los procesos de obtención de bioestimulantes orgánicos, que se componen de péptidos y aminoácidos, fitohormonas, polisacáridos y oligosacáridos.

Hay una diferencia entre ambos procesos, ya que la fermentación no es solo un sistema de extracción y modificación de los compuestos bioactivos presentes o potenciales en los substratos orgánicos, sino que el metabolismo bacteriano puede expresar y producir metabolitos secundarios procedentes de los procesos fermentativos, enzimas hidrolíticas así como la presencia en el bioestimulante de los propios microorganismos que realizan el proceso, muchos de ellos con potencial capacidad de promover el crecimiento de las plantas conocidos como *PGPB (Plant Growth Promoting Bacteria)* [19]

1.6 HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS: COMPUESTOS BIOESTIMULANTES

Los hidrolizados de proteínas, son unos de los principales compuestos bioestimulantes, en los cuales se centra éste primer capítulo de tesis doctoral. Son productos que se obtienen tras realizar un proceso de hidrólisis enzimática con proteasas y también por fermentación, a una materia prima rica en proteínas, con el fin de obtener un bioestimulante rico en péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres. Estos productos



tienen diversas propiedades funcionales propias de sus componentes, como son la alta solubilidad, poder emulsionante, espumante, saborizante, etc. [20]

Sus componentes principales son péptidos y aminoácidos. Los péptidos tienen como principal objetivo el aporte de nitrógeno al suelo y plantas, aunque sus beneficios van más allá que un simple aporte nutricional, como su gran estabilidad, buena absorción por parte de las plantas, alta solubilidad, efecto antioxidante, hormonal y quelante. Por su parte, los aminoácidos destacan por su rápido efecto bioestimulante debido a su alta absorción en respuestas como estimulación del crecimiento radicular, expresión de clorofila... Así, mediante una aplicación conjunta o en su caso un producto que sea rico en ambos, provocará una acción bioestimulante en las plantas [21].

Estos hidrolizados ricos en aminoácidos y péptidos han despertado un gran interés en el sector agronómico, principalmente debido a que son una fuente rica en nitrógeno biodisponible. No obstante, no es el único beneficio que aportan, pues estos productos ayudan a mejorar el rendimiento de los cultivos, calidad de sus productos, control del uso de riego debido a que ayudan al estrés abiótico, oxidativo, salino, etc., y también favorecen la conservación y estímulo de la actividad microbioma del suelo.

La capacidad de las plantas para adquirir aminoácidos y péptidos se ha demostrado en condiciones de laboratorio y de campo para las plantas. Muchos factores, como la competencia con microorganismos o la concentración de aminoácidos en el suelo, influyen en el nivel de absorción de aminoácidos desde el suelo. Los resultados más recientes han demostrado que los dipéptidos, tripéptidos e incluso oligopéptidos pueden ser utilizados directamente por plantas sin digestión previa. Los aminoácidos en el suelo se encuentran principalmente en forma de proteínas y, por tanto, la capacidad de los aminoácidos de ser absorbidos por las raíces está íntimamente ligada a su disponibilidad en la rizosfera y a la actividad de los transportadores de aminoácidos y péptidos en las membranas celulares en contacto con la solución del suelo [22].



Para acceder a esta fuente de nitrógeno, la acción de las proteasas es fundamental. La digestión de las proteínas está asegurada por estas enzimas de origen microbiano, lo que hace que las plantas dependan de la actividad de los microorganismos y por enzimas secretadas por las raíces de las plantas. Por otro lado, las proteasas secretadas por las raíces de las especies vegetales pertenecen a la familia de las cisteín proteasas; su actividad es máxima a pH 10 y operan principalmente como endopeptidasas [23].

La captación de aminoácidos por las plantas es energéticamente más ventajosa, en comparación con la absorción de NO_3^- ; NH_4^+ o fijación biológica, porque la planta no necesita energía para asimilar el nitrógeno absorbido y luego incorporarlo a los aminoácidos [24]

Se ha demostrado que los hidrolizados proteicos son clave en funciones como bioestimulantes a través de la modulación de los procesos moleculares y fisiológicos de las plantas que desencadenan el crecimiento, aumentan el rendimiento y alivian el impacto del estrés abiótico en los cultivos [25,26].

Los tipos de estrés abiótico incluyen salinidad, metales pesados, estrés térmico, escasez de nutrientes y estrés hídrico [27,28]. Los efectos directos de los hidrolizados proteicos en las plantas incluyen la estimulación del metabolismo del carbono y el nitrógeno, así como la regulación de la absorción de nitrógeno mediada por enzimas clave involucradas en el proceso de asimilación de nitrógeno y la regulación de la actividad de tres enzimas involucradas en el ciclo del ácido tricarbóxico (citrato sintasa, isocitrato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa) [21,29]. Los hidrolizados proteicos también podrían interferir con las actividades hormonales, debido a la presencia de péptidos bioactivos [29]. Varios estudios han demostrado que muchos productos comerciales obtenidos a partir de hidrolizados proteicos provocan actividades similares a las hormonas (auxina y giberelinas), promoviendo el crecimiento de raíces y brotes y, por lo tanto, la productividad de los cultivos [29,30].

Además, del efecto directo de los hidrolizados de proteínas, también se han demostrado efectos indirectos sobre el crecimiento y la nutrición vegetal cuando se aplicaron a suelos y plantas [21]. Así pues, las



aplicaciones foliares y radicales mejoran la absorción y la eficiencia del uso de macro y micronutrientes [29,30].

La actividad bioestimulante observada tras la aplicación de hidrolizados proteicos actúan directa e indirectamente a una mejora de la salud vegetal mediada por microorganismos [31]. En la actualidad, se acepta comúnmente que los microorganismos pueden mejorar el rendimiento de las plantas al alterar los procesos fisiológicos y de desarrollo, lo que resulta en una mayor absorción de nutrientes y agua, así como una mayor resiliencia contra los factores de estrés ambiental [32].

Varios estudios demuestran los efectos positivos que ejercen los hidrolizados proteicos y los aminoácidos, para inducir el metabolismo secundario de las plantas y aumentar las respuestas de defensa de las plantas y la tolerancia al estrés, incluida la salinidad, la sequía, la temperatura y las condiciones oxidativas [33,34].

Los aminoácidos se consideran precursores y constituyentes de proteínas, que son importantes para la estimulación del crecimiento celular [35]. Contienen grupos tanto ácidos como básicos actuando como tampones, que ayudan a mantener un valor de pH favorable dentro de la célula vegetal [36]. Además, los aminoácidos son un bioestimulante bien conocido que tiene efectos positivos sobre el crecimiento y el rendimiento de las plantas y mitiga significativamente las lesiones causadas por el estrés abiótico [37].

Respecto a las funciones biológicas de aminoácidos concretos, se ha demostrado que, por una parte la aplicación de cisteína, fenilalanina, glicina, glutamato y una mezcla de estos aminoácidos (Glu + Phe + Cys + Gly), pueden incrementar el contenido de nitratos, aminoácidos y nitrógeno total en las hojas de soja, posiblemente debido a la acción de señalización de estos aminoácidos. Por otra parte, la aplicación exógena de glicina mejora el crecimiento y la supervivencia de una amplia variedad de plantas sometidas a estrés [38].

La aplicación de glutamato y/u ornitina, precursores de prolina, también puede mejorar la tolerancia al estrés salino [39], mientras que la arginina, juega un importante papel en el almacenamiento y transporte de



nitrógeno en las plantas, demostrándose que se acumula bajo estrés abiótico y biótico [40,41].

Respecto a los aminoácidos alifáticos, los componentes del aroma de la fruta se sintetizan principalmente utilizando aminoácidos como precursores (valina, leucina, isoleucina, alanina y aspartato). Se ha probado que, en los tratamientos con aplicación de aminoácidos alifáticos, se ha conseguido aumentar el contenido total de aroma en el fruto, así como la expresión por la planta de diferentes enzimas y moléculas relacionadas con ello. Así pues, una aplicación foliar de aminoácidos, especialmente rica por aminoácidos alifáticos, mejora el metabolismo del aroma y puede utilizarse en la producción para mejorar la calidad de la fruta a escala comercial [42].

Los hidrolizados proteicos, debido a su alto contenido en aminoácidos libres y péptidos, presentan innumerables ventajas independientemente de su vía de aplicación en las plantas, ya sea foliar o radicular, mejorando la disponibilidad de nutrientes, crecimiento radicular, eficiencia y adaptación ante condiciones adversas y germinación de semillas. Por otra parte no solamente afecta a la adaptación y crecimiento de las plantas, que se ha comprobado que mejoran parámetros de calidad del fruto como propiedades organolépticas, contenido de compuestos nutricionales, antioxidantes, etc. Como se ha desarrollado anteriormente, se ha demostrado que los hidrolizados proteicos afectan directamente a los microbiomas de las plantas, provocando cambios en composición y actividad en ellos, aunque también afectan a taxones específicos beneficiosos para resistir el estrés abiótico o mejora nutricional y rendimiento de las plantas [43].



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

2. OBJETIVOS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

2. OBJETIVOS

El objetivo de este capítulo de la Tesis es el desarrollo de bioprocesos para la creación de nuevos productos con capacidad de bioestimulación ambiental, a partir de okara con gran potencial nutricional y funcional en el ámbito de la agricultura.

1. Caracterizar físico-químicamente los residuos de okara.
2. Desarrollar bioprocesos de obtención.
 - Tecnología hidrolítica directa.
 - Tecnología fermentativa.
3. Producir y caracterizar químicamente los nuevos productos bioestimulantes agronómicos ambientales obtenidos a partir de okara, enriquecidos en compuestos bioactivos (isoflavonas, péptidos y aminoácidos).



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

3. ARTÍCULOS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb



Protease technology for obtaining a soy pulp extract enriched in bioactive compounds: isoflavones and peptides



Angel Orts^a, Elisa Revilla^{a,*}, Bruno Rodriguez-Morgado^a, Angélica Castaño^a, Manuel Tejada^b, Juan Parrado^a, Albert García-Quintanilla^a

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Pharmacy, University of Seville C/ Prof. Garcia Gonzalez 2, Seville 41012, Spain

^b Department of Crystallography, Mineralogy and Agricultural Chemistry, ETSIA, University of Seville. Ctr. Utrera Km 1, Seville 41013, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Food science
Food chemistry
Enzymatic extraction
Subtilisin
Okara
Isoflavone
Antioxidant
Bioactive peptides

ABSTRACT

This work presents a new bioprocess process for the extraction of bioactive components from soy pulp by-product (okara) using an enzymatic technology that was compared to a conventional water extraction. Okara is rich in fiber, fat, protein, and bioactive compounds such as isoflavones but its low solubility hampers the use in food and fertilizer industry. After the enzymatic attack with endoproteases half of the original insoluble proteins were converted into soluble peptides. Linked to this process occurred the solubilization of isoflavones trapped in the insoluble protein matrix. We were able to extract up to 62.5% of the total isoflavones content, specially aglycones, the more bioactive isoflavone forms, whose values rose 9.12 times. This was probably due to the increased solubilization and interconversion from the original isoflavones. In conclusion, our process resulted in the formulation of a new functional product rich in aglycones and bioactive peptides with higher antioxidant potency than the original source. Therefore, we propose that the enzymatic extraction of okara bioactive compounds is an advantageous tool to replace conventional extraction.

1. Introduction

The soy pulp, also called okara, is the insoluble by-product obtained during the production of soymilk and tofu. Despite its high content in proteins, fats, carbohydrates (including fiber), phytochemicals and minerals (Redondo-Cuenca et al., 2008; Villanueva-Suarez et al., 2013), okara is generally floccinaucinihilipilificated. Two main obstacles hamper its wider use in food industry. The first reason is that raw okara has to be processed quickly due to its high moisture content (about 80%), which leads to a fast fermentation process. Unfortunately, current methods to preserve okara, such as heat drying, lyophilization or pressing, still cannot guarantee a profitable practice at an industrial scale (Mateos-Aparicio, 2012). The second problem is that most of the nutrients in okara remain in the insoluble form, decreasing its nutritional value. With these arguments, okara is hardly used for human consumption in Western countries, and basically just applied as animal food, plant biostimulant, soil fertilizer (Rinaldi et al., 2000), or more recently, in the obtention of bioethanol.

Therefore, its introduction in the productive sector requires new strategies to valorize it and make it attractive. Our aim in this study was

to develop a simple process for the obtention of such a product with new functional properties.

It is largely known that soy and its derivatives have several polyphenol compounds, such as isoflavones (Galanakis, 2012) that can be beneficial for promoting human health (Cederroth and Nef, 2009; Messina et al., 1994). In this sense, okara contains all the remnants that do not pass to soymilk and up to 40% of the soy isoflavones, despite this percentage may vary depending on the type of soy and elaboration method (Jackson et al., 2002; Rinaldi et al., 2000; Wang and Murphy, 1996). Isoflavones are classified as phytoestrogens and have shown potential clinical implications preventing diabetes, cancer, osteoporosis, neurodegeneration or cardiovascular diseases (Kalaiselvan et al., 2010). Up to date, twelve different types of isoflavones have been isolated from soybeans and they are grouped in four main categories: aglycones (daidzein, glicitein, genistein), β -glucosides (daidzin, glicitin, genistin) and their malonyl- and acetyl-derivatives (Wang and Murphy, 1994). Since isoflavones have hydrophobic interactions with the proteins where they are embedded, a direct correlation between the solubilization of proteins and isoflavones has been observed in okara (Jankowiak et al., 2014a), suggesting the idoneity of proteolytic treatments for isoflavone recovery.

* Corresponding author.

E-mail address: ertorres@us.es (E. Revilla).

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01958>

Received 7 February 2019; Received in revised form 23 May 2019; Accepted 13 June 2019

2405-8440/© 2019 Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



Soy is recommended for human and animal consumption due to the high biological value of its proteins. Besides, it is considered to be the cheapest source of proteins available worldwide, which may help solve numerous feeding and agronomical problems. On top of that, soybean-based products such as okara are a potential source of bioactive peptides that can be obtained using proteolytic enzymes. These peptides are of particular interest due to their antihypertensive, antioxidant, anticancer, antimicrobial or antidiabetic properties (Agvei, 2015; Puchalska et al., 2014a, 2014b, 2017). Several studies have analyzed the antioxidant properties (Yokomizo et al., 2002) and health-promoting effects of bioactive peptides (Jiménez-Escrig et al., 2010; Nishibori et al., 2017) and fiber (Jiménez-Escrig et al., 2008) derived from okara with promising results both *in vitro* and in animal models.

The extraction of isoflavones using alcohol has been proposed by other authors and is maximal in theory (Jankowiak et al., 2014b) but expensive and not practical. Therefore, using water as extractant is preferred (Jankowiak et al., 2014a) despite the lower yield. In this article we hypothesized that the direct enzymatic hydrolysis of crude okara in aqueous solutions would enhance the extraction of isoflavones while also favoring the generation of bioactive peptides, thus contributing to the affordable formulation of a new product with higher antioxidant potency and increased value for the food and fertilizer industry.

2. Materials and methods

2.1. Okara and enzymes

Okara from the same production batch was used for all experiments and it was supplied by Soria Natural S.L. (Garray, Soria, Spain). Briefly, soybeans were washed to eliminate impurities, soaked in cold water for 30 h at 33.3% (w/v) and heated up at 95 °C for 5 min to inactivate any trypsin inhibitors and lipoxigenase present. Next, the grains were grinded in the presence of hot water at a 1:1 proportion (w/v) and soymilk was obtained by pressure and filtration, with the remaining by-product being the soy pulp (okara). Okara hydrolysates were made using a liquid formulation of the serine-endoprotease subtilisin (EC 3.4.21.62) from Biocon (Les Franqueses del Valles, Barcelona, Spain) with an enzyme activity of 100,000 AU/g. The enzyme was stored at 4 °C.

2.2. Analysis of the chemical composition of okara

The chemical composition of the okara used was analyzed by the Spanish Association for Standardisation and Certification (AENOR) laboratory (Madrid, Spain).

The ash content was analysed according to standard AOAC methods (2016). The protein load was determined using the Kjeldahl procedure (AOAC, 2016) and multiplying the total nitrogen content in a protein by the conversion factor 5.80, which is applicable to most plant proteins. Crude fat was determined gravimetrically after extraction with hexane for 12 h in a Soxhlet extractor (Clemente et al., 1997). Total soluble carbohydrates were determined after extraction with a mixture of ethanol/water (2/3) for 2 h. After centrifugation at 4,000 g (MiniSpin, Eppendorf), the supernatant was filtered through a no. 1 Whatman paper and total soluble sugars were estimated colorimetrically at 490 nm (GeneQuant 1300, General Electric) by the phenol-sulphuric acid method, using a standard curve of glucose (Dubois et al., 1956). Organic matter was determined by the dry combustion method (MAPA, 1986).

2.3. Preparation of okara extracts

Crude okara was diluted in water to a final concentration of 10% (dry w/v). Enzymatic hydrolysis using water as extractant was performed at pH 4.0, 6.0, 8.0 and 10.0 according to the pH-stat method (Brocklehurst, 2002). Conditions relative to the amount of enzymes, enzyme type, times of incubation and temperatures used were optimized in preliminary experiments not shown here. Briefly, incubation with 0.3% of liquid

subtilisin (v/v) for 2 h at 55 °C without stirring was chosen. This temperature is optimal for the subtilisin activity and kills most of the microorganisms present in the sample, thus deferring spoilage while contributing to the solubilization process. It has been described that after one hour at that temperature subtilisin retains 90% of its activity (Sigma Aldrich, 1996) and enzyme variants with increased stability have been developed too (Takagi et al., 1990). The samples were later centrifuged for 40 min at 4 °C and 10,000 g (Avanti J-26XP, Beckman-Coulter). The soluble part (hereafter also referred as hydrolyzed okara) was heat dried and analyzed, while the pellet was weighted and discarded. As negative controls, we performed the same extractions without any enzyme, using water only (hereafter also referred as soluble okara).

2.4. Protein quantification

Protein determinations were performed according to Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard.

2.5. Analysis of the molecular weight of soluble proteins

The protein content of the soluble fraction of okara was studied by size-exclusion chromatography using an ÄKTA-purifier FPLC system (GE Healthcare), filtration chromatography and a Superdex Peptide 10/300GL column, with an exclusion range between 700 and 10,000 Da that discriminates free peptides and amino acids. Samples were centrifuged at 12,000 g for 30 min at room temperature (MiniSpin, Eppendorf) to remove insoluble molecules, and the supernatant was passed through a 0.2 µm filter and loaded into a 0.1 mL loop connected to an ÄKTA-purifier system. The column was equilibrated, and eluted with 0.25 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) in isocratic mode, at a flow-rate of 0.5 mL/min, and proteins/peptides were detected at 280 and 215 nm with a GE Healthcare UV900 module coupled to the column elution.

2.6. Analysis of the amino acid composition

The amino acid composition was determined by reversed-phase HPLC analysis of 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) derivatives using γ-aminobutyric acid as the internal standard. The samples were hydrolyzed using 6N HCl/1% (w/v) phenol vapor at 110 °C for 24 h in a vacuum (Bidlingmeyer et al., 1984). The amino acids were treated with AQC to form AQC derivatives using the commercial method described by Waters AccQ-Tag, which were then analyzed using a Waters HPLC system (Millipore Ltd) fitted with a reversed-APase C18 column. For cysteine estimation, aliquots were first oxidized with performic acid and analyzed as above.

2.7. Analysis of isoflavones by UHPLC-MS/MS

Isoflavones were analyzed using a Thermo Scientific liquid chromatography system consisting of a quaternary UHPLC Dionex Ultimate 3000 SD, connected to a quadrupole-Orbitrap Qexactive hybrid mass spectrometer with HESI ionization probe. Xcalibur software was used for instrument control and data acquisition. Separation was performed on a C18 column Xbridge BEH (2.1 × 100 mm, 2.5 µm) (Waters). The injection volume was 5 µL and the flow rate was 0.4 mL/min. Two different solvents were used as mobile phase: solvent A (water with 0.1% formic acid) and solvent B (acetonitrile with 0.1% formic acid). The following gradient was used: 0–1 min 5% of solvent B, 1–10 min from 5% to 100% of solvent B, 10–12 min 100% of solvent B, then 5% of solvent B up to 15 min. The Parallel Reaction Monitoring (PRM) was acquired in positive mode and a resolution of 17500 at *m/z* 200 FWHM, with an isolation window of 1 *m/z*.

The HESI source parameters were as follows: spray voltage 3.5 kV, S lens level 50, capillary temperature of 320 °C and probe heater temperature of 400 °C, sheath flow, auxiliary flow and sweep gas flow (N₂) of 50, 13 and 2 arbitrary units, respectively.



Quantitation was performed selecting the following fragments: m/z 255.06519 for daidzin, acetyl daidzin and malonyl daidzin, m/z 285.07575 for glycitin, acetyl glycitin and malonyl glycitin, m/z 271.06010 for genistin, acetyl genistin and malonyl genistin, m/z 137.02320 for daidzein, m/z 242.05736 for glycitein and m/z 153.01824 for genistein. External calibration was used for the majority of the isoflavones, except for the malonyl and acetyl derivatives, where the calibration curves were estimated as daidzin, glycitin, and genistin, respectively. TraceFinder 3.3 software was used for treatment of data.

2.8. Antioxidant capacity assays

The ability of okara samples to reduce Fe^{+3} to Fe^{+2} was determined by the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assay (Benzie and Strain, 1996) at pH 3.6. Absorbance was measured at 734 nm and Trolox (Merck Millipore) was used for the standard curve.

2.9. Statistical analysis

Three independent experiments were performed and measured by triplicate using the same okara batch. Data was analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA) using Statgraphics Centurion XVIII followed by Tukey's post-hoc test for multiple comparisons in order to confirm differences among the groups. A p -value < 0.001 was considered significant.

3. Results and discussion

3.1. Chemical composition of okara

The chemical composition of crude okara can vary depending on the soybean variety and method of obtention during soymilk production. Therefore, a prior characterization of the dried product was performed as shown in Table 1. In our case, crude okara contained 76.5% of humidity, which is in agreement with the literature and predisposes okara to fast spoilage. On the other hand, proteins represented around 40% of the total dry weight. However, around 90% of them were insoluble, reflecting their poor bioavailability. When soluble proteins were analyzed by exclusion chromatography (Fig. 1, Table 2), about 90% of them corresponded to proteins of more than 10 kDa, while almost 7% were small peptides and free amino acids.

The whole amino acid composition of dried okara (which includes both soluble and insoluble protein content) was further analyzed (Table 3). Demonstrating the high potential value of its protein, we observed that nearly 30% of the amino acids found were essential for the human diet. Among these, branched-chain amino acids (BCAA) represented 15% of the total, and their presence in diets may have beneficial effects on the ageing process, muscle synthesis, body weight and glucose homeostasis (Bifari and Nisoli, 2017). Aromatic amino acids summed a 6% and most remarkably, hydrophobic amino acids counted for around one third of all amino acids detected.

Most soluble proteins are removed during soymilk production. These proteins contain less than 25% of hydrophobic amino acids (Puchalska et al., 2017). Therefore, it is expected that proteins and peptides with a higher content of hydrophobic amino acids are retained in okara. Interestingly, the prevalence of hydrophobic amino acids in bioactive peptides has been related to their antioxidant properties (Kitts and Weiler, 2003; Puchalska et al., 2017; Samardi and Ismail, 2010; Zhang et al., 2012). Altogether, these values reflect the high potential for generating bioactive peptides from okara.

Carbohydrates comprised nearly 30% of the total dry weight and for the most part were insoluble fiber. On the other hand, fats accounted nearly one fourth of the total weight (23.6%) and the most abundant oligoelements were K, P, S, Mg and Ca. Despite okara is rich in organic molecules, most of its proteins, carbohydrates and biomolecules embedded inside are insoluble, which hampers its use as a source of

Table 1
Chemical composition of okara (dry matter) used.

OKARA	Dried okara	Water extraction	Subtilisin extraction
Moisture (%)	0.0	0.0	0.0
Dry matter (%)	100.0	100.0	100.0
C	53.7	41.8	44.8
N	6.6	4.2	10.6
Proteins (%N x 6.25)	41.2	25.9	66.5
Insoluble proteins	36.9	0.0	0.0
Soluble proteins	4.4	100.0	100.0
Carbohydrates (%)	29.5	50.2	21.4
Insoluble fiber	26.0	4.9	5.1
Soluble fiber	2.8	6.0	4.9
Starch	0.5	0.5	0.5
Fats (%)	23.6	4.6	2.2
Ashes (%)	4.1	14.1	6.6
Macroelements (g/100 g)			
K	0.9	4.5	1.7
P	0.7	2.1	1.1
Na	0.4	1.0	0.6
Mg	0.2	0.7	0.4
Ca	0.2	0.3	0.3
Microelements (mg/100 g)			
Fe	1.3	0.7	10.2
Mn	1.1	0.2	7.2
Zn	0.6	0.6	4.7
Cu	0.3	0.3	0.4

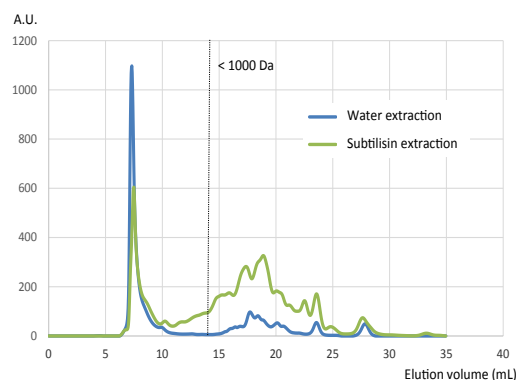


Fig. 1. Chromatography profile of the soluble protein content of okara according to its molecular weight using a Superdex Peptide 10/300GL column.

Table 2
Distribution of the soluble protein content of okara according to its molecular weight using a Superdex Peptide 10/300GL column.

Molecular weight (Da)	Water extraction (%)	Subtilisin extraction (%)
>10,000	91.14	7.85
10,000–5,000	1.09	15.87
5,000–1,000	0.80	0
<1,000	6.98	75.74

functional molecules. For this reason, we reasoned that the enzymatic hydrolysis would enable the extraction of compounds with functional activity, such as isoflavones, bioactive peptides and amino acids, hence contributing to the formulation of a new product with added value.

3.2. Chemical composition of the water extract and subtilisin extract of okara

The chemical composition of the soluble extracts (treated with subtilisin or only with water) was analyzed after heat drying the samples (Table 1). Taking into account that the extraction efficiency at pH 10.0 was 30.4% for the subtilisin treatment and 12.6% for the water control



Table 3

Whole amino acid composition from dry matter of okara used in the experiments. Essential amino acids are in bold. N.D.: not determined.

	(% ng)
Glu + Gln	19.27
Asp + Asn	12.20
Leu	7.84
Lys	6.88
Arg	6.62
Ser	6.35
Pro	5.88
Phe	5.44
Ala	5.04
Gly	4.79
Thr	4.19
Val	4.12
Ile	3.79
His	2.87
Tyr	2.83
Met	1.40
Cys	0.49
Trp	N.D.

(Fig. 2A), we were able to extract 49.1% of the total protein with the subtilisin treatment, compared to only 7.9% with water alone. As expected, no significant differences were observed in the extraction of carbohydrates (22.9% with subtilisin vs. 21.4% with water) and fats (2.9% with subtilisin vs 2.5% with water).

3.3. Effect of pH and subtilisin treatment on the solubilization of okara

Unless stated otherwise, previous experiments were carried out at the starting pH value of 6.7, which corresponds to the initial pH of okara, without pH control. However, we wanted to check the effect of different pH values on the solubilization of okara. As shown in Fig. 2A, the solubility was minimal at pH 4.0 and increased at higher pH values for both the aqueous controls and the 0.3% subtilisin hydrolyzed extracts. This data suggests that alkaline pH favors solubilization. After the treatment, the enzymatic extracts reached a solubility of 27.3% at pH 8.0 and 30.4% at pH 10.0, respectively, despite that difference was not statistically significant. This represented an additional 17.1% and 17.8% solubilization at pH 8.0 and 10.0, compared to their respective controls, and is consistent with the optimal pH range activity for subtilisin (pH 7.5–10.0). At acidic pH values subtilisin samples yielded an extra 11.2–10.4% than the controls. Overall, the solubilization achieved with the subtilisin treatments at pH 8.0 and 10.0 was significantly much higher than any of the controls at any pH value tested, hence justifying the use of subtilisin in the alkaline pH range.

3.3.1. Effect of pH and subtilisin treatment on the solubilization of proteins

After testing the enzymatic treatment at different pH values we observed that the solubilization of proteins increased at higher pH values, being maximal at pH 10.0 (Fig. 2B). The addition of subtilisin doubled the amount of protein extracted compared to the respective controls at all pH values tested. In particular, the increase was 2.5 fold at pH 4.0, 2.9 fold at pH 6.0, 2.1 fold at pH 8.0, and 2.2 fold at pH 10.0, which represents almost 200 mg extra of solubilized protein per g of dry okara.

When the soluble proteins of the enzymatic extract at pH 10.0 were analyzed by molecular exclusion chromatography and compared to the negative control extracted with water only (Fig. 1, Table 2) we observed that proteins with a molecular weight greater than 10 kDa decreased from 91.14% to only 7.85%, while the small protein/peptide (1–10 kDa) and small peptide/amino acid (<1 kDa) fractions increased from 1.09% to 15.87% and 6.98%–75.74%, respectively.

It is worthy to mention that bioactive peptides, which usually consist of 2–20 amino acids, may be generated by proteolytic digestion and therefore be contained in these fractions. The biological and antioxidant

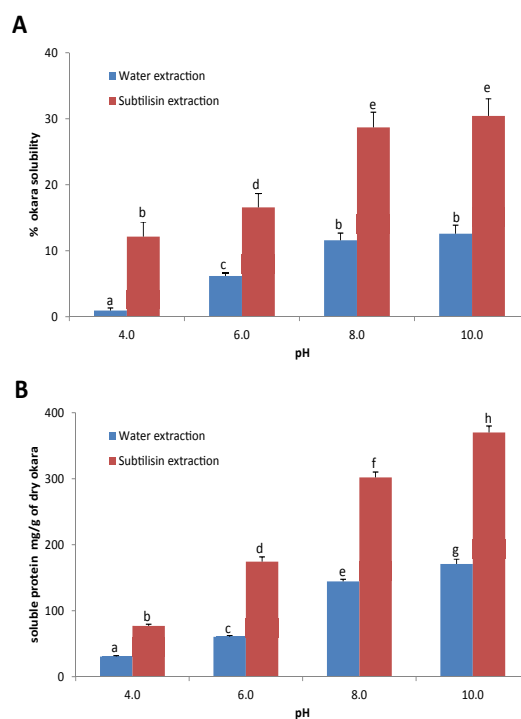


Fig. 2. A. Solubility of okara at different pH values after subtilisin treatment or using water as negative control. B. Soluble protein (mg/g of dry okara) extracted after subtilisin treatment at different pH values or using water as negative control. Bars with different letters are significantly different ($p < 0.001$).

properties of these peptides are related to their content in hydrophobic and aromatic residues (Kitts and Weiler, 2003; Puchalska et al., 2017; Samardi and Ismail, 2010; Zhang et al., 2012), whilst the abundance of hydrophobic amino acids also contributes to the bitter taste of soy (FitzGerald and O'Cuinn, 2006). Strikingly, subtilisin hydrolysates of soy protein have been found to exhibit the highest bitter taste compared to hydrolysates with other proteases (Seo et al., 2008), thus reflecting their idoneity for the potential generation of bioactive peptides. Taken together, these results underscore the adequacy of the subtilisin treatment to solubilize the protein content of okara and its potential to generate bioactive peptides.

3.3.2. Effect of pH and subtilisin treatment on the solubilization of isoflavones

The solubilization of isoflavones was measured by mass spectrometry both in the presence and absence of subtilisin. Table 4 shows the total amount of isoflavones, aglycones, β -glucosides, and acetyl and malonyl derivatives extracted at different pH values. In general, we observed that alkaline pH values exerted the strongest effect on the solubilization of isoflavones. Thus, when the pH increased from 8.0 to 10.0 the total amount of solubilized isoflavones raised an extra 28% (763.40 vs 597.54 $\mu\text{g/g}$ of dry okara) in the presence of subtilisin and 38% (469.89 vs 338.97 $\mu\text{g/g}$ of dry okara) in the control samples. Compared to their water-soluble counterparts, the addition of subtilisin at pH 8.0 augmented the extraction of total isoflavones by 76% (597.54 vs 338.97 $\mu\text{g/g}$ of dry okara) and 62% at pH 10.0 (763.40 vs 469.89 $\mu\text{g/g}$ of dry okara). Remarkably, at pH 10.0 the subtilisin treatment increased 9.1 times the total amount of aglycones extracted (174.83 vs 19.18 $\mu\text{g/g}$ of dry okara). This can be due to an increased efficiency of the extraction at pH 10.0, but also to a higher interconversion of the thermally unstable conjugated forms (malonyl and acetyl glucosides) to their respective heat-stable non-conjugated β -glucosides and aglycones (Mathias et al.,



2006). Importantly, the higher recovery of aglycones is desired, since they are considered to be the most bioactive forms of isoflavone, due to their moderate lipophilicity that allows them to be better absorbed in the gut (Murota et al., 2002).

For each of the aglycones measured (daidzein, genistein and glycitein), for the β -glucosides daidzin and genistin, and for total isoflavones, the highest solubilization values were achieved at pH 10.0. For the β -glucoside glycitein the maximum solubilization (96.04 $\mu\text{g/g}$ of dry okara) was achieved at pH 6.0 in the presence of subtilisin. Malonyl and acetyl derivatives increased gradually with pH and reached the highest values at pH 8.0. However, at pH 10.0 they were almost inexistent, except for the malonyl genistin extracted with subtilisin, which remained high (105.39 $\mu\text{g/g}$ of dry okara) despite some interconversion to its non-conjugated forms. No other major differences were observed for the malonyl and acetyl derivatives in the presence or absence of subtilisin, hence indicating a small effect of the enzyme on their extraction.

In the okara hydrolyzed with subtilisin at pH 10.0, malonyl-derivatives accounted for 14.0% of the total isoflavones extracted, β -glucosides for the 63.1% and aglycones for the 22.9%. Also, genistein and its β -glucosides and malonyl-derivatives represented 63.9% of all the isoflavones extracted. The daidzein family represented one third of the total, while the glycitein-based isoflavones only summed 2.8%. Similar percentages were found at pH 8.0, being 60.8% genistein-based isoflavones, the remaining 38.3% daidzein-derivatives, and only 0.9% glycitein and its family. However, at pH 6.0 glycitein-based isoflavones, mainly in the glycitein form, accounted for half of the total isoflavones extracted in the presence of subtilisin. In agreement with other authors (Mathias et al., 2006), this behavior may be related to the extra H_3CO -group present in the glycitein molecule and reflects how the chemical structure of isoflavones dictates their stability under variable pH conditions, which may be used to modulate the solubility of different isoflavone molecules.

Malonyl genistin and malonyl daidzin are the most abundant forms in raw soybeans (Mathias et al., 2006) but their lower thermal stability favors their conversion into non-conjugated forms. Thus, the solubilization of isoflavones during our enzymatic treatment involved an incubation step at 55 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h. At this temperature isoflavones are relatively stable (Xu et al., 2002). Besides, it may increase the solubility of aglycones (Wu et al., 2010) and also favor the conversion of daidzin and genistin into their bioactive aglycone forms (Muliterno et al., 2017), particularly at pH 10.0. However, Jankowiak et al. (2014a) did not observe any significant difference in the total amount of isoflavones extracted within the 20–95 $^{\circ}\text{C}$ range, despite a significant decrease of the malonyl-glucosides above 65 $^{\circ}\text{C}$.

Similar to them (Jankowiak et al., 2014a), we also used water as extractant instead of ethanol. Whereas they tested water to dry okara

ratios ranging from 20:1 till 100:1, we just used a 10:1 ratio. However, only when they assayed the 20:1 ratio at pH 10.0, they were able to increase the aglycone content up to 340 $\mu\text{g/g}$ of dry okara approximately and recover 911 μg of total isoflavones per gram of dry okara. In our hands, water extraction alone did not recover high yields, and we only obtained 19.18 μg of aglycones and 469.89 μg of total isoflavones per gram of dry okara at pH 10.0. Since both methods are theoretically equivalent, the differences in the aglycone and isoflavone content at pH 10.0 without any enzymatic treatment may be essentially attributed to the type of soy used and the processing conditions during soymilk manufacture, as well as the distinct liquid-to-solid ratio used (10:1 in our case and 20:1 for Jankowiak et al.). It should be expected to increase our aglycone and total isoflavone content to some extent by raising the liquid-to-solid ratio from 10:1 to 20:1. However, the addition in our case of 0.3% subtilisin increased the total amount of isoflavones solubilized (763.4 $\mu\text{g/g}$ of dry okara) by 62.5% and raised the aglycone content 9.1 times up to 174.8 $\mu\text{g/g}$ of dry okara, whereas for Jankowiak et al. their highest extraction yield using 70% ethanol increased their isoflavone content only by 11.7% (1018 $\mu\text{g/g}$ of dry okara) and the aglycone levels barely added a 5% (357 $\mu\text{g/g}$ of dry okara) extra.

3.4. Protein/isoflavone relationship in okara extracts

Remarkably, we found a direct correlation between the amount of proteins solubilized and total isoflavones extracted at all pH values tested, either with the subtilisin treatment or the water extraction (Fig. 3). However, after the enzymatic treatment, the yield of isoflavones extracted was lower than expected for the quantity of proteins solubilized. This reinforces the notion that the solubilization of isoflavones was an indirect effect provoked by the solubilization of proteins and that some isoflavones may remain trapped in the insoluble fiber matrix too, in agreement with previous works (Jankowiak et al., 2014a).

3.5. Reducing activity of okara extracts

When the specific ability of the samples to reduce Fe^{+3} to Fe^{+2} was measured using the FRAP technique (Fig. 4), we found that the reducing activity of the samples was strongly affected by the pH, despite the fact that samples hydrolyzed with subtilisin were higher than their respective controls. At acidic values, the effect of the enzymatic treatment was considerable (3.2-fold at pH 4.0 and 2.4-fold at pH 6.0 over their respective controls), but slight at basic pH values, where it only represented a 1.2-fold at pH 8.0 and 1.1-fold at pH 10.0. Overall, such antioxidant capacity increased at higher pH values in all samples tested, except for the subtilisin extract at pH 8.0 that was lower than its equivalent at pH 6.0. That anomaly might be due to the solubilization of other

Table 4

Effect of the subtilisin treatment at different pH values on the extraction of isoflavones from okara. Values with different letters are significantly different ($p < 0.001$).

Isoflavones ($\mu\text{g/g}$ dry okara)	Water extraction				Subtilisin extraction			
	pH4	pH6	pH8	pH10	pH4	pH6	pH8	pH10
Aglycones	0.00 \pm 0.0	0.01 \pm 0.0	1.70 \pm 0.1	19.18 \pm 1.2	0.02 \pm 0.0	0.06 \pm 0.0	1.05 \pm 0.2	174.83 \pm 13.7
Daidzein	0.00 \pm 0.0	0.01 \pm 0.0	0.71 \pm 0.1	11.06 \pm 0.7	0.01 \pm 0.0	0.04 \pm 0.0	0.57 \pm 0.0	77.48 \pm 5.4
Genistein	0.00 \pm 0.0	0.00 \pm 0.0	0.31 \pm 0.0	7.15 \pm 0.4	0.01 \pm 0.0	0.01 \pm 0.0	0.19 \pm 0.0	82.29 \pm 6.6
Glycitein	0.00 \pm 0.0	0.00 \pm 0.0	0.68 \pm 0.0	0.97 \pm 0.0	0.00 \pm 0.0	0.01 \pm 0.0	0.29 \pm 0.1	15.06 \pm 1.7
β -glucosides	26.65 \pm 2.3	50.93 \pm 4.1	134.60 \pm 24.6	445.81 \pm 25.8	29.56 \pm 2.9	129.64 \pm 9.3	320.86 \pm 31.8	481.70 \pm 37.6
Daidzin	15.86 \pm 1.6	24.98 \pm 2.1	65.93 \pm 10.2	193.41 \pm 9.3	14.41 \pm 1.7	14.90 \pm 0.7	139.78 \pm 9.4	176.66 \pm 11.7
Genistin	10.22 \pm 0.6	21.31 \pm 1.6	59.34 \pm 12.4	225.81 \pm 11.4	14.62 \pm 1.2	18.70 \pm 1.4	177.81 \pm 11.2	300.03 \pm 21.1
Glycitein	0.57 \pm 0.1	4.64 \pm 0.4	9.33 \pm 2.0	26.59 \pm 5.1	0.53 \pm 0.0	96.04 \pm 7.2	3.27 \pm 1.2	5.01 \pm 0.8
Derivatives	18.13 \pm 1.4	80.22 \pm 3.7	202.67 \pm 14.3	4.9 \pm 0.8	26.56 \pm 2.1	67.08 \pm 5.3	275.63 \pm 16.4	106.87 \pm 10.2
Acetyl Daidzin	0.12 \pm 0.1	0.89 \pm 0.0	1.00 \pm 0.0	0.00 \pm 0.0	0.11 \pm 0.0	0.58 \pm 0.1	0.00 \pm 0.0	0.00 \pm 0.0
Acetyl Genistin	0.05 \pm 0.0	0.45 \pm 0.0	0.90 \pm 0.0	0.00 \pm 0.0	0.11 \pm 0.0	0.54 \pm 0.0	0.24 \pm 0.0	0.00 \pm 0.0
Acetyl Glycitein	0.01 \pm 0.0	0.10 \pm 0.0	0.12 \pm 0.0	0.00 \pm 0.0	0.02 \pm 0.0	0.08 \pm 0.0	0.01 \pm 0.0	0.00 \pm 0.0
Malonyl Daidzin	10.50 \pm 1.0	33.41 \pm 2.3	80.09 \pm 1.1	0.12 \pm 0.0	11.69 \pm 0.9	20.77 \pm 1.6	88.66 \pm 5.3	0.08 \pm 0.0
Malonyl Genistin	7.15 \pm 0.3	41.57 \pm 1.3	112.25 \pm 12.9	4.75 \pm 0.8	14.21 \pm 1.2	42.84 \pm 3.3	184.77 \pm 11.0	105.39 \pm 9.8
Malonyl Glycitein	0.30 \pm 0.0	3.80 \pm 0.1	8.31 \pm 0.3	0.03 \pm 0.0	0.42 \pm 0.0	2.27 \pm 0.3	1.95 \pm 0.2	1.40 \pm 0.4
Total Isoflavones	44.78 \pm 3.7 ^a	131.16 \pm 7.8 ^b	338.97 \pm 38.9 ^c	469.89 \pm 27.7 ^d	56.14 \pm 5.0 ^{ab}	196.78 \pm 14.6 ^c	597.54 \pm 38.4 ^f	763.40 \pm 57.5 ^e



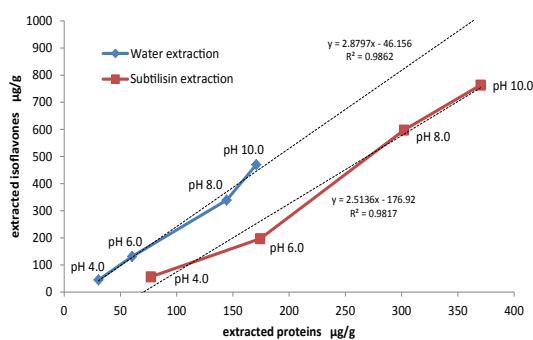


Fig. 3. Linear relationship between soluble proteins and isoflavones extracted from okara.

