المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك

المجلد (7) العدد (2)
لسنة 2015

تأثير كبريتيت الصوديوم في فعالية مثبطات الترسين والبروتين المعزول والذائب لبذور الفاصوليا البيضاء الكاملة والمزالة القشور.

عبد القادر هادي علوان عامر عبد الله
مركز التقانات/ دائرة البحوث الزراعية
وزارة العلوم والتكنولوجيا

تأريخ استلام البحث: 2015/9/1 تأريخ قبول النشر: 2015/12/9

الخلاصة

هدفت الدراسة الى زيادة القيمة الحيوية لبذور الفاصوليا البيضاء، وتم دراسة تأثير التراكيز المختلفة من محلول كبريتيت الصوديوم 0.01 و 0.02 و 0.03 و 0.04 مولار وبدرجة حرارة 70م لمدة ساعة في فعالية مثبطات الترسين والبروتين المعزول والذائب لمسحوق الفاصوليا البيضاء الكاملة والمزالة القشور واظهرت النتائج انخفاض فعالية مثبطات الترسين في طحين البذور الكاملة بنسبة 42.97 و 58.69 و 68.59 و 69.58% عند التراكيز 0.01 و 0.02 و0.03 و 0.04 مولار على التوالي، أما في طحين البذور المزالة القشور فكانت القيم المقابلة 50.43 و 61.00 و75.61 و85.66% على التوالي. احتوى انموذج السيطرة على 13.41% من البروتين المعزول و 2.2% بروتين ذائب، وادت المعاملة الكيميائية الى خفض تدريجي في نسبة البروتين المعزول والذي بلغ ادناه 11.54% عند تريز 0.04 مولار في حين ازداد البروتين الذائب ليصل 2.53% عند نفس التريز.

الكلمات المفتاحية: كبريتيت الصوديوم، مثبط الترسين، الفاصوليا البيضاء.

المجلد (7) العدد (2)
لسنة 2015

المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك

Effect of Sodium sulfite treatment on the trypsin inhibitors activity, protein isolate and protein solubility of complete and dehulling white bean seeds *Phaseolus vulgaris.*

Abdul Kadir Hadi Alwan **Amer Abdulhadi Jawad**
Biotechnology Center/ Directorate of Agric Res.
Ministry of Science & Technology

Abstract

The study aimed to increase the biological value of white bean. The effect of different concentrations 0.01 ,0.02,0.03,and 0.04 M of sodium sulfite solutions for 1hr at 70 ºC on the trypsin inhibitors activity, protein isolate and protein solubility of complete and dehulling white bean flour were studied.Trypsin inhibitors activity were reduced by 42.97, 58.69, 68.59 and 69.58% in complete white bean flour at 0.01 ,0.02, 0.03, 0.04 M respectively, while the corresponding values were 50.43, 61.00, 75.61 and 85.66% respectively in dehulling white bean flour .Protein isolate value was 13.41% and protein solubility was 2.2% in control sample, Furthermore, the using of chemical treatment showed that protein isolate was reduced gradually and the minimum value was 11.54% at 0.04M, while soluble protein increased to the maximum value of 2.53% in the same concentration.

Key words: Sodium sulfite, Trypsin inhibitors. White bean.

