



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO DE DESARROLLO DE PRODUCTOS  
BIÓTICOS

**DINÁMICA DE CARBOHIDRATOS Y MECANISMOS DE  
REGULACIÓN DE LA ADP-GLUCOSA PIROFOSFORILASA  
DURANTE EL DESARROLLO DE FRUTO DE PLÁTANO MACHO  
(*Musa paradisiaca* L.)**

## TESIS

Que para obtener el Grado de Maestría en Ciencias en Desarrollo de  
Productos Bióticos

PRESENTA

Alejandra Barranco Aguilar

Directores de Tesis

Dra. Edith Agama Acevedo

Dr. Axel Tiessen Favier



Yautepec, Morelos; Diciembre 2014



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Yautepec, Morelos siendo las 10:00 horas del día 07 del mes de Noviembre del 2014 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CeProBi para examinar la tesis titulada:  
"Dinámica de carbohidratos y mecanismos de regulación de la ADP-glucosa pirofosforilasa durante el desarrollo de fruto de plátano macho (*Musa paradisiaca* L.)".

Presentada por el alumno:

Barranco	Aguilar	Alejandra							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
		Con registro:	B	1	2	0	1	8	2

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


  
\_\_\_\_\_  
Dra. Edith Agama Acevedo

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Axel Tiessen Favier

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Luis Arturo Bello Pérez

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Mario Rodríguez Monroy

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Silvia Evangelista Lozano

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Gabriela Sepúlveda Jiménez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Antonio Ruperto Jiménez Aparicio



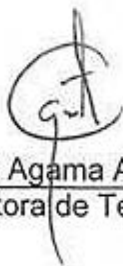
SEP-IPN  
CENTRO DE DESARROLLO  
DE PRODUCTOS BIÓTICOS  
YAUTEPEC, MOR.

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Con base en el artículo 57 fracción I del Reglamento de Estudios de Posgrado vigente y en la Sección IV del Código de Ética del IPN, hacemos constar que el trabajo de tesis "Dinámica de carbohidratos y mecanismos de regulación de la ADP-glucosa pirofosforilasa durante el desarrollo de fruto de plátano macho (*Musa paradisiaca* L.)" es responsabilidad del C. Dra. Edith Agama Acevedo, C. Dr. Axel Tiessen Favier y de la C. IBT. Alejandra Barranco Aguilar, y que ni los datos experimentales ni el texto han sido usados para obtener otro grado académico en el país o en el extranjero. Cualquier colaboración o cita textual fue declarada y reconocida en el documento.

Yautepec, Morelos; a 27 de Noviembre de 2014

ATENTAMENTE



Dra. Edith Agama Acevedo  
Directora de Tesis



Dr. Axel Tiessen Favier  
Director de tesis



IBT. Alejandra Barranco Aguilar  
Alumna

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**Presente**

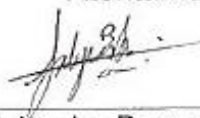
Bajo protesta de decir la verdad el que suscribe **Alejandra Barranco Aguilar** (se anexa copia simple de la identificación oficial), manifiesto ser autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada **Dinámica de carbohidratos y mecanismos de regulación de la ADP-glucosa pirofosforilasa durante el desarrollo de fruto de plátano macho (*Musa paradisiaca* L.)**, en adelante "La Tesis" y de la cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la ley federal del derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales "La Tesis" por un periodo de dos años contando a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar aviso expreso a "El IPN" de su terminación.

En virtud de lo anterior, "El IPN" deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de "La Tesis".

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de "La Tesis", manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de "La Tesis", por lo que deslindo de toda responsabilidad a "El IPN" en caso de que el contenido de "La Tesis" o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

México, D.F., 27 de Noviembre del 2014.

Atentamente



---

Alejandra Barranco Aguilar



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de Yauatepec, Morelos el día 27 del mes de Noviembre del año 2014, el que suscribe **C. Alejandra Barranco Aguilar** alumna del Programa de **Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos bióticos** con número de registro B120182, adscrito al **Centro de Desarrollo de Productos Bióticos**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Edith Agama Acevedo** y del **Dr. Axel Tiessen Favier** y cede los derechos del trabajo intitulado **“Dinámica de carbohidratos y mecanismos de regulación de la ADP-glucosa pirofosforilasa durante el desarrollo de fruto de plátano macho (*Musa paradisiaca* L.)”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Carretera Yauatepec-Jojutla, Km. 6, calle CEPROBI No. 8, Col. San Isidro, Yauatepec, Morelos, México. C.P. 62731, Apartado Postal 24. Teléfonos: (735) 394 20 20, 3941896, (55) 57 29 69 00 Ext. 82500 / 82505. Fax 82512, 82521.** Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

