اندازه گیری و مقایسه فعالیت لیپاز، لیپواکسیژناز و فیتاز در کینوا و آمارانت

سیده سعادت عزیزی[1*]، محمد حسین عزیزی[2]، رکسانا موگویی[3]،
مینا کارگزاری[4]، پیمان رجائی[5]

۱ - دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی تهران شمال
۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه تربیت مدرس
۳ - عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
۴ - استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
۵- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین

چکیده:
بیماران مبتلا به سلیاک نیازمند پیروی از یک رژیم فاقد گلوتن در سراسر عمر خود هستند. آمارانت و کینوا شبه غلات فاقد گلوتنی هستند که ارزش تغذیه ای بالایی دارند و می‌توانند برای تولید محصولات نانوایی با کیفیت به کار روند. با وجود اینکه تحقیقات مختلف ارزش غذایی و ترکیبات سودمند تغذیه ای را در کینوا و آمارانت نشان داده اند اما فعالیت آنزیمی آن‌ها ناشناخته مانده یا تحقیقات اندکی بر روی آن‌ها صورت گرفته است. با توجه به اهمیت آنزیم‌ها در تولید محصولات با کیفیت نانوایی، در این تحقیق میزان فعالیت آنزیم‌های لیپاز، لیپواکسیژناز و فیتاز در آمارانت و کینوا بررسی شده است تا اثرات مفید یا زیان آور آنزیم‌های این دانه‌ها در کاربردهای غذایی شناسایی شوند و با اصلاح فعالیت آنزیمی این شبه غلات، محصولات با کیفیت بالاتری ازآن‌ها تهیه گردد؛ همچنین در صورت امکان، از آرد این دانه‌ها برای اصلاح و غنی سازی آرد گندم استفاده شود. نتایج این تحقیق نشان داده است که تمامی روش‌های به کار رفته در این تحقیق کارآیی لازم برای سنجش فعالیت آنزیمی را داشته اند؛ کینوا و آمارانت دارای فعالیت لیپازی، لیپواکسیژنازی و فیتازی بوده اند. فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز در کینوا به طور معناداری($P < 0.05$) از آمارانت بیشتراست و فعالیت آنزیم‌های لیپاز و فیتاز در کینوا نسبت به آمارانت به طور معنا داری($P < 0.05$) کمتر است

واژه های کلیدی: آمارنت، کینوا، لیپاز، لیپواکسیژناز، فیتاز، فاقد گلوتن

۱- مقدمه

بیماری سلیاک یک بیماری خود ایمنی است . این بیماری عدم تحمل به گلوتن دائمی در افرادی که به طور ژنتیکی به پروتئین گلوتن (موجود در گندم، جو و چاودار) حساس هستند؛ ایجاد می‌کند. گیلیادین موجود در غلات حاوی گلوتن برای افراد مبتلا به سلیاک اثر سمی دارد. تخمین زده شده که در حدود ۱٪ جمعیت جهان به این بیماری مبتلا هستند. تنها راه درمانCD [۱] استفاده از یک رژیم غذایی فاقد گلوتن(GF) در تمام طول عمر است. بنابراین افراد مبتلا نیاز به محصولات غذایی مانند نان یا پاستا برپایه غلات GF یا شبه غلات دارند (Wang et al.,2017 ؛ Inglett et al.,2015؛ Alvarez-Jubete et al.,2010). گلوتن مهمترین پروتئین سازنده بافت محصولات آردی موجود در آرد گندم است که در ساختمان مغز و ظاهر بسیاری از محصولات آردی تهیه شده از آرد گندم از جمله نان دخالت دارد (Lazaridou et al.,2007). ویژگی های منحصر به فرد نان گندم بیشتر به دلیل خواص ویژه ی پروتئین گلوتن است. ایجاد تمامی خواص گلوتن در محصولات فاقد گلوتن کاری بسیار پیچیده است. محصولات فاقد گلوتن کیفیت پایینی داشته و از نظر محتوای مواد مغذی و فیبرها هم ضعیف هستند؛ تولید نان فاقد گلوتن علاوه بر چالش تکنولوژیکی، یک چالش مهم تغذیه ای نیز به شمار می‌آید (De Moraise et al.,2013). جایگزین های زیادی برای غلات حاوی گلوتن وجود دارد که از این میان می توان به شبه غلاتی مانند کینوا[۲](Q) و آمارانت (A) اشاره کرد. این گیاهان از نظر تغذیه ای بسیار مغذی هستند و استفاده از آنها در رژیم غذایی GF ، تنوع و کیفیت تغذیه ای محصولات GF را بهبود می دهد(Alvarez- et al.,2010؛ Koehler,2014 Jubete).

