

ORIGINAL ARTICLE

PENINGKATAN ISOFLAVON DALAM PRODUK BERBASIS OKARA YANG DIFERMENTASI OLEH JAMUR

Isoflavones enhancement in fungal-fermented okara-based products

Tina Nurkhoeriyati¹, Ihsan Iswaldi²

¹Program Studi Teknologi Pangan, Universitas Lintas Internasional Indonesia

²Program Studi Teknologi Bisnis Pangan, Universitas Prasetya Mulya, Indonesia

*Penulis Korespondensi

ABSTRACT

Background: Isoflavones as a group of polyphenolic compounds contained in soybean are known to have beneficial effect on health by acting as antioxidant, may prevent cancer, osteoporosis and cardiovascular diseases. During the process of tofu and soymilk manufacturing, most of the soybean is left in okara. Okara is produced in high volume in Indonesia. Regarding as waste, okara has not been optimally utilized eventhough it has a significant nutritional composition. Though consumed by some portion of the Indonesian population, research on isoflavones content in okara tempe or oncom are scarce. **Objective:** study isoflavone changes before and after fungal okara fermentation. **Method:** solid substrate fermentation (SSF) from okara by three different fungi which are *P. ostreatus* for 10 days (PO D-10), *R. oligosporus* or *N. sitophila* for three days designated as RO D-3 and NS D-3, respectively, is performed in this study. **Result:** In general, SSF led to the improvement of aglycon conjugates isoflavones (daidzein, glycytein, and genistein) concentration in okara. A DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay has been carried out and fermentation seem altered the antioxidant capacity of samples. The protein content (% dry mass) of control, PO D-10, RO D-3 and NS D-3 are 34.8 ± 0.24 , 38.3 ± 0.30 , 40.4 ± 0.19 , and 39.7 ± 0.13 g/ 100 g, respectively. **Conclusion:** SSF on okara with three different types of fungi can increase the concentration of aglycone conjugate, protein content and antioxidant activity
Keywords: Antioxidant activity, fungi, isoflavones, okara, soybean

ABSTRAK

Latar Belakang: Isoflavon merupakan kelompok senyawa polifenol yang terkandung dalam kedelai yang diketahui memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan dengan bertindak sebagai antioksidan, dapat mencegah kanker, osteoporosis dan penyakit kardiovaskular. Selama proses pembuatan tahu dan susu kedelai, sebagian besar kedelai terbuang dalam bentuk okara sebagai limbah. Okara diproduksi dalam volume yang besar di Indonesia. Okara, yang dianggap sebagai limbah, belum dimanfaatkan secara optimal walaupun memiliki komposisi gizi yang signifikan. Meskipun dikonsumsi oleh sebagian penduduk Indonesia, penelitian tentang kandungan isoflavon dalam okara tempe atau oncom masih langka. **Tujuan:** untuk mempelajari perubahan isoflavon sebelum dan setelah fermentasi okara oleh jamur. **Metode:** fermentasi substrat padat (*Solid State Fermentation*, SSF) dari okara oleh tiga kapang/ jamur berbeda yaitu *P. ostreatus* selama 10 hari (PO D-10), *R. oligosporus* atau *N. sitophila* selama tiga hari ditetapkan sebagai RO D-3 dan NS D-3, secara berturut-turut, dilakukan dalam penelitian ini. **Hasil:** Secara umum, SSF menyebabkan peningkatan konsentrasi konjugasi aglikon isoflavon (daidzein, glycytein, dan genistein) pada okara. Uji DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) telah dilakukan dan sampel yang difermentasi relatif memiliki kapasitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan kontrol. Kandungan protein (% basis kering) dari kontrol, PO D-10, RO D-3 dan NS D-3 secara berturut-turut adalah $34,8 \pm 0,24$, $38,3 \pm 0,30$, $40,4 \pm 0,19$, dan $39,7 \pm 0,13$ g/ 100 g. **Kesimpulan:** SSF pada okara dengan tiga jenis jamur secara umum dapat meningkatkan konsentrasi konjugat

aglikon, kadar protein dan aktivitas antioksidan.

