

Artículo Original / Original Article

Factor de conversión proteica y capacidad antioxidante de isoflavonas en *Glycine max*

[Protein conversion factor and antioxidant capacity of isoflavones in *Glycine max*]

Edmundo Venegas-Casanova¹, José G. Gavidia-Valencia², Yuri F. Curo-Vallejos¹, Miguel Ríos³, Luis A. Chavez-Abanto², Ruben J. Aro-Díaz¹, Jorge Escobar⁴, Felipe Ruben Rubio-López¹, José Uribe-Villarreal¹, José L. Martínez^{5,6,7} y Roger A. Rengifo-Penadillos²

¹Departamento Académico de Farmacotecnia, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Peru

²Departamento Académico de Bioquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Peru

³Departamento de Biología, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile

⁴Laboratorio de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica Valparaíso, Valparaíso, Chile

⁵Vicerrectoría de Investigación, Desarrollo e Innovación, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile

⁶Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Peru

⁷Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Peru

Reviewed by:

Mitchell Bacho Lemus
Universidad Andrés Bello
Chile

Aurelio San Martín
Universidad de Magallanes
Chile

Correspondence:

Edmundo VENEGAS-CASANOVA
evenegas@unitru.edu.pe

Section biological activity

Received: 15 April 2022

Accepted: 20 June 2022

Accepted corrected: 29 November 2022

Published: 30 September 2023

Citation:

Venegas-Casanova EA, Gavidia-Valencia JG, Curo-Vallejos YF, Ríos M, Chavez-Abanto LA, Aro-Díaz RJ, Escobar J, Vasquez D, Uribe-Villarreal J, Martínez JL, Rengifo-Penadillos RA
Factor de conversión proteica y capacidad antioxidante de isoflavonas en *Glycine max*
Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat
22 (5): 649 - 656 (2023).
<https://doi.org/10.37360/blacpma.23.22.5.47>

Abstract: The conversion factor of nitrogen to proteins and isoflavones present in *Glycine max* was determined. For the determination of the conversion factor, we worked with solubilizing the proteins at alkaline pH and then extracting them with acidic pH. The proteins were identified by the Kjeldahl method. The antioxidant capacity was determined after extracting the isoflavones and their glycosides through the Soxhlet method, and then using the Brand Williams method (DPPH). The results indicate that the protein conversion factor was 5.85, the maximum concentration of total isoflavones was 33.33%, the antiradical efficiency of total isoflavones was 0.004 mL/ug min, the antiradical efficiency of gallic acid was 0.005 mL/ug min. and the antiradical efficiency of tannic acid was 0.0004 mL/ug min. These results justify the consumption of *Glycine max* (Soya) as a food that has a high nutritional quality and provides an excellent source of antioxidants, which will prevent hormonal and carcinogenic diseases.

Keywords: *Glycine max*; Legume seeds; Protein; Isoflavones; Antioxidant capacity.

Resumen: Se determinó el factor de conversión de nitrógeno a proteínas e isoflavonas presentes en *Glycine max*. Para la determinación del factor de conversión se trabajó con solubilizando las proteínas a pH alcalinos y luego extrayéndolas con pH ácidos. Las proteínas fueron identificadas por el método Kjeldahl. La capacidad antioxidante se determinó previa extracción de las isoflavonas y sus glicósidos a través del método de Soxhlet, y luego empleando el método de Brand Williams (DPPH). Los resultados indican que el factor de conversión proteica fue 5,85, la concentración máxima de isoflavonas totales fue 33,33 %, la eficiencia antirradicalaria de las isoflavonas totales fue 0,004 mL/ug min, la eficiencia antirradicalaria de ácido gálico fue 0,005 mL/ug min y la eficiencia antirradicalaria de ácido tánico fue 0,0004 mL/ug min. Estos resultados justifican el consumo de *Glycine max* (Soya) como un alimento que posee una alta calidad nutricional y proporciona una óptima fuente de antioxidantes, que permitirá prevenir enfermedades hormonales y cancerígenas.

Palabras clave: *Glycine max*; Semillas leguminosas; Proteína; Isoflavonas; Capacidad antioxidante.

