



## STARCH: BIOSYNTHESIS, GRANULE STRUCTURE AND GENETIC MODIFICATIONS

Hülya ÖLÇER & Betül AKIN

Dumlupınar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü,  
Merkez Kampüs, Kütahya

*Geliş tarihi: 25.07.2007*

*Kabul tarihi: 10.07.2008*

### ABSTRACT

Starch is the main product of photosynthesis and its the most dominant reserve polysaccharide that stored in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. Starch is a staple food in human and animal diets, but also a raw material widely used for industrial purposes, such as food, paper and textile. Starch granule structure, amylose and amylopectin molecular structure, amylose and amylopectin ratio, and also lipid, protein and phosphate content are the main determinants that effect the functional properties of starch, in turn, its industrial application. For example, in food industry high amylose starches are preferred in sweet and fried products, while amylose free starches are used in frozen foods. In fact, starch is generally modified by physical, enzymatic or chemical treatments to alter structural and functional properties for industrial applications. Today starches with improved functionality has also been produced from mutant and genetically modified plants. Increased knowledge about enzymes that are involved in starch biosynthesis and improvement in plant biotechnology made possible to alter starch composition by genetic modifications. This review focus on the starch granule structure, starch biosynthetic enzymes in storage tissues and their genetic modifications with potential benefits.

**Key Words:** *Amylose, amylopectin, granule bound starch synthase, waxy mutant.*

## NIŞASTA: BİYOSENTEZİ, GRANÜL YAPISI VE GENETİK MODİFİKASYONLAR

### ÖZET

Nişasta bitkilerde fotosentezin temel ürünüdür ve polisakaritlerin hem fotosentetik hem de fotosentetik olmayan dokulardaki en yaygın depo şeklidir. Nişasta insan ve hayvan beslenmesinde temel olarak tüketilen bir gıda olmakla sınırlı kalmayıp yiyecek endüstrisi başta olmak üzere kağıt, tekstil ve diğer birçok endüstriyel alan için de temel bir ham maddedir. Nişastanın granül yapısı ve şekli, amiloz ve amilopektinin moleküler yapısı, amiloz-amilopektin oranı, lipid, protein ve fosfat miktarı gibi faktörler nişastanın fonksiyonel özelliklerini dolayısıyla endüstriyel kullanım alanını belirler. Örneğin yiyecek endüstrisinde, tatlılar ve kızartılmış ürünlerde yüksek amiloz içeren nişastalar tercih edilirken, dondurulmuş ürünlerde ise amiloz içermeyen nişastalar tercih edilmektedir. Bu sebeple endüstriyel amaçlı kullanılan nişasta genellikle fiziksel, kimyasal veya enzimatik olarak modifiye edilerek yapısal özellikleri ve bununla bağlantılı olarak fonksiyonel özellikleri değiştirilir. Günümüzde ise fonksiyonelliği geliştirilmiş bu tip nişastalar özellikle mutant ve genetik modifikasyona uğratılmış bitkilerden üretilmektedir. Gerek bitki biyoteknolojisindeki gelişmeler gerekse nişasta biyosentezinde rol oynayan enzimler ve özelliklerinin ortaya konması genetik modifikasyonları mümkün kılmıştır. Bu derlemede nişasta granül yapısı, depo dokularında nişasta biyosentezinde rol alan enzimler ve bunların genetik modifikasyonu üzerinde durulmuş olup bu modifikasyonların potansiyel yararları tartışılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Amiloz, amilopektin, granüle bağlı nişasta sentaz, waxy (mumlu) mutant.*



## STARCH: BIOSYNTHESIS, GRANULE STRUCTURE AND GENETIC MODIFICATIONS

Hülya ÖLÇER & Betül AKIN

Dumlupınar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü,  
Merkez Kampüs, Kütahya

*Geliş tarihi: 25.07.2007*

*Kabul tarihi: 10.07.2008*

### ABSTRACT

Starch is the main product of photosynthesis and its the most dominant reserve polysaccharide that stored in photosynthetic and non-photosynthetic tissues. Starch is a staple food in human and animal diets, but also a raw material widely used for industrial purposes, such as food, paper and textile. Starch granule structure, amylose and amylopectin molecular structure, amylose and amylopectin ratio, and also lipid, protein and phosphate content are the main determinants that effect the functional properties of starch, in turn, its industrial application. For example, in food industry high amylose starches are preferred in sweet and fried products, while amylose free starches are used in frozen foods. In fact, starch is generally modified by physical, enzymatic or chemical treatments to alter structural and functional properties for industrial applications. Today starches with improved functionality has also been produced from mutant and genetically modified plants. Increased knowledge about enzymes that are involved in starch biosynthesis and improvement in plant biotechnology made possible to alter starch composition by genetic modifications. This review focus on the starch granule structure, starch biosynthetic enzymes in storage tissues and their genetic modifications with potential benefits.

**Key Words:** *Amylose, amylopectin, granule bound starch synthase, waxy mutant.*

## NIŞASTA: BİYOSENTEZİ, GRANÜL YAPISI VE GENETİK MODİFİKASYONLAR

### ÖZET

Nişasta bitkilerde fotosentezin temel ürünüdür ve polisakaritlerin hem fotosentetik hem de fotosentetik olmayan dokulardaki en yaygın depo şeklidir. Nişasta insan ve hayvan beslenmesinde temel olarak tüketilen bir gıda olmakla sınırlı kalmayıp yiyecek endüstrisi başta olmak üzere kağıt, tekstil ve diğer birçok endüstriyel alan için de temel bir ham maddedir. Nişastanın granül yapısı ve şekli, amiloz ve amilopektinin moleküler yapısı, amiloz-amilopektin oranı, lipid, protein ve fosfat miktarı gibi faktörler nişastanın fonksiyonel özelliklerini dolayısıyla endüstriyel kullanım alanını belirler. Örneğin yiyecek endüstrisinde, tatlılar ve kızartılmış ürünlerde yüksek amiloz içeren nişastalar tercih edilirken, dondurulmuş ürünlerde ise amiloz içermeyen nişastalar tercih edilmektedir. Bu sebeple endüstriyel amaçlı kullanılan nişasta genellikle fiziksel, kimyasal veya enzimatik olarak modifiye edilerek yapısal özellikleri ve bununla bağlantılı olarak fonksiyonel özellikleri değiştirilir. Günümüzde ise fonksiyonelliği geliştirilmiş bu tip nişastalar özellikle mutant ve genetik modifikasyona uğratılmış bitkilerden üretilmektedir. Gerek bitki biyoteknolojisindeki gelişmeler gerekse nişasta biyosentezinde rol oynayan enzimler ve özelliklerinin ortaya konması genetik modifikasyonları mümkün kılmıştır. Bu derlemede nişasta granül yapısı, depo dokularında nişasta biyosentezinde rol alan enzimler ve bunların genetik modifikasyonu üzerinde durulmuş olup bu modifikasyonların potansiyel yararları tartışılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Amiloz, amilopektin, granüle bağlı nişasta sentaz, waxy (mumlu) mutant.*

## 1. GİRİŞ

Bitkiler fotosentez ile yıllık 2850 milyon ton nişasta üretir. İnsanoğlu için nişastanın temel kaynağı tahıllar olmasına rağmen, kök ve yumru da önemlidir. Tahıllardan yıllık nişasta üretimi yaklaşık 2050 milyon ton, kök ve yumrulardan ise 679 milyon tondur [1]. Nişasta başta yiyecek olmak üzere pek çok endüstriyel alanda yüzyıllardır kullanılmaktadır (Tablo 1).