کینوا

کینوا (Q) یک گیاه خوراکی است و بیش از ۵۰۰۰ سال است که توسط انسان کشت می‌شود. دانه ها و برگ‌های این گیاه، برای انسان قابلیت مصرف خوراکی دارند. منشأ Q از رشته کوه‌های آند است اما امروزه در سراسر جهان، از جمله ایالات متحده ی آمریکا، کانادا، اروپا و هند کشت می‌شود. Q فاقد گلوتن است و به راحتی هضم می‌شود. دانه های Q به دلیل محتوای پروتئین، چربی، فیبر، ویتامین ها، مواد معدنی و ترکیبات آنتی اکسیدانی موجود در آن ارزش غذایی بالایی دارند. در نتیجه Q پتانسیل استفاده در تولید محصولات فاقد گلوتن را دارد و حتی می‌تواند مکملی برای آرد گندم باشد. Q به علت داشتن ارزش تغذیه ای بالا، به عنوان یک غذای عملگرا و یک ابر غذا شناخته می‌شود. سازمان ملل متحد، سال ۲۰۱۳ را با هدف افزایش توجه جهانی به ارزش تغذیه ای و امنیت غذایی و سال جهانی Q نامگذاری کرده است(Nowak et al.,2016 ؛ et Hemalatha al.,2016 ؛ Inglett et al.,2015 ؛ Ramos Diaz et ؛Caussette et al.,1997 .al.,2013)

آمارانت

آمارانت (A) یک گیاه خوراکی است و بیش از ۵۰۰۰ سال است که توسط انسان استفاده شده است. گونه های مختلف A در آب و هوای گرمسیری و نیمه گرمسیری گسترده شده اند و همین امر کشت این گیاه را تسهیل کرده است. آمارانت فاقد گلوتن است. دانه A به دلیل محتوای پروتئین، فیبر، مواد آنتی اکسیدانی، مواد معدنی و ویتامینی ارزش غذایی بالایی دارند. در ترکیب اسید آمینه های A دسترسی مناسبی به اسید آمینه های محدود کننده ی غلات و حبوبات مانند لیزین و متیونین وجود دارد. مطالعات نشان داده است که استفاده از A در رژیم غذایی انسان، خطر بیماری هایی

---

[۱] Gluten Free(GF)
[۲] quinoa
[۳] Amaranth

مانند دیابت، سرطان، کلسترول و فشار خون بالا را کاهش می‌دهد. آمارانت یک غذای امید بخش در طی هزار سال معرفی شده است و به دلیل محتوای تغذیه ای بالای آمارانت، استفاده ی تجاری از A تشویق و تبلیغ شده است. A و Q به ترتیب ۸/۸ ٪، ۲۳/۳٪ خاصیت مهار کنندگی ACE[1]را دارند. میزان فعالیت مهار کنندگی ACE در A کمتر از Q است؛ اما این میزان از غلاتی مانند گندم و برنج بالاتر است(Arêas et al.,2016؛ Ramos Diaz et al.,2013).

آنزیم لیپاز

لیپازها (EC 3.1.1.3) پیوندهای استری راشکسته و تجزیه می‌کنند. لیپازها در مواد غذایی دارای اثرات مثبت و منفی هستند. این آنزیم‌ها درآغاز واکنشهای اکسیداسیونی نقش دارد و باعث کاهش کیفیت آرد می شوند. لیپازها جایگزین های مناسبی برای استفاده از امولسیفایرها درمواد غذایی هستند. به دلیل اهمیت اقتصادی لیپازها، استفاده ازآنها به عنوان یک عامل بهبود دهنده یا کمک فرآیند در محصولات نانوایی افزایش یافته است. قسمتهای قطبی حاصل از تجزیه لیپید گندم در اثر عمل آنزیم لیپاز، نقش عملکردی مثبتی را در تولید نان دارد و لیپازها میتواند جایگزین امولسیفایرهای سنتتیکی مانند داتم در تولید نان باشند؛ همچنین حجم و حجم مخصوص نان را افزایش دهند (Gerits et al.,2017; Delcour &Hoseney, 2010). با توجه به اثرات مطلوب لیپازها در تولید محصولات نانوایی؛ به نظر میرسد بااستفاده از این آنزیم‌ها در تولید محصولات فاقد گلوتن تهیه شده از کینوا و آمارانت ؛ محصولی با کیفیت بالاتری تولید گردد.

