

DETOKSİFİYE EDİCİ ENZİMLER

DETOKSIFYING ENZYMES

Özer KINIK, Necati AKBULUT

Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü-İZMİR

ÖZET: Dünya nüfusunun sürekli ve hızlı bir şekilde artması protein yetersizliğinin çözümünde bitkisel kaynaklı protein çeşitlendirilmesini gerekli kılmıştır. Ancak, bitkisel kaynaklı proteinlerin bir bölümü bunların işlenmeleri yada tüketilmeleri sırasında uygun yöntemlerin kullanımı yolu ile inaktive edilemezler ise insanlarda bir takım beslenme ve sindirim bozukluklarına yol açabilirler.

SUMMARY: Proteins of plant origin considerable promise for alleviating the shortage of food protein recently facing many segments of the world's population so it should be recognized, however, that many plants commonly consumed by man contain substances which may have an adverse effect on the nutritional properties of the protein unless inactivated or eliminated by suitable methods.

GİRİŞ

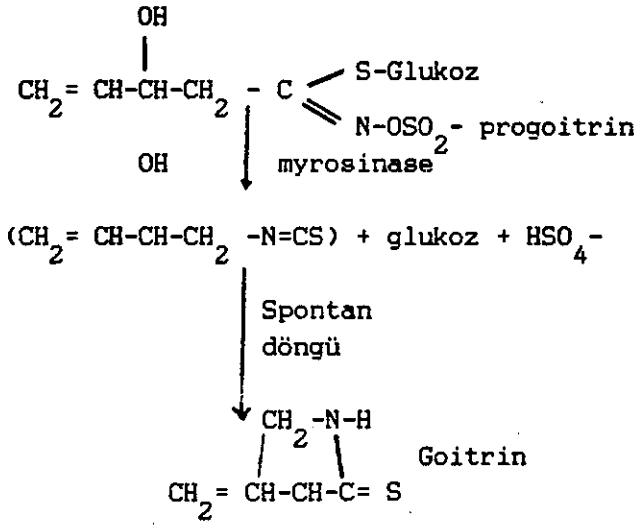
Dünya nüfusunun sürekli ve hızlı bir şekilde artması, gıdalarla alınan protein yetersizliği sorununun çözümünde bitkisel kaynaklı protein çeşitlendirilmesini gerekli kılmıştır. Ancak bitkisel kaynaklı proteinlerin bir kısmı, bunların işlenmeleri ve tüketime sunulmaları esnasında uygun yöntemlerinin kullanımı yolu ile inaktive ve elimine edilemezler ise insanlarda bazı beslenme ve sindirim bozukluklarına yol açabilirler (LIENER, 1987). Bu maddelerin çoğu doğal halde zararsız iken, bitki dokusunda bulunan enzimlerin etkisi neticesinde toksik hale dönüşebilirler. Bu yüzden plantasyonların bünyesindeki endogen enzimler uygun yöntemlerin seçilmesi ya da küf ve bakteri fermentasyonları sonucu oluşan eksogen enzimler ile bu mikroorganizmalardan elde edilen enzim preparatları toksik etkili maddelerin uzaklaştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada da insan ve hayvan beslenmesinde yararlanılan gıda maddelerindeki bazı toksik maddeleri detoksifiye etmek için gerek endogen gerekse ekzogen enzimlerin kullanım olanakları irdelenmiştir.

GOİTROGENİK GLİKOSİTLER

Kolza tohumu, hardal tohumu, habes tohumu gibi *Crusifera* familyasında yer alan bitkiler sadece hayvan beslenmesinde değil insan beslenmesinde de potansiyel olarak değerli bir protein kaynağını teşkil etmektedirler (LIENER, 1987). Yağ ekstraksiyonundan sonra kalan küspelerdeki protein miktarını oransal olarak fazla olduğu ve amino asit bileşimlerinin de yüksek değerli soya proteinleri ile karşılaştırılabileceği belirtilmektedir (LIENER, 1987). Mamafih böyle yağlı tohumların kullanımı ile sülfür içeren glikositlerin (glucosinolate) yüksek düzeyde alınımı sınırlıdır. Bu glikositlerin mamullerde arzu edilmeyen bileşiklere parçalanması insanlarda gelişmeyi önleyici ve guatr oluşumunu arttırıcı etki yapmaktadır (TOOKEY ve Ark., 1980).