---

Alejandra Barranco Aguilar

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Análisis de Carbohidratos del Departamento de Desarrollo Tecnológico del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Edith Agama Acevedo, y en el laboratorio de Metabolómica y Fisiología molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Cinvestav, Unidad Irapuato, bajo la dirección del Dr. Axel Tiessen Favier. Para la realización de los estudios se obtuvo el apoyo económico de la beca CONACYT (becario No. 478576) y del Programa Institucional de Formación de Investigadores de la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP) del IPN. La investigación fue realizada con los financiamientos otorgados de los proyectos de la Secretaría de investigación y Posgrado SIP 2013-0122 y CONACYT 131762.

## AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, le agradezco a **Dios** infinitamente, porque siempre, siempre permanece a mi lado, por la fortaleza, la sabiduría y todo lo que me ha dado, gracias por sus inmensas bendiciones, y porque siempre me manda ángeles que me acompañan en mi camino.

A mis **padres y hermanas** porque siempre han estado conmigo, porque nunca me han dejado caer y porque siempre han confiado en mí, los amo.

A mi mejor amigo, **Juan Carlos** porque desde que inicio este proyecto ha permanecido a mi lado apoyándome siempre.

A la **Dra Edith Agama** por ser mi directora de Tesis, y por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por todo su apoyo brindado.

Al **Dr. Axel Tiessen** por ser mi director de Tesis y por permitirme trabajar en su laboratorio, por sus asesorías, por todo su apoyo, gracias por confiar en mí.

A los miembros de comisión revisora, **Dra. Silvia, Dra. Gabriela, Dr. Bello y Dr. Mario** gracias por las observaciones y conocimientos brindados.

A **Erandi** gracias por tu inmenso apoyo, por tus enseñanzas y consejos, y gracias porque además de amiga fuiste mi maestra.

A **Maye**, porque durante el desarrollo del trabajo siempre me apoyaste a no detener el trabajo por falta insumos, muchas gracias.

Al **inge Francisco**, al **inge Felipe**, y a **Don Berna** por todo su apoyo durante la colecta del material, muchísimas gracias.

A mis amigos **Erika Juarez, Robert, Nan, Francis, Kris, Fandy, Liz, Jaqui, Lau** que siempre me han brindado su apoyo de alguna forma u otra, sin esperar nada a cambio, mil gracias.

A los **minions** del Cinvestav, **Cristal, Shei, Mary, Julio, Pepe, Irving, Sofí, Sharon, Adrian y Oved** gracias por ser agradable mi estancia en su laboratorio.

A cada una de las personas que contribuyeron directa e indirectamente en este proyecto, de corazón muchas gracias.

## DEDICATORIA

A mi nena hermosa, **Naomi Yeyetzi**, porque que eres mi luz, mi inspiración, mi fuerza, eres mi todo, y la más hermosa bendición que Dios me ha dado.

A mi amorcito, mi amado, esposo y amigo, **Juan Carlos**, porque desde que comenzó esta etapa de mi vida, decidiste caminar a mi lado sin nunca dejarme caer, gracias por todo tu amor.

Y a mis padres, **Teresa y Alejandro** porque sin ellos no habría podido llegar hasta donde ahora me encuentro. Y a mis hermanas **Eli y Andrea**, porque han sido parte fundamental en mi vida.

Los amo.