Nişasta, yiyecek endüstrisinde donmuş yiyecekler, çorbalar, soslar, hamur işlerinde ya da diğer endüstriyel alanlarda bir kaplama materyali olarak kullanılabilir. Örneğin kağıt endüstrisinde nişasta kağıdın dayanıklılık ve baskı kalitesini arttırmada, eczacılıkta suda çabuk çözünebilen kapsül ve tablet halindeki ilaçların hazırlanmasında, inşaat sektöründe çimento katkı maddesi olarak ve boyalarda veya yanmaya dayanıklı duvar kağıdı yapımında kullanılmaktadır. Günümüzde ise artan çevresel sorunlardan dolayı yenilenebilir ve biyolojik olarak parçalanabilir hammaddelerin kullanımı üzerine ilgi yoğunlaşmıştır. Plastik ve paketleme malzemelerinin yapımı için kullanılan petrol temelli maddelerin yerine, nişasta temelli hammaddelerin kullanılabilirliği araştırılmaktadır [2]. Mesela mısır nişastasından yapılan gevşek paketleme materyali polistiren'in yerini almaktadır [3].

**Tablo 1.** Nişastanın bazı kullanım alanları

Yiyecek İçecek	Plastik Sanayi	Eczacılık ve Kozmetik	İnşaat Sanayi	Tekstil Sanayi	Kâğıt Endüstrisi
• Mayonez	• Parçalanabilir plastik ve filmler	• Tabletler	• Beton	• Kumaş	• Oluklu mukavva
• Bebek maması		• Toz pudra	• Yanmaya dayanıklı duvar kağıdı	• İplik	• Karton
• Ekmek		• Yüz kremi		• Dokuma	• Kaplama
• Alkolsüz içecekler					• Yapıştırıcı
					• Çocuk bezi

Nişasta granüllerinin kompozisyonu ve yapısı bitkiler arasında oldukça farklılık gösterir ve bu durumda nişastanın özellik ve fonksiyonlarını etkiler. Granül yapısı ve şekli, amiloz- amilopektin oranı, amiloz ve amilopektinin moleküler yapısı ve lipid, protein, fosfat miktarı gibi diğer faktörler nişastanın fonksiyonel özelliklerini dolayısıyla endüstriyel kullanım alanını belirler. Kimyasal ve genetik modifikasyonlar sonucu nişastanın yapısal özelliklerinin ve bununla bağlantılı olarak fonksiyonel özelliklerinin değiştirilmesi üzerinde yoğun araştırmalar yapılan bir konudur. Kimyasal modifikasyonların gerek insan sağlığı gerekse çevre açısından potansiyel olumsuz yönleri göz önüne alındığında bitki biyoteknolojisindeki gelişmelerin yardımıyla gerçekleştirilen genetik modifikasyonlar ön plana çıkmaktadır.

Genetiksel olarak modifiye edilmiş bitkilerin (GM) ticari amaçlı ekiminin yapıldığı 1996 yılından 2005 yılına kadar uzanan zaman diliminde herbisitlere dayanıklılık özelliği kazandırılmış transgenik bitkiler birinci sırada yer almış, bunu böceklerle dayanıklılık özelliği takip etmiştir (Tablo 2) [4]. Günümüzde ise araştırmaların ve ticari yönelimlerin çoğu ürün kalitesi artırılmış transgenik bitkilerin üretilmesi yönündedir. Örneğin ticari amaçlı ekimleri yapılan aminoasit veya yağ asidi kompozisyonu değiştirilmiş olan bitkiler bunlardan bazılarıdır (Tablo 2). Vitamin veya mikroelement miktarındaki değişim ile besin değeri artırılmış [5, 6, 7] veya çevre kirliliğini önleme ve restorasyon çalışmalarında kullanılmak (fito-iyileştirme) amacıyla modifiye edilen pek çok transgenik bitkinin de yakın gelecekte günlük hayatımıza girmesi beklenmektedir [8, 9, 10]. Günlük hayatımızın her alanında karşımıza çıkan nişastanın da moleküler yapısının biyoteknolojik yöntemlerle değiştirilmesi ürün kalitesini artırmaya yönelik yapılan çalışmalardan bir diğeridir [11].

**Tablo 2.** 2005 yılı itibarıyla dünyada ticari amaçlı ekimi yapılan transgenik bitkilerin bazı uygulamalara göre dağılımı. [12]'den alınmıştır.

Uygulama Türü	Transgenik bitki sayısı	Tür sayısı
Herbisitlere tolerans	63	14
Böceklerle dayanıklılık	35	4
♂ Sterilite	9	3
Ürün kalitesi (aminoasit veya yağ asidi kompozisyonunda değişim; nikotin miktarında azalma)	7	4
Olgunlaşmada gecikme	7	3
Virüslere dayanıklılık	5	3
Modifiye edilmiş renk	2	1

### 1.1. Nişastanın Yapısı ve Fonksiyonel Özellikleri

Nişasta suda çözünmeyen granüller halinde plastidlerde bulunur. Bu granüllerin büyüklüğü, şekli ve kompozisyonu bitkinin cinsine, bulunduğu organa veya bitkinin içinde bulunduğu büyüme evresine göre değişir. Örneğin buğdayda granül çapı 10 µm dan küçük olanlar ve 10-35 µm arasında olanlar olarak iki farklı tip bulunurken, patatesteki çapı 5-100 µm arasında değişebilen tek tip granül vardır. (Tablo 1.1.1), [13, 14].

Nişasta granülleri temel olarak glikoz polimeri olan amiloz ve amilopektinden meydana gelir, fakat yapısında az miktarda fosfat ve lipid de içerir. Amiloz genellikle 600-3000 sayıda 1-4 α -glikozil grubuna sahip lineer formda olup, her 1000 glikozilde bir 1-6 α -glikozil yan gruplarına yani dallara sahiptir. Amilopektin ise daha büyük bir molekül olup amiloza göre daha fazla dallanma gösterir. Yaklaşık 6000-60000 glikozil gruba sahip ve her 20-26 ünite de bir 1-6 α -glikozil yan grubu taşır (Tablo 1.1.2) (Şekil 1.1.1A) [15].