آنزیم لیپواکسیژناز

آنزیم لیپواکسیژناز(EC 1.13.11.34) یک آنزیم دی اکسیژناز است که اکسیداسیون اسیدهای چربی که دارای گروه سیس-سیس-۴،۱ پنتا دی ان (Cis-cis-1,4pentadiene) هستند را به هیدروپراکسیدها انجام می-دهد. لیپواکسیژناز به طور طبیعی در آرد گندم وجود دارد و دارای نقش های فراوانی در محصولات صنایع پخت است. در طی مراحل مخلوط کردن خمیر، لیپواکسیژناز می‌تواند موجب اکسیداسیون پیگمان‌های آرد شود و مغز نان را سفید تر کند. لیپواکسیژناز درصنایع پخت می‌توانند موجب افزایش تحمل به مخلوط کردن و بهبود خواص رئولوژیکی خمیر و افزایش حجم نان شوند(Cilliers & Swart,2016 ; Danielson, 2007).

آنزیم فیتاز

در حدود ۸۰ ٪ فسفر غلات به صورت اسید فیتیک در آنها ذخیره شده است. اسید فیتیک به دلیل داشتن خاصیت شلاته کنندگی یون های کلسیم، منیزیم و آهن خاصیت ضد تغذیه ای داشته و در نتیجه منبع ضعیف فسفر به شمار می آید. آنزیم فیتاز با تجزیه ی اسید فیتیک، دسترسی زیستی به ریزمغذی های معدنی را افزایش می‌دهد. فیتازها غلات به دلیل افزایش پذیرش مصرف کنندگان و کاهش احتمال بروز واکنش های آلرژیک جایگزین‌های بهتری برای فیتازهای میکروبی به شمار می‌آیند(Vashishth et al.,2017).

۲- مواد و روش ها

۲-۱-مواد

از کینوا (Chenopodium quinoa Wild) و آمارانت (Amaranthus hypochondriacus)تولید کشور پرو در انجام این تحقیق استفاده شد. ، Twin20 مورد استفاده دراین تحقیق از شرکت سیگما آلدریچ تهیه شد؛ سایرمحلول‌ها و مواد شیمیایی ساخت شرکت مرک بود.

۲-۲-روش ها

۲-۲-۱ -آنزیم لیپاز

برای سنجش فعالیت آنزیمی از روش (and Pike2006 Rose) استفاده شد.

[1] Angiotensin-Converting Enzyme

۲- ۲-۲- آنزیم لیپواکسیژناز

بر اساس روش اصلاح شده ی (Sun et al.,2012) انجام شد.

۱-۲-۲-۲ -استخراج آنزیم

۵ گرم از آرد مورد نظر را با ۲۵ میلی لیتر بافر فسفات سرد(۰/۱مولار با pH = 6/5 و دمای C^0 ۴-۵) مخلوط گردید و به مدت ۲ ساعت در دمای C^0 ۴ نگهداری شد و به فواصل زمانی ۱۰ دقیقه، سوسپانسیون حاصل، هم زده می‌شد. سپس سوسپانسیون حاصل به داخل فالکون های ۱۵ میلی لیتری ریخته شد و تو سط سانتریفوژی با دورg ۷۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مایع فوقانی از میکروفیلترهای سرنگی با قطر ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد و محلول شفاف حاصل به عنوان منبع آنزیم لیپواکسیژناز مورد استفاده قرار گرفت. در تمام زمان اندازه گیری، عصاره ی آنزیمی داخل یخ نگهداری گردید.

۲-۲-۲-۲- تهیه محلول سوبسترا

به ۰/۰۶ گرم لینولئیک اسید، ۱ میلی لیتر اتانول خالص اضافه شد و ظرف حاوی مخلوط را خوب تکان داده شد. سپس ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات (۰/۱مولار با pH =۶/۸) که حاوی ۰/۰۵ گرم Twin20 بود را به مخلوط لینولئیک اسید و اتانول اضافه شد و خوب هم مخلوط گردید.

