

Agrovoc Descriptors: starch, quality, quantitative analysis, amylose, amylopectin, enzymes, genes

Agris Category Codes: F50, Q04

COBISS koda 1.02

Genetske in biotehnološke osnove kakovosti škroba v rastlinskih pridelkih in živilih

Vida ŠKRABANJA¹

Delo je prispelo 15. julija 2005; sprejeto 11. oktobra 2005.

Received July 15, 2005; accepted October 11, 2005.

IZVLEČEK

V delu je pregled problemov sinteze škroba v rastlinah, pomen amilopektina in amiloze. Na prehransko kakovost škroba vpliva amiloza in možnost nastanka retrogradiranega škroba. Opisane so genetske osnove sinteze škroba in možni biotehnološki posegi, ki lahko vplivajo na spremembo količine in kakovosti škroba.

Ključne besede: škrob, amiloza, amilopektin, encimi, geni, biotehnološki posegi, kakovost, rezistentni škrob

GENETIC AND BIOTECHNOLOGICAL APPROACH TO STARCH QUALITY IN PLANT PRODUCTS AND FOODS

ABSTRACT

Starch (amylose and amylopectin) synthesis in plants is reviewed. Nutritional importance of retrograded starch is pointed out. Genetic and biotechnological approach of starch quality in plant materials and products is discussed.

Key words: starch, amylose, amylopectin, enzymes, genes, biotechnology, quality, resistant starch

1. UVOD

Škrob je glavni rezervni polisaharid zelenih rastlin in v naravi poleg celuloze drugi najbolj zastopan med ogljikovimi hidrati. Je izjemno koristen substrat, ki ga s kemičnimi ali biokemičnimi tehnikami uspešno pretvorimo v najrazličnejše oblike.

Kemično škrob sestavljata dve strukturno različni komponenti: amiloza in amilopektin. Njuno normalno razmerje v žitih znaša 1 : 3. S pomočjo genetskih manipulacij pa je

¹ Doc., dr., Krka, tovarna zdravil, d.d., Novo mesto, Raziskave in razvoj, Služba za industrijsko lastnino, Šmarješka c. 6, 8501 Novo mesto.

razmerje pri pšenici, ječmenu, rižu, koruzi in krompirju lahko močno spremenjeno v korist ene ali druge komponente.

Tabela 1: Tipična masna razmerja amiloza:amilopektin v škrobu (Zobel in Stephen, 1995).

Vir škroba	Amiloza	Amilopektin
visoko amilozna koruza	50-85	15-50
koruza	26	74
voskasta koruza	1	99
pšenica	25	75
riž	17	83
kasava	17	83
tapioka	17	83
krompir	21	79

V nativnih škrobih so molekule amiloze in amilopektina skupaj z omejeno količino vode, beljakovin, lipidov, fosforja in mineralov organizirane v micelah znotraj obstojnih, morfološko prepoznavnih mikroskopskih struktur, imenovanih škrobna zrna. Zrna, ki jih najdemo v semenih, koreninah, gomoljih, steblih, listih, plodovih in celo pelodu, so različnih velikosti in oblik kot tudi kemičnih in fizikalnih lastnosti, ter variirajo z njegovim izvorom. Specifičnost je tako markantna, da služi kot parameter pri identifikaciji nativnega škroba.

Pri večini škrobov velja, da se zrno oblikuje v amiloplastu (na vsak amiloplast eno škrobno zrno). V nekaterih škrobih (npr. oves) pa več manjših zrn premera 4-10 μm tvori agregate večjih velikosti (20-150 μm) (Eliasson in Gudmundsson, 1996). V vsaki vrsti rastline je biokemijsko formiranje zrna uravnavano genetsko in termodinamsko preko več stopenj: izbira sladkorne enote, hitrost in način njene vključitve v škrobni polisaharid in proces urejanja v kristalinično oziroma amorfnó strukturo (Annison in Topping, 1994; Galliard in Bowler, 1987).

