

PAPER DETAILS

TITLE: Bacillus subtilis α -amilaz Enziminin Nisasta Granüllerine Etkisinin Taramalı Elektron Mikroskobu ile İncelenmesi.

AUTHORS: Elif DEMIRKAN

PAGES: 13-19

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/154081>



***Bacillus subtilis* α -amilaz Enziminin Nişasta Granüllerine Etkisinin Taramalı Elektron Mikroskobu ile İncelenmesi**

Elif Demirkan^{1*}

¹Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Bursa
e-posta: edemirkan@uludag.edu.tr

Özet: *Bacillus subtilis* α -amilazının bitkisel kaynaklı çeşitli nişasta granülleri (patates, buğday, pirinç ve mısır) üzerindeki hidroliz etkisi taramalı elektron mikroskobu kullanılarak incelenmiştir. Amilaz ile muamele edilmemiş patates, buğday ve pirinç granüllerinin yüzeylerinin düzgün ya da hafif pürüzlü olduğu, mısır granüllerinin yüzeyinde küçük görünür porlara sahip olduğu gözlenmiştir. Granüller çok ya da daha az hasara sahipti. Patates sentrifugal tip çevresel parçalanma gösterirken, mısır, buğday ve pirinç granülleri sentipental tip parçalanma göstermiştir. Taramalı elektron mikroskop sonuçları enzimatik hidrolizin esasen mısır, buğday ve pirinç granüllerinin yüzeyinde meydana geldiğini ve amilaz ile nişasta parçalanmasında uzun bir hidroliz periyodunun gerektiğini göstermiştir. Çünkü 24 saat sonunda granüllerde büyük ve derin delikler görülmüştür. Buna karşın, patates granüllerinin de ise fazla bir hidroliz saptanmamıştır.

Anahtar kelimeler: α -amilaz, Nişasta granülleri, Hidroliz, Taramalı Elektron Mikroskobu (TEM)

Investigation of the Effect of *Bacillus subtilis* α -amylase onto Starch Granules by Using Scanning Electron Microscope

Abstract: The degradation abilities of α -amylase from *Bacillus subtilis* onto starch granules from various botanical sources (potato, wheat, rice and corn) were investigated by scanning electron microscope. It was observed that the surface of potato, wheat and rice starch granules untreated with amylase were as smooth or rougher surface, corn starch granules have small visible pores on the surface. Granules are more or less damaged. Corn, wheat and rice starch granules exhibited centripental type degradation, while that of potato exhibited centrifugal type degradation from outer region.. Scanning electron microscope examinations showed that enzymatic hydrolysis occurred mainly at the surface of corn, wheat and rice starch granules and to degrade starch with amylase requires a long hydrolysis period. Because , it was observed big and deep holes on the granule surface after 24 hours. In contrast, it was not determined more hydrolysis on potato granules .

Key words: α -amylase, Starch granules, Hydrolysis, Scanning Electron Microscope (SEM)

Giriş

Nişasta soğuk suda çözünmeyen granüller formunda olup, organizmalar için depo materyali olarak bitki hücrelerinde depolanan önemli bir karbonhidrattır. Mısır, patates, pirinç ve buğday gibi birçok hububatın ana bileşenidir (Polaina ve MacCabe, 2007).

Nişasta granülleri amiloz ve amilopektin olarak adlandırılan α -D-glukoz birimlerinden meydana gelmiş iki tip molekülden oluşmaktadır. Amiloz, glukoz birimleri arasında α -1,4-glikozidik bağ ile bağlanmasından oluşan ve dallanma göstermeyen düz bir yapıdadır. Amilopektin ise glukoz birimleri arasında α -1,4 bağlantısına ilaveten α -1,6-glikozidik dallanma bağ noktalarını da içermektedir. Amiloz ve amilopektin içeriği bitki türlerine bağlıdır. Örneğin, buğday nişastası yaklaşık %25 amiloz içerirken, mısır nişastası %97-99 oranında amilopektine sahiptir. Granüllerinin yapısı, şekli ve büyüklüğünde de farklılıklar vardır (Polaina ve MacCabe, 2007).