Kata kunci: Aktivitas antioksidan, isoflavon, jamur, kedelai, okara

PENDAHULUAN

Isoflavon sebagai kelompok senyawa polifenol memiliki nilai ekonomi potensial yang tinggi. Hal ini disebabkan oleh fakta berdasarkan penelitian tentang isoflavon menunjukkan bahwa komponen ini bertanggung jawab atas sebagian besar manfaat kesehatan yang diperkirakan dimiliki oleh kedelai.(1) Bentuk isoflavon bisa berupa aglikon (bentuk tidak terkonjugasi) atau pun dalam bentuk konjugasi glikosida. Isoflavon dalam bentuk aglikon isoflavon menunjukkan aktivitas biologis yang lebih kuat daripada glikosida.(2)

Okara, produk samping kedelai dalam pembuatan tahu, diproduksi dalam volume yang tinggi di Indonesia.(3) Okara merupakan produk yang kaya nutrisi, mengandung serat, protein, lemak, vitamin, dan mineral.(4) Karakterisasi produk sampingan ini, termasuk protein, minyak, serat makanan dan polisakarida dapat ditemukan dalam beberapa literatur. (5–7) Sebagian besar okara yang dihasilkan telah dimanfaatkan sebagai pakan ternak, baik dalam bentuk segar maupun olahan. Di beberapa daerah, okara telah digunakan untuk memproduksi tempe atau oncom okara. Meskipun dikonsumsi oleh sebagian penduduk Indonesia, penelitian tentang kandungan isoflavon dalam tempe atau oncom okara masih langka. Penelitian tentang fermentasi substrat padat dengan jamur tiram (*P. ostreatus*) pernah dilakukan oleh Shi *et al.* pada tahun 2011 dan secara signifikan meningkatkan polifenol, protein dan asam amino, akan tetapi penelitian terkait spesifik kandungan isoflavon belum banyak dilakukan.(8)

Okara adalah bahan baku yang memiliki sumber nutrisi yang baik. Dengan demikian, cocok digunakan sebagai media fermentasi mikroorganisme dan dapat diolah.(6) Fermentasi tidak hanya meningkatkan daya cerna dan penyerapan nutrisi (okara mengandung antitripsin, saponin, dan faktor anti-nutrisi), tetapi

juga semakin meningkatkan nilai gizi okara. Fermentasi dapat menghilangkan bau khas kacang; meningkatkan jumlah serat yang dapat dimakan, asam amino bebas, gula, asam lemak, vitamin B12 dan vitamin B2, laktoflavin, dan laktokrom. Queiroz Santos *et. al.* melaporkan bahwa fermentasi substrat padat (SSF) menggunakan *S. Cereviceae* dapat meningkatkan konversi isoflavon dari bentuk glikosida menjadi bentuk aglikonnya. Dengan demikian, fermentasi dapat menjadi proses yang penting dalam meningkatkan mutu dan atribut fungsional pada okara.(9) Dalam kehidupan sehari-hari, okara difermentasi untuk pembuatan kecap, selai, pakan protein mikroba, bahan tambahan makanan dan minuman fermentasi.(6)

Kedelai kaya akan isoflavon dan senyawa fenolik lainnya.(5) Isoflavon kedelai bertindak sebagai antioksidan, dan dapat mencegah kanker, osteoporosis, dan penyakit kardiovaskular, serta komplikasi pascamenopause. (10,11) Menurut Li *et al.*, selama proses pembuatan tahu dan susu kedelai, sebagian besar isoflavon kedelai tersisa di okara.(5) Persentase total isoflavon yang hilang dalam air untuk merendam kedelai mentah, okara dan *whey* masing-masing adalah 4%, 31% dan 18%.(12) Penelitian ini bertujuan terutama untuk mempelajari perubahan isoflavon sebelum dan sesudah fermentasi okara. Tiga spesies jamur akan digunakan dalam penelitian ini: *Rhizopus oligosporus*, *Neurospora sitophila* dan *Pleurotus ostreatus*. Ketiga spesies telah digunakan secara luas untuk waktu yang lama untuk pengolahan makanan di Indonesia dan wilayah Asia lainnya, sehingga dapat dianggap aman untuk dikonsumsi.