INTRODUCCIÓN

Glycine max es la principal fuente de proteína y aceite vegetal del mundo, contiene 40% de proteína y 20% de aceite (en muestra seca). En ese sentido es importante tener una información lo más completa de esa composición, así como los aspectos nutricionales que generen un valor agregado a este producto (Ezegau et al., 2002).

Las proteínas son grandes moléculas de aminoácidos, y se encuentran en los alimentos de origen animal y vegetal. Constituyen los principales componentes estructurales de las células y tejidos del cuerpo. Los músculos y los órganos están formados en gran medida por proteínas. Éstas son necesarias para el crecimiento, el desarrollo y el mantenimiento del cuerpo y para reparar y reemplazar los tejidos gastados o dañados, así como para producir enzimas metabólicas y digestivas. Son, además, un componente esencial de ciertas hormonas (FAO, 2022). Se determina comúnmente calculando la cantidad de nitrógeno y luego multiplicando por un valor denominado factor de conversión de nitrógeno (FCN). El FCN se determina a partir de las proteínas y secuencias de aminoácidos presente en el producto, o midiendo el contenido de nitrógeno de una proteína altamente purificada (International Dairy Federation, 2016).

El método usado para determinar el FCN es el método Kjeldahl, mediante la cuantificación de proteínas, y el método de Soxhlet que realiza la extracción de los aceites empleando un solvente orgánico. Además, para formular alimentos y verificar el cumplimiento de los requisitos de etiquetado y otras especificaciones, los fabricantes y los laboratorios de control oficial deben utilizar el FCN científicamente justificados y ratificados por organismos internacionales de normalización de alimentos como la Comisión del Codex Alimentarius (International Dairy Federation, 2016).

Las leguminosas como la soja sintetizan en sus células gran variedad de fitoquímicos, en particular isoflavonas, alcaloides y glucósidos cianogénicos. Las isoflavonas pueden modular eficaz y eficientemente los niveles de estrógenos en humanos y animales, lo cual se refleja en etapas como la menopausia y en tratamientos como el cáncer de mama, los ovarios poliquísticos y la endometriosis entre las mujeres (Munro et al., 2003; Ogbewu et al., 2010).

Existen variados métodos para de ensayos de antioxidantes (Singh y Singh, 2008; Victoria et al., 2015). Uno de los métodos usados para medir la capacidad antioxidante de isoflavonas en *Glycine*

max es el método de Brand Williams y se fundamenta en que el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH*) posee un electrón desapareado que produce un color azul-violeta y se decolora hacia amarillo pálido al reaccionar con una sustancia capturadora de radicales libres; cuya absorbancia es medida en espectrofotómetro a 517 nm. La diferencia entre absorbancias permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres .14,15

Las isoflavonas son estructuras difenólicas no esterooidal con capacidad de unirse al receptor de estrógeno (alfa y beta), según se ha demostrado en investigaciones realizadas con animales, en tanto que a nivel clínico han demostrado efectividad en la prevención de enfermedades cardiovasculares, osteoporosis y cánceres dependientes de hormonas mujeres (Munro et al., 2003; Ogbewu et al., 2010). Esta línea de investigación es siempre de actualidad en especial con una especie muy utilizada en los cinco continentes (Choi et al., 2020).

MATERIALES Y METODOS

Recolección y Preparación del extracto

Se recolectó 10 kg de semillas de *Glycine max* (Soya), en frascos secos y estériles de vidrio; luego se llevó a remojar por una semana, cambiando diariamente el agua, luego se retiró la cascara, secó y trituraron las semillas. El polvo fue colocado en frascos de vidrio y se conservó a 10°C.