Nişasta; α -, β -amilaz, isoamilaz ve pullulanaz gibi enzimlerle glikoz, maltoz ve oligosakkaritlere hidrolize edilmektedir. Nişasta ürünlerinin çoğu gıda ve meşrubat endüstrilerinde kullanılmaktadır. Amilazlar nişastayı hidrolize eden endüstriyel açıdan en önemli enzimlerdir. Gıda, tekstil ve farmakoloji endüstrilerindeki farklı işlemlerde yaygın bir şekilde kullanılırlar. Fungus, maya ve bakterileri kapsayan birçok organizma nişastayı parçalayan enzimler üretmektedir (Gawande ve Patkar, 2001; Hamilton ve ark., 1999, Yamamoto ve ark., 2000). Fakat en iyi kaynak olarak bazı *Bacillus* suşları bilinmektedir. Özellikle *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* ve *Bacillus licheniformis* çok önemli α -amilaz kaynaklarıdır, çünkü enzimleri termostabildir ve nişastanın jelatinizasyonunda kullanılmaktadır (Uhling, 1998). Genel olarak amilazlar amilolitik parçalanmaya çok dirençli olan ham nişasta granülleri üzerine iyi bir etkiye sahip değildirler. Bundan dolayı amilazlar ile nişastanın hidrolizasyonu 24 ya da 48 saat gibi uzun bir parçalama zamanına ihtiyaç göstermektedir. Kimura ve Robty (1995) 32 saat sonunda D-glukozun ortaya çıktığını rapor etmişlerdir.

α -amilazlar A, B ve C bölgeleri içeren çok bölgeli proteinlerdir (Juszcak ve ark., 1997). Bazı amilazların nişasta bağlama bölgesi (Starch Binding Domain=SBD) olarak adlandırılan katalitik olmayan bölge içerdikleri bilinmektedir (MacGregor ve ark., 2001; Sorimachi ve ark., 1997; Southall ve ark., 1999). Rodríguez-Sanoja ve ark. (2005) 3 tane *Laktobacillus* α -amilazında yeni bir nişasta bağlama bölgesi tanımlamışlardır. Fakat enzimin nişasta granülleri üzerine adsorbsiyon mekanizması hala net değildir, bazı çalışmalar bunu enzimin C bağlanma bölgesi ile açıklamaktadır. Çünkü *Aspergillus* ve *Rhizopus* gibi bazı fungusların glikoamilazları bir C terminal bağlanma bölgesine sahiptir. Bu bölgenin ham nişasta üzerinde çok etkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca *B. polymyxa* β -amilazı ve *B. macerans* cyclodextrin glukotransferazı da bu bölgeyi içermektedir (Jespersen ve ark., 1991; Dettori-Campus ve ark., 1992). Diğer yandan *B. cereus* ve soya fasulyesi β -amilaz yapılarının karşılaştırılması sonucunda *B. cereus* β -amilazının iki ekstra maltoz bağlanma bölgesinin olduğu tespit edilmiştir. Bu bölgelerin enzimin ham nişasta granüllerini absorblama ve sindirme yeteneği kazandırdığı saptanmıştır (Mikami ve ark., 1999).

Nişasta granüllerinin enzimle parçalanması iki tipte olmaktadır. Bunlardan birisi nişasta granülünün yüzeyinden merkezine doğru olan sentripental, diğeri ise sadece dış yüzeyde sentrifugal parçalanmadır (Helbert ve ark., 1996).

Bu çalışmada, *B.subtilis* α -amilaz enziminin nişasta granüllerini parçalama yetenekleri ve şekilleri Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Elektron Mikroskobu (SEM)) ile tespit edilmeye çalışılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Çalışmada α -amilaz enzimi üreten bir fabrika (ORBA Biyokimya A.Ş., İstanbul)'dan sağlanan *Bacillus subtilis* α -amilaz enzim kaynağı olarak ve nişasta kaynakları olarak ise ham pirinç, mısır, buğday ve patates nişastaları kullanılmıştır.

Bakterinin enzim üretim koşulları Sarıkaya ve Gürgün (2000)'e göre yapılmıştır. 72 saatlik üretim sonucunda toplanan süpernatant % 80 amonyum sülfatlı çökelme, TSK Toyopeal kolon, ultrafiltrasyon, diyaliz ve SP sefaroze kolonu ile saflaştırılmıştır. Saflık kontrolü Sodyum Dodesil Sülfat PoliAkrilamid Jel Elektroforezi: SDS-PAGE ile yapılmıştır.

