

JOANNA LE THANH-BLICHARZ ¹

JACEK ANIOŁA ^{2a}

ALEKSANDER WALKOWSKI ¹

GRAŻYNA LEWANDOWICZ ^{2b}

¹ Oddział Koncentratów Spożywczych i Produktów Skrobiowych w Poznaniu, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego

^{2a} Katedra Higieny Żywności Człowieka, ^b Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Ocena strawności diet zawierających skrobię modyfikowane typu RS w badaniach na szczurach *

Digestibility of diets containing RS modified starches assessment in rats

W pracy określono wpływ skrobi opornej na strawność *in vivo* w badaniach na szczurach outbredowych Wistar. W doświadczeniu wykorzystano 40 samców w wieku 12 tygodni. Zwierzęta karmiono czterema rodzajami diet: kontrolną ze wstępnie kleikowaną skrobią ziemniaczaną suszoną na walcach (SW), oraz trzema z dodatkiem różnych preparatów modyfikowanych skrobi opornych (AO, WT, RS). Wykonano oznaczenia parametrów ogólnie żywieniowych i wzrostowych oraz oznaczono strawność *in vivo* metodą klasyczną. Wykazano, że 50% dodatek preparatów opornych na enzymy amylolityczne skrobi modyfikowanych do diet szczurów rasy Wistar spowodował zwiększenie zawartości wody w kale, co świadczy o zdolności tychże preparatów do wiązania wody, a co za tym idzie przyspieszonego pasażu treści pokarmowej czego wynikiem jest jego potencjalne działanie dietetyczne. Oznaczona metodą bilansową strawność diety i jej głównych składników, tzn. białka, tłuszczu oraz węglowodanów (skrobi) była nieznacznie zróżnicowana pomiędzy badanymi grupami. Najniższą strawność *in vivo* odnotowano w przypadku handlowego preparatu RS3.

Słowa kluczowe: badania *in vivo*, skrobia oporna, strawność

The objective of the paper was to assess the effect of RS modified starch on *in vivo* digestibility in Wistar rats. In the experiment, 40 12-week-old rats were used. Animals were fed 4 different diets: control pregelatinised potato starch and 3 diets with resistant starches (AO, WT, RS). Determination of nutritional and growth parameters have been carried out. The *in vivo* digestibility determined by standard method was made as well. It was found that 50% addition of starch preparations resistant to amylolytic enzymes to the diet increased the water content in fecal. It proves that RS preparations are able to bind water and accelerate the feed passage. Digestibility and protein, fat and sugars content

* Praca była finansowana z grantu badawczego MNiSW: N N312 093739

measured by balance method were hardly distinguishable between analyzed diets. The preparation marked RS-3 showed the lowest digestibility.

Key words: digestibility, *in vivo* researches, resistant starch

WSTĘP

Skrobia oporna na enzymy amylolityczne od połowy lat 90. ubiegłego stulecia cieszy się niezmiennie wysokim zainteresowaniem żywieniowców i technologów żywności. Badania nad metodami otrzymywania, strukturą i funkcją biologiczną tego materiału były prowadzone przez szereg ośrodków naukowych (Leszczyński, 2004; Soral-Śmietana i Wronkowska, 2004). Aktualnie na rynku oferowane są preparaty skrobi odpornej typu RS3 (retrogradowanej), jednak w ostatnich latach zainteresowanie przesunęło się w kierunku skrobi typu RS4 (modyfikowanej chemicznie). Skrobie te są atrakcyjne dlatego, że nie tylko wykazują obniżoną strawność, ale również ze względu na fakt, iż charakteryzują się często dużą siłą zagęszczającą oraz zdolnością kształtowania tekstury produktów spożywczych (Zięba i in., 2011 a, b). Aczkolwiek powszechnie uważa się, że skrobie odporne wywierają pozytywny wpływ na organizm człowieka, jednak teza ta każdorazowo wymaga udowodnienia w drodze odpowiednio zaprojektowanych badań. W przypadku oceny właściwości prebiotycznych jest to szczególnie trudne, ponieważ wymaga zaangażowania dużych nakładów na badania laboratoryjne, przy czym należy podkreślić, że jak dotąd standardy procedur *in vitro* nie zostały ustalone. Szczególnie słabo rozpoznany aspektem tej problematyki jest wpływ modyfikacji chemicznej na fizjologiczne oddziaływanie skrobi. Skrobia oporna typu czwartego (RS4) nie została skomercjalizowana prawdopodobnie głównie ze względu na braki rzetelnych informacji o faktycznym wpływie fizjologicznym tego typu preparatów. Tymczasem tego typu skrobia modyfikowana potencjalnie mogłaby być stosowana przez wszystkie zakłady przetwórstwa spożywczego stosujące preparaty skrobiowe jako zagęstniki, stabilizatory, nośniki itp. Szczególnie zainteresowanie powinny wykazywać zakłady mleczarskie produkujące wyroby mleczarskie z dodatkiem żywych kultur bakterii probiotycznych. Zastosowanie w produkcji, zamiast indywidualnej kultury bakteryjnej, całego kompleksu: probiotyk-prebiotyk pozwoliłoby na wytworzenie zupełnie nowej klasy produktów z grupy żywności funkcjonalnej o szczególnie efektywnym oddziaływaniu na organizm człowieka.