Bu goitrogenik maddeler; tohumlar ezildikten ve ıslatıldıktan sonra glukosinolat bağları üzerine etki eden endogen enzimlerinden myrosinase (thioglucoside glukohidrolaz) ana glikositten açığa çıkardıkları isotiyosiyonat ve oxazolidine- thiones'tur.

Krusifera familyası üyelerinin yapısında çeşitli glukosinolatlar bulunmakta olup bunlardan kolza tohumu ile crambe tohumunun yapısında bulunana progoitrin ismi verilmektedir. Şekil 1'de gösterildiği gibi myrosinase enziminin aktivitesi sonucu progoitrin isotiyonate ve spontan olarak oluşan bir döngü sonucu da goitrine (5-Vinyloxazolidine-2-thione) kadar parçalanır.



Şekil 1. Progoitrinin goitrine enzimatik hidrolizi

rının sindirim sistemi florasında bulunan mikroorganizmaların glikosinolatların goitrogenik son maddelere parçalanmasını katalizlemedikleri saptanmıştır. Özellikle ısı işlem uygulaması ile kombine edilen çeşitli solventlerle ekstraksiyon yöntemi (b) toksitenin azaltılmasında yaygın kullanım alanı bulmasına karşın prosten önce oluşan goitrogenik bileşiklerin ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır (LIENER, 1987).

Konu ile ilgili günümüzdeki en yeni ve yaygın yöntem glikosinolatların endoenzimlerden yararlanılarak parçalanmasıdır. Bu konuda yapılan çalışmalarda BELZILE ve BELL (1966) ham kolza küspesinde toksitenin azaltılmasında, küspenin 22-50°C'lerde 1 saat süreyle etolize alıcı ile ısıtılmasını izleyen aşamada oluşan goitrogenik maddelerin pH sı 3,6 ya da 9 olan çözeltide ekstrakte edilmesine dayanan bir yöntemin uygulanmasını önermişlerdir (LIENER, 1987).

GOEHRING (1963), kolza tohumlarının soğuk suda ısıtılmasından sonra 45-50°C de potansiyel endoenzimlerde isotiyosiyanalara parçalanmış goitrogenik maddelerin buharda kabuk soyma işlemi ile uzaklaştırıldığı bir yöntem geliştirmiştir. Ancak bu yöntemde uçucu tiyosiyanalardan ortamdan uzaklaştırıldığı halde oxazolidinetion ve uçucu olmayan diğer maddeler ortamda kalmaktadır. MUKHERJEE ve Ark. (1976 ve 1978) yukarıdaki yöntemde heksanda ekstraksiyon aşamasını ilave ederek yöntemi modifiye etmişlerdir. Ne var ki, bu modifiye yöntem yağların glikosinolatların hidrolitik parçalanma ürünleriyle yüksek düzeyde kontaminasyonuna neden olmaktadır (LIENER, 1987).

Hardal tohumu küspelerinde bulunması istenmeyen temel komponent tioglukosidsinigrinin hidrolizasyonu neticesinde meydana gelen allyl isotiyosiyanatürdür. Hayvan yemlerinde sınırlı miktarda kullanılan hardal tohumu küspesinde allyl isotiyosiyanat ortamdan uzaklaştırılmaz ise keskin acı tada neden olduğu bildirilmektedir. Bu maddenin elimine edilmesinde MUSTAKAS ve Ark. (1963 ve 1965)'ca geliştirilen bir yöntemde allyl isotiyosiyanatın suda çözünbilme özelliği yanında uçucu özelliğinden yararlanılmaktadır (LIENER, 1987). Bu yöntemde ham küspe %30 oranında nemlendirilmekte ve tioglukosid 55°C de myrosinase enzimi ile allyl thiosiyanata hidrolize edildikten sonra 100°C de pişirme ve destilasyon işlemlerinin kombine uygulamasıyla bu madde ortamdan uzaklaştırılmaktadır. %25 den fazla oranda erusik asit içeren yağdan; heksanda yapılan solvent ekstraksiyonu ile yağ ayrılır. Bu aşama sadece ortamdan erusik asitin elimine edilmesini sağlamakla kalmayıp aynı zamanda küspedeki diğer toksik maddelerin de ayrılması da sağlar. Bu yöntemde göre elde edilen son ürünün yaklaşık %50 protein ve %0.01 den daha az isotiyosiyanat içerdiği bildirilmektedir. Kobaylarla yapılan besleme testleri bu yöntemle üretilen küspelerin gelişmeyi engellememesi yanında soya fasulyesi küspesi ile 1:1'lik karışımın beslemede başarıyla kullanılabileceğini göstermiştir (LIENER, 1987).