Enzimin nişasta hidroliz yeteneğini gözlemek için, kullanımdan önce nişastalar milliQ distile suyla beş kez yıkanmış ve bir desikatörde kurutulmuştur. %5 w/v kurutulmuş nişasta örnekleri (20 mg) içerisinde 5mM CaCl_2 ve 10mM 2-ME bulunan 400 μl 50mM Na asetat tamponu (pH:5.4) içerisinde bırakılmıştır. Reaksiyon 35°C'de, seyreltilmiş saf enzim solüsyonunun 100 μl eklenmesiyle başlatılmıştır. Reaksiyon 12, 18, 24 saat sürece takip edilmiştir. Her bir zaman aralığında örnekler alınmış ve +4°C'de 10000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Hidrolize granülleri içeren peletler elektron mikroskobu çalışmalarında kullanılmıştır.

Elektron mikroskobu çalışmaları için peletler saf etanol ile iki kez yıkanmış ve 10000 g' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra t-bütül alkol (2- mety- 2- propanol) ile iki kez yıkanmışlar ve tekrar santrifüj edilmişlerdir. Santrifüjden sonra tüm örnekler liyofilize edilmiştir. Kuru nişasta granülleri gümüş plakalı SEM (Scanning Electron Microscope) stabına tutturulmuş ve örnekler iyon kaplatıcı (Hitachi, E-1030) ile palladiyum/platinyumla kaplanmışlardır. Böylece örnekler Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope (SEM)), Hitaci, S-4500) ile incelenmiştir (Sarıkaya ve ark., 2000).

Araştırma Sonuçları ve Tartışma

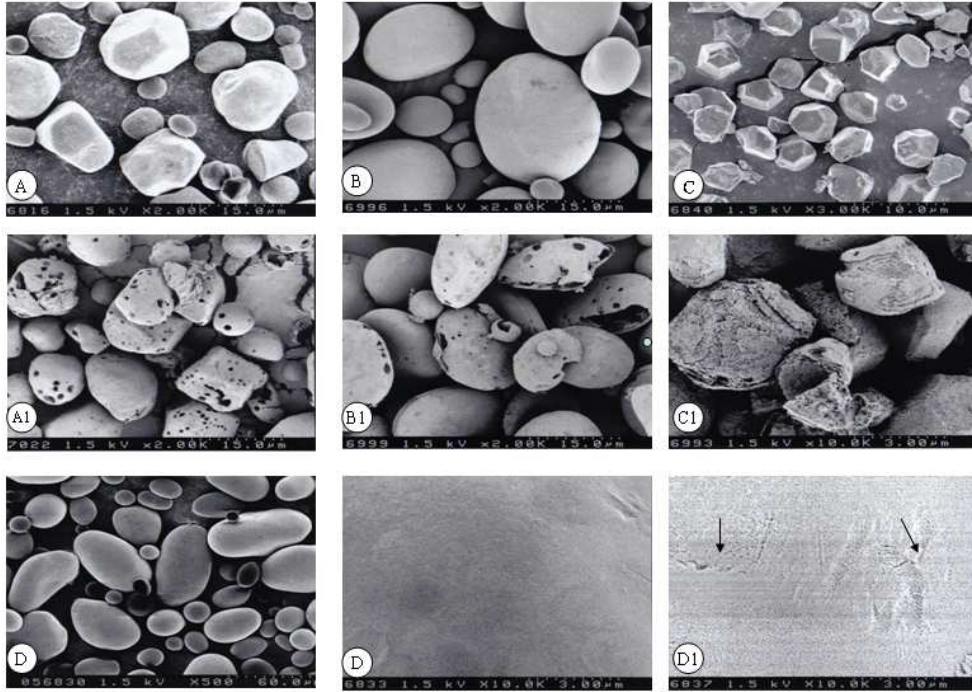
Bacillus subtilis α -amilaz enzimi ile muamele edilmiş ve edilmemiş 4 farklı ham nişasta granülleri SEM ile incelenmiştir. 12,18 ve 24 saatlik reaksiyon sonucunda, enzimin ilerleyen saatlerde granülleri parçalama yeteneğinin arttığı ve 24 saat sonunda granüllerin çoğunun hasara uğradığı görülmüştür.

Enzimle muamele edilmemiş nişasta granüllerinden buğday, pirinç ve patates yüzeyinin düzgün ya da hafif pürüzlü olduğu (Şekil B, C, D), sadece mısır granüllerinin yüzeyinde küçük porlar görülmüştür (Şekil A). Enzimle muamele edilmiş mısır, buğday ve pirinç nişasta granüllerinin daha çok, patates granüllerinin ise daha az parçalandığı tespit edilmiştir (Şekil A1, B1, C1, D2).