BAHAN DAN METODE

Kedelai yang digunakan dalam penelitian ini bersumber dari kultivar lokal yang dibeli di Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi Indonesia, Malang, Jawa Timur, Indonesia.

Kultur starter murni jamur disiapkan dengan mengisolasi spora tempe, oncom, dan jamur tiram untuk masing-masing mendapatkan *Rhizopus oligosporus*, *Neurospora sitophila* dan *Pleurotus ostreatus*. Kacang kedelai yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 1 di bawah ini:

Bahan yang digunakan dalam penelitian



Gambar 1. Kedelai lokal kultivar Detap 1

Peralatan utama yang digunakan adalah *autoclave* (Hiclave HG-50, Hirayama, Jepang), inkubator (MMM, Medcenter GmbH, Jerman), *biosafety cabinet* (Heal Force, Sanghai Lishen Scientific Equipment Co., Ltd.), Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (HPLC) (Shimadzu, Kyoto, Jepang), pengering beku (christ Alpha 1-2 LDplus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Jerman), *rotary evaporator* (RE100-Pro Rotary Evaporator, Scilogex, Rocky Hill, USA), dan *centrifuge* (80-2 Electronic Centrifuge, China), serta spektrofotometer (UV-M51, Bel Engineering, Italia).

Kultur starter murni dari jamur disiapkan dengan mengisolasi spora tempe, oncom, dan jamur tiram untuk mendapatkan masing-masing *R. oligosporus*, *N. sitophila* dan *P. ostreatus*. Media yang digunakan untuk isolasi adalah agar dichloran rose bengal chloramphenicol (DRBC) dengan suhu inkubasi 30°C dan waktu inkubasi bervariasi antar jenis jamur (1-2 hari untuk *R. oligosporus*, *N. sitophila* dan 7-10 hari untuk *P.*

ini adalah kedelai lokal terpilih (kultivar Detap 1), *dichloran rose bengal chloramphenicol agar* (Himedia, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, Mumbai, India), *buffered peptone water* (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), air distilasi, air deionisasi, methanol, dan standar daidzein, glycitein serta genistein (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA).

ostreatus). Pemurnian diulang empat kali. Isolat yang diperoleh kemudian diamati di bawah mikroskop untuk identifikasi. Isolat kemudian diinokulasi dalam agar miring DRBC.

Okara pada penelitian ini diproduksi di laboratorium dengan menggunakan metode sebagai berikut: Kacang kedelai 100 g dicuci dan kemudian direndam dalam 300 mL air selama 10 jam. Kedelai kemudian dihancurkan dengan enam bagian air dan dipanaskan hingga 76°C selama 10 menit menggunakan Soymilk Maker (Dai Q Bean Soymilk Maker, China) sehingga menghasilkan bubur. Bubur disaring menggunakan kain katun dan residu yang dihasilkan (okara) dibekukan pada -20 ° C sebelum digunakan.

Persiapan sampel okara termasuk *thawing* dan mengukus okara untuk memasak dan melunakkannya sebelum fermentasi (121°C, 15 menit) dengan menggunakan *autoclave*. Setelah didinginkan, okara diinokulasi dengan suspensi spora dan diinkubasi pada 30°C hingga 72 jam untuk fermentasi *R. oligosporus* dan *N.*

sitophila, dan hingga 10 hari untuk *P. ostreatus*. Sampel diambil setiap satu hari untuk *R. oligosporus* dan *N. sitophila*, dan pada hari 1, 5 dan 10 untuk *P. ostreatus*.