المقدمة

تعد العائلة البقولية Fabaceae من أهم العوائل النباتية كونها تشمل إعدادا كبيرة من المحاصيل ألاقتصادية التي تمتاز باحتوائها على نسبة عالية من البروتين والزيت والنشا والمعادن فضلا عن الفيتامينات الضرورية للجسم (17)، ألا أن البقوليات تحتوي على العديد من المحددات التغذوية (Anti-nutritional factors) والتي لها ألأثر السلبي في القيمة التغذوية لهذه المحاصيل، من هذه المحددات التانينات ومثبطات الترسين (4؛ 5)، وتعد الفاصوليا البيضاء *Phaseolus vulgaris* احد البقوليات الشائعة للاستهلاك البشري (التي تتميز بطول عمرها ألخزني) من المصادر البروتينية المهمة علاوة على احتوائها على الألياف الغذائية والنشا والزيت والفلافونيدات وغيرها (20)، الا أنها تمتلك مستويات عالية من مواد ذات طبيعة بروتينية لها نشاط مثبط لانزيم الترسين المعوي (12)، وتتميز مثبطات الترسين في البقوليات بقابلية تحملها للعصارة الهاضمة والقابلية على ألارتباط بقوة مع المجاميع الفعالة لأنزيم الترسين مكونة معه معقد يصعب التحرر منه، مما يعيق تكسر الجزئات البروتينية وبالتالي خفض معامل هضمها والذي ينعكس سلبا على النمو، وان هذا ألارتباط يؤدي إلى ألإفراز المفرط للأنزيم وقد يؤدي الى إجهاد البنكرياس وإلأصابة بمرض التضخم البنكرياسي Pancreatic hypertrophy (12؛ 16) أما التانينات فلها القابلية على ألأرتباط بالبروتينات (منها ألأنزيمات) (6)، وتؤثر التانينات ومثبطات الترسين بشكل سلبي كبير في استهلاك البقوليات ومنها الفاصوليا البيضاء، ولغرض زيادة التوجه لاستهلاك هذا النوع من الغذاء فقد استعملت طرائق عديدة ومتنوعة للتخلص أو التقليل من محتوى محددات هذه البذوروخصوصا مثبطات الترسين، وتعد المعاملة الحرارية من الطرائق الشائعة لخفض هذه المحددات في البقوليات، الا ان لها الاثر السلبي في ذوبانية البروتين وبعض الحوامض الامينية منها الاساسية كالسستين، علاوة على تاثيرها المحدود في شل فعالية المثبطات(2؛ 22)، لذا يتوجب عند استعمال المعاملة الحرارية في البقوليات مراعاة الظروف المثلى من درجة الحرارة ووقت التسخين والرطوبة النسبية والضغط الجوي لضمان خفض فعالية المثبطات مع الحفاظ على نوعية البروتين، وقد صنفت منظمة الاغذية والادوية الامركية FDA (7) مرئب كبريتيت الصوديوم كمادة امينة (GRAS) Generally Recocognized As Save وسمحت باستعماله في حفظ الاغذية والادوية، واشار كلا من (15؛ 18) الى امكانية حفظ العديد من الاغذية كالمعجنات والاجبان والسمك والصوصج والحلويات واللحم المثروم

باستعمال كبريتيت الصوديوم, وهو مرئب غير مطفر(19) بل على العكس من ذلك بين Winkler (23) ان لهذا الملح القابلية في كبح تطفير بعض خلايا جسم الانسان. لذا فقد هدف البحث الى دراسة اثر المعاملة الكيميائية بكبريتيت الصوديوم بتراكيز مختلفة المصاحب للمعاملة الحرارية على نشاط مثبطات الترسين وكمية البروتين المستخلص (معزول البروتين) ونسبة البروتين المذاب في الفاصوليا البيضاء.