2. UPORABNOST ŠKROBA

Biotehnologija z genskim inženiringom učinkovito posega v rastline in s "kmetovanjem na molekulski ravni" povečuje pridelek ogljikovih hidratov, maščobnih kislin, farmacevtskih polipeptidov, industrijskih encimov, biorazgradljivih materialov, sekundarnih metabolitov idr. Rastlina v tem primeru služi kot bioreaktor za proizvodnjo živil, živalske krme, surovin v predelovalni industriji, ki v ekonomskem smislu lahko tekmuje z živalsko ali mikrobnó proizvodnjo biomolekul.

Možnosti uporabe nativnega škroba so v živilski industriji omejene, zato si raziskovalci prizadevajo razširiti uporabno območje z modifikacijo škrobov s fizikalnimi, kemijskimi ali biokemijskimi metodami, oziroma s posegi v sam metabolizem sinteze škroba v rastlini (*in planta*), s katerimi naj bi pridelali škrob ustrezne kakovosti ter se s tem

izognili stroškom in problemom odpadnih produktov, ki spremljajo klasične modifikacije škroba.

Regulacija sinteze škroba v rezervnih tkivih rastlin je kompleksna in še ne povsem jasna. Sami detajli metabolizma škroba so si pogosto nasprotujoči, dejavniki, ki vplivajo na hitrost sinteze ali strukturo škroba, pa premalo znani.

Izkoriščanje polne biosintetske kapacitete rastlin oz. poljščin potrebuje temeljito predznanje o metabolizmu rastline in o regulacijskih mehanizmi, vključenih v rastlinsko biokemijo. Kadar namreč z genetskim inženiringom posežemo v poti rastlinskega metabolizma, moramo upoštevati celo vrsto omejitev, preden dosežemo ustrezen pridelek. Ena od osnovnih omejitev je že ta, da mora imeti novo vpeljani encim zadostno afiniteto do svojega substrata/substratov, če hoče tekmovati z endogenimi encimi.

3. SINTEZA ŠKROBA

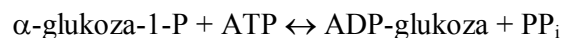
Kadar je hitrost fotosinteze hitrejša od hitrosti transporta asimilatov (saharoze), se ti zadržijo v kloroplastu in se konvertirajo v škrob. Skladiščenje škroba je tu le začasno in služi za uravnavanje fotosintetske kapacitete.

V nasprotju s situacijo v kloroplastih poteka akumulacija škroba v rezervnih tkivih bistveno počasneje, včasih tudi nekaj mesecev. Ob ustreznih razmerah lahko škrob tu ostane nespremenjen do naslednje sezone. V tkivih (gomolji, semena) je škrob v obliki v vodi netopnih zrn znotraj amiloplastov oz. struktur, obdanih z dvojno membrano, ki omejuje dostop metabolitov do zrna. Privzem spojin, ki so donorji ogljika za sintezo škroba, je iz citoplazme možen le ob prisotnosti transportnega sistema.

V rezervnih tkivih je glavni vir ogljika za sintezo škroba običajno saharoza, ki se iz tkivnih virov prenaša preko floema. Preden se znotraj plastida konvertira v škrob, se mora v citoplazmi pretvoriti v obliko, ki je kompatibilna z značilnostmi substrata transportnega sistema. Tako se mora saharoza najprej razgraditi do dihidroksiacetofosfata (DHAP), ki lahko potuje preko membrane amiloplasta, kjer se dalje pretvori do ADP-glukoze s pomočjo encimov glukoneogeneze in ADP-glukoze pirofosforilaze (AGP). Amiloplasti pa lahko heksoza-fosfate privzamejo tudi direktno. Študije z amiloplasti koruze so pokazale, da so ti sposobni sintetizirati škrob iz glukoze-6-P, pri eksperimentih z izoliranimi pšeničnimi amiloplasti pa so zasledili obilno sintezo škroba iz glukoze-1-P (Smith, 1993).