Factor de conversión de nitrógeno (FCN) a proteínas (AOAC, 1998; AOAC, 2000; AOAC, 2012; Gavidia-Valencia et al., 2020)

Extracción de proteínas: Donde se determinó el pH de máxima solubilidad cuyo método se da por dispersión acuosa en medio alcalino. Procedimiento: En un balón de 500 mL, se colocó 5g de muestra y adicionó 100 mL de agua destilada, se agitó y mantuvo a 30°C, hasta completa suspensión. Luego se adaptó un potenciómetro y fue llevado al pH deseado (8,0; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0; 10,5; 11,0; 11,5; 12,0), adicionando gota a gota NaOH 5 N o 0,5 N, según se aproxime al pH deseado, manteniendo agitación y la temperatura de 30°C. La suspensión fue centrifugada por 20 minutos a 2800 rpm. El sobrenadante fue extraído con una pipeta limpia y estéril, y filtrado. Luego el filtrado obtenido se colocó en un matraz de 500 mL. Al precipitar se solubilizó con 25 mL de agua destilada y fue llevado a pH deseado con NaOH. Luego se agitó y centrifugó por 10 minutos a 2800 rpm. El filtrado se colocó en un matraz de 250 mL que contenía el anterior sobrenadante, mientras que el precipitado fue

empleado en una segunda extracción. Se adicionó 50 mL de agua destilada al precipitado y luego la solución fue solubilizada pasándola a un balón de 500 mL. Se procedió a agitar a 30°C, hasta completa suspensión llevándose al pH deseado. En la segunda extracción se realizó el mismo procedimiento donde finalmente el precipitado fue eliminado y el sobrenadante fue llevado a pH deseado y luego aforado a 500 mL. En esta solución se procedió a determinar el porcentaje de nitrógeno extraído empleando el método Kjeldahl. Precipitación de proteínas: Se trabajó en los siguientes pH: 3,3; 3,5; 3,8; 4,1; 4,3; 4,5; 4,7; 4,9. Del aforado de la segunda extracción se extrajo 250 mL y colocaron en un vaso beaker de 400 mL. Se agitó hasta total homogeneización de la muestra, y luego se llevó al pH deseado empleando HCl y con agitación. Se dejó reposar por 5 minutos y luego fue centrifugado a 2800 rpm por 20 minutos. El sobrenadante fue filtrado y este fue colocado en una fiola de 500 mL. Al precipitado se le adicionó 50 mL de agua destilada y llevó al pH deseado, agitó y centrifugó por 10 minutos a 2800 rpm. El sobrenadante fue filtrado, se llevó al pH deseado y colocó en la fiola de 500 mL procediendo a aforar y el precipitado fue desechado. Del aforado se extrajeron dos volúmenes, 50 y 100 mL respectivamente, y en cada volumen y pH se determinó el porcentaje de nitrógeno extraído no precipitado empleando el método Kjeldahl. Determinación del factor de conversión proteica: Se determinó en base al dato porcentual de nitrógeno, luego se aplicó la siguiente fórmula: $F = 100/N$

Donde:

100: cantidad de proteínas que contiene nitrógeno

F: factor de conversión proteico

N: porcentaje de nitrógeno en proteínas. La cantidad de ensayos realizados fue de 6 por cada pH.

Extracción y purificación de isoflavonas totales

Desecado y triturado de la droga: 500 g de semillas de *Glycine max* fueron pesados y secados por el método gravimétrico de la estufa a 45°C hasta peso constante y después fue triturado en un mortero metálico (Remondetto *et al.*, 2001; Araujo *et al.*, 2016; Yuliani *et al.*, 2018). Desengrasado y despigmentado de la droga: 20 g de la droga fueron triturados y mezclados con cantidad suficiente de arena lavada y tratada, se armó un cartucho de papel que fue introducido en la cámara del equipo Soxhlet, procediendo a extraer la grasa y los pigmentos con éter de petróleo, por 4 horas hasta agotar la grasa y los pigmentos (Rostagno *et al.*, 2009; Yuliani *et al.*,