Şekilde de görüldüğü gibi, α -amilaz enziminin mısır, buğday ve pirinç nişasta granüllerinde sentripental tip parçalanma (Şekil A1, B1, C1), patates nişasta granüllerinde ise sentrifugal tip çevresel parçalanma gösterdiği ve parçalanmanın sadece granül yüzeyinde olduğu saptanmıştır (Şekil D1). Ayrıca Mısır ve buğday granülleri klasik İsviçre peyniri modelini göstermiştir. Bu model ilk olarak Smith ve Lineback tarafından rapor

edilmiştir (Hyun ve Zekius, 1985). Mısır ve buğday granüllerinde oldukça büyük ve yüzeyden içeriye doğru derin delikler görülürken (Şekil A1, B1), pirinç granüllerinde ise ince tabakalı (lameller) bir hidroliz etkisi görülmüştür (Şekil C1).

Enzimle muamele edilen mısır granülleri sünger benzeri yapılar göstermiştir (Şekil A1). Burada parçalanmanın muhtemelen yüzeyde bulunan porlardan başladığı ve porların parçalanma boyunca enzim moleküllerinin nişasta granülleri üzerindeki etkinliğini arttırdığı düşünülmektedir. Buna benzer bir yaklaşım Kimura ve Robty (1995) tarafından da ifade edilmiştir. Amilaz enziminin farklı nişasta granülleri üzerindeki parçalama yeteneği farklı araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir. Nişasta granüllerinin üzerinde şekilsiz bölgeler bulunmuş (Van der Maarel ve ark., 2002) ve Apinan (2007) mısır nişastasının yüzeyinin çok porlu bir yapıya sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Yüzeydeki porların granüllerin iç kanallarının açık uçları oldukları tahmin edilmektedir (Kork ve ark., 2000; Baldwin ve ark., 1997).



Şekil. *B. subtilis* α -amilaz enzimi ile muamele edilmiş ve edilmemiş ham nişasta granüllerinin Taramalı Elektron Mikroskop görüntüleri. A, B, C ve D mikrografları enzimle muamele edilmemiş, A1, B1, C1 ve D1 ise enzimle muamele edilmiş nişasta granüllerini göstermektedir. A:mısır, B:buğday, C:pirinç, D:patates

Manelius ve Bertoft (1996) SEM ile yaptıkları çalışmada *B.subtilis* α -amilazının yulaf nişasta granülleri üzerine etkisinin mısır granüllerinden farklı olduğunu göstermişlerdir. Shariffa ve ark.(2009) tatlı patates ve tapioca nişasta granülleri üzerinde enzimin etkisine bakmışlar. Scanning elektron mikroskopik çalışmalarında genel olarak enzimatik hidrolizin

nişasta granüllerinin yüzeyinde ve yüzeydeki şekilsiz bölgelerinde olduğunu göstermişlerdir.

Tapioca nişasta granüllerinin pürüzlü olduğu ve bu pürüzlü yüzeyde spesifik bölgelerin bulunduğu, enzimatik hidrolizin bu bölgelerde başladığı ileri sürülmüştür (Janeček ve ark., 2003). Apinan (2007) *B.subtilis* α -amilazının patates nişastasının hidrolizini SEM ve Confocal Laser Scanning ile göstererek, parçalanmanın nişasta yüzeyinde olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda da patatesin elektron mikrograflarında parçalanmanın sadece yüzeyde olduğu saptanmıştır.

Lacerda ve ark.(2008) mısır nişastası ile yaptıkları çalışmalarda fungal α -amilaz enziminin mısır nişasta granüllerinin şekilsiz kısımlarında daha fazla parçalanmaya uğrattığını gözlemlemişlerdir. Enzimin, hidrolize ilk olarak nişasta yüzeyinde gözlenen deliklerden başladığını ifade etmişlerdir. Sujka ve Jamroz (2007), yaptıkları çalışmada granül yüzeyleri üzerindeki delikleri dikkate çekmişlerdir.

Sujka ve ark. (2006) mısır ve patates granülleri ile yaptıkları çalışmalar sonucunda mısır granüllerinin yüzeyinde delikler ve çatlakların, patates granüllerinin yüzeyinde ise çiziklerin olduğunu gözlemişlerdir. Yaptığımız çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Diğer yandan granül yapısı, sayısı ve boyutunun enzim atağı için önemli olduğu rapor edilmiştir (Gallant ve ark. 1992; Kimura ve Robty, 1995; Baldwin ve ark.1997). Yaptığımız ölçümlerde pirinç granül boyutu 3 μ m ve diğerlerinin ise 6-15 μ m olduğunu saptandı ve boyut küçüldükçe enzim atağının daha fazla olduğu sonucuna varılabilir. Çünkü en büyük boyuta sahip olan patates nişastasının daha az hidrolize uğradığı görülmüştür.