W świetle wyników dotychczasowych badań *in vivo* na skrobi o obniżonej strawności uważa się, że spożywanie pokarmów zawierających substancje balastowe prowadzi do ograniczenia pobierania energii z pożywieniem, reguluje perystaltykę jelit, skład i wydalanie kału, działalność mikroflory jelitowej oraz wpływa na wchłanianie i metabolizm lipidów. Wyniki tych badań są jednak niejednoznaczne, często sprzeczne, co w dużej mierze jest związane z różnicami w sposobie otrzymywania nieprzyswajalnych węglowodanów wprowadzonych do diet doświadczalnych (Englyst i in., 1992; Faisant i in., 1995). W badaniach nad wpływem fizjologicznym skrobi typu RS4 dodatkowym problemem jest fakt, iż autorzy nie odnoszą się do rodzaju modyfikacji chemicznej, jaki został przeprowadzony celem obniżenia strawności (Figurska-Ciura i in., 2007; Grajeta i in. 2007; Orzeł i in., 2007).

Celem badań była ocena strawności *in vitro* oraz *in vivo* nowo opracowanych preparatów RS4. Badania *in vivo* obejmowały również ocenę wpływu wysokiego dodatku skrobi modyfikowanych do diet o obniżonej strawności na parametry ogólnie żywieniowe szczurów.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły trzy różne preparaty skrobi modyfikowanej chemicznie, którym nadano następujące oznaczenia:

- AO — preparat otrzymany w procesie sieciowania skrobi ziemniaczanej mieszaniną bezwodnika adypinowego i kwasu octowego zgodnie z metodyką opisaną w poprzedniej naszej pracy (Le Thanh-Blicharz i in., 2011).
- WT — preparat otrzymany w toku kolejno procedury sieciowania skrobi ziemniaczanej trójmetafosforanem (Walkowski i in. 2000) oraz mieszaniną bezwodnika adypinowego i kwasu octowego (Le Thanh-Blicharz i in., 2011)
- RS — handlowy preparat RS3 produkcji National Starch, USA

Jako preparat odniesienia zastosowano skrobię natywną SW, będącą preparatem skrobi ziemniaczanej walcowanej produkcji P.P.H.U. Chemet Sp. z o.o., Plewiska k/Poznań.