2018). Extracción e hidrólisis de glicósidos de isoflavonas: Se utilizó el método Soxhlet con 100 mL de mezcla hidrometanólica al 50% v/v, y 100 mL de ácido sulfúrico al 10% p/v, por un tiempo aproximado de 4 h, para obtener el extracto hidrometanólico acidificado (Rostagno *et al.*, 2009; Yatsu *et al.*, 2016). Purificación de isoflavonas: El extracto hidrometanólico acidificado se llevó a Baño María a 60°C hasta disminuir a la mitad el contenido inicial del extracto, se enfrió y puso a refrigeración a 20°C por una hora. El extracto refrigerado se filtró al vacío sobre embudo Buchner, previamente acondicionado a temperatura menor a 20°C, se lavó el residuo con 3 volúmenes consecutivos de 400 mL de agua bidestilada, obteniéndose en el papel filtro las isoflavonas totales, las cuales fueron llevadas a 45°C en estufa por 2 horas, luego se solubilizó en 50 mL de metanol a 50°C. Esta solución fue colocada en fiola de 100 mL., repitiendo esta reciente operación adicionando un par de volúmenes consecutivos de 25 mL de metanol, estas soluciones finales fueron trasvasadas a una fiola de 100 mL para luego aforar. Esta última solución se llevó a enfriar a temperatura ambiente y filtró al vacío, y a este filtrado se le adicionó 100 mL de agua bidestilada (Rostagno *et al.*, 2009; Yuliani *et al.*, 2018).

Preparación de la solución problema

De la primera muestra problema se midieron 2,5 mL y aforó a 100 mL con metanol; de este aforo se extrajo 3 alícuotas de 4 mL, para obtener lectura de absorbancias a 310 nm por cada alícuota en el espectrofotómetro UV-Visible (Rostagno *et al.*, 2009; Yuliani *et al.*, 2018). Preparación de la solución blanco: Se preparó una solución hidroximetanólica al 50% v/v como solución blanco, se midió en una alícuota de 4 mL aproximadamente para la calibración del espectrofotómetro UV-Visible (Rostagno *et al.*, 2009; Yuliani *et al.*, 2018). Preparación de la solución patrón: 0,005 g de genisteína al 98% de pureza fue disuelta en 5 mL de metanol; de esta solución se midió 0,2 mL y aforó a 25 mL con solución hidroximetanólica al 50%. De este aforo se midió 9 alícuotas de 4 mL aproximadamente, para obtener de cada alícuota tres lecturas de absorbancia a 310 nm en el espectrofotómetro UV-Visible (Rostagno *et al.*, 2009; Yuliani *et al.*, 2018).

Capacidad antioxidante in vitro del extracto metanólico de isoflavonas totales mediante los porcentajes captados del radical DPPH*: Método de Brand Williams. Determinación de los porcentajes

del radical DPPH*

5 tubos con muestra problema fueron recubiertos de papel aluminio. Se les adicionó 1 mL de solución de DPPH* 0,1 mM; se agitaron vigorosamente y colocaron en oscuridad por 30 minutos, y procedió a medir la absorbancia a 517 nm a cada tubo de muestra problema cada uno frente a un blanco (Tyug et al., 2010). Determinación de la Eficiencia Antirradicalaria (EA) de isoflavonas totales: Se calculó previamente el valor promedio IC₅₀ que denota la concentración de muestra que se requiere para eliminar el 50% de los radicales libres DPPH y el promedio de los tiempos de IC₅₀ (T IC₅₀) de todas las concentraciones (Malencic et al., 2012). Determinación *in vitro* de la eficiencia antirradicalaria (EA) de la solución de ácido gálico

0,1 mM: Se preparó 0,1 mM de ácido gálico, llevándose a refrigeración en envase de vidrio cubierto con papel de aluminio. Luego, se repitió todos los pasos descritos en la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto metanólico de isoflavonas totales (Tyug et al., 2010; Skowrya, 2014; Pisoschi et al., 2016). Determinación de la eficiencia antirradicalaria (EA) *in vitro* de la solución de ácido tánico 0,1 mM: Se preparó 0,1 mM de ácido tánico, llevándose a refrigeración en envase de vidrio cubierto con papel de aluminio. Luego, se repitió todos los pasos descritos en la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto metanólico de isoflavonas totales (Tyug et al., 2010; Skowrya, 2014; Pisoschi et al., 2016).