Kolza tohumunun toksik tesiri aşağıda sıralanan bir veya birkaç yöntemin kombine olarak kullanımı ile azaltılabilir.

- Nemli ortamda ısıtma işlemi ile enzimin ortadan kaldırılması,
- Sıcak su, seyreltik alkali ve aseton çözeltileri ile ekstraksiyon ya da demir tuzlarının dekompozisyonu ve soda külü kullanımını yolu ile glikosinolatların uzaklaştırılması,
- Endogen enzimlerin potansiyel uygulamaları ile goitrogenik son ürünlerin uzaklaştırılması (LIENER, 1987).

Nemli ortamda ısıtma işlemi küspede glikosinolatların ileri parçalanmalarını önlemesine karşın, sindirim sisteminde serbest kalan glikosinolatların enzimlerce veya gut florasında yer alan mikroorganizmalarca toksik ürünlere parçalanması mümkündür. Öte yandan kümes hayvanla-

Yağlı tohumlardan glukosinolatların uzaklaştırılmasında mikrobiyal fermentasyon teknikleri de kullanılabilir. STARON (1974) (LIENER, 1987) *Geotricum candidum* küf kültürü ile glukosinatların biyolojik olarak metabolize edilmesinin sadece mamülün besleyici değerini değil tohum proteinlerinin çözünürlüğünü de arttırdığını vurgulamıştır.

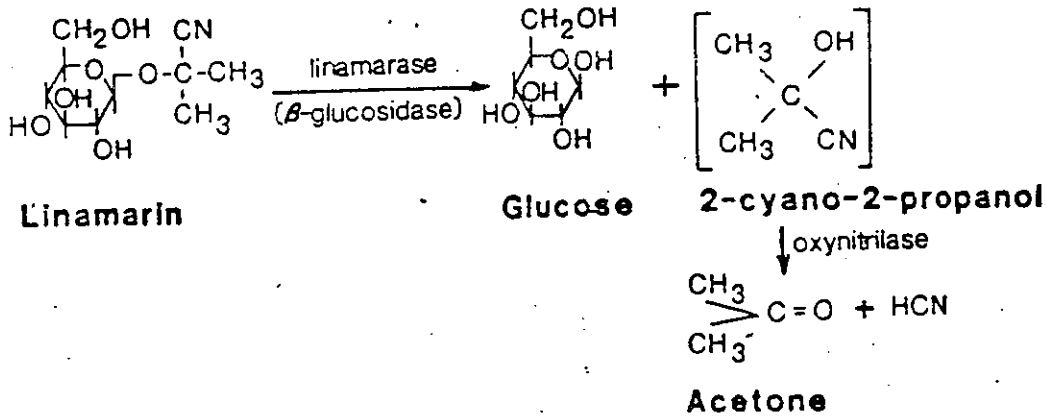
KANSEROJENİK GLİKOSİTLER

Dünyamızdaki plantasyonların bir çoğunun siyanürlere parçalanarak insan sağlığı için potansiyel risk kaynağı oluşturan glikositleri içerdiği hemen hemen 150 yıla yakın bir süredir biline bir gerçektir (LIENER, 1987).

Glikositler kendi başlarına toksik tesirli olmamalarına karşın endoenzimlerce HCN ye hidrolize edildiklerinde sitokrom oksidaz enzim aktivitesini engelleyerek özellikle aerobik organizmalara toksik tesir göstermektedir.

Cassava

Cassava özellikle tropik bölgelerde haşlanmış olarak ya da geleneksel yolla üretilen ve çeşitli yemeklere ilave edilen bir temel gıda maddesidir (LIENER, 1987). Cassavanın bünyesinde yer alan temel glikosit asetoncynohydrimin bir β glukositi olan Linamarindir. Linamarin, köklerin maserasyonu sırasında Linamaraz diye isimlendirilen bir endoenzim olan β glukosidaz enziminin etkisi ile β glukosidik bağları üzerinden glukoz ve hidroksinitrile (2 cyano-2 propanol), daha sonra spontan olarak yada hidroksinitrilaz denilen ikinci bir enzimin tesiri ile aseton ve HCN ye indirgenir (ŞEKİL 2).