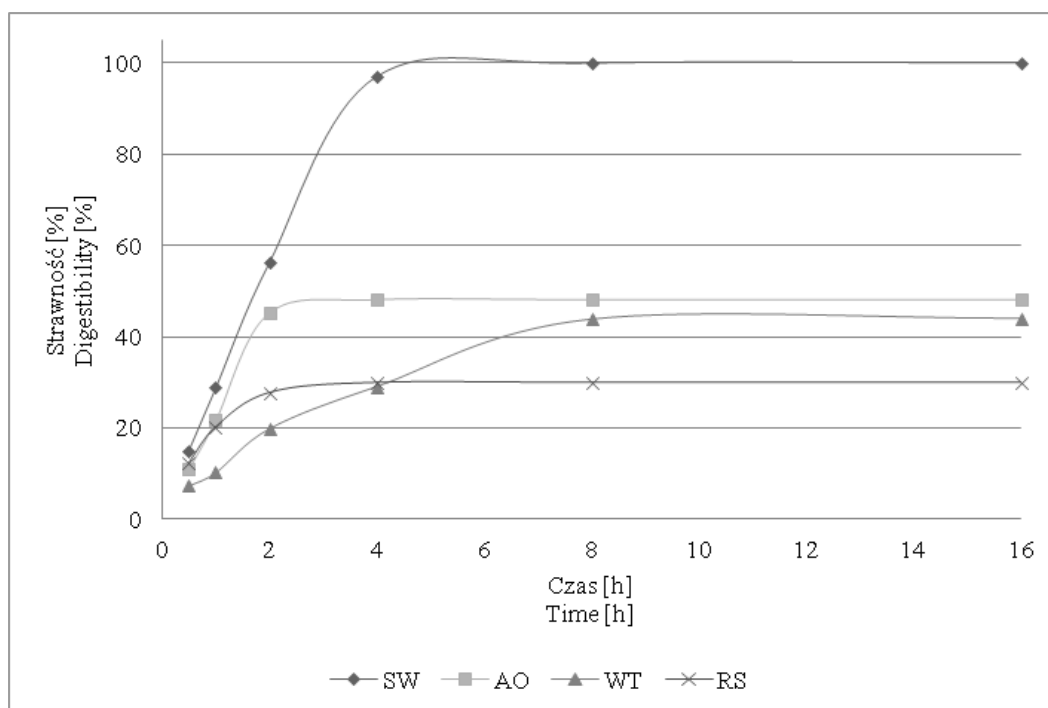
Strawność *in vitro* preparatów skrobiowych określono w oparciu o pomiar ilości glukozy wydzielonej po 16. godzinnej inkubacji kleików skrobiowych z α -amylazą trzuskową i amyloglukozydazą w 37°C (Le Thanh-Blicharz, 2009). Oznaczenia dla poszczególnych preparatów badano w trzech powtórzeniach, a wynik podawano jako średnią.

Ocenie biologicznej poddano preparaty skrobi modyfikowanych chemicznie o zredukowanej podatności na enzymy amylolityczne. Doświadczenie zrealizowano za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej nr 23/2008 z dn. 18.04.2008r, na 40 samcach szczurów outbredowych Wistar w wieku 12 tygodni o średniej masie początkowej około 315g. Zwierzęta pochodzące z hodowli Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu podzielono na 4 równoliczne grupy, które otrzymywały *ad libitum* diety eksperymentalne złożone z: badanych preparatów skrobiowych (50%), kazeiny (20%), oleju słonecznikowego (10%), cukru (10%), skrobi ziemniaczanej (5%), mieszanek: witaminowej (1%) i mineralnej (4%) sporządzonych wg AIN-93(Reeves i in., 1993). Doświadczenie trwało 15 dni, przy czym od 5 do 13 dnia przeprowadzono badania bilansowe metodą klasyczną. W dietach oraz kale oznaczono podstawowy skład za pomocą powszechnie stosowanych metod analitycznych, a zawartość węglowodanów obliczono z różnicy (Rutkowska, 1981)

WYNIKI I DYSKUSJA

Badania tempa trawienia w warunkach *in vitro* wskazują, że handlowe skrobie modyfikowane powszechnie stosowane jako zagęstniki i stabilizatory wykazują obniżoną strawność i charakteryzują się zwolnioną kinetyką trawienia w stosunku do skrobi natywnej, jednak stopień obniżenia strawności jest niewielki i maksymalnie osiąga 10% (Le Thanh i in., 2007). Opracowane w wyniku aktualnie realizowanego projektu preparaty

skrobi odpornej typu RS4 wykazywały strawność obniżoną w znacznie wyższym stopniu (rys. 1). Różniły się również istotnie tempem trawienia.



Rys. 1. Tempo trawienia opornych skrobi modyfikowanych
Fig 1. Digestion rate of resistant modified starches

Tylko preparat skrobi SW (natywnej) wykazał 100% strawność już po 8h trawienia enzymatycznego. Skrobie sieciowane (niezależnie od rodzaju sieciowania) już po około 8h wykazały strawność na poziomie AO 48%, WT 44%. Natomiast najniższą wartością strawności wykazał się preparat handlowej skrobi RS3 30%. Na uwagę zasługuje fakt, że najtrudniej trawioną skrobią okazała się skrobia WT – podwójnie sieciowana. W przypadku tej skrobi odnotowano najdłuższy czas trawienia enzymatycznego. Preparat tego typu mógłby być zatem rekomendowany konsumentom wykazującym zaburzoną gospodarkę cukrową.