Okara tanpa perlakuan (kontrol) dan okara yang telah menyelesaikan proses fermentasi dianalisis kadar protein (metode Kjeldahl, $N \times 6.25$) dan kadar airnya (dikeringkan pada suhu 105°C). Data yang diperoleh digunakan untuk menghitung kandungan proteinnya dalam persentase massa kering.

Ekstraksi isoflavon dilakukan berdasarkan metode Vyn, *et al.* dan Sumardi *et al.* dengan modifikasi.(13)(14) Okara yang difermentasi dibekukan selama 48 jam (suhu kondensor: -73°C ; tekanan bilik: 0,027 mbar). Okara yang telah dikeringbekukan ditumbuk, kemudian dilarutkan dengan heksana untuk menghilangkan kadar lipidnya (8: 1, b / v) pada 25°C selama 30 menit dalam kondisi statis, padatan kemudian didekantasi dan pelarut yang mengandung lipid dihilangkan. Proses ini diulangi tiga kali untuk memastikan pengangkatan lipid sepenuhnya. Okara hasil fermentasi kering beku yang telah dihilangkan lipidnya, ditimbang sebanyak 0,5 g dan dilarutkan dalam 10 mL 96% etanol dan 2 mL HCl pekat yang ditambahkan ke dalam campuran. Sampel kemudian diinkubasi dalam air pada suhu 75°C selama dua jam. Setelah pendinginan hingga suhu kamar, sampel pH diatur ke pH 3.0 menggunakan NaOH. Sampel kemudian disentrifugasi pada 3000 rpm selama 15 menit dan supernatan disaring melalui filter PTFE 0,45 μm .

Analisis isoflavon dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (HPLC) (Shimadzu, Jepang) dengan kolom C-18 (Shimpack VP-ODS) dan dilengkapi dengan detektor PDA pada panjang gelombang 261 nm dan dioperasikan pada suhu 30°C . Sampel sebanyak 25 μL disuntikkan ke instrumen untuk analisis. Suatu larutan asam asetat 0,5% dalam air

terdeionisasi digunakan sebagai fase gerak A dan larutan asam asetat 0,5% dalam metanol tingkat HPLC digunakan sebagai fase gerak B. Komposisi campuran fase gerak mengikuti campuran gradien linier selama periode tertentu. waktu sebagai berikut: fase seluler A dan B: 70% A dan 30% B untuk waktu antara 0 dan 10 menit, 60% A dan 40% B antara 11 dan 30 menit, 60% A dan 40% B antara 31 dan 40 menit, dan 40% A dan 60% B antara 41 dan 65 menit. Laju aliran adalah 1 mL / menit. Standar aglikon konjugat isoflavon yang digunakan dalam penelitian ini adalah: daidzein, glycitein dan genistein (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA).

Okara yang telah difermentasi dan dikeringbekukan yang serta dihilangkan lipidnya diuji secara spektrofotometri dengan menggunakan radikal bebas DPPH (2,2-difenil-1-pikrillhidrazil) untuk pengukuran kapasitas antioksidannya. Analisis mengikuti prosedur yang dilakukan oleh Brand-Williams *et al.* dengan sedikit modifikasi.(15) Analisis ini menggunakan reagen DPPH (Sigma-aldrich, USA) sebagai larutan radikal yang diperoleh dengan melarutkan 1,182 mg DPPH dalam 50 mL metanol dengan konsentrasi 6×10^{-5} M. Larutan radikal DPPH sebanyak 3,90 mL dicampur dengan 0,1 mL larutan metanol dan diaduk dengan baik menggunakan vorteks selama 10 detik. Campuran diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Setelah inkubasi, penurunan absorbansi campuran diukur pada 515 nm. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid; Sigma-aldrich, USA) digunakan sebagai kontrol positif. Aktivitas penghambatan dihitung dari persamaan berikut:

Aktivitas penangkapan radikal DPPH (%) = $((1-A) / A_0) \times 100$

A_0 adalah absorbansi campuran tanpa sampel dan A adalah absorbansi campuran dengan sampel. Nilai hasil eksperimen yang ditunjukkan dalam gambar adalah rata-rata dari setidaknya dua penentuan ($\pm$ standar deviasi).