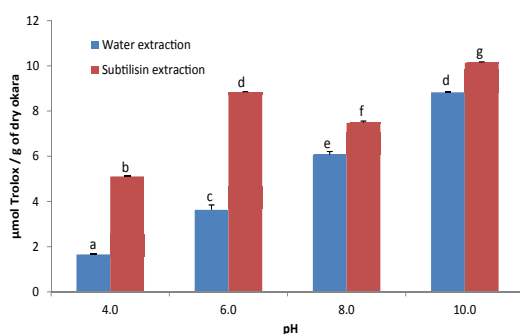


Fig. 4. Reducing activity of okara extracts at different pH values, with or without subtilisin treatment using the FRAP method. Bars with different letters are significantly different ($p < 0.001$).

compounds at pH 6.0 not investigated here.

It has been described that genistein and genistin have the highest antioxidant activities of all soy isoflavones (Lee et al., 2005). Accordingly, their elevated occurrence at pH 10.0 correlated with the highest antioxidant capacity of okara extracts at that pH value. Also, low-molecular weight peptides have been shown to have anti-oxidant activity (Jiménez-Escrig et al., 2010; Nishibori et al., 2017) that may also contribute to the total reducing activity observed in the okara extracts due to the solubilization of the protein content with the subtilisin treatment.

4. Conclusions

We developed a method for the valorization of okara based on the application of 0.3% subtilisin at pH 10.0 to 10% (dry w/v) crude okara. This approach rendered high levels of soluble isoflavones and peptides, and a linear correlation between their extractions was observed reflecting potential interactions among them. Our process skips the drying of okara, which is energy intensive and may damage its components, decreasing its properties and economic value. However, it contains an initial step at 55 °C that reduces the risk of spoilage by microorganisms and extends the half-life of crude okara. This technology avoids the use of ethanol, which is not profitable at industrial scale, but achieves comparable rates for the solubilization of proteins and isoflavones. In particular, it is noteworthy the rich content of aglycones. The subtilisin activity also facilitates the generation of bioactive peptides with potential uses in health and agriculture, which all in all results in the formulation a new functional product with high antioxidant potency. Therefore, this protocol may represent a functional alternative for the valorization of okara

potentially suitable for industrial scale-up.

Declarations

Author contribution statement

Angel Orts: Performed the experiments; Analyzed and interpreted the data.

Elisa Revilla, Albert García-Quintanilla, Angélica Castaño: Analyzed and interpreted the data; Wrote the paper.

Bruno Rodríguez-Morgado, Manuel Tejada: Conceived and designed the experiments.

Juan Parrado: Conceived and designed the experiments; Contributed reagents, materials, analysis tools or data.

Funding statement

This work was supported by Grant of Ministerio de Ciencia e Innovación, CTM2015-64354-C3-1-R, and Junta de Andalucía, Proyecto de Excelencia P11-RNM-7887.

Competing interest statement

The authors declare no conflict of interest.

Additional information

No additional information is available for this paper.

References

- Ageyi, D., 2015. Bioactive proteins and peptides from soybeans. *Recent Pat. Food, Nutr. Agric.* 7 (2), 100–107.
- AOAC International, 2016. *Official Methods of Analysis*, twentieth ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Benzie, I.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239 (1), 70–76.
- Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A., Tarvin, T.L., 1984. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J. Chromatogr.* 336 (1), 93–104.
- Bifari, F., Nisoli, E., 2017. Branched-chain amino acids differently modulate catabolic and anabolic states in mammals: a pharmacological point of view. *Br. J. Pharmacol.* 174 (11), 1366–1377.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brocklehurst, K., 2002. Electrochemical assays: the pH-stat. In: Eissenthal, R., Danson, M.J. (Eds.), *Enzyme Assays. A Practical Approach*, second ed. Oxford University Press, Oxford, pp. 157–170.
- Cederroth, C.R., Nef, S., 2009. Soy, phytoestrogens and metabolism: a review. *Mol. Cell. Endocrinol.* 304 (1–2), 30–42.
- Clemente, A., Sánchez-Vioque, R., Vioque, J., Bautista, J., Millan, F., 1997. Chemical composition of extracted dried olive pomaces containing two and three phases. *Food Biotechnol.* 11 (3), 273–291.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and substances. *Anal. Chem.* 28 (3), 350–353.
- FitzGerald, R.J., O'Cuinn, G., 2006. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. *Biotechnol. Adv.* 24 (2), 234–237.
- Galanakis, C.M., 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends Food Sci. Technol.* 26 (2), 68–87.
- Jackson, C.J.C., Dini, J.P., Lavandier, C., Rupasinghe, H.P.V., Faulkner, H., Poysa, V., Buzzell, D., DeGrandis, S., 2002. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Process Biochem.* 37 (10), 1117–1123.
- Jankowiak, L., Kantzas, N., Boom, R., Van der Goot, A.J., 2014a. Isoflavone extraction from okara using water as extractant. *Food Chem.* 160, 371–378.
- Jankowiak, L., Trifunovic, O., Boom, R., van der Goot, A.J., 2014b. The potential of crude okara for isoflavone production. *J. Food Eng.* 124, 166–172.
- Jiménez-Escrig, A., Alaiz, M., Vioque, J., Rupérez, P., 2010. Health-promoting activities of ultra-filtered okara protein hydrolysates released by in vitro gastrointestinal digestion: identification of active peptide from soybean lipoxygenase. *Eur. Food Res. Technol.* 230, 655–663.
- Jiménez-Escrig, A., Tenorio, M.D., Espinosa-Martos, I., Rupérez, P., 2008. Health-promoting effects of a dietary fiber concentrate from the soybean byproduct okara in rats. *J. Agric. Food Chem.* 56 (16), 7495–7501.



- Kalaiselvan, V., Kalaivani, M., Vijayakumar, A., Sureshkumar, K., Venkateskumar, K., 2010. Current knowledge and future directions of research on soy isoflavones as therapeutic agents. *Pharm. Rev.* 4 (8), 111–1117.
- Kitts, D.D., Weiler, K., 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharmaceut. Des.* 9 (16), 1309–1323.
- Lee, C.H., Yang, L., Xu, J.Z., Yeung, S.Y.V., Huang, Y., Chen, Z., 2005. Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides. *Food Chem.* 90 (4), 735–741.
- MAPA, 1986. *Métodos oficiales de análisis*, 1ª ed. Secretaría General Técnica del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, España, pp. 221–285.
- Mateos-Aparicio, I., 2012. Beans by-products, potential sources for functional ingredients. In: Popescu, E., Golubev, I. (Eds.), *Beans: Nutrition, Consumption and Health*. Nova Publishers Inc., New York, pp. 233–248.
- Mathias, K., Ismail, B., Corvalan, C.M., Hayes, K.D., 2006. Heat and pH effects on the conjugated forms of genistin and daidzin isoflavones. *J. Agric. Food Chem.* 54 (20), 7495–7502.
- Messina, M.J., Persky, V., Setchell, K.D.R., Barnes, S., 1994. Soy intake and cancer risk – a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr. Canc.* 21 (2), 113–131.
- Muliterno, M.M., Rodrigues, D., Sanches de Lima, F., Ida, E.L., Kurozawa, L.E., 2017. Conversion/degradation of isoflavones and color alterations during the drying of okara. *Food Sci. Technol. (N. Y.)* 75, 512–519.
- Murota, K., Shimizu, S., Miyamoto, S., Izumi, T., Obata, A., Kikuchi, M., Terao, J., 2002. Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal caco-2 cells: comparison of isoflavonoids and flavonoids. *J. Nutr.* 132 (7), 1956–1961.
- Nishibori, N., Kishibuchi, R., Morita, K., 2017. Soy pulp extract inhibits angiotensin I-converting enzyme (ACE) activity in vitro: evidence for its potential hypertension-improving action. *J. Diet. Suppl.* 14 (3), 241–251.
- Puchalska, P.M., García, M.C., Marina, M.L., 2017. Advances in the determination of bioactive peptides in foods. In: Aguilar, V., Otero, C. (Eds.), *Frontiers in Bioactive Compounds*. Bentham Science Publishers, Sharjah, UAE, pp. 24–53.
- Puchalska, P.M., García, M.C., Marina, M.L., 2014a. Identification of native angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides in commercial soybean based infant formulas using HPLC-Q-ToF-MS. *Food Chem.* 157, 62–69.
- Puchalska, P.M., Marina, M.L., García, M.C., 2014b. Isolation and identification of antioxidant peptides from commercial soybean-based infant formulas. *Food Chem.* 148, 147–154.
- Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M.J., Mateos-Aparicio, I., 2008. Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and Englyst methods. *Food Chem.* 108, 1099–1105.
- Rinaldi, V.E.A., Ng, P.K.W., Bennink, M.R., 2000. Effects of extrusion on dietary fiber and isoflavone contents of wheat extrudates enriched with wet okara. *Cereal Chem.* 77 (2), 237–240.
- Sarmadi, B.H., Ismail, A., 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides* 3 (10), 1949–1956.
- Seo, W.H., Lee, H.G., Baek, H.H., 2008. Evaluation of bitterness in enzymatic hydrolysates of soy protein isolate by taste dilution analysis. *J. Food Sci.* 73 (1), S41–46.
- Sigma-Aldrich, 1996. *Subtilisin*. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/p5380pis.pdf.
- Takagi, H., Takahashi, T., Momose, H., Inouye, M., Maeda, Y., Matsuzawa, H., Ohta, T., 1990. Enhancement of the thermostability of subtilisin E by introduction of a disulfide bond engineered on the basis of structural comparison with a thermophilic serine protease. *J. Biol. Chem.* 265 (12), 6874–6878. <http://www.jbc.org/content/265/12/6874.long>.
- Villanueva-Suárez, M.J., Pérez-Cózar, M.L., Redondo-Cuenca, A., 2013. Sequential extraction of polysaccharides from enzymatically hydrolyzed okara byproduct: physicochemical properties and in vitro fermentability. *Food Chem.* 141 (2), 1114–1119.
- Wang, H.J., Murphy, P.A., 1994. Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.* 42 (8), 1666–1673.
- Wang, H.J., Murphy, P.A., 1996. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. *J. Agric. Food Chem.* 44 (8), 2377–2383.
- Wu, J., Ge, J., Zhang, Y., Yu, Y., Zhang, X., 2010. Solubility of genistein in water, methanol, ethanol, propan-2-ol, 1-butanol, and ethyl acetate from (280 to 333) K. *J. Chem. Eng. Data* 55 (11), 5286–5288.
- Xu, Z., Wu, Q., Godber, J.S., 2002. Stabilities of daidzin, glycitin, genistin, and generation of derivatives during heating. *J. Agric. Food Chem.* 50 (25), 7402–7406.
- Yokomizo, A., Takenaka, Y., Takenaka, T., 2002. Antioxidative activity of peptides prepared from okara protein. *Food Sci. Technol. Res.* 8 (4), 357–359.
- Zhang, H., Yokoyama, W.H., Zhang, H., 2012. Concentration-dependent displacement of cholesterol in micelles by hydrophobic rice bran protein hydrolysates. *J. Sci. Food Agric.* 92 (7), 1395–1401.



are common environmental pollutants with toxic, genotoxic, mutagenic and carcinogenic properties. Microorganisms play a major role in cleaning of this pollution. Therefore, biodegradation using microorganisms is usually preferred. In this study, about 10 g of soil samples were aseptically collected from different petroleum contaminated sites in and around Mersin in Turkey. Bacteria were isolated from soil samples using an enrichment medium containing petrol and were isolated 38 bacteria. For heavy metal resistance selected mercury salt solution HgCl_2 . Heavy metal resistance was determined by the plate diffusion method. The salt solutions for mercury were adjusted as 5 mM, 10 mM, 15 mM and 20 mM. The most resistance results were obtained from the FH5-3, FH 2-3 and FH 1-4 of bacterial cultures. However, the most sensitive resistance results were obtained from FH 1-5, FH 5-6, FH 7-1 and FH 7-2 of bacterial cultures.

Acknowledgments: This work was supported in part by a grant from Ahi Evran Univ. BAP No: PYO-Fen.4003/2.14.009 (2015).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1008>

The removal of pentachlorophenol with laccase as polyphenol oxidase and the toxicological evaluation of the degradation products



Jingfei Luan, Yue Shen*

State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, China

E-mail address: yueshen.sally@outlook.com (Y. Shen).

To further explore the importance of toxicological estimation after enzymatic treatment, we studied the removal results of pentachlorophenol with laccase as polyphenol oxidase and the synthetic effluent. Additionally, we investigated the influence of enzyme load ($4.55\text{--}134.28\text{ U mL}^{-1}$), pentachlorophenol concentration ($2\text{--}75\text{ mg L}^{-1}$), reaction time ($0\text{--}25\text{ min}$), and hydrogen peroxide concentration ($5\text{--}820\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$). The results indicated that the maximum removal percentage of pentachlorophenol was 87.4% after 14 min of reaction time when experimental parameters were as following: hydrogen peroxide $101.2\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$, enzyme 74.3 U mL^{-1} and pentachlorophenol 45.9 mg L^{-1} . *Lactuca sativa* and *Artemia salina* were used to estimate the toxicity of the products which appeared after enzymatic treatment. Above results indicated that laccase was very efficient for removal of pentachlorophenol, simultaneously, the products which were obtained after enzymatic action indicated relatively high toxicity. The lethal concentration LC50 which was gained for *Artemia salina* was 52.7% and the inhibition concentration IC50 which was obtained for *Lactuca sativa* was 26.9%. Moreover, the enzymatic treatment should be united with other kinds of treatment for further degradation and toxicity reduction of pentachlorophenol.

Acknowledgments: This work was supported by a grant from the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20141312).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1009>

Waste gas biotreatment



Zvagarogea Ramona^{1,*}, Niculescu Violeta¹, Miricioiu Marius¹, Iordache Andreea¹, Paun Nadia¹, Covaliu Cristina²

¹ National R&D Institute for Cryogenic and Isotopic Technologies – ICSI, Ramnicu Valcea, Romania

² The Faculty of Biotechnical Systems Engineering, Polytechnic University of Bucharest, Romania

E-mail address: ramona.zgavarogea@icsi.ro (Z. Ramona).

Biotechnology has been applied to find green and low cost environmental processes in the waste gas treatments. Odorous and volatile organic compounds emissions represent a serious problem related to biowaste treatment, because they may be carried away several kilometres, depending on weather and topographical conditions.

The most used systems are the biofilters, working in normal operating conditions in terms of temperature and pressure. Due to this, they are relatively cheap and highly efficient.

Waste air bio-treatment with biofilters was developed as a reliable and cost-effective technology, the pollutants biodegradation by microorganisms leading to harmless end-products. Biofilters are also efficient systems for odorous off-gases from composting processes treatment.

Results revealed that the main part of the volatile organic compounds load was degraded within the biofilters. As a conclusion, the benefits of the biotechnology use, such as environmental monitoring and inspecting, pollutant removal, soil and groundwater treatment, molecular nanotechnology, green energy and so on, really make the great changes in our environment and living life.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1010>

Okara valorization process by fermentation with *Bacillus licheniformis*: Obtention of hydrolytic enzymes, bioactive compounds, and protein hydrolysates



Angel Orts Gomez^{1,*}, Juan Parrado Rubio¹, Manuel Tejada Moral², Bruno Rodriguez Morgado¹, Pablo Caballero Jimenez¹

¹ Faculty of Pharmacy, University of Seville, Seville, Spain

² ETSIA, University of Seville, Seville, Spain

E-mail address: geotiff@hotmail.com (A.O. Gomez).

Okara is a by-product obtained during the manufacturing process of soy milk that has a great potential for food industry due to its richness in proteins and high content in bioactive compounds (isoflavones). However, it is underused due to its low bioavailability caused by its high fiber content and insolubility. *B. Licheniformis* is a Gram-positive bacterium used in the biotechnology industry to produce industrial enzymes (proteases, α -amylase, lipases, chitinases, etc.) that also can be used to modify insoluble by-products and hence obtain highly valuable biological products. The aim of this work was to develop a biorefinery process of Okara using fermentation with *B. Licheniformis* as a biological tool. Once the optimal fermentation conditions (pH, temperature, substrate concentration) were determined, we obtained a new product that was rich in enzymes (proteases and lipases) and where the organic matter from Okara was modified by the hydrolytic enzymes excreted by *B. Licheniformis*. In second place, a biorefinery process to separate the valuable fractions – (1) hydrolytic enzymes, (2) soluble protein hydrolysates, and (3) soluble extracted bioactive compounds – was evaluated. This separation was designed using size



exclusion chromatography and ultra/nanofiltration technology, the three fractions were characterized and also their functional properties.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1011>

Enzyme and Protein Engineering

Isolation and screening of actinomycetes from *Ulva lactuca* compost sample for their enzymatic and antibacterial activities



Hatice Kati*, Zeynep Sule Topatan, Sermin Yildirim, Mustafa Turkmen

Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Gure Campus, Giresun, Turkey

E-mail address: haticekati@yahoo.com (H. Kati).

The present study is focused on isolating actinomycetes from compost sample, *Ulva lactuca* and investigating the enzyme and antibacterial substance producing abilities of these isolates. The *Ulva lactuca* was prepared as compost material. Actinomycetes were isolated from compost sample by serial dilution method on agar medium with or without potassium dichromate. The presence of extracellular amylase, lipase/esterase, chitinase, pectinase, protease and cellulase enzymes in these isolates were qualitatively investigated. The isolates were tested for antibacterial activity. Forty actinomycete isolates have been obtained from *Ulva lactuca* compost sample. Many isolates produced one or more enzymatic activities. From these isolates, 34 (85%) showed amylase, 21 (53%) lipase/esterase, 21 (53%) chitinase, 29 (73%) pectinase, 40 (100%) protease and 30 (75%) cellulase activities. Extracellular enzyme activity results were evaluated and found that totally eight isolates have quite high amylase and ten isolates have quite high protease activities. Two isolates exhibited quite high antibacterial activity. This study clearly indicated that algae compost can be considered as an important source for actinomycetes. Some actinomycete isolates showed high enzymatic and antibacterial activities. These isolates may be used for commercial, industrial and pharmaceutical applications in the future.

Acknowledgements: This study was supported by the Giresun University (FEN-BAP-A-140316-52, FEN-BAP-A-200515-82).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1012>

Characterization of alkaline protease produced by *Bacillus megaterium*



Melis Sumengen Ozdenefe¹, Sadik Dincer^{2,*}, Mustafa Umit Unal³, Hatice Aysun Mercimek Takci⁴, Fikret Buyukkaya Kayis⁵, Afet Arkut⁶

¹ Department of Biomedical Engineering, Near East University, Nicosia, Cyprus

² Biology Department, Cukurova University, Adana, Turkey

³ Department of Food Engineering, Cukurova University, Adana, Turkey

⁴ Department of Molecular Biology and Genetics, 7 Aralik University, Kilis, Turkey

⁵ Central Research Laboratory, Adiyaman University, Adiyaman, Turkey

⁶ Department of Nutrition and Dietetics, Cyprus International University, Nicosia, Cyprus

E-mail address: sdincer@cu.edu.tr (S. Dincer).

Bacillus megaterium, an alkaline protease producing strain was isolated from soil sample that was collected from the campus of Cukurova University. The optimum pH and temperature of the enzyme were found as 11.5 and 30 °C, respectively. However, the activity of the enzyme was high at temperatures ranging from 40 to 90 °C. The alkaline protease was 91% stable for 30 min at 60 °C. The enzyme activity was slightly inhibited by 1 mM MnSO₄ and 5 mM NaCl with, 3% and 1%, respectively. The proteolytic activity was moderately stimulated by the chelating agent EDTA (113%, 115%) at 1 and 5 mM concentration. 1% Triton X-100, Tween-20 and Tween-80 increased the enzyme activity up to 124%, 113% and 115%, respectively. In contrast, the higher concentration (5%) of Triton X-100, Tween-20 and Tween-80 was significantly inhibitory to protease stability and this activity decreased to 28%, 22% and 14%, respectively. Alkaline protease activity of *Bacillus megaterium* was determined as 42.97 U/mL. The molecular weight of alkaline protease was estimated to be 83 kDa by SDS-PAGE. Considering these properties *Bacillus megaterium* alkaline protease has significant application potential in laundry detergents.

Acknowledgments: This study was supported by Cukurova University, Project No. FEF2013BAP13.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1013>

Production and characterization of L-asparaginase from native *Bacillus* sp.



Zahra Hosseinpour Feizi, Hatice Korkmaz Guvenmez*

Department of Biology, Science and Letters Faculty, Cukurova University, Adana, Turkey

E-mail address: hkorkmaz@cu.edu.tr (H.K. Guvenmez).

The enzyme L-asparaginase has received great attention as an anti-tumor agent for its treatment of tumor cells, particularly acute lymphoblastic leukemia. Additionally, as a food processing aid, L-asparaginase can significantly reduce the level of acrylamide in starchy food. In this study, L-asparaginase was procured from soil isolates. The highest L-asparaginase producing strain was identified as *Bacillus subtilis*. The optimum activity of the purified enzyme was observed at 40 °C, at pH 8.0. In treating the enzyme with different buffers of pH, 100% of the stability was obtained at pH 7.0. By pre-incubating the enzyme at 20 °C to 100 °C, it was 100% stable at 50 °C, whereas the enzyme became unstable at temperatures over 70 °C. While urea and EDTA greatly decreased the enzyme activity, however, MgCl₂ increased the activity. The enzyme was seen to be a single band with a molecular weight of 128 kDa by using the zymogram method.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1014>

Freeze-drying microencapsulation of anthocyanins from sour cherries in the β-lactoglobulin matrices



Nicoleta Stănciuc*, Ana Maria Oancea, Ioana Otilia Ghinea, Vasilica Barbu, Gabriela Bahrin, Gabriela Răpeanu, Iuliana Aprodu

Faculty of Food Science and Engineering, "Dunarea de Jos" University of Galati, Romania

E-mail address: nsava@ugal.ro (N. Stănciuc).

Sour cherries (*Prunus cerasus* L.) anthocyanins were encapsulated by freeze drying using β-lactoglobulin as a matrix. Three experimental designs of microencapsulation were analyzed as follows:



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

Obtaining an agronomic/environmental biostimulant by enzymatic hydrolysis of okara

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

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

² Department Crystallography, Mineralogy and Agricultural Chemistry, E.T.S.I.A., University of Seville, Crta. de Utrera km. 1, 41013 Seville, Spain

*josortgom2@alum.us.es

Resumen*

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

Bioestimulante, enzimas, peptidos, Okara, NPK.

Abstract **

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

Biostimulant, enzymes, peptides, Okara, NPK.



Introducción

Okara es un subproducto obtenido durante el proceso de fabricación de leche de soja, presenta un alto valor nutricional debido a su riqueza en proteínas, grasas, carbohidratos y contenido en compuestos bioactivos (isoflavonas, vitaminas y oligoelementos) (O'Toole, 1999). Destaca su alto contenido proteico 31,1%, de lípidos 24,6 y de carbohidratos, fundamentalmente fibra insoluble (celulosas y hemicelulosas) de un 38,9%. Respecto a los microelementos, presenta un alto contenido en fósforo (5,3 g/kg) y potasio (11,5 g/kg). En cuanto al componente inorgánico, el contenido de cenizas es 4.1%. (Tabla 1 y 2)

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

Tabla 1 – Composición química de Okara. Los resultados son expresads en porcentaje (p/p) en relación con material seca

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

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

Debido a su alta humedad la okara es un producto muy perecedero el cual, debe procesarse muy rápidamente y, aunque existen formas de preservarlo, no son rentables debido a su alto coste energético (Mateos-Aparicio, 2011, 2016).

Actualmente se usa principalmente en países occidentales como alimento para animales o abono de lenta absorción (Rinaldi *et al.*, 2000). Actualmente existe una tendencia en alza de valorización de productos orgánicos industriales (Parrado *et al.*, 2015), con la finalidad de transformarlos en bioestimulantes o fertilizantes orgánicos (Xu and Geelen 2018).

Okara puede ser valorizado en un bioestimulante rico en nutrientes de rápida absorción y con alto contenido en compuestos bioactivos (Bastida, 2008). Así pues, el presente trabajo tiene como objetivo desarrollar un proceso enzimático destinado a la valorización de la okara mediante su conversión en un producto bioestimulante agronómico/ambiental altamente biodisponible y con alto contenido en C, N, P, K.

Materiales y Métodos

2.1. Características del proceso de hidrólisis enzimática y okara

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

2.2 Análisis de peso molecular de las proteínas solubles

El contenido de proteína de la fracción soluble de okara se estudió mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando un sistema FPLC ÄKTA-purificator (GE Healthcare), cromatografía de filtración y una columna Superdex Peptide 10 / 300GL, con un rango de exclusión



entre 700 y 10.000 Da que discrimina péptidos y aminoácidos libres.

2.3 Análisis de las proteínas totales

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

2.4 Análisis de glucosa libre

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

2.5 Análisis de fosfato soluble

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

2.6 Caracterización química extractos solubles

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

Resultados y discusión

Para la hidrólisis proteica se eligió la enzima Protamex de Novozymes debido a su mejor rendimiento por el pH natural de la okara (Tabla 1). Respecto a la solubilización de fosfato orgánico, se comparó la extracción con diferentes enzimas (Proteasas, lipasas, glucanasas y fitasas), obteniendo los mejores resultados con la enzima Fitasa de Biocon consiguiéndose extraer hasta un 92% del total de fosforo existente en okara

y, su vez transformando todo el contenido de fitatos (macromolécula de alto contenido en fósforo no biodisponible) en fósforo orgánico libre (Tabla 2). Finalmente para la solubilización de los carbohidratos se eligió la enzima Glucanasa ME de Biocon, la cual es un complejo de múltiples carbohidrolasas. Tras la hidrólisis enzimática con éstas tres enzimas aplicadas secuencialmente, se obtuvo una solubilización de la okara del 60%. (Tabla 3).

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

Tabla 1: Solubilización de okara con diferentes proteasas

Las proteínas representan la mayor fracción y en forma de proteínas hidrolizadas (Tabla 4), mayoritariamente péptidos con un tamaño molecular inferior a 1000dan (64%) en cambio la pequeña fracción de proteínas solubles de OK son de alto peso molecular superior a 1000da (72%).

Respecto a la extracción total de proteínas y glucosa libre en el extracto enzimático, se alcanzó una extracción del 40,9% del total de proteínas existente en la okara, frente al 22,02% en el extracto acuoso, y una extracción de 117,9 mg/kg de glucosa libre en el extracto enzimático, frente a 18,61 mg/kg que se obtienen en el extracto acuoso. Respecto a la composición química del extracto enzimático de la okara, se consigue extraer hasta un 76% del contenido total de nitrógeno, el 79,1% del total de fósforo y el 86,6% del total de potasio (Tabla 5).



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

Tabla 2: Extracción del total de fósforo existente en okara mediante hidrólisis a 24h con diferentes enzimas

Solubilización %	
Control	35,50
Secuencial	59,63

Tabla 3: Solubilización de okara tras la hidrólisis multienzimática secuencial

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

Tabla 4 – Distribución del contenido de proteínas solubles de Okara y el Extracto enzimático referidos a materia seca. Columna Superdex Peptide 10/300GL column

Conclusiones

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

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

Tabla 5: Solubilización de okara tras la hidrólisis multienzimática secuencial

Bibliographic References

- [1] Perez-López E., Mateos-Aparicio I., Rupérez P. 2016. Okara treated with high hydrostatic pressure assisted by Ultraflo L. *Innovated food science & emerging technologies*. 33: 32-37.
- [2] O'Toole. Characteristics and use of okara, the soybean residue from soy milk production--a review. 1999 Feb;47(2):363-71
- [3] Rodríguez-Morgado, B., Gómez, I., Parrado, J., García-Martínez, A.M., Aragón, C., Tejada, M. 2015c. Obtaining edaphic biostimulants/biofertilizers from different sewage sludges. Effects on soil biological properties. *Environ. Technol.* 36, 2217-2226.
- [4] Mateos-Aparicio, I. (2011). Beans by-products, potential sources for functional ingredients. In E. Popescu, & I. Golubev (Eds.), *Beans: Nutrition, Consumption and Health* (pp. 233-248). New York: Nova Publishers Inc.
- [5] Nassiri M, Ariannejad H. Comparative Analysis of Peripheral Alkaline Phytase Protein Structures Expressed in E. coli. *Reports of biochemistry & molecular biology* vol. 4,1 (2015): 10-8..
- [6] Xu L., Geelen D. Developing biostimulants from agro-food and industrial by-products. *Frontiers*, 2018.
- [7] Bastida F, Kandelir E, Moreno JL, et al. Application of fresh and composted organic wastes modifies structure, size and activity of soil microbial community under semiarid climate. *Appl Soil Ecol.* 2008;40:318–329.



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se caracterizó la composición química de okara (ver capítulos 2, y 4); presentando alto contenido de biomoléculas como carbohidratos (30%), proteínas (40%) y un 18% de lípidos, así como minerales y moléculas bioactivas como las isoflavonas, cuyos valores corresponden en torno al 12-40% del contenido total de isoflavonas en la soja [43,44] lo que la convierte en un sustrato idóneo para la obtención de productos bioestimulantes.

4.1 Obtención de un bioestimulante a través de tecnología hidrolítica

En primer lugar, vamos a describir la obtención de un bioestimulante rico en hidrolizados proteicos y compuestos bioactivos, mediante un proceso de hidrólisis enzimática.

Se realizó una extracción enzimática de okara y seguidamente una optimización del proceso, siendo los principales parámetros, la solubilización de materia orgánica y el contenido en compuestos bioactivos.

4.1.1 Efecto del pH sobre la solubilización de okara.

El okara fue solubilizado a diferentes pH, solamente utilizando el agua como agente solvente, con la finalidad de comprobar la cantidad de materia solubilizada. Se observó que la solubilidad fue mínima a pH 4,0 (4%) aumentando la solubilidad en función del aumento de pH, corroborándose una correlación directa entre pH y solubilidad. Estos datos sugieren que soluciones acuosas con pH alcalino favorecen la solubilización.

4.1.2 Efecto del pH y tratamiento con proteasa alcalina de *Bacillus* (Subtilisina), sobre la solubilización de okara

Okara fue solubilizado a diferentes pH en presencia de una proteasa.

Respecto a la presencia de la proteasa, ésta mejoró la solubilización de materia orgánica considerablemente alcanzando el máximo de un 30% a



pH 10, frente a un 17,1% a pH 6 en las extracciones exclusivamente con agua.

Respecto a la solubilización específica de proteínas, observamos que la solubilización de proteínas aumentaba a valores de pH más altos, siendo máxima a pH 10. La adición de proteasa duplicó la cantidad de proteína extraída en comparación con los controles respectivos en todos los valores de pH probados.

Tras el análisis por cromatografía de exclusión molecular del tamaño molecular de las biomoléculas presentes en los extractos, se observa una reducción del tamaño proteico superior a 10 kDa, con un contenido de un 91,14 % en el extracto acuoso a solo 7,85% en hidrolizado con proteasa, mientras que las fracciones de proteína/péptido (1 a 10 kDa) y péptido/aminoácido (<1 kDa) aumentaron de 1,09% a 15,87% y 6,98% a 75,74%, respectivamente. Por tanto, se aumentó la concentración de péptidos y aminoácidos, pudiendo existir numerosos péptidos bioactivos (generados por digestión proteolítica), presentes en el extracto hidrolizado. Cabe destacar que las propiedades antioxidantes están relacionadas con el contenido de aminoácidos hidrófobos y aromáticos [45,46]. En definitiva, estos resultados subrayan la idoneidad del tratamiento con proteasa para solubilizar el contenido de proteínas del okara y su potencial para generar péptidos bioactivos.

4.1.3 Efecto del pH, tratamiento con proteasa alcalina de *Bacillus* (Subtilisina) sobre la solubilización de isoflavonas y extracción de capacidad antioxidante

Se estudió la influencia de la hidrólisis proteolítica en la solubilización de las isoflavonas presentes en okara.

En las extracciones con agua, se observó que a pH alcalino se produjo una mayor solubilización de isoflavonas. Los mayores rendimientos se obtuvieron a pH 10 con 469,89 µg/g de okara seco, incrementándose un 28% respecto a pH 6 (original de nuestra okara) con un valor de 131,16 µg/g de okara seco.



Por su parte, las muestras tratadas con proteasa a diferentes pH, los mayores valores de extracción de isoflavonas se obtuvieron a pH 10 con 763,40 µg/g de okara seco, alcanzando un incremento de un 78% del total de isoflavonas solubilizadas. Esto es debido a una mayor eficiencia de la extracción a pH 10,, pero también a una mayor conversión de las formas conjugadas térmicamente inestables (malonil y acetilglucósidos) a sus respectivos β-glucósidos y agliconas, más estables [47]. Es importante destacar que se desea la mayor recuperación de agliconas, ya que se consideran las formas más bioactivas de isoflavonas [48].

Así pues, los mayores valores de extracción de todos los tipos de isoflavonas se alcanzaron a pH 10 con proteasa. Respecto a otros métodos eficaces de extracción de isoflavonas, la hidrólisis enzimática planteada, aumentó la cantidad total de isoflavonas solubilizadas en un 78% y elevó el contenido de aglicona 9,1 veces, mientras que para Jankowiak et al. 2014, su mayor rendimiento de extracción de isoflavonas con etanol fue de un 70% y los niveles de agliconas apenas agregaron un 5%.

Por lo tanto, se considera la hidrólisis a pH 10 y 55°C, con proteasa una buena herramienta para la obtención y bioconversión de agliconas junto a β-glucósidos.

Un parámetro muy importante es la relación proteína/isoflavona. Según los resultados obtenidos respecto a la solubilización de proteínas e isoflavonas, encontramos una correlación directa entre la cantidad de proteínas solubilizadas y las isoflavonas totales extraídas en todos los valores de pH analizados, ya sea con el tratamiento con proteasa o con la extracción de agua. Por otra parte, se observó que los ratios de extracción de isoflavonas presentes en el extracto enzimático fueron menores de lo esperado respecto a la cantidad de proteínas solubilizadas, , tras el tratamiento enzimático, el rendimiento de isoflavonas extraída fue inferior a la esperada para la cantidad de proteínas solubilizadas, en parte debida a una superior concentración de proteínas solubilizadas por las enzimas.

Esto refuerza la noción de que la solubilización de las isoflavonas fue un efecto indirecto provocado por la solubilización de proteínas y que algunas isoflavonas también pueden quedar atrapadas en la matriz de fibra



insoluble, en concordancia con trabajos previos como Jankowiak et al., 2014 [49].

Así pues, al solubilizar proteínas, indirectamente se extraen isoflavonas. Así pues, debido a que nuestra hidrólisis es específica para proteínas, se podría incrementar el rendimiento en la extracción de isoflavonas.

La actividad reductora de los extractos de okara fue evaluada, mediante la técnica FRAP, la cual mide la capacidad de reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} , siendo un indicador de la capacidad antioxidante. Se observó que la actividad reductora de las muestras se veía fuertemente afectada por el pH. En general, dicha capacidad antioxidante aumentó en función del pH, obteniendo los máximos valores a pH 10 en el extracto enzimático.

Está descrito que la genisteína y la genistina tienen las mayores actividades antioxidantes de todas las isoflavonas de la soja (Lee et al., 2005). En consecuencia, los elevados valores obtenidos de estas isoflavonas a pH 10 pueden explicar los valores más altos de antioxidantes. Se ha demostrado que los péptidos de bajo peso molecular tienen actividad antioxidante [50,51] por lo que también pueden contribuir al aumento de la actividad reductora total observada en los extractos enzimáticos de okara, debido a la solubilización del contenido proteico con el tratamiento con proteasa.

4.2 Obtención de un bioestimulante a través de tecnología fermentativa.

En segundo lugar, vamos a describir la obtención de un bioestimulante rico en hidrolizados proteicos y compuestos bioactivos, mediante un proceso de hidrólisis enzimática mediante fermentación bacteriana.

B. licheniformis es una bacteria Gram positiva utilizada en la industria biotecnológica para producir enzimas industriales, debido a la gran capacidad de producción de enzimas exocelulares (proteasas, amilasas, lipasas, quitinasas, etc.). En este ensayo, una vez determinadas las



condiciones óptimas de fermentación (pH 7, temperatura 37°C y concentración de sustrato 2%), obtuvimos un nuevo producto rico en enzimas (proteasas, lipasas y fitasas) donde la materia orgánica de el okara fue modificada por las enzimas hidrolíticas excretadas por *B. licheniformis*.



Imagen 3: Fermentación de Okara con *B. licheniformis* en bioreactor de laboratorio

El okara presenta una baja solubilidad (17%), por tanto, este producto tiene muy poca biodisponibilidad [52]. En este trabajo, mediante fermentación utilizando *B. licheniformis*, el okara se transformó en diferentes productos nuevos con potencial capacidad ambiental y agronómica. La fermentación de okara con *B. licheniformis* conduce a una solubilización de un 65%, obteniendo una fase orgánica soluble (OKF-sol) con alta biodisponibilidad y una fase sólida insoluble (OKF-unsol). Como resultado de la fermentación, los OKF-sol está compuesto principalmente por péptidos y aminoácidos libres asociados a diferentes compuestos bioactivos como isoflavonas y enzimas hidrolíticas, como proteasas, fitasas, lipasas, producidas por *B. licheniformis*, siendo un producto con alto potencial agronómico.



Por lo tanto, se han desarrollado dos bioprocesos eficaces y rentables para la biovalorización de okara en productos bioestimulantes ricos en nutrientes, sostenibles y ecológicos. En resumen, por un lado se propone una hidrólisis enzimática y por otro el producto soluble obtenido tras la fermentación de okara con *B. licheniformis*, presenta alto contenido en materia biodisponible, a la vez de un complejo multienzimático con alto potencial bioestimulante.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



5. CONCLUSIONES

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

5. CONCLUSIONES

Se han desarrollado nuevos bioprocesos para obtener bioestimulantes a partir de okara; así mismo, se han caracterizado los productos obtenidos. A continuación se exponen las conclusiones más relevantes:

- La tecnología enzimática sobre okara es una herramienta viable para obtener bioestimulantes.
- Las condiciones óptimas en cuanto a productividad en la producción de péptidos e isoflavonas es pH 10 y temperatura 55°, proteasa 0,3% p/v.
- Los bioestimulantes obtenidos son ricos en péptidos y aminoácidos libres, lo que les confiere una elevada capacidad bioestimulante.
- Los bioestimulantes obtenidos son ricos en isoflavonas solubles, presentando una alta capacidad antioxidante.
- La tecnología fermentativa utilizando la bacteria *Bacillus licheniformis*, es viable en la obtención de bioestimulantes.
- El bioestimulante fermentativo presenta composición química similar al bioestimulante enzimático, hidrolizados proteicos e isoflavonas, pero presenta dos nuevos componentes, un complejo multienzimático con alto potencial bioestimulante y biomasa bacteriana con actividad PGPB.
- Los procesos enzimáticos y fermentativos utilizan okara sin necesidad de secado, evitando el consumo de energía y potencial deterioro en sus componentes funcionales.