RESULTADOS

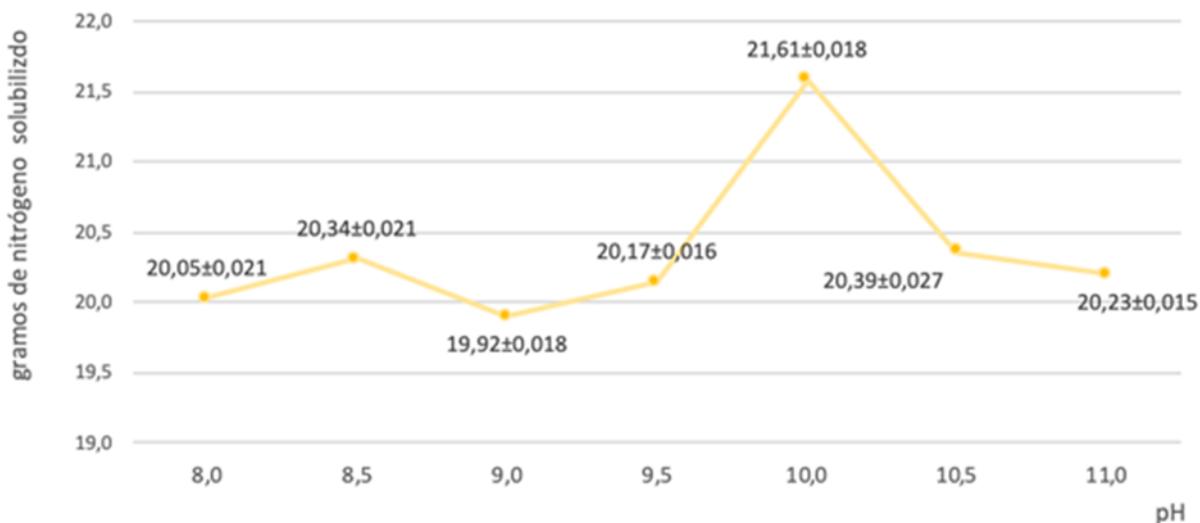


Figura N° 1
Gramos de nitrógeno solubilizado procedente de proteínas de *Glycine max* según el pH alcalino

Tabla N° 1
Factor de conversión proteica para las semillas de *Glycine max* (Soya)

Muestra	Factor de conversión proteica
Semillas de <i>Glycine max</i>	5.88

Tabla N° 2
Porcentaje de isoflavonas totales expresados en porcentaje de las semillas de *Glycine max*

Muestras problemas analizadas	Absorbancias promedios (nm)	Porcentaje de isoflavonas totales (%)
1	0,28	28,57
2	0,30	33,33
3	0,30	33,33
4	0,28	28,57
5	0,29	31,03
Promedio	0,290	30,97
Desviación estándar	0,01	2,38

Tabla N° 3
Capacidad antioxidante expresado como eficiencia antirradicalaria (EA) de las isoflavonas totales, ácido gálico y ácido tánico presentes en semillas de *Glycine max*

Antioxidante	Eficacia antirradicalaria (mL x ug ⁻¹ x min ⁻¹)
Isoflavonas totales	0,004
Ácido gálico	0,005
Ácido tánico	0,0004
Promedio	0,00313

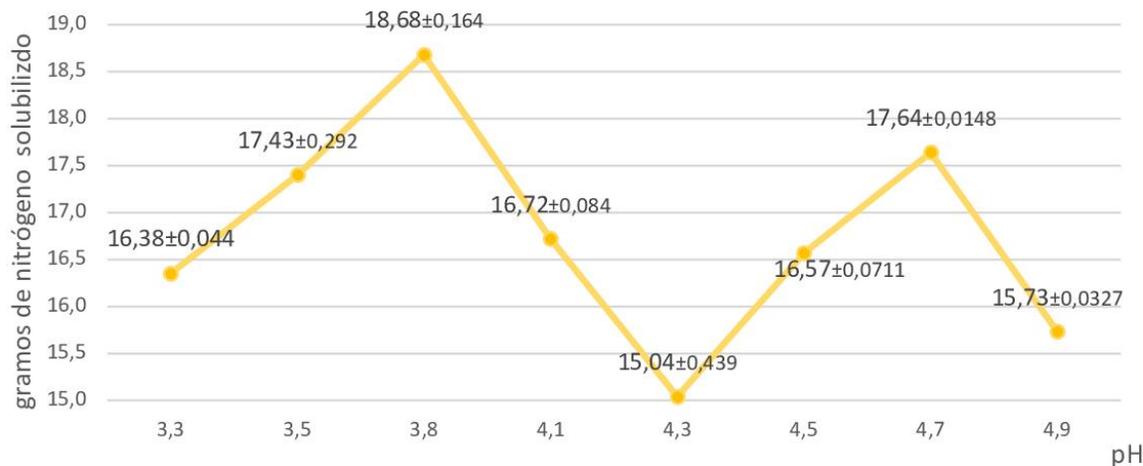


Figura N° 2
Gramos de nitrógeno solubilizado procedente de proteínas de *Glycine max* (soya) según el pH ácido