W drugim etapie badań przeprowadzono badania *in vivo*. Oznaczono następujące parametry doświadczalne: spożycie suchej masy diety (g/24h), przyrost masy ciała (g/24h) efektywność żywienia (g przyrostu masy ciała/1g spożytej diety), wydalanie kału (g s.m./24h), zawartość wody w kale (g/100g), czas pasażu treści pokarmowej (min), strawność pozorną suchej masy diety, strawność pozorną białka, tłuszczu oraz węglowodanów. Wszystkie oznaczane parametry przedstawiono w tabeli 1 poniżej. W warunkach doświadczenia *in vivo* nie zaobserwowano żadnych niekorzystnych zmian w wyglądzie i zachowaniu zwierząt otrzymujących diety z dodatkiem skrobi modyfikowanych o obniżonej strawności.

Tabela 1

Oddziaływanie preparatów skrobiowych na wybrane parametry doświadczalne
Starch preparation influence on chosen experimental parameters

Parametr doświadczalny Experimental parameter	Grupa SW SW group	Grupa AO AO group	Grupa WT WT group	Grupa RS RS group
Spożycie suchej masy diety (g/24h) Diet intake (g DM/24h)	17,96±2,14	18,60±2,41	17,87±1,32	19,54±2,48
Przyrost masy ciała (g/24h) Body weight gain (g/24h)	3,05±0,50	2,97±0,81	3,08±0,41	4,20±0,74
Efektywność żywienia (g przyrostu masy ciała/ g spożytej diety) Feed efficiency (g of weight / g taken diet)	0,170	0,106	0,172	0,215
Wydalenie kału (g s.m. /24h) Defecation (g DM/ 24h)	1,64±0,22	2,12±0,29	1,77±0,16	5,19±1,41
Zawartość wody w kale (g/100g) Water kontent in faeces (g/100g)	13,52±2,46	18,96±4,05	17,60±2,52	24,92±2,15
Czas pasażu treści pokarmowej (min) Transit time (min)	1112±215	937±182	1159±216	719±93
Strawność pozorna suchej masy diety Apparent diet digestibility	59,96±1,85	54,12±5,56	62,67±2,41	54,54±6,43
Strawność pozorna białka Apparent protein digestibility	92,19±0,77	89,45±0,76	89,92±0,77	82,77±1,55
Strawność pozorna tłuszczu Apparent fat digestibility	98,85±0,24	99,03±0,45	98,84±0,28	99,38±0,32
Strawność pozorna węglowodanów Apparent carbohydrates digestibility	93,57±0,63	92,92±0,66	93,15±0,57	78,02±5,78

Zgodnie z założeniami tej części pracy, pierwszym celem było określenie wpływu skrobi modyfikowanej na wielkość spożycia suchej masy diety przez zwierzęta laboratoryjne. W składzie diet eksperymentalnych skrobia naturalna była w całości zastępowana skrobiami modyfikowanymi ponieważ doniesienia literaturowe wskazują na fakt iż karmienie szczurów dietą zawierającą skrobię oporną jako wyłącznym źródłem węglowodanów nie wpływa na wielkość spożycia suchej masy diety szczurów oraz na parametry wzrostu w porównaniu z dietą zawierającą skrobię kukurydzianą (De Schrijver i in., 1999). W celu określenia wpływu czynników doświadczalnych na ten parametr w trakcie trwania doświadczenia codziennie sprawdzano wielkość spożycia diety. Diety testowe zróżnicowane pod względem rodzaju skrobi były dobrze tolerowane przez zwierzęta. Jak wynika z danych przytoczonych w tabeli 1 szczury karmione preparatami sieciowanymi AO i WT (18,60±2,41 i 17,87±1,32) spożywały podobną ilość suchej masy diety. Tylko szczury karmione dietą z zawartością preparatu RS spożywały jej statystycznie więcej 19,54±2,48. Prawdopodobnie większe spożycie diety przez zwierzęta z tej grupy było wywołane mniejszą jej strawnością, w skutek czego zwierzęta instynktownie pobierały jej większe ilości w celu zaspokojenia potrzeb energetycznych organizmu. Odzwierciedleniem tego faktu był również bezwzględny przyrost masy ciała, który w przypadku diet AO i WT był na podobnym poziomie, natomiast w przypadku diety RS znacznie większy. Efektywność żywienia liczona jako g przyrostu masy ciała na g spożytej diety, dla każdej z badanych grup była różna: najlepszą efektywnością żywienia wykazała się grupa spożywająca preparat RS 0,215, następnie grupa karmiona preparatem skrobi podwójnie sieciowanej WT 0,172 a najmniejszą efektywność osiągnięto w