Nişasta granülleri birbirini takip eden amorf bölge ve semi-kristal büyüme halkalarından oluşur. Amorf bölge amiloz ve kristal yapıda olmayan amilopektin içerir. Semi-kristal büyüme halkaları ise yine birbirini dönüşümlü olarak takip eden, yaklaşık 9-10 nm genişliğinde amorf ve kristal lamellerden meydana gelir. Kristal lameller amilopektin zincirlerinin sol eli α-helix şeklinde paketlenmesiyle oluşur, dallanma noktaları ise amorf bölgede yer alır (Şekil 1.1.1B). Amilopektin' in iç ve dış zincirleri A, B ve C zincirlerine ayrılır. A zinciri indirgenen ucundan α - 1- 6 bağlarıyla diğer zincirlere bağlanan lineer ve en kısa zincirdir. B ve C zincirlerinin her ikisi de bir veya daha fazla sayıda A ve/veya B zincirine sahiptir. Molekül başına sadece bir C zinciri vardır ve bu da molekülün tek indirgenen ucuna sahiptir. Amilopektin sarmalları çoğu tahıl nişastasında sıkı bir şekilde istiflenmişken (A-tipi nişasta), patates ve muz gibi bazı bitkilerde daha aralıklı istiflenirler (B-tipi nişasta) [3, 16, 13].

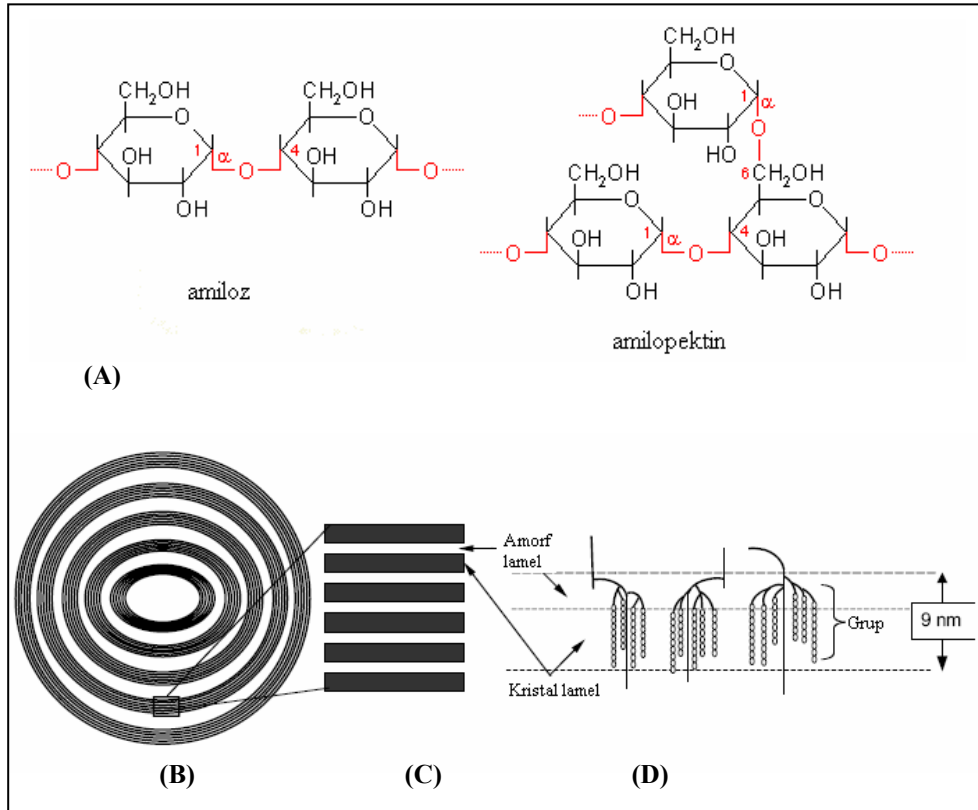
**Tablo 1.1.1.** Bazı bitkilerde doğal nişasta granülünün özellikleri [13].

Nişasta	Büyüklik (µm)	Şekil
Arpa	2 -5 (B tipi granül) 15 -25 (A tipi granül)	Spherical Lenticular
Mısır	2 -30	Spherical/ Polyhedral
Yulaf	3 -10 (basit) 80 (bileşik)	Polyhedral
Bezelye	5 -10	Rentiform
Patates	5 -100	Lenticular

Pirinç	3 -8 (basit) 150 (bileşik)	Polyhedral
Çavdar	5 -10 (B tipi granül) 10 -40 (A tipi granül)	Spherical Lenticular
Sorgum	5 -20	Spherical
Triticale	1 -30	Spherical
Buğday	2 -10 (B tipi granül) 15 -35 (A tipi granül)	Spherical Lenticular

**Tablo 1.1.2.** Amiloz ve amilopektinin yapısal karşılaştırması [17].

Karakter	Amiloz	Amilopektin
Granüldeki yüzde ağırlık	% 15 - 35	% 65 -85
$\alpha$ -1,6 dallarının yüzdesi	< % 1	% 4 - 6
Molekül kütlesi (Da)	$10^4$ - $10^5$	$10^7$ - $10^8$
Polimerizasyon derecesi	$10^2$ - $10^3$	$10^3$ - $10^4$
Zincir uzunluğu	3 -1000	3 -50



**Şekil 1.1.1** Nişasta granülü içinde bulunan amiloz ve amilopektinin kimyasal yapısı (A) ve şematize edilmiş granül organizasyonu (B, C, D). Amorf büyüme halkaları ile ayrılmış kristal lameller (B), amorf ve kristal

bölgenin büyütülmüş hali (C), yan yana bulunan amilopektin zincirleri tarafından oluşturulan çift heliks yapısı kristal lamelleri oluştururken, dallanma noktaları ise amorf bölgede yer alır (D).

Niştastanın fonksiyonel özellikleri endüstriyel kullanım alanının belirlenmesinde önem taşır. Fonksiyonel özellikler arasında spesifik viskozite, jel yapısı, donma-çözünme kararlılığı, berraklık, kristallik, renk, şişme ve şişmeye dayanıklılık sayılabilir. Nişasta granülleri su ve sıcaklığın etkisiyle yapısal değişime uğrar. Su ile karıştırıldığı zaman nişasta granülleri bir süspansiyon oluşturur. Isıtmayla birlikte granüller su absorbladığı için şişerek süspansiyonu koyulaştırır. Sıcaklığın artmasıyla amiloz amilopektinden ayrılır ve amiloz granülden solüsyon içine geçer. Bunu takip eden soğutmayla da amiloz molekülleri diğer amiloz ve amilopektin ile H<sup>+</sup> bağları kurar. Dolayısıyla suyun, amiloz ve amilopektinden oluşan bu ağ arasında hapsedilmesi sonucu jelatinimsi bir yapı oluşur yani jelleşme meydana gelir. Bu yapı uzun zaman periyodunda dondurulduğu veya soğutulduğu zaman, amiloz molekülleri birbirine daha da yakınlaşır ve yoğun kristal kümeleri oluşturur (retrogradasyon) ve neticede su molekülleri serbest kalır [18, 13, 19]. Suyun açığa çıkması arzu edilmeyen bir olaydır. Örneğin bu niştastayı bulandıran işlenmiş gıda ürünlerinde mikroorganizmaların üremesine veya dondurulmuş unlu mamullerde hoş olmayan değişimlere sebep olabilir. Bu yüzden doğal formunda niştastanın kullanım alanları oldukça sınırlıdır ve genellikle koyulaştırıcı veya yapıştırıcı olarak kullanılır.