Şekil 2. Linamarinin enzimatik hidrolizi

Özellikle glikositlerce zengin olan meyve kabuğunun yarattığı potansiyel risk kabukların soyulması ya da pulpun yıkanması yolu ile azaltılabilir (LIENER, 1987). Toksitenin azaltılmasında diğer bir yol ise ısı işlemi (haşlama, fırında pişirme, güneşte kurutma) uygulaması ile Linamaraz enziminin inaktif, HCN bileşiklerinin ise uçar hale getirilmesidir.

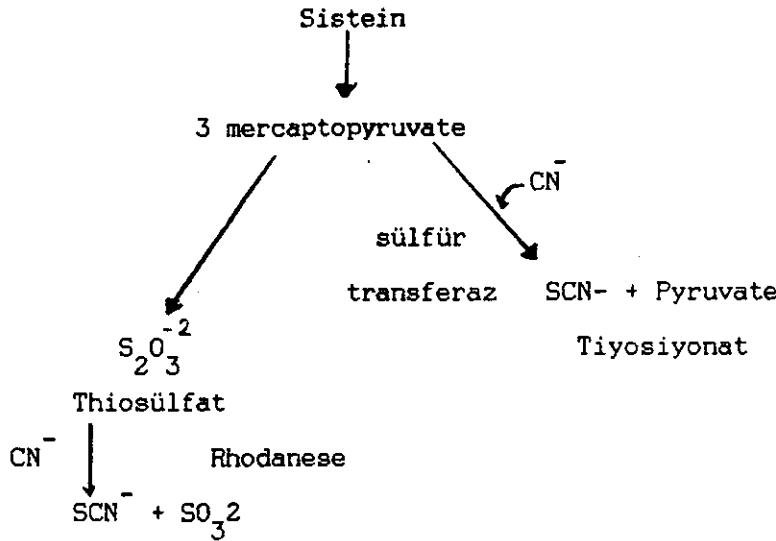
Geleneksel bir Nijerya yemeği olan Gari cassava köklerinden elde edilen pulpun *Corynebacterium manihot* ile fermentasyonu neticesinde hazırlanmaktadır. Fermentasyon sırasında siyanitlerde meydana gelen önemli ölçüdeki azalma organik asitlerin hidrolik etkisinden kaynaklanmaktadır. Daha sonra uygulanan kızartma işlemi ise serbest siyanitlerin tamamen elimine edilmesini sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar seyreltik asit çözeltilerinde linamarinin 100°C bile oldukça dayanıklı olduğunu ve bu yüzden mikrobiyal

fermentasyonlar sırasında meydana gelen zayıf organik asitlerin bunun kimyasal hidrolizinde herhangi bir rollerinin bulunmadığını ortaya koymuştur (LIENER, 1987). Nitekim Gari fermentasyonundaki Linamarinin detoksifikasyonu, mikrobiyal Linamaraz enzimini aktivitesine bağlanmaktadır.

Konu ile ilgili çalışmalar, linamarinin toksik tesirinin önlenmesinde *Aspergillus sydowi*; *Fusarium equiseti* ve *Penicillium streckii* den elde edilen ekzoenzim preparatları kullanımının en etkili yol olduğunu göstermiştir (IKEDİÖBE vöe ONYİKE, 1982 ve 1985).

Cassava'dan elde edilen, insan diyetleri ile hayvan yemlerinde yaygın olarak kullanılan nişasta miktarı yüksek (yaklaşık %65) ve sindirilmesi kolay olan diğer bir besin maddesi de Tapioca'dır. Tapioca hazırlanma aşamasında toksiteyi azaltıcı herhangi bir işlem görmediği için ortamda mevcut hidrolitik enzimler linamarinini, HCN ile bunun cyanohidrin gibi aldehit bileşiklerine kadar parçalanmasını katalizeleyebilirler. Bu yüzden ham cassavadan tapioca benzeri, gıdaların hazırlanmasında toksiteyi azaltmak için ortama belli miktarda glukoz ilave edilmesi önerilmektedir (LIENER, 1987).