المواد وطرق العمل

تم شراء الفاصوليا البيضاء الخشنة من ألأسواق المحلية، واستبعدت البذور المتكسرة والمصابة واعتمدت البذور البيضاء البراقة الخالية من عيوب اللون، وجرى غسل البذور بالماء المقطر وجففت بدرجة حرارة 50 م ثم قسمت بذور الفاصوليا إلى ارع فئات وبوزن 100 غم/ فئة فضلا عن انموذج السيطرة، وتم اعتماد الطريقة التي ذكرها (8) في المعاملات والتي تضمن عدم بقاء اي نسبة من الكبريت في النماذج مع اجراء بعض التغييرات البسيطة، اذ وضعت كل فئة من الفئات الأربعة في دورق سعة 500 مللتر وخلطت مع محلول كبريتيت الصوديوم بارتفاع 2 سم فوق الفاصوليا بالتراكيز 0.01 و 0.02 و 0.03 و 0.04 مولار كلا على حده، ثم وضعت في حمام مائي وسخنت النماذج الى درجة حرارة 70 م لمدة ساعة. رشحت البذور بمصفي معدني وغسلت بالماء المقطر وجففت بدرجة حرارة 50 م وطحنت بقطر 0.1 ملم ثم حفظت بالثلاجة، وبنفس الطريقة أعلاه تم معاملة أرع فئات أخرى أزيلت القشور منها، وأجريت التحاليل بمكررات ثلاثة لكل معاملة لتحديد نسبة فعالية مثبطات الترسين لكل معاملة ونسبة كلا من معزول البروتين والبروتين الذائب للفاصوليا الكاملة والمقارنة مع نموذج السيطرة .

ألتحاليل الكيميائية:

تم قياس النسبة المئوية للبروتين والزيت والرطوبة والرماد في نماذج الفاصوليا حسب الطرائق المعتمدة من(3) قبل AOAC (23) أما بقية الكربوهيدرات (من ضمنها ألألياف) فحسبت على أساس الفرق بالوزن، حسب المعادلة التالية:

الكاروهيدرات% = 100– (البروتين + الزيت + الرماد+ الرطوبة).

تقدير البروتين الخام:

قدر البروتين الخام باستعمال طريقة المايكروكلدال Micro – Kjeldal، اذ تم الهضم بجهاز Selecta بدرجة حرارة 375 م، ثم سحح النتروجين المستحصل بصيغة الامونيوم ضد حامض الهيدروكلوريك (0.1N) وحسبت نسبة البروتين الخام بضرب قيمة النتروجين الناتجة بالمعامل 6.25.

$$\%\ N = \frac{(A-B)\ xN\ x1400}{W}$$

N% نسبة النتروجين المئوية .

A عدد ملليليترات حامض HCl القياسي المستهلك بعملية التسحيح للانموذج.

B عدد ملليليترات حامض HCl القياسي المستهلك بعملية التسحيح للبلانك.

N عيارية الحامض القياسي معبرا عنه بالعيار (0.1) والمستعمل في عملية التسحيح.

W وزن النموذج بالملغرام.

تقدير البروتين الذائب في الماء:

تم قياس البروتين الذائب للنماذج باذابة 100 ملغم من طحين الفاصوليا المزال الدهن في 10مللتر من الماء المقطر المزال منه الايونات، وخلط بالخلاط المغناطيسي نوع Labinco هولندي الصنع ولمدة ساعة في درجة حرارة الغرفة، وأجريت عملية النبذ المركزي بسرعة 5000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة ثم اجري قياس النتروجبن الذائب (للرائق) بنفس طريقة تقدير البروتين الخام ولكل معاملة على حدة.

تقدير الزيت:

قدرت النسبة المئوية للزيت باستعمال جهاز الاستخلاص المستمر Soxhlet apparatus، اذ وضع وزن معين من الانموذج المطحون في كشتبان ألاستخلاص السليلوزي thimble وأستعمل الهكسان كمذيب للاستخلاص لمدة 8 ساعات تلتها إزالة المذيب بجهاز المبخر الدوار نوع IKA RV– 05 basic ألماني الصنع تحت الضغط

المخلخل وعند درجة حرارة 50 مئوي وزن الزيت بعد انتهاء المذيب وحسبت نسبته المئوية في النماذج.

تقدير الرماد:

قدر الرماد في النماذج بحرق وزن معين من الانموذج في فرن الترميد نوع (Lab tech) كوري الصنع بدرجة حرارة 550 م لحين الحصول على رماد لونه ابيض أو رمادي فاتح. تم وزن الرماد وحسبت نسبته المئوية.