## RESUMEN

El almidón es un polisacárido que se sintetiza y se acumula en diversas fuentes vegetales como los cereales, leguminosas, tubérculos y frutos en estado inmaduro o verde (ejemplo, el plátano *Musa paradisiaca* L.). El almidón es aislado de esas fuentes vegetales y es utilizado en diversos productos alimenticios, farmacéuticos e industriales, en los cuales imparte diferente funcionalidad. La funcionalidad del almidón está relacionada con su estructura, la cual se determina desde su biosíntesis. La ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa) es la enzima que da inicio a la biosíntesis y acumulación del almidón. Dependiendo de la fuente botánica esta enzima es regulada por distintos mecanismos. Algunas isoenzimas son sensibles a los efectores alostéricos, especialmente a la relación 3-ácido fosfoglicérico (3-PGA): fosfato inorgánico (Pi), y también se ha reportado que es regulada por mecanismos redox y por fosforilación. El objetivo de este trabajo fue estudiar la regulación de la actividad de la AGPasa en fruto de plátano inmaduro, para aportar información que ayude a desarrollar estrategias para modificar el contenido de almidón en esta especie. De un productor comercial en Oaxaca se colectó plátano Macho en las semanas 4, 6, 10 y 14 de desarrollo, se les determinó el contenido de azúcares solubles y almidón. Se evaluó la actividad enzimática de la AGPasa en la dirección pirofosforilisis en condiciones reductoras y no reductoras, para observar el grado de activación redox de la AGPasa. Durante todo el desarrollo del plátano el contenido de sacarosa fue mucho mayor que el de glucosa y fructosa. Se postula que la sacarosa no solo es producida por las hojas, sino también por la cáscara verde del plátano. El hecho de que la glucosa y fructosa no se acumularon, sugiere que las hexosas fueron rápidamente metabolizadas y usadas para la respiración y la biosíntesis de almidón. La actividad de la AGPasa y el contenido de almidón incrementaron linealmente en función de las semanas de desarrollo, lo cual se vio reflejado en el aumento del peso y diámetro del fruto. Se encontró que el 3-PGA incrementó la actividad de la AGPasa, mientras que el Pi la inhibió. En condiciones reductoras y oxidantes se observó un efecto diferencial sobre la actividad de la AGPasa, durante distintas semanas de desarrollo. Esto indica que el mecanismo de regulación no es constante durante la maduración del fruto. Se sugiere que la AGPasa mayoritaria del plátano podría ser citosólica, debido a que la isoforma de las monocotiledóneas no contiene péptido señal ni presenta el residuo de Cys82, que está involucrado en el puente disulfuro formando dímeros entre las subunidades pequeñas. Se concluye que la AGPasa es responsable de la preacumulación masiva de almidón en el fruto inmaduro de plátano y que la isoenzima del fruto fue regulada alostéricamente de forma constante, pero que el mecanismo redox pudiera interactuar con otro tipo de regulación enzimática (por ejemplo expresión de isoenzimas o fosforilación).

## ABSTRACT

Starch is a prominent polysaccharide synthesized and stored in diverse botanical sources as cereals, legumes, tubers and unripe fruits (i.e. plantain *Musa paradisiaca* L.). Starch isolated from various sources is used in food, pharmaceutical and industrial products to confer specific functionalities. Starch functionality is given by its molecular structure that is determined during its biosynthesis. ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) is the key enzyme for starch biosynthesis and accumulation. Depending on the botanical source, this enzyme is regulated by different mechanisms. Some but not all isoenzymes are highly sensible to allosteric effectors, specially to 3-phosphoglyceric acid (3-PGA): inorganic phosphate (Pi) ratio. Other isoenzymes are also regulated by redox mechanisms and phosphorylation. The aim of this study was to characterize the regulatory properties of AGPase extracted from unripe plantain fruits. Such information may assist the implementation of genetic strategies to modify starch content in this tropical crop. Plantain fruit was collected in a commercial farm in Oaxaca, México in the weeks 4, 6, 10 and 14 of development. Soluble sugars and starch were determined. Enzymatic activity of AGPase was measured in the pyrophosphorolysis direction under reducing and non-reducing conditions to determine the redox activation state. Sucrose content was higher than glucose and fructose during the development of the fruit. Sucrose was not only produced in the leaf blades of the tree, but also in the unripe green peel of the fruit. Glucose and fructose did not accumulate, suggesting that hexoses were rapidly metabolized to sustain respiration and starch biosynthesis. AGPase activity and starch content increased lineally during development, concomitantly with a gain of weight and diameter of the fruit. 3-PGA increased AGPase activity of unripe plantain fruits, whilst Pi inhibited it. Reducing conditions caused a variable activatory/inhibitory effect on AGPase during development. These results indicated that the regulatory mechanism was not constant during ripening of the fruit. We hypothesize that in plantain fruits the major source of AGPase could be cytosolic due to that the isoforms from monocots neither have signal peptid nor the Cys82 residue involved in the disulphur bridge, producing dimers between small subunits. In conclusion, AGPase is responsible of high pre-accumulation of starch in unripe plantain fruit, and the isoenzymes were regulated by allostery and redox, but there may be interaction with other regulatory mechanisms (i.e. isozyme expression or phosphorylation).