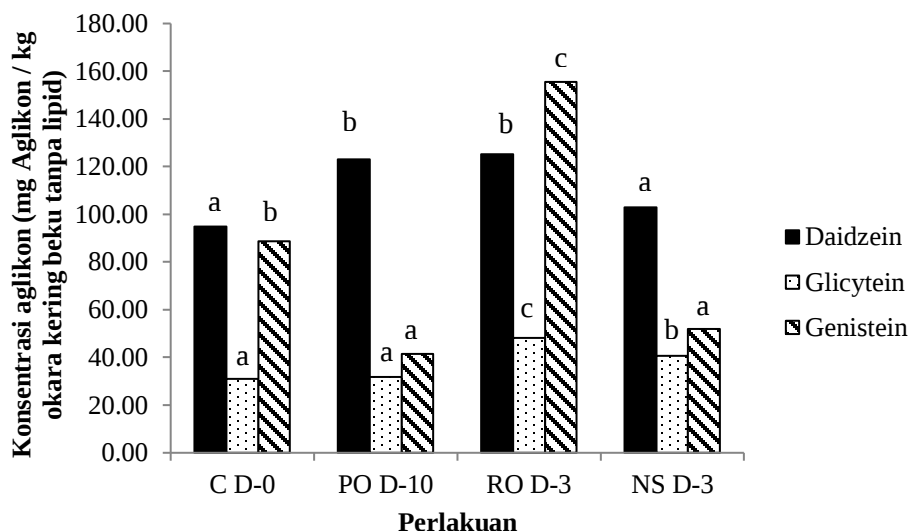
Analisis statistik yang digunakan dalam

penelitian ini adalah ANOVA satu arah (*one-way ANOVA*) yang bertujuan untuk membandingkan rata-rata dari dua ulangan dari seluruh perlakuan. SPSS 22.0 digunakan sebagai alat bantu untuk menganalisis data.

HASIL

Okara yang diuji dalam penelitian setelah difermentasi oleh *P. ostreatus* selama 10 hari, *N.*

Sitophila atau *R. oligosporus* selama tiga hari secara umum memiliki kandungan konjugat aglikon isoflavon yang lebih tinggi apabila dibandingkan dengan okara tanpa perlakuan (kontrol). Hasil serupa diperoleh dalam penelitian tentang kedelai yang difermentasi oleh *S. cerevisiae* dan okara yang difermentasi oleh *A. Oryzae*. (9)(11)