Afrika'nın birçok bölgesinde cassavadan geleneksel yöntemlerle hazırlanan yiyeceklerin *ataxic neuropathy* (kısmi felç) ve guatr diye isimlendirilen patolojik rahatsızlıklara sebep olduğu belirlenmiştir (OSUNTOKUN, 1972). Ataxic neuropathy'nin amblyopia ile sonuçlanan optik sinirlerin yer aldığı dokulardaki arazlarla ilişkili olduğuna ve kan plazmasındaki yüksek düzeyde bulunan tiyosiyonatların bu hastalığa yol açtığına inanılmaktadır. Ancak yine de siyanit ve bunun metabolik ürünlerinin ataxic neuropathy'deki rolü halen tam olarak açıklanamamıştır. ŞEKİL 3'de insan vücudunda *in vivo* koşullarda siyanitlerin detoksifiye edilme mekanizması verilmiştir.



Şekil 3. *In vivo* koşullarda siyanitlerin detoksifikasyonu

den 15 kat daha fazla HCN içermektedir. Lima fasulyelerinde toksiteye neden olan madde Linamarindir. RAHMAN ve Ark. (1947) (LIENER, 1987); Lima fasulyelerinde toksitenin azaltılmasında basit bir yöntem önermişlerdir. Yöntemde fasulye ununa %25-30 oranında su karıştırılmakta, daha sonra sulu unun 20 dakika süre ile kurutulması ve pişirilmesi sırasında siyanit içeriği insanlar için HCN'nin tespit edilmiş olan 50 mg'lık toksik dozunun altına düşürülmektedir.

Meyve ve Sert Kabuklu Meyve Daneleri

Fırıncılık ve şekerleme mamüllerinin üretiminde badem ve kayısı içlerinden hazırlanan ezmele yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu meyvelerde bulunan temel kanserojenik glikosid D-mandelonitrile ve gentibioz'dan meydana gelen amygladin'dir. Emülsin adı verilen endoenzim amygladinlerin hidrolizini katalizlemektedir. Bu enzim Linamarine karşı inaktif olmasına karşın Linamaraseye benzer iki aşamalı

Öte yandan tiyosiyonat açıkça belirlenmiş bir goiter ve cretinisizm etmeni olduğu için bunun goiter ve cretinisizm vakalarındaki rolü büyüktür.

Lima fasulyesi

İnsan ve hayvanlarda görülen ciddi zehirlenme enfeksiyonları özellikle koyu renkli olmak üzere belli Lima fasulyesi varyetelerinin tüketimi ile yakından ilişkilidir. İnsanlarda öldürücü gıda zehirlenmelerine yol açan Lima fasulyesi türleri insan diyetlerinde kullanılan beyaz lima fasulyesi türlerin-

aktivite göstermektedir. İlk aşamada β glukosit bağları hidrolize edilerek gentioz ve mandelonitril meydana gelmekte, ikinci aşamada ise mandelonitril benzaldehit ve HCN'ye dönüşmektedir.

Geleneksel yolla ezme üretiminde en basit yol meyvelerin suda 24-48 saat süre ile ıslatılmasıdır. Ancak bu yöntemde yıkama suyunda meydana gelen HCN bir takım çevre kirliliği problemlerine yol açmaktadır. Ayrıca, sadece bitkisel yağlarda çözülebilen, buna karşın suda çözünmeyen benzaldehitlerin meydana gelmesi ve bunların büyük ölçüde benzoik aside dönüşerek belli düzeylerin üzerine çıkması gıda katkı maddelerinde izin verilen sınırların zorlamaktadır. Anılan problemlerin giderilmesinde SCHAB ve YANNAI (1973) (LIENER, 1987) tarafından geliştirilen acı maddelerin giderilmesine yönelik 55°C de pH sı 6.5 olan asidifiye suda 2 saat süreli ıslatma işlemi kullanılmakta ve yöntemde tam olarak hidrolize olan amyladinin hidroliz ürünleri buhar destilasyonu yolu ile uzaklaştırılmaktadır.