przypadku preparatu AO 0,106. Inną sytuację odnotowali Figurska-Ciura i in. (2007). Średnie spożycie paszy zawierających 5% dodatek skrobi typu RS4 w dietach doświadczalnych nie różniło się statystycznie w porównaniu do grup kontrolnych, natomiast stwierdzono istotnie niższe przyrosty masy ciała. Natomiast w badaniach innych autorów nie stwierdzono wpływu skrobi odpornej typu RS1-RS3 na przyrost masy ciała zwierząt doświadczalnych (Figurska-Ciura i in., 2007). W grupie RS odnotowano największe wydalanie kału na poziomie 5,19 g s.m./24 h. O połowę mniej wydalaly szczury karmione dietą AO (2,12 g s.m./24 h). Wydalanie kału w grupie WT tylko nieznacznie różniło się od grupy kontrolnej SW. Wyższe przyrosty masy w grupie zwierząt karmionych dietą RS wynikały z większego spożycia diety w obrębie tej grupy. Z tego samego powodu w tej grupie obserwowano też większe wydalanie kału w przeliczeniu na jego suchą masę. Na uwagę zasługuje fakt, że we wszystkich badanych grupach zaobserwowano istotnie większą zawartość wody w stolcu zwierząt w porównaniu z grupą kontrolną. Najwięcej wody zawierał odpowiednio kał RS>AO>WT. Sugeruje to, że skrobie modyfikowane wpływają na zdolność wiązania wody przez kał, ale może też świadczyć o intensywności rozwoju mikroflory jelitowej (Hylla i in., 1998, Le Blay i in., 2003; Muir i in., 2004). Uważa się, że spożywanie pokarmów zawierających skrobię oporną, na skutek intensywnej działalności mikroflory jelitowej, prowadzi m.in. do ograniczenia pobierania energii z pożywieniem (Englyst i in., 1992; Faisant i in., 1995). Ten intensywny rozwój mikroflory probiotycznej mógłby być przyczyną obserwowanej w niniejszej pracy lepszej efektywności żywienia dietą RS. Jednakowoż zebrany materiał doświadczalny, nie obejmujący badań mikrobiologicznych, nie stanowi wystarczającego dowodu dla postawionej powyższej hipotezy.

W przypadku pasażu treści pokarmowej, średni czas pasażu był wyraźnie krótszy w grupie RS, co wskazuje, że skrobia handlowa RS3 oraz sieciowana AO pobudzają silniej motorykę przewodu pokarmowego niż pozostałe skrobie. Sugeruje to również, że skrobie te w górnych odcinkach przewodu pokarmowego pozostają niestrawione w stopniu istotnym dla oddziaływania na motorykę przewodu pokarmowego.

Oznaczona metodą bilansową strawność diety i jej głównych składników, tzn. białka, tłuszczu oraz węglowodanów (skrobi) była nieznacznie zróżnicowana. Grupy karmione z dodatkiem skrobi AO i RS wykazały ogólną strawność diet na poziomie 54%. Natomiast pozostałe grupy na poziomie 60%. Strawność *in vivo* białka i tłuszczu we wszystkich badanych przypadkach była taka sama. Nie wykazano istotnych różnic statystycznych. Natomiast strawność *in vivo* węglowodanów (skrobi) dla preparatów sieciowanych wynosiła 93% a dla skrobi preparatu RS3 78%. Wartości strawności *in vivo* znacznie różniły się od wartości oznaczonych w badaniach *in vitro*. Także inni autorzy (Biliaderis 1991, Galiński i in. 2000, Lee 1985) odnotowali znaczne różnice między strawnością *in vivo* a strawnością *in vitro*, która to nie uwzględnia wzajemnych oddziaływań pomiędzy składnikami pożywienia, procesów mechanicznych, jak również zmian w sekrecji soków trawiennych oraz działania mikroflory przewodu pokarmowego. Zagadnienie właściwego oznaczania strawności *in vitro* oraz *in vivo* jak również korelacji pomiędzy tymi parametrami było przedmiotem szeregu badań w różnych zespołach (Fässler i in., 2006; Hoover i Zhou, 2003; Skrabanja i in., 1998; Sun i in., 2006; Wiseman i in., 2006). Metody