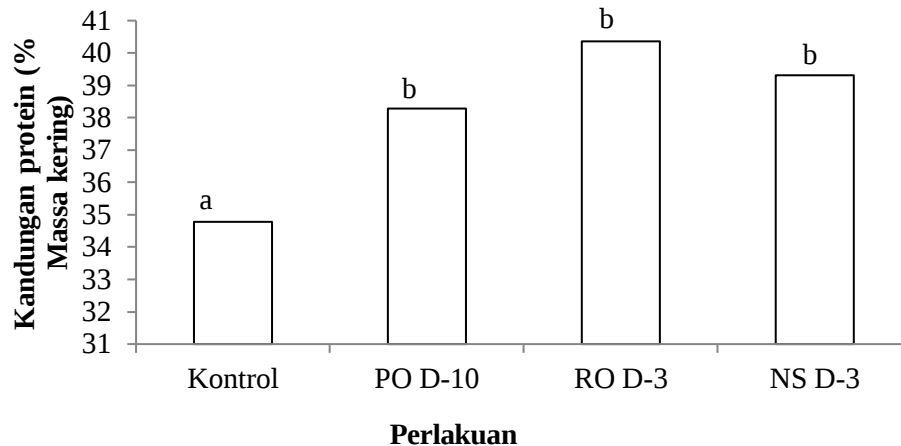


Gambar 2. Kandungan konjugat aglikon isoflavon (daidzein, glycytein, genistein) dari okara tanpa perlakuan (kontrol) dan okara yang telah difermentasi (10 hari untuk *P. ostreatus* dan tiga hari untuk *R. oligosporus* atau *N. Sitophila*)

Fermentasi oleh *R. oligosporus* meningkatkan kandungan keseluruhan aglikon dari isoflavon yang diamati (daidzein, glycytein dan genistein) pada sampel. Namun, hasil yang sedikit berbeda ditemukan pada okara yang difermentasi oleh *P. ostreatus* dan *N. sitophila*. Berbeda dengan isoflavon aglikon lain yang diamati, kandungan genistein dalam okara yang difermentasi kedua kultur ini lebih rendah

daripada sampel tanpa fermentasi (kontrol).

Selama fermentasi oleh tiga jamur berbeda selama 10 hari untuk *P. ostreatus* dan tiga hari untuk *R. oligosporus* atau *N. Sitophila*, okara mengalami peningkatan kandungan protein yang signifikan. Kandungan protein dinyatakan sebagai persentase massa kering dan ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Kandungan protein dari okara tanpa perlakuan (kontrol) dan okara yang telah difermentasi (10 hari untuk *P. ostreatus* dan tiga hari untuk *R. oligosporus* atau *N. Sitophila*)

Nilai IC₅₀ (μg/mL) dari Kontrol, PO D-10, RO D-3 dan NS D-3 adalah 451.03 ± 0.052^d , 444.10 ± 0.042^c , 343.21 ± 0.043^b , and 320.03 ± 0.031^a , secara berturut-turut. Trolox digunakan sebagai kontrol positif dari antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 3.06 ± 0.028 μg/mL.

PEMBAHASAN

Penelitian-penelitian yang dilakukan oleh Queiroz Santos *et al.* dan Nam *et al.*, menyimpulkan bahwa selama proses fermentasi, konjugat glikosida atau isoflavon terikat diubah menjadi konjugat aglikon yang bersesuaian atau isoflavon bebas.(9)(11) Biotransformasi isoflavon terjadi karena adanya aktivitas β-glukosidase yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang digunakan untuk memfermentasi substrat yang dipilih. Kandungan aglikon dari isoflavon (daidzein, glycitein dan genistein) disajikan pada Gambar 2.

Kandungan genistein pada sampel yang difermentasi oleh *P. ostreatus* dan *N. Sitophila* lebih rendah jika dibandingkan kontrol. Sebuah percobaan yang berkaitan dengan degradasi in vitro flavonoid oleh usus mikroflora mengungkapkan bahwa genistein memiliki laju degradasi yang cepat sedangkan daidzein dan glycitein memiliki laju degradasi yang lambat. Fenomena ini diduga karena struktur genistein yang memiliki gugus hidroksil pada posisi 5.(16)

Laju degradasi genistein, kemungkinan menghasilkan kandungan aglikon yang lebih rendah.