Ayrıca, nişastalar α -1,4 bağ ile bağlanmış dallı bir yapı olmayan amiloz ve 1,4 ve α -1,6 bağlarını içeren dallı bir yapı oluşturan amilopektin olmak üzere 2 form içermektedirler. Amilazlar α -1,4 bağını hidrolize etmektedir. Farklı bitkisel nişasta granülleri amiloz ve amilopektinin farklı dağılımına sahiptirler (Sivak ve Preiss, 1998; Polaina ve MacCabe, 2007). Bunların nişasta granüllerindeki farklı dağılımlarından dolayı enzimin etkisinin de farklı olabileceği düşünülmüş, ancak Kimura ve Robty (1995), granüldeki amiloz miktarının enzim tesir oranını etkilemediğini rapor etmişlerdir. Ancak, bu konuda yeterli çalışmalar bulunmamaktadır.

Çok önemli bir endüstriyel enzim olan α -amilaz enzimin substratı olan nişastayı parçalama yeteneğinin taramalı elektron mikrografları enzimin farklı kaynaklı nişastalarını farklı bir şekilde parçaladığını göstermiştir. Dolayısıyla, α -amilaz enziminin parçalama yeteneği nişasta tiplerine bağlı olmaktadır.

Ayrıca granülün boyutu, içeriği ve yüzey yapısının parçalanma ile bir ilişkisi olacağı ve özellikle parçalanma esasen yüzeyde ilk olarak başladığından nişasta granüllerinin ortam şartlarının değişimi ile (sıcaklık, pH vd.) yüzeylerinin daha çok pürüzlü hale getirilerek, enzimin yüzeye bağlanmasının kolaylaşabileceği düşünülmektedir.

Amilazların X-Ray diffraksiyon yöntemiyle moleküler yapısını belirlemek ve ham nişasta granülleri üzerindeki etkinliği konusunda araştırmalara hız verilmelidir. Eğer amilazın moleküler yapısı ve nişasta hidrolizinde en büyük rolü oynayan bölgesi tamamen çözülsün, bu ham nişastanın endüstriyel işlenmesinde daha etkin kullanılmasına imkan tanıyacaktır. Ayrıca amilazların nişastaya affinitesinin biyokimyasal mekanizmasının bilinmesi nişastanın endüstriyel hidrolizine ışık tutacaktır.

Kaynaklar

- Apinan, S., Yujiro, I., Hidefumi, Y., Takeshi, F., Myllarinen, P., Forssell, P. and K., Poutanen. 2007. Visual observation of hydrolyzed potato starch granules by alpha-amylase with Confocal laser scanning microscopy. *Starch-Starke*, 59: 543-548.
- Baldwin, P.M., Davies, M.C. ve C.D., Melia.1997. Starch granule surface imaging using low-voltage scanning electron microscopy and atomic force microscopy. *Intl. J Biol. Macromol.*, 21: 103-7.
- Dettori-Campus, B.G., Priest, F.G. and J.R., Stark. 1992 Hydrolysis of starch granules by the amylase from *B.stearothermophilus* NCA. *Process Biochem.*, 27:17-21.
- Gallant, D.J, Bouchet, B., Buleon, A. and S., Perez. 1992. Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. *Eur. J Clin. Nutr.*,46:3 -16.
- Gawande, B.N. and A.Y., Patkar. 2001. Purification and properties of a novel raw starch degrading cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* AS-22. *Enzyme Microb. Technol.*, 22:735-743.
- Hamilton, L.M., Kelly, C.T. and W.M., Fogarty. 1999. Purification and properties of the raw starch degrading amylase of *Bacillus* sp. IMD 434. *Biotechnol. Lett.*, 21:111-115.
- Helbert W., Schülerin, M. and B., Henrissat. 1996. Electron microscopic investigation of the diffusion of *B.Licheniformis* α -amylase into corn starch granules. *Intl. J Biol Macromol.*, 19:165-9.
- Hyun, H.H. and J.G., Zekius. 1985. Biochemical characterization of thermostable extracellular β -amylase from *Clostridium thermosulfurogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49:11627.
- Jespersen, H.M., MacGregor, E.A., Sierks, M.R. and B., Svensson. 1991. Comparison of the domain-level organization of starch hydrolyses and related enzymes. *Biochem. J.*, 280: 51-5.
- Janeček, S., Svensson, B. and B., Henrissat.1997. Domain evolution in α -amylase family. *J. Mol. Evol.*, 45:322-331.
- Kimura, A. and J.F., Robty.1995. Reaction of enzymes with starch granules: kinetics and products of the reaction with glucoamylase. *Carbohydr. Res.*, 227:87-107.
- Kork, F., Szymonska, J., Tomasik, P. and M., Szymonski. 2000. Noncontact AFM investigation of influence of freezing process on the surface structure of potato starch granule. *Appl. Surf. Sci.*, 157:382-386.
- Lacerda, L.G.G., Filho, M.A.D.C., Demiate, I.M., Bannach, G., Ionashiro M. and E., Schnitzler. 2008. Thermal behaviour of corn starch granules under action of fungal α - amylase. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.*, 93:445-449.
- Juszczak L., Fortuna, T. and F., Krok, 2003. Non-contact atomic force microscopy of starch granules surface: Part I. Potato and tapioca starches, *Starch/Stärke.*, 55:1–7.
- MacGregor, E., Janecek, A., S. and B., Svensson. 2001. Relationship of sequence and structure to specificity in α -amylase family of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1546:1-20.
- Manelius, R. and E., Bertoft .1996. The Effect of Ca^{2+} -Ions on the α -Amylolysis of Granular Starches from Oats and Waxy-Maize. *Journal of Cereal Science*, 24:139-150.