تقدير الرطوبة:

قدرت رطوبة النماذج بعد وزنها وتجفيفها كلا على حدة في فرن Lab tech بدرجة حرارة 105 م لمدة ساعة ثم وضعت في مجفف زجاج Disctator يحوي هلام السليكا الذاتي وبعد الوزن أعيدت االنماذج إلى الفرن لمدة ساعة إضافية ثم وضعت بالمجفف الزجاجي وكررت العملية حتى الوصول إلى الوزن الثابت، ثم حسبت النسبة المئوية لرطوبة النماذج بفارق الوزن.

تحضير وتقدير بروتين ألفاصوليا المعزول:

تم استخلاص وتقدير بروتين الفاصولياالمعزول حسب Ghanbarzadeh (10)، وتم طحن بذور الفاصوليا لكل معاملة على حدة وجرى استخلاص الزيت من الطحين بالهكسان وبنسبة [1 نموذج : 2مذيب] ولمرتين ولمدة 10 دقائق بدرجة حرارة 50 م، وتم استخلاص البروتينات من كل معاملة بإذابة 100 غم من الطحين في 1000مللتر من الماء وتعديل إلاس الهيدروجيني الى 10.5 باستعمال محلول 5N NaOH والتحريك لمدة 30 دقيقة (4)، وأجريت عملية النبذ المركزي 5000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة، ثم فصل الرائق وعدل الاس الهيدروجيني إلى 4.5 بمحلول 5NHCl لترسيب البروتين، ثم فصلت البروتينات بالنبذ المركزي مجددا 5000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة ثم غسل البروتين بالماء المقطر وعدل الاس الهيدروجيني الى 7.0 بوساطة محلول 5N NaOH وجففت بدرجة حرارة 50 م ثم وزن.

تقدير فعالية مثبط الترسين:

قدرت فعالية مثبط إنزيم الترسين حسب الطريقة الموضحة من قبل (14) باستعمال الكازين كمادة خاضعة للتفاعل والتي تعتمد على قياس نسبة تحلل الكازين بوساطة إنزيم الترسين وان كل وحدة واحدة من مثبط الترسين تعمل على خفض فعالية الترسين وحدة

واحدة، وتم استعمال جهاز Shimadzu ياباني الصنع لقياس نسبة الأحماض ألأروماتية الحرة التي تزداد بزيادة تحلل الكازين والتي تمتص الضوء على طول موجي 280 نانومتر.

تقدير التانين:

تم تقدير نسبة التانين باستعمال جهاز الاستخلاص المستمر Soxhlet appratuse بوضع الانموذج المطحون والمزال منه الزيت (بالهكسان) في كشتبان الاستخلاص السليلوزي thimble واستعمل الميثانول كمذيب لاستخلاص التانينات ولمدة 18 ساعة تلتها ازالة المذيب بجهاز المبخر الدوار نوع IKA RV 05 basic تحت الضغط المخلخل عند درجة حرارة 50م، ويعد وزن التانينات تم حساب النسبة المئوية (13).

التحليل ألإحصائي:

تم تحليل نتائج التجربة باستعمال البرنامج ألإحصائيSPSS– system. وتمت المقارنة بين المتوسطات باستعمال اختبار دنكن عند مستوى معنوية0.05%(1).

النتائج والمناقشة

قدرت النسب المئوية للتركيب ألأجمالي في نماذج مطحون بذور الفاصوليا البيضاء الكاملة والمزالة القشور، ويبين (الجدول، 1) نسب المكونات الكيميائية لبذور الفاصوليا الكاملة والمزالة القشور، اذ بلغت نسبة البروتين 23.60 والزيت 1.62 والرماد 2.31 والرطوبة 5.82 والتانينات 1.06 والكروهيدرات 65.59%، وقد أدت عملية إزالة القشور إلى زيادة كل من البروتين والزيت والرطوبة وانخفاض نسبة الكروهيدرات والرماد والتانينات، وبلغت نسبة التانينات الكلية في طحين الفاصوليا الكاملة 1.06% في حين انخفضت النسبة في الفاصوليا المزالة القشور الى 0.2% وهذا يبين تركيز التانينات في القشور.