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

6. BIBLIOGRAFÍA

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Kamble, D.B.; Rani, S. Bioactive Components, in Vitro Digestibility, Microstructure and Application of Soybean Residue (Okara): A Review. *Legum. Sci.* 2020, 2, e32, doi:10.1002/leg3.32.
2. Redondo-Cuenca, A.; Villanueva-Suárez, M.J.; Mateos-Aparicio, I. Soybean Seeds and Its By-Product Okara as Sources of Dietary Fibre. Measurement by AOAC and Englyst Methods. *Food Chem.* 2008, 108, 1099–1105, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2007.11.061.
3. Pérez-López, E.; Mateos-Aparicio, I.; Rupérez, P. Okara Treated with High Hydrostatic Pressure Assisted by Ultraflo® L: Effect on Solubility of Dietary Fibre. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2016, 33, 32–37, doi:10.1016/j.ifset.2015.12.017.
4. Christaki, E.; Bonos, E.; Giannenas, I.; Florou-Paneri, P. Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. *Agric.* 2012, 2, 228–243, doi: 10.3390/agricultura2030228.
5. Bernhoft, A.; Flaten, T.P.; Holmsen, E.; Langmark, F.; Norum, K.R.; Bal, B.S.; Singh, R.; Steinnes, E.; Aaseth, J.O. Bioactive Compounds in Plants-Benefits and Risks for Man and Animals. *The Norwegian Academy.* 2008, 978-82-7099-583-7, doi:10.3793847.18385.
6. Rinaldi, V.E.A.; Ng, P.K.W.; Bennink, M.R. Effects of Extrusion on Dietary Fiber and Isoflavone Contents of Wheat Extrudates Enriched with Wet Okara. *Cereal Chem.* 2000, 77, 237–240, doi:10.1094/CCHEM.2000.77.2.237.
7. Wang, H.J.; Murphy, P.A. Mass Balance Study of Isoflavones during Soybean Processing. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 2377–2383, doi:10.1021/jf950535pf00004.
8. O'toole, D.K. Characteristics and Use of Okara, the Soybean Residue from Soy Milk Productions: A Review. 1999, doi:10.1021/jf980754I.
9. Vishwanathan, K.H.; Govindaraju, K.; Singh, V.; Subramanian, R. Production of Okara and Soy Protein Concentrates Using Membrane



- Technology. *J. Food Sci.* 2011, 76, doi:10.1111/J.1750-3841.2010.01917.X.
10. Jankowiak, L.; Kantzas, N.; Boom, R.; Van Der Goot, A.J. Isoflavone Extraction from Okara Using Water as Extractant. *Food Chem.* 2014, 160, 371–378, doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.082.
 11. de Figueiredo, V.R.G.; Justus, A.; Pereira, D.G.; Georgetti, S.R.; Ida, E.I.; Kurozawa, L.E. Production of Hydrolysate of Okara Protein Concentrate with High Antioxidant Capacity and Aglycone Isoflavone Content. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 2019, 62, 1–13, doi:10.1590/1678-4324-2019180478.
 12. Rodríguez-Morgado, B.; Gómez, I.; Parrado, J.; Tejada, M. Behaviour of Oxyfluorfen in Soils Amended with Edaphic Biostimulants/Biofertilizers Obtained from Sewage Sludge and Chicken Feathers. Effects on Soil Biological Properties. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2014, 21, 11027–11035, doi:10.1007/s11356-014-3040-3.
 13. Castillo, F. *Biotecnología Ambiental*; 2005; ISBN 84-7360-211-0.
 14. Tejada, M.; García-Martínez, A.M.; Gómez, I.; Parrado, J. Application of MCPA Herbicide on Soils Amended with Biostimulants: Short-Time Effects on Soil Biological Properties. *Chemosphere* 2010, 80, 1088–1094, doi:10.1016/j.chemosphere.2010.04.074.
 15. Tejada, M.; García-Martínez, A.M.; Rodríguez-Morgado, B.; Carballo, M.; García-Antras, D.; Aragón, C.; Parrado, J. Obtaining Biostimulant Products for Land Application from the Sewage Sludge of Small Populations. *Ecol. Eng.* 2013, 50, 31–36, doi:10.1016/j.ecoleng.2012.07.006.
 16. Eivazi, F.; Tabatabai, M.A. Glucosidases and Galactosidases in Soils. *Soil Biol. Biochem.* 1988, 20, 601–606, doi:10.1016/0038-0717(88)90141-1.
 17. TURGEON, S.L.; GAUTHIER, S.F. Whey Peptide Fractions Obtained with a Two-Step Ultrafiltration Process: Production and Characterization. *J. Food Sci.* 1990, 55, 106–110,



doi:10.1111/j.1365-2621.1990.tb06028.x.

18. Parrado, J.; Bautista, J.; Romero, E.J.; García-Martínez, A.M.; Friaça, V.; Tejada, M. Production of a Carob Enzymatic Extract: Potential Use as a Biofertilizer. *Bioresour. Technol.* 2008, 99, 2312–2318, doi:10.1016/j.biortech.2007.05.029.
19. Parrado, J.; Bautista, J.; Machado, A. Production of Soluble Enzymatic Protein Hydrolysate from Industrially Defatted Nondehulled Sunflower Meal. *J. Agric. Food Chem.* 1991, 39, 447–450, doi:10.1021/jf00003a004.
20. du Jardin, P. Plant Biostimulants: Definition, Concept, Main Categories and Regulation. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 2015, 196, 3–14.
21. Jämtgård, S. The Occurrence of Amino Acids in Agricultural Soil and Their Uptake by Plants. 2010.
22. Liu, H.; Hu, M.; Wang, Q.; Cheng, L.; Zhang, Z. Role of Papain-like Cysteine Proteases in Plant Development. *Front. Plant Sci.* 2018, 871, 1717.
23. Jones, D.L.; Hodge, A.; Kuzyakov, Y. Plant and Mycorrhizal Regulation of Rhizodeposition. *New Phytol.* 2004, 163, 459–480, doi: 10.1111/J.1469-8137.2004.01130.X.
24. Calvo, P.; Nelson, L.; Kloepper, J.W. Agricultural Uses of Plant Biostimulants. *Plant Soil.* 2014, 383, 3–41, doi: 10.1007/s11104-014-2131-8.
25. Yakhin, O.I.; Lubyánov, A.A.; Yakhin, I.A.; Brown, P.H. Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Front. Plant Sci.* 2017, 7, 2049, doi: 10.3389/FPLS.2016.02049/XML/NLM.
26. Botta, A. Enhancing Plant Tolerance to Temperature Stress with Amino Acids: An Approach to Their Mode of Action. *In Proceedings of the Acta Horticulturae*. 2012, Vol. 1009, pp. 29–36, doi:10.17660/Acta Hortic.2013.1009.1



27. Iglesias, F.M.; Cerdán, P.D. Maintaining Epigenetic Inheritance during DNA Replication in Plants. *Front. Plant Sci.* 2016, 7, 38, doi:10.3389/fpls.2016.00038.
28. Colla, G.; Nardi, S.; Cardarelli, M.; Ertani, A.; Lucini, L.; Canaguier, R.; Rouphael, Y. Protein Hydrolysates as Biostimulants in Horticulture. *Sci. Hortic.* 2015, 196, 28–38, doi: 10.1016/j.scienta.2015.08.037.
29. Ertani, A.; Cavani, L.; Pizzeghello, D.; Brandellero, E.; Altissimo, A.; Ciavatta, C.; Nardi, S. Biostimulant Activity of Two Protein Hydrolyzates in the Growth and Nitrogen Metabolism of Maize Seedlings. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 2009, 172, 237–244, doi:10.1002/jpln.200800174.
30. Colla, G.; Rouphael, Y.; Canaguier, R.; Svecova, E.; Cardarelli, M. Biostimulant Action of a Plant-Derived Protein Hydrolysate Produced through Enzymatic Hydrolysis. *Front. Plant Sci.* 2014, 5, 448, doi:10.3389/fpls.2014.00448.
31. Philippot, L.; Raaijmakers, J.M.; Lemanceau, P.; Van Der Putten, W.H. Going Back to the Roots: The Microbial Ecology of the Rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013, 11, 789–799, doi: 10.1038/nrmicro3109.
32. Kauffman, G.L.; Kneivel, D.P.; Watschke, T.L. Effects of a Biostimulant on the Heat Tolerance Associated with Photosynthetic Capacity, Membrane Thermostability, and Polyphenol Production of Perennial Ryegrass. *Crop Sci.* 2007, 47, 261–267, doi:10.2135/CROPSCI2006.03.0171.
33. Ertani, A.; Schiavon, M.; Muscolo, A.; Nardi, S. Alfalfa Plant-Derived Biostimulant Stimulate Short-Term Growth of Salt Stressed Zea Mays L. Plants. *Plant Soil* 2013, 364, 145–158, doi:10.1007/s11104-012-1335-z.
34. Rai, V.K. Role of Amino Acids in Plant Responses to Stresses. *Biol. Plant.* 2002, 45, 481–487, doi: 10.1023/A:1022308229759.
35. Davies, D.D. Physiological Aspects of Protein Turnover. In *Nucleic Acids and Proteins in Plants I*; Springer Berlin Heidelberg, 1982; pp.



189–228, doi: 10.1007/978-3-642-68237-7_7.

36. Van Oosten, M.J.; Pepe, O.; De Pascale, S.; Silletti, S.; Maggio, A. The Role of Biostimulants and Bioeffectors as Alleviators of Abiotic Stress in Crop Plants. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 2017, 4, 1–12, doi: 10.1186/s40538-017-0089-5.
37. Cuin, T.A.; Shabala, S. Amino Acids Regulate Salinity-Induced Potassium Efflux in Barley Root Epidermis. *Planta* 2007, 225, 753–761, doi:10.1007/s00425-006-0386-x.
38. da Rocha, I.M.A.; Vitorello, V.A.; Silva, J.S.; Ferreira-Silva, S.L.; Viégas, R.A.; Silva, E.N.; Silveira, J.A.G. Exogenous Ornithine Is an Effective Precursor and the δ -Ornithine Amino Transferase Pathway Contributes to Proline Accumulation under High N Recycling in Salt-Stressed Cashew Leaves. *J. Plant Physiol.* 2012, 169, 41–49, doi:10.1016/j.jplph.2011.08.001.
39. Nakaminami, K.; Okamoto, M.; Higuchi-Takeuchi, M.; Yoshizumi, T.; Yamaguchi, Y.; Fukao, Y.; Shimizu, M.; Ohashi, C.; Tanaka, M.; Matsui, M.; et al. AtPep3 Is a Hormone-like Peptide That Plays a Role in the Salinity Stress Tolerance of Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2018, 115, 5810–5815, doi:10.1073/pnas.1719491115.
40. Lea, U.S.; Leydecker, M.T.; Quilleré, I.; Meyer, C.; Lillo, C. Posttranslational Regulation of Nitrate Reductase Strongly Affects the Levels of Free Amino Acids and Nitrate, Whereas Transcriptional Regulation Has Only Minor Influence. *Plant Physiol.* 2006, 140, 1085–1094, doi:10.1104/pp.105.074633.
41. Gou, W.; Zhang, L.; Chen, F.; Cui, Z.; Zhao, Y.; Zheng, P.; Tian, L.I.; Zhang, C.; Zhang, L. Foliar application of amino acids modulates aroma components of 'fuji' apple (*Malus domestica* L.). *Pak. J. Bot.* 2015, 47, 2257–2262, doi:10.53308208
42. Bulgari, R.; Cocetta, G.; Trivellini, A.; Vernieri, P.; Ferrante, A. Biostimulants and Crop Responses: A Review. *Biol. Agric. Hortic.* 2015, 31, 1–17, doi:10.1080/01448765.2014.964649.



43. Genovese, M.I.; Davila, J.; Lajolo, F.M. Isoflavones in Processed Soybean Products from Ecuador. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 2006, 49, 853–859, doi:10.1516-89132006000600020.
44. 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 Biochem.* 2002, 37, 1117–1123, doi:10.1016/S0032-9592(01)00323-5.
45. Kitts, D.; Weiler, K. Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses Used in Isolation and Recovery. *Curr. Pharm. Des.* 2003, 9, 1309–1323, doi:10.2174/1381612033454883.
46. Puchalska, P.; Concepción García, M.; Luisa Marina, M. Identification of Native Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Peptides in Commercial Soybean Based Infant Formulas Using HPLC-Q-ToF-MS. *Food Chem.* 2014, 157, 62–69, doi:10.1016/j.foodchem.2014.01.130.
47. Mathias, K.; Ismail, B.; Corvalan, C.M.; Hayes, K.D. Heat and PH Effects on the Conjugated Forms of Genistin and Daidzin Isoflavones. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 7495–7502, doi:10.1021/JF061322A.
48. Murota, K.; Shimizu, S.; Miyamoto, S.; Izumi, T.; Obata, A.; Kikuchi, M.; Terao, J. Unique Uptake and Transport of Isoflavone Aglycones by Human Intestinal Caco-2 Cells: Comparison of Isoflavonoids and Flavonoids. *J. Nutr.* 2002, 132, 1956–1961, doi:10.1093/JN/132.7.1956.
49. Jankowiak, L.; Trifunovic, O.; Boom, R.M.; Van Der Goot, A.J. The Potential of Crude Okara for Isoflavone Production. *J. Food Eng.* 2014, 124, 166–172, doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.10.011.
50. Mateos-Aparicio, I.; Mateos-Peinado, C.; Jiménez-Escrig, A.; Rupérez, P. Multifunctional Antioxidant Activity of Polysaccharide Fractions from the Soybean Byproduct Okara. *Carbohydr. Polym.* 2010, 82, 245–250, doi:10.1016/j.carbpol.2010.04.020.



51. Nishibori, N.; Kishibuchi, R.; Morita, K. Soy Pulp Extract Inhibits Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Activity In Vitro: Evidence for Its Potential Hypertension-Improving Action. *J. Diet. Suppl.* 2017, 14, 241-251, doi:10.1080/19390211.2016.1207744.
52. Orts, A.; Revilla, E.; Rodriguez-Morgado, B.; Castaño, A.; Tejada, M.; Parrado, J.; García-Quintanilla, A. Protease Technology for Obtaining a Soy Pulp Extract Enriched in Bioactive Compounds: Isoflavones and Peptides. *Helvion* 2019, 5, e01958, doi:10.1016/J.HELIYON.2019.E01958.



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

CAPÍTULO 2

EVALUACIÓN DE LA POTENCIA BIOESTIMULANTE EDAFOLÓGICA DE LOS BIOESTIMULANTES AMBIENTALES OBTENIDOS A PARTIR DE OKARA

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

1. INTRODUCCIÓN

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

INTRODUCCIÓN

1. BIOESTIMULACIÓN EDÁFICA

El suelo es parte fundamental de la superficie terrestre, compuesto por una mezcla de partículas minerales, materia orgánica, agua, aire y organismos vivos. Es un sistema vivo, dinámico y no renovable, soporte de la vegetación y elemento fundamental para la agricultura [1], siendo un recurso muy importante para la vida terrestre, debido a que presenta funciones como soporte biológico para el crecimiento de las plantas, regulador del aporte de agua, sistema de almacenamiento de nutrientes y filtración de oxígeno, a la vez de ser un medio protector frente al estrés ambiental y diversas contaminaciones [2].

El concepto de calidad del suelo se caracteriza por las propiedades presentes y dinámicas de los procesos edafológicos. Según la Sociedad Americana de la Ciencia del Suelo (SSSA), la calidad de un suelo es la capacidad de éste para, dependiendo de los ecosistemas, funcionar, sostener la productividad de plantas y animales y, manejar o mejorar la calidad del agua y aire, apoyando la salud humana y del hábitat [2].

La calidad del suelo depende de dos propiedades fundamentales, las propiedades inherentes del suelo (clima, topografía, vegetación, etc.) y, la propia dinámica del suelo (uso, manejo, maleabilidad, etc.) [3]. Para su determinación existen numerosos indicadores de calidad del suelo, tanto generales (textura, pH, salinidad, relación carbono/nitrógeno, etc.) como específicos [4], los cuales son susceptibles de cualquier cambio en el mismo y, su determinación, aporta conocimientos de los procesos que acontecen en el suelo [5].

El concepto de bioestimulación edáfica se fundamenta en la adición al suelo de nutrientes, con la finalidad de que los microorganismos presentes sean estimulados y se produzca un incremento en sus poblaciones mediante la mejora de su hábitat. De este modo se consigue amplificar la mineralización de la materia orgánica presente y aplicada, con una mayor biodisponibilidad para ser usada por las plantas, y por otro lado, tal como se desarrolla en el capítulo 3, aumentar la tasa de biodegradación natural de los agentes exógenos existentes en caso de contaminaciones [6].



A lo largo de la historia del ser humano, el aporte de materia orgánica al suelo es una práctica habitual debido a la mejora que ésta, produce sobre sus propiedades físicas, químicas y biológicas con el fin de aumentar la productividad. Los residuos orgánicos animales y vegetales son los aportes tradicionales para esta finalidad, tales como estiércol animal, residuos de cosechas, lodos de depuradora, residuos sólidos urbanos, vermicompost, etc. [7]. Sin embargo, la influencia de la materia orgánica sobre las propiedades del suelo depende del tipo, cantidad y componentes principales de la materia orgánica añadida [1].

1.1. ASPECTOS GENERALES DE LOS BIOESTIMULANTES EDAFOLÓGICOS

Actualmente, se están desarrollando nuevos productos (bioestimulantes edafológicos), obtenidos a partir de subproductos orgánicos procedentes de procesos agroindustriales, como pueden ser productos a partir de residuos orgánicos de naturaleza vegetal, algarroba [8]; lodos de depuradora [9]; y también a partir de residuos de origen animal generados en la industria del sector, como plumas de pollo [10].

Estos subproductos orgánicos debido a su composición química son sustratos idóneos para obtener los bioestimulantes (ver definición capítulo 1), mediante diferentes tipos de tecnologías, como las hidrólisis químicas, las hidrólisis enzimáticas y fermentaciones dirigidas con microorganismos (en éstas dos últimas se centra ésta Tesis) a través de aplicación directa y controlada de enzimas o a través de procesos fermentativos.

Los efectos positivos de la aplicación de los bioestimulantes son muy variados, debido a que mejoran la calidad del suelo, a través de la proliferación de microorganismos beneficiosos para la cobertura edáfica, como para el crecimiento, calidad y protección vegetal frente a las adversidades [11]. Por lo tanto, éstos productos presentan una doble finalidad; por un lado como protección de la planta ante situaciones de estrés y, por otro, la estimulación microbiana del suelo [12].



Las diferencias que presentan los bioestimulantes respecto a los fertilizantes convencionales, radica en que la función de estos es aportar nutrientes específicos, mientras que los bioestimulantes inducen sistemas fisiológicos en las plantas, como mejorar los mecanismos de absorción de los nutrientes, regular y estimular las comunidades microbianas existentes en los suelos, aumentar la tolerancia de estrés abiótico y reducir las cantidades de adición [11].

1.2. TIPOS DE BIOESTIMULANTES EDAFOLÓGICOS

Fundamentalmente, los bioestimulantes pueden englobarse en 2 bloques principales, los bioestimulantes edafológicos inorgánicos, y los bioestimulantes edafológicos orgánicos [13].

1.2.1. Bioestimulantes edafológicos inorgánicos

Los bioestimulantes edafológicos inorgánicos se caracterizan por ser mezclas de compuestos con nutrientes inorgánicos, tales como compuestos nitrogenados, fosfatados, vitaminas y minerales, provenientes de fuentes inorgánicas. Se ha demostrado que la adición de éstos compuestos, tienen un efecto directo en la proliferación de microorganismos del suelo y por ende, en la biorremediación de contaminantes existentes. Sin embargo, las malas prácticas, tales como el sobreuso de estos compuestos pueden acarrear problemas como inhibición de la proliferación de microorganismos o lixiviación de éstos componentes a las aguas subterráneas [14].

1.2.2 Bioestimulantes edafológicos orgánicos

Los bioestimulantes orgánicos contienen moléculas biodisponibles directas para los microorganismos y las plantas, con un efecto directo y rápido sobre ellos. Éstos compuestos actualmente son muy utilizados, debido a su bajo coste de producción y sus altos beneficios tras su aplicación. Se caracterizan por provocar una rápida estimulación microbiana al ser un reservorio muy asimilable de péptidos, aminoácidos, fosfatos, carbohidratos de fácil asimilación y minerales.



1.3. BIOINDICADORES ESPECÍFICOS DE CALIDAD DEL SUELO

Los suelos son un sistema fundamental para la vida y un recurso no renovable. La necesidad de determinar la calidad del suelo y el efecto de la aplicación de productos mejoradores del suelo, es una cuestión fundamental para poder obtener productos fiables que mejoren la calidad del suelo. Actualmente se utilizan múltiples indicadores de calidad relacionados con las propiedades químicas o biológicas del suelo, susceptibles a cualquier cambio [5].

A continuación, se describen los indicadores de calidad más utilizados.

1.3.1. Actividades enzimáticas como parámetros de calidad del suelo

Los indicadores con mayor eficacia son los biológicos, los cuales dan medidas integradas que no pueden sustituirse a través de variables fisicoquímicas tradicionales, como pH, salinidad, capacidad de intercambio catiónico, etc. Son indicadores potenciales debido a su sensibilidad al estrés ecológico y a las praxis del manejo del suelo, reaccionando a los cambios edáficos con mayor velocidad que las técnicas convencionales [15].

Los indicadores biológicos más utilizados son las enzimas existentes en el suelo, las cuales son utilizadas como indicadores potenciales de la calidad del suelo debido a que son sensibles al estrés ecológico y a las prácticas de manejo del suelo [9].

La producción de enzimas en los suelos proviene de las poblaciones microbianas edáficas, las cuales utilizan materia orgánica presente en el medio [16]. Mediante técnicas convencionales es difícil determinar el total de actividad enzimática en los suelos, por lo que es necesario medir cada tipo de actividad enzimática por separado [17].

Estas enzimas pueden dividirse en dos grupos: extracelulares e intracelulares. Las extracelulares son liberadas durante el metabolismo y



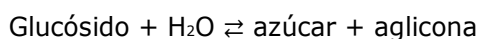
muerte celular y su vida media como enzimas libres es muy corta; mientras que las intracelulares forman parte de la biomasa microbiana.

Existe un grupo de actividades enzimáticas presentes en el suelo que aportan una visión fiable sobre el efecto de las diferentes aplicaciones de productos en los suelos y su manejo.

Estas actividades enzimáticas son β -glucosidasa, fosfatasa, deshidrogenasa y ureasa.

1.3.1.1. Actividad β -glucosidasa

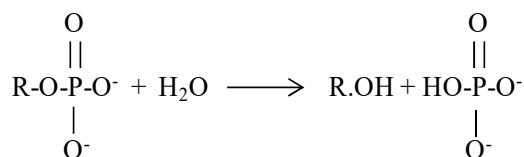
La actividad glucosidasa es una enzima extracelular perteneciente al grupo de las glicosidas que son aquellas enzimas encargadas de catalizar la hidrólisis de β -D-glucopiranosidos.



Está relacionada con el contenido de carbono orgánico en el suelo, proveniente de la degradación de la materia orgánica, siendo de especial interés en la relación con el ciclo del carbono, proporcionando una fuente importante de energía para los microorganismos del suelo [18].

1.3.1.2. Actividad fosfatasa

La actividad fosfatasa es la responsable de la mineralización del fósforo orgánico del suelo y de la liberación del fósforo inorgánico necesario para los microorganismos y las plantas, a través de la hidrólisis de fosfatos hasta formas biodisponibles [19].



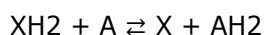
Las enzimas de este grupo se clasifican fosfatasas ácidas, producidas por microorganismos y plantas, y fosfatasas alcalinas,



producidas por microorganismos [20], aunque también pueden provenir de fuentes vegetales, mediante la excreción de enzimas radiculares [21].

1.3.1.3. Actividad deshidrogenasa

La actividad deshidrogenasa, es una actividad enzimática relacionada con el sistema redox microbiano, por lo que se suele considerar un buen indicador de las actividades oxidativas del suelo y de la actividad microbiana del mismo [22,23]. Es la responsable de la oxidación de compuestos orgánicos mediante deshidrogenación:



Dónde:

XH₂ = compuesto orgánico dador de hidrógenos

A = aceptor de hidrógenos

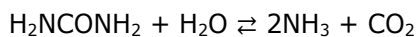
Éstas enzimas son oxidoreductasas, las cuales producen una oxido-reducción de sustancias orgánicas, mediante la fosforilación oxidativa [24]. Éstas enzimas son clave en el metabolismo energético de la célula y son las más activas en la comunidad microbiana del suelo. Por otra parte existe una relación entre la materia orgánica y la actividad enzimática, directamente relacionado por cultivos y sistemas de manejo edáfico, siendo así, un buen indicador de la actividad microbiana del suelo [23]

1.3.1.4. Ureasa

La ureasa es una enzima perteneciente a las amidohidrolasas. Su actividad está relacionada con la reserva o acumulación de nitrógeno a través de la excreción por raíces o microorganismos [25]. Se caracteriza por su estabilidad en suelo pero su existencia en suelos dependiendo del tipo de materia orgánica [9,13].

Es una exoenzima responsable de la catálisis en la hidrolisis de la urea, dando como productos carbono y amonio, el cual se absorbe por los microorganismos y plantas como fuente de nitrógeno [26]:





1.3.2 Indicadores de biomasa y biodiversidad microbiana

Los PLFA son fosfolípidos existentes en bacterias y hongos. Es un indicador de biomasa bacteriana y también informa de su diversidad.

Su análisis es un método ampliamente usado como indicador de calidad del suelo, dando información directa sobre el manejo edáfico y otros factores ambientales [27].

Determina la proliferación de microorganismos y hongos en los suelos, los cuales ayudan a interpretar qué está ocurriendo en los suelos, en procesos de estimulación edáfica.

Estos indicadores son los que abordaremos en esta tesis para el estudio del efecto de los diferentes bioestimulantes y biofertilizantes aplicados en los suelos.



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

2. OBJETIVOS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este capítulo es evaluar el potencial bioestimulante edafológico de los bioestimulantes desarrollados a partir de okara, mediante tecnología enzimática y fermentativa.

- 1- A nivel bioquímico, en particular, sobre las actividades enzimáticas. vinculadas a los ciclos biogeoquímicos.
- 2- La influencia en la biodiversidad microbiana



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

3. ARTÍCULO

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb



Production of biostimulants from okara through enzymatic hydrolysis and fermentation with *Bacillus licheniformis*: comparative effect on soil biological properties

Ángel Orts, Manuel Tejada, Juan Parrado, Patricia Paneque, Carlos García, Teresa Hernández & Isidoro Gómez-Parrales

To cite this article: Ángel Orts, Manuel Tejada, Juan Parrado, Patricia Paneque, Carlos García, Teresa Hernández & Isidoro Gómez-Parrales (2018): Production of biostimulants from okara through enzymatic hydrolysis and fermentation with *Bacillus licheniformis*: comparative effect on soil biological properties, *Environmental Technology*, DOI: [10.1080/09593330.2018.1436596](https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1436596)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1436596>



Accepted author version posted online: 05 Feb 2018.
Published online: 15 Feb 2018.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 54



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tent20>

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb



Production of biostimulants from okara through enzymatic hydrolysis and fermentation with *Bacillus licheniformis*: comparative effect on soil biological properties

Ángel Orts^a, Manuel Tejada^{ib}, Juan Parrado^{ib}, Patricia Paneque^{ib}, Carlos García^c, Teresa Hernández^c and Isidoro Gómez-Parrales^{ib}

^aDpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain; ^bResearching Group Edafología Ambiental, Dpto. Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola, E.T.S.I.A., Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain; ^cDepartment of Soil and Water Conservation and Organic Waste Management, CEBAS-CSIC, Murcia, Spain

ABSTRACT

In this work okara (OK), a by-product of soy milk manufacturing, is submitted to an enzymatic hydrolysis and a fermentative process to produce different soil biostimulants (BS): EH, hydrolysate obtained by the enzymatic process; FHEB, fermentation broth with *Bacillus licheniformis* and the enzymes secreted during the fermentation; FHE, fermentation broth without bacteria and FH, the FHE hydrolysate in which enzymes were denatured. Enzymatic hydrolysates showed a different chemical composition compared with fermented hydrolysates and OK. It had a higher protein concentration as well as C, P and K. The proteins of OK were converted into peptides with a lower molecular weight, the fermented hydrolysates being those with the lowest molecular weight profile. The influences of hydrolysates and OK were tested in soil, finding that β -glucosidase, phosphatase and dehydrogenase activities were stimulated by every treatment. However, it was observed that EH produced a greater stimulation of dehydrogenase and phosphatase than both OK and fermented BS. The bacterial and fungal phospholipid fatty acids were also higher in soils amended with BS than those of the control and soils with OK. It has also been found that β -glucosidase, phosphatase and microbial biomass were dose-dependent in every treatment, but dehydrogenase only was dose-dependent in EH and OK treatments.

ARTICLE HISTORY

Received 29 November 2017
Accepted 31 January 2018

KEYWORDS

Okara; soil biostimulation; enzymatic hydrolysis; *Bacillus licheniformis*; fermentation



1. Introduction

The addition of organic matter to soils is a common agricultural and environmental practice used to supply nutrients and improve the soil properties with the aim of enhancing either the productivity of the agroecosystem or reclaiming degraded soils [1–3]. In order to achieve these objectives, different sources rich in organic matter such as crop residues, animal manures, sewage sludge, by-products of food processing industry, etc. have been used [4–7]. However, it is necessary that these residues break down to provide the nutrients needed to stimulate the soil microbiology but, as found by several authors, this breakdown takes some time which depends on both the soil properties and the nature of the added organic wastes [1,8,9]. Therefore, recently, new products, called biostimulants (BS), have been used. These products are obtained by hydrolytic processes, enzymatic hydrolysis being the most used one. In order to produce these BS, different industrial by-products have been used, such as carob germ [10],

sewage sludge [11], wheat-condensed distiller [12], defatted sunflower seed meal [13], chicken feathers [3], rice bran [3] and by-product of the dry-mill bioethanol process [14].

Enzymatic hydrolysis of these organic wastes yields a product rich in peptides, amino acids, polysaccharides, humic acids, etc., which provide a higher concentration of organic matter, macro and micro nutrients than those of the raw materials. Therefore, they provoke an enhancement of the microbial soil activity, improving its capability to reclaim contaminated soils; thus several researchers have studied the effect of BS on the degradation of different xenobiotics in soils, such as polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) [15] and pesticides [16]. Likewise, the use of BS as biofertilisers exerts a positive influence on plant growth and fruit quality and production [10,13,17,18]

Taking into account what has been found so far, any organic waste rich in organic matter can be used to obtain BS. In this sense, okara (OK) is an interesting raw

CONTACT Isidoro Gómez-Parrales  iangel@us.es  Researching Group Edafología Ambiental, Dpto. Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola, E.T.S.I.A., Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

© 2018 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

material because of its composition. OK is a by-product of soy milk and tofu production rich in dietary fibre and proteins which contains essential amino acids [19]. Besides, it has a little quantity of fats, other carbohydrates and isoflavones. This composition makes OK an exceptional source of functional compounds in the food industry [20–23]. Nevertheless, due to the fact that OK ferments rapidly and has a high content of water, its conservation, although possible, is unprofitable. Consequently, OK has to be processed quickly and so, currently in the Western World, this by-product is mainly used as feed or fertiliser [19]. To overcome this aspect, OK could be submitted to a hydrolytic process to obtain a product with a high concentration of peptides and other functional compounds which can be used not only as a source of organic nitrogen and phosphorus but also as a sustainable tool to enhance the soil quality, contributing to making OK profitable and to reduce chemical fertilisers [24,25].

In addition to enzymatic hydrolysis to valorise a wide variety of agricultural and agro-industrial by-products, several authors have carried out a fermentative process using different microorganisms to recycle these residues, most of which focus on the production of bioethanol [26–30] and enzymes [31–37]. On the other hand, there are some research works that study the application to soils of the bio-based products obtained by fermentation. Among them, it is worth highlighting those which focus on the production of bioherbicides [38], bio-pesticides [39,40] and biosurfactants [41,42]. Many research works have brought to light the importance of biosurfactants in the restoration of contaminated soils. In this sense Magthalin et al. [43] found that cationic biosurfactants obtained from chicken tallow were very efficient in the bioremediation of chromium-contaminated soils. On the other hand, other authors have highlighted the importance of these substances in reclamation of organic xenobiotics-contaminated soils. In this sense, Bezza et al. [44] and Mnif et al. [45] concluded that biosurfactants enhanced the bioavailability and hence the biodegradation of PAHs and diesel oil. Finally, Wang et al. [46] observed that the phytoremediation of DDT-contaminated soil was improved when biosurfactants were used. However, there are few articles in which the production of BS by fermentative processes is studied, such as Chintagunta et al. [30] who, in fact, obtained a biomanure as a co-product in the bioethanol manufacturing process, Oliveira Mendes et al. [47] and Acevedo-Díez et al. [48] who used the broth obtained after the fermentation of a culture medium with *Aspergillus niger* and *Bacillus thuringiensis* as biofertiliser, respectively.

Hence, the present paper aimed to produce BS from OK through two different processes, namely an enzymatic hydrolytic process, using an endoprotease, and a

fermentative process, using *Bacillus licheniformis*. After obtaining the BS, its effect on soil biological properties and soil microbial community was assessed.

2. Materials and methods

2.1. Substrate, enzymatic hydrolysis and fermentative processes

The substrate used in the fermentative as well as in the enzymatic hydrolysis process was OK, a by-product of the soy milk production provided by the company Soria Natural located in Garray (Soria, Spain).

The enzymatic hydrolysis process was carried out according to the pH-stat method [49] using as hydrolytic agent the enzyme bioprotease LA-450 (Biocon Española S.A.) which is subtilisin. The process took place in a bioreactor operating under controlled temperature without either stirring or pH control and with the following conditions: (a) temperature: 55°C; (b) OK concentration: 10% (w/v); (c) subtilisin concentration: 0.05% and (d) operating time: 3 h. Finally, the hydrolysed product was centrifuged and the hydrolysed liquid (EH) was concentrated in a rotary evaporator until obtaining 58% of dry matter (Table 1).

Regarding fermentation, this was carried out in 500 mL Erlenmeyer flasks under controlled stirring and temperature by *B. licheniformis* ATCC 21415, which was stored under freezing at –80°C and refreshed 24 h before inoculation in LB medium (10 g tryptone, 10 g NaCl, 5 g yeast extract and 1 L of water). The conditions of the

Table 1. Chemical analyses and protein molecular weight distribution of OK, water-soluble fraction from OK, enzymatic hydrolysates (EH) and fermented hydrolysates (FH).

	OK	EH	FHE	FHEB	FH
Chemical analyses					
Dry matter (%)	23.3	58.0	31.5	77.4	38.9
Water solubility (%)	17	32	65	-	-
Fats (%)	23.6	-	-	-	-
Ashes (%)	4.05	-	-	-	-
Carbohydrates (%)	29.5	-	-	-	-
Soluble fibre (%)	2.8	-	-	-	-
Insoluble fibre (%)	26	-	-	-	-
Protein (%)	41.28	66.54	42.25	-	-
Soluble proteins (%)	4.4	-	-	-	-
Insoluble proteins (%)	36.88	-	-	-	-
C (%)	53.7	44.81	33.6	-	-
N (%)	6.60	10.64	6.76	-	-
C/N	8.13	4.21	5.01	-	-
K (g kg ⁻¹)	9.11	17.14	11.25	-	-
P (g kg ⁻¹)	6.53	11.16	6.89	-	-
Protein molecular weight distribution					
Molecular weight (kD)					
>10	91.14	7.85	0	-	-
10–5	1.09	15.87	0	-	-
5–1	0.80	0	28.42	-	-
<1	6.98	75.74	71.47	-	-

Note: The results are referred to dry weight.



fermentation were the followings: (a) OK concentration: 1% (w/v); (b) *B. licheniformis* concentration: 2% (w/v); (c) temperature: 37°C; (d) initial pH: 9 and (e) operating time: 312 h. Then the insoluble fibre was separated by centrifugation, obtaining a supernatant with hydrolysed proteins, bioactive products, enzymes and bacteria (FHEB). Secondly, a fraction of this supernatant was centrifuged to eliminate the bacteria, and thus a soluble fraction with hydrolysed proteins, bioactive compounds and enzymes was obtained (FHE). Thirdly, a portion of this last fraction was heated at 80°C for 20 min to denature the enzymes. Therefore, the resultant product was composed of hydrolysed proteins, bioactive compounds and denatured enzymes (FH). Finally, all these fractions were concentrated in a rotary evaporator obtaining the following dry matter content for each BS: FHEB 77.4%, FHE 31.5% and FH 38.9% (Table 1).

2.2. Chemical characterisation of OK, enzymatic and fermented hydrolysates

Macro elements in OK (previously burned) and in enzymatic and fermented hydrolysates were analysed by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. The equipment used standard operational conditions, which are detailed in Parrado et al. [37].

Ash was analysed according to standard AOAC methods [50]. Total soluble carbohydrates were determined after extraction with a mixture of ethanol/water (2/3) for 2 h. After centrifugation at 4000×g, the supernatant was filtered through a No. 1 Whatman paper, and total soluble sugars were estimated colorimetrically using the phenol-sulphuric acid method with a standard curve of glucose [51]. Crude fat content was determined gravimetrically after OK extraction with hexane for 12 h in a Soxhlet extractor [52]. Organic matter was analysed by dry combustion at 550°C for 6 h [53]. Total nitrogen was determined by the Kjeldahl method [50]. The protein content was determined by multiplying the total nitrogen content in a protein by the conversion factor 5.71, which is applicable to soy protein. Fibre content was determined gravimetrically according to standard AOAC methods [50]. OK solubility was determined in 200 mL of water with an OK concentration of 10% at 55°C for 24 h.

2.3. Protein molecular weight and solubility determination

The molecular mass distribution of protein in the samples was determined by size-exclusion chromatography using an ÄKTA-purifier (GE Healthcare). The operational conditions are described in Parrado et al. [10].

Protein solubility was determined using the method described by Adler-Nissen [54]: briefly, 5 mL of 2.4 M trichloroacetic acid was added to 10 mL of the sample (1% w/v), the precipitate was removed by centrifugation (8000g, 10 min) and the nitrogen concentration of the supernatant was determined.

2.4. Biostimulation experimental design

The soil used in this experiment is a Haplic Regosol (Calcari) [55]. Soil samples were collected from the 0–25 cm surface layer. The main soil characteristics and methodology used to determine the physical and chemical parameters in soil are presented elsewhere [11,17].

The biostimulation design was performed in microcosms consisting of a glass pot with 300 g of dried and 2 mm sieved soil. Prior to the treatments, soil was pre-incubated at 25°C for 7 days at 40% of its water-holding capacity according to Tejada et al. [56].

Soil was amended with OK and the four BS obtained at two concentrations so that the organic matter was 1% and 1.5%. An unamended soil was used as control. Distilled water was added to each soil to achieve 60% of its water-holding capacity.

The BS were liquid, so they were dissolved in distilled water before the application. On the other hand, OK, having been dried, was a powdery solid and so was dry mixed with soil. Therefore, there were five treatments per each concentration plus the control soil, with the following incubation conditions: (a) C: unamended soil; (b) OK1.5: amended soil with OK so that organic matter in soil was 1.5%; (c) OK1: amended soil with OK so that organic matter in soil was 1%; (d) EH1.5: amended soil with EH so that organic matter in soil was 1.5%; (e) EH1: amended soil with EH so that organic matter in soil was 1%; (f) FHEB1.5: amended soil with FHEB so that organic matter in soil was 1.5%; (g) FHEB1: amended soil with FHEB so that organic matter in soil was 1%; (h) FHE1.5: amended soil with FHE so that organic matter in soil was 1.5%; (i) FHE1: amended soil with FHE so that organic matter in soil was 1%; (j) FH1.5: amended soil with FH so that organic matter in soil was 1.5%; (k) FH1: amended soil with FH so that organic matter in soil was 1%. Triplicates of every treatment were performed and were incubated for 55 days at room temperature. For each treatment and each incubation time, a sample of 20 g of soil was taken and stored at –20°C in sealed polyethylene jars prior to enzymatic activities and phospholipid fatty acid (PLFA) analyses.

2.5. Soil enzymatic activities and PLFA analyses

After 1, 3, 7, 10, 15, 30 and 55 days of the incubation period and for each treatment four enzymatic activities



and bacterial Gram+, bacterial Gram– and fungal PLFAs were measured.

The dehydrogenase, urease, phosphatase and β -glucosidase enzymatic activities were determined using the methods described by García et al. [57], Kandeler and Gerber [58], Tabatabai and Bremner [59] and Masciandaro et al. [60], respectively.

Phospholipids were analysed at the Group of Soil Enzymology and Bioremediation and Organic Wastes Lab, CEBAS-CSIC, Murcia (Spain) according to Bastida et al. [61]. The concentration of each PLFA (ng g^{-1}) was used to indicate the Gram+ and Gram– bacteria as well as fungi biomass.