Kisaran kandungan protein pada penelitian ini mirip dengan yang diteliti oleh Queiroz Santos *et al.*(9) Fermentasi okara dengan dan tanpa perlakuan panas sebelum fermentasi oleh *S. cereviceae* menunjukkan bahwa kandungan protein okara segar, okara yang difermentasi dengan dan tanpa perlakuan panas adalah 32,8 g / 100 g, 36,2 / 100 g, 40,5 g / 100 g (% massa kering), masing-masing. Studi lain menunjukkan kesesuaian dengan temuan penelitian ini. Studi pada *soymeal* yang difermentasi oleh *P. ostreatus* menemukan bahwa kandungan protein kasar meningkat sebanyak 9% pada *soymeal* yang difermentasi dibandingkan dengan sampel yang tidak difermentasi.(17)

Nilai kandungan protein yang lebih rendah ditemukan dalam beberapa penelitian sebelumnya.(18)(19) Vong *et al.*, menemukan bahwa okara sebelum fermentasi memiliki kandungan protein 26,20% massa kering dan tidak mengalami perubahan signifikan selama lima hari fermentasi oleh ragi *Y. lipolytica*.(18) Li *et al.* menemukan bahwa kandungan protein dari residu dadih kedelai yang tidak difermentasi adalah 24,9 g / 100 g dan meningkat menjadi 28,1 g / 100 g, setelah fermentasi *M. esculenta*

selama 21 hari.(19)

Kandungan protein okara yang difermentasi dalam penelitian ini meningkat secara signifikan dibandingkan dengan okara yang tidak difermentasi. Peningkatan ini mungkin karena inokulasi dengan jamur berkontribusi pada biomassa mikroorganisme serta akumulasi pertumbuhan sel selama fermentasi.(9)

Kobayashi *et al.* meneliti bahwa isoflavon beserta konstituen protein pada susu kedelai yang difermentasi oleh bakteri asam laktat (BAL), bersama-sama bekerja mencegah dislipidemia pada tikus yang diberi diet tinggi kolesterol.(20) Studi ini menemukan bahwa susu kedelai yang difermentasi oleh BAL memiliki isoflavon aglikon yang dapat meningkatkan metabolisme lipid tikus yang diberi diet tinggi kolesterol. Namun, hal ini tidak hanya dipengaruhi oleh isoflavon aglikon tetapi karena efek kerjasama dengan protein kedelai.

Secara umum, seluruh sampel yang telah mengalami fermentasi memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan sampel. Gan *et al.* menemukan bahwa fermentasi dapat meningkatkan bioavailabilitas polifenol legum sehingga meningkatkan kapasitas antioksidannya.(21)

KESIMPULAN

Kandungan aglikon konjugat isoflavon umumnya meningkat setelah fermentasi oleh tiga spesies kapang/ jamur yang berbeda. Peningkatan ini diduga karena aktivitas β -glukosidase yang diproduksi oleh kapang/ jamur dan melakukan pemecahan glikosida. Kandungan protein okara yang difermentasi dalam penelitian ini meningkat secara signifikan dibandingkan dengan okara yang tidak difermentasi. Analisis sifat kimia terutama aktivitas antioksidan menunjukkan okara yang difermentasi oleh jamur/ kapang menunjukkan aktivitas antioksidan yang relatif lebih tinggi apabila dibandingkan dengan sampel tanpa fermentasi (kontrol).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih atas dukungan yang diberikan oleh Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi untuk penyediaan dana penelitian melalui Skema Penelitian Dosen Pemula, sehingga penelitian dapat dilakukan dengan baik.

KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak ada konflik dalam publikasi artikel ini