Za sintezo škroba so pomembne tri reakcije, v katerih sodelujejo naslednji encimi:

1. **ADP-glukoza pirofosforilaza**; **AGP** katalizira naslednjo reakcijo:



2. **Škrob sintaza** katalizira prenos ADP-glukoze na α -1,4 glukozni "primer" (=začetna veriga, nosilec) in podaljša α -1,4 glukozno verigo.

3. Encim, ki je odgovoren za prenos podaljšanih α -1,4 verig in tvorbo α -1,6 razvejitvenih mest v amilopektinu (delno tudi v amilozi) (angl. **branching enzyme; BE**).

Ključni encim, "pacemaker" v sintezi škroba tako v fotosintetskih kot nefotosintetskih tkivih je AGP. Podobno ta encim uravnava hitrost sinteze glikogena tudi v bakterijah, medtem ko je ugotovljeno, da pri kvasovkah in sesalcih vlogo ključnega encima prevzema glikogen sintaza (Stark s sod., 1992).

Škrob sintaza in BE obstajata v več oblikah (izoencimi); izo- oblike škrob sintaze so lahko topne ali trdno vezane na škrobna zrna (Smith s sod., 1995).

4. BIOTEHNOLOŠKI POSEGI V KOLIČINO IN STRUKTURO ŠKROBA IN NJIHOV POMEN V AGRONOMIJI IN ŽIVILSTVU

Kljub temu, da prednostno vlogo v sintezi škroba pripisujejo AGP, je količina in struktura škroba odvisna od katalitičnih sposobnosti vseh treh encimov, njihova vloga pa se spreminja glede na organ rastline, z razmerami v okolju in s stopnjo razvoja rastline.

Tako so z mutacijami na lokusih, ki kodirajo zapis za mali in veliki podenoti encima AGP, pri endospermu koruze, embrijih graha in gomoljih krompirja zasledili nižjo aktivnost encima in s tem nižji pridelek škroba. V embrijih graha pa so mutacije na lokusu, ki kodira zapis za BE, prav tako zavrle sintezo škroba. Brez kvantitativnih analiz razmerij med aktivnostmi AGP in BE torej ni možno ugotoviti, kateri od obeh encimov je pomembnejši za hitrost sinteze škroba.

Ugotovljen je tudi izrazito nižji pridelek škroba v organih rastlin, izpostavljenih višjim temperaturam. Domnevno je ta pojav možno pripisati nižji aktivnosti škrob sintaze zaradi višjih temperatur (Smith s sod., 1995).

Razmerje med amilozo in amilopektinom je eden izmed dejavnikov, ki močno vpliva na prebavljivost toplotno obdelanega škroba. Znanstveniki npr. znižujejo količino amiloze pri različnih virih z namenom pridobivanja škroba, primernejšega za živila, ki jih obdelujemo z mikrovalovnim segrevanjem, saj dajejo lepšo in stabilnejšo strukturo (Goddijn in Pen, 1995). Na drugi strani pa so visoko amilozne vrste škroba v prehrani posebej pomembne, saj kompleksi z lipidi, proteini, polifenoli, ki se tvorijo med retrogradacijo škroba, predstavljajo prebavnim encimom težje dostopen ali celo nedostopen škrob (imenovan rezistentni). Njegova prednost je ta, da kaže podobne prehranske učinke kot dietna vlaknina: uravnava nivo glukoze oziroma insulina (vpliva na glikemični indeks živil) ter raven holesterola v krvi, znižuje pa tudi učinek dejavnikov tveganja za nastanek raka v debelem črevesju (Tovar, 1992; Annison in Topping, 1994; Škrabanja in Kreft, 1998; Škrabanja s sod., 2001a; Škrabanja s sod., 2001b; Kreft in Škrabanja, 2002; Hoover in Zhou, 2003; Gonzales-Soto s sod., 2004; Aparicio-Saguilan s sod., 2005; Englyst in Englyst, 2005; Yamada s sod., 2005; Chen s sod., 2005).