## ÍNDICE

	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
SIMBOLOGÍA Y/O NOTACIÓN UTILIZADA	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Almidón	3
2.1.1 Estructura química	3
2.2 Fuentes de almidón	7
2.3 Plátano	9
2.3.1 Acumulación de almidón en el plátano	11
2.3.2 Desarrollo del fruto de plátano	11
2.4 Metabolismo primario	16
2.4.1 Transporte de fotoasimilados	16
2.4.2 Enzimas que participan en el transporte de fotoasimilados	17
2.5 Biosíntesis de almidón	17
2.5.1 Almidón transitorio	18
2.5.2 Almidón de reserva	19
2.6 ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa)	21
2.7 Mecanismos de regulación enzimática	22
2.9 Mecanismos de regulación de la ADP-glucosa pirofosforilasa	26
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVOS	30

5.1 Objetivo general	30
5.2 Objetivos específicos	30
6. METODOLOGÍA	31
6.1 Material vegetal	32
6.2 Determinación del contenido de azúcares solubles y almidón en plátano	32
6.2.1 Extracción de azúcares solubles	33
6.2.2 Determinación de azúcares solubles	33
6.2.3 Determinación de almidón	35
6.3 Evaluación de la actividad de la AGPasa	35
6.3 Evaluación de la actividad de la AGPasa	35
6.3.1 Extracción de la AGPasa	36
6.3.2 Evaluación de la actividad de la AGPasa en presencia del agente reductor ditioneitol (DTT)	36
6.3.3 Evaluación de la actividad de la AGPasa mediante la presencia de 3-fosfoglicerato (3-PGA) y fosfato inorgánico (Pi)	37
6.4 Análisis estadístico	38
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
7.1 Contenido de azúcares solubles y almidón	39
7.2 Evaluación de la actividad de la AGPasa	44
7.2.1 Evaluación de la actividad de la AGPasa mediante diferentes concentraciones de ADP-glucosa	44
7.2.2 Evaluación de la actividad de la AGPasa por el mecanismo de óxido-reducción	48
7.2.3 Evaluación de la actividad de la AGPasa mediante la presencia de 3-PGA y Pi	52
8. CONCLUSIONES	56
9. PERSPECTIVAS	57
10. LITERATURA CITADA	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

Número	Figura	Página
1	Estructura química de la amilosa y amilopectina.	5
2	Representación esquemática de la estructura laminar de un gránulo de almidón.	7
3	Variedades de plátano producidas en México.	10
4	Etapa reproductiva del plátano macho.	11
5	Cambios en la forma y tamaño del plátano durante su desarrollo.	14
6	Representación esquemática del desarrollo del plátano (pre-emergencia de la inflorescencia hasta la cosecha) en condiciones climáticas tropicales.	15
7	Ruta de biosíntesis del almidón y función de la AGPasa plastidial y citosólica.	20
8	Regulación alostérica de enzimas.	24
9	Regulación óxido-reducción de enzimas.	25
10	Diagrama del trabajo experimental.	31
11	Sistema de enzimas acopladas para la determinación de los azúcares solubles.	34
12	Sistema de enzimas acopladas para determinar la actividad de la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa).	36
13	Contenido de azúcares solubles y almidón durante el desarrollo del plátano macho.	40
14	Relación del contenido de sacarosa y almidón con el peso fresco del plátano macho durante su desarrollo.	42
15	Efecto de la concentración de ADP-glucosa sobre la actividad de la AGPasa en plátano macho inmaduro a diferentes semanas de desarrollo.	45
16	Actividad de la AGPasa en las diferentes semanas de	47

	desarrollo de plátano macho inmaduro a diferentes concentraciones de ADP-glucosa sin ditioteitol.	
17	Actividad de la AGPasa en la semana 4 y 14 de desarrollo de plátano macho a diferentes concentraciones de ADP-glucosa.	50
18	Efecto del 3-fosfoglicerato (3-PGA) y fosfato inorgánico (Pi) sobre la actividad de la AGPasa en plátano macho inmaduro de las semanas 10 y 14 de desarrollo, con y sin 3-PGA y Pi.	53

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Número</b>	<b>Cuadro</b>	<b>Página</b>
1	Tamaño de los gránulos de almidón de diferentes fuentes.	4
2	Usos industriales del almidón.	8
3	Características físicas de los plátanos con cáscara.	43
4	Actividad de la AGPasa en plátano macho inmaduro a diferentes semanas de desarrollo.	48