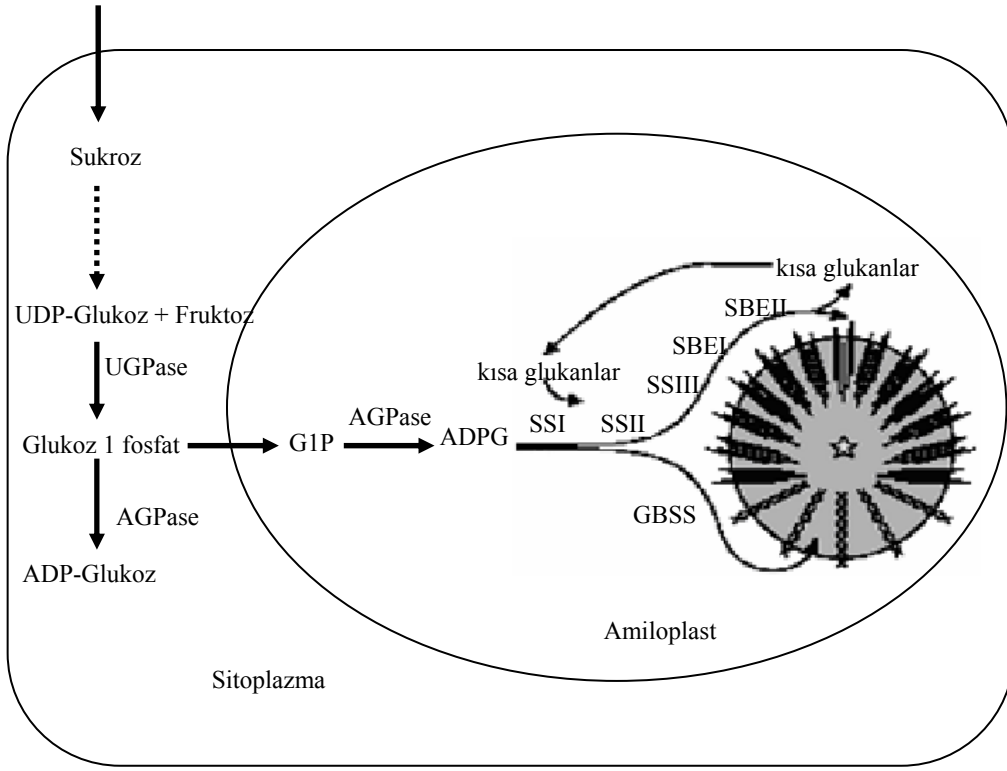
Genel olarak nişasta granüllerinin su ve sıcaklık etkisiyle geçirdiği bu yapısal değişimlerin kontrolü niştastanın fonksiyonelliğinde anahtar faktördür. Doğal nişasta fiziksel, enzimatik veya kimyasal olarak modifiye edilerek spesifik bir kullanım için gerekli olan özellikler kazandırılabilir. Fiziksel olarak öğütmeye veya enzimatik olarak niştastanın daha küçük polimerlere (dekstrin, maltoz vs.) hidrolizi sonucu nişasta modifiye edilebilir. Nişasta modifikasyonunun en yaygın tipi ise doğal niştastanın kimyasal maddelerle muamelesi yani kimyasal modifikasyondur. Son zamanlarda fonksiyonelliği geliştirilmiş bu tip niştastalar özellikle mutant ve genetik modifikasyona uğratılmış bitkilerde üretilmektedir [16]. Gerek bitki biyoteknolojisindeki gelişmeler gerekse nişasta biyosentezinde rol oynayan enzimler ve özelliklerinin ortaya konması genetik modifikasyonu mümkün kılmıştır.

## 1.2. Depo Dokularda Nişasta Biyosentezi

Sukroz gibi nişasta da fotosentezin temel ürünüdür ve son ürün olarak yaprak kloroplastlarda depolanabileceği gibi fotosentetik olmayan dokularda, amiloplastlarda da depolanabilir. Yeşil yapraklarda fotosentez sırasında üretilip depolandığı ve gece periyodunda sukroza parçalandığı için dönüşümlü nişasta (transitory) olarak adlandırılır. Depo niştastası ise tohum, yumru ve kök gibi depo organlarda bulunur, uzun zaman periyotları için depolanır ve tohum çimlenmesi ya da büyüme amacıyla metabolize edilir. Depo niştastası bitki türüne bağlı olarak değişik oranlarda bulunan amiloz ve amilopektinden oluşurken dönüşümlü nişasta da amilopektin dominant formdur [20].

Geçtiğimiz 10-15 yıldaki çalışmalar nişasta polimerlerinin sentezi için gerekli olan protein ve genlerin tanımlanması üzerine odaklanmış ve en azından 4 grup enzimin nişasta biyosentez yolunda rol aldığı ortaya konmuştur. Bunlar ADP-glikoz pirofosforilazlar (AGPase; EC 2.7.7.23), nişasta sentazlar (SS; EC 2.4.1.21), nişasta-dallanma enzimleri (SBE; EC 2.4.1.28) ve nişasta-dalları kıran enzimler (DBE; EC 2.4.1.41) dir (Şekil 1.2.1). Bitkiler genellikle bu her enzim grubunda birkaç izoenzime sahiptir. Nişasta sentezinde rol alan bu genlerin 14 formu olduğu (2 AGPase, 5 SS, 3 SBE ve 4 DBE) ve bunlardan 13 genin tüm bitkilerde homoloji gösterdiği bildirilmiştir [21].

ADP-glikoz pirofosforilaz enzimi hem kaynak hem de depo dokularda bulunur. Fotosentetik dokularda plastid içinde yer alırken, tohumda farklı genler tarafından kodlanan spesifik formları olduğu için bitkiye göre bulunduğu yerde farklılık gösterebilir. Örneğin patates ve bezelye embriyosundaki AGPase' in çoğunluğu plastidik iken, mısır, arpa ve pirinçte ise sitoplazmikdir [20]. Nişasta sentaz enzimleri ise iki grup altında toplanabilir; nişasta granüllerine sıkıca bağlanmış granüle bağlı nişasta sentaz enzimleri (GBSS) ile granüle bağlı veya serbest halde bulunan nişasta sentaz enzimleri (SSI, SSII ve SSIII) [14, 15, 21].



**Şekil 1.2.1. Depo organlarda nişasta biyosentez yolu.** Enzimler, UGPase, UDP-glikoz pirofosforilaz; AGPase, ADP-glikoz pirofosforilaz; SS, Nişasta sentaz; GBSS, Granüle bağlı nişasta sentaz; SBE, Nişasta dallanma enzimi [21]'den modifiye edilmiştir.

Nişasta dallanma enzimleri lineer glikoz zincirine  $\alpha$ -1,6 glikozidik bağlarla yan dal olarak glikoz ekler ve bu dallanmada nişastanın kimyasal ve fiziksel özelliklerini etkiler. Aminoasit dizilimindeki homoloji göz önüne alınarak iki sınıf SBE tanımlanmıştır. A sınıfı SBE'leri bezelye SBEI, mısır SBEII ve pirinç SBEIII' den oluşurken, B sınıfı SBE'leri mısır SBEI, pirinç SBEI ve bezelye SBEII' den oluşur [22]. SBE'nin enzimatik özellikleri bu iki sınıf arasında farklılık gösterir. Örneğin A sınıfına giren SBE izoformları'nın amiloza olan afinitesi B sınıfından daha düşüktür. Ayrıca sınıf B izoformları uzun glukoz zincirlerine yan grup eklerken A sınıfı izoformları ise kısa zincirleri tercih eder [20]. İzoamilaz olarak da bilinen nişasta-dalları kıran enzimler (DBE) ise amilopektin'in  $\alpha$ -1,6 glukoz dallarını hidrolize eder. SS ve SBE enzimleri tarafından sentezlenen ve yüksek oranda dallanma gösterebilen glukoz zincirlerinin DBE enzimleri yardımıyla dallarının kırılması nişasta granülünün oluşumu, amilopektin sentezi ve organizasyonda önem taşıyan bir olaydır [23, 14].