2.6. Statistical analysis

In order to test the significance of differences among means of the dependent variables measured in the soil for each treatment during the incubation (repeated measurements model) a mixed ANOVA model with a between-subjects factor (incubation time) and a within-subject factor (treatment) was performed. The analysis was made with the function aov of R statistical software [62]. When the differences were statistically significant the *post hoc* Tukey HSD test was applied using the R package ‘agricolae’ [63].

3. Results

3.1. BS obtaining process

As mentioned above, OK is a by-product of the soy milk manufacturing process with only 23.3% of dry matter which is composed of fat (23.6%), insoluble fibre (26%) and protein (41.28%) (Table 1). OK's chemical composition makes it an interesting product to be used as biosimulant/biofertiliser but due to its low water solubility (17%) it has very little bioavailability.

In order to make the most of OK's chemical composition, it is necessary to degrade the insoluble fraction and make it more bioavailable. To achieve this goal, two biorefinery processes have been proposed, namely enzymatic hydrolysis and a fermentative process.

The enzymatic hydrolysate showed an increase of 25% in proteins content with respect to OK. Most of these proteins in OK (91.14%) have a molecular weight higher than 10 kD while in EH 75.74% of them have a molecular weight lower than 1 kD (Table 1).

On the other hand, the fermented hydrolysates FHEB, FHE and FH had practically the same chemical composition since the differences among them are due to physical processes; so only the FHE chemical analysis is shown. The protein content is 42.25% (24% lower than

EH), almost the same as that of original OK; nonetheless, 28.42% of these have a molecular weight between 1 and 5 kD and 71.47% are below 1 kD, that is, 99.89% have a molecular weight under 5 kD.

Table 1 also gathers the elemental analysis of every product. The concentration of phosphorus is higher in EH (11.16 mg kg^{-1}) than both in OK (6.53 mg kg^{-1}) and in FHE (6.89 mg kg^{-1}). Regarding the potassium values, EH has the highest one (17.14 mg kg^{-1}), followed by FHE (11.25 mg kg^{-1}) and OK had the lowest quantity (9.11 mg kg^{-1}). Nitrogen behaves in a similar way as phosphorus, i.e. EH presents the greatest value (10.64%) among the three products. On the contrary, the carbon content of OK (53.7%) is larger than those of EH (44.81%) and FHE (33.6%).

3.2. Soil microbial activity

3.2.1. β -glucosidase activity

In Table 2 it can be observed that every treatment produced a significant stimulation ($p < .05$) of this activity regarding control soil from the 7th day on, showing a sharp increase until reaching the maximum value between 10th and 15th days in soils amended with either enzymatic or fermentative hydrolysates. Afterwards, an abrupt decrease was produced until the end of the incubation period, reaching values similar to those of the first day. The evolution of β -glucosidase activity in soils amended with OK followed a quite different behaviour, namely, there was an increase during the entire experimental period, reaching the maximum value at the end of the incubation.

The highest β -glucosidase activities were achieved in soils amended with FHE1.5 and FHE1 on the 15th day, being 2.16 and $1.96 \mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, around four-fold higher than that of the control and two-fold significantly higher than the maximum values of the other products at both concentrations. On the other hand, the maximum β -glucosidase activity in soils amended with EH, FHEB, FH and OK was twice as much that of the control but did not show significant differences among them.

According to the evolution of β -glucosidase activity over the incubation period, the maximum values, achieved on different days depending on the treatment, were significantly higher than those of the first day. The greatest differences were observed again in soils amended with FHE1.5 and FHE1.

This enzymatic activity was dose-dependent; so the higher the dose the greater the β -glucosidase activity. The differences were significant in the period between the 7th and 30th days, except when FHEB was used, in which case, practically, there were no significant differences during the entire period.



Table 2. Evolution during the experimental period of β -glucosidase and phosphatase activities (mean \pm standard error) ($\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$) in soils amended with OK and BS obtained from OK.

	1	3	7	10	15	30	55
β-Glucosidase							
C	0.5 a \pm 0.05	0.52 a \pm 0.07	0.47 a \pm 0.02	0.47 a \pm 0.1	0.48 a \pm 0.03	0.46 a \pm 0.08	0.46 a \pm 0.03
OK1.5	0.6 bc \pm 0.19	0.66 be \pm 0.09	0.75 d \pm 0.04	0.79 h \pm 0.03	0.91 g \pm 0.12	0.96 gm \pm 0.12	1.07 im \pm 0.07
OK1	0.55 cf \pm 0.04	0.60 bc \pm 0.08	0.65 be \pm 0.03	0.71 de \pm 0.06	0.80 h \pm 0.12	0.88 g \pm 0.27	0.96 gm \pm 0.18
EH1.5	0.63 bc \pm 0.15	0.67 be \pm 0.06	0.91 g \pm 0.1	1.14 ij \pm 0.1	0.85 gh \pm 0.08	0.57 cf \pm 0.15	0.51 ac \pm 0.1
EH1	0.55 cf \pm 0.09	0.61 bc \pm 0.1	0.68 be \pm 0.15	0.89 g \pm 0.13	0.71 de \pm 0.06	0.49 a \pm 0.13	0.45 a \pm 0.06
FHEB1.5	0.64 b \pm 0.15	0.72 de \pm 0.18	0.85 gh \pm 0.21	1.02 im \pm 0.22	0.84 gh \pm 0.14	0.67 be \pm 0.1	0.63 bc \pm 0.06
FHEB1	0.50 a \pm 0.04	0.66 be \pm 0.08	0.72 de \pm 0.04	0.82 h \pm 0.12	0.73 d \pm 0.12	0.56 cf \pm 0.09	0.54 ac \pm 0.15
FHE1.5	0.74 d \pm 0.17	0.86 gh \pm 0.14	1.02 im \pm 0.05	1.82 k \pm 0.05	2.16 l \pm 0.14	1.53 kn \pm 0.1	1.28 j \pm 0.1
FHE1	0.67 be \pm 0.02	0.78 dh \pm 0.12	0.86 gh \pm 0.1	1.6k n \pm 0.16	1.96 kl \pm 0.32	1.46 n \pm 0.02	1.10 i \pm 0.04
FH1.5	0.64 b \pm 0.2	0.82 h \pm 0.07	0.92 g \pm 0.19	1.29 j \pm 0.12	1.05 im \pm 0.1	0.79 h \pm 0.07	0.78 dh \pm 0.23
FH1	0.58 cf \pm 0.19	0.69 be \pm 0.18	0.81 h \pm 0.09	1.11 i \pm 0.45	0.91 g \pm 0.13	0.58 cf \pm 0.12	0.61 bc \pm 0.11
Phosphatase							
C	3.28 a \pm 0.39	3.28 a \pm 0.14	3.25 a \pm 0.12	3.25 a \pm 0.02	3.29 a \pm 0.13	3.27 a \pm 0.2	3.24 a \pm 0.11
OK1.5	3.84 abc \pm 0.37	4.14 bfg \pm 0.46	4.68 jl \pm 0.48	4.76 jl \pm 0.35	5.04 l \pm 0.11	5.61 n \pm 0.09	6.83 d \pm 0.34
OK1	3.72 ac \pm 0.1	4.02 bcg \pm 0.21	4.13 bfg \pm 0.16	4.16 bfg \pm 0.27	4.41 fgj \pm 0.4	4.95 l \pm 0.13	5.49 ln \pm 0.24
EH1.5	6.52 de \pm 0.33	8.42 h \pm 0.57	9.49 km \pm 0.5	10.3 k \pm 0.23	8.76 hm \pm 0.42	6.67 de \pm 0.42	5.59 n \pm 0.1
EH1	5.94 en \pm 0.17	7.89 i \pm 0.36	8.00 h \pm 0.22	8.80 hm \pm 0.24	7.76 i \pm 0.25	6.24 de \pm 0.16	5.48 ln \pm 0.31
FHEB1.5	3.67 ac \pm 0.08	4.02 bcg \pm 0.15	4.13 bfg \pm 0.29	4.83 jl \pm 0.08	3.96 bcg \pm 0.18	3.94 bc \pm 0.33	3.86 bc \pm 0.17
FHEB1	3.39 a \pm 0.12	3.53 ac \pm 0.15	3.73 ac \pm 0.26	3.98 bcg \pm 0.13	3.63 ac \pm 0.2	3.60 ac \pm 0.28	3.46 ac \pm 0.06
FHE1.5	3.44 a \pm 0.16	3.75 abc \pm 0.19	4.47 fgj \pm 0.12	4.75 jl \pm 0.16	4.07 bfg \pm 0.14	3.79 abc \pm 0.26	3.59 ac \pm 0.33
FHE1	3.39 a \pm 0.36	3.58 ac \pm 0.1	4.06 bfg \pm 0.13	4.32 fg \pm 0.08	3.70 ac \pm 0.3	3.58 ac \pm 0.17	3.54 ac \pm 0.17
FH1.5	3.68 ac \pm 0.08	3.79 abc \pm 0.17	3.96 bcg \pm 0.08	4.47 fgj \pm 0.18	3.91 bc \pm 0.18	3.64 ac \pm 0.13	3.34 a \pm 0.15
FH1	3.51 ac \pm 0.24	3.56 ac \pm 0.09	3.71 ac \pm 0.09	4.03 bcg \pm 0.13	3.68 ac \pm 0.22	3.45 ac \pm 0.14	3.25 a \pm 0.1

Notes: Data followed by the same letter are not significantly different ($p < .05$). PNP: p-nitrophenol.

Finally, it is worth highlighting that at the end of the experimental period β -glucosidase activity in soils amended with fermented BS continued being significantly higher than that of the control, the highest values being found in soils with FHE1.5 and FHE1.

3.2.2. Phosphatase activity

Soil phosphatase activity was also significantly stimulated by every treatment. As happened with β -glucosidase activity, soils amended with enzymatic as well as fermentative hydrolysates displayed a fast rise until reaching the maximum values of phosphatase activity on the 10th day. In soils treated with OK this enzymatic activity increased gradually until the end of the incubation (Table 2).

The higher stimulation was found in soils amended with EH1.5 and EH1 that achieved on the 10th day values of 10.3 and 8.8 $\mu\text{mol PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$, three-fold significantly higher than that of the control and twice as much as the greatest activities of soils treated with OK and fermentative hydrolysates.

As happened with β -glucosidase activity, soil phosphatase activity was dose-dependent with every treatment, although FHEB, FHE and FH BS hardly displayed significant differences among them.

As opposed to what happened with β -glucosidase activity, at the end of the experimental period only enzymatic hydrolytic BS (EH1.5 and EH1) presented phosphatase activity values significantly higher than that of the control soil.

3.2.3. Urease activity

Nothing but OK at 1.5% and 1% stimulated the urease activity, which was between 25% and 70% significantly higher than those of the control and the BS from the 7th to the 55th day (Table 3).

3.2.4. Dehydrogenase activity

The application of OK and the BS to soil caused a significant stimulation of the dehydrogenase activity with respect to the control. The significantly highest differences were produced in soils amended with EH1.5 as well as EH1 on the 10th day, which reached values of 11.89 and 9.84, around four-fold that of the control and more than two-fold the maximum activity provoked by fermented BS and OK.

As was the case with β -glucosidase and phosphatase activities, dehydrogenase activity increased sharply since the 1st day until achieving, on the 10th day, the maximum value in soils in which EH, FHEB, FHE and FH were added. Following this, a decrease was produced, taking at the end of the incubation period values akin to the initial ones and to the control, except for EH1.5 and EH1 which presented a dehydrogenase activity 59% and 42% significantly greater than those of the initial day as well as 100% and 80% higher than that of the control. In contrast, the soils treated with OK at 1.5% and 1% experienced a gradual rise of this parameter up to reaching a maximum at the end of the experimental period, a significant increase in INTF concentration being observed, in relation to the first day of 78% and 56%, respectively.



Table 3. Evolution during the experimental period of urease ($\mu\text{mol NH}_4^+ \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$) and dehydrogenase activities (mean \pm standard error) ($\mu\text{mol INTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$) in soils amended with OK and BS obtained from OK.

	1	3	7	10	15	30	55
Urease							
C	2.29 a \pm 0.2	2.24 a \pm 0.1	2.30 a \pm 0.12	2.22 a \pm 0.12	2.28 a \pm 0.25	2.27 a \pm 0.06	2.29 a \pm 0.17
OK1.5	2.56 a \pm 0.3	2.71 ab \pm 0.2	2.88 bc \pm 0.4	2.95 bc \pm 0.22	3.03 c \pm 0.05	3.83 d \pm 0.02	3.99 d \pm 0.18
OK1	2.52 a \pm 0.19	2.59 a \pm 0.61	2.88 bc \pm 0.15	2.94 bc \pm 0.79	3.35 cd \pm 0.25	3.48 d \pm 0.11	3.60 d \pm 0.16
EH1.5	2.46 a \pm 0.27	2.48 a \pm 0.19	2.34 a \pm 0.31	2.36 a \pm 0.16	2.48 a \pm 0.17	2.37 a \pm 0.2	2.33 a \pm 0.15
EH1	2.40 a \pm 0.2	2.26 a \pm 0.05	2.35 a \pm 0.3	2.47 a \pm 0.11	2.32 a \pm 0.23	2.31 a \pm 0.34	2.27 a \pm 0.25
FHEB1.5	2.50 a \pm 0.19	2.49 a \pm 0.29	2.52 a \pm 0.17	2.47 a \pm 0.13	2.38 a \pm 0.19	2.46 a \pm 0.17	2.45 a \pm 0.13
FHEB1	2.38 a \pm 0.18	2.39 a \pm 0.09	2.44 a \pm 0.36	2.44 a \pm 0.17	2.51 a \pm 0.15	2.50 a \pm 0.21	2.42 a \pm 0.15
FHE1.5	2.43 a \pm 0.17	2.34 a \pm 0.19	2.38 a \pm 0.14	2.27 a \pm 0.4	2.42 a \pm 0.25	2.44 a \pm 0.25	2.43 a \pm 0.23
FHE1	2.43 a \pm 0.19	2.57 a \pm 0.09	2.47 a \pm 0.15	2.29 a \pm 0.17	2.42 a \pm 0.09	2.42 a \pm 0.07	2.40 a \pm 0.06
FH1.5	2.45 a \pm 0.2	2.13 a \pm 0.11	2.32 a \pm 0.3	2.53 a \pm 0.2	2.54 a \pm 0.07	2.46 a \pm 0.13	2.39 a \pm 0.18
FH1	2.37 a \pm 0.13	2.43 a \pm 0.19	2.46 a \pm 0.22	2.41 a \pm 0.09	2.29 a \pm 0.16	2.35 a \pm 0.18	2.33 a \pm 0.12
Dehydrogenase							
C	2.72 a \pm 0.03	2.86 a \pm 0.24	2.81 a \pm 0.15	2.80 a \pm 0.11	2.78 a \pm 0.32	2.79 a \pm 0.05	2.86 a \pm 0.2
OK1.5	3.46 be \pm 0.22	3.54 be \pm 0.2	4.02 cf \pm 0.09	4.36 fi \pm 0.03	4.60 im \pm 0.11	5.08 lm \pm 0.3	6.17 h \pm 0.61
OK1	3.37 be \pm 0.24	3.47 be \pm 0.25	3.80 bc \pm 0.17	4.18 fi \pm 0.18	4.27 fi \pm 0.32	4.98 lm \pm 0.25	5.26 lm \pm 0.34
EH1.5	3.84 bc \pm 0.12	4.09 cf \pm 0.17	7.36 g \pm 0.43	11.89 j \pm 0.63	8.57 n \pm 0.48	6.56 gh \pm 0.52	6.09 h \pm 0.39
EH1	3.74 b \pm 0.18	3.45 be \pm 0.19	6.18 h \pm 0.4	9.84 k \pm 0.03	6.97 g \pm 0.28	5.37 lm \pm 0.23	5.31 lm \pm 0.32
FHEB1.5	3.06 ad \pm 0.06	3.14 ade \pm 0.13	3.40 be \pm 0.17	3.75 b \pm 0.06	3.46 be \pm 0.11	3.11 ade \pm 0.64	2.97 ad \pm 0.05
FHEB1	2.92 ad \pm 0.07	2.94 ad \pm 0.12	3.19 de \pm 0.13	3.44 be \pm 0.15	3.19 de \pm 0.07	3.05 ad \pm 0.07	2.93 ad \pm 0.15
FHE1.5	3.46 be \pm 0.2	4.09 cf \pm 0.36	5.28 lm \pm 0.9	6.57 gh \pm 0.33	4.35 fi \pm 0.17	3.69 b \pm 0.19	2.95 ad \pm 0.28
FHE1	3.00 ad \pm 0.17	3.81 bc \pm 0.31	4.27 fi \pm 0.48	5.53 hl \pm 0.28	3.65 b \pm 0.17	3.02 ad \pm 0.48	2.87 a \pm 0.23
FH1.5	3.18 de \pm 0.44	3.85 bc \pm 0.55	4.22 fi \pm 0.22	5.66 hl \pm 0.37	4.73 m \pm 0.72	3.95 cf \pm 0.35	3.02 ad \pm 0.24
FH1	2.91 ad \pm 0.39	3.28 de \pm 0.2	3.81 bc \pm 0.5	5.34 lm \pm 0.25	4.67 m \pm 0.86	3.23 de \pm 0.28	2.96 ad \pm 0.08

Notes: Data followed by the same letter are not significantly different ($p < .05$). INTF: 2-p-iodo-3-nitrophenyl formazan.

Contrary to β -glucosidase and phosphatase activities, dehydrogenase activity was not dose-dependent in soils amended with FHEB, FHE and FH although there were significant differences among them. Nonetheless, it was dose-dependent in soils amended with EH during all the incubation period and in soils treated with OK at the end of the incubation.

3.3. Soil microbial community

Every treatment increased the soil bacterial and fungal populations (Tables 4 and 5). Bacterial Gram+ and Gram- PLFA showed the highest values on the 10th day when the soil was treated with both enzymatic and fermented BS and at the end of the incubation in soils amended with OK. The greatest concentrations of bacterial Gram+ PLFA corresponded to soils with EH1.5 and EH1 with values three-fold significantly higher than that of the control and between 20% and 50% significantly greater with respect to the maximum reached with OK and the fermented hydrolysates at both concentrations. With regard to Gram- PLFA, the maximum concentration was found in the soil amended with OK1.5 (359.2 ng g⁻¹). This was four-fold significantly greater than that of the control and from 25% to 70% significantly higher than fungal PLFA in soils amended with EH, FHEB, FHE and FH at both doses.

Contrary to the bacterial population, the fungal population reached the maximum concentration on the 15th day, the significantly highest values yielded when FHE

and FHEB were applied to the soil, which were approximately four times as much as the fungal PLFA concentration of control soil. Likewise, depending on the treatment and on the dose, fungal population in these soils was between 10% and 55% higher than the maximum values found in soils amended with the other products.

As happened with β -glucosidase phosphatase and dehydrogenase activities, it is worth mentioning that at the end of the experimental period bacterial Gram+ and Gram- as well as fungal PLFA measured in soils amended with EH and fermented BS were significantly higher when compared to the control soil. Again, the highest differences depended on the parameter measured, so the highest bacterial Gram+ and Gram- PLFA were achieved in soils treated with EH and the greatest fungal PLFA were produced by FHE. In spite of that, the three parameters displayed little differences among BS and not always were statistically significant.

Finally, as was observed with enzymatic activities, the higher the dose applied to the soil the greater the soil bacterial Gram+, Gram- and fungal populations.

4. Discussion

The application of organic wastes to soil is a well-known practice to increase soil fertility which can affect the structure of soil microbiota and therefore the dynamic of nutrients in soils [64]. One of the most important nutrients is nitrogen since it is found among the most



Table 4. Evolution during the experimental period of bacterial Gram+ and Gram- PLFA (ng g⁻¹) (mean ± standard error) in soils amended with OK and BS obtained from OK.

	1	3	7	10	15	30	55
Bacterial Gram+							
C	183.3 a ± 2.2	184.6 a ± 0.9	186.0 a ± 1.2	187.5 a ± 0.8	186.1 a ± 1.8	185.5 a ± 1.4	188.2a ± 0.7
OK1.5	201.3 a ± 1.6	245.0 cd ± 2.6	245.2 cd ± 0.9	335.0 f ± 0.5	397.3 l ± 0.9	435.2 k ± 1.7	475.2j ± 2.2
OK1	198.7 a ± 1	222.7 ce ± 0.8	241.5 cd ± 1	254.7 d ± 2.2	308.6 hi ± 0.7	322.7 fh ± 2.2	395.2 i ± 2.2
EH1.5	284.3 b ± 1.2	330.8 f ± 0.9	449.3 j ± 0.7	692.4 n ± 2	560.0 m ± 1.9	323.5 fh ± 1.9	314.8hi ± 1.8
EH1	282.4 b ± 0.6	320.1fh ± 1.5	423.1 k ± 0.9	559.1 m ± 2.7	442.3 j ± 1.3	321.0 fh ± 0.9	313.5hi ± 1.2
FHEB1.5	226.7 c ± 2.3	286.8 bg ± 1.6	387.9 l ± 1.1	455.3 j ± 1.4	389.3 l ± 1.6	268.9 g ± 1	214.9e ± 1.1
FHEB1	224.7 ce ± 0.5	272.6 g ± 1.0	292.2 bi ± 1.3	374.8 o ± 0.8	342.2 q ± 1.4	265.6 g ± 1.2	213.6e ± 1
FHE1.5	245.7 cd ± 0.6	315.7 hi ± 1.2	565.5 m ± 2.2	515.4 jp ± 2.7	347.7 q ± 1.1	266.2 g ± 1.7	215e ± 1.8
FHE1	236.7 c ± 0.6	301.8 bi ± 0.8	448.3 j ± 1.5	355.7 o ± 1.2	326.0 fh ± 1.8	263.7 dg ± 0.7	213e ± 1.1
FH1.5	225.6 c ± 0.7	266.9 g ± 1.1	317.5 hi ± 1	533.4 mp ± 0.9	456.8 j ± 1.3	323.3 fh ± 1.3	213.3e ± 1.3
FH1	215.7 e ± 0.7	263.9 dg ± 1.1	311.0 hi ± 1	408.6 l ± 0.4	387.9 l ± 1.2	320.6 fh ± 1.3	211.8e ± 1.7
Bacterial Gram-							
C	79.4 a ± 0.7	80.3 a ± 0.6	79.4 a ± 0.4	79 a ± 0.3	80.5 a ± 0.4	79.6 a ± 0.6	80.0 a ± 0.2
OK1.5	92.4 bc ± 1.3	102.4 de ± 0.6	125.6 h ± 0.5	203.2 lm ± 0.7	205.3 lm ± 0.6	216.3 mp ± 0.5	359.8 r ± 1.3
OK1	89.9 c ± 0.8	98.6 be ± 0.6	104.4 de ± 0.6	115.5 dn ± 0.8	136.1 g ± 0.4	160.5 f ± 1.1	208.1 lm ± 0.7
EH1.5	111.9 d ± 0.8	154.9 f ± 1.4	264.5 i ± 0.5	286.0 o ± 0.4	277.5 io ± 1	154.2 f ± 1.2	125.6 f ± 0.8
EH1	108.8 d ± 1.5	153.1 f ± 1.1	238.1 j ± 0.5	262.8 i ± 0.8	175.5 k ± 0.4	153.2 f ± 1.2	121.2 hn ± 0.1
FHEB1.5	107.5 d ± 1.3	155.5 f ± 1.2	179.4 k ± 0.6	239.3 j ± 0.6	250.2 j ± 0.5	155.6 f ± 1.7	117.5 dn ± 0.6
FHEB1	91.3 c ± 1	154.7 f ± 1	176.6 k ± 0.9	214.7 mp ± 0.4	134.5 g ± 0.9	127.8 hq ± 0.7	116.0 n ± 1.2
FHE1.5	111.1 d ± 0.3	138.2 g ± 1.2	263.3 i ± 0.4	279.4 io ± 0.6	185.0 k ± 0.4	157.3 f ± 0.9	123.3 hn ± 1.4
FHE1	93.4 bc ± 1.2	136.3 g ± 0.8	242.3 j ± 0.7	263.3 io ± 0.4	155.0 f ± 0.4	131.7 gq ± 0.9	89.5 c ± 0.5
FH1.5	92.4 bc ± 0.6	134.1 g ± 0.6	197.7 f ± 0.8	212.2 m ± 0.5	229.1 p ± 1	152.4 f ± 0.9	126.1 h ± 0.8
FH1	86.0 c ± 0.4	132.7 gq ± 1.3	158.7 m ± 0.6	206.1 lm ± 0.7	156.3 f ± 0.5	137.7 g ± 0.6	125.9 h ± 0.5

Note: Data followed by the same letter are not significantly different ($p < .05$).

Table 5. Evolution during the experimental period of fungal PLFA (ng g⁻¹) (mean ± standard error) in soils amended with OK and BS obtained from OK.

	1	3	7	10	15	30	55
C	17.5 a ± 0.8	18.8 a ± 0.7	18.0 a ± 0.6	17.0 a ± 0.3	18.3 a ± 0.3	18.6 a ± 0.4	17.1 a ± 0.4
OK1.5	31.0 b ± 0.5	32.7 h ± 1	39.6 jm ± 0.4	47.4 lp ± 0.5	49.1 p ± 0.3	52.0 q ± 0.8	53.3 q ± 0.6
OK1	18.2 a ± 0.4	20.8 d ± 0.6	23.2 ef ± 0.7	27.7 co ± 0.3	31.5 bh ± 0.3	34.3 i ± 0.2	39.4 jm ± 0.4
EH1.5	29.1 bo ± 0.4	29.9 bo ± 0.3	42.4 jk ± 0.3	52.2 q ± 0.2	57.6 s ± 0.3	42.6 jk ± 0.5	27.3 co ± 0.6
EH1	16.6 a ± 0.3	21.4 fd ± 0.3	44.3 l ± 0.3	47.3 lp ± 0.5	46.4 lp ± 0.3	25.4 ce ± 0.2	24.0 e ± 0.7
FHEB1.5	25.3 ce ± 0.5	31.6 bh ± 0.9	33.1 hi ± 0.5	57.7 s ± 0.6	63.7 r ± 0.4	31.7 bh ± 0.4	23.7 ef ± 0.7
FHEB1	20.5 d ± 0.5	25.8 ce ± 0.7	29.2 bo ± 0.2	38.6 mn ± 0.7	52.2 q ± 0.5	29.3 bo ± 0.9	22.8 f ± 0.5
FHE1.5	24.5 e ± 0.4	33.5 hi ± 0.4	38.9 mn ± 0.9	46.0 lp ± 0.6	69.8 t ± 0.9	36.4 in ± 0.2	36.8 in ± 0.9
FHE1	21.2 fd ± 0.4	32.9 h ± 0.8	35.4 in ± 0.4	40.7 jm ± 0.4	61.3 r ± 0.6	18.7 a ± 0.4	19.3 dg ± 0.9
FH1.5	21.9 fd ± 0.4	24.7 e ± 0.5	26.6 c ± 0.5	51.2 q ± 0.2	55.8 s ± 0.8	47.5 lp ± 0.5	25.8 ce ± 0.7
FH1	24.5 a ± 0.4	22.3 f ± 0.5	27.4 co ± 0.4	48.6 p ± 0.6	45.7 l ± 0.9	38.7 mn ± 0.9	16.8 a ± 0.7

Note: Data followed by the same letter are not significantly different ($p < .05$).

common limiting elements to primary production and other ecosystems processes [65]. Considering that proteinaceous materials are one of the major nitrogen components in soils [66], the first step in the liberation of this element is the breakdown of proteins by extracellular proteases which according to Jan et al. [67] is the major bottleneck in nitrogen cycling.

Both the enzymatic and fermentative hydrolyses increased the protein concentration in BS as well as the percentage of peptides with a low molecular weight which are more soluble than proteins and can be more easily taken up by microorganisms [67] and plants [13,17]. On the other hand, these results are in agreement with those of other authors who used an enzymatic hydrolytic process to obtain BS from different agro-industrial by-products and sewage sludges and obtained enzymatic hydrolysates with a high percentage of low

molecular weight peptides [11–12]. However, the molecular weight distribution in the fermented hydrolysates shown in this article is below 5 kD which is not in accordance with other researchers like Parrado et al. [37] who used a fermentative process with *B. licheniformis* to hydrolyse chicken feathers and found a molecular weight profile akin to that of enzymatic hydrolysates. This can be due to the nature of the raw material. In fact, Rodríguez-Morgado et al. [16] obtained a BS from chicken feathers through enzymatic hydrolysis with a higher molecular size than that of the BS produced using vegetable wastes [10,12,14]. Another aspect to bear in mind is that EH has a higher P concentration than OK and fermented BS (FHEB, FHE and FH). This is in accordance with Parrado et al. [10] who observed an increase of P in the enzymatic hydrolysate with regard to the raw material, although there are several works



where the concentration of this element decreases [11,13,56], the greatest concentration being in the insoluble phase after hydrolysis. This could be due to phytic acid being associated with proteins [68] which are broken down during the enzymatic hydrolysis and consequently this macroelement is released. Nevertheless, fermented BS and OK present a similar P concentration perhaps owing to the immobilisation of this element by microorganisms [69].

According to Tejada et al. [70] enzymatic activities can be used as indicators of overall microbial activity in soils, the knowledge of hydrolases activities being of great importance because they are related to the cycle of such important nutrients as N, P and C. In the present study, β -glucosidase was stimulated by every treatment and was dose-dependent, but OK behaved in a quite different way to both enzymatic and fermented BS. In soils treated with OK the maximum value of this enzyme activity was displayed at the end of the experimental period, while soils with EH, FEHB, FHE and FH achieved the highest values around the 10th day. The differences in the behaviour of raw OK and hydrolysed OK could be due to its composition. β -glucosidase plays a significant role in the degradation of organic matter, catalysing the hydrolysis of low molecular weight carbohydrates in soils [71]. Original OK has a high content in insoluble fibre which is not present in the hydrolysates. Therefore, firstly, this compound has to be broken down. However, in the hydrolysates these complex compounds do not exist and all the carbohydrates are soluble and easier to breakdown. Thus, these results are in agreement with those expressed in other articles in which a gradual increase of β -glucosidase activity was found when different organic residues were added to soil [1,4,61]. Likewise, the behaviour of hydrolysates is also in accordance to what has been observed in different works where this kind of products was obtained [10,15,16]; nonetheless these authors reported that β -glucosidase reached the maximum value around the fifth and seventh days of the incubation period. Paying attention to the β -glucosidase activities of EH and fermented hydrolysates (FHEB, FHE and FH) only there were significant differences between FHE and the other hydrolysates. The maximum values of EH, FHEB, FH and OK were similar and did not present significant differences. As mentioned in the introduction section several studies have been performed to produce enzymes by fermentation using different agro-industrial by-products. In this sense, Shu-bin et al. [72] carried out fermentation with *B. subtilis* Pa5 obtaining a broth with a high β -glucosidase activity. This could explain why soils amended with FHE had the highest β -glucosidase activity. Regarding FH, its

chemical composition is similar to FHE but it was submitted to a high-temperature treatment so that the enzymes were denatured, losing its activity.

Phosphatase showed a behaviour analogous to β -glucosidase in soils amended with OK and hydrolysates which is according to many authors [4,11,12]. Soils amended with EH displayed the highest values of this enzyme followed by OK. Phosphatase enzymes are released by microorganisms to mineralise organic phosphorus [69]; so the higher the concentration of this, the higher the phosphatase activity. This could explain the greater activity in soil amended with EH, since it has the highest concentration of P, but comparing OK with fermented BS (FHEB, FHE and FH) the former presented the greatest activity, despite P concentration being similar to FHEB, FHE and FH. A possible explanation of this behaviour is that phytate is the main form of P occurring in legumes and different species of *Bacillus* excrete extracellular phytase which catalyses the hydrolysis of these phytates to myo-inositol and phosphoric acid [73]. According to this, during the fermentation *B. licheniformis* could have excreted phytase to hydrolyse the phytate and release the inorganic phosphorus, while these enzymes exist neither in the enzymatic hydrolysis nor in raw OK. So phosphorus in fermented BS is found as phosphate and in EH and OK as organic phosphorus.

On the other hand, enzymatic and fermented hydrolysates did not stimulate urease activity, possibly because of the presence of low molecular weight peptides which are easily transported through the cellular membrane and, therefore, microorganisms do not need to excrete any enzyme to breakdown the organic compounds to obtain easily available N. These results agree with other authors who found that urease activity was not stimulated after application of different BS [11,12,56]. On the contrary, when OK was applied to soil a stimulation of urease was observed which was increasing gradually until the end of the incubation period. The results obtained with OK are similar to those found by other authors when applied to different soil organic wastes (vermicompost, manure, compost, MSW, green manure, etc.) with high molecular weight proteins which must be hydrolysed to release N. In these cases, the urease activity increased during the experimental period [7,8].

With regard to dehydrogenase activity, the present work brought to light that soils amended with EH displayed significantly highest values compared with the other treatments. In addition, the soils treated with FHEB and FH showed values similar to OK. As happened with phosphatase and β -glucosidase, in soils where OK was added dehydrogenase increased gradually, reaching the maximum activity at the end of the incubation.



Several authors have reported that the addition of organic matter of different chemical compositions to soils produces a stimulation of dehydrogenase. Such a stimulation is gradual and achieves the highest values at the end of the incubation period when the organic wastes added to soil are composed of complex organic matter which firstly has to be mineralised to release the nutrients [18,61,74]. In the same way as other enzymatic activities, in soils amended with enzymatic as well as fermented hydrolysates, dehydrogenase activity increased sharply with a maximum on the 10th day and then decreased until the end of the experimental time. Dehydrogenase is involved in the intracellular flux of electron to O_2 , that is to say, it is linked with respiratory processes so that can be considered a measurement of microbial oxidative activities in soils [57,75]. Tejada et al. [70] found that dehydrogenase activity was a good index of microbial biomass in Mediterranean soils treated with different organic wastes. The sharpest and fast increase of this enzyme in soils amended with protein hydrolysates has been reported by other authors using BS obtained from different organic wastes [3,11,12,76]. As exposed above, the lower molecular weight peptides are easily taken by microorganisms. Moreover more complex proteins are resistant to being hydrolysed because they are protected by humic material and inorganic soil components such as clays and iron and aluminium oxy-hydroxides [66]. Accordingly, the higher content in low molecular weight peptides' distribution, the easier the soil microbiota takes them and the greater the dehydrogenase activity. This explains why soils amended with EH presented the highest values of the mentioned activity. Nevertheless, soils treated with fermented hydrolysates, despite having a lower molecular weight profile, had a lower dehydrogenase activity than EH and similar to OK. Possibly this is a consequence of its chemical composition, given that FHEB, FHE and FH have a considerably lower concentration of proteins than EH and similar to OK.

The effect of the different amendments on soil microbiota was studied, analysing the PLFA profile. Organic amendments stimulated both bacterial and fungal growth as observed by Rodríguez-Morgado et al. [16,18] and Bastida et al. [61]. In this sense, bacterial and fungal PLFA in soils amended with fermented and enzymatic BS increased in the first days of incubation in consonance with dehydrogenase activity and due to the same reason, namely the presence of low molecular weight peptides. Besides, Meidute et al. [77] studied the influence of different carbon and nitrogen sources and concluded that easily available carbon sources, such as simple carbohydrates, favoured bacterial growth, especially in nitrogen-rich media but there are opportunistic fungi which also grow in this media. In this work, in

general, both bacteria and fungi underwent a higher increase in soils amended with fermented and enzymatic BS compared with OK, probably due to what has been explained above. The highest bacterial biomass corresponded to EH possibly because it has the greatest proteins content.

The present work also points out that β -glucosidase and phosphatase activities as well as bacterial and fungal PLFA in soils amended with OK, EH and fermented hydrolysates are dose-dependent but dehydrogenase activity only is dose-dependent in soils amended with EH and OK.

Finally, the BS FHEB produced the lower enzymatic stimulation and the lower bacterial and fungal proliferation compared with the other treatments. Saison et al. [78] demonstrated that in soils amended with composts, the compost-borne microorganisms were outcompeted by the soil microorganisms, the microbial structure changes being essentially due to the use of a compost rich in organic matter. Similarly, Pimmata et al. [79] in a study about bioremediation of soil by bioaugmentation drew as conclusion that a short time after bioaugmentation there was a competition with the indigenous microorganisms and consequently a decrease in the soil activity. This could explain why FHEB presented the lower enzymatic activities.

In conclusion, an enzymatic hydrolysis and a fermentative process have been developed to manufacture different hydrolysates with BS properties. These hydrolysates induced a fast and sharp increase of enzymatic activities as well as bacterial and fungal PLFA in the first days of incubation compared with control soil. Soils amended with EH reached the highest dehydrogenase activity regarding raw OK and fermented hydrolysates. The work also concludes that *B. licheniformis* is outcompeted by soil microorganisms and therefore the soils amended with this BS presented the lower soil activity.