- Mikami B., Adachi, M., Kage, T., Sarikaya E., Nanmori T., Shinke, R. and S., Utsumi. 1999. Structure of raw-starch digesting *Bacillus cereus* β -amylase complexed with maltose. *Biochemistry.*, 38(22):7050-7061.
- Polaina, J. and A.P., MacCabe. 2007. *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. Springer. The Netherlands.
- Rodríguez-Sanoja, R., Ruiz, B., Guyot, J. P. and S., Sanchez. 2005. Starch-Binding Domain Affects Catalysis in Two *Lactobacillus* α -Amylases. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(1): 297–302.
- Sarikaya, E. and V., Gürgün. 2000. Increase of the α -amylase yield by some *Bacillus* strains *Turk. J Biol.*, 24:299-308.
- Sarikaya, E., Higasa, T., Adachi, M. and B., Mikami. 2000. Comparison of the abilities of α - and β -amylases to degrade raw starch granules. *Process Biochem.*, 35:711-5.
- Shariffa, Y.N, Karim, A.A., Fazilah, A. and I.S.M. Zaidul. 2009. Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature. *Food Hydrocolloids.*, 23: 434-440.
- Sivak, MN. and J., Preiss. 1998. *Starch: Basic Science to Biotechnology*. Advanced in food and nutrition research., Vol. 41: 163-70. New York, Academic Pres.
- Sorimachi, K., Le Gal-Coëffet, M. F., Williamson, Archer, G., D.B. and M.P., Williamson. 1997. Solution structure of the granular starch binding domain of *Aspergillus niger* glucoamylase bound to β -cyclodextrin. *Structure.*, 5:647-661.
- Southall, S. M., Simpson, P. J., Gilbert, H., J., Williamson, G. and M. P., Williamson. 1999. The starch binding domain from glucoamylase disrupts the structure of starch. *FEBS Lett.*, 447:58-60.
- Sujka, M, Udeh, K.O. and J., Jamroz .2006. Alpha-amylolysis of native corn, potato, wheat and rice starch granules. *Italian Journal of Food Science.*, 18 (4): 433-439.
- Sujka, M. and J., Jamroz, 2007. Starch granule porosity and its changes by means of amylolysis. *International Agrophysics.*, 21:107-113.
- Uhling, H. 1998. *Industrial enzymes and their applications*. Translated and update by Elfried M. Linsmaier-bednar, Ph. D. New York.
- Van der Maarel, MJ., Uitdehaag, J.C., Leemhuis H. and L. Dijkhuizen. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *J. Biotech.* 94:137-155.
- Yamamoto, K., Zhang, Z. Z. and S., Kobayashi. 2000. Cycloamylose (cyclodextrin) glucanotransferase degrades intact granules of potato raw starch. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 962-966.