Şekil 1.2.1 de şematize edildiği gibi depo doku hücrelerine giren sukroz sukroz sentaz tarafından parçalanarak UDP-glikoz ve fruktoza dönüştürülür. Nişasta biyosentezinin birinci aşamasında AGPase glukoz-1-fosfatdan ATP yardımıyla ADP-glikoz ve pirofosfat (PPi) oluşum reaksiyonunu katalizler. ADP-glikoz ise nişasta sentaz enzimlerinin substratıdır. Tüm nişasta sentaz enzimleri ADP-glikozdan büyümekte olan  $\alpha$ -1,4-glukozların indirgenmeyen uçlarına glikozil ünitelerini transfer eder. Granüle bağlı nişasta sentazın amiloz sentezi, SS ve SBE enzimlerinin ise amilopektin sentezinden sorumlu olduğu bilinmektedir [15].

### 1.3. Nişastanın fonksiyonel özelliklerinin genetik olarak değiştirilmesi

#### 1.3.1. Amiloz içermeyen (*waxy-mumlu*) nişasta

Amiloz sentezi *waxy* geninin ürünü olan *waxy* protein miktarı tarafından kontrol edilir ve bu protein de GBSS enzimidir. Örneğin hegzaploid bir buğday türü üç tane *waxy* gene ve bunun sonucunda da üç *waxy* protein

izoformuna sahiptir. Amiloz miktarındaki değişimin bu üç proteinden bir veya ikisinin olmamasıyla bağlantılı olduğu bildirilmiştir [24]. Doğal olarak yapısında amiloz bulundurmeyen *waxy* mutantların GBSS enzimine sahip olmadığı bulunmuştur [25, 26]. *Waxy* mutant bitkilere bazı örnekler Tablo 1.3.1 de sunulmuştur.

**Tablo 1.3.1.** Çeşitli *waxy* mutant bitkilerin amiloz ve amilopektin içerikleri.

Niştastanın kaynağı	% Amiloz	% Amilopektin	Kaynaklar
Normal mısır	28	72	[27]
<i>Waxy</i> mısır	1	99	
Normal darı	30	70	[28]
<i>Waxy</i> darı	1	99	
Normal pirinç	18 – 28	72 – 82	[29]
<i>Waxy</i> pirinç	0	100	
Normal buğday	18 - 20	79 – 81	[30]
<i>Waxy</i> buğday	0.8 – 0.9	99	

*Waxy* nişasta hemen hemen %100 amilopektin içerir ve lineer amiloz molekülünün yokluğundan dolayı yapısal kararlılığı fazladır. *Waxy* mısır niştastası 1908 yılında Çin’ de bir Amerikan misyoner tarafından keşfedilmiş ve 1940 lı yıllarda ticari amaçlı ekimi başlamıştır. Mısır, arpa, buğday ve sorgum’ un *waxy* mutant türleri yıllardır bilinmesine karşın ticari olarak en fazla yetiştirilen sadece *waxy* mısırdır. İlk olarak hamur işleri, soslar ve pudingler için bir kıvam verici olarak kullanılmaya başlanmış, daha sonra asetilleme, çapraz bağlanma gibi kimyasal modifikasyonlarla yapısı daha kararlı hale getirilerek donmuş yiyecek endüstrisinde de kullanılmaya başlanmıştır [31]. Ayrıca normal mısır’ a göre daha kolay sindirilebilme özelliğinden dolayı çiftlik hayvanlarının beslenmesinde ve kâğıt endüstrisinde de kullanım alanı bulunmaktadır [32, 16, 13].

Günümüzde nişasta kompozisyonu ve yapısının genetik modifikasyonlarla değiştirilmesi sonucunda da *waxy* bitkiler elde edilmiştir. Örneğin GBSS enziminin antisens inhibisyonu sonucunda transgenik patatesten amilopektin miktarı %85’ den %98’ e artırılmış, amiloz miktarı ise %15’ den %2’ ye düşürülmüştür [33]. Benzer şekilde tropikal ülkelerde yetiştirilen kassava (*Manihot esculenta*) bitkilerinde yaklaşık %19 olan amiloz içeriği GBSS enziminin antisens inhibisyonu ile % 2 oranına düşürülmüştür. Ayrıca doğal olarak kassava niştastasındaki amilopektinin patates ve mısır niştastasına göre daha fazla oranda kısa zincir içermesinin de bir avantaj olduğu ve bu sebeple amiloz içermeyen transgenik kassava bitkilerinden elde edilen niştastanın kimyasal modifikasyona gerek kalmadan jel kararlılığı ve berraklığının yüksek olduğu bildirilmiştir [34].

### 1.3.2. Yüksek amiloz içeren nişasta

Amiloz sentezinde sadece tek bir gene ihtiyaç duyulurken, amilopektin sentezi ise pek çok izoformu bulanan; SS, SBE ve DBE’ nin katılımıyla gerçekleşir. Dolayısıyla amilopektin içeriğini değiştirmek için sadece tek bir genin inhibe edilmesi yeterli olmayabilir. Nişasta sentez enziminin farklı isoformlarına sahip mutant bezelye (*rug5*) [35], ve mısır (*dull1*) [36] bitkilerinde SS enzim aktivitesinin düşük olduğu bulunmuştur. Bu mutantlardaki niştastanın amilopektin sentezindeki düşüş nedeniyle yüksek amiloz içerdiği ve bezelye niştastasındaki amilopektinin yüksek miktarda kısa glukan zincirlerine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu da SS enzimlerinin amiloz miktarı yanında amilopektinin yapısal özelliklerini de etkilediğini göstermiştir. Nitekim SS II ve SS III izoformlarının beraber antisens inhibisyonu, patates yumrularındaki niştastanın yapısı ve özelliklerinde önemli değişimlere neden olmuştur [37, 38, 14]. Meydana gelen niştastanın içerisindeki amilopektinin kısa zincir sayısının artması, niştastanın düşük sıcaklıklarda (< 50 °C) jelatinleşmesini sağlamıştır. Bu özelliğe sahip nişasta da yiyecek endüstrisinde önemli kullanım alanlarına sahiptir [16].