قدرت النسبة المئوية للفقد في فعالية مثبطات إنزيم الترسين في النماذج المدروسة ويبين (الجدول، 2) النسبة المئوية للانخفاض والتي بلغت 42.97 و 58.69 و 68.59 و 69.58% في الفاصوليا الكاملة المعاملة بكبريتيت الصوديوم بتراكيز 0.01 و 0.02 و 0.03 و 0.04 مولار على التوالي، في حين بلغت نسب الاتخفاض المقابلة في الفاصوليا المزالة القشور 50.43 و 61.00 و 75.61 و 85.66% عند التراكيز المذكورة، على التوالي.

ويلاحظ في الجدول زيادة في تثبيط فعالية مثبطات الترسين في طحين البذور المزالة القشور عند المقارنة مع القيم المقابلة في طحين البذور الكاملة وهذا قد يعود إلى انخفاض مستويات التانينات الموجودة بالقشور بنسبة كبيرة والتي لها القابلية على ألأرتباط بالبروتينات مما زاد من فعالية إنزم الترسين. تستعمل بعض المرئبات الكيماوية وخصوصا الحاوية على الكبرت ومنها كبرتيت الصوديوم في تثبيط فعالية مثبطات الترسين في درجات الحرارة االمرتفعة نسبيا، وقد أشارت دراسة اجراها Friedman (9) إلى إن أواصر الكبرت الموجودة في كبرتيت الصوديوم تعمل على دمج مثبطات الترسين مع البروتينات مما يؤدي إلى حدوث تحوير في ترئيب تلك المثبطات مما يؤدي الى ايقاف فعلها التثبيطي للترسين, في حين أشارت دراسة قام بها Sessa (21) إلى إن المعاملة بالمرئبات الكبرتية تؤدي إلى تكوين مشتقات الثايولات Thiols وحامض السلفونيك المرتبط بالكبرت S-Sulfonic acid والتي تغير ترئيب المثبط وتقليل فعاليته، وقد جاءت نتائج هذه الدراسة متفقة مع ما توصل إليه (8) الذي أشار إلى إن استعمال محلول كبرتيت الصوديوم بترئيز وحرارة معينين لمدة ساعة أدى إلى شل فعالية مثبطات الترسين تماما في طحين فول الصويا دون أن يترك اثر للكبرت في بروتين ذلك الطحين.

يبين (الجدول، 3) نسبة البروتين المعزول والذائب في انموذج السيطرة، اذ بلغت 13.41% ونسبة البروتين الذائب 2.2%، فقد ادت المعاملة بمحلول كبرتيت الصوديوم المصاحبة للحرارة الى انخفاض مستوى نسبة البروتين المعزول بازدياد ترئيز محلول الكبرتيت، فضلا عن ان ألانخفاض كان تدرجيا نسبيا مع ارتفاع نسبة البروتين الذائب، كما ان زيادة الذوبانية يمكن ان ترجع الى تكون ببتيدات اصغر نتيجة للمعاملة المزدوجة المذكورة، وانفتاح المجاميع المحبة للماء وزيادة تداخل الحوامض الامينية مع الماء، وتعدالمعاملة الحرارية إحدى الطرق الفعالة في إزالة مثبطات الترسين في البقوليات، فقد اشار Griffiths (11) الى حصول مسخ لمثبطات الترسين بنسبة 72.7%عند التعرض لحرارة المؤصدة، وان هذا ألاختزال للمثبط ادى إلى تحسين القيمة التغذوية لذلك البقول، إلا إن المعاملة الحرارية العالية لها اثر سلبي في العديد من الخصائص الوظيفية، إذ تتغير تداخلات البروتينات مع بعضها وتظهر تداخلات جديدة بين البروتينات ومواد أخرى مثل الزيت والماء والكروهيدرات والعناصر المعدنية وبالتالي تكوين بروتينات جديدة عالية اللزوجة منخفضة الذوبانية ناتجة من تغيير الشكل الترئيبي للبروتينات (Denaturation)، لذا يمكن إن تكون المعاملة بكبرتيت الصوديوم