Acknowledgements

We thank the company Soria Natural located in Garray (Soria, Spain) for providing us the okara used as raw material in this work.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

ORCID

Manuel Tejada  <http://orcid.org/0000-0003-0944-4946>
 Juan Parrado  <http://orcid.org/0000-0002-1462-408X>
 Patricia Paneque  <http://orcid.org/0000-0003-1197-4524>
 Isidoro Gómez-Parrales  <http://orcid.org/0000-0003-1627-034X>



References

- [1] Tejada M, Gómez I, Fernández-Boy E, et al. Effects of sewage sludge and *Acacia dealbata* composts on soil biochemical and chemical properties. *Commun Soil Sci Plant Anal.* 2014;45:570–580.
- [2] Aranda V, Macci C, Peruzzi E, et al. Biochemical activity and chemical-structural properties of soil organic matter after 17 years of amendments with olive-mill pomace co-compost. *J Environ Manage.* 2015;147:278–285.
- [3] Tejada M, Benítez C, Gómez I, et al. Use of biostimulants on soil restoration: effects on soil biochemical properties and microbial community. *Appl Soil Ecol.* 2011;49:11–17.
- [4] Tejada M, González JL, García-Martínez AM, et al. Effects of different green manures on soil biological properties and maize yield. *Bioresource Technol.* 2008;99:1758–1767.
- [5] Peltre C, Gregorich EG, Bruun S, et al. Repeated application of organic waste affects soil organic matter composition: evidence from thermal analysis, FTIR-PAS, amino sugars and lignin biomarkers. *Soil Biol Biochem.* 2017;104:117–127.
- [6] Goswami L, Nath A, Sutradhar S, et al. Application of drum compost and vermicompost to improve soil health, growth, and yield parameters for tomato and cabbage plants. *J Environ Manage.* 2017;200:243–252.
- [7] Tejada M, Benítez C. Effects of crushed maize straw residues on soil biological properties and soil restoration. *Land Degrad Develop.* 2014;25:501–509.
- [8] Franco-Andreu L, Gómez I, Parrado J, et al. Soil biology changes as a consequence of organic amendments subjected to a severe drought. *Land Degrad Develop.* 2017;28:897–905.
- [9] Tejada M, González JL. Effects of foliar application of a byproduct of the two-step olive oil mill process on rice yield. *Eur J Agron.* 2004;21:31–40.
- [10] Parrado J, Bautista J, Romero EJ, et al. Production of a carob enzymatic extract: potential use as a biofertilizer. *Bioresource Technol.* 2008;99:2312–2318.
- [11] Rodríguez-Morgado B, Gómez I, Parrado J, et al. Obtaining edaphic biostimulants/biofertilizers from different sewage sludges. Effects on soil biological properties. *Environ Technol.* 2015;6:2217–2226.
- [12] García-Martínez AM, Díaz A, Tejada M, et al. Enzymatic production of an organic soil biostimulant from wheat-condensed distiller solubles: effects on soil biochemistry and biodiversity. *Process Biochem.* 2010;45:1127–1133.
- [13] Ugolini L, Cintia S, Righetta L, et al. Production of an enzymatic protein hydrolyzate from defatted sunflower seed meal for potential application as a plant biostimulant. *Ind Crop Prod.* 2015;75:15–23.
- [14] Parrado J, Escudero-Gilete ML, Friaza V, et al. Enzymatic vegetable extract with bioactive components: influence of fertilizer on the colour and anthocyanins of red grapes. *J Sci Food Agric.* 2007;87:2310–2318.
- [15] Rodríguez-Morgado B, Gómez I, Parrado J, et al. Accelerated degradation of PAHs using edaphic biostimulants obtained from sewage sludge and chicken feathers. *J Hazard Mater.* 2015;300:235–242.
- [16] Rodríguez-Morgado B, Gómez I, Parrado J, et al. Behaviour of oxyfluorfen in soils amended with edaphic biostimulants/biofertilizers obtained from sewage sludge and chicken feathers. Effects on soil biological properties. *Environ Sci Pollut Res.* 2014;21:11027–11035.
- [17] Colla G, Nardi S, Cardarelli M, et al. Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Sci Hortic.* 2015;196:28–38.
- [18] Tejada M, Rodríguez-Morgado B, Gómez I, et al. Use of biofertilizers obtained from sewage sludges on maize yield. *Eur J Agron.* 2016;78:13–19.
- [19] Rinaldi VEA, Ng PKW, Bennink MR. Effects of extrusion on dietary fiber and isoflavone contents of wheat extrudates enriched with wet okara. *Cereal Chem J.* 2000;77:237–240.
- [20] Redondo-Cuenca A, Villanueva-Suárez MJ, Mateos-Aparicio I. Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and English methods. *Food Chem.* 2008;108:1099–1105.
- [21] Jankowiak L, Jonkman J, Rossier-Miranda FJ, et al. Exergy driven process synthesis for isoflavone recovery from okara. *Energy.* 2014;74:471–483.
- [22] Galanakis CM. Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends Food Sci Technol.* 2012;26:68–87.
- [23] Mateos-Aparicio I. Beans by-products, potential sources for functional ingredients. In: Popescu E, Golubev I, editors. *Beans: nutrition, consumption and health.* New York (NY): Nova Science Publishers Inc.; 2011. p. 233–248.
- [24] Maini P. The experience of the first biostimulant, based on aminoacids and peptides: a short retrospective, review on the laboratory researches and the practical results. *Fertilitas Agrorum.* 2006;1:29–43.
- [25] Schiavon M, Ertani A, Nardi S. Effects of an Alfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolism in *Zea mays* L. *J Agric Food Chem.* 2008;56:11800–11808.
- [26] Matsakas L, Gao Q, Jansson S, et al. Green conversion of municipal solid wastes into fuels and chemicals. *Electron J Biotechnol.* 2017;26:69–83.
- [27] Phuong Thuy Pham T, Kaushik R, Parshetti GK, et al. Food waste-to-energy conversion technologies: current status and future directions. *Waste Manage.* 2015;38:399–408.
- [28] Pleissner D, Qinsheng Q, Cuijuan G, et al. Valorization of organic residues for the production of added value chemicals: a contribution to the bio-based economy. *Biochem Eng J.* 2016;116:3–16.
- [29] Champagne P. Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues: a Canadian perspective feasibility of producing bio-ethanol from waste residues in Canada. *Resour Conserv Recycl.* 2007;50:211–230.
- [30] Chintagunta AD, Ray S, Banerjee R. An integrated bioprocess for bioethanol and biomanure production from pineapple leaf waste. *J Clean Prod.* 2017;165:1508–1516.
- [31] Ergun SO, Urek RO. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. *Ann Agrar Sci.* 2017;15:273–277.
- [32] Ajijolakewua K, Leha CP, Abdullaha WNW, Lee CK. Optimization of production conditions for xylanase production by newly isolated strain *Aspergillus niger* through solid state fermentation of oil palm empty fruit bunches. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2017;11:239–247.
- [33] Socol CR, Ferreira da Costa ES, Junior Letti LA, et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnol Res Innov.* 2017;1:52–71. DOI: 10.1016/j.biori.2017.01.002.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

- [34] Mohan Kumar NS, Ramasamy R, Manonmani KH. Production and optimization of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. *Ind Crop Prod.* **2013**;43:150–158.
- [35] Oharan A, Soares de Castro RJ, Nishide TG, et al. Invertase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation: focus on physical–chemical parameters, synergistic and antagonistic effects using agro-industrial wastes. *Biocatal Agric Biotechnol* **2015**;4:645–652.
- [36] Uyar F, Baysal Z. Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. under solid state fermentation. *Process Biochem.* **2004**;39:1893–1898.
- [37] Parrado J, Rodríguez-Morgado B, Tejada M, et al. Proteomic analysis of enzyme production by *Bacillus licheniformis* using different feather wastes as the sole fermentation media. *Enzyme Microbial Technol.* **2014**;57:1–7.
- [38] Castro de Souza AR, Bortoluzzi Baldoni D, Lima J, et al. Bioherbicide production by *Diaporthe* sp. isolated from the Brazilian Pampa biome. *Biocatal Agric Biotechnol.* **2015**;4:575–578.
- [39] Zhang W, Qui L, Gong A, et al. Solid-state fermentation of kitchen waste for production of *Bacillus thuringiensis*-based bio-pesticide. *BioResources.* **2013**;8.1:1124–1135.
- [40] Zhang W, Zou H, Jiang L, et al. Semi-solid state fermentation of food waste for production of *Bacillus thuringiensis* biopesticide. *Biotechnol Bioprocess Eng.* **2015**;20:1123–1132.
- [41] Meneses DP, Gudiña EJ, Fernandes F, et al. The yeast-like fungus *Aureobasidium thailandense* LB01 produces a new biosurfactant using olive oil mill wastewater as an inducer. *Microbiol Res.* **2017**;204:40–47.
- [42] Satpute SK, Plaza GA, Banpurkar AG. Biosurfactants' production from renewable natural resources: example of innovative and smart technology in circular bioeconomy. *MSPE* **2017**;25:46–54.
- [43] Magthalin J, Varadharajan A, Swarnalatha S, et al. Utilization of chicken tallow for the production of cationic biosurfactant and thereof for decontamination of Cr(III) containing soil. *Procedia Environ Sci.* **2016**;35:895–913.
- [44] Bezza FA, Nkhalambayausi Chirwa EM. The role of lipopeptide biosurfactant on microbial remediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil. *Chem Eng J.* **2017**;309:563–576.
- [45] Mnif I, Sahnoun R, Elous-Chaabouni S, et al. Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. *Process Saf Environ Protect.* **2017**;109:72–81.
- [46] Wang B, Wang Q, Liu W, et al. Biosurfactant-producing microorganism *Pseudomonas* sp. SB assists the phytoremediation of DDT-contaminated soil by two grass species. *Chemosphere.* **2017**;182:137–142.
- [47] Oliveira Mendes G, Galvez A, Vassileva M, et al. Fermentation liquid containing microbially solubilized P significantly improved plant growth and P uptake in both soil and soilless experiments. *Appl Soil Ecol.* **2017**;117–118:208–211.
- [48] Aceves-Diez AE, Estrada-Castañeda KJ, Castañeda-Sandoval LM. Use of *Bacillus thuringiensis* supernatant from a fermentation process to improve bioremediation of chlorpyrifos in contaminated soils. *J Environ Manage* **2015**;157:213–219.
- [49] Adler-Nissen J. *Enzymatic hydrolysis of food proteins*. Barking: Elsevier Applied Science Publisher; **1986**.
- [50] AOAC. 18th ed. Washington, DC: Official Methods of Analysis; **2006**.
- [51] Dubois M, Gilles K, Hamilton J, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* **1956**;28:350–356.
- [52] Clemente A, Sanchez-Vioque R, Vioque J, et al. Chemical composition of extracted dried olive pomaces containing two and three phases. *Food Biotechnol.* **1997**;11:273–291.
- [53] MAPA. Madrid (España): Métodos oficiales de análisis; **1994**.
- [54] Parrado J, Miramontes E, Jover M, et al. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. *Food Chem.* **2006**;98:742–748.
- [55] FAO. Rome: World reference base for soil resources. *World Soil Resources Reports* 103; **2006**.
- [56] Tejada M, García-Martínez AM, Rodríguez-Morgado B, et al. Obtaining biostimulant products for land application from the sewage sludge of small populations. *Ecol Eng.* **2013**;50:31–36.
- [57] García C, Hernández T, Costa F, et al. The dehydrogenase activity of soils and ecological marker in processes of perturbed system regeneration. *Proceedings of the 11th International Symposium of Environmental Biogeochemistry*, Salamanca, Spain; **1993**.
- [58] Kandeler E, Gerber H. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol Fertil Soils.* **1988**;6:68–72.
- [59] Tabatabai MA, Bremner JM. Use of p-nitrophenol phosphate in assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol Biochem.* **1969**;1:301–307.
- [60] Masciandaro G, Ceccanti B, García C. Anaerobic digestion of straw and piggery wastewaters. II. Optimization of the process. *Agrochimica.* **1994**;38:195–203.
- [61] Bastida F, Kandelér E, Moreno JL, et al. Application of fresh and composted organic wastes modifies structure, size and activity of soil microbial community under semi-arid climate. *Appl Soil Ecol.* **2008**;40:318–329.
- [62] R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2017. Available from: <https://www.R-project.org/>.
- [63] Felipe de Mendiburu. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 1.2-4; 2016. <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>.
- [64] Blagodatskaya E, Kuzyakov Y. Mechanisms of real and apparent priming effects and their dependence on soil microbial biomass and community structure: critical review. *Biol Fertil Soils.* **2008**;45:115–131.
- [65] Vitousek PM, Poder S, Houlton BZ, et al. Terrestrial phosphorus limitation: mechanisms, implications, and nitrogen–phosphorus interactions. *Ecol Appl.* **2010**;20:5–15.
- [66] Mooshammer M, Wanek W, Hämmerle I, et al. Adjustment of microbial nitrogen use efficiency to carbon:nitrogen imbalances regulates soil nitrogen cycling. *Nat Commun.* **2014**;5:2272. DOI: 10.1038/ncomms4694.
- [67] Jan MT, Roberts P, Toheim SK, et al. Protein breakdown represents a major bottleneck in nitrogen cycling in grassland soils. *Soil Biol Biochem.* **2009**;41:2272–2282.
- [68] Ali F, Ippersiel D, Lamarche F, et al. Characterization of low-phytate soy protein isolates produced by membrane technologies. *Inn Food Sci Emerg Technol* **2010**;11:162–168.



- [69] Richardson AE, Simpson FJ. Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant Physiol.* 2011;156:989–996.
- [70] Tejada M, Hernández MT, García C. Application of two organic amendments on soil restoration: effects on the soil biological properties. *J Environ Qual.* 2006;35:1010–1017.
- [71] Stott DE, Andrews SS, Liebig MA, et al. Evaluation of β -glucosidase activity as a soil quality indicator for the soil management assessment framework. *Soil Sci Soc Am J.* 2010;74:107–119.
- [72] Shu-bin L, Ren-chao Z, Xia L, et al. Solid-state fermentation with okara for production of cellobiose-rich cellulases preparation by a selected *Bacillus subtilis* Pa5. *Afr J Biotechnol.* 2012;11:2720–2730.
- [73] Choi YM, Suh HJ, Kim JM. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *J Protein Chem.* 2001;20:287–292.
- [74] Gaid S, Nain L. Exploration of composted cereal waste and poultry manure for soil restoration. *Bioresour Technol.* 2010;101:2996–3003.
- [75] Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, et al. Microbial diversity and soil functions. *Eur J Soil Sci.* 2003;54: 655–670.
- [76] Chen SK, Edwards CL, Suble S. The influence of two agricultural biostimulants on nitrogen transformations, microbial activity, and plant growth in soil microcosms. *Soil Biol Biochem.* 2003;35:9–19.
- [77] Meidute S, Demoling F, Baath E. Antagonistic and synergistic effects of fungal and bacterial growth in soil after adding different carbon and nitrogen sources. *Soil Biol Biochem.* 2008;40:2334–2343.
- [78] Saison C, Degrange V, Oliver R, et al. Alteration and resilience of the soil microbial community following compost amendment: effects of compost level and compost-borne microbial community. *Environ Microbiol.* 2006;8:247–257.
- [79] Pimmata P, Reungsang A, Plangklang P. Comparative bioremediation of carbofuran contaminated soil by natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2013;85:196–204.

ÁMBITO- PREFIJO**GEISER**

Nº registro

REGAGE22e00054148269**CSV****GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb****DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN****<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>****FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO****28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular**

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se caracterizó la composición química de okara (ver capítulos 2, y 4); presentando alto contenido de biomoléculas como carbohidratos (30%), proteínas (40%) y un 18% de lípidos, así como minerales y moléculas bioactivas como las isoflavonas, cuyos valores corresponden en torno al 12-40% del contenido total de isoflavonas en la soja [43,44] lo que la convierte en un sustrato idóneo para la obtención de productos bioestimulantes.

4.1 Obtención de un bioestimulante a través de tecnología hidrolítica

En primer lugar, vamos a describir la obtención de un bioestimulante rico en hidrolizados proteicos y compuestos bioactivos, mediante un proceso de hidrólisis enzimática.

Se realizó una extracción enzimática de okara y seguidamente una optimización del proceso, siendo los principales parámetros, la solubilización de materia orgánica y el contenido en compuestos bioactivos.

4.1.1 Efecto del pH sobre la solubilización de okara.

El okara fue solubilizado a diferentes pH, solamente utilizando el agua como agente solvente, con la finalidad de comprobar la cantidad de materia solubilizada. Se observó que la solubilidad fue mínima a pH 4,0 (4%) aumentando la solubilidad en función del aumento de pH, corroborándose una correlación directa entre pH y solubilidad. Estos datos sugieren que soluciones acuosas con pH alcalino favorecen la solubilización.

4.1.2 Efecto del pH y tratamiento con proteasa alcalina de *Bacillus* (Subtilisina), sobre la solubilización de okara

Okara fue solubilizado a diferentes pH en presencia de una proteasa.

Respecto a la presencia de la proteasa, ésta mejoró la solubilización de materia orgánica considerablemente alcanzando el máximo de un 30% a



pH 10, frente a un 17,1% a pH 6 en las extracciones exclusivamente con agua.

Respecto a la solubilización específica de proteínas, observamos que la solubilización de proteínas aumentaba a valores de pH más altos, siendo máxima a pH 10 La adición de proteasa duplicó la cantidad de proteína extraída en comparación con los controles respectivos en todos los valores de pH probados.

Tras el análisis por cromatografía de exclusión molecular del tamaño molecular de las biomoléculas presentes en los extractos, se observa una reducción del tamaño proteico superior a 10 kDa, con un contenido de un 91,14 % en el extracto acuoso a solo 7,85% en hidrolizado con proteasa, mientras que las fracciones de proteína/péptido (1 a 10 kDa) y péptido/aminoácido (<1 kDa) aumentaron de 1,09% a 15,87% y 6,98% a 75,74%, respectivamente. Por tanto, se aumentó la concentración de péptidos y aminoácidos, pudiendo existir numerosos péptidos bioactivos (generados por digestión proteolítica), presentes en el extracto hidrolizado. Cabe destacar que las propiedades antioxidantes están relacionadas con el contenido de aminoácidos hidrófobos y aromáticos [45,46]. En definitiva, estos resultados subrayan la idoneidad del tratamiento con proteasa para solubilizar el contenido de proteínas del okara y su potencial para generar péptidos bioactivos.

4.1.3 Efecto del pH, tratamiento con proteasa alcalina de *Bacillus* (Subtilisina) sobre la solubilización de isoflavonas y extracción de capacidad antioxidante

Se estudió la influencia de la hidrólisis proteolítica en la solubilización de las isoflavonas presentes en okara.

En las extracciones con agua, se observó que a pH alcalino se produjo una mayor solubilización de isoflavonas. Los mayores rendimientos se obtuvieron a pH 10 con 469,89 µg/g de okara seco, incrementándose un 28% respecto a pH 6 (original de nuestra okara) con un valor de 131,16 µg/g de okara seco.



Por su parte, las muestras tratadas con proteasa a diferentes pH, los mayores valores de extracción de isoflavonas se obtuvieron a pH 10 con 763,40 µg/g de okara seco, alcanzando un incremento de un 78% del total de isoflavonas solubilizadas. Esto es debido a una mayor eficiencia de la extracción a pH 10,, pero también a una mayor conversión de las formas conjugadas térmicamente inestables (malonil y acetilglucósidos) a sus respectivos β-glucósidos y agliconas, más estables [47]. Es importante destacar que se desea la mayor recuperación de agliconas, ya que se consideran las formas más bioactivas de isoflavonas [48].

Así pues, los mayores valores de extracción de todos los tipos de isoflavonas se alcanzaron a pH 10 con proteasa. Respecto a otros métodos eficaces de extracción de isoflavonas, la hidrólisis enzimática planteada, aumentó la cantidad total de isoflavonas solubilizadas en un 78% y elevó el contenido de aglicona 9,1 veces, mientras que para Jankowiak et al. 2014, su mayor rendimiento de extracción de isoflavonas con etanol fue de un 70% y los niveles de agliconas apenas agregaron un 5%.

Por lo tanto, se considera la hidrólisis a pH 10 y 55°C, con proteasa una buena herramienta para la obtención y bioconversión de agliconas junto a β-glucósidos.

Un parámetro muy importante es la relación proteína/isoflavona. Según los resultados obtenidos respecto a la solubilización de proteínas e isoflavonas, encontramos una correlación directa entre la cantidad de proteínas solubilizadas y las isoflavonas totales extraídas en todos los valores de pH analizados, ya sea con el tratamiento con proteasa o con la extracción de agua. Por otra parte, se observó que los ratios de extracción de isoflavonas presentes en el extracto enzimático fueron menores de lo esperado respecto a la cantidad de proteínas solubilizadas, , tras el tratamiento enzimático, el rendimiento de isoflavonas extraída fue inferior a la esperada para la cantidad de proteínas solubilizadas, en parte debida a una superior concentración de proteínas solubilizadas por las enzimas.

Esto refuerza la noción de que la solubilización de las isoflavonas fue un efecto indirecto provocado por la solubilización de proteínas y que algunas isoflavonas también pueden quedar atrapadas en la matriz de fibra



insoluble, en concordancia con trabajos previos como Jankowiak et al., 2014 [49].

Así pues, al solubilizar proteínas, indirectamente se extraen isoflavonas. Así pues, debido a que nuestra hidrólisis es específica para proteínas, se podría incrementar el rendimiento en la extracción de isoflavonas.

La actividad reductora de los extractos de okara fue evaluada, mediante la técnica FRAP, la cual mide la capacidad de reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} , siendo un indicador de la capacidad antioxidante. Se observó que la actividad reductora de las muestras se veía fuertemente afectada por el pH. En general, dicha capacidad antioxidante aumentó en función del pH, obteniendo los máximos valores a pH 10 en el extracto enzimático.

Está descrito que la genisteína y la genistina tienen las mayores actividades antioxidantes de todas las isoflavonas de la soja (Lee et al., 2005). En consecuencia, los elevados valores obtenidos de estas isoflavonas a pH 10 pueden explicar los valores más altos de antioxidantes. Se ha demostrado que los péptidos de bajo peso molecular tienen actividad antioxidante [50,51] por lo que también pueden contribuir al aumento de la actividad reductora total observada en los extractos enzimáticos de okara, debido a la solubilización del contenido proteico con el tratamiento con proteasa.

4.2 Obtención de un bioestimulante a través de tecnología fermentativa.

En segundo lugar, vamos a describir la obtención de un bioestimulante rico en hidrolizados proteicos y compuestos bioactivos, mediante un proceso de hidrólisis enzimática mediante fermentación bacteriana.

B. licheniformis es una bacteria Gram positiva utilizada en la industria biotecnológica para producir enzimas industriales, debido a la gran capacidad de producción de enzimas exocelulares (proteasas, amilasas, lipasas, quitinasas, etc.). En este ensayo, una vez determinadas las



condiciones óptimas de fermentación (pH 7, temperatura 37°C y concentración de sustrato 2%), obtuvimos un nuevo producto rico en enzimas (proteasas, lipasas y fitasas) donde la materia orgánica de el okara fue modificada por las enzimas hidrolíticas excretadas por *B. licheniformis*.



Imagen 3: Fermentación de Okara con *B. licheniformis* en bioreactor de laboratorio

El okara presenta una baja solubilidad (17%), por tanto, este producto tiene muy poca biodisponibilidad [52]. En este trabajo, mediante fermentación utilizando *B. licheniformis*, el okara se transformó en diferentes productos nuevos con potencial capacidad ambiental y agronómica. La fermentación de okara con *B. licheniformis* conduce a una solubilización de un 65%, obteniendo una fase orgánica soluble (OKF-sol) con alta biodisponibilidad y una fase sólida insoluble (OKF-unsol). Como resultado de la fermentación, los OKF-sol está compuesto principalmente por péptidos y aminoácidos libres asociados a diferentes compuestos bioactivos como isoflavonas y enzimas hidrolíticas, como proteasas, fitasas, lipasas, producidas por *B. licheniformis*, siendo un producto con alto potencial agronómico.



Por lo tanto, se han desarrollado dos bioprocesos eficaces y rentables para la biovalorización de okara en productos bioestimulantes ricos en nutrientes, sostenibles y ecológicos. En resumen, por un lado se propone una hidrólisis enzimática y por otro el producto soluble obtenido tras la fermentación de okara con *B. licheniformis*, presenta alto contenido en materia biodisponible, a la vez de un complejo multienzimático con alto potencial bioestimulante.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



5. CONCLUSIONES

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

5. CONCLUSIONES

Se han desarrollado nuevos bioprocesos para obtener bioestimulantes a partir de okara; así mismo, se han caracterizado los productos obtenidos. A continuación se exponen las conclusiones más relevantes:

- La tecnología enzimática sobre okara es una herramienta viable para obtener bioestimulantes.
- Las condiciones óptimas en cuanto a productividad en la producción de péptidos e isoflavonas es pH 10 y temperatura 55°, proteasa 0,3% p/v.
- Los bioestimulantes obtenidos son ricos en péptidos y aminoácidos libres, lo que les confiere una elevada capacidad bioestimulante.
- Los bioestimulantes obtenidos son ricos en isoflavonas solubles, presentando una alta capacidad antioxidante.
- La tecnología fermentativa utilizando la bacteria *Bacillus licheniformis*, es viable en la obtención de bioestimulantes.
- El bioestimulante fermentativo presenta composición química similar al bioestimulante enzimático, hidrolizados proteicos e isoflavonas, pero presenta dos nuevos componentes, un complejo multienzimático con alto potencial bioestimulante y biomasa bacteriana con actividad PGPB.
- Los procesos enzimáticos y fermentativos utilizan okara sin necesidad de secado, evitando el consumo de energía y potencial deterioro en sus componentes funcionales.



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

6. BIBLIOGRAFÍA

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Kamble, D.B.; Rani, S. Bioactive Components, in Vitro Digestibility, Microstructure and Application of Soybean Residue (Okara): A Review. *Legum. Sci.* 2020, 2, e32, doi:10.1002/leg3.32.
2. Redondo-Cuenca, A.; Villanueva-Suárez, M.J.; Mateos-Aparicio, I. Soybean Seeds and Its By-Product Okara as Sources of Dietary Fibre. Measurement by AOAC and Englyst Methods. *Food Chem.* 2008, 108, 1099–1105, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2007.11.061.
3. Pérez-López, E.; Mateos-Aparicio, I.; Rupérez, P. Okara Treated with High Hydrostatic Pressure Assisted by Ultraflo® L: Effect on Solubility of Dietary Fibre. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2016, 33, 32–37, doi:10.1016/j.ifset.2015.12.017.
4. Christaki, E.; Bonos, E.; Giannenas, I.; Florou-Paneri, P. Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. *Agric.* 2012, 2, 228–243, doi: 10.3390/agricultura2030228.
5. Bernhoft, A.; Flaten, T.P.; Holmsen, E.; Langmark, F.; Norum, K.R.; Bal, B.S.; Singh, R.; Steinnes, E.; Aaseth, J.O. Bioactive Compounds in Plants-Benefits and Risks for Man and Animals. *The Norwegian Academy.* 2008, 978-82-7099-583-7, doi:10.3793847.18385.
6. Rinaldi, V.E.A.; Ng, P.K.W.; Bennink, M.R. Effects of Extrusion on Dietary Fiber and Isoflavone Contents of Wheat Extrudates Enriched with Wet Okara. *Cereal Chem.* 2000, 77, 237–240, doi:10.1094/CCHEM.2000.77.2.237.
7. Wang, H.J.; Murphy, P.A. Mass Balance Study of Isoflavones during Soybean Processing. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 2377–2383, doi:10.1021/jf950535pf00004.
8. O'toole, D.K. Characteristics and Use of Okara, the Soybean Residue from Soy Milk Productions: A Review. 1999, doi:10.1021/jf980754I.
9. Vishwanathan, K.H.; Govindaraju, K.; Singh, V.; Subramanian, R. Production of Okara and Soy Protein Concentrates Using Membrane



- Technology. *J. Food Sci.* 2011, 76, doi:10.1111/J.1750-3841.2010.01917.X.
10. Jankowiak, L.; Kantzas, N.; Boom, R.; Van Der Goot, A.J. Isoflavone Extraction from Okara Using Water as Extractant. *Food Chem.* 2014, 160, 371–378, doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.082.
 11. de Figueiredo, V.R.G.; Justus, A.; Pereira, D.G.; Georgetti, S.R.; Ida, E.I.; Kurozawa, L.E. Production of Hydrolysate of Okara Protein Concentrate with High Antioxidant Capacity and Aglycone Isoflavone Content. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 2019, 62, 1–13, doi:10.1590/1678-4324-2019180478.
 12. Rodríguez-Morgado, B.; Gómez, I.; Parrado, J.; Tejada, M. Behaviour of Oxyfluorfen in Soils Amended with Edaphic Biostimulants/Biofertilizers Obtained from Sewage Sludge and Chicken Feathers. Effects on Soil Biological Properties. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2014, 21, 11027–11035, doi:10.1007/s11356-014-3040-3.
 13. Castillo, F. *Biotecnología Ambiental*; 2005; ISBN 84-7360-211-0.
 14. Tejada, M.; García-Martínez, A.M.; Gómez, I.; Parrado, J. Application of MCPA Herbicide on Soils Amended with Biostimulants: Short-Time Effects on Soil Biological Properties. *Chemosphere* 2010, 80, 1088–1094, doi:10.1016/j.chemosphere.2010.04.074.
 15. Tejada, M.; García-Martínez, A.M.; Rodríguez-Morgado, B.; Carballo, M.; García-Antras, D.; Aragón, C.; Parrado, J. Obtaining Biostimulant Products for Land Application from the Sewage Sludge of Small Populations. *Ecol. Eng.* 2013, 50, 31–36, doi:10.1016/j.ecoleng.2012.07.006.
 16. Eivazi, F.; Tabatabai, M.A. Glucosidases and Galactosidases in Soils. *Soil Biol. Biochem.* 1988, 20, 601–606, doi:10.1016/0038-0717(88)90141-1.
 17. TURGEON, S.L.; GAUTHIER, S.F. Whey Peptide Fractions Obtained with a Two-Step Ultrafiltration Process: Production and Characterization. *J. Food Sci.* 1990, 55, 106–110,



doi:10.1111/j.1365-2621.1990.tb06028.x.

18. Parrado, J.; Bautista, J.; Romero, E.J.; García-Martínez, A.M.; Friaça, V.; Tejada, M. Production of a Carob Enzymatic Extract: Potential Use as a Biofertilizer. *Bioresour. Technol.* 2008, 99, 2312–2318, doi:10.1016/j.biortech.2007.05.029.
19. Parrado, J.; Bautista, J.; Machado, A. Production of Soluble Enzymatic Protein Hydrolysate from Industrially Defatted Nondehulled Sunflower Meal. *J. Agric. Food Chem.* 1991, 39, 447–450, doi:10.1021/jf00003a004.
20. du Jardin, P. Plant Biostimulants: Definition, Concept, Main Categories and Regulation. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 2015, 196, 3–14.
21. Jämtgård, S. The Occurrence of Amino Acids in Agricultural Soil and Their Uptake by Plants. 2010.
22. Liu, H.; Hu, M.; Wang, Q.; Cheng, L.; Zhang, Z. Role of Papain-like Cysteine Proteases in Plant Development. *Front. Plant Sci.* 2018, 871, 1717.
23. Jones, D.L.; Hodge, A.; Kuzyakov, Y. Plant and Mycorrhizal Regulation of Rhizodeposition. *New Phytol.* 2004, 163, 459–480, doi: 10.1111/J.1469-8137.2004.01130.X.
24. Calvo, P.; Nelson, L.; Kloepper, J.W. Agricultural Uses of Plant Biostimulants. *Plant Soil.* 2014, 383, 3–41, doi: 10.1007/s11104-014-2131-8.
25. Yakhin, O.I.; Lubyánov, A.A.; Yakhin, I.A.; Brown, P.H. Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Front. Plant Sci.* 2017, 7, 2049, doi: 10.3389/FPLS.2016.02049/XML/NLM.
26. Botta, A. Enhancing Plant Tolerance to Temperature Stress with Amino Acids: An Approach to Their Mode of Action. *In Proceedings of the Acta Horticulturae*. 2012, Vol. 1009, pp. 29–36, doi:10.17660/Acta Hortic.2013.1009.1



27. Iglesias, F.M.; Cerdán, P.D. Maintaining Epigenetic Inheritance during DNA Replication in Plants. *Front. Plant Sci.* 2016, 7, 38, doi:10.3389/fpls.2016.00038.
28. Colla, G.; Nardi, S.; Cardarelli, M.; Ertani, A.; Lucini, L.; Canaguier, R.; Rouphael, Y. Protein Hydrolysates as Biostimulants in Horticulture. *Sci. Hortic.* 2015, 196, 28–38, doi: 10.1016/j.scienta.2015.08.037.
29. Ertani, A.; Cavani, L.; Pizzeghello, D.; Brandellero, E.; Altissimo, A.; Ciavatta, C.; Nardi, S. Biostimulant Activity of Two Protein Hydrolyzates in the Growth and Nitrogen Metabolism of Maize Seedlings. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 2009, 172, 237–244, doi:10.1002/jpln.200800174.
30. Colla, G.; Rouphael, Y.; Canaguier, R.; Svecova, E.; Cardarelli, M. Biostimulant Action of a Plant-Derived Protein Hydrolysate Produced through Enzymatic Hydrolysis. *Front. Plant Sci.* 2014, 5, 448, doi:10.3389/fpls.2014.00448.
31. Philippot, L.; Raaijmakers, J.M.; Lemanceau, P.; Van Der Putten, W.H. Going Back to the Roots: The Microbial Ecology of the Rhizosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013, 11, 789–799, doi: 10.1038/nrmicro3109.
32. Kauffman, G.L.; Kneivel, D.P.; Watschke, T.L. Effects of a Biostimulant on the Heat Tolerance Associated with Photosynthetic Capacity, Membrane Thermostability, and Polyphenol Production of Perennial Ryegrass. *Crop Sci.* 2007, 47, 261–267, doi:10.2135/CROPSCI2006.03.0171.
33. Ertani, A.; Schiavon, M.; Muscolo, A.; Nardi, S. Alfalfa Plant-Derived Biostimulant Stimulate Short-Term Growth of Salt Stressed Zea Mays L. Plants. *Plant Soil* 2013, 364, 145–158, doi:10.1007/s11104-012-1335-z.
34. Rai, V.K. Role of Amino Acids in Plant Responses to Stresses. *Biol. Plant.* 2002, 45, 481–487, doi: 10.1023/A:1022308229759.
35. Davies, D.D. Physiological Aspects of Protein Turnover. In *Nucleic Acids and Proteins in Plants I*; Springer Berlin Heidelberg, 1982; pp.



189–228, doi: 10.1007/978-3-642-68237-7_7.

36. Van Oosten, M.J.; Pepe, O.; De Pascale, S.; Silletti, S.; Maggio, A. The Role of Biostimulants and Bioeffectors as Alleviators of Abiotic Stress in Crop Plants. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 2017, 4, 1–12, doi: 10.1186/s40538-017-0089-5.
37. Cuin, T.A.; Shabala, S. Amino Acids Regulate Salinity-Induced Potassium Efflux in Barley Root Epidermis. *Planta* 2007, 225, 753–761, doi:10.1007/s00425-006-0386-x.
38. da Rocha, I.M.A.; Vitorello, V.A.; Silva, J.S.; Ferreira-Silva, S.L.; Viégas, R.A.; Silva, E.N.; Silveira, J.A.G. Exogenous Ornithine Is an Effective Precursor and the δ -Ornithine Amino Transferase Pathway Contributes to Proline Accumulation under High N Recycling in Salt-Stressed Cashew Leaves. *J. Plant Physiol.* 2012, 169, 41–49, doi:10.1016/j.jplph.2011.08.001.
39. Nakaminami, K.; Okamoto, M.; Higuchi-Takeuchi, M.; Yoshizumi, T.; Yamaguchi, Y.; Fukao, Y.; Shimizu, M.; Ohashi, C.; Tanaka, M.; Matsui, M.; et al. AtPep3 Is a Hormone-like Peptide That Plays a Role in the Salinity Stress Tolerance of Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2018, 115, 5810–5815, doi:10.1073/pnas.1719491115.
40. Lea, U.S.; Leydecker, M.T.; Quilleré, I.; Meyer, C.; Lillo, C. Posttranslational Regulation of Nitrate Reductase Strongly Affects the Levels of Free Amino Acids and Nitrate, Whereas Transcriptional Regulation Has Only Minor Influence. *Plant Physiol.* 2006, 140, 1085–1094, doi:10.1104/pp.105.074633.
41. Gou, W.; Zhang, L.; Chen, F.; Cui, Z.; Zhao, Y.; Zheng, P.; Tian, L.I.; Zhang, C.; Zhang, L. Foliar application of amino acids modulates aroma components of 'fuji' apple (*Malus domestica* L.). *Pak. J. Bot.* 2015, 47, 2257–2262, doi:10.53308208
42. Bulgari, R.; Cocetta, G.; Trivellini, A.; Vernieri, P.; Ferrante, A. Biostimulants and Crop Responses: A Review. *Biol. Agric. Hortic.* 2015, 31, 1–17, doi:10.1080/01448765.2014.964649.



43. Genovese, M.I.; Davila, J.; Lajolo, F.M. Isoflavones in Processed Soybean Products from Ecuador. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 2006, 49, 853–859, doi:10.1516-89132006000600020.
44. 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 Biochem.* 2002, 37, 1117–1123, doi:10.1016/S0032-9592(01)00323-5.
45. Kitts, D.; Weiler, K. Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses Used in Isolation and Recovery. *Curr. Pharm. Des.* 2003, 9, 1309–1323, doi:10.2174/1381612033454883.
46. Puchalska, P.; Concepción García, M.; Luisa Marina, M. Identification of Native Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Peptides in Commercial Soybean Based Infant Formulas Using HPLC-Q-ToF-MS. *Food Chem.* 2014, 157, 62–69, doi:10.1016/j.foodchem.2014.01.130.
47. Mathias, K.; Ismail, B.; Corvalan, C.M.; Hayes, K.D. Heat and PH Effects on the Conjugated Forms of Genistin and Daidzin Isoflavones. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 7495–7502, doi:10.1021/JF061322A.
48. Murota, K.; Shimizu, S.; Miyamoto, S.; Izumi, T.; Obata, A.; Kikuchi, M.; Terao, J. Unique Uptake and Transport of Isoflavone Aglycones by Human Intestinal Caco-2 Cells: Comparison of Isoflavonoids and Flavonoids. *J. Nutr.* 2002, 132, 1956–1961, doi:10.1093/JN/132.7.1956.
49. Jankowiak, L.; Trifunovic, O.; Boom, R.M.; Van Der Goot, A.J. The Potential of Crude Okara for Isoflavone Production. *J. Food Eng.* 2014, 124, 166–172, doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.10.011.
50. Mateos-Aparicio, I.; Mateos-Peinado, C.; Jiménez-Escrig, A.; Rupérez, P. Multifunctional Antioxidant Activity of Polysaccharide Fractions from the Soybean Byproduct Okara. *Carbohydr. Polym.* 2010, 82, 245–250, doi:10.1016/j.carbpol.2010.04.020.



51. Nishibori, N.; Kishibuchi, R.; Morita, K. Soy Pulp Extract Inhibits Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Activity In Vitro: Evidence for Its Potential Hypertension-Improving Action. *J. Diet. Suppl.* 2017, 14, 241–251, doi:10.1080/19390211.2016.1207744.
52. Orts, A.; Revilla, E.; Rodriguez-Morgado, B.; Castaño, A.; Tejada, M.; Parrado, J.; García-Quintanilla, A. Protease Technology for Obtaining a Soy Pulp Extract Enriched in Bioactive Compounds: Isoflavones and Peptides. *Helvion* 2019, 5, e01958, doi:10.1016/J.HELIYON.2019.E01958.



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

CAPÍTULO 3:

ESTUDIO DE LA POTENCIA BIOESTIMULANTE DEL HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE OKARA EN LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR CLORPIRIFÓS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

1. INTRODUCCIÓN

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

INTRODUCCIÓN

1. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

Como resultado de la actividad del hombre, cada año se liberan grandes cantidades de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos en el medio ambiente y como consecuencia de muchas de las actividades industriales aparece la contaminación de los suelos.

De forma convencional, se define el término "suelo contaminado", como aquél suelo que contenga componentes químicos de carácter peligroso y de origen humano, que puedan alterar las características tanto químicas como físicas o biológicas del suelo en una concentración tal que comporte un riesgo inaceptable para la salud humana o el medio ambiente, y así se haya declarado mediante resolución expresa.

La Agencia Europea de Medio Ambiente (AEMA) estimó en el año 1999 entre 300.000 y 1.500.000 el número de zonas o áreas contaminadas en Europa occidental. A estas cifras alarmantes, demostrativas de la gravedad del problema, hay que añadir la falta de metodologías normalizadas para la identificación y caracterización de los suelos contaminados. La amplia diferencia encontrada en el número de enclaves contaminados descritos se debe a la heterogeneidad en los criterios utilizados para definir el término "suelo contaminado", para evaluar los riesgos aceptables, y a las distintas metodologías de caracterización utilizadas.

El estudio de suelos potencialmente contaminados se ha venido desarrollando en países como Estados Unidos desde los años 70, en España, no es hasta la publicación de la Ley 10/1998, de 21 de abril de Residuos, cuando se crea un marco normativo para los suelos contaminados, recogido en su título V. A partir de la entrada en vigor de esta Ley y hasta la publicación del Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados, se desarrollaron las primeras actuaciones en la materia tanto a nivel nacional como autonómico.

El Inventario nacional de suelos contaminados se basó en la identificación, de las actividades potencialmente contaminantes por generar



residuos tóxicos y peligrosos, y de los emplazamientos presuntamente contaminados por los mismos, así como en la caracterización en campo de un número determinado de ellos, en este inventario se identificaron 18.142 actividades que, por su tamaño, probabilidad de contaminar y toxicidad de las sustancias podían ser focos potenciales de generar espacios contaminados. De esas actividades, 4.532 emplazamientos se identificaron como potencialmente contaminados, de los cuales, 249 fueron caracterizados.

Es por ello imperativo encontrar soluciones factibles a la descontaminación de suelos.

Para la descontaminación de un suelo, se debe priorizar la aplicación de las mejores técnicas disponibles en función de las características de cada caso. Las actuaciones de recuperación deben garantizar que se materialicen soluciones permanentes, prevaleciendo, en la medida de lo posible, las técnicas de tratamiento "*in situ*" que eviten la generación y traslado del residuo. Siempre que sea posible, la recuperación se orientará a eliminar los focos de contaminación y a reducir la concentración de los contaminantes del suelo.

Se han aplicado muchas estrategias de remediación a suelos contaminados, pero a menudo resultan ser ambientalmente agresivas, costosas y dañinas para el suelo [1]. Algunas técnicas incluso tienden a posponer el tratamiento de los contaminantes ya sea confinándolos o transfiriéndolos a otro compartimento ambiental (aire o agua).

Ante tal hecho, la biorremediación de suelos contaminados por xenobióticos tanto orgánicos como inorgánicos es una práctica medioambiental muy utilizada entre tecnólogos ambientales para eliminar o disminuir la concentración de dichos xenobióticos y así disminuir su toxicidad [2].

1.1. CONTAMINACIÓN DE SUELOS POR PLAGUICIDAS

Desde hace varias décadas se ha venido demostrando que la aplicación de plaguicidas al suelo no solo conlleva el control de plagas a tratar,



sino que, además, su uso puede causar importantes problemas de salud humana (cáncer, cefaleas, mareos, náuseas, etc.), así como en el equilibrio de los ecosistemas, debido principalmente al envenenamiento que pueden causar estos compuestos químicos sobre la flora, fauna y microorganismos que puedan desarrollarse en el suelo [3].

Por otra parte existen numerosos estudios que demuestran la toxicidad que producen los diferentes tipos de plaguicidas sobre la microbiota edáfica, los cuales producen una inhibición de los diferentes procesos bioquímicos de los microorganismos del suelo durante un largo tiempo, así como una disminución de la biomasa microbiana de dichos suelos [4-6].

En los últimos años, existe una gran preocupación con respecto al uso del insecticida clorpirifós [$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ u O, O-dietil-O- (3,5,6-tricloro-2-piridinilo) fosforotioato]. Este compuesto es un insecticida organofosforado no sistémico utilizado para el control de plagas de insectos tanto en aplicación en el suelo y foliar, se ha constatado su persistencia tanto en suelos como en aguas subterráneas, en este sentido, los restos de clorpirifós pueden estar presentes de 7 a 120 días dependiendo la tasa de degradación de la textura, el pH, la temperatura, contenido de humedad, contenido de carbono orgánico y la formulación del plaguicida [7], siendo pues un grave problema ambiental por su persistencia en dichos medios [8,9].

1.2. BIOREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS

La biorremediación es una técnica de descontaminación que emplea procesos biológicos, n para eliminar las sustancias químicas perjudiciales para el medio ambiente presentes en fangos, residuos, aguas y suelos contaminados.

El proceso de transformación más importante en el que se basa la biorremediación es la biodegradación, entendiendo por biodegradación el resultado de los procesos de digestión, asimilación y metabolización de un compuesto orgánico llevado a cabo por bacterias, hongos, protozoos y otros organismos.



La biorremediación es pues un proceso que depende de microorganismos, plantas, o sus respectivas enzimas para degradar los contaminantes y su éxito depende de la disponibilidad del contaminante para los microorganismos del suelo [1].

Cada vez más, el empleo de sistemas de tratamiento biológico de suelos y aguas contaminadas se presenta como una alternativa viable y prometedora frente a las técnicas físico-químicas convencionales. Los procesos físico-químicos tradicionales de remediación de zonas contaminadas son económicamente muy costosos y, a menudo, no solucionan de forma permanente el riesgo de contaminación, entendiéndose como riesgo la probabilidad de que un contaminante presente en el suelo entre en contacto con algún receptor con consecuencias adversas para la salud de las personas o para el medio ambiente.