V nadaljevanju je navedeno še nekaj primerov, kjer so v rastlinah z genetiko oz. biotehnologijo spremenili potek sinteze škroba.

V ječmenu (*Hordeum vulgare*) cDNA kodira zapis za encim AGP, katere aktivnost je neodvisna od *in vivo* koncentracij 3-fosfoglicerata in/ali anorganskega fosfata oziroma je ne stimulira fruktoza-1,6-biP in/ali inhibira AMP. Transgene rastline krompirja s cDNA ječmena so dale večji pridelek škroba. Krompir z visoko vsebnostjo škroba med pripravo vpije manj maščobe in je uporabnejši v živilski industriji (Villard s sod., 1995).

Pri ječmenu je bilo tudi ugotovljeno, da gen za visoko vsebnost lizina v zrnju pleiotropno vpliva tudi na sintezo škroba (Kreft s sod., 1985; Kreft, 1987). Persson in sod. (1996) so ugotovili, bi na vsebnost amiloze oziroma amilopektina v zrnju ječmena poleg genov z neposrednim vplivom lahko vplivalo tudi vsakokratno gensko ozadje ostalih genov.

Posledica uspešnega vnosa gena, ki kodira glikogen sintazo pri *E. coli*, se je v amiloplastih krompirja izrazila v nižji vsebnosti škroba v gomoljih, manjših škrobnih zrnih, vsebnosti amiloze in razdalji med razvejitvenimi mesti v amilopektinu (Krohn s sod., 1994). Obratno je Kishore (cit. v Willmitzer s sod., 1993) z vnosom mutirane oblike encima AGP iz *E. coli* v amiloplast transgenega krompirja uspel "skreirati" rastlino z višjo vsebnostjo škroba in sušine (suha snov je bila v povprečju višja kar za 24 % glede na kontrolni vzorec).

S tehniko rekombinantne DNA je mogoče upočasniti kaljenje pri krompirju z zniževanjem koncentracije saharoze, ki inducira kaljenje. To dosežemo z inhibicijo encimov, ki razgrajujejo škrob, in/ali razgradnjo saharoze, ki se je že formirala (Potato transgenic, 1994).

Na ta način je v živilstvu rešljiv tudi problem, ki ga predstavlja akumulacija reducirajočih sladkorjev glukoze in fruktoze med skladiščenjem krompirja pri nizkih temperaturah. Ti sladkorji v Maillardovi reakciji reagirajo z aminokislinami in med cvrenjem krompirja povzročajo temno obarvanje in neželen vonj čipsa ali pomfrita. Z žlahtnjenjem je moč doseči počasnejšo razgradnjo škroba in akumulacijo heksoz pri nizkih temperaturah skladiščenja (Machray s sod., 1994).

Izmed vzorcev genske banke riža (*Oryza sativa* L.) so japonski znanstveniki izbrali tistega z najvišjo vsebnostjo amilopektina in sekvenco z zapisom za njegovo sintezo preko plazmida *E. coli* klonirali v rastlinah riža s sekvenco za nižjo vsebnost amilopektina. Tako so namesto s klasičnim žlahtnjenjem uspeli z genskim inženiringom spremeniti vsebnost amilopektina v rižu in s tem izboljšati njegov okus (Rice, 1994).

Stabilna vključitev vsaj enega gena različnih donorjev (npr. plesni, bakterije, živalske ali rastlinske celice, npr. koruze) v genom rastline (paradižnik (*Lycopersicon esculentum*), koruza (*Zea mays*)) je metoda za pridelavo škroba pri višjih ali nižjih temperaturah, ali škroba s spremenjeno strukturo. Donor je običajno gen za škrob sintazo, BE in/ali glikogen sintazo (New transgenic, 1994).