Diğer taraftan, örneğin patatesten SBE II geninin antisens inhibisyonu amiloz miktarını yaklaşık %38 artırırken, SBEI geninin antisens inhibisyonu ise amiloz miktarını etkilememiştir [39]. Fakat her iki genin beraber



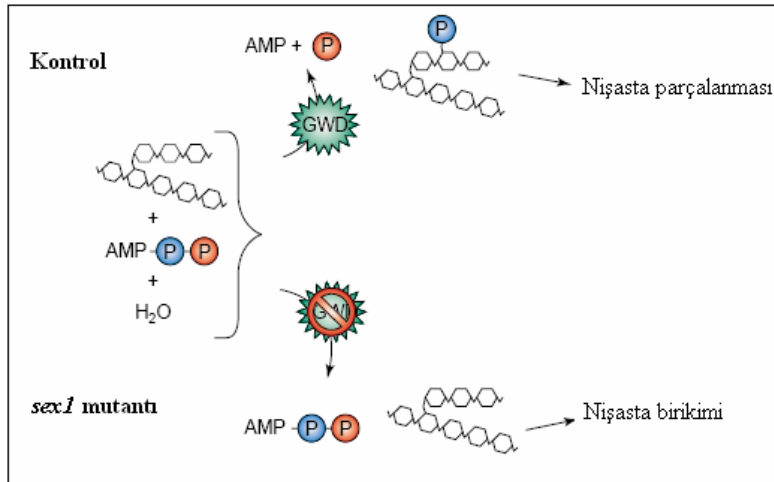
inhibisyonu yüksek amiloza sahip patates nişastasının üretimini mümkün kılmıştır [40]. Tatlı patatesten ise SBEII geninin inhibisyonu sonucu kontrole göre iki kat daha fazla oranda amiloz içeren transgenik bitkiler üretilmiştir [22].

Yüksek amiloz içeren nişastalar, yüksek jelleşme gücüne sahip olduğundan özellikle tatlılarda ve kızartmalarda kullanılır. Kızartılmış ürünlerin üzerindeki tabakanın gevrek olmasını sağlar ve pişirilirken yağ alımını da azaltır. Bu tip nişastalar ayrıca yapııştırıcı, mukavva ve kâğıt üretiminde de kullanılmaktadır [16, 20].

### 1.3.3. Nişasta fosfat içeriği

Nişastaya bağlı fosfat (P) miktarı bitkisel orijine göre değişir ve fosforilasyon derecesi nişastanın fiziksel özelliklerini önemli derecede etkiler. Nişasta içindeki P gruplarının varlığı, nişastanın viskozite ve jel oluşturma özelliğini etkiler ve kristalleşmeyi engeller. Ticari nişastalar içinde patates nişastası en yüksek P seviyesine sahiptir, örneğin patatesten her 200 glikoz ünitesinde bir fosforilasyon görülürken bu frekans Arabidopsis yaprak nişastasında her 2000 üniteye bir tanedir. Nişastanın içindeki P gruplarının büyük bir kısmı kovalent olarak amiloza değil amilopektine bağlanır ve amilopektinin fosforlanma frekansı nişastanın bitkisel kaynağına göre değişiklik gösterir. Bu sebeple çeşitli endüstriyel alanda kullanılacak nişasta kimyasal madde uygulamasıyla fosforile edilir [41, 42].

Nişasta biyosentezi sırasında fosfat grupları monoesterler olarak glikoz ünitelerinin C-6 veya C-3 pozisyonlarına bağlanır. Nişastanın yapısına P gruplarının eklenmesinden sorumlu olan protein (R1) ilk olarak patates yumrusunda bulunmuş ve daha sonra  $\alpha$ -glukan su dikinaz ( $\alpha$ -glukan water dikinase; GWD) enzimi olarak isimlendirilmiştir [43].  $\alpha$ -Glukan su dikinaz ATP' deki  $\beta$ - fosfatın, glikoz ünitelerinin C-6 ya da C-3 pozisyonuna transferini katalizleyen enzimdir. Bu enzimi kodlayan genin antisens inhibisyonu patatesten nişastaya bağlı P miktarının %90 azalmasına sebep olmuştur [44]. Benzer şekilde GWD' yi kodlayan genin Arabidopsisdeki homoloğu olan *sex1*' in mutasyona uğratılması sonucu yüksek miktarda nişasta içeren mutantlar (starch excess; *sex*) elde edilmiş ve *sex1* mutantında nişastaya bağlı P miktarının önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir [42, 45] (Şekil 1.3.3.1.).



**Şekil 1.3.3.1.** Nişasta fosforilasyon aktivitesi ve GWD-çıkarılmış fenotip.  $\alpha$ -Glukan su dikinaz (GWD), nişasta biyosentezi esnasında nişasta-fosfat esterlerini dikinaz metabolizması vasıtasıyla katalize eder. Bunu da ATP' deki  $\beta$ -fosfat grubunu nişastaya ve  $\gamma$ -fosfat grubunu ise suya transfer ederek gerçekleştirir. Fosforilasyon sonucunda kontrol *Arabidopsis*'de karanlık periyodu süresince yaprakta nişasta parçalanırken, nişasta fosforilasyon enzimi olan GWD'nin çıkarıldığı *sex1* mutantında ise yapraklarda nişastanın biriktirildiği gözlenmiştir. [41]' den alınmıştır.

GWD homologlarının tatlı patates yumruları, mısır ve arpa tohumları ve muz meyvesinde de bulunması bu enzimin pek çok bitkide fonksiyonel olduğunu ortaya koymaktadır. Fakat mısır ve arpa gibi bitkilerde depo nişastasındaki P miktarı oldukça düşüktür bu da sadece GWD enzim aktivitesinin nişasta fosforilasyonu için yeterli olmadığını göstermektedir. GWD'nin substrat olarak amilopektini, özellikle uzun ve dallanma gösteren glukoz zincirlerini kısa zincirlere tercih etmesi tahıl nişastasındaki düşük P miktarının sebebi olabilir. Nitekim tahıl nişastaları çoğunlukla kısa amilopektin zincirlerinden oluşur ve GWD olmasına rağmen fosforilasyon derecesi oldukça düşüktür [41]. Nişasta fosforilasyon mekanizmasının tam olarak anlaşılması, gelecekte modifikasyonun nişastayı üreten bitki tarafından yapılmasını sağlayacak ve neticede pahalı ve çevre dostu olmayan kimyasal uygulamalara olan ihtiyacı ortadan kaldıracaktır.

#### 1.4. Tartışma

Nişasta günlük hayatımızda yiyecek, içecek, tarım, ecza, inşaat, tekstil ve kâğıt gibi pek çok endüstriyel alan için temel bir hammaddedir. Nişastanın farklı endüstriyel alanlarda kullanımını nişasta granüllerinin yapı-fonksiyon ilişkisi belirler. Bu sebeple bitkiler tarafından üretilen nişasta granüllerinin moleküler yapılarının değiştirilmesi bitki biyoteknolojisi için önemli bir konu olmuştur. Doğal nişasta genellikle fiziksel, enzimatik veya kimyasal olarak modifiye edilerek kullanılır. Nişasta biyosentezinde rol alan enzimlerin aktivitelerinin değiştirilmesiyle yapılan genetik modifikasyonlar ise nişastanın hasattan sonraki bu tip kimyasal modifikasyon ihtiyacını azaltır. Örneğin kassava da amiloz yokluğu; propilen oksit, etilen oksit ve asetik anhidrit gibi jel kararlılığını artırıcı çevre dostu olmayan kimyasal maddelerin kullanımına gerek kalmadan, nişastanın jel kararlılığı ve berraklığını arttırmıştır [34]. Ayrıca nişastanın belli bir endüstriyel alanda kullanılmak için bir seri işlemlerden geçirilmesi girdilerin, dolayısıyla maliyetin artmasına sebep olacaktır. Dolayısıyla genetik modifikasyon çevre dostu ve ekonomik bir teknoloji olarak ön plana çıkmaktadır.