Por todo esto, cada vez más, el empleo de tecnologías de biorremediación de suelos y aguas contaminadas se presenta como una alternativa viable y prometedora frente a las técnicas físico-químicas convencionales.

1.2.1. Efecto de la bioestimulación microbiana en el proceso de biorremediación de suelos contaminados.

La biodegradación puede darse, en las condiciones ambientales, a unas velocidades que son insuficientes para conseguir la rápida degradación de los compuestos orgánicos peligrosos para la salud o para el medio ambiente, por ello es preciso suministrar el oxígeno y los nutrientes, normalmente nitrógeno y fósforo, necesarios para promover una metabolización rápida de los compuestos de interés, incrementando si es necesario, la temperatura a la que se encuentran los microorganismos, lo que acelerará el metabolismo.

Los microorganismos que viven en el suelo y las aguas subterráneas son capaces de metabolizar gran parte de los productos químicos presentes en los derrames de diferentes compuestos orgánicos contaminantes procedentes de actividades humanas. De hecho, su composición química



elemental es muy similar a los compuestos orgánicos habituales en la naturaleza, por ello, cuando los microorganismos implicados en la descontaminación digieren en su totalidad las sustancias químicas presentes en el subsuelo, las transforman en los productos habituales del metabolismo: agua y dióxido de carbono en el caso del carbono, o nitratos en el caso del nitrógeno.

Este fenómeno biológico de la degradación es el fundamento de las nuevas tecnologías de la biorremediación. Se convierte así en una herramienta poderosa para mitigar la contaminación medioambiental. Sobre todo, en suelos/aguas contaminadas con compuestos orgánicos [1].

Con un metabolismo acelerado y los nutrientes y el oxígeno necesarios, los microorganismos se reproducirán más rápidamente utilizando los compuestos orgánicos presentes en su entorno para su alimentación y desarrollo. Sin embargo, la falta de control sobre alguno de los parámetros indicados (falta de oxígeno, nutrientes, toxicidad del producto, variaciones de temperatura...) puede ocasionar la muerte de las bacterias del suelo o la degradación de los compuestos orgánicos por vías no deseadas, lo que podría originar la síntesis de moléculas más peligrosas incluso que las originales.

La biodegradabilidad de un contaminante orgánico, como un plaguicida, en un suelo contaminado depende de diversos factores como son: la presencia de una población microbiana degradadora potencialmente activa, la estructura molecular del contaminante, su concentración y biodisponibilidad, y factores ambientales como el pH, temperatura, humedad del suelo, presencia de aceptores de electrones disponibles, y la existencia de nutrientes inorgánicos (fuente de nitrógeno y fósforo) disponibles.

Los procesos de bioremediación pueden ser acelerados mediante el fenómeno de la bioestimulación, que consiste en la introducción de nutrientes adicionales en forma orgánica o inorgánica en los sistemas contaminados [10] con lo que se incrementan las poblaciones microbianas [11,12]. Así se logra inducir una mayor rapidez en la metabolización de los compuestos orgánicos.

El incremento de la diversidad y número de las poblaciones microbianas es la clave del éxito del proceso de bioestimulación.



1.2.2. Tipos de bioestimulantes utilizados en la biorremediación

A continuación, se hace un resumen de los principales tipos de bioestimulantes referentes al aporte de nitrógeno y fósforo utilizado en el proceso de biorremediación:

1) Bioestimulantes inorgánicos

Existen múltiples estudios en los que se emplean distintas mezclas de fuentes inorgánicas de nitrógeno y de fósforo.

En trabajos realizados por Bento et al., 2005 [13], se hace una comparativa de la biorremediación de suelos contaminados bajo tratamientos de bioestimulación, añadiendo $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ y K_2HPO_4 .

También se han obtenido resultados respecto a la degradación de hidrocarburos, los cuales ponen de manifiesto que el efecto de la adición de nutrientes en los suelos que trataron, promovía significativamente la degradación (72%) de la fracción ligera de los hidrocarburos del petróleo [14].

Por otra parte, la adición de estos nutrientes inorgánicos presenta algunos problemas. Como principal inconveniente se cuenta el efecto inhibitor tanto en cantidad como en diversidad que provoca en las poblaciones microbianas del suelo [15], efecto ya muy conocido del uso de fertilizantes inorgánicos en el ámbito de la agricultura, además de otros efectos colaterales como es la probabilidad de contaminación por parte de los componentes de los fertilizantes.

Recientemente se está mostrando un gran interés por el uso de substratos orgánicos como bioestimulantes, debido a su capacidad para suplir las necesidades nutritivas de las plantas [16], y en procesos de bioestimulación microbiana.

2) Bioestimulantes orgánicos



En estos casos, la materia orgánica reduce la concentración de contaminante en el suelo a través de dos vías diferentes.

En primer lugar, esta materia orgánica tiene la capacidad de adsorber los xenobióticos, disminuyendo su concentración en la solución del suelo y consecuentemente reduciendo su toxicidad.

En segundo lugar, la adición de esta materia orgánica estimula el crecimiento de aquellos microorganismos tolerantes a los contaminantes presentes en el suelo. Al hacerlo, los microorganismos aumentan la tasa de degradación de estos y por lo tanto disminuyen su concentración [17-21].

Suelen tener como característica común el elevado contenido en materia orgánica y los elementos químicos están formando biomoléculas como proteínas, azúcares, lípidos, etc.

Se pueden distinguir dos categorías:

a) Bioestimulantes orgánicos sólidos no hidrolizados:

Son productos normalmente sólidos que proceden de procesos de compostaje, residuos sólidos de plantas de depuración, estiércoles, etc., y actualmente se están utilizando en fase experimental [22-25].

La adición de enmiendas orgánicas como los lodos de aguas residuales o el compost pueden facilitar la degradación de los contaminantes porque juegan un papel muy importante como suplemento de nutrientes y fuente de carbono. Estas enmiendas contienen abundante nitrógeno y materia orgánica (en torno al 45,2% y 43% respectivamente), lo que les confiere un gran potencial en la estimulación de los procesos de biorremediación, por otra parte, aportando una inoculación microbioana, con alta potencia en cantidad como en diversidad.

El compostaje ha sido demostrado eficaz en la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos, así Cho et al., 1997 [23], trata el suelo contaminado de petróleo con la adición de estiércoles como nutrientes básicos, así como otros tratamientos con distintas enmiendas orgánicas, inducen la estimulación de los microorganismos del suelo, responsables de la degradación de los hidrocarburos [23].



Namkoong et al., 2002 [25], usaba compost o lodos procedentes de aguas residuales como bioestimulantes de la degradación de diésel en suelo, empleando estos materiales como suplemento de materia orgánica para el compostaje de los suelos. Buscaba el ratio de mezcla adecuado para lograr la mayor efectividad en la degradación. El ratio de suelo contaminado y enmiendas es fundamental para evitar un retardo en el proceso incluso la inhibición de la actividad microbiana [25].

Sin embargo, el empleo de estos bioestimulantes presenta una serie de problemas relacionados con el potencial bioestimulante, debido a la biodisponibilidad de los elementos. Así, el nitrógeno orgánico (fundamentalmente proteínas) debe ser procesado (hidrolizado *in situ*) para su absorción microbiológica, presentan problemas de transporte a zonas profundas del suelo [26]; por último tienen unas composiciones menos controlables y definidas debido a su origen y proceso de obtención teniendo una composición final muy diversa con bajos contenidos en nitrógeno y fósforo.

Sin embargo, para que esta materia orgánica sea capaz de estimular el proceso de bioremediación, debe estimular de una forma rápida la microbiota edáfica, si bien a veces existe un retraso mientras se mineraliza en formas más simples y más fácilmente accesibles a dichos microorganismos. Esto, a su vez, requiere que los microorganismos gasten una gran cantidad de energía [27,28].

b) Bioestimulantes orgánicos hidrolizados:

Para obtener bioestimulantes de una mayor potencia, se recurre a la hidrólisis de las biomoléculas vía enzimática a partir de diversas materias orgánicas.

Los bioestimulantes orgánicos hidrolizados están siendo estudiados para su aplicación en la bioestimulación de la degradación de hidrocarburos en suelos [29], ya que son compuestos fácilmente asimilables y que presentan una emisión lenta. Esto es debido a que los péptidos son biomoléculas cargadas y las partículas minerales que conforman el suelo



presentan también carga predominantemente negativa (silicatos), así se produce una inmovilización de estos componentes en el suelo

Por otra parte, los bioestimulantes orgánicos hidrolizados, tienen la capacidad, debido a su composición proteica, de formar emulsiones gaseosas, la cuales tiene un considerable potencial en la creación de microambientes dentro de los suelos para la degradación de los contaminantes hidrofóbicos. Estas emulsiones gaseosas o espumas son un reservorio de oxígeno, nutrientes (nitrógeno, fósforo, etc.) y de microorganismos.

Diversos estudios determinan que existen evidencias de que este complejo nutricional puede estimular la actividad de microorganismos específicos en el suelo por varios mecanismos: son factores de crecimiento tales como metabolitos microbianos, micronutrientes, enzimas extracelulares, así como moléculas secretadas por las plantas que tienen la capacidad de seleccionar determinados microorganismos.

Las mencionadas características son especialmente interesantes en cuanto a su implicación potencial en biorremediación. Se hace la suposición de que el uso de estos extractos hidrolizados puede también permitir la colonización de las plantas en lugares con altas concentraciones de compuestos xenobióticos tóxicos.

1.2.3. Bioestimulantes en biorremediación de plaguicidas

Como consecuencia de todo esto, para conseguir remediar suelos contaminados por plaguicidas, en la última década se han venido desarrollado diversos bioestimulantes mediante el empleo de tecnología de hidrólisis enzimática a partir de diferentes sustratos orgánicos, como lodos de depuradora, plumas de ave, salvado de arroz y germen de semilla de algarroba [5,28,30,31].

Estos bioestimulantes, ricos en moléculas altamente biodisponibles, como péptidos, aminoácidos, polisacáridos, etc., son asimilados de forma directa y rápida por los microorganismos del suelo, sin requerir el gasto energético elevado asociado a la asimilación de nutrientes a partir de los mismos sustratos sin tratamiento enzimático [31]. Por lo tanto, la aplicación



edafológica de estos productos bioestimulantes aumenta la materia orgánica y el contenido de macro y micronutrientes, e indirectamente estimula significativamente la comunidad microbiana del suelo [13].

Los resultados obtenidos en tales experiencias de bioremediación de suelos contaminados por plaguicidas sugieren que los microorganismos tolerantes a dicho plaguicida son estimulados, debido a que los mismos absorben rápidamente estos aminoácidos y péptidos de bajo peso molecular procedentes de los bioestimulantes. Como consecuencia de ello, ocurre una rápida disminución en la concentración del plaguicida en el suelo [5,9,20,27,31].

El okara, como hemos referido en capítulos anteriores es un sustrato orgánico interesante para el desarrollo de productos bioestimulantes.

En este capítulo se estudia el efecto de los bioestimulantes obtenidos a partir de okara en procesos de biorremediación de suelos contaminados por plaguicidas. Así pues, Ortiz [2], observó la capacidad biorremediadora de dos productos bioestimulantes obtenidos a partir de esta materia prima mediante procesos de hidrólisis enzimática en distintos suelos agrícolas contaminados por los herbicidas oxifluorfen, imazamox y diuron. Los resultados obtenidos en dicho estudio destacaron que dichos bioestimulantes mostraban una importante capacidad biorremediadora, consiguiendo acelerar la degradación de dichos herbicidas en suelo, disminuyendo así su toxicidad.

Del mismo modo, este tipo de bioestimulantes podrían tener resultados similares en la recuperación de suelos contaminados por clorpirifós.



2. OBJETIVOS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

2. OBJETIVOS

El objetivo de este capítulo de la tesis doctoral es estudiar el potencial bioestimulante de un hidrolizado enzimático de okara, en la biorremediación de suelos contaminados por plaguicidas.

El potencial bioestimulante será evaluado a nivel de influencia en las propiedades biológicas del suelo, y específicamente en la degradación del plaguicida clorpirifós.



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

3. ARTICULOS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La obtención del producto bioestimulante a partir de okara usado para evaluar la potencia bioremediadora del contaminante clorpirifós, se realizó mediante tecnología enzimática, con la enzima endoproteasa bacteriana subtilisina (Ver capítulo 1). Tras el proceso enzimático, el producto de la hidrólisis se fraccionó, obteniéndose una fracción insoluble, descartada, y una fracción soluble, cuya caracterización química ha sido mostrada anteriormente (Ver capítulo 1) y de la que cabe destacar su alto contenido en los elementos nitrógeno, fósforo y potasio.

El producto obtenido, aumentó la fracción proteica de bajo peso molecular <300 Da en un 75,7%, por ende se produjo una reducción de las proteínas de mayor peso molecular al ser hidrolizadas por la enzima, los valores obtenidos para proteínas de peso molecular entre 10,000-5000 Da fueron de un 23,5% y, >10,000 Da de un 0,7%.

Como resultado de la adición del insecticida, las actividades enzimáticas del suelo se vieron negativamente afectadas. Se conoce que existen bacterias resistentes a los clorpirifós, las cuales son las principales responsables de su degradación en suelos contaminados por este compuesto xenobiótico, pero su degradación un proceso muy largo en el tiempo, dependiente también de otros factores como la temperatura, la radiación solar, el tipo de suelo, el pH, la aireación, la estructura química del insecticida y la biodisponibilidad del compuesto [32].

La adición de materia orgánica en la remediación de clorpirifós es una práctica útil y eficaz, ya demostrada con anterioridad [9,18,28,33] con el fin de estimular la microbiota del suelo capaz de degradar el contaminante. En todos los estudios se observó que en los ensayos realizados se produce una disminución de este contaminante en los suelos, como resultado de la estimulación específica de microorganismos resistentes, a la vez que aumenta la velocidad de degradación, al provocar una proliferación de bacterias resistentes al clorpirifós los cuales reducen su concentración en suelos.



El efecto de los bioestimulantes y del clorpirifós en los suelos fue evaluado mediante el análisis bioquímico del de distintos indicadores de calidad de suelo, como las actividades enzimáticas β -glucosidasa, fosfatasa, deshidrogenasa y ureasa.

En la aplicación de los productos de estudio en ausencia del insecticida, se observó que la aplicación de okara sin tratamiento (Op) produjo una estimulación de la actividad deshidrogenasa temporal progresiva máxima a los 80 días, mientras que como resultado de la aplicación del okara hidrolizado (Oh) la estimulación fue máxima a los 7 días.

La adición de clorpirifós produjo una inhibición de la actividad deshidrogenasa en suelo, con un máximo de actividad a los 30 días de incubación, que fue disminuyendo a lo largo del ensayo. Los tratamientos combinados del plaguicida con los productos de estudio Op y Oh, resultaron en un efecto tamponador de la reducción de ésta actividad enzimática, produciéndose en Op una disminución lenta y progresiva hasta el final del experimento y en Oh, una rápida disminución con un máximo a los 7 días de incubación.

En ausencia de clorpirifós, la actividad ureasa se comportó de forma distinta según el producto aplicado. Op produjo un progresivo aumento de la actividad ureasa, con un máximo de actividad hacia el final del experimento. Por otra parte, Oh no produjo estimulación de la actividad ureasa, presumiblemente por el aporte de péptidos y aminoácidos libres presentes en el producto, los cuales son utilizados por los microorganismos como fuente de N directa.

Cuando se aplicó el insecticida, la estimulación de actividad ureasa asociada al producto Op fue menor, produciendo la máxima inhibición del insecticida al día 30 después del inicio del experimento. En las muestras con Oh e insecticida el comportamiento fue similar al de Op con insecticida.

La actividad β -glucosidasa en las muestras tuvo un comportamiento similar a la deshidrogenasa. En las muestras con Op la estimulación fue progresiva hasta el final del ensayo, mientras que las muestras con aplicación de Oh, se obtuvo un máximo a los 7 días de incubación.



Cuando se aplicó el clorpirifós, se observó una disminución máxima de esta actividad enzimática a los 30 días de incubación y en el caso de las muestras con Oh, el comportamiento fue idéntico al suelo sin contaminar, presentando una gran estimulación máxima a los 7 días de incubación, decayendo dramáticamente al igual que pasaba en el control estimulado con okara hidrolizado sin contaminar

Por su parte, la actividad fosfatasa presentó el mismo comportamiento que la actividad β -glucosidasa para todos los tratamientos estudiados, debido a que las muestras con aplicación de Oh, recibieron unas altas dosis de péptidos y aminoácidos libres como incremento de fuente disponible de N, frente a las fuentes disponibles de C y P, naturales en okara.

La inhibición de las actividades enzimáticas en suelos tras la aplicación por clorpirifós es una consecuencia ampliamente estudiada, coincidiendo en esta tesis con [9,18,28,34]. La degradación de clorpirifós en suelos es fundamentalmente realizada por el microbioma edáfico [9,28,32,35], pero es un proceso dependiente de diferentes factores ambientales o bioquímicos del suelo, que pueden provocar un retardo muy atenuado en la degradación del contaminante, por lo tanto, la persistencia del clorpirifós en suelos es muy variable.

Para aumentar la degradación de los contaminantes en suelos, en este caso clorpirifós, actualmente se han desarrollado numerosas técnicas, demostrando la adición de materia orgánica como una gran candidata para acelerar la degradación del contaminante a través de la proliferación de microorganismos [28,33].

En este experimento, se ha comprobado que la aplicación de okara como fuente de materia orgánica, consiguió un efecto equivalente a los anteriores trabajos descritos, pero su efecto fue diferente en función de la forma molecular de los componentes de okara. Como puede observarse en los resultados, el okara sin hidrolizar tuvo un efecto más lento en la degradación de clorpirifós, mientras que el okara hidrolizado tuvo un efecto más rápido en la inhibición del efecto del insecticida alcanzando el valor máximo a los 7 días de aplicación del bioestimulante hidrolizado. Esto es debido a la biodisponibilidad de las moléculas aportadas a los microorganismos, ya que el okara puro contiene macromoléculas que



presentan mayor resistencia a la biodegradación, consiguiendo los mayores valores de actividades enzimáticas a los 30 días de aplicación, mientras que el okara hidrolizado es una fuente de compuestos bioactivos y péptidos rápidamente asimilable por los microorganismos del suelo y, por consecuencia, promueven una rápida proliferación.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



5. CONCLUSIONES

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

5. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos sobre el potencial de biorremediación del bioestimulante de okara aplicado a suelos contaminados por clorpirifós se puede concluir que:

- Los bioestimulantes a partir de okara aplicados a los suelos presentan un gran potencial para la biorremediación de suelos contaminados por clorpirifós, aumentando considerablemente la degradación del contaminante en los suelos.
- Las actividades enzimáticas en las muestras con aplicación del bioestimulante con clorpirifós, demostró una rápida degradación del contaminante, situándose a los 7 días la mayor tasa de eliminación.
- Los mayores valores de biorremediación se obtuvieron en el producto hidrolizado de okara, debido a su contenido en proteínas de bajo peso molecular soluble fácilmente asimilable por los microorganismos del suelo, siendo así una buena alternativa para la biorremediación de suelos contaminados por clorpirifós.



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

6. BIBLIOGRAFÍA

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, G.O.; Fufeyin, P.T.; Okoro, S.E.; Ehinomen, I. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *Int. J. Environ. Bioremediation Biodegrad.* 2015, 3, 28–39, doi:10.12691/ijebb-3-1-5.
2. Ortiz Botella, M. Uso de Bioestimulantes Obtenidos a Partir de Okara En La Biorremediación de Suelos Contaminados Por Herbicidas. Efecto En Propiedades Biológicas Del Suelo, 2020.
3. Imfeld, G.; Vuilleumier, S. Measuring the Effects of Pesticides on Bacterial Communities in Soil: A Critical Review. *Eur. J. Soil Biol.* 2012, 49, 22–30, doi:10.1016/J.EJSOBI.2011.11.010.
4. Orts, A.; Cabrera, S.; Gómez, I.; Parrado, J.; Rodríguez-Morgado, B.; Tejada, M. Use of Okara in the Bioremediation of Chlorpyrifos in Soil: Effects on Soil Biochemical Properties. *Appl. Soil Ecol.* 2017, 121, 172–176, doi:10.1016/J.APSOIL.2017.09.042.
5. Tejada, M.; García-Martínez, A.M.; Gómez, I.; Parrado, J. Application of MCPA Herbicide on Soils Amended with Biostimulants: Short-Time Effects on Soil Biological Properties. *Chemosphere* 2010, 80, 1088–1094, doi:10.1016/j.chemosphere.2010.04.074.
6. Alexander, M. *Biodegradation and Bioremediation*; Academic Press, 1999; ISBN 9780120498611.
7. Cachada, A.; Rocha-Santos, T.A.P.; Duarte, A.C. Soil and Pollution: An Introduction to the Main Issues. *Soil Pollut. From Monit. to Remediat.* 2018, 1–28, doi:10.1016/B978-0-12-849873-6.00001-7.
8. Korade, D.L.; Fulekar, M.H. Rhizosphere Remediation of Chlorpyrifos in Mycorrhizospheric Soil Using Ryegrass. *J. Hazard. Mater.* 2009, 172, 1344–1350, doi:10.1016/J.JHAZMAT.2009.08.002.
9. Tejada, M.; Rodríguez-Morgado, B.; Gómez, I.; Parrado, J. Degradation of Chlorpyrifos Using Different Biostimulants/Biofertilizers: Effects on Soil Biochemical Properties and Microbial Community. *Appl. Soil Ecol.* 2014, 84, 158–165, doi:10.1016/J.APSOIL.2014.07.007.



10. Wrenn, B.A.; Venosa, A.D. Selective Enumeration of Aromatic and Aliphatic Hydrocarbon Degrading Bacteria by a Most-Probable-Number Procedure. *Can. J. Microbiol.* 1996, 42, 252–258, doi:10.1139/M96-037.
11. Jain, D.K.; Lee, H.; Trevors, J.T. Effect of Addition of Pseudomonas Aeruginosa UG2 Inocula or Biosurfactants on Biodegradation of Selected Hydrocarbons in Soil. *J. Ind. Microbiol.* 1992, 10, 87–93, doi:10.1007/BF01583840.
12. Pankratz, T.M. *Environmental Engineering Dictionary and Directory*; Lewis, 2001; ISBN 9781566705431.
13. Bento, F.M.; Camargo, F.A.O.; Okeke, B.C.; Frankenberger, W.T. Comparative Bioremediation of Soils Contaminated with Diesel Oil by Natural Attenuation, Biostimulation and Bioaugmentation. *Bioresour. Technol.* 2005, 96, 1049–1055, doi:10.1016/J.BIORTECH.2004.09.008.
14. Ke, L.; Yu, K.S.H.; Wong, Y.S.; Tam, N.F.Y. Spatial and Vertical Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mangrove Sediments. *Sci. Total Environ.* 2005, 340, 177–187, doi:10.1016/J.SCITOTENV.2004.08.015.
15. Sarkar, D.; Ferguson, M.; Datta, R.; Birnbaum, S. Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons in Contaminated Soils: Comparison of Biosolids Addition, Carbon Supplementation, and Monitored Natural Attenuation. *Environ. Pollut.* 2005, 136, 187–195, doi:10.1016/J.ENVPOL.2004.09.025.
16. Bulluck, L.R.; Brosius, M.; Evanylo, G.K.; Ristaino, J.B. Organic and Synthetic Fertility Amendments Influence Soil Microbial, Physical and Chemical Properties on Organic and Conventional Farms. *Appl. Soil Ecol.* 2002, 19, 147–160, doi:10.1016/S0929-1393(01)00187-1.
17. Delgado-Moreno, L.; Peña, A. Compost and Vermicompost of Olive Cake to Bioremediate Triazines-Contaminated Soil. *Sci. Total Environ.* 2009, 407, 1489–1495, doi:10.1016/J.SCITOTENV.2008.10.047.



18. Kadian, N.; Malik, A.; Satya, S.; Dureja, P. Effect of Organic Amendments on Microbial Activity in Chlorpyrifos Contaminated Soil. *J. Environ. Manage.* 2012, 95, S199–S202, doi:10.1016/J.JENVMAN.2010.10.023.
19. López-Piñeiro, A.; Peña, D.; Albarrán, A.; Sánchez-Llerena, J.; Becerra, D. Behavior of MCPA in Four Intensive Cropping Soils Amended with Fresh, Composted, and Aged Olive Mill Waste. *J. Contam. Hydrol.* 2013, 152, 137–146, doi:10.1016/J.JCONHYD.2013.07.003.
20. Gómez, I.; Rodríguez-Morgado, B.; Parrado, J.; García, C.; Hernández, T.; Tejada, M. Behavior of Oxyfluorfen in Soils Amended with Different Sources of Organic Matter. Effects on Soil Biology. *J. Hazard. Mater.* 2014, 273, 207–214, doi:10.1016/J.JHAZMAT.2014.03.051.
21. Lipczynska-Kochany, E. Humic Substances, Their Microbial Interactions and Effects on Biological Transformations of Organic Pollutants in Water and Soil: A Review. *Chemosphere* 2018, 202, 420–437, doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.03.104.
22. Walworth, J.L.; Reynolds, C.M. Bioremediation of a Petroleum-contaminated Cryic Soil: Effects of Phosphorus, Nitrogen, and Temperature. <http://dx.doi.org/10.1080/15320389509383499> 2008, 4, 299–310, doi:10.1080/15320389509383499.
23. Cho, B.H.; Chino, H.; Tsuji, H.; Kunito, T.; Nagaoka, K.; Otsuka, S.; Yamashita, K.; Matsumoto, S.; Oyaizu, H. Laboratory-Scale Bioremediation of Oil-Contaminated Soil of Kuwait with Soil Amendment Materials. *Chemosphere* 1997, 35, 1599–1611, doi:10.1016/S0045-6535(97)00220-8.
24. Williams, C.M.; Grimes, J.L.; Mikkelsen, R.L. The Use of Poultry Litter as Co-Substrate and Source of Inorganic Nutrients and Microorganisms for the Ex Situ Biodegradation of Petroleum Compounds. *Poult. Sci.* 1999, 78, 956–964, doi:10.1093/PS/78.7.956.
25. Namkoong, W.; Hwang, E.Y.; Park, J.S.; Choi, J.Y. Bioremediation of Diesel-Contaminated Soil with Composting. *Environ. Pollut.* 2002, 119,



- 23–31, doi:10.1016/S0269-7491(01)00328-1.
26. McBride, M.B. Toxic Metals in Sewage Sludge-Amended Soils: Has Promotion of Beneficial Use Discounted the Risks? *Adv. Environ. Res.* 2003, 8, 5–19, doi:10.1016/S1093-0191(02)00141-7.
27. Tejada, M.; Benítez, C. Organic Amendment Based on Vermicompost and Compost: Differences on Soil Properties and Maize Yield. *Waste Manag. Res.* 2011, 29, 1185–1196, doi:10.1177/0734242X10383622/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0734242X10383622-FIG2.JPEG.
28. Tejada, M.; Gómez, I.; del Toro, M. Use of Organic Amendments as a Bioremediation Strategy to Reduce the Bioavailability of Chlorpyrifos Insecticide in Soils. Effects on Soil Biology. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2011, 74, 2075–2081, doi:10.1016/J.ECOENV.2011.07.005.
29. Radwan, S.S.; Al-Mailem, D.; El-Nemr, I.; Salamah, S. Enhanced Remediation of Hydrocarbon Contaminated Desert Soil Fertilized with Organic Carbons. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 2000, 46, 129–132, doi:10.1016/S0964-8305(00)00088-3.
30. Rodríguez-Morgado, B.; Gómez, I.; Parrado, J.; Tejada, M. Behaviour of Oxyfluorfen in Soils Amended with Edaphic Biostimulants/Biofertilizers Obtained from Sewage Sludge and Chicken Feathers. Effects on Soil Biological Properties. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2014, 21, 11027–11035, doi:10.1007/s11356-014-3040-3.
31. Rodríguez-Morgado, B.; Gómez, I.; Parrado, J.; García, C.; Hernández, T.; Tejada, M. Accelerated Degradation of PAHs Using Edaphic Biostimulants Obtained from Sewage Sludge and Chicken Feathers. *J. Hazard. Mater.* 2015, 300, 235–242, doi:10.1016/j.jhazmat.2015.05.045.
32. Chishti, Z.; Hussain, S.; Arshad, K.R.; Khalid, A.; Arshad, M. Microbial Degradation of Chlorpyrifos in Liquid Media and Soil. *J. Environ. Manage.* 2013, 114, 372–380, doi:10.1016/J.JENVMAN.2012.10.032.
33. Romyen, S.; Luepromchai, E.; Hawker, D.; Karnchanasest, B. Potential



of Agricultural By-Product in Reducing Chlorpyrifos Leaching through Soil. *J. Appl. Sci.* 2007, 7, 2686–2690, doi:10.3923/JAS.2007.2686.2690.

34. Sanchez-Hernandez, J.C.; Sandoval, M.; Pierart, A. Short-Term Response of Soil Enzyme Activities in a Chlorpyrifos-Treated Mesocosm: Use of Enzyme-Based Indexes. *Ecol. Indic.* 2017, 73, 525–535, doi:10.1016/J.ECOLIND.2016.10.022.
35. Liu, H.; Hu, M.; Wang, Q.; Cheng, L.; Zhang, Z. Role of Papain-like Cysteine Proteases in Plant Development. *Front. Plant Sci.* 2018, 871, 1717.





Use of okara in the bioremediation of chlorpyrifos in soil: Effects on soil biochemical properties



Angel Orts^a, Sonia Cabrera^b, Isidoro Gómez^c, Juan Parrado^a, Bruno Rodríguez-Morgado^a, Manuel Tejada^{c,*}

^a Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, C/Prof. García González 2, 41012 Sevilla, Spain

^b Departamento de Ingeniería Agrícola y Uso de la Tierra, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Av. San Martín 4453, C1417DSE, Argentina

^c Grupo de Investigación Edafología Ambiental, Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola, E.T.S.I.A. Universidad de Sevilla, Crta de Utrera km. 1, 41013 Sevilla, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Okara
Biostimulant/biofertilizer
Bioremediation
Chlorpyrifos
Soil biochemical properties

ABSTRACT

The main objective of this manuscript was to study the bioremediation capacity of okara (a byproduct of soy milk production) in soils contaminated by organic xenobiotics. To this aim, and under controlled laboratory conditions, a soil was contaminated with chlorpyrifos insecticide at a dose of 51 ha⁻¹. Okara was added to this contaminated soil in two different manners: (1) pure okara (Op); and (2) a biostimulant/biofertilizer made from pure okara using the pH-stat technique. Several enzymatic activities (dehydrogenase, urease, β-glucosidase and phosphatase) and the evolution of the insecticide in soil were studied over an 80-day period. The results suggested that both forms of okara stimulated soil microorganisms and accelerated the degradation of chlorpyrifos in soil. It was, however, the biostimulant/biofertilizer that showed the greatest acceleration in insecticide degradation, possibly due to its higher content in low molecular weight (< 300 Da) peptides, easily available to soil microorganisms.

1. Introduction

Applying different sources of organic matter to soils contaminated by persistent pesticides is a widely-used environmental technique among scientists and environmental engineers (Tejada et al., 2011a, 2011b, 2014; Gómez et al., 2014). On the one hand, the mineralization of this organic matter releases nutrients that stimulate the growth of xenobiotic-tolerant microbes, causing an acceleration in the degradation of the said chemical compound by the microorganisms. On the other hand, the material is capable of adsorbing the said pesticide, reducing its concentration in the soil and consequently reducing its toxicity (Delgado-Moreno and Peña, 2009; Kadian et al., 2012; Gómez et al., 2014).

Okara is a byproduct obtained from the manufacture of soy milk, tofu, and their derivatives. At present, and according to Choi et al. (2015), worldwide an estimated 14 million tons of okara are generated annually. Its high fiber (56%) and protein (29%) content makes this byproduct an exceptional source for the food industry (Redondo-Cuenca et al., 2008; Villanueva-Suárez et al., 2013; Park et al., 2015). Several biostimulants/biofertilizers (BS) have, in recent years, been obtained from various organic wastes such as sewage sludge, chicken

feathers, soluble wheat condensed distillers, rice bran extract, carob germ enzymatic extract – all with the purpose of being used in the bioremediation of soils polluted with various organic xenobiotics (pesticides and hydrocarbons) (Gómez et al., 2014; Tejada et al., 2010, 2011a, 2011b, 2014; Rodríguez-Morgado et al., 2015a, 2015b). Producing a new okara-based BS could, therefore, be another new alternative for recovering contaminated soils. This would be a completely new approach to the problem since, to our knowledge, there is nothing in the literature describing the use of okara either as an unaltered byproduct or as a BS in the bioremediation of soils polluted by organic xenobiotics.

In recent years, there is a strong concern regarding chlorpyrifos contamination in both soil and groundwater, due to its high persistence in soil (Korade and Fulekar, 2009; Tejada et al., 2011b, 2014). Chlorpyrifos [C₉H₁₁Cl₃NO₃PS or *O,O*-diethyl-*O*-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate] is a non-systemic organophosphorus insecticide used to control insect pests in the soil and foliar treatments.

Most soil scientists, furthermore, consider biochemical properties (especially the study of enzymatic activities) as excellent soil quality indicators, because they are more sensitive than physical and chemical properties (Paz-Ferreiro et al., 2010; Bera et al., 2016). Therefore,

* Corresponding author.

E-mail address: mtmoral@us.es (M. Tejada).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.042>

Received 2 April 2017; Received in revised form 29 September 2017; Accepted 30 September 2017

Available online 13 October 2017

0929-1393/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.



Table 1

Chemical composition and protein molecular weight distribution (mean \pm standard error, $n = 3$) of the two okara forms. Columns followed by the same letter(s) are not significantly different ($p > 0.05$).

	Op	Oh
Organic matter (g kg ⁻¹)	537a \pm 14	448a \pm 18
N (g kg ⁻¹)	60.7a \pm 4.2	107.2b \pm 11.4
P (g kg ⁻¹)	6.5a \pm 1.7	11.8b \pm 2.2
K (g kg ⁻¹)	9.1a \pm 1.2	20.8b \pm 3.1
S (g kg ⁻¹)	3.8a \pm 1.1	11.8b \pm 1.4
Ca (g kg ⁻¹)	1.8a \pm 0.3	2.7a \pm 0.8
Mg (g kg ⁻¹)	2.1a \pm 0.8	3.3a \pm 1.0
Fe (mg kg ⁻¹)	63.9a \pm 4.9	63.4a \pm 5.7
Cu (g kg ⁻¹)	10.9a \pm 1.0	12.5a \pm 1.6
Mn (g kg ⁻¹)	30.6a \pm 2.2	27.2a \pm 1.9
Zn (g kg ⁻¹)	28.0a \pm 2.6	47.7b \pm 3.8
Protein molecular weight distribution (Da)		
> 10,000	1.7b \pm 0.5	0.7a \pm 0.1
10,000–5000	64.0b \pm 10.5	23.5a \pm 2.8
5000–1000	1.2 \pm 0.2	0
1000–300	0	0
< 300	33.2a \pm 6.4	75.7b \pm 10.6

measuring enzymatic activities can provide information on the behavior of chlorpyrifos in soil, as well as the effects that this insecticide can cause on soil metabolic activity (Tejada et al., 2011b, 2014; Franco-Andreu et al., 2016).

The main objectives of this manuscript are to study the method of obtaining a new BS from okara, as well as its effectiveness in bioremediating a chlorpyrifos-contaminated soil by observing its impact on the biochemical properties of the said soil.

2. Material and methods

2.1. Characteristics of okara and enzymatic hydrolysis process

Pure Okara (Op) was supplied by the Spanish company Soria Natural S.A. The chemical characteristics of this by-product are shown in Table 1. The determinations of organic matter, macro- and micro-nutrients, as well as protein molecular mass distribution were performed following the methodology described in Rodríguez-Morgado et al. (2015c).

Hydrolysis process took place in a bioreactor following the pH-stat methodology (Adler-Nissen, 1977), using an endoprotease obtained by liquid fermentation of *Bacillus licheniformis* ATCC 21,415 as the hydrolytic agent. Fig. 1 shows this process of enzymatic hydrolysis schematically. Table 1 shows the chemical properties of the new BS (Oh) obtained from pure okara. The methodology used in determining the chemical properties of this new fertilizer was the same as previously described.

2.2. Soil and chlorpyrifos characteristics

The soil used in the study was classified as Vertic Argiudoll (USDA, 1999), with 173 \pm 23 g kg⁻¹ sand, 585 \pm 31 g kg⁻¹ silt, and 242 \pm 29 g kg⁻¹ clay. Soil pH was 6.5 \pm 0.1, 30 g kg⁻¹C, and 1.9 \pm 0.1 g kg⁻¹N. The methodology used in the determination of the soil parameters is described in Tejada et al. (2014).

The insecticide used was chlorpyrifos. The Senator® 48 (48% chlorpyrifos) commercial formulation was purchased from Bayer CropScience (Madrid, Spain). According to Giménez et al. (2004), the recommended dose of insecticide to cause toxic effect on soil biochemical properties is 51 ha⁻¹.

2.3. Experimental design

Two hundred and fifty grams of dried and sieved (< 2 mm) soil was

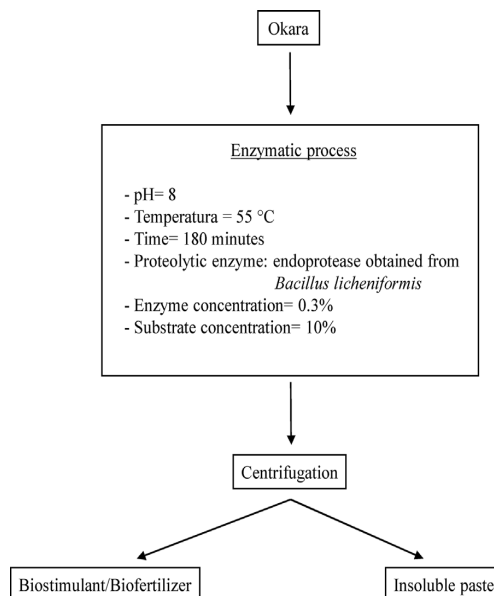


Fig. 1. Enzymatic hydrolysis process used for obtaining biostimulants/biofertilizers from okara.

mixed with chlorpyrifos insecticide and the forms of okara in 1-L glass bottles at a rate of 1.5%. Distilled water was added to each soil to bring it to 60% of its water-holding capacity. An unamended polluted and amended non-polluted soil were used as control. The incubation treatments are detailed as follows:

- C, Control soil, unamended and non insecticide polluted soil. (1)
- C + Op, soil amended with Op and non-insecticide polluted (2)
- C + Oh, soil amended with Oh and non-insecticide polluted (3)
- C + I, soil non-organic amended and insecticide polluted. (4)
- C + Op + I, soil amended with Op and insecticide polluted (5)
- C + Oh + I, soil amended with Oh and non-insecticide polluted (6)

For each treatment, triplicate glass bottles were kept at 25 \pm 1 °C. The moisture content was controlled gravimetrically and moisture loss was replaced by distilled water as necessary.

2.4. Soil analysis

On days 3, 7, 15, 30, 50 and 80, dehydrogenase, urease, β -glucosidase and phosphatase activities were determined using the methods described by García et al. (1993), Kandelers and Gerber (1988), Eivazi and Zakaria (1993) and Tabatabai and Bremner (1969), respectively.

Chlorpyrifos in soil was also extracted and determined on days 3, 7, 15, 30, 50 and 80 after the start of incubation. Chlorpyrifos extraction from soil followed the Menon et al. (2004) criteria and its concentration was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a UV detector set at 240 nm using a C18 reverse phase column (4.6 \times 250 mm²) at 25 °C. Hexane/dichloromethane/methanol/2-propanol (80:15:0.2:4.8) was used as the mobile phase.

2.5. Statistical analysis

With the data obtained, a two-way analysis of variance (ANOVA) was performed with treatment and sampling time as factors followed by Tukey's significant difference as a post hoc test, considering a significance level of $p < 0.05$ throughout the study and using



Table 2

Evolution of dehydrogenase and urease activities (mean \pm standard error, n = 3) in soils amended with pure okara and hydrolyzate okara and with chlorpyrifos during the experimental period. Columns followed by the same letter(s) are not significantly different ($p > 0.05$). INTF: 2-p-iodo-3-nitrophenyl formazan.