DAFTAR PUSTAKA

1. Zaheer K, Humayoun Akhtar M. An updated review of dietary isoflavones: Nutrition, processing, bioavailability and impacts on human health. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017;57(6):1280–93.
2. Vitale DC, Piazza C, Melilli B, Drago F, Salomone S. Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2013;38(1):15–25.
3. Faisal M, Gani A, Mulana F DH. Treatment and Utilization of Industrial Tofu Waste in Indonesia. *Asian J Chem*. 2016;28(3):501–7.
4. Li S, Zhu D, Li K, Yang Y, Lei Z, Zhang Z. Soybean Curd Residue: Composition, Utilization, and Related Limiting Factors. *ISRN Ind Eng*. 2013;2013:1–8.
5. Li B, Lu F, Nan H, Liu Y. Isolation and structural characterisation of okara polysaccharides. *Molecules*. 2012;17(1):753–61.
6. Li S, Wang L, Song C, Hu X, Sun H, Yang Y, et al. Utilization of soybean curd residue for polysaccharides by *Wolfiporia extensa* (Peck) Ginns and the antioxidant activities in vitro. *J Taiwan Inst Chem Eng*. 2014;45(1):6–11.
7. Puechkamut Y, Panyathitipong W. Characteristics of proteins from fresh and dried residues of soy milk production. *Kasetsart J - Nat Sci*. 2012;46(5):804–11.
8. Shi M, Yang Y, Li Y, Wang Y, Zhang Z. Optimum Condition of Ecologic Feed Fermentation by *Pleurotus ostreatus* Using Soybean Curd Residue as Raw Materials. *Int J Biol*. 2011;3(4):2–12.

9. Queiroz Santos VA, Nascimento CG, Schimidt CAP, Mantovani D, Dekker RFH, da Cunha MAA. Solid-state fermentation of soybean okara: Isoflavones biotransformation, antioxidant activity and enhancement of nutritional quality. *Lwt*. 2018;92:509–15.
10. Yulifianti R, Muzaiyanah S, Utomo JS. Kedelai sebagai Bahan Pangan Kaya Isoflavon. *Bul Palawija*. 2018;16(2):84–93.
11. Hwan Nam D, Jung Kim H, Sun Lim J, Heon Kim K, Park CS, Hwan Kim J, et al. Simultaneous Enhancement of Free Isoflavone Content and Antioxidant Potential of Soybean by Fermentation with *Aspergillus oryzae*. *J Food Sci*. 2011;76(8):194–200.
12. Jackson CJC, Dini JP, Lavandier C, Rupasinghe HPV, Faulkner H, Poysa V, et al. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Process Biochem*. 2002;37(10):1117–23.
13. Vyn TJ, Yin X, Bruulsema TW, Jackson CJC, Rajcan I, Brouder SM. Potassium fertilization effects on isoflavone concentrations in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *J Agric Food Chem*. 2002;50(12):3501–6.
14. Sumardi D, Pancoro A, Yulia E, Musfiroh I, Prasetyono J, Karuniawan A, et al. Potential of local black soybean as a source of the isoflavones daidzein and genistein. *Int Food Res J*. 2017;24(5):2140–5.
15. Brand-Williams MEC, Berset C. Respostas Perceptivas E. *LWT - Food Sci Technol*. 1995;28(1):25–30.
16. Simons AL. Structure - degradation relationships of flavonoids and their correlation to human bioavailability. Ames, Iowa, USA: Iowa State University. 2005.
17. Mandyam K, Njiti V, Singleton R, Nanjundaswamy AK. Fermentation Optimization of Macro-Fungus *Pleurotus Sajor-Caju* on Soymeal. *Ferment Technol*. 2017;6(2):29–31.
18. Vong WC, Au Yang KLC, Liu SQ. Okara (soybean residue) biotransformation by yeast *Yarrowia lipolytica*. *Int J Food Microbiol*. 2016;235:1–9.
19. Li S, Chen Y, Li K, Lei Z, Zhang Z. Characterization of physicochemical properties of fermented soybean curd residue by *Morchella esculenta*. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2016;109:113–8.
20. Kobayashi M, Egusa S, Fukuda M. Isoflavone and protein constituents of lactic acid-fermented soy milk combine to prevent dyslipidemia in rats fed a high cholesterol diet. *Nutrients*. 2014;6(12):5704–23.
21. Gan RY, Shah NP, Wang MF, Lui WY, Corke H. Fermentation alters antioxidant capacity and polyphenol distribution in selected edible legumes. *Int J Food Sci Technol*. 2016;51(4):875–84.