البسيطة فعالة لخفض مستويات هذا المثبط التغذوي في الفاصوليا البيضاء ورفع كفاءة الاستفادة من بروتين هذه البذور وزيادة الاستهلاك البشري دون التأثير على ترئيب البروتين بشكل كبير، وبناء على النتائج السابقة من الدراسة وجد ان المعاملة بمحلول كبريتيت الصوديوم المرافقة للحرارة القابلية العالية اثرت على خفض مثبط الترسين وزيادة محدودة في البروتين الذائب ونتيجة لذلك سيكون زيادة في معامل هضم البروتينات والقيمة الحيوية لها.

جدول (1): النسب المئوية للمكونات الكيميائية لبذور الفاصوليا البيضاء الكاملة والمزالة القشور.

المعاملة	البروتين (%)	الزيت (%)	الرطوبة (%)	الرماد (%)	الكروهيدرات (%)	التانينات (%)
فاصوليا بيضاء كاملة	23.60	1.62	5.82	2.31	65.59	1.06
فاصوليا بيضاء مزالة القشور	24.16	1.79	6.09	2.29	65.47	0.20

جدول (2): أثر المعاملة بكبريتيت الصوديوم في النسبة المئوية لفعالية مثبطات الترسين في طحين الفاصوليا البيضاء الكاملة والمزالة القشور.

المعاملات مولاري	طحين بذور الفاصوليا الكاملة		طحين بذور الفاصوليا مزالة القشور	
	وحدات مثبطات الترسين.	(%) الفقد في وحدات الترسين	وحدات مثبطات الترسين.	(%) الفقد في وحدات الترسين.
السيطرة	24.2d	00.0	24.2e	00.0
0.01	13.8c	42.97	11.99d	50.43
0.02	10.00b	58.69	9.44c	61.00
0.03	7.60a	68.59	5.90b	75.61
0.04	7.36a	69.58	3.48a	85.66

*ألأحرف المتشابه تشير الى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال(**P≤ 0.05**).

جدول (3): أثر المعاملة بكبريتيت الصوديوم في النسب المئوية لبروتين الفاصوليا المعزول والبروتين الذائب في شرش طحين الفاصوليا البيضاء الكاملة.

	انموذج السيطرة	0.01M	0.02M	0.03M	0.04M
البروتين المعزول(%)	13.41a	13.00a	12.91a	12.87a	11.54b
البروتين الذائب غم/لتر.	2.20b	2.28ab	2.33ab	2.45ab	2.53a

*ألأحرف المتشابه تشير الى عدم وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال(**P≤ 0.05**).

المصادر

1. الراوي، خاشع محمود وخلف الله، عبد العزيز .(1980). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. دار الكتب للطباعة والنشر. العراق.

2. Anderson, R. L. (1992). Effect of steaming on soy bean proteins and trypsin inhibitors . J. Am. Oil Chem. Soc. 69 :1170-1176.

3. Association of Official Analytical Chemists (AOAC).(1984). Official, Methods of Analysis 14th ed, Washington. D. C.

4. Batista, K. A.; Prudencio, S. and Hand Fernandes, K .F.(2010**)**. Changes in the functional properties and anti nutritional factors of extruded hard cook common beans(*Phaseolus vulgaris)* .J .Food Sci. 75(3): 286-290.

5. Diaz-batalla, L. (2006**)**. Chemicals components with health implication in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris*), J. Agric. Food Chem. Washington.54:2045-2052.