Incubation days	Incubation days					
	3	7	15	30	50	80
Dehydrogenase activity ($\mu\text{g INTF g}^{-1} \text{h}^{-1}$)						
C	1.6b \pm 0.2	1.5b \pm 0.3	1.5b \pm 0.2	1.4b \pm 0.2	1.5b \pm 0.2	1.4b \pm 0.2
C + Op	3.2c \pm 0.9	3.9c \pm 1.2	4.7c \pm 1.4	5.1c \pm 1.3	6.0d \pm 1.5	7.4d \pm 1.2
C + Oh	28.9e \pm 3.5	36.8e \pm 2.7	30.8e \pm 3.0	9.7d \pm 1.8	1.4b \pm 0.2	1.3b \pm 0.3
C + I	0.93a \pm 0.14	0.75a \pm 0.11	0.64a \pm 0.13	0.60a \pm 0.11	0.74a \pm 0.14	1.1ab \pm 0.2
C + Op + I	2.3c \pm 0.5	2.8c \pm 0.7	3.6c \pm 0.9	4.0c \pm 1.4	4.5c \pm 1.4	5.3d \pm 1.8
C + Oh + I	20.1e \pm 1.6	23.9e \pm 2.2	17.1d \pm 1.6	2.9c \pm 0.8	1.4b \pm 0.2	1.5b \pm 0.2
Urease activity ($\mu\text{g NH}_4^+ \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$)						
C	1.6b \pm 0.2	1.5b \pm 0.3	1.5b \pm 0.2	1.6b \pm 0.3	1.4b \pm 0.2	1.4b \pm 0.3
C + Op	2.0b \pm 0.3	2.4b \pm 0.5	2.8b \pm 0.7	3.9c \pm 0.6	5.0c \pm 1.0	6.7d \pm 1.2
C + Oh	1.8b \pm 0.3	1.9b \pm 0.3	1.6b \pm 0.1	1.7b \pm 0.3	1.8b \pm 0.3	1.5b \pm 0.2
C + I	1.1a \pm 0.1	0.79a \pm 0.10	0.71a \pm 0.12	0.68a \pm 0.08	0.82a \pm 0.11	1.2ab \pm 0.1
C + Op + I	1.5b \pm 0.2	1.7b \pm 0.2	2.1b \pm 0.4	2.6b \pm 0.3	3.4c \pm 0.6	4.5c \pm 0.8
C + Oh + I	1.2ab \pm 0.2	0.83a \pm 0.14	0.72a \pm 0.11	0.86a \pm 0.12	1.4b \pm 0.2	1.4b \pm 0.2

Statgraphics Plus 2.1 software package.

3. Results

3.1. Characteristics of the new BS

After enzymatic hydrolysis, the new BS (Oh) is characterized by higher content values of N, P and K, as well as higher S and Zn macronutrient values (Table 1). With regard to the molecular mass protein distribution, the enzymatic hydrolysis process increased the percentage of proteins of molecular weight < 300 Da by 56.1%, while decreasing proteins of between 10,000–5000 Da and > 10,000 Da proteins by 63.3% and 58.8%, respectively.

3.2. Soil biochemical properties

Applying Op and Oh to the soil caused a significant increase ($p < 0.05$) in dehydrogenase activity (Table 2). However, this increase varied greatly between the two forms of okara. Compared with the C treatment, when Op was applied to the soil a progressive increase of this intracellular activity was observed throughout the experimental period, increasing by 80.6% by the end of the experiment. However, when Oh was applied to the soil, the highest stimulation of dehydrogenase activity occurred at day 7 (95.1%, compared with the C treatment), before decreasing progressively until the end of the incubation period, at which point the values of the dehydrogenase activity in the C + Oh treatment were similar to those in C treatment.

When the insecticide was applied to the soil, the dehydrogenase activity was inhibited. This inhibition was maximal 30 days after starting the experiment, from which moment the inhibition decreased until the end of the incubation period.

Applying Op and Oh to polluted soil caused less dehydrogenase activity inhibition. However, depending on the type of organic source applied to the soil, dehydrogenase behavior varied. Compared with the C + Op treatment, when Op was applied to the polluted soil, the dehydrogenase activity had decreased by 28.4% at the end of the experiment. On the other hand, at day 7 after applying Oh to polluted soil, and compared with the C + Oh treatment, dehydrogenase activity decreased by 35.1%. From day 7 this inhibition began to decrease progressively until the end of the experiment, at which time the dehydrogenase activity showed similar values between C and C + Oh + I treatments, respectively.

Urease activity behavior also differed greatly depending on the type of organic matter applied to the soil (Table 2). Compared with treatment C, when Op was applied to the soil, urease activity progressively

increased during the incubation period, showing a significant increase ($p < 0.05$) of 79.1% by the end of the experiment. However, and compared to treatment C, when Oh was applied, the urease activity was not stimulated. When applying chlorpyrifos to the soil, the urease activity decreased, the maximum decrease being found 30 days after the experiment was started. The behavior of this enzyme in the C + I treatment was similar to that obtained in the C + Oh + I treatment. Compared with the C + Op treatment, and at the end of the experiment, urease activity decreased in the C + Op + I treatment by 32.8%.

In the C + Oh treatment, the highest β -glucosidase activity stimulation also occurred 7 days after starting the experiment, whereas for the C + Op treatment the highest enzymatic stimulation was at the end of the incubation period (Table 3). Applying chlorpyrifos also inhibited β -glucosidase, reaching maximum inhibition 30 days after starting the incubation. Compared with the C + Op treatment, and at the end of the experimental period, β -glucosidase activity had decreased by 50% in the C + Op + I treatment. On the other hand, 7 days after applying Oh to soil contaminated with chlorpyrifos, and compared with the treatment C + Oh, β -glucosidase activity decreased by 40%. Also, and at the end of the incubation period, β -glucosidase activity values were similar between C and C + Oh + I treatments, respectively.

Finally, the behavior of phosphatase activity was similar to that of β -glucosidase activity for all treatments studied (Table 3).

3.3. Soil chlorpyrifos evolution

Fig. 2 shows the progressive degradation of chlorpyrifos during the experimental period. This degradation increases by incorporating both forms of okara into the soil. However, the degradation of the insecticide was greatest when Oh was applied, to such an extent that at the end of the experiment no chlorpyrifos was detected in soil. When Oh was applied to the contaminated soil, the insecticide concentration after 80 days of incubation was 4 times lower in the C + Op + I treatment than in the C + I treatment.

4. Discussion

This study has demonstrated that the application of chlorpyrifos insecticide to the soil caused a rapid and significant inhibition in the enzymatic activities studied. These results are in agreement with those obtained by Tejada et al. (2011b, 2014), Kadian et al. (2012), Shan et al. (2006) and Sanchez-Hernandez et al. (2017), who found a significant decrease in biological properties after the application of chlorpyrifos to soil.

Currently, a large number of scientific publications indicate that



Table 3

Evolution of β -glucosidase and phosphatase activities (mean \pm standard error, n = 3) in soils amended with pure okara and hydrolyzate okara and with chlorpyrifos during the experimental period. Columns followed by the same letter(s) are not significantly different ($p > 0.05$). PNP: *p*-nitrophenol.

Incubation days	Incubation days					
	3	7	15	30	50	80
β -glucosidase activity (mmol PNP g ⁻¹ h ⁻¹)						
C	0.56b \pm 0.12	0.53b \pm 0.09	0.51b \pm 0.11	0.52b \pm 0.11	0.49b \pm 0.16	0.48b \pm 0.17
C + Op	0.71b \pm 0.18	0.85c \pm 0.16	1.0c \pm 0.1	1.8c \pm 0.2	2.4d \pm 0.3	3.0d \pm 0.8
C + Oh	1.8c \pm 0.2	2.5d \pm 0.4	2.0d \pm 0.2	1.7c \pm 0.2	0.48b \pm 0.11	0.51b \pm 0.11
C + I	0.34a \pm 0.09	0.29a \pm 0.07	0.25a \pm 0.05	0.23a \pm 0.06	0.32a \pm 0.08	0.41b \pm 0.15
C + Op + I	0.49b \pm 0.14	0.61b \pm 0.15	0.75b \pm 0.18	0.85c \pm 0.14	0.99c \pm 0.12	1.5c \pm 0.1
C + Oh + I	1.1c \pm 0.1	1.5c \pm 0.2	1.0c \pm 0.1	0.74 \pm 0.11	0.51b \pm 0.14	0.49b \pm 0.12
phosphatase activity (μ mol PNP g ⁻¹ h ⁻¹)						
C	1.9b \pm 0.3	1.7b \pm 0.3	1.9b \pm 0.4	1.8b \pm 0.2	1.8b \pm 0.2	1.8b \pm 0.3
C + Op	3.9c \pm 0.8	5.1c \pm 1.6	6.3c \pm 2.0	7.0d \pm 1.8	8.1d \pm 2.3	9.3d \pm 1.5
C + Oh	6.7c \pm 1.6	10.4d \pm 2.4	8.3d \pm 2.1	3.2b \pm 0.8	1.7b \pm 0.2	1.6b \pm 0.2
C + I	1.2a \pm 0.2	0.97a \pm 0.15	0.81a \pm 0.17	0.78a \pm 0.16	0.98a \pm 0.19	1.3a \pm 0.2
C + Op + I	2.7b \pm 0.7	3.4b \pm 0.9	4.2c \pm 1.1	4.9c \pm 1.0	5.2c \pm 1.1	6.4c \pm 1.3
C + Oh + I	4.8c \pm 1.6	7.1d \pm 1.8	5.9c \pm 1.6	2.8b \pm 0.7	1.8b \pm 0.3	1.6b \pm 0.2

chlorpyrifos-tolerant microorganisms are responsible for the degradation of this insecticide in soil (Kulshrestha and Kumari, 2011; Tejada et al., 2011b, 2014; Liu et al., 2012; Chishti et al., 2013). However, this degradation process can last quite a long time, since not only does the process depend on these microorganisms, but also on other factors such as temperature, solar radiation, soil type, pH, aeration, the chemical structure of the insecticide and bioavailability of the compound (Chishti et al., 2013). This means that the soil persistence of chlorpyrifos varies greatly and, for this reason, it is advisable to use strategies or techniques specifically designed to mitigate the toxic effects of this chemical.

In recent years, applying organic matter to chlorpyrifos-polluted soils has been regarded as an optimal alternative to stimulate the microorganisms tolerant to this toxin, thus accelerating its degradation in soil. In this sense there have been many organic products used to accelerate chlorpyrifos degradation in soil, such as coconut shells, peat moss, peanut shells and rice husks, municipal solid waste, cow manure, farmyard manure, mushroom, vermicompost from Teri Gram, biostimulants made from sludges and chicken feathers, etc. (Romayen et al., 2007; Tejada et al., 2011b, 2014; Kadian et al., 2012). In all of these cases, applying organic matter to the soil contaminated with chlorpyrifos increased the microbial activity of the microorganisms tolerant to this toxic. This caused an acceleration in the degradation of the insecticide in the soil, with a consequent decrease in its soil concentration, leading in turn to a recovery of the pre-contamination microbial community.

In our experiment, applying okara to soil contaminated by chlorpyrifos had an effect similar to those described by the above-mentioned

scientists when applying different forms of organic matter. This leads us to deduce that okara is a source of organic matter that is useful in the bioremediation of chlorpyrifos-polluted soils. This by-product did, however, have a very different effect on chlorpyrifos depending on its manner of application to the soil. When pure okara (Op) was applied, chlorpyrifos was degraded more slowly than when okara was applied in the form of a BS, suggesting that the stimulating effect of this organic residue depends on its manner of application to contaminated soil.

The BS presented a high content of peptides of low molecular weight (< 300 Da), which were quickly used by the soil microorganisms, favoring their proliferation, as evidenced by the high enzymatic activities values during the first days of incubation. As a consequence, insecticide-tolerant microorganisms were stimulated during the first 7 days of the incubation period, causing an increase in the degradation of chlorpyrifos in soil. These results are in agreement with those obtained by Tejada et al. (2014), when using several BS obtained from sewage sludge and chicken feathers which greatly accelerated the degradation of chlorpyrifos in soil due to the rapid stimulation exerted by these products. This is the reason for which chlorpyrifos was not found in soil 80 days after the experiment was started. The Op presented higher contents of high molecular weight proteins. These proteins cannot be absorbed directly by soil microorganisms; in order to obtain energy and nutrients they first need to degrade them. This mineralization is slow, since it is affected by chlorpyrifos-tolerant microorganisms in soil. Therefore the process of soil bioremediation is much slower over time.

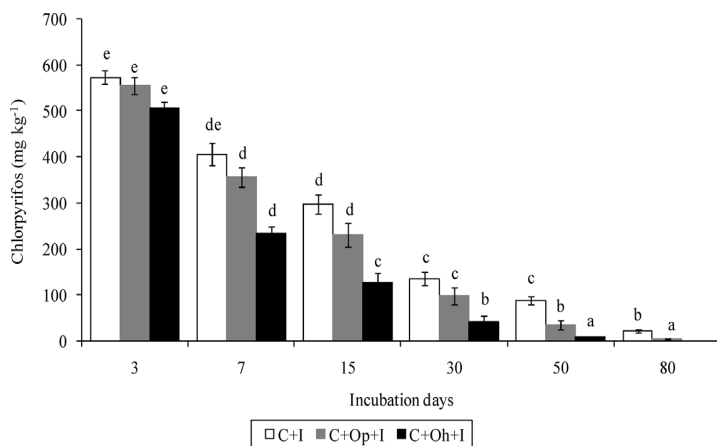


Fig. 2. Evolution of chlorpyrifos (mean \pm standard error, n = 3) in soils during the experimental period. Columns followed by the same letter(s) are not significantly different ($p > 0.05$).



5. Conclusions

It can be concluded that okara, a byproduct obtained in the production of soy milk, is of great utility in the bioremediation of soils contaminated by chlorpyrifos. However, the greatest bioremediation effects of this product occurred when okara was transformed and through enzymatic hydrolysis a new biostimulant/biofertilizer was obtained which was rich in low molecular weight proteins and easily assimilated by soil microorganisms that accelerated the degradation of this insecticide in soil.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Spanish company Soria Natural S.L. his contribution of okara for the development of the manuscript. On the other hand, the second author received funding for an international stay during her MSc studies by the AUIP (Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado).

References

- Adler-Nissen, J., 1977. Enzymatic hydrolysis of food protein. *Proc. Biochem.* 12, 15–32.
- Bera, T., Collins, H.P., Alva, A.K., Purakayastha, T.J., Patra, A.K., 2016. Biochar and manure effluent on soil biochemical properties under corn production. *Appl. Soil Ecol.* 107, 360–367.
- Chishti, Z., Hussain, S., Arshad, K.R., Khalid, A., Arshad, M., 2013. Microbial degradation of chlorpyrifos in liquid media and soil. *J. Environ. Manage.* 114, 372–380.
- Choi, I.S., Kim, Y.G., Jung, J.K., Bae, H.J., 2015. Soybean waste (okara) as a valorization biomass for the bioethanol production. *Energy* 93, 1742–1747.
- Delgado-Moreno, L., Peña, A., 2009. Compost and vermicompost of olive cake to bioremediate triazines-contaminated soil. *Sci. Total Environ.* 407, 1489–1495.
- Eivazi, F., Zakaria, A., 1993. β -Glucosidase activity in soils amended with sewage sludge. *Agric. Ecosyst. Environ.* 43, 155–161.
- Franco-Andreu, L., Gómez, I., Parrado, J., García, C., Hernández, T., Tejada, M., 2016. Behavior of two pesticides in a soil subjected to severe drought. Effects on soil biology. *Appl. Soil Ecol.* 105, 17–24.
- Gómez, I., Rodríguez-Morgado, B., Parrado, J., García, C., Hernández, T., Tejada, M., 2014. Behavior of oxyfluorfen in soils amended with different sources of organic matter. Effects on soil biology. *J. Hazard. Mater.* 273, 207–214.
- García, C., Hernández, T., Costa, F., Ceccanti, B., Masciandaro, G., 1993. The dehydrogenase activity of soils an ecological marker in processes of perturbed system regeneration. In: Gallardo-Lancho, J. (Ed.), *Proceedings of The XI International Symposium of Environmental Biogeochemistry*. Salamanca, Spain. pp. 89–100.
- Giménez, R., Della Penna, A., Odello, E., 2004. Efectos tóxicos de los insecticidas clorpirifos y teflutrina sobre la lombriz de tierra (*Lumbricus terrestris* L.). *Agric. Téc.* 64, 347–352 (in Spanish).
- Kadian, N., Malik, A., Satya, S., Dureja, P., 2012. Effect of organic amendments on microbial activity in chlorpyrifos contaminated soil. *J. Environ. Manage.* 95, S199–S202.
- Kandeler, E., Gerber, G., 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils* 6, 68–72.
- Korade, D.L., Fulekar, M.H., 2009. Rhizosphere remediation of chlorpyrifos in mycorrhizospheric soil using ryegrass. *J. Hazard. Mater.* 172, 1344–1350.
- Kulshrestha, G., Kumari, A., 2011. Fungal degradation of chlorpyrifos by *Acremonium* sp. strain (GFR-1) isolated from a laboratory-enriched red agricultural. *Biol. Fertil. Soils* 47, 219–225.
- Liu, Z., Chen, X., Shi, Y., Su, Z., 2012. Bacterial degradation of chlorpyrifos by *Bacillus cereus*. *Adv. Mater. Res.* 356–360, 676–680.
- Menon, P., Gopal, M., Prasad, R., 2004. Influence of two insecticides, chlorpyrifos and quinalphos, on arginine ammonification and mineralizable nitrogen in two tropical soil types. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7370–7376.
- Park, J., Choi, I., Kim, Y., 2015. Cookies formulated from fresh okara using starch, soy flour and hydroxypropyl methylcellulose have high quality and nutritional value. *LWT—Food Sci. Technol.* 63, 660–666.
- Paz-Ferreiro, J., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Seoane, S., Gil-Sotres, F., 2010. Effect of management and climate on biochemical properties of grassland soils from Galicia (NW Spain). *Eur. J. Soil Biol.* 46, 136–143.
- Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M.J., Mateos-Aparicio, I., 2008. Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and englyst method. *Food Chem.* 108, 1099–1108.
- Rodríguez-Morgado, B., Gómez, I., Parrado, J., Tejada, M., 2015a. Behaviour of oxyfluorfen in soils amended with edaphic biostimulants/biofertilizers obtained from sewage sludge and chicken feathers. Effects on soil biological properties. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 11027–11035.
- Rodríguez-Morgado, B., Gómez, I., Parrado, J., García, C., Hernández, T., Tejada, M., 2015b. Accelerated degradation of PAHs using edaphic biostimulants obtained from sewage sludge and chicken feathers. *J. Hazard. Mater.* 300, 235–242.
- Rodríguez-Morgado, B., Gómez, I., Parrado, J., García-Martínez, A.M., Aragón, C., Tejada, M., 2015c. Obtaining edaphic biostimulants/biofertilizers from different sewage sludges: effects on soil biological properties. *Environ. Technol.* 36, 2217–2226.
- Romyen, S., Luepromchai, E., Hawker, D., Karnchanaset, B., 2007. Potential of agricultural by-product in reducing chlorpyrifos leaching through soil. *J. Appl. Sci.* 7, 2686–2690.
- Sanchez-Hernandez, J.C., Sandoval, M., Pierant, A., 2017. Short-term response of soil enzyme in a chlorpyrifos-treated mesocosmos: use of enzyme based indexes. *Ecol. Indic.* 73, 525–535.
- Shan, M., Fang, H., Wang, X., Feng, B., Chu, Q., Yu, Y.L., 2006. Effect of chlorpyrifos on soil microbial populations and enzyme activities. *J. Environ. Sci. China* 18, 4–5.
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1969. Use of p-nitrophenol phosphate in assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1, 301–307.
- Tejada, M., García-Martínez, A.M., Gómez, I., Parrado, J., 2010. Application of MCPA herbicide on soils amended with biostimulants: short-time effects on soil biological properties. *Chemosphere* 80, 1088–1094.
- Tejada, M., Benítez, C., Parrado, J., 2011a. Application of biostimulants in benzo(a) pyrene polluted soils: short-time effects on soil biochemical properties. *Appl. Soil Ecol.* 50, 21–26.
- Tejada, M., Gómez, I., del Toro, M., 2011b. Use of organic amendments as a bioremediation strategy to reduce the bioavailability of chlorpyrifos insecticide in soils. Effects on soil biology. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 2075–2081.
- Tejada, M., Rodríguez-Morgado, B., Gómez, I., Parrado, J., 2014. Degradation of chlorpyrifos using different biostimulants/biofertilizers: effects on soil biochemical and microbial community. *Appl. Soil Ecol.* 84, 158–165.
- USDA, 1999. *Keys of Soil Taxonomy*, 8th edition. Pocahontas Press, Blacksburg, VA.
- Villanueva-Suárez, M.J., Pérez-Cózar, M.L., Redondo-Cuenca, A., 2013. Sequential extraction of polysaccharides from enzymatically hydrolyzed okara byproduct: physicochemical properties and *in vitro* fermentability. *Food Chem.* 141, 1114–1119.



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

CAPÍTULO 4

ESTUDIO DE LA POTENCIA BIOESTIMULANTE DEL HIDROLIZADO ENZIMÁTICO DE OKARA FRENTE AL ESTRÉS AMBIENTAL POR OZONO

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

1. INTRODUCCIÓN

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

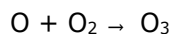
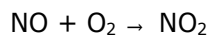
INTRODUCCIÓN

1. CONTAMINACIÓN POR OZONO Y AGRICULTURA

En los últimos cien años la proliferación de agentes contaminantes antropogénicos ha causado un gran impacto tanto en la flora salvaje como en las plantas cultivadas, convirtiéndose en causa silenciosa de pérdida en la productividad de los cultivos y debilitando la respuesta de las plantas ante otras causas de estrés. Esta situación, lejos de ir remitiendo, aumenta año a año y se espera que siga empeorando [1].

Entre estos contaminantes se encuentra el ozono troposférico. El ozono (O₃) presente en este nivel se forma por reacciones fotoquímicas de compuestos atmosféricos, precursores, que son emitidos tanto por fuentes naturales como antropogénicas, en presencia de luz solar, altas temperaturas y baja velocidad del viento. Su concentración, por tanto, suele ser más elevada durante los meses de verano y en condiciones secas acompañadas de altas presiones.

Entre los precursores se encuentran los óxidos de nitrógeno (NO_x), compuestos orgánicos volátiles (COVs), monóxido de carbono (CO), y metano (CH₄). El mecanismo básico de formación es:



Por tanto, el ozono troposférico es un contaminante secundario.

El ozono está reconocido como el oxidante fotoquímico más frecuente y sus efectos perjudiciales en la vegetación han sido extensamente estudiados desde la primera observación de daños en plantas ornamentales y cultivos en California, a principio de los años 40 [2].



EFFECTO DEL OZONO EN EL TRATAMIENTO DE CULTIVOS

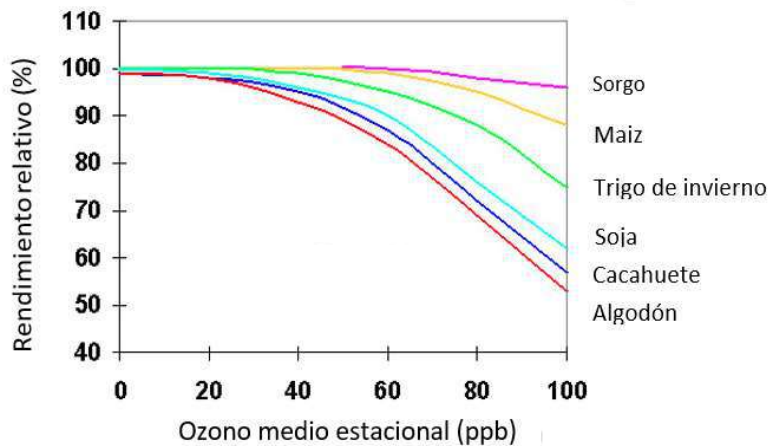


Figura 1. Efecto del Ozono en la productividad de los cultivos.

Como se muestra en la figura 1, la pérdida de productividad agrícola en diferentes cultivos es proporcional a la concentración de ozono en el aire [3].

1.1. MECANISMOS DE ACTUACIÓN DE LAS SUSTANCIAS OXIDANTES EN LAS PLANTAS

Las sustancias oxidantes, como el ozono, penetran en las plantas a través de los estomas de las hojas. Por tanto, la cantidad de oxidantes en hoja depende directamente del número de estomas por unidad de superficie y de la apertura de éstos.

Una vez dentro del apoplasto, la reacción de los oxidantes con el agua y solutos lleva a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como radical superóxido, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno y oxígeno singlete.

Las ROS ponen en marcha los mecanismos antioxidantes celulares (MAC) que pueden ser:

- Enzimáticos: superóxido dismutasa (SOD), catalasas, peroxidasas, glutatión reductasa.



- No enzimáticos: Ácido ascórbico, carotenoides y antocianinas.

Estos MAC pueden llegar a saturarse por la alta presencia de las ROS. Si los sistemas de detoxificación del apoplasto son insuficientes, las ROS generadas a partir de los gases pueden penetrar en las células del mesofilo y reaccionar con las membranas y otros componentes celulares como las proteínas, causando cambios en la permeabilidad y fluidez de las membranas, daños a enzimas y un desequilibrio iónico y metabólico [4]. Este conjunto de daños se denomina estrés oxidativo.

Entre las ROS que se generan durante la respuesta oxidativa se encuentra el radical hidroxilo (OH-•), un oxidante muy potente y una de las especies más reactivas que se conocen. Este radical es el responsable de una gran parte de la fitotoxicidad de las ROS debido a que reacciona rápidamente con todo tipo de macromoléculas biológicas [5]. El OH-• puede iniciar la peroxidación de lípidos dando lugar a una reacción en cadena que pasa por la formación de radicales peroxilo y finalmente conduce a la formación de hidroperóxidos lipídicos (LOOH); los dobles enlaces conjugados de los LOOH disminuyen la fluidez de las membranas [6]. El OH-• también puede modificar las proteínas haciéndolas más susceptibles al ataque de endopeptidasas específicas [7] y dañar el ADN [5]. Otra especie reactiva es el radical superóxido (O₂-•), que también puede iniciar la peroxidación de lípidos [8]. A su vez, el O₂ sufre una dismutación espontánea o catalizada por la enzima SOD, que da lugar a otra especie oxidante, H₂O₂.

La oxidación provoca finalmente cambios en las funciones de la membrana celular que afectan a las concentraciones de iones y cambian el potencial osmótico del citoplasma reduciendo los procesos fotosintéticos en los cloroplastos. Se reduce la fijación neta de CO₂ y aumenta la respiración, lo cual lleva a un envejecimiento precoz de la hoja y a una catálisis acelerada que produce:

- Una rápida pérdida de proteínas y clorofila.
- Una bajada en el número de frutos y semillas.
- Y una disminución en la capacidad de respuesta ante otros factores de estrés.



Todo lo anterior se traduce en un gasto de energía extraordinario para la planta y una pérdida de productividad.

Además, hay que tener en cuenta que algunos MAC intervienen en otros procesos vegetales como proliferación y elongación celular, que quedarán desatendidos si todos los recursos de la célula se concentran en contrarrestar la oxidación.

1.2. SÍNTOMAS Y DIAGNOSIS DE DAÑOS POR OZONO

Los síntomas de daños por oxidantes son de dos tipos: agudos y crónicos. Los síntomas agudos se relacionan con concentraciones muy elevadas de oxidantes durante cortos periodos de tiempo y se manifiestan como clorosis, motas, puntos y necrosis internervales en la hoja que suelen darse en el haz y, en casos graves, también en el envés. Están asociados a las hojas más viejas y, más concretamente, a la zona soleada de éstas, quedando la zona de umbría intacta. Los síntomas crónicos son causados por bajas concentraciones de ozono con picos de frecuencia periódica e intermitentes y afectan el crecimiento de la planta, la productividad y la calidad sin necesidad de la aparición de síntomas externos. Si se presentan síntomas externos de toxicidad crónica suelen ser clorosis, retraso en la época de crecimiento, senescencia prematura y hojas quebradizas.

Para el diagnóstico de daños por ozono es importante evaluar la presencia en exceso de los componentes de los MAC, así como acumulaciones de formaldehídos, formiato y acetato, provenientes de la reacción de las sustancias oxidantes con etileno y fenilpropanoide en los tejidos.





Figura 2. Síntomas y diagnóstico de daños producidos por ozono en hojas de calabaza.

1.3. PRODUCTOS QUÍMICOS EN LA AGRICULTURA PARA COMBATIR DAÑOS POR OZONO

El uso de compuestos químicos, incluyendo antioxidantes, para evitar o corregir los daños de la contaminación atmosférica en los cultivos se ha llevado a cabo durante las últimas cuatro décadas. Rich S. revisó algunos aspectos de la protección con énfasis en los primeros intentos de usar fungicidas y materiales tensioactivos inertes [9]. En 1974, Ormrod y Adedipe publicaron un artículo que contenía una breve historia de los protectores químicos, dividiendo los protectores químicos en fungicidas, antioxidantes y reguladores de crecimiento [10].

Actualmente, se utiliza un grupo heterogéneo de antioxidantes para evitar daños por el ozono, principalmente a través de la inhibición de procesos oxidativos. De esta forma se pretende dotar de protección a corto plazo ante los contaminantes atmosféricos. Entre ellos están:

- 1. Acido Ascórbico y sus sales
- 2. Quinolínol
- 3. Níquel-N-dibutil ditiocarbamato
- 4. Fenilurea
- 5. Etilendiurea



Cabe resaltar que los antioxidantes utilizados en la actualidad son sintetizados químicamente, contienen un solo tipo de molécula antioxidante y son de difícil manejo en campo debido a su poca solubilidad y/o toxicidad y los resultados descritos son contradictorios [11].

La innovación de nuestra investigación se haya en obtener productos que contienen diversos tipos de antioxidantes, tanto los hidrófilos (solubles en agua) como aquellos que son lipófilos, debido a la formación de microemulsiones. Estos productos se consiguen a partir de fuentes naturales, fundamentalmente recuperando material desechado por otras industrias agroalimentarias.

Nuestra propuesta incluye ventajas como:

- 1. Obtener un producto con diversos tipos de actividad antioxidantes y con variedad en su ubicación dentro de la célula.
- 2. Serán compuestos de síntesis biológica y procedente de fuentes naturales.

Se trata, por tanto, de conseguir fitonutrientes funcionales, sustancias naturales de origen vegetal, que tienen como principales características:

- Composición orgánica de origen natural.
- Presencia de compuestos bioactivos naturales: polifenoles, antioxidantes, vitaminas, aminoácidos, nucleótidos...
- No son productos de síntesis química.

En definitiva, el problema de los oxidantes siempre se ha enfocado desde un punto de vista puramente químico y/o físico. Es necesario poner en trabajo solidario las visiones biológica, química y física y llegar a una solución compatible tanto con la alimentación sana y natural del consumidor, como respetuosa con el medio ambiente, unidos a procesos de bioeconomía circular ya que recuperamos subproductos orgánicos de industrias agroalimentaria como es el okara.



2. OBJETIVOS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

2. OBJETIVOS

La disminución en la productividad de las cosechas debido a los contaminantes ambientales, como el ozono, suponen un gran problema en la agricultura.

En la actualidad no hay herramientas eficientes para solucionar este problema que se agrava constantemente. El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad bioestimulante del extracto enzimático de okara, rico en compuestos bioactivos, frente al estrés oxidativo producido por ozono.

Para ello, la capacidad bioestimulante frente al estrés producido por ozono será evaluada a través del análisis de parámetros fisiológicos y bioquímicos en plantas.

El desarrollo de esta investigación nos permitirá ofertar un nuevo producto para solucionar el problema de contaminación atmosférica, en un nicho de mercado emergente que se espera tenga un crecimiento exponencial en los próximos años. Además, y como se ha comentado en capítulos anteriores, ya que el producto de partida es un residuo de la industria alimentaria, rico en compuestos bioactivos, este proceso aporta también una vía de optimización en el uso del mismo.



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

3. ARTÍCULO

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

BIOSTIMULANT CAPACITY OF AN ENZYMATIC EXTRACT FROM OKARA AGAINST OZONE-INDUCED DAMAGE IN *CAPSICUM ANNUM*

Sandra Macias-Benitez, Angel Orts, Pablo Caballero, Manuel Tejada, Angélica Castaño and Juan Parrado*

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Seville, Spain

ABSTRACT

Ozone is a destructive pollutant, damaging crops, and decreasing crop yield. Therefore, there is great interest in finding strategies to alleviate ozone-induced crop losses. In plants, ozone enters at leaves through the stomata and is immediately degraded into reactive oxygen species (ROS), producing ROS stress in plants. ROS stress can be controlled by ROS-scavenging systems that include enzymatic or non-enzymatic mechanisms. Our research group has developed an enzymatic extract product derived from okara, a by-product rich in bioactive molecules that acts as an antioxidant compound, which is water-soluble and preserves all the properties and improves the solubility of proteins and the antioxidant components of okara. The beneficial properties of okara have been already demonstrated in animal nutrition. However, to date, okara has not been used as a protective agent against oxidative damage in agricultural fields. The main goal of this study was to investigate the ability of okara to be used as a biostimulant by preventing oxidative damage in plants, after ozone exposure. To perform this investigation, pepper plants (*Capsicum annuum*) exposed to ozone were treated with the okara enzymatic extract (OEE). Results showed that the okara extract protects against the ozone-induced damage, as revealed by net photosynthetic rate and the content of photosynthetic pigments, and prevents the lipid oxidation processes in leaves. Taken together, these results support that OEE protects plants against ozone exposure and its use as a new biostimulant is proposed.



INTRODUCTION

Ozone (O₃) is a destructive pollutant with negative effects on human and ecosystem health that induces abiotic stress in plants – affecting photosynthetic carbon assimilation, stomatal conductance, and plant growth – that damages crops and decreases crop yield (Ainsworth et al., 2012). In plants, O₃ enters through the stomata and is degraded into secondary reactive oxygen species (ROS), including H₂O₂, O₂ and HO, in the apoplastic space (Vainonen and Kangasjärvi, 2015). High levels of ROS can lead to ROS stress that causes direct or indirect ROS-mediated damage on a variety of molecules including lipid peroxidation in cellular membranes, protein denaturation, carbohydrate oxidation, and pigment breakdown (Sharma et al., 2012).

Studies on the effect of O₃ on agricultural productivity showed an estimated 5–15% crop yield loss in the United States (Avnery et al., 2011) and a 5% in Europe (Mills et al., 2007). To alleviate the drop in crop productivity, the main defense strategy over the past four decades has been the application of chemicals, mainly synthetic antioxidants (fungicides, insecticides, herbicides, nematocides, growth regulators, antitranspirants, antioxidants from the rubber industry, etc.) (Didyk and Blum, 2010). These xenobiotic products have varied protection capacity with some producing ineffective or even detrimental side effects. The most effective product was found to be EDU (ethylene diurea–(N-[2-(2-oxo-1-imidazolidinyl) ethyl]-N0 phenylurea), developed by the duPont Chemical company (Archambault et al., 2000) whose main mechanism of action is not clear yet. Currently, more effective alternatives are being sought, such as extracts of plant origin, which do not generate environmental toxicity.

The soy pulp, also called okara, is the insoluble by-product obtained during the production of soymilk and tofu. Despite its high content in proteins, fats, carbohydrates (including fiber), phytochemicals and minerals (Redondo-Cuenca et al., 2008; Villanueva-Suarez et al., 2013), its low solubility hampers the use in food or agricultural industry. Using enzymatic technology, our group has developed a process that enables obtaining a stable, water-soluble okara enzymatic extract (OEE), rich in isoflavones, mainly aglycones, and bioactive peptides with higher antioxidant potency than the original



source (Orts et al., 2019). Its high content in bioactive compounds, lead us to consider the use of okara as a biostimulant in agriculture. To this end, we propose studying the role of okara in plant protection against abiotic stress mediated by ROS, specifically in O₃ exposure.

We chose pepper plants (*Capsicum annuum*) since pepper is a vegetable crop of great agricultural and economic importance being the second most traded spice in the world. Heavy losses in pepper production are frequently caused by abiotic stresses including O₃ exposition, in fact *Capsicum* pepper cultivation is almost entirely located in regions where O₃ concentration is increasing to phytotoxic levels (Bortolin et al., 2016). For these reasons pepper plants are an interesting research target to evaluate the negative effects of O₃. Pepper plants exposed to O₃ were treated with OEE and specific functional parameters were analyzed. Treatment with OEE protected against lipid peroxidation as revealed MDA values and improved physiological parameters, such as net photosynthetic rate and photosynthetic pigments content in plants exposed to with O₃.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of enzymatic extract of Okara

The okara (by-product of the production of soy milk) was provided by Soria Natural S.L. (Soria, Spain). Okara was processed by enzymatic hydrolysis using a hydrolytic enzyme, Subtilisin from Biocon (EC 3.4.21.62). This enzyme is an endoprotease widely used in industry as a hydrolytic agent. The enzymatic hydrolysis process was carried out in a bioreactor at temperature (55 °C), controlled pH (pH 9) for 24h, using the pH-stat method (Parrado et al., 2006). Next, a separation was carried out by centrifugation at 9000 rpm, 4 °C for 30 min. Finally, a soluble phase, rich in nutrients and bioactive compounds, was obtained and concentrated in a rotary evaporator (Büchi R-200) until reaching a density of 1.2 g/ml.



Analysis of the chemical composition of okara

The chemical composition of the okara used was analyzed by the Spanish Association for Standardisation and Certification (AENOR) laboratory (Madrid, Spain).

The ash content was analysed according to standard AOAC methods (2016). The protein load was determined using the Kjeldahl procedure (AOAC, 2016) and multiplying the total nitrogen content in a protein by the conversion factor 5.80, which is applicable to most plant proteins.

Crude fat was determined gravimetrically after extraction with hexane for 12 h in a Soxhlet extractor (Clemente et al., 1997). Total soluble carbohydrates were determined after extraction with a mixture of ethanol/water (2/3) for 2 h. After centrifugation at 4,000 g (MiniSpin, Eppendorf), the supernatant was filtered through a no. 1 Whatman paper and total soluble sugars were estimated colorimetrically at 490 nm (GeneQuant 1300, General Electric) by the phenol-sulphuric acid method, using a standard curve of glucose (Dubois et al., 1956).

Organic matter was determined by the dry combustion method (MAPA, 1986).

Analysis of the molecular weight of soluble proteins

The protein content of the soluble fraction of okara was studied by size-exclusion chromatography using an ÄKTA-purifier FPLC system (GE Healthcare), filtration chromatography and a Superdex Peptide 10/ 300GL column, with an exclusion range between 700 and 10,000 Da that discriminates free peptides and amino acids. Samples were centrifuged at 12,000 g for 30 min at room temperature (MiniSpin, Eppendorf) to remove insoluble molecules, and the supernatant was passed through a 0.2 µm filter and loaded into a 0.1 mL loop connected to an ÄKTA-purifier system. The column was equilibrated and eluted with 0.25 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) in isocratic mode, at a flow-rate of 0.5 mL/min, and proteins/peptides were detected at 280 and 215 nm with a GE Healthcare UV900 module coupled to the column elution.



Analysis of isoflavones by UHPLC-MS/MS

Isoflavones were analyzed using a Thermo Scientific liquid chromatography system consisting of a quaternary UHPLC Dionex Ultimate 3000 SD, connected to a quadrupole-Orbitrap Qexactive hybrid mass spectrometer with HESI ionization probe. Xcalibur software was used for instrument control and data acquisition. Separation was performed on a C18 column Xbridge BEH (2.1-100 mm, 2.5 μ m) (Waters). The injection volume was 5 μ L and the flow rate was 0.4 mL/min. Two different solvents were used as mobile phase: solvent A (water with 0.1% formic acid) and solvent B (acetonitrile with 0.1% formic acid). The following gradient was used: 0–1 min 5% of solvent B, 1–10 min from 5% to 100% of solvent B, 10–12 min 100% of solvent B, then 5% of solvent B up to 15 min. The Parallel Reaction Monitoring (PRM) was acquired in positive mode and a resolution of 17500 at m/z 200 FWHM, with an isolation window of 1 m/z.

The HESI source parameters were as follows: spray voltage 3.5 kV, Slens level 50, capillary temperature of 320 C and probe heater temperature of 400 C, sheath flow, auxiliary flow and sweep gas flow (N₂) of 50, 13 and 2 arbitrary units, respectively.

Plant treatment

Pepper plants were grown in a phytoclimatic chamber at 18-22°C and 50% humidity, in different pots with commercial organic substrate (Gramoflor GmbH und Co., KG.) and Osmocote ® (NPK 15-9-12), irrigation with tap water and photoperiods of 16 h of light (1200 μ mol.m⁻² . s⁻¹)/8 h of darkness. After 8 days, 18 plants were selected with different treatments, control plants (C), plants treated with OEE, control plants under O₃ exposure (C + O₃), and plants treated with OEE under O₃ exposure (Okara +O₃).

The plants were treated with OEE 0.1% w/v four times for 5 days. Control plants were treated with distilled water. After 5 days of treatment, the C+O₃ and Okara+O₃ plant samples were transferred to a phytoclimatic chamber, adapted with an O₃ generator (Zonosystem GM 5000 O3 Generator), to be fumigated at a concentration of 100ppB of O₃ for 6h. After 24 h of treatment, different foliar samples were taken from each plant and the different analyzes described later were carried out.



Determination of lipid peroxidation

Lipid peroxidation in leaves was determined after assessing malondialdehyde (MDA) content by applying reactive substances to thiobarbituric acid (Esterbauer and Cheeseman, 1990). 1 g of leaf samples were mixed with 2 ml of 0.1% trichloroacetic acid. It was then centrifuged at 8,000 r.p.m. 8 min at 4 °C and the soluble phase was filtered through a 0.2mm aseptic filter. To the 0.3 ml of soluble sample, 0.9 ml of 20% TCA with a TAB content of 0.5% was added. They were then heated at 95 °C for 1 h and centrifuged at 10,000 r.p.m. 1min, to measure absorbance at 532 and 600 nm, calculating the MDA concentration by subtracting the non-specific absorption at 600 nm from that at 532 nm using the 156 nm absorbance extinction coefficient. Finally, the results were expressed in $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ of fresh weight (FW).