FLATULANSA YOL AÇAN OLİGOSAKKARİTLER

Baklagillerin insan beslenmesinde kullanımı sınırlayan en önemli faktör, bunların sindirim sisteminde oluşturdukları gazdır (OLSON ve Ark., 1981). Gaz, bulantı, mide kramptı ve diyare gibi rahatsızlıkların ortaya çıkmasında en büyük etken şüphesiz galaktosidik ve β Fruktosidik bağları içeren bazı oligosakkaritlerin hidrolizi için gerekli enzimlerin sindirim sisteminde yer almaması ve bunun neticesinde oligosakkaritlerin bünyesinde bir veya daha fazla sayıda bulunan α 1-6 D galaktopiranosil grubunun mide mukozasını oluşturan doğal mikroflora tarafından karbondioksit, hidrojen ve metana kadar parçalanmasıdır.

Yenebilir baklagillerde anılan rahatsızlıkların elimine edilmesinde plantasyonların dokularında doğal halde bulunan endoenzimlerden ya da 1-6 galaktosit bağlarının hidrolizasyonunu sağlayan enzim kaynaklarından faydalanılabileceği ifade edilmektedir. Nitekim fasulyelerin oligosakkarit içerikleri, dokularında bulunan enzimlerin hidroliz güçlerinin maksimize edilmesi yoluyla önemli derecede azalmaktadır (BECKER ve Ark., 1974).

Fasulyelerin ıslatılması suretiyle uygulanan bu basit yöntem yanında *Proteus vulgaris*'in soya fasulyesi ve diğer baklagillerin rafinoz ve stakioz içeriklerinin azaltılmasında başarıyla kullanılabileceği belirtilmektedir (LIENER, 1987).

Bu yöntem fasulyelerde gaz oluşturan faktörlerin, soya fasulyesi ve buğdayda fitat içeriğinin ve pamuk tohumunda gossypol içeriğinin azaltılmasında başarı ile kullanılmaktadır. Öte yandan teknolojiye detoksifikasyon çalışmalarında immobilize organizma ve enzimlerden yararlanabilme olanaklarının artması gıda işleme sanayinde yeni ufuklar açacaktır.

Oligosakkaritlerin eliminasyonunda etkili olan bir yol da danelerin çimlendirilmesi ile enzim aktivitesinin artırılmasıdır. Nitekim KIM ve Ark. (1973) 4 saat süreli ıslatma ve çimlenme işlemlerinin kombine edilmesi ile birlikte ikinci kez ıslatma işleminin soya fasulyesindeki oligosakkarit miktarını yaklaşık %70 oranında azalttığını saptamışlardır. Ayrıca 48 saat süreli benzer uygulama ile nohut Bengal nohutu (*Cicer arietinum*), börülce (*Phaseolus mungo*), mercimek (*Cajanus cajan*) ve bakla da (*Vicia faba*) rafinoz, stakioz ve verbaskozun tam anlamıyla hidrolizinin sağladığı kaydedilmektedir (REDDY ve Ark., 1980).

Öte yandan *Rhizopus oligosporus* fermentasyonu ile hazırlanan tempeh benzeri soya gıdalarında küf mikroorganizmaların salgıladıkları sindirim sistemi rahatsızlıklarına yol açan metabolitlerin, ortama *Saccharomyces* türleri aşılması yolu ile elimine edilebileceği belirtilmektedir (LIENER, 1987).

Soya mamüllerinde oligosakkaritlerin hidrolizasyonunda izlenen yollardan biri de *Aspergillus saitoi*'den elde edilen galaktosidaz ile invertaz aktivitesine sahip enzim preparatlarının kullanımınıdır (LIENER, 1987). İşlemin etkinliği henüz tam olarak saptanamamasına karşın *Lactobacillus acidophilus* ve *L. bulgaricus* kültürleriyle fermente edildikten sonra papain enzimiyle işlem hemen hemen tamamının indirgenebildiği kaydedilmektedir (CRUZ ve Ark., 1981). Öte yandan oligosakkaritlerin hidrolizasyonunda mikrobiyal kaynaklardan elde edilen galaktosidazın immobilize preparatları sürekli akışlı reaktörlerde veya dializörlerde başarıyla kullanılmaktadır (SMILEY ve Ark., 1976; THANAKUL ve Ark., 1976).