۳-۲-۲-۲- سنجش آنزیمی

۶۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۲ میلی لیتر سوبسترا با هم مخلوط شد و ۵ میلی لیتر محلول سود ۰/۵ مولار به آن اضافه شد و به مدت ۴ دقیقه به مخلوط حاصل زمان داده شد تا واکنش به طور کامل انجام شود. افزودن سود موجب دناتوره شدن آنزیم شده و لینولئیک اسید را به سمت تشکیل نمک آن هدایت می کند. بنابراین یک سیستم شفاف حاصل می‌شود. سپس میزان جذب محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۳۴ nm قرائت گردید. یک واحد فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز به صورت افزایش ۰/۰۰۱ جذب در طول موج ۲۳۴ nm و در زمان یک دقیقه تعریف می‌شود.

فرمول۱- محاسبه فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز

$$x = \frac{\Delta OD\ 234 \times V2}{\Delta t M(1-W)V1} \times 1000$$

ΔOD234: میزان جذب در ۲۳۴ nm، Δt : زمان انجام واکنش به دقیقه (۴ دقیقه)، M: جرم آرد (بر حسب گرم)، W: رطوبت آرد، V1: حجم عصاره ی خام آنزیمی که به سوبسترا اضافه می‌شود (بر حسب میلی لیتر)،V2: حجم عصاره ی خام آنزیمی (بر حسب میلی لیتر)

۲- ۳-۲- آنزیم فیتاز

بر اساس روش (Zimmermann et al.,2002) انجام شد.

۳-۲- تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه وتحلیل آماری نتایج داده‌های این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد بررسی قرار گرفت. تمام آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام پذیرفت. برای تحلیل نتایج داده‌ها روش آنالیز واریانس (ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه دانکن استفاده شد. نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم‌افزار Excel 2013 رسم گردید.

جدول ۱- جدول مقایسه ی میانگین صفات مورد بررسی

متغیر مورد بررسی	فعالیت آنزیم لیپازU/g	فعالیت آنزیم لیپوکسیژنازU/g	فعالیت آنزیم فیتاز U/Kg
آمارانت	^{b}۱,۷۸	^{a} ۱۳۸۹۹,۸	۷۴۳۳^{b}
کینوا	۱,۶۱۵^{a}	^{b} ۱۴۵۳۴	۱۶۵۹,۵^{a}

تفاوت اعدادی که دارای حروف مشابه می باشند از نظر آماری بر اساس آزمون دانکن معنی دار نیست(P-Value<۰,۰۵)

۳- بحث و نتیجه گیری

با توجه به جدول مقایسه میانگین ها موارد زیر برداشت می-گردد:

۳-۱ - میزان فعالیت آنزیم لیپاز

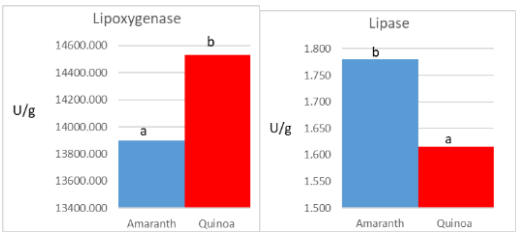
تفاوت میان فعالیت آنزیم لیپاز در نمونه های آمارانت (A) و کینوا (Q) معنا داراست . فعالیت لیپازی A از Q بیشتر است . فعالیت این آنزیم در کینوا (1.615 U/g) و آمارانت (1.780 U/g) بیشتر است (نمودار ۱).

(Rose & Pike 2006) با اندازه گیری فعالیت آنزیم لیپاز، شرایط بهینه برای اندازه گیری فعالیت آنزیم لیپاز را تعیین کردند.

۳-۲- میزان فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز

تفاوت میان فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز در نمونه های آمارانت (A) و کینوا (Q) معنا داراست. مقدار فعالیت لیپواکسیژناز Q از A بیشتر است (نمودار ۱). روش به کار رفته در این تحقیق برای سنجش فعالیت انزیم لیپواکسیژناز روش مناسبی است و کارآیی لازم برای سنجش فعالیت آنزیمی را دارد و به خوبی می‌تواند فعالیت لیپواکسیژناز را در کینوا و آمارانت مشخص کند. میزان فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز در کینوا بالاست. روش به کار رفته توسط (Caussette et al.,1997) قادر به سنجش و تشخیص فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز در کینوا نبوده است. (Sun et al., *2012*) خصوصیات لیپواکسیژناز مالت گندم را با استفاده از این روش در دما و شرایط مختلف pH بررسی کردند. در مطالعه ی این محققان اپتیمم فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز در دمای 35^0C و pH=6.8 و دمای غیر فعال شدن این آنزیم 70^0C تعیین شد.