Physiological Status in Plants

Determination of Net Photosynthetic Rate

Twenty-four hours after the last ozone treatment, the net photosynthetic rate (AN) was measured in plants using an IRGA (LI-6400XT, LI-COR Inc., Nev., EEUU) with a light chamber for the leaf (Li-6400-02B, Li-Cor Inc.). Measurements ($n = 20$) were performed between 10 a.m. and 2 p.m. hours under a photosynthetic photon flux density of $1500 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, a deficit of vapor pressure of 2–3 kPa, a temperature around 25 °C, and a CO_2 concentration environment of $400 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ air. Each measurement was recorded after the stabilization of the exchange of gases was equilibrated (120 s).

Chlorophyll content

The chlorophyll content was determined using the methodology of (Hiscox and Israelstam, 1979), being 50 mg of leaves homogenized in acetone at 100 % (v/v) and saline solution at 0.9 % (p/v). The total content was determined by absorbance at 652 nm, using the absorbance extinction coefficient $34.5 \text{ cm}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ (Arnon, 1949):

$$\text{Abs } 652 \text{ nm} = [\text{chlorophyll}] \cdot 34.5 \text{ cm}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}.$$



Delayed Fluorescence Measurements

Delayed fluorescence (DF) was detected using a plant imaging system (NightShade LB 985, Berthold Technologies, Germany) equipped with a deeply cooled CCD camera according to López-Jurado et al. (2020). From plants of each treatment, 2–3 intact leaves of approximately the same size were separated and placed in the plant imaging system. The leaves were illuminated for 20 s with light supplied from far red (730 nm), red (660 nm), green (565 nm), and blue (470 nm) LED panels at 2, 105, 40, and 110 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, respectively. Immediately after the LEDs were turned off, DF was measured, and the recorded intensities of light were converted to counts per second (cps). Data were then normalized to each leaf area to obtain comparable cps values across treatments.

RESULTS AND DISCUSSION

Okara Enzymatic extract

The enzymatic process of obtaining OEE from okara bran by using subtilisine has been previously shown by our group (Orts et al., 2019). The chemical composition of dried okara and OEE is shown in Table 1. Briefly, proteins are the main components of both, dry okara and OEE are proteins (41.25% and 66.54% respectively). Carbohydrates comprised nearly 30% of the total dry weight in dried okara and for the most part were insoluble fiber. Carbohydrates in OEE comprises 21.4% but insoluble and soluble fiber are in similar proportion (5.1% and 4.9% respectively). On the other hand, fats accounted nearly one fourth of the total weight (23.6%) in dried okara but only 2.2% in OEE.

Enzymatic process solubilizes and hydrolyzes the initial insoluble proteins in okara (Table 1), reducing the size of original proteins to soluble peptides (Table 2). Proteins with a molecular weight greater than 10 kDa decreased from 91.14% to only 7.85%, while the small protein/peptide (1–10 kDa) and small peptide/amino acid (<1 kDa) fractions increased from 1.09% to 15.87% and 6.98%–75.74%, respectively.



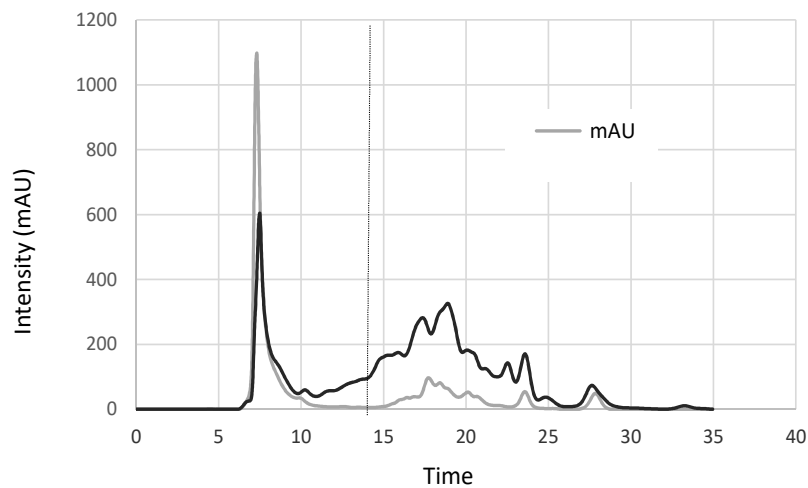
The whole amino acid composition of dried okara (which includes both soluble and insoluble protein content) was further analyzed. Branched-chain amino acids (BCAA) represented 15% of the total, and aromatic amino acids summed a 6% and most remarkably, hydrophobic amino acids counted for around one third of all amino acids detected.

This process also led to the solubilization of hydrophobic compounds as bioactive metabolites. The protease treatment solubilized and extracted the isoflavones, which are hydrophobic bioactive compounds. Table 3 shows the total amount of isoflavones, as well as aglycones (daidzein, genistein and glycitein), β -glucosides (daidzin, genistin and glicitin), and acetyl and malonyl derivatives extracted from okara, before and after enzymatic treatment. Values show a high increase in OEE for aglycones (daidzein, genistein and glycitein), the β glucosides daidzin and genistin, and for total isoflavones. The higher recovery of aglycones is important since they are considered to be the most bioactive forms of isoflavone.



OKARA	Dried okara	Protease extraction
Moisture (%)	0.0	0.0
Dry matter (%)	100.0	100.0
C (%)	53.7	44.81
N (%)	6.60	10.64
C/N	8.13	4.21
Proteins (%N x 6.25)	41.25	66.54
Insoluble proteins	36.88	0.0
Soluble proteins	4.40	100.0
Carbohydrates (%)	29.5	21.4
Insoluble fiber	26.0	5.1
Soluble fiber	2.8	4.9
Starch	0.46	0.50
Fats (%)	23.6	2.2
Ashes (%)	4.05	6.59
Macroelements (g/100 g)		
K	0.91	1.71
P	0.65	1.12
Na	0.37	0.61
Mg	0.21	0.40
Ca	0.18	0.29
Microelements (mg/100 g)		
Fe	1.3	10.2
Mn	1.1	7.2
Zn	0.6	4.7
Cu	0.3	0.4

Table 1: Chemical composition of okara and protease extract



Graphic 1: Chromatography molecular exclusion. Superdex Peptide 10/300GL.



Molecular weight (Da)	Water extraction (%)	Protease extraction (%)
>10,000	91.14 ± 1,2	7.85 ± 0,4
10,000-5,000	1.09 ± 0,6	15.87 ± 0,7
5,000-1,000	0.80 ± 1,0	0 ± 0,1
<1,000	6.98 ± 0,7	75.74 ± 0,7

Table 2. Distribution of the soluble protein content of okara according to its molecular weight using a Superdex Peptide 10/300GL column.

	Control	OEE
Daidzein	0,71 ± 0,1	77,48 ± 5,4
Genistein	0,31 ± 0,0	82,29 ± 6,6
Glicitein	0,68 ± 0,0	15,06 ± 1,7
Daidzin	65,93 ± 10,02	176,66 ± 11,7
Genistin	59,34 ± 12,4	300,03 ± 21,1
Glicitin	9,33 ± 2,0	5,01 ± 0,8
Acetyl Daidzin	1,0 ± 0,0	0,00
Acetyl Genistin	0,90 ± 0,0	0,00
Acetyl Glicitin	0,12 ± 0,0	0,00
Malonyl Daidzin	80,09 ± 1,1	0,08 ± 0,0
Malonyl Genistin	112,25 ± 12,9	105,39 ± 9,8
Malonyl Glicitin	8,31 ± 0,3	1,40 ± 0,4
Sume	338,97 ± 38,9	763,40 ± 57,5

Table 3: Isoflavones content in okara and hydrolyzed okara extract (µg/g dry okara).

Physiological Status in Plants

After the experiments, the physiological status in pepper plants was determined by assaying diverse parameters, such as net photosynthetic rate, chlorophyll content, and DF. The net photosynthetic rate was significantly affected by O₃ exposure (Figure 1A). This decrease was recovered by 88% in the plants exposed to O₃ and treated with OEE. It should be noted that after



the treatments with OEE plants showed similar values to the control plants indicating that the OEE does not interfere with the photosynthesis.

Regarding to total chlorophyll content, leaves of control plants treated with ozone showed 4.6-folds less content of total chlorophyll than non O₃-exposed control plants (Figure 1B). Despite OEE treatment did not fully recover the decrease of total chlorophyll under O₃ conditions, this treatment improved this content by 70%. (Figure 2)

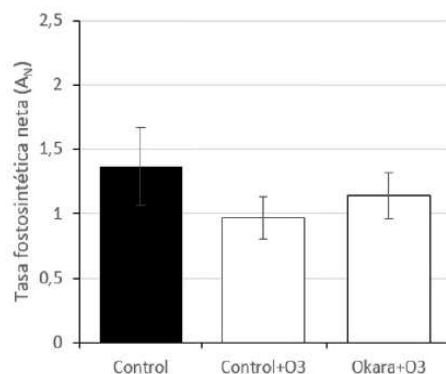


Figure 1(A): Net photosynthetic rate

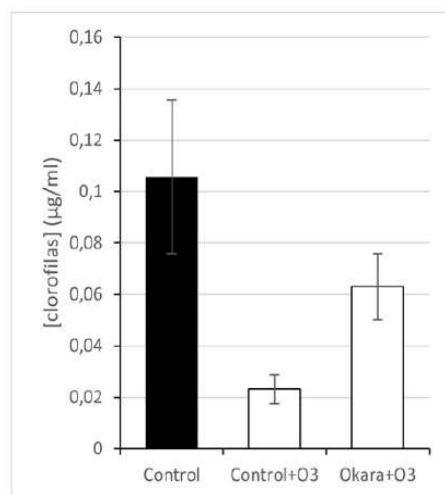


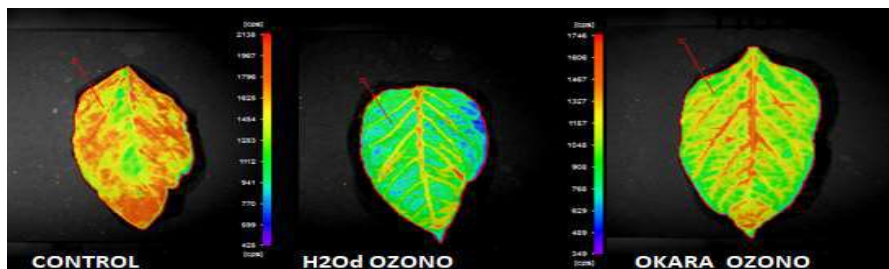
Figure 1(B): Total chlorophyll content

FIGURE 1 | Physiological parameters. (A) Net photosynthetic rate (AN) and (B) total chlorophyll content in pepper plants in response to two conditions of ozone (O₃) (0 and 100 ppm) under a treatment without and with okara enzymatic extract (OEE). Values represent mean SD, n = 5.



To monitor plant stress status DF, closely related to photosynthetic reactions and chlorophyll content, was also measured (Zhang et al., 2019). O₃ exposure produced a significant decrease in DF emissions in both, control plants and plantas treated with OEE, being the lowest values found in control plants. Thus, again, OEE prevented the stress status induced by O₃. The lowest measurements were detected in untreated, O₃-fumigated plants, and the okara and okara + O₃ plants showed a less substantial decrease in DF emissions than the C + O₃ plants (Figures 2A, B). Although O₃ also produced a loss of DF signals in the okara-treated plants, this decrease was much less marked compared to C + O₃ plants, highlighting a lower stress state of these plants.

These results suggest that OEE protects plants against photosynthetic damages by O₃ exposure and maintain the physiological status of plants under these conditions. With the naked eye, although with less significant differences, we could also observe the attenuation of the visible foliar symptoms caused by ozone in the plants treated with okara before ozonization. C+O₃ plants showed a more widespread chlorosis, as well as the appearance of small brown spots that were not present on OEE + O₃ plants.



Foliar tratment with ozone and OEE + ozone by nightshade LB985 in vivo Plant Imaging Image System Berthold



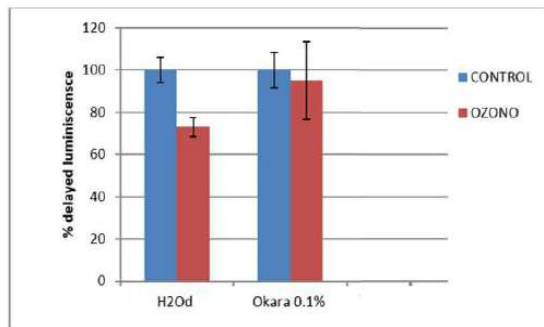


FIGURE 3: Delayed fluorescence in leaves of pepper plants in response to two conditions of ozone (O_3) (0 and 100 ppm) under a treatment without and with okara enzymatic extract (OEE). (A) Counts per second (cps) values for each treatment. Values represent mean \pm SD, n = 5. Different letters indicate means that are significantly different from each other (two-way ANOVA, O_3 exposition x OEE treatment; HSD test, $P < 0.05$).

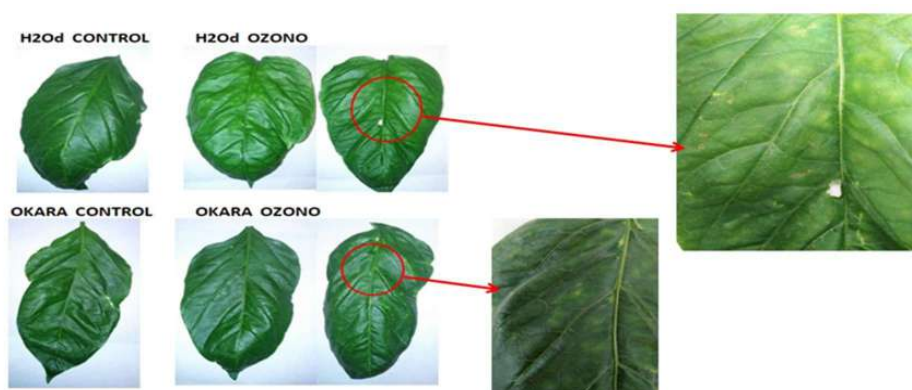


Image 2: Morphological changes in leaves after Ozone exposition

Oxidative stress level in plants

As a cue of ozone-induced oxidative stress, lipid peroxidation was evaluated. For that the content of MDA, commonly used as a marker of oxidative stress (Oszlányi et al., 2020), was measured in leaf samples. Higher concentrations of MDA were recorded in the C+ O_3 plants, which presented a significant increase in MDA content compared to controls (Figure 4). On the other hand, the plants sprayed with OEE showed similar levels of lipid peroxidation to those of the control plants, showing the protective effect of okara treatment against oxidative stress caused by O_3 exposure.



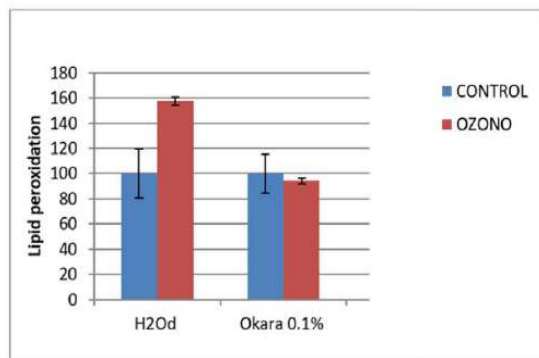


FIGURE 4: Malondialdehyde concentration (MDA) (A) and oxidative stress index (OSI) (B) in leaves of pepper plants in response to two conditions of ozone (O₃) (0 and 100 ppm) under a treatment without and with rice bran enzymatic extract (OEE). Values represent mean \pm SD, n = 5. Different letters indicate means that are significantly different from each other (two-way ANOVA, O₃ exposition okara treatment; HSD test, P < 0.05). O₃ exposition, OEE treatment, and O₃ exposition x OEE treatment in the corner of the panels indicate main or interaction significant effects (*P < 0.01; **P < 0.001)

DISCUSSION

Biostimulants have been defined as “formulated products of biological origin that improve plant productivity as a consequence of the novel, or emergent properties of the complex of constituents, and not as a sole consequence of the presence of known essential plant nutrients, plant growth regulators, or plant protective compounds” (Yakhin et al., 2017). Present results show a new product, an enzymatic extract from okara that protects against O₃-induced damage. According to the OEE antioxidant capacity described previously by our group (Orts et al., 2019), we have selected an acute O₃ treatment as an abiotic stressor. O₃ is degraded in the apoplast into secondary ROS (Vainonen and Kangasjärvi, 2015) and high levels of ROS can lead to ROS stress that induces the enzymatic and non-enzymatic-systems that protect cells from ROS (Sachdev et al., 2021).

O₃ treatment induces a decrease in net photosynthetic rate, chlorophyll content, and DF in pepper leaves, which was partially reversed after foliar treatment with OEE. Thus, we propose that OEE may exert a biostimulant effect on pepper plants mainly based on its bioactive compounds.

Present results show a notable total antioxidant capacity as revealed by MDA values. OEE is rich in prominent bioactive molecules that may contribute to



its antioxidant capacity, such as protein hydrolyzates, including bioactives peptides, or isoflavones.

OEE main component are protein hydrolyzates (PHs). PHs exhibit different antioxidant and free radicals scavenging activities (Li et al., 2008), mainly conferred by some nitrogenous compounds contained therein such as glycine, betaine, and proline (du Jardin, 2015). Moreover, the amino acid content of OEE shows prevalence of hydrophobic amino acids that has been related to antioxidant properties of bioactives peptides (Kitts and Weiler, 2003; Puchalska et al., 2017; samardi and Ismail, 2010; Zhand et al., 2012).

PHs have shown an ability to enhance antioxidant mechanisms in plants (Gurav and Jadhav, 2013). It is worth noting that PHs, mainly those resulting from the enzymatic hydrolysis of protein substrates into low molecular weight peptides and free amino acids, have shown multiple biostimulant capabilities. Protein hydrolysates are included within the biostimulant classification (du Jardin, 2015). The direct effects in plants include modulating N uptake and assimilation, acting on signaling pathways in the root, regulating enzymes involved in this process (du Jardin, 2015), possessing hormonal activity similar to auxin and gibberellin (Colla et al., 2014), and producing antioxidant activity (Li et al., 2008; Gurav and Jadhav, 2013).

In addition, when applied to soils, PHs have shown indirect effects on plant growth and nutrition by increasing the availability of nutrients and their acquisition by the roots – enhancing the microbial activity and biomass of the soil, soil respiration, and their fertility in general (du Jardin, 2015; Rodríguez-Morgado et al., 2015).

Regarding to phytochemical components, that also contribute to OEE antioxidant activity, the most abundant are isoflavones. Isoflavones have hydrophobic interactions with the proteins where they are embedded, and in this sense, it has been described a direct correlation between the solubilization of proteins and isoflavones in okara (Jankowiak et al., 2014a; Orts et al., 2019), suggesting the idoneity of proteolytic treatments for isoflavone recovery.

Isoflavones are most notable functional component of soy, exhibiting antioxidant activity while preventing plant-related diseases (e.g.,



antimicrobial and antiherbivore activities) and having positive effects on the life quality of plants (Kim, 2022). It has been described that genistein and genistin, both of them abundant in OEE, have the highest antioxidant activities of all soy isoflavones (Lee et al., 2005).

In conclusion, OEE, an enzymatic extract of plant origin, reversed the O₃-induced decrease in physiological parameters as net photosynthetic rate, chlorophyll content, and DF in pepper plants. Thus, the results of our study highlight the potential use of okara as an effective biostimulant plant protector against oxidative stress caused by O₃, and it could be considered that we contribute to the general efforts done in the last decade searching new non-chemical alternative products to protect crops against damages caused by environmental oxidative stress.

BIBLIOGRAPHY

Ainsworth, E. A., Yendrek, C. R., Sitch, S. S., Collins, W. J. C., and Emberson, L. D. (2012). The effects of tropospheric ozone on net primary productivity and implications for climate change. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 637–661. doi: 10.1146/ANNUREV-ARPLANT-042110-103829

AOAC International, 2016. *Official Methods of Analysis*, twentieth ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

Archambault, D. J., Archambault, D. J., Slaski, J. J., and Li, X. (2000). Ozone protection in plants: the potential use of chemical protectants to measure atmospheric oxidant damage in Alberta crops. Edmonton: Alberta Environment. doi: 10.5962/bhl.title.115607

Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1–15. doi: 10.1104/PP.24.1.1

Avnery, S., Mauzerall, D. L., Liu, J., and Horowitz, L. W. (2011). Global crop yield reductions due to surface ozone exposure: 2. Year 2030 potential crop production losses and economic damage under two scenarios of O₃ pollution. *Atmos. Environ.* 45, 2297–2309. doi: 10.1016/J.ATMOENV.2011.01.002

Bortolin, R. C., Caregnato, F. F., Divan Junior, A. M., Zanotto-Filho, A., Moresco, K. S., de Oliveira Rios, A., et al. (2016). Chronic ozone exposure alters the secondary metabolite profile, antioxidant potential, anti-inflammatory property, and quality of red pepper fruit from *Capsicum baccatum*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 129, 16–24. doi: 10.1016/J.ECOENV.2016.03.004

Clemente, A., Sanchez-Vioque, R., Vioque, J., Bautista, J., Millan, F., 1997. Chemical composition of extracted dried olive pomaces containing two and three phases. *Food Biotechnol.* 11 (3), 273–291.



Colla, G., Roupael, Y., Canaguier, R., Svecova, E., and Cardarelli, M. (2014). Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Front. Plant Sci.* 5:448. doi: 10.3389/fpls.2014.00448

Didyk, N. P., and Blum, O. B. (2010). Natural antioxidants of plant origin against ozone damage of sensitive crops. *Acta Physiol. Plant* 33, 25–34. doi: 10.1007/S11738-010-0527-5

du Jardin, P. 2015. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic.* 196, 3–14. doi: 10.1016/J.SCIENTA.2015.09.021

Esterbauer, H., and Cheeseman, K. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 186, 407–421. doi: 10.1016/0076-6879(90)86134-H

Gurav, R. G., and Jadhav, J. P. (2013). A novel source of biofertilizer from feather biomass for banana cultivation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 4532–4539. doi: 10.1007/s11356-012-1405-z

Hiscox, J. D., and Israelstam, G. F. (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.* 57, 1332–1334. doi: 10.1139/b79-163

Jankowiak, L., Kantzas, N., Boom, R., Van der Goot, A.J., 2014. Isoflavone extraction from okara using water as extractant. *Food Chem.* 160, 371–378.

Kangasjärvi, J., Jaspers, P. and KOLLIST, H. (2005), Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant, Cell & Environment*, 28: 1021-1036. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01325.x>

Kim IS. 2022. Current perspectives on the beneficial effects of soybean isoflavones and their metabolites on plants. *Food Sci Biotechnol.* 5;31(5):515-526. doi: 10.1007/s10068-022-01070-7. PMID: 35529690; PMCID: PMC9033921.

Kitts, D.D., Weiler, K., 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr. Pharmaceut. Des.* 9 (16), 1309–1323.

Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., and Liu, J. 2008. Antioxidant and free radicalscavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chem.* 106, 444–450. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.04.067

López-Jurado, J., Balao, F., and Mateos-Naranjo, E. 2020. Polyploidy-mediated divergent light-harvesting and photoprotection strategies under temperature stress in a Mediterranean carnation complex. *Environ. Exp. Bot.* 171:103956. doi: 10.1016/J.ENVEXPBOT.2019.103956

MAPA, 1986. *Métodos oficiales de análisis*, 1a ed. Secretaría General Técnica del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, España, pp. 221–285.

Mills, G., Buse, A., Gimeno, B., Bermejo, V., Holland, M., Emberson, L., et al. 2007. A synthesis of AOT40-based response functions and critical levels of ozone for agricultural and horticultural crops. *Atmos. Environ.* 41, 2630–2643. doi: 10.1016/J.ATMOSENV.2006.11.016

Orts, A., Revilla, E., Rodríguez-Morgado, B., Castaño, A., Tejada, M., Parrado, J., García-Quintanilla, A. 2019. Protease technology for obtaining a soy pulp extract enriched in bioactive compounds: isoflavones and peptides, *Heliyon*, Volume 5, Issue 6, e01958, ISSN 2405-8440.

Oszlányi, R., Mirmazloum, I., Pónya, Z., Szego, A., Jamal, S., Bat-Erdene, O., et al. (2020). Oxidative stress level and dehydrin gene expression pattern differentiate two contrasting



cucumber F1 hybrids under high fertigation treatment. *Int. J. Biol. Macromol.* 161, 864–874. doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2020.06.050

Parrado J, Miramontes E, Jover M, et al. 2006. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. *Food Chem.* 98:742–748.

Pérez-Palacios, P., Agostini, E., Ibáñez, S. G., Talano, M. A., Rodríguez-Llorente, I. D., Caviedes, M. A., et al. (2017). Removal of copper from aqueous solutions by rhizofiltration using genetically modified hairy roots expressing a bacterial Cu-binding protein. *Environ. Technol.* 38, 2877–2888. doi: 10.1080/09593330.2017.1281350

Puchalska, P.M., García, M.C., Marina, M.L., 2017. Advances in the determination of bioactive peptides in foods. In: Aguilar, V., Otero, C. (Eds.), *Frontiers in Bioactive Compounds*. Bentham Science Publishers, Sharjah, UAE, pp. 24–53.

Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M.J., Mateos-Aparicio, I., 2008. Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and Englyst methods. *Food Chem.* 108, 1099–1105.

Rodríguez-Morgado, B., Gómez, I., Parrado, J., García-Martínez, A. M., Aragón, C., and Tejada, M. 2015. Obtaining edaphic biostimulants/biofertilizers from different sewage sludges. Effects on soil biological properties. *Environ. Technol.* 36, 2217–2226. doi:10.1080/09593330.2015.1024760

Sachdev, S., Ansari, S. A., Ansari, M. I., Fujita, M., and Hasanuzzaman, M. 2021. Abiotic Stress and Reactive Oxygen Species: generation, Signaling, and Defense Mechanisms. *Antioxidants* 10:277. doi: 10.3390/ANTIOX10020277

Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., and Pessarakli, M. 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *J. Bot.* 2012:217037. doi: 10.1155/2012/217037

Vainonen, J. P., and Kangasjärvi, J. (2015). Plant signalling in acute ozone exposure. *Plant Cell Environ.* 38, 240–252. doi: 10.1111/PCE.12273

Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., Yakhin, I. A., and Brown, P. H. 2017. Biostimulants in plant science: a global perspective. *Front. Plant Sci.* 7:2049. doi: 10.3389/fpls.2016.02049

Villanueva-Suárez, M.J., Pérez-Cózar, M.L., Redondo-Cuenca, A., 2013. Sequential extraction of polysaccharides from enzymatically hydrolyzed okara byproduct: physicochemical properties and in vitro fermentability. *Food Chem.* 141 (2), 1114–1119.

Zhang, Y., Fu, Y., Fan, J., Li, Q., Francis, F., and Chen, J. 2019. Comparative transcriptome and histological analyses of wheat in response to phytotoxic aphid *Schizaphis graminum* and non-phytotoxic aphid *Sitobion avenae* feeding. *BMC Plant Biol.* 19:547. doi: 10.1186/S12870-019-2148-5



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

4. RESULTADOS Y DISCUSION

El ozono se considera el contaminante del aire más importante en áreas no urbanas y el más importante, que afecta la salud humana y la vegetación [12]. Utilizando tecnología enzimática y/o fermentativa, el grupo de investigación de la Universidad de Sevilla (AGR212) ha desarrollado productos con capacidad bioestimulante a partir de subproductos de la industria alimentaria [13]. La capacidad bioestimulante implica, entre otras propiedades, la capacidad de proteger frente a situaciones de estrés abiótico [14]. Entre los estresores abióticos, tienen especial relevancia aquellos que implican estrés oxidativo, como los niveles elevados de ozono.

Teniendo en cuenta la relevancia de la agricultura en los países mediterráneos con alto nivel de ozono troposférico, existe un interés emergente en la búsqueda de estrategias de protección para evitar los daños descritos anteriormente.

Los bioestimulantes han sido definidos como “un producto formulado de origen biológico que mejora la productividad vegetal como consecuencia de las propiedades nuevas o emergentes del complejo de constituyentes, y no como consecuencia única de la presencia de nutrientes vegetales esenciales conocidos, reguladores del crecimiento vegetal , o compuestos protectores de plantas” [15]. Los resultados actuales muestran un nuevo producto, un extracto enzimático de okara (OEE) que protege contra el daño inducido por ozono. El tratamiento con ozono induce una disminución en la tasa fotosintética neta, el contenido de clorofila y la fluorescencia retardada (DF) en las hojas de pimiento, que se revirtió parcialmente tras el tratamiento foliar con okara. Por lo tanto, podemos proponer que el okara puede ejercer un efecto bioestimulante en las plantas de pimiento basado principalmente en sus compuestos bioactivos. El OEE, muestra una notable capacidad antioxidante total y ha sido evaluado como una potente actividad antioxidante [16]. El OEE es rico en moléculas bioactivas prominentes. Muchos componentes del extracto pueden contribuir a su capacidad antioxidante. El principal componente de los OEE son péptidos con elevado contenido de aminoácidos hidrofóbicos, curiosamente, la prevalencia de aminoácidos



hidrofóbicos en péptidos bioactivos se ha relacionado con sus propiedades antioxidantes [17,18].

El componente principal del extracto enzimático de OEE son los hidrolizados de proteínas (PHs). Los PHs exhiben diferentes actividades antioxidantes y de eliminación de radicales libres, conferidas principalmente por algunos compuestos nitrogenados contenidos en ellos, como la glicina, la betaína y la prolina [14]. Además, los PHs han demostrado tener la capacidad de mejorar los mecanismos antioxidantes en las plantas [21]. Cabe señalar que los PHs, principalmente los resultantes de la hidrólisis enzimática de sustratos proteicos en péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres, han mostrado múltiples capacidades bioestimulantes. Los hidrolizados de proteínas se incluyen dentro de la clasificación de bioestimulantes [14]. Los efectos directos en las plantas incluyen la modulación de la absorción y asimilación de nitrógeno, actuando sobre las vías de señalización en la raíz, regulando las enzimas involucradas en este proceso [14], poseyendo una actividad hormonal similar a la auxina y la giberelina [22], y produciendo actividad antioxidante [21].

Además, cuando se aplican a los suelos, los PHs han mostrado efectos indirectos sobre el crecimiento y la nutrición de las plantas al aumentar la disponibilidad de nutrientes y su adquisición por parte de las raíces, mejorando la actividad microbiana y la biomasa del suelo, la respiración del suelo y su fertilidad en general [23,24].

De acuerdo con la capacidad antioxidante de la OEE, hemos seleccionado un tratamiento agudo con ozono como estresor abiótico. El Ozono se degrada en el apoplasto en ROS secundarias [25] y los niveles altos de ROS pueden provocar estrés por ROS que induce los sistemas enzimáticos y no enzimáticos que protegen a las células de las ROS [26].

Por lo tanto, los resultados de nuestro estudio destacan el uso potencial de los bioestimulantes de okara, como un protector vegetal eficaz contra el estrés oxidativo causado por el ozono.

El OEE es un nuevo producto natural con capacidad bioestimulante frente al estrés oxidativo ambiental, con uso potencial en la formulación de productos protectores contra los daños causados del ozono en la agricultura.



5. CONCLUSIONES

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

5. CONCLUSIONES

La potencia bioestimulante del OEE frente en el estrés ambiental por ozono ha sido evaluada en plantas.

- El OEE revirtió la disminución de parámetros fisiológicos inducida por ozono en plantas de pimiento, como la tasa fotosintética neta, contenido de clorofila y evaluación de la DF directamente en hoja.
- El OEE detuvo la oxidación de biomoléculas en hojas, específicamente la oxidación de los lípidos.
- El OEE tiene el uso potencial como bioestimulante eficaz contra el estrés oxidativo causado por el O₃, siendo un protector vegetal alternativo de los cultivos frente a los daños causados por el estrés oxidativo ambiental.



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

6. BIBLIOGRAFÍA

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

6. BIBLIOGRAFIA

1. Chaves-Barrantes, N.F.; Gutiérrez-Soto, M.V.; Chaves-Barrantes, N.F.; Gutiérrez-Soto, M.V. Respuestas Al Estrés Por Calor En Los Cultivos. I. Aspectos Moleculares, Bioquímicos y Fisiológicos. *Agron. Mesoam.* 2017, 28, 237–253, doi:10.15517/AM.V28I1.21903.
2. Tai, A.P.K.; Martin, M.V.; Heald, C.L. Threat to Future Global Food Security from Climate Change and Ozone Air Pollution. *Nat. Clim. Chang.* 2014 49 2014, 4, 817–821, doi:10.1038/nclimate2317.
3. Heck, W.W.; Adams, R.M.; Cure, W.W.; Rawlings, J.O.; Heagle, A.S.; Heggstad, H.E.; Kohut, R.J.; Kress, L.W.; Taylor, O.C. A Reassessment of Crop Loss from Ozone. *Environ. Sci. Technol.* 1983, 17, 573–581, doi:10.1021/ES00118A716.
4. Heath, R.L.; Taylor, G.E.J. Physiological Processes and Plant Responses to Ozone Exposure. *For. decline ozone a Comp. Control. Chamb. F. Exp.* 1997, doi:10.3/JQUERY-UI.JS.
5. Lamb, C.; Dixon, R.A. THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1997, 48, 251–275, doi:10.1146/ANNUREV.ARPLANT.48.1.251.
6. Schraudner, M.; Langebartels, C.; Sandermann, H.; Langebartels, M.; Sandermann, C.; Changes, H. 1997; Schraudner, M. Changes in the Biochemical Status of Plant Cells Induced by the Environmental Pollutant Ozone. *Physiol. Plant.* 1997, 100, 274–280, doi:10.1111/J.1399-3054.1997.TB04783.X.
7. Casano, L.M.; Martín, M.; Sabater, B. Sensitivity of Superoxide Dismutase Transcript Levels and Activities to Oxidative Stress Is Lower in Mature-Senescent Than in Young Barley Leaves. *Plant Physiol.* 1994, 106, 1033–1039, doi:10.1104/PP.106.3.1033.
8. Kangasjärvi, J.; Jaspers, P.; Kollist, H. Signalling and Cell Death in Ozone-Exposed Plants. *Plant. Cell Environ.* 2005, 28, 1021–1036, doi:10.1111/J.1365-3040.2005.01325.X.



9. Rich, S. Ozone Damage to Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2003, 2, 253–266, doi:10.1146/ANNUREV.PY.02.090164.001345.
10. Ormrod, D.P.; Adedipe, N.O. Protecting Horticultural Plants from Atmospheric Pollutants: A Review1. *HortScience* 1974, 9, 108–111, doi:10.21273/HORTSCI.9.2.108.
11. Manning, W.J.; Flagler, R.B.; Frenkel, M.A. Assessing Plant Response to Ambient Ozone: Growth of Ozone-Sensitive Loblolly Pine Seedlings Treated with Ethylenediurea or Sodium Erythorbate. *Environ. Pollut.* 2003, 126, 73–81, doi:10.1016/S0269-7491(03)00141-6.
12. Ashmore, M.R. Assessing the Future Global Impacts of Ozone on Vegetation. *Plant. Cell Environ.* 2005, 28, 949–964, doi:10.1111/J.1365-3040.2005.01341.X.
13. Parrado, J.; Miramontes, E.; Jover, M.; Gutierrez, J.F.; Collantes de Terán, L.; Bautista, J. Preparation of a Rice Bran Enzymatic Extract with Potential Use as Functional Food. *Food Chem.* 2006, 98, 742–748, doi:10.1016/J.FOODCHEM.2005.07.016.
14. du Jardin, P. Plant Biostimulants: Definition, Concept, Main Categories and Regulation. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 2015, 196, 3–14.
15. Yakhin, O.I.; Lubyantsev, A.A.; Yakhin, I.A.; Brown, P.H. Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Front. Plant Sci.* 2017, 7, 2049.
16. Orts, A.; Revilla, E.; Rodríguez-Morgado, B.; Castaño, A.; Tejada, M.; Parrado, J.; García-Quintanilla, A. Protease Technology for Obtaining a Soy Pulp Extract Enriched in Bioactive Compounds: Isoflavones and Peptides. *Heliyon* 2019, 5, e01958, doi:10.1016/J.HELIYON.2019.E01958.
17. Kitts, D.; Weiler, K. Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses Used in Isolation and Recovery. *Curr. Pharm. Des.* 2003, 9, 1309–1323, doi:10.2174/1381612033454883.
18. Puchalska, P.; Concepción García, M.; Luisa Marina, M. Identification of Native Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Peptides in



- Commercial Soybean Based Infant Formulas Using HPLC-Q-ToF-MS. *Food Chem.* 2014, *157*, 62–69, doi:10.1016/j.foodchem.2014.01.130.
19. Sarmadi, B.H.; Ismail, A. Antioxidative Peptides from Food Proteins: A Review. *Peptides* 2010, *31*, 1949–1956, doi:10.1016/J.PEPTIDES.2010.06.020.
 20. Zhang, S.; Shi, R.; Li, C.; Parivar, K.; Wang, D.D. Fixed Dosing versus Body Size-Based Dosing of Therapeutic Peptides and Proteins in Adults. *J. Clin. Pharmacol.* 2012, *52*, 18–28, doi:10.1177/0091270010388648.
 21. Gurav, R.G.; Jadhav, J.P. A Novel Source of Biofertilizer from Feather Biomass for Banana Cultivation. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2013, *20*, 4532–4539, doi:10.1007/S11356-012-1405-Z.
 22. Colla, G.; Roupael, Y.; Canaguier, R.; Svecova, E.; Cardarelli, M. Biostimulant Action of a Plant-Derived Protein Hydrolysate Produced through Enzymatic Hydrolysis. *Front. Plant Sci.* 2014, *5*, 448, doi:10.3389/fpls.2014.00448.
 23. Rodríguez-Morgado, B.; Gómez, I.; Parrado, J.; García, C.; Hernández, T.; Tejada, M. Accelerated Degradation of PAHs Using Edaphic Biostimulants Obtained from Sewage Sludge and Chicken Feathers. *J. Hazard. Mater.* 2015, *300*, 235–242, doi:10.1016/j.jhazmat.2015.05.045.
 24. du Jardin, P. Plant Biostimulants: Definition, Concept, Main Categories and Regulation. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 2015, *196*, 3–14, doi:10.1016/J.SCIENTA.2015.09.021.
 25. Vainonen, J.P.; Kangasjärvi, J. Plant Signalling in Acute Ozone Exposure. *Plant. Cell Environ.* 2015, *38*, 240–252, doi:10.1111/PCE.12273.
 26. Sachdev, S.; Ansari, S.A.; Ansari, M.I.; Fujita, M.; Hasanuzzaman, M. Abiotic Stress and Reactive Oxygen Species: Generation, Signaling, and Defense Mechanisms. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 2021, *10*, 1–37, doi:10.3390/ANTIOX10020277.



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

CONCLUSIONES FINALES

{ 211 }

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

CONCLUSIONES FINALES

A continuación se exponen las conclusiones de esta tesis doctoral:

1. Se ha valorizado este subproducto en bioestimulantes enzimáticos y fermentativos. Los hidrolizados enzimáticos presentan alto contenido en péptidos y aminoácidos libres solubles, de fácil asimilación para los microorganismos del suelo. Por su parte, los productos obtenidos por fermentación (*B. licheniformis*) también presentan las proteínas en forma de péptidos y aminoácidos libres solubles, junto a las enzimas secretadas por los microorganismos y la biomasa microbiana.
2. Respecto a la aplicación de los productos en suelos, destaca una gran estimulación de los microorganismos edáficos tanto en el producto hidrolizado, como en el producto fermentado soluble, postulándolos como buenos candidatos para la formulación de bioestimulantes agronómicos ricos en aminoácidos, péptidos y moléculas bioactivas.
3. Se ha conseguido una rápida estimulación de los microorganismos de los suelos en torno a los 10 días de aplicación, unido a los mayores niveles de actividades enzimáticas (deshidrogenasa, fosfatasa y glucosidasa fundamentalmente) junto a una alta proliferación de hongos y bacterias.
4. El bioestimulante a partir de la okara aplicado a los suelos presentan un gran potencial para la biorremediación de suelos contaminados por clorpirifos, aumentando considerablemente la degradación del contaminante en los suelos, especialmente en el producto hidrolizado, debido a su alto contenido en proteínas de bajo peso molecular soluble fácilmente asimilable por los microorganismos del suelo, siendo así una buena alternativa para la biorremediación de suelos contaminados por clorpirifós.
5. Finalmente, se evaluó la potencia del bioestimulante enzimático de okara frente a modelos *in vivo* de plantas sometidas a estés ambiental por ozono, demostrando la disminución inducida por ozono en parámetros



fisiológicos como tasa fotosintética neta, contenido de clorofila y evaluación de la fluorescencia directamente en hoja. También se detuvo la oxidación de biomoléculas en hojas, específicamente la oxidación de los lípidos.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

REGAGE22e00054148269

CSV

GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

28/11/2022 13:58:57 Horario peninsular



GEISER-08eb-06e7-39cb-4ed0-b25e-c400-4b02-e4cb