Pri grahu so bili ugotovljeni mutanti na več lokusih, ki vplivajo na potek sinteze škroba, na razmerje amiloza/amilopektin ter na vsebnost prostih sladkorjev (Wang in Hedley, 1993; Lloyd s sod., 1996). Mutacije na posameznih lokusih različno posegajo v sintezo škroba, kombinacije mutiranih genov tako omogočajo široko izbiro lastnosti živil.

Večina študij, ki obravnavajo prebavljivost škroba pri stročnicah, se nanaša na vpliv termičnega postopka, skladiščenja ali botanične integritete vzorca. Glede na dostopno literaturo je vpliv razmerja amiloza/amilopektin precej raziskan pri žitih. Pri grahu pa se s podobno problematiko raziskovalci niso ukvarjali. Da bi ugotovili dejanski vpliv oz. kombinacijo naštetih dejavnikov na izkoristljivost škroba, smo uporabili različne genotipe graha s 23, 33 in 65 % amiloze in ustreznim deležem amilopektina. Po termični obdelavi (kuhanje ali avtoklaviranje) celih ali zmletih zrn graha smo analizirali vsebnost izkoristljivega in rezistentnega škroba ter z *in vitro* metodo spremljali hitrost hidrolize škroba in izračunali hidrolizni indeks. Najmanjšo vsebnost rezistentnega škroba (6,2 % glede na skupni škrob) smo določili v genotipu graha z najmanjšo vsebnostjo amiloze, s širjenjem razmerja amiloza/amilopektin se večja tudi vsebnost rezistentnega škroba. Tako se je pri enako pripravljenem pireju genotipa s 33 % amiloze formiralo 11 % pri genotipu s 65 % amiloze pa 32 % rezistentnega škroba glede na skupni škrob. Za hitrost hidrolize je bila ugotovljena negativna korelacija z deležem amiloze v škrobu oz. z vsebnostjo nastalega rezistentnega škroba (Škrabanja s sod., 1999).

5. INDUSTRIJSKA PREDELAVA ŠKROBA

Ciklodekstrini so ciklični oligosaharidi, zgrajeni iz 6 (α), 7 (β) ali 8 (γ) glukoznih enot, ki so z α -1,4 glikozidnimi vezmi povezane v obroč. Njihova zunanost je hidrofilna, zaradi hidrofobne notranosti pa zlahka tvorijo komplekse z drugimi hidrofobnimi substancami, primernih oblik in velikosti (vitamini, maščobne kisline, arome). Sposobnost tvorbe inkluzijskih kompleksov (t.i. molekularno enkapsulacijo) že izkoriščajo farmacevtska, kemična, živilska in kozmetična industrija.

V živilstvu je največja možnost uporabe ciklodekstrinov je na področju arom, saj z enkapsulacijo hlapnih komponent povečajo njihov učinek. S svojimi lastnostmi stabilizirajo emulzije maščob in olj, ščitijo pred oksidacijo, vplivom svetlobe, razgradnje, razgrenijo sokove citrusov. S pomočjo β ciklodekstrina je iz kazeinskih hidrolizatov možno selektivno odstraniti aminokislini fenilalanin in tirozin, kar je posebej pomembno pri pripravi dietetičnih živil za bolnike s fenilketonurijo, patentiranih pa je tudi več postopkov za odstranitev holesterola iz jajc (Sidhu in Oakenfull, 1992) ali kofeina iz kave (Guzman-Maldonado s sod., 1995).

Oakes s sod. (1991) predstavlja novo možnost proizvodnje ciklodekstrinov *in planta* (v rastlinah transgenega krompirja). Z ekspresijo CGT gena iz *Klebsiella pneumoniae* v amiloplastih krompirja so dosegli sintezo α in β ciklodekstrinov v količini 0,001-0,01 % glede na skupno vsebnost škroba (Goddijn in Pen, 1995). Isti znanstveniki napovedujejo, da naj bi v prihodnosti raven ciklodekstrinov v krompirju dosegla 1-10 % skupnega škroba in da bo v rastlini možno katalizirati sintezo ciklodekstrina

določenega tipa (α , β , γ) ali celo takega z več kot 8 glukoznimi enotami v obroču (Guzman-Maldonado s sod., 1995).