DISCUSION

Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] is the most important oilseed cultivated in the world. Global production is estimated at 317.3 million tons for the 2015/2016 harvest. Brazil joins the United States as one of the major producers, with 30% of this total. The average productivity of soybean in Brazil is 2,999 kg ha⁻¹ (Araujo et al., 2016).

En la Figura N° 1, se muestran los gramos de nitrógeno solubilizado procedente de proteínas de

Glycine max donde se trabajó a pH alcalino, observándose que la mayor solubilidad se presenta a pH 10 con 21,61 ± 0,018 gramos. En este ensayo se emplean solventes alcalinos que ayudan a romper los puentes de hidrógeno y a disociarlo favoreciendo el incremento de la carga superficial de las moléculas proteicas aumentando la solubilidad en agua (Mariotti et al., 2008; Rouch et al., 2008).

En la Figura N° 2 se muestran los gramos de nitrógeno solubilizado procedente de proteínas de

Glycine max, donde se trabajó a pH ácido, observándose que la menor solubilidad se presenta a pH 4,3 con $15,04 \pm 0,439$ gramos. Según los resultados encontrados en los precipitados, presentan un mayor contenido de proteína, esto se debe a la influencia de la temperatura, donde su incremento disminuye la solubilidad de la proteína en la solución, y por tanto favorece una mayor precipitación de la misma, también se refiere al pH donde la proteína no tiene carga eléctrica y es incapaz de desplazarse en un campo eléctrico, por lo que no existe repulsión electrostática entre las moléculas de proteína vecinas y tienden a precipitar (Mariotti et al., 2008; Rouch et al., 2008; Maubois y Lorient, 2016).

En la Tabla N° 1 se muestran el FCN para las semillas de *G. max*, el cual resultó ser 5,88, el cual es elevado respecto a otras fuentes de nitrógeno, sin embargo, se encuentra por debajo de los productos lácteos y la leche humana que presentan factores de 6,38 y 6,37 respectivamente. Los alimentos en los cuales se ha determinado su factor de conversión proteica, como: las lentejas (5,71), los hongos (4,70) y la gelatina (5,55), poseen FCN menor al determinado lo que reafirma que se trata de una fuente de alto valor nutritivo (Gorska-Warsewicz et al., 2018).

En la Tabla N° 2 se observa que el promedio del porcentaje de isoflavonas totales encontrado fue de 30,97%, el cual se encuentra dentro del rango aceptado por asociaciones científicas internacionales (20-50%). Entre las principales isoflavonas presentes en *G. soya* están daidzeína, genisteína y gliciteína, y sus respectivos β -glucósidos, malonilglucósidos y acetilglucósidos; además, la temporada de invierno y

sus temperaturas bajas influyeron positivamente en los porcentajes de isoflavonas (Shao et al., 2009; Zhang et al., 2014; Bursac et al., 2017).

Los resultados de la capacidad antioxidante se encuentran en la Tabla N° 3 expresada como EA de las isoflavonas totales, el ácido gálico y el ácido tánico, donde se consideró el promedio de los valores IC_{50} y TIC_{50} de todas las concentraciones y de todos los tiempos respectivamente. Los valores obtenidos para el ácido gálico son aceptables; mientras que, el ácido tánico también posee óptima EA, principalmente frente al anión superóxido, no solo con el objetivo de prolongar la vida útil de la soya, sino también brindar propiedades funcionales. Asimismo, estos resultados indican que la capacidad antioxidante de la soya permite la regeneración de antioxidantes primarios y retrasa la oxidación de lípidos, por lo que la EA va estar aumentada, atribuyendo el efecto reductor del grupo hidroxilo aromático, que reduce los radicales libres como el ión oxígeno (Prakash et al., 2007; Malencic et al., 2007; Gulcin et al., 2010). Sin olvidar que pueden existir cambios en los compuestos fenólicos en *Glycine max* bajo determinadas condiciones (Lee et al., 2013).