in vitro oraz *in vivo* oznaczania strawności skrobi nie zawsze dają porównywalne wyniki. Najlepsze rezultaty uzyskuje się w przypadku skrobi odpornej typu RS3 i nieco gorsze w odniesieniu do RS2 (Fässler i in., 2006). Brakuje natomiast danych w odniesieniu do skrobi typu RS4. Skrobia oporna typu RS4 znacząco różni się od pozostałych typów swoją strukturą cząsteczkową. Stwarza to już merytoryczny problem na poziomie oznaczeń *in vitro*. Wszystkie proponowane metody enzymatyczne oznaczania strawności skrobi bazują na hydrolizie wiązań glikozydowych (Le Thanh i in., 2007). Skrobie modyfikowane chemicznie zawierają również inne wiązania (np. estrowe), które również są trawione *in vivo*. Generalnie uważa się iż w celu uzyskania porównywalności w oznaczenia metodami *in vitro* oraz *in vivo* konieczne jest położenie nacisku na doskonalenie metod *in vitro* (Wiseman. i in., 2006). Obserwowane różnice pomiędzy strawnością *in vitro* oraz strawnością pozorną oznaczona *in vivo* mogą być spowodowane niedoskonałością metody *in vitro*, w której uwzględnia się wyłącznie działanie enzymów amylolitycznych. Procesy trawienia *in vivo* są znacznie bardziej złożone, obejmują wszystkie zachodzące w organizmie człowieka procesy biochemiczne, co może pozwalać na bardziej efektywną przemianę struktur utworzonych w wyniku modyfikacji chemicznej skrobi RS4.

WNIOSEK

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że 50% dodatek preparatów opornych na enzymy amylolityczne skrobi modyfikowanych do diet szczurów spowodował zwiększenie zawartości wody w kale, co świadczy o zdolności tychże preparatów do wiązania wody, a co za tym idzie przyspieszonego pasażu treści pokarmowej czego wynikiem jest jego potencjalnie działanie dietetyczne.

LITERATURA

- Biliaderis C.G. 1991. The structure and interactions of starch with food constituents. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1991; 1 (69): 60 — 78.
- De Schrijver R., Vanhoof K. 1999. N-nitrosoproline formation in rats fed enzyme resistant starch. *Nutrition Research* 19 (4): 623 — 627.
- Englyst H.N., Kingman S.M., Cummings J.H. 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition* 46(2): 33–50.
- Faisant N., Buleon A., Collona P., Molis C., Lartigue S., Galmiche J.P., Champ M. 1995. Digestion of row banana starch in the small intestine of healthy humans: structural features of resistant starch. *British Journal of Nutrition* (73): 111 — 123.
- Fässler C., Arrigoni E., Venema K., Hafner V., Brouns F., Amad R. 2006. Digestibility of resistant starch containing preparations using two *in vitro* models *European Journal of Nutrition* 45: 445 — 453.
- Figurska-Ciura D. Orzeł D. Styczyńska M. Leszczyński W. Żechałko-Czajkowska A. 2007. Wpływ skrobi odpornej RS 4 na metabolizm szczurów rasy Wistar. Wskaźniki biochemiczne i lipidowe. 58 (1): 1 — 6.
- Galiński G., Gawęcki J., Remiszewski M. 2000. Strawność skrobi natywnych i modyfikowanych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 3 (24): 58 — 68.
- Grajeta H. Prescha A. Biernat J. 2007. Wpływ skrobi odpornej RS4 na zawartość wapnia w osoczu krwi i kości udowej oraz na jego absorpcję i retencję pozorną u szczurów doświadczalnych. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna* 40 (1): 99 — 105.
- Hoover R., Zhou Y. 2003. *In vitro* and *in vivo* hydrolysis of legume starches by α -amylase and resistant starch formation in legumes — a review *Carbohydrate Polymers* 54: 401 — 417.