Rastlinski pridelki vsebujejo škrob, ki ga lahko na najrazličnejše načine oplemenitimo in uporabimo v živilstvu in prehrani.

6. LITERATURA

- Annison, G., Topping, D.L. 1994. Nutritional role of resistant starch: Chemical structure vs physiological function.- Annual Reviews of Nutrition 14: 297-320.
- Aparicio-Saguilan, A., Flores-Huicochea, E., Tovar, J., García-Suárez, F., Gutiérrez-Meraz, F., Bello-Pérez, L.A. 2005: Resistant starch-rich powders prepared by autoclaving of native and lintnerized banana starch: Partial characterization. Starch-Stärke, 57: 405-412.
- Chen, L., Li, X.X., Li, L., Li, B. 2005. Enzyme-resistant starch for oral colon-targeting drug delivery system ASBM6. Advanced Biomaterials VI, Key Engineering Materials, 288-289: 129-132.
- Eliasson, A.C., Gudmundsson, M. 1996. Starch: Physicochemical and functional aspects. V: Eliasson, A.C. ed. Carbohydrates in food. New York, Marcel Dekker, 431-503.
- Englyst, K.N., Englyst, H.N. 2005. Carbohydrate bioavailability. British Journal of Nutrition, 94: 1-11.
- Galliard, T., Bowler, P. 1987. Morphology and composition of starch. V: Galliard, T. ed. Starch: Properties and potential. Chichester, John Wiley, 55-78.
- Goddijn, O.J.M., Pen, J. 1995. Plants as bioreactors.- Trends in Biotechnology 13: 379-387.
- Gonzalez-Soto, R.A., Agama-Acevedo, E., Solorza-Feria, J., Rendón-Villalobos, R., Bello-Pérez, L. A. 2004. Resistant starch made from banana starch by autoclaving and debranching. Starch-Stärke, 56: 495-499.
- Guzman-Maldonado, H., Peredes-Lopez, O. 1995. Amylolytic enzymes and products derived from starch: A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 35: 373-403.
- Hoover, R., Zhou, Y. 2003. In vitro and in vivo hydrolysis of legume starches by alpha-amylase and resistant starch formation in legumes - a review. Carbohydrate. Polymers, 54: 401-417.
- Kreft, I., Javornik, B., Kajfež-Bogataj, L. 1985. Ripening and yield in barley with high-lysine gene lys-3a. Barley Genetics Newsletter 15: 65-67.
- Kreft, I. 1987. Pleiotropic effects of high-lysine genes and possibilities for breeding high yielding barley with improved nutritional quality. V: Barley Genetics, Proceedings of the fifth international barley genetics symposium, October 6-11, 1986, Okayama, Japan, 861-863.
- Kreft, I., Škrabanja, V. 2002. Nutritional properties of starch in buckwheat noodles. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 48: 47-50.
- Krohn, B.M., Stark, D.M., Barry, G.F., Preiss, J., Kishore, G.M. 1994. Plant Physiology, Suppl, 105: 37.
- Lloyd, J. R., Wang, T. L., Hedley, C. L. 1996. An analysis of seed development in *Pisum sativum* XIX. Effect of mutant alleles at the *r* and *rb* loci on starch grain size and on