## **SIMBOLOGÍA Y/O NOTACIÓN UTILIZADA**

3-PGA	3-ácido fosfoglicérico
ADP	adenosin difosfato
AGPasa	ADP-glucosa pirofosforilasa
ATP	trifosfato de adenosina
BE	enzima ramificante
Cys	cisteína
DBE	enzima desramificante
DTT	ditioteitrol
GBSS	enzima unida al gránulo
G6P	Glucosa-6-fosfato
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
HK	hexoquinasa
Inv	invertasa
Pi	fosfato inorgánico
PGI	fosfoglucosa isomerasa
PS	peso seco
NADP <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma reducida
NaPPi	pirofosfato de sodio
SS	Almidón sintasa
TCA	ácido tricloroacético



## 1. INTRODUCCIÓN

El almidón es un carbohidrato que tiene diversas aplicaciones industriales, debido a sus propiedades funcionales y nutricionales; además, es una fuente renovable, ya que se acumula en cereales, leguminosas, tubérculos y frutas. La acumulación del almidón es el resultado de su proceso biosintético. Dentro de este proceso participa la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), una de las enzimas clave, que ejerce un control importante sobre la biosíntesis del almidón (Preiss, 1982; Tiessen *et al.*, 2002). Es la enzima encargada de producir adenosin difosfato glucosa (ADP-glucosa), que es el único precursor metabólico para la biosíntesis del almidón (Smith, 2001). Estudios sobre la actividad de la AGPasa han revelado, que el incremento de su actividad está relacionado con el aumento en el tamaño de las semillas, en el caso de cereales, y un aumento en el contenido de almidón de papa, lo que aumenta el rendimiento de los cultivos (Stark *et al.*, 1992; Giroux *et al.*, 1996). La regulación de la actividad de la AGPasa depende de la fuente botánica. En cereales (maíz, arroz y trigo), tubérculos (la papa) y en frutos (tomate), la AGPasa es activada por 3-ácido fosfoglicérico (3-PGA) e inhibida por fosfato inorgánico (Pi). Otro mecanismo que regula la actividad de la AGPasa es el de óxido-reducción (Tiessen *et al.*, 2002). En papa, arábido y otras especies dicotiledóneas se encontró que en condiciones oxidantes forma puentes disulfuro formando dímeros entre sus subunidades pequeñas (Tiessen *et al.*, 2002; Hendriks *et al.*, 2003). La regulación redox modifica la actividad de la AGPasa, y cuando ésta se dimeriza por oxidación la actividad disminuye, siendo un cambio reversible que puede activarse otra vez por un agente reductor como DTT, NADPH o la Thioredoxina NTRC (Michalska *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha reportado que la AGPasa de las monocotiledóneas no presenta el característico residuo de cisteína en el N-término de la proteína, por lo que es relevante confirmar la presencia/ausencia de los mecanismos redox o alostéricos de esta especie botánica. El plátano es una planta monocotiledónea que durante su desarrollo acumula almidón, contribuyendo en gran medida al crecimiento del fruto, hasta alcanzar su madurez fisiológica (estado verde o inmaduro), que es la etapa donde existe la mayor acumulación del almidón (80% base seca); en ese

momento el fruto alcanza su tamaño máximo y es cosechado para su posterior maduración en cámaras (Rosales-Reynoso *et al.*, 2014). Los estudios sobre la biosíntesis del almidón en plátano son escasos, lo cual ayudaría a conocer la acumulación de este polisacárido en el estado verde o inmaduro del fruto. El objetivo de este trabajo fue estudiar el comportamiento de los carbohidratos no estructurales durante el desarrollo del plátano inmaduro y relacionarlo con la regulación de la actividad de la AGPasa. Nos propusimos caracterizar los mecanismos de activación o inhibición de esta enzima, así como la relación de su actividad con la acumulación del almidón en el fruto. La información permitirá ampliar el conocimiento de esta reacción enzimática, considerada como el inicio de la biosíntesis del almidón y en consecuencia de su acumulación.

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 Almidón

#### 2.1.1 Estructura química

Después de la celulosa, el almidón es el segundo polisacárido más abundante en las plantas y es producto de la fotosíntesis que llevan a cabo las células vegetales (Zeeman *et al.*, 2010). Este compuesto es sintetizado en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos (Buleón *et al.*, 1998) y se almacena como gránulos insolubles en agua con una estructura laminar interna, que se compone de polímeros de  $\alpha$ -glucanos y pequeñas cantidades de lípidos y proteínas (Chibbar *et al.*, 2007). El tamaño de los gránulos varía de acuerdo a la fuente botánica (Cuadro 1), el tamaño varía desde  $1\mu\text{m}$  hasta  $100\mu\text{m}$ , generalmente el tamaño del gránulo se refiere al diámetro promedio de los gránulos de almidón (Buleón *et al.*, 1998). En función del tamaño del gránulo, el almidón se ha clasificado 4 grupos: grande ( $> 25\mu\text{m}$ ) medio ( $10\text{-}25\mu\text{m}$ ) pequeños ( $5\text{-}10\mu\text{m}$ ) y muy pequeños ( $<5\mu\text{m}$ ) (Lindeboom *et al.*, 2004).