6. Deavill, E.; Green, R.; Mueller- Harveey, I.; Willoughbyl, L.and Fraizer, F.(2007). Hadrozable tannin structures influence relative globular and random coil protein binding strengths. J. Agric. Food Chem. 55: 4554- 4561.

7. FDA. (1977). Food and Drug Administration, Food for human consumption, part 182 substances generally recognized as safe., U.S. Department of health and human services. Authority: 21. U.S.C321.342, 348, 371.

8. Friedman, M., and Gumbmann, M. R. (1986). Nutritional improvement of soy flour through inactivation of trypsin inhibitors by sodium sulfite. J. Food sci.51(5):1239-1241.

9. Friedman, M. and Gumbmann, M. R. (1986**)**. Nutritional improvement of legume proteins through disulfide interchange. Adv. Exp, Med, 199:357-89.

10. Ghanbarzadeh, B.; Oromiehe, A.; Manssani, M.; Reezzay, R.; Amsi, E. and Milani, J. (2006**)**. Investigation of water vapour permeability, hydrophobicity, on morphology of zein films plasticized by polyoles. Iranian Polymer J. 15(9): 691-700 .

11. Griffiths, D. W. (1984). The trypsin and chemotrypsin inhibitor activities of various pea (Pisum spp) and field bean(*Vicia faba*). J. Sci. Food Agri. 35: 481-486.

12. Guillamon, E.; Pedora, M. M.; Curdudo, B.; Cortesanches, M. and Muzquiz, M. (2008). The trypsin inhibitors present in seeds of different grain legumes species and cultivar. Food chemistry. 107: 68-74.

13. Hagerman, A. E. and Butler, L .G. **(**1978**)**. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins .J. Agric. Food Chem. 26: 809-812 .

14. Kakade, M. L.; Simons, N. and Liener, I. E. **(**1969). An evaluation of natural vs. synthetic substrates measuring the antitryptic of soy bean sample. Cereal Chem. . 46: 518 -526.

15. Karasz, A. B.; Maxtadt, J. J.; Reher, J. and Decocco, F. (1976). Rapid screening procedure for the determination of preservatives in ground beef, sulfites, benzoate, sorbates and ascorbates. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 59: 766-769.

16. Liener, I. E. (1980). Toxic Constituents of Plant Food Stuffs. 2nd ed., Academic Press. New York.

17. Liu, K. (2001). Soy Bean Chemistry, Technology and Utilization. ITP. International Thomson Publishing. chapman & Hall Book. Tokyo.

18. Luck, E. (1990). Food applications of sorbic acid and its salts. Food Addit. Contam. 7: 711-715.

19. Nair, B. and Elmore, A. R. (2003). Cosmetic ingredients review expert panel, Final report on the safety assessment of sodium sulfite, potassium sulfite, ammonium sulfite, sodium bisulfate, ammonium bisulfate, sodium metasulfite, potassium bisulfate. Int. J. Toxicol. 22:63-88.

20. Paiva, K. C.; Carvalho, M. R. B. and Pizaro junior, J. M. **(**2011**)**. Effectiveness inactivation of trypsin inhibitor from Brazilian

cultivars of bean (*Phaseolus vulgaris*) Alim. Nyr. Araraquara. 22(3): 331-337.

21. Sessa, D. J. and Ghantous, P. E. (1987**)**.Chemical inactivation of soy bean trypsin inhibitors .JAOCS. 64:1681-687.

22. Skred, A. and Krogdal. A. (1985). Heat effects on nutritional characteristics of soy bean meal and excretion of proteinases in mink and chicks. Nutr. Rep. Int. 32: 479.

23. Winkler, C.; Frick, B.; Schroeksnadel, K.; Schennach, H. and Fuchs, D. (2006). Food preservatives sodium sulfite and sorbic acid suppress mitogen- stimulated peripheral blood mononuclear cells. Food and Chem. Toxicol. 44:2003-2007.