Diğer taraftan bugüne kadar nişasta biyosentez yolu ve bu yolda rol alan enzimlerle ilgili olarak büyük bir yol alınmasına rağmen, bitkinin yetiştiği çevre koşullarının nişasta sentezi üzerindeki etkisini de göz ardı etmemek gerekir. Örneğin hava sıcaklığındaki 5 °C' lik bir artış bile, bazı buğday varyetelerinde verimin % 10-15 oranında düşmesine neden olabilmektedir. Bununda, buğdayda çözünür nişasta sentaz enziminin, 20 °C'nin üzerindeki sıcaklıklara hassas olmasından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür [46]. Dolayısıyla çevre şartları, bir metabolik yolda rol alan enzimlerin aktivitelerini değiştirerek, meydana gelen ürünün miktarını ve kalitesini de değiştirebilir. Bu noktada nişasta kompozisyonu genetik olarak değiştirilmiş bitkilerin, tarla koşullarında maruz kalacağı çevre şartlarından nasıl etkileeneceği sorusunun da aydınlatılması gerekmektedir. Bu da genetik olarak modifiye edilmiş bitkilerin üretim aşamasında ortaya çıkabilecek olumsuz bir etken olarak düşünülebilir [1].

Bugün genetik olarak modifiye edilmiş nişasta içeren bitkilerin henüz ticari olarak üretimi yapılmamaktadır. Fakat Amylogen HB firması tarafından geliştirilen ve yüksek amilopektin içeren patateslerin özellikle kağıt endüstrisinde kullanımı amaçlanmış ve oluşan yan ürünlerinde hayvan yemi olarak kullanılabileceği önerilmiştir. İsveçte 1994 yılından beri tarla denemeleri yapılan transgenik patates EH92-527-1'in İsveç Tarım Bakanlığı tarafından Nisan 2004 de ticari olarak ekimi kabul edilmiştir [47]. Fakat ticari olarak ekiminin yapılabilmesi için diğer Avrupa Birliği üye ülkelerinin de onayı beklenmektedir [48]. Fakat yan ürünlerin hayvan yemi olarak kullanılması, bunların insan besin zinciri içerisine girme ihtimalini artırdığı içinde bir risk olarak düşünülmektedir. Ayrıca Almanya, Hollanda ve Çek Cumhuriyeti gibi diğer Avrupa ülkelerinde de henüz tarla denemesi aşamasında olan yüksek amiloz veya amilopektin içeren transgenik patatesler üzerindeki çalışmalar da devam etmektedir.

Genel olarak bakıldığında genetik olarak modifiye edilmiş nişastanın yiyecek endüstrisi dışındaki alanlarda çevre dostu bir hammadde olarak kullanılmasının getireceği potansiyel yararlar oldukça fazladır. Yiyecek endüstrisinde kullanımı ise, diğer genetik olarak modifiye edilmiş ürünlerde olduğu gibi, tüketicilerde doğal olmayan ürünleri kullanma psikolojisi ve sağlık açısından güvenli olmaması, ürünlerin satışı ve pazarlanmasında mutlaka uyarıcı etiket bilgilerinin bulundurulması, tüketicilerin bilgilendirme ve seçme hakkının korunması gibi konuları gündeme getirecektir. Fakat kimyasal olarak modifiye edilmiş ve zorunlu olarak etiketinde bir E numarası içermesi gereken nişastalı pek çok yiyeceği de her gün tükettiğimiz unutulmamalıdır.

## KAYNAKLAR

- [1] Burrell, M.M., “Starch: the need for improved quality or quantity-an overview”, *Journal of Experimental Botany*, 54 (382): 451-456, (2003).
- [2] National Starch & Chemical. URL: <http://nationalstarch.com>
- [3] Andersson, L., “Studies on starch structure and the differential properties of starch branching enzymes, Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 13, (2001).
- [4] Information Systems for Biotechnology. URL: [www.nbiap.vt.edu](http://www.nbiap.vt.edu).
- [5] Grusak, M.A. and DellaPenna, D., “Improving the nutrient composition of plant to enhance human nutrition and health”, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 133-161 (1999).
- [6] Herbers, K., “Vitamin production in transgenic plants”, *Journal of Plant Physiology*, 160: 821-829 (2003).
- [7] Ölçer, H and Ortaca, Ş., “Plants genetically enhanced with vitamins and microelements”, *DPÜ. Fen Bilimleri Dergisi*, 9: 27-40 (2005).
- [8] Dunwell, J.M., “Transgenic crops: The next generation, or an example of 2020 vision”, *Annals of Botany*, 84: 269-277 (1999).
- [9] Pilon-Smit, E and Pilon, M. “Phytoremediation of metals using transgenic plants”, *Critical Reviews in Plant Science*, 21(5): 439-456 (2002).
- [10] Ölçer, H., “Fito-iyileştirme ve metal biriktiren bitkiler”, *DPÜ. Fen Bilimleri Dergisi*, 8: 163-178 (2005).
- [11] Shewmaker, C.K. and Stalker, D.M., “Modifying starch biosynthesis with transgenes in potato”, *Plant Physiology*, 100: 1083-1086 (1992).
- [12] Biotechnology and GMOs Information System. URL: <http://gmoinfo.jrc.it>
- [13] Tester, R.F., Karkalas, J. and Qi, X., “Starch structure and digestibility Enzyme-Substrate relationship”, *World's Poultry Science Journal*, 60: 186-195 (2004).
- [14] Smith, A.M., “The Biosynthesis of starch granules”, *Biomacromolecules*, 2: 335-341 (2001).
- [15] Preiss, J., “Modulation of starch synthesis”, *In A Molecular Approach to Primary Metabolism in Higher Plants*, eds, Christine H. Foyer and W. Paul Quick, Taylor & Francis (1998).
- [16] Jobling, S., “Improving starch for food and industrial applications”, *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 210-218 (2004).
- [17] Ball, S.G., van de Wal M.H.B.J. and Visser, R.G.F., “Progress in understanding the biosynthesis of amylose”, *Trends in Plant Science*, 3(12): 462-467 (1998).
- [18] Dennis, D.T. and Blakeley, S.D., “Carbohydrate metabolism”, *In Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, ed. Bob B. Buchanan, Wilhelm Gruissem and Russell L. Jones, American Society of Plant Biology, pp 630-675 (2000).