Existen diferentes formas de los gránulos, esféricas, ovaladas, poligonales, poliédricas, e incluso existen formas irregulares (Lindeboom *et al.*, 2004). La morfología de los gránulos de almidón podría ser influenciada por las estructuras membranosas y características físicas de los plastidios, las cuales afectan el arreglo molecular de los componentes del almidón dentro del gránulo (Jane *et al.*, 1994). Por ejemplo, los gránulos de almidón provenientes de cereales presentan formas esféricas, lenticulares, poliédricas u ovaladas; los de tubérculos, formas lenticulares (Tester *et al.*, 2004) y los de algunos frutos como el plátano, formas irregulares, como ovaladas alargadas con crestas (Zhang *et al.*, 2005). La estructura del gránulo también pudiera estar determinada por las propiedades cinéticas de las enzimas participantes y de los complejos proteicos que se asocian a la superficie del gránulo.

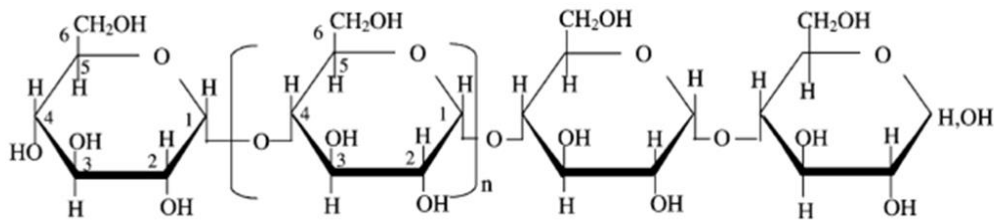
**Cuadro 1.** Tamaño de los gránulos de almidón de diferentes fuentes (Lindeboom *et al.*, 2004).

<b>Fuente</b>	<b>Diámetro [<math>\mu\text{m}</math>]</b>
<i>Bimodal</i>	
Cebada	2-3 y 12-32
Maíz dulce inmaduro	1-5 y 10-20
Centeno	2-3 y 22-36
Triticale	5 y 22-36
Trigo	<10 y 10-35
<i>Gránulos de almidón pequeños</i>	
Alforfón	2-14
Espadaña	2-15
Durián	3-14
Avena	2-14
Arroz	2-10
Arroz silvestre	2-8
<i>Gránulos de almidón muy pequeños</i>	
Amaranto	1-2
Alpiste	1.5-3.5
Malanga	0.5-3
Huazontle	1.5-4
Quinoa	0.5-3
Taro	2-3