- Hylla S., Gostner A., Dusel G., Anger H., Bartram H.P., Christl S.U., Kasper H., Scheppach W. 1998. Effects of resistant starch on the colon in healthy volunteers: possible implications for cancer prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* 1 (67): 136 — 142.
- Le Blay G.M., Michel C. D., Blottiere H. M., Cherbut C. J. 2003. Raw potato starch and short-chain fatty fructooligosaccharides affect the composition and metabolic activity of rat intestinal microbiota differently depending on the caecocolonic segment involved. *J. Appl. Microb.* 2 (94): 312 — 320.
- Lee P.C. 1985. Digestibility of native and modified starches: in vitro studies with human and rabbit pancreatic amylases and in vivo studies in rabbits. *J. Nutr.* 1 (115): 93 — 103.
- Le Thanh J., Błaszczak W., Lewandowicz G. 2007. Digestibility vs structure of food grade modified starches, *EJPAU* 10(3), #10. Dostępne online: <http://www.ejpau.media.pl/volume10/issue3/art-10.html>.
- Le Thanh-Blicharz J. 2009. Praca doktorska pt. "Charakterystyka dietetycznych produktów spożywczych otrzymywanych w procesach modyfikacji skrobi". Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu.
- Le Thanh-Blicharz J., Małysek Z., Walkowski A., Drożdżyńska A., Lewandowicz G. 2011. Właściwości reologiczne i tekstura kleików nowego typu RS4. *Postępy Nauki i Technologii przemysłu Rolno-Spożywczego* nr 4, t.66: 53 — 65.
- Muir J. G., Yeow E. G. W., Keogh J., Pizzey C., Bird A. R., Shape K., O'Dea K., Macrae F. A. 2004. Combining wheat bran with resistant starch has more beneficial effects on fecal indexes than does wheat bran alone. *Am. J. Clin. Nutr.* 6 (79): 1020 — 1028.
- Orzeł D., Figurska-Ciura D., Styczyńska M., Leszczyński W., Żechałko-Czajkowska A. 2007. Wpływ skrobi odpornej RS 4 na absorpcję magnezu i żelaza u szczurów rasy Wistar. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 58 (1): 29 — 34.
- Reeves P. G., Nielsen F. H., Fahey G. C. Jr. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final rapport of American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 11 (123): 1939 — 1951.
- Rutkowska U. 1981. Wybrane metody badania składu i wartości odżywczej żywności. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa.
- Skrabanja V., Laerke H. N., Kreft I. 1998. Effects of Hydrothermal Processing of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Groats on Starch Enzymatic Availability *In Vitro* and *In Vivo* in Rats. *Journal of Cereal Science* 28: 209 — 214.
- Soral-Śmietana M., Wronkowska M. 2004 Resistant starch — nutritional and biological activity. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 13/54 (S1 1): 51 — 64.
- Sun T., Lærke H. N., Jørgensen H., Knudsen K. E. B. 2006. The effect of extrusion cooking of different starch sources on the *in vitro* and *in vivo* digestibility in growing pigs. *Animal Feed Science and Technology* 131: 66 — 85.
- Walkowski A., Lewandowicz G., Szymańska G., Gzyl P., Mączyński M. 2000. Sposób otrzymywania skrobi modyfikowanej E 1412 do produktów sterylizowanych. Projekt wynalazczy nr 1/2000 z dnia 12.01.2000.
- Wiseman J. 2006. Variations in starch digestibility in non-ruminants *Animal Feed Science and Technology* 130: 66 — 77.
- Zięba T., Szumny A., Kapelko M. 2011. Properties of retrograded and acetylated starch preparations: Part 1. Structure, susceptibility to amylase, and pasting characteristics. *LWT — Food Science and Technology* 44: 1314 — 1320.
- Zięba T., Juszcak L., Gryszkin A. 2011. Properties of retrograded and acetylated starch preparations: Part 2. Dynamics of saccharification with amyloglucosidase and rheological properties of resulting pastes and gels. *LWT — Food Science and Technology* 44: 1314 — 1320.