- [19] Singh, N., Sandhu, K.S. and Kaur, M., “Physicochemical properties including granular morphology, amylose content, swelling and solubility, thermal and pasting properties of starches from normal, waxy, high amylose and sugary corn”, *Progress in Food Biopolymer Research*, 1: 44-54 (2005).
- [20] Slattery, J.C., Kavakli, H. And Okita, T.W., “Engineering starch for increased quantity and quality”, *Trends in Plant Science*, 5(7): 291-298 (2000).
- [21] Morell, M.K. and Myers, A.M., “Towards the rational design of cereal starches”, *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 204-210 (2005).
- [22] Shimada, T., Otani, M., Hamada, T. and Kim, S-H., “Increase of amylose content of sweetpotato starch by RNA interference of starch branching enzyme II gene”, *Plant Biotechnology*, 23: 85-90 (2006).
- [23] Myers, A.M., Morell, M.K., James, M.G. and Ball, S.G., “Recent progress toward understanding biosynthesis of the amylopectin crystal”, *Plant Physiology*, 122: 989-997 (2000).
- [24] Yanagisawa, T., Kiribuchi-Otobe, C. and Fujita, M., “Increase in apparent amylose content and changes in starch pasting properties at cool growth temperatures in mutant wheat”, *Cereal Chemistry*, 81(1): 26-30 (2004).
- [25] Shure, M., Wessler, S. and Fedoroff, N., “Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize”, *Cell*, 35: 225-233 (1983).
- [26] Macdonald, F.D. and Preiss, J., “Partial purification and characterization of granule-bound starch synthases from normal and waxy maize”, *Plant Physiology*, 78: 849-852 (1985).
- [27] Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., Oliva-Teles, A., “Effect of normal and waxy maize starch on growth, food utilization and hepatic glucose metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles”, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 143 89–96 (2006).
- [28] Shelton, J. L., Matthews, J. O., Southern, L. L., Higbie, A. D., Bidner, T. D., Fernandez, J. M. and Pontif, J. E., “Effect of nonwaxy and waxy sorghum on growth, carcass traits, and glucose and insulin kinetics of growing-finishing barrows and gilts”, *Journal of Animal Science*, 82:1699-1706 (2004).
- [29] Cooperative Research Center for Sustainable Rice Production. URL: [www.ricecrc.org](http://www.ricecrc.org)
- [30] Sasaki, T., “Effect of wheat starch characteristics on the gelatinization, retrogradation and gelation properties”, *JARQ* 39 (4), 253 – 260 (2005).
- [31] Mason, W.R. Research Associate National Starch and Chemical Company, 10 Funderne Avenue Bridgewater, NJ URL: [www.foodinnovation.com](http://www.foodinnovation.com)
- [32] The GRAIN Center. Suppliers of value enhanced grains. URL: [www.vegrains.org](http://www.vegrains.org)
- [33] Visser, R.G., Somhorst, I., Kuipers, G.J., Ruys, N.J., Feenstra, W.J. and Jacobsen E., “Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch synthase in potato by antisense constructs”, *Molecular and General Genetics*, 225: 289-296 (1991).
- [34] Raemakers, K., Schreuder, M., Suurs, L., Furrer-Verhost, H., Wincken, J-P., Vetten, N., Jacobsen, E. And Visser, R.G.F., “Improved cassava starch by antisense inhibition of granule-bound starch synthase I.”, *Molecular Breeding*, 16: 163-172 (2005).

- [35] Craig J., Lloyd, J.R., Tomlinson, K., Barber, L., Edwards, A., Wang, T.L., Martin, C., Hedley, C.L. and Smith, A.M., "Mutations in the gene encoding starch synthase II profoundly alter amylopektin structure in pea embryos", *Plant Cell*, 10: 413-426, (1998).
- [36] Gao, M., Wanat, J., Stinard, P.S., James, M.G. and Myers, A.M., "Characterization of *dull1*, a maize mutant gene coding for a novel starch synthase", *Plant Cell*, 10: 399-412. (1998).
- [37] Lloyd, J.R., Landschu, V. And Kossmann, J., "Simultaneous antisense inhibition of two starch-synthase isoforms in potato tubers leads to accumulation of grossly modified amylopektin", *Biochemistry Journal*, 338: 515-521 (1999).
- [38] Jobling, S.A., Westcott, R.J., Tayal, A., Jeffcoat, R. And Schwall, G.P., "Production of a freeze-thaw-stable potato starch by antisense inhibition of three starch synthase genes", *Nature Biotechnology*, 20: 295-299 (2002).
- [39] Jobling, S.A., Schwall, G.P., Westcott, R.J., Sidebottom C.M., Debet, M., Gidley, M.J., Jeffcoat, R., Safford, R., "A minor form of starch branching enzyme in potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers has a major on starch structure: cloning and characterisation of multiple forms of SBE A", *The Plant Journal*, 18: 163-171 (1999).
- [40] Schwall, G.P., Safford, R., Westcott, R.J., Jeffcoat, R., Tayal, A., Shi, Y.C., Gidley M.J. and Jobling, S.A., "Production of very-high-amilose potato starch by inhibition of SBE A and B", *Nature Biotechnology*, 18: 551-554 (2000).
- [41] Blennow, A., Wischmann, B., Houborg, K., Ahmt, T., Jørgensen, K., Engelsen, S. B., Bandsholm, O. and Poulsen, P., "Structure function relationships of transgenic starches with engineered phosphate substitution and starch branching", *International Journal of Biological Macromolecules*, 36: 159-168 (2005).
- [42] Yu, T. S., Kofler, H., Häusler, R. E., Hille, D., Flügge, U. I., Zeeman, S. C., Smith, A. M., Kossmann, J., Lloyd, J., Ritte, G., Steup, M., Lue, W. L., Chen, J. and Weber, A., "The Arabidopsis *sex1* Mutant Is Defective in the R1 Protein, a General Regulator of Starch Degradation in Plants, and Not in the Chloroplast Hexose Transporter", *The Plant Cell*, 13: 1907-1918 (2001).
- [43] Mikkelsen, R., Mutenda, K. E., Mant, A., Schürmann, P. and Blennow, A., "Glucan, water dikinase (GWD): A plastidic enzyme with redox-regulated and coordinated catalytic activity and binding affinity", *PNAS*, 102: 1785-1790 (2005).
- [44] Lorberth, R., Ritte, G., Willmitzer, L., and Kossmann, J., "Inhibition of a starch-granule-bound protein leads to modified starch and repression of cold sweetening", *Nat. Biotechnol.*, 16 : 473-477 (1998).
- [45] Kötting, O., Pusch, K, Tiessen, A., Geigenberger, P., Steup, M. and Ritte, G., "Identification of a Novel Enzyme Required for Starch Metabolism in Arabidopsis Leaves. The Phosphoglucan, Water Dikinase", *Plant Physiology*, 137: 242-252 (2005).
- [46] Jenner, C.F., Denyer, K. and Guerin, J., "Thermal characteristics of soluble starch synthase from wheat endosperm", *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 703-709 (1995).
- [47] Lexmon, A., "Sweden approves first genetically engineered product for commercial planting", *USDA Foreign Agricultural Service GAIN Report (SW4005)*, URL: [www.fas.usda.gov](http://www.fas.usda.gov). (2004).
- [48] EFSA-GMO-UK-2005-14, "Opinion of The Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on application for the placing on the market of genetically modified potato EH92-527-1 with altered starch composition, for production of starch and food/feed uses, under Regulation (EC)", No 1829/2003 from BASF Plant Science, *The EFSA Journal*, 324: 1-20 (2006).