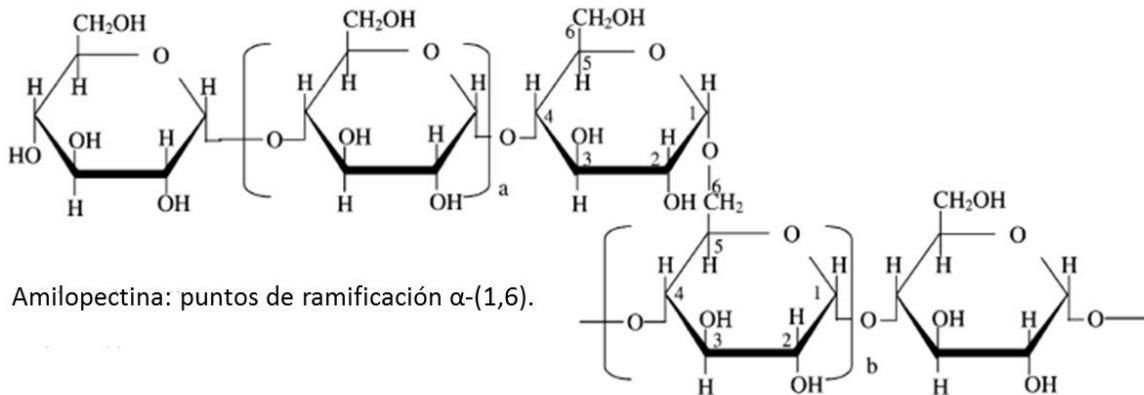
### **Amilosa y amilopectina**

Los gránulos constan de dos diferentes polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina (Figura 1). La relación de estos polímeros varía en las fuentes vegetales, la mayoría de los almidones contienen entre 60-90% de amilopectina, y almidones tipo cerosos o “waxy” contiene hasta el 100% de amilopectina y otros almidones contienen el 70% de amilosa (Copeland *et al.*, 2009). La amilosa es un polímero altamente lineal compuesto por unidades de D-glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4 y algunas ramificaciones las cuales están unidas por enlaces  $\alpha$ -1,6. La amilosa tiene un peso molecular de aproximadamente  $1 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  Da y un grado de polimerización (GP) de 324-4920 unidades de glucosa con alrededor de

9-20 puntos de ramificación equivalente a 3-11 cadenas por molécula. Cada molécula contiene aproximadamente 200-700 residuos de glucosa. En cambio la amilopectina es una molécula mucho más grande que la amilosa, su peso molecular varía de  $1 \times 10^7$ - $1 \times 10^9$  Da, su estructura es altamente ramificada constituida por aproximadamente el 95% de enlaces  $\alpha$ -1,4 y el 5% de uniones  $\alpha$ -1,6. Y el grado de polimerización es de 9600-15900 residuos de glucosa, pero comprende tres especies predominantes con un grado de polimerización de 13400-26500, 4400-8400 y 700-2100 residuos de glucosa (Tester *et al.*, 2004).



Amilosa: glucano  $\alpha$ -1,4). Algunas veces puede llevar algunas ramificaciones unidas por enlaces  $\alpha$ -1,6).



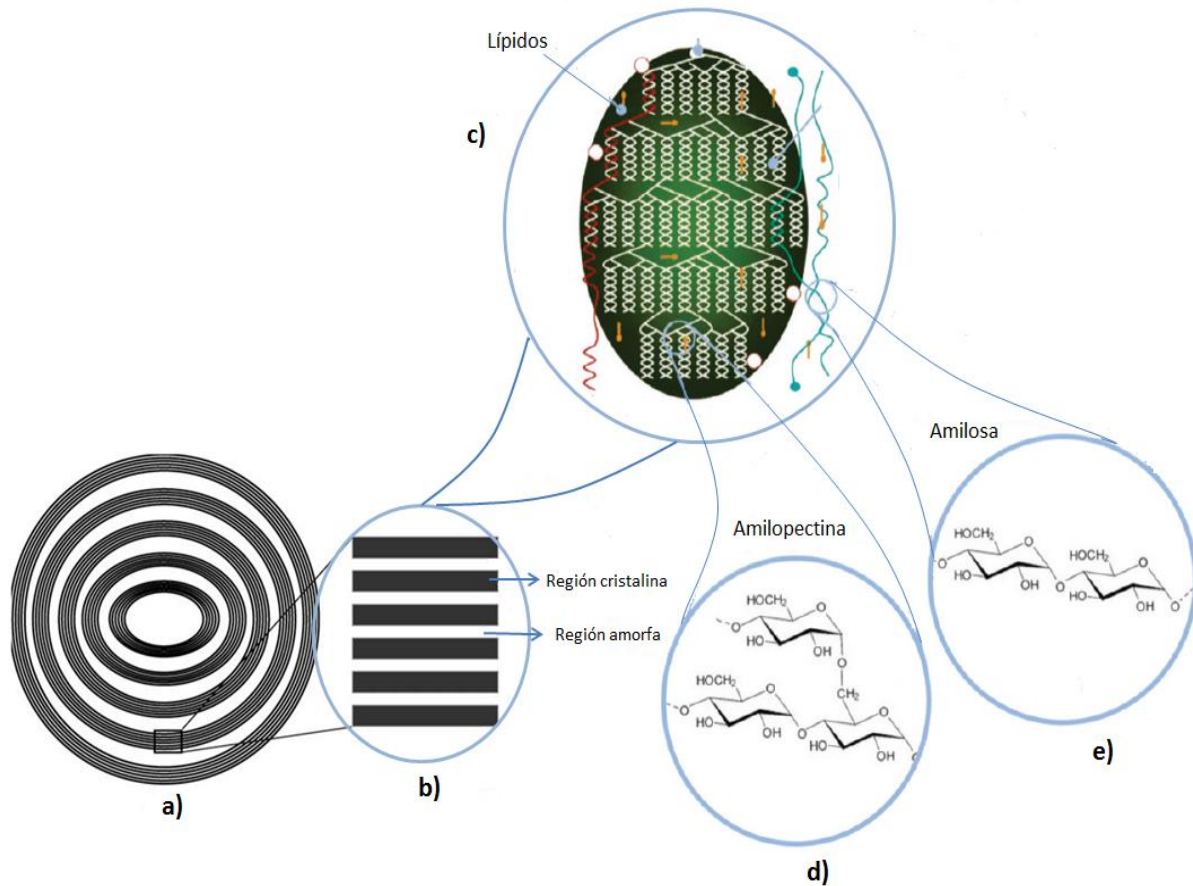
Amilopectina: puntos de ramificación  $\alpha$ -1,6).