CONCLUSIONES

El factor de conversión proteica de *Glycine max* fue de 5,85; La concentración máxima de isoflavonas totales en *Glycine max* fue de 33,33%; La eficiencia antirradicalaria de las isoflavonas totales es 0,004 mL/ μ g min; La eficiencia antirradicalaria de ácido gálico es 0,005 mL/ μ g min; La eficiencia antirradicalaria de ácido tánico es 0,0004 mL/ μ g min.

REFERENCIAS

- AOAC. 1998. **International Official Methods of Analysis**. Ed. Patricia Conniff. Published by AOAC International, USA.
- AOAC. 2000. **Internacional Métodos oficiales de análisis**, AOAC International. Ed. Maryland, USA.
- AOAC. 2012. **Official methods of analysis**. Ed. Gaithersburg, USA.
- Araujo MMV, Caneppele MAB, Bianchini MGA. 2016. Total alcoholic acidity and pH tests as quality parameters in stored soybean grains. **Pesq Agropec Trop** 41: 191 - 196. <https://doi.org/10.1590/1983-40632016v4638707>
- Bursac M, Krstonošića MA, Miladinović J, Malenčić D, Gvozdenovića L, Cvejić JH. 2017. Isoflavone composition, total phenolic content and antioxidant capacity of soybeans with colored seed coat. **Nat Prod Commun** 12: 527 - 532. <https://doi.org/10.1177/1934578X1701200417>
- Choi YM, Yoon H, Lee S, Ko HC, Shin MJ, Lee MC, Hur OS, Ro NY, Desta KT. 2020. Isoflavones, anthocyanins, phenolic content, and antioxidant activities of black soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill) as affected by seed weight. **Scientif Rep** 10: 19960. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76985-4>
- Ezegaú IE, Petzke JK, Metges CC, Akinsoyinu AO and Ologhobo AD. 2002. Seed protein contents and nitrogen-to-protein conversion factors for some uncultivated tropical plant seeds. **Food Chem** 78: 105 - 109. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00105-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00105-X)

- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2022. FAOSTATProducción Agrícola. <https://www.fao.org/nutrition/requirements/proteinas/es>
- Gavidia-Valencia JG, Venegas-Casanova EA, Ríos M, Uribe-Villarreal JC, Gutiérrez-Mendoza DD, Rengifo-Peñadillos RA, Jara-Aguilar DR, Martínez JL. 2020. Determinación del factor de conversión de nitrógeno a proteína en huevos de *Coturnix coturnix* L. (codorniz japonesa). **Arch Venez Farmacol Therapeut** 39: 706-708. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4404721>
- Górska-Warsewicz H, Laskowski W, Kulykovets O, Kudlińska-Chylak A, Czczotko M, Rejman K. 2018. Food products as sources of protein and amino acids - The case of Poland. **Nutrients** 10: 1977. <https://doi.org/10.3390/nu10121977>
- Gulcin I, Huyut Z, Elmastas M, Aboul-Enein HY. 2010. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. **Arab J Chem** 3: 43 - 53. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2009.12.008>
- International Dairy Federation. 2016. Evaluation of nitrogen conversions factors for dairy and soy. **Boletín IDF** 482: 5 - 7.
- Lee JH, Lee BW, Kim B, Kim HT, Ko JM, Baek IY, Seo WT, Kang YM, Cho KM. 2013. Changes in phenolic compounds (isoflavones and phenolic acids) and antioxidant properties in high-protein soybean (*Glycine max* L., cv. Saedanbaek) for different roasting conditions. **J Korean Soc Appl Biol Chem** 56: 605 - 612. <https://doi.org/10.1007/s13765-013-3048-2>
- Malenčić D, Popovic M, Miladinović J. 2007. Phenolic content and antioxidant properties of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seeds. **Molecules** 12: 576 - 581. <https://doi.org/10.3390/12030576>
- Malenčić D, Cvejić J, Miladinović J. 2012. Polyphenol content and antioxidant properties of colored soybean seeds from Central Europe. **J Med Food** 15: 89 - 95. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0329>
- Mariotti F, Tomé D, Mirand PP. 2008. Converting nitrogen into protein--beyond 6.25 and Jones' factors. **Crit Rev Food Sci Nutr** 48: 177 - 184. <https://doi.org/10.1080/10408390701279749>
- Maubois JL, Lorient D. 2016. Dairy proteins and soy proteins in infant foods nitrogen-to-protein conversion factors. **Dairy Sci Technol** 96: 15 - 25. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0271-0>
- Munro IC, Harwood M, Hlywka JJ, Stephen AM, Doull J, Flamm WG, Adlercreutz H. 2003. Soy isoflavones: A safety review. **Nutr Rev** 61: 1 - 33. <https://doi.org/10.1301/nr.2003.janr.1-33.2003>
- Ogbuewu IP, Uchegbu MC, Emenalom OO, Okoli IC; Iloeje MU. 2010. Overview of the chemistry of soy isoflavones, potential threats and potential therapeutic benefits. **Elect J Environm Agric Food Chem** 9: 682 - 695.
- Pisoschi AM, Pop A, Cimpeanu C, Predoi G. 2016. Antioxidant capacity determination in plants and plant-derived products: A review. **Oxid Med Cell Longev** 2016: 9130976. <https://doi.org/10.1155/2016/9130976>
- Prakash D, Upadhyay G, Singh BN, Singh HB. 2007. Antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). **Food Chem** 104: 783 - 790. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.029>
- Remondetto G, Añón MC, González RJ. 2001. Hydration properties of soybean protein isolates. **Braz Arch Biol Technol** 44: 425 - 431.
- Rostagno MA, Manchón N, Guillamon E, García-Lafuente A, Villares A, Martínez JA. 2009. **Métodos y técnicas para el análisis de isoflavonas en alimentos**. Nova Science Publishers, Nueva York, USA.
- Rouch DA, Roginski H, Britz ML, Roupas P. 2008. Determination of a nitrogen conversion factor for protein content in Cheddar cheese. **Int Dairy J** 18: 216 - 220. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.07.004>
- Shao S, Duncan AM, Yang R, Marcone MF, Rajcan I, Tsao R. 2009. Tracking isoflavones: From soybean to soy flour, soy protein isolates to functional soy bread. **J Funct Foods** 1: 119 - 127. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2008.09.013>
- Singh S, Singh RP. 2008. *In vitro* methods of assay of antioxidant: An overview. **Food Rev Int** 24: 392 - 415. <https://doi.org/10.1080/87559120802304269>
- Skowrya M. 2014. **Antioxidant properties of extracts from selected plant materials (*Caesalpinia spinosa*, *Perilla frutescens*, *Artemisia annua* and *Viola wittrockiana*) in vitro and in model food systems modelo**. Thesis. Universitat Politècnica de Catalunya, España.
- Tyug TS, Prasad KN, Ismail A. 2010. Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in soybean by-products.

Food Chem 123: 583 - 589. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.074>

- Victoria BG, S Rodica, NC Georgeta. 2015. Improvement of the antioxidant activity of soybean (*Glycine max*) by biotechnology processing. **Rom Biotechnol Lett** 20: 10212 - 10220.
- Yatsu FKJ, Koester LS, Bassani VL. 2016. Isoflavone-aglycone fraction from *Glycine max*: a promising raw material for isoflavone-based pharmaceutical or nutraceutical products. **Rev Bras Farmacogn** 26: 259 - 267. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.12.004>
- Yuliani SH, Gani MR, Istyastomo EP, Riswanto FDO. 2018. Optimization of genistein and daidzein extraction from a tempeh fermented product of soybean. **J Pharm Pharmacogn Res** 6: 231 - 241.
- Zhang J, Ge Y, Han F, Li B, Yan S, Sun J, Wang L. 2014. Isoflavone content of soybean cultivars from maturity group 0 to VI grown in Northern and Southern China. **J Am Oil Chem Soc** 91: 1019 - 1028. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2440-3>