- the content and composition of starch in developing pea seeds. *Journal of Experimental Botany* 47: 171-180.
- Machray, G.C., Hedley, P.E., Burch, L., Meyer, R., Davies, H.V., Waugh, R. 1994. Genes of sucrose metabolism in potato and manipulation of their expression. V: Proceedings of the international colloquium on Impact of plant biotechnology on agriculture, Rogla, December 5-7, 201-210.
- New transgenic plant and its construction. Patent Nr. WO 9409144. (V: Derwent Biotechnology Abstracts an=94-08123.)
- Persson, G., Stahl, A., Johansson, L.-A., Johansson, H. 1996. Korn som stärkelsevara för livsmedelindustrin.- *Sveriges Utsädesförenings Tidskrift* 106: 79-86.
- Potato transgenic plant construction with suppressed tuber sprouting. Patent Nr. DE 4213444. (V: Derwent Biotechnology Abstracts an=94-00290.)
- Rice starch-branching enzymes gene. Patent Nr. JP05317057. (V: Derwent Biotechnology Abstracts an=94-02715.)
- Sidhu, G.S., Oakenfull, D.G. 1992. Cyclodextrin-cholesterol complexation and technology for removing cholesterol from egg and dairy products. V: Abstracts of the sixth international cyclodextrin symposium. Chicago, 1-11.
- Smith, A.M., Denyer, K., Martin, C.R. 1995. What controls the amount and structure of starch in storage organs?- *Plant physiology* 107: 673-677.
- Smith, C.J. 1993. Carbohydrate chemistry: Metabolism of starch. V: Lea, R.J., Leegood, R.C. eds. *Plant biochemistry and molecular biology*. Chichester, John Wiley, 90-100.
- Stark, D.M., Timmerman, K.P., Barry, G.F., Preiss, J., Kishore, G.M. 1992. Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP glucose pyrophosphorylase.- *Science* 258: 287-292.
- Škrabanja, V., Kreft, I., 1998. Resistant starch formation following autoclaving of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats. An in vitro study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 2020-2023.
- Škrabanja, V., Liljeberg, H. G. M., Hedley, C. L., Kreft, I., Björck, I. M. E. 1999. Influence of genotype and processing on the in vitro rate of starch hydrolysis and resistant starch formation in peas (*Pisum sativum* L.).- *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 2033-2039.
- Škrabanja, V., Kovač, B., Golob, T., Liljeberg Elmstahl, H.G.M., Björck, I.M.E., Kreft, I. 2001a. Effect of spelt wheat flour and kernel on bread composition and nutritional characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 497-500.
- Škrabanja, V., Liljeberg, E.H.G.M., Kreft, I., Björck, I.M.E. 2001b. Nutritional properties of starch in buckwheat products: studies in vitro and in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 490-496.
- Tovar, J. 1992. Bioavailability of starch in processed legumes: Importance of physical inaccessibility and retrogradation. Doctoral thesis. Lund, University of Lund, 143 s.
- Villard, P., Kleczkowski, L., Olsen, O.A., Poulsen, P., Okkels, F., Marcussen, J. 1994. Transgenic plant with increased starch content. Patent Nr. WO 9424292. (V: Derwent Biotechnology Abstracts an=95-00535.)
- Wang, T. L., Hedley, C. L. 1993. Genetic and developmental analysis of the seed. V: Casey, R. in Davies, D. R. eds. *Peas: genetics, molecular biology and biotechnology*. Wallingford, CAB International press, 217-236.

- Willmitzer, L., Koßmann, J., Müller-Röber, B., Sonnewald, U. 1993. Starch synthesis in transgenic plants. V: Meuser, F., Manners, D.J., Seibel, W. eds. Plant polymeric carbohydrates. Cambridge, Royal Society of Chemistry, 33-39.
- Zobel, H.F., Stephen, A.M. 1995. Starch: Structure, analysis and application. V: Stephen, A.M. ed. Food polysaccharides and their applications. New York, Marcel Dekker, 19-66.
- Yamada, Y., Hosoya, S., Nishimura, S., Tanaka, T., Kajimoto, Y., Nishimura, A., Kajimoto, O. 2005. Effect of bread containing resistant starch on postprandial blood glucose levels in humans. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69: 559-566.