FİTAT

Fitik asit veya fitik asit tuzları 6 fosfat redikali içeren siklik bileşiklerdir. Yenebilir baklagillerde fitatların fizyolojik önemi demir, bakır, kalsiyum, çinko ve bakır gibi iki ya da üç değerli metal iyonları ile suda zor çözünen kompleks bileşikler oluşturması ve bunların vücut tarafından emilimini güçleştirerek, vücutta bulunması gerekli esansiyel makroelementlerin yetersizliğine yol açmalarından kaynaklanmaktadır. Metal iyonlarına bağlı fitatların karakteristik özellikleri fitaz enziminin hidrolizasyon sonucu inositol'den fosfor gruplarını uzaklaştırması ile kaybolmaktadır. Doğal fitaz aktivitesi bir takım deney hayvanlarının sindirim sistemlerinde bulunmasına karşın aynı aktivitenin insanların sindirim sisteminde de bulunduğuna ilişkin bilgiler halen tam olarak ortaya konmamıştır.

Baklagil plantasyonlarında fitat miktarının azaltılması için faydalanılması önerilen yöntemler ıslatma, çimlendirme ve fitaz aktivitesine sahip mikroorganizmalarla fermentasyon yöntemleridir. Ayrıca fitaz enzimi ilavesi de bu amaçla önerilmektedir (OKUBO ve Ark., 1976; LIENER, 1987).

Sonuç olarak, insan ve hayvan beslenmesinde kullanılan plantasyonlarda doğal olarak bulunan toksik maddelerin uygun işleme koşullarının seçimi ya da bazı spesifik endoenzimlerden faydalanılarak elimine edilebilmesi mümkün olmaktadır. Detoksifikasyon çalışmalarında dikkati çeken en önemli konu, gelecekte doğal toksik maddelere karşı daha çok yararlanılacak olan mikrobiyal enzimlerin kullanım olanaklarıdır.

KAYNAKLAR

- BECKER, R., A.C. OLSON, D.P. FREDERIC, S. KON, M.R. GUMBMAN, J.R. WAGNER, 1974. Conditions for the Autolysis of Alpha Galactosides and Phytic Acid in California Small White Beans. *J. Food Sci.* 39: 766.
- CRUZ, R., J.C. BATISTELA, G. WASIACKI, 1981. Microbial Galaktosidase for Soymilk Processing. *J. Food Sci.* 46: 1196.
- GOEHRING, K.J., 1963. US. Pat. 2. 987, 399.
- IKEDIOBI, C.O., E. ONYIKE, 1982. The Use of Linamarase in Gari Production. *Process Biochem* 17: 2/July/Aug.
- IKEDIOBI, C.O., E. ONYIKE, 1985. Production of Linamarase by *Aspergillus Sydowi* and *Fusarium equiseti*, *Process Biochem* 20: 99.
- LIENER, J.E., 1987. *Detoxifying Enzymes in Food Biotechnology* King, R.D. Cheetham, P.S.J. Ed. Elsevier Appl. Sci. Newyork, 321 sayfa.
- OKUBO, K., A.B. WALDROP, G.A. IACOBUCCI, D.V. MEYERS, 1976. Binding of Phytic Acid to Glycinin. *Cereal Chem.* 53: 513.
- OLSON, A.C., R. BECKER, J.C. MIERS, M.R. GUMBMAN, J.R. WAGNER, 1975. IN protein Nutritional Quality of Foods and Feeds. Friedman M., Marcel Dekker, Newyork, 551 sayfa.
- OSUNTOKUN, B.O., 1972. Chronic Cyanide Neurotoxicity and Neuropathy in Nigerians. *PL. Fds. Hum. Nutr.* 2: 215.
- REDDY, N.R., D.K. SALUMKHE, R.P. SHARMA, 1980. Flatulence in Rats Following Ingestion of Cooked and Germinated. Black Gram and a Fermented Product of Black Gram and Rice Blend, *J. Food Sci* 45: 1161.
- SMILEY, K.L., D.E. HENSLEY, H.J. GASDORD, 1976. Alpha Galactosidase Production and Use in a Hollow Fiber Reactor. *Appl. Environ Microbiol* 31: 615.
- THANANKUL, D.M., M. TANAKA, C.O. CHICHESTER, T.C. LEE, 1976. Degradation of Raffinose and Stachyose in Soybean Milk by Galachosidase from *Mortierella vinacea*. Entrapment of a Galachosidase within Polyacrylamidegel. *J. Food. Sci.* 41: 173.
- TOOKEY, H.L., C.H. VAN ETTEN, M.E. DAXENBICHLER, 1980. In Toxic Constituents of Plant Foodstuffs. Liener, I.E. (Ed.) 2 nd Ed. Academic Press Newyork pp. 103-142.