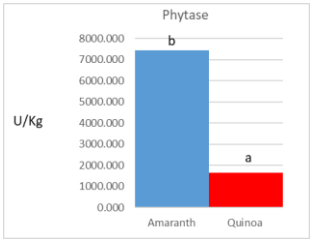
نمودار۱- نمودار فعالیت آنزیمی لیپاز و لیپواکسیژناز در آمارانت و کینوا



3-۳- میزان فعالیت آنزیم فیتاز

فعالیت آنزیم فیتاز در A به طور معنادری نسبت به Q بالاتر است (نمودار۲). فعالیت آنزیمی A ، ۷۴۳۳ U/Kg است که نسبتفعالیت آنزیمی Q ، U/Kg ۱۶۵۹,۵ مقدار بیشتری دارد. لازم به ذکر است که تا کنون فعالیت آنزیم فیتاز در کینوا و آمارانت مورد بررسی قرار نگرفته است.

نمودار ۲- نمودار فعالیت آنزیمی فیتاز در آمارانت و کینوا



۴-۳- نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که آمارانت و کینوا حاوی آنزیم-های لیپاز، لیپواکسیژناز و فیتاز هستند. تمامی روش های به کار رفته در این تحقیق کارآیی لازم برای سنجش فعالیت آنزیمی را دارند و به به خوبی می‌توانند؛ فعالیت آنزیمی را در این شبه غلات شناسایی کنند. نتایج این تحقیق نشان داده است که فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز در کینوا به طور معناداری($P < 0.05$) از آمارانت بیشتراست و فعالیت آنزیم‌های لیپاز و فیتاز در کینوا نسبت به آمارانت به طور معنا داری($P < 0.05$) کمتر است . فعالیت آنزیم فیتاز در آمارانت بیشتر از کینوا است؛ باتوجه به کوتاه بودن زمان تخمیر در محصولات فاقد گلوتن، به نظر می‌رسد آمارانت را با اطمینان بیشتری می‌توان برای تولید محصولات فاقد گلوتن به کار برد. لازم است تحقیقات بعدی سنجش فعالیت آنزیمی گندم با استفاده از روش‌های به کار رفته در این تحقیق باشد تا زمینه ی مقایسه ی فعالیت آنزیمی این شبه غلات با گندم ایجاد شود؛ در این صورت می‌توان از آنزیم‌های این شبه غلات جهت اصلاح فعالیت آنزیمی گندم استفاده کرد. همچنین می‌توان با افزودن آنزیم‌های لازم فعالیت آنزیمی این شبه غلات را در جهت تولید محصولات فاقد گلوتن با کیفت اصلاح کرد.

۴- منابع

1. Alvarez-Jubete, L., Arendt, E. K., & Gallagher, E. (2010). "Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional gluten-free ingredients". Trends in Food Science & Technology. Volume 21, Issue 2, Pages 106–113
2. Arêas, J.A.G., Carlos-Menezes, A.C.C.C., Soares, R.A.M. (2016). "Amaranth". Encyclopedia of Food and Health. Available at http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00025-8
3. Caussette, M., Kershaw, J. L., & Sheltod, D. R. (1997). "Survey of enzyme activities in desaponified quinoa Chenopodium quinoa Willd". Food Chemistry. Vol. 60, No. 4, pp. 587-592
4. Cilliers, T., & Swart, P. (2017). "Lipoxygenases: From Isolation to Application", Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, Volume 16, Issue 1, Pages 199–211. doi: 10.1111/1541-4337.12239
5. Danielson, E. M. (2007). "Addition of Soybean Lipoxygenase to All-Purpose Flour and its Effects on Dough Gluten Strength and Bread Quality", Master of Science Thesis.
6. Delcour, J., & Hoseney, R. (2010). "Principles of Cereal Science and Technology", Third Edition, R&R Research Services, Manhattan, Kansas, U.S.A. ISBN: 978-1-891127-63-2
7. De Morais, E. C., Cruz, A. G., & Bolini, H. M. A. (2013). "Gluten-free bread: multiple time–intensity analysis, physical characterisation and acceptance test", International Journal of Food Science & Technology, Vol 48: 2176–2184. doi: 10.1111/ijfs.12202
8. Gerits,L., Pareyt, B., Decamps,K.,& Delcour, J. (2017). "Lipases and Their Functionality in the Production of Wheat-Based Food Systems", Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, Vol.13, Published online, doi: 10.1111/1541-4337.12085
9. Hamada,S., Keitaro,S., Aoki, N., & Suzuki,Y. (2013). "Improvements in the qualities of gluten-free bread after using a protease obtained from Aspergillus oryzae", Journal of Cereal Science, Volume 57, Pages 91-97
10. Hatta,E., Matsumoto,K., & Honda,Y.(2015). "Bacillolysin, papain, and subtilisin improve the quality of gluten-free rice bread", Journal of Cereal Science, Volume 61, Pages 41-47
11. Hemalatha, P., Bomzan, D.P., Sathyendra Rao, B.V., & Sreerama,Y. N. (2016). "Distribution of phenolic antioxidants in whole and milled fractions of quinoa and their inhibitory effects on a-amylase and a-glucosidase activities". Food Chemistry, Volume 199: 330–338
12. Hidalgo, A., Brusco, M., Plizzari, L., & Brandolini, A. (2013). "Polyphenol oxidase, alpha-amylase and beta-amylase activities of Triticum monococcum, Triticum turgidum and Triticum aestivum: A two-year study", Journal of Cereal Science, Volume 58: Issue 1, Pages 51-58, available at https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.04.004
13. Inglett, G.E., Chen, D., & Liu, S.X. (2015). "Antioxidant Activities of Selective Gluten Free Ancient Grains", Food and Nutrition Sciences, Volume 6:612-621
14. Kawamura-Konishi, Y., Shoda, K., Koga,H., & Honda,Y. (2013). "Improvement in gluten-free rice bread quality by protease treatment", Journal of Cereal Science, Volume 58: 45-50
15. Koehler, P., Wieser, H., & Konitzer, K. (2014). "Celiac disease and Gluten Multidisciplinary Challenges and Opportunities", Academic Press, Elsevier Inc, Pages 173-223
16. Lazaridou, A., Duta,D., Papageorgiou, M., Belc, N., & Biliaderis, C.G. (2007). "Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations", Journal of Food Engineering, Volume 79: 1033-1047.
17. Lorenz, K., & Nyanzi, F. (1989). "Enzyme activities in quinoa (Chenopodium quinoa)", International

Journal of Food Science and Technology, 24:543-551
18. Nowak,V., Du, J., Ruth., & Charrondière, U. (2016). "Assessment of the Nutritional Composition of Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.)", Food Chemistry, Volume 193, Pages 47-54, doi: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.111
19. Ramos Diaz, J.M., Kirjoranta, S., Tenitz,S, A. Penttilä, P., Serimaa, R., Lampi, A. M., & Jouppila,K. (2013). "Use of amaranth, quinoa and kañiwa in extruded corn-based snacks", Journal of Cereal Science, Volume 58: 1-9. Available at
20. http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2013.04.003
21. Renzetti, S., & Arendt, E. K. (2009). "Effect of protease treatment on the baking quality of brown rice bread: from textural and rheological properties to biochemistry and microstructure". Journal of Cereal Science, Volume 50: 22-28.
22. Rose, D. J., & Pike, O. A. (2006). A simple method to measure lipase activity in wheat and wheat bran as an estimation of storage quality, J Amer Oil Chem Soc, Volume 83: 415. Available at https://doi.org/10.1007/s11746-006-1220-0

Sun,W., Du, J., Jin,Y., Liu, J., & Kong, L. (2012). Preliminary research on wheat lipoxygenase during malting, J. Inst. Bre,
23. Volume 118: 192–197, wiley online library.com, DOI 10.1002/jib.27
24. Tucker, G. A., & Woods, L.F.J. (1995). Enzymes in food processing, Enzymes in Food Processing,
25. 2nd edition, Springer US.
26. Vashishth, A., Ram, S., & Beniwal,V. (2017). Cereal phytases and their importance in improvement of micronutrients bioavailability, Biotech J, Volume 7:42
27. Wang, K., Lu, F., Li, Zh., Zhao, L., han, Ch. (2017). Recent developments in gluten-free bread baking approaches: a review, Food Science and Technology, DOI: http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.01417
28. Zimmermann, B., Lantzsch, H. J., Langbein, U., Drochner,W. (2002). Determination of Phytase activity in cereal grains by direct incubation, J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr, Volume 86: 347–352