**Figura 1.** Estructura química de la amilosa y amilopectina (Tester *et al.*, 2004).

La amilopectina tiene un alto grado de organización estructural, que puede variar sustancialmente entre diferentes almidones con respecto a la colocación y longitud de sus ramificaciones, dicha estructura da consigo cierta cristalinidad a los gránulos de almidón. El modelo más aceptado para explicar la estructura de la

amilopectina es el modelo de “cluster” o racimo, que sugiere que la amilopectina está constituida por regiones amorfas y cristalinas. Y que además sugiere que está constituida por diferentes clases de cadenas, el cual consisten en la diferencia de longitud y distribución polimodal de las cadenas dentro de la molécula de amilopectina. Las tres clases de cadenas se denominan A, B y C, las cadenas A son las más cortas en longitud y no presentan ramificaciones; las cadenas B presentan ramificaciones por cadenas A o B. Las cadenas C llevan tanto los extremos reductores de las moléculas de amilopectina como las cadenas B (Kossmann y Lloyd, 2000).

La amilopectina llega a conformar racimos, los cuales se alinean perpendicularmente en la estructura granular llegando a formar anillos compuestos por regiones amorfas y cristalinas, estos anillos crecen hacia la superficie del gránulo en un arreglo radial. Las ramificaciones de la amilopectina interactúan unas con otras formando dobles hélices, que dan como resultado la región cristalina del gránulo mientras que las moléculas de amilosa se intercalan aleatoriamente entre las moléculas de amilopectina las cuales originan la región amorfa (Figura 2) (Le Corre *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Representación esquemática de la estructura laminar de un gránulo de almidón. a) Láminas microcristalinas separadas por anillos de crecimiento amorfo. b) Regiones amorfas y cristalinas, c) dobles hélices de amilopectina que forman la estructura cristalina del gránulo, d) estructura molecular de la amilopectina y e) estructura molecular de la amilosa (Le Corre *et al.*, 2010; Tester *et al.*, 2004).

## 2.2 Fuentes de almidón

El almidón se extrae de diferentes fuentes vegetales, debido a que varía en su forma estructural y funcionalidad, proporcionando almidones con diversas propiedades. Se ha reportado que a nivel mundial aproximadamente, 60 millones de toneladas se extraen de cereales (maíz y trigo), tubérculos (yuca, camote y papa) y raíces (Funglie *et al.*, 2001; Copeland L. *et al.*, 2009). El almidón de maíz

representa más del 80% a nivel mundial donde gran parte se produce en los Estados Unidos. Europa es el mayor productor de almidón de trigo y papa, mientras que Asia produce almidón de yuca y tapioca (Jobling, 2004). En los países en desarrollo, los cultivos de raíces son más importantes como fuentes de almidón que los cultivos de cereales (Funglie *et al.*, 2001).

Dicho polisacárido tiene una amplia variedad de usos los cuales se han dirigido tanto para la industria alimentaria y no alimentaria (Cuadro 2), cada industria requiere un tipo específico de almidón para la fabricación de sus productos. El almidón es mayormente utilizado en la industria de alimentos, debido a que se busca el desarrollo de productos con propiedades funcionales diferentes o mejores a los convencionales (Bello-Pérez, *et al.*, 2000). Por ello se ha optado en la búsqueda de fuentes alternativas para la obtención de almidón. Una de ellas es la utilización de frutos en estado verde, siendo el plátano una nueva alternativa para la obtención del mismo ya que se ha reportado que el almidón de plátano (*Musa paradisiaca* L.) contiene ciertas propiedades funcionales (Bello-Pérez, *et al.*, 2006).

**Cuadro 2. Usos industriales del almidón (Ellis *et al.*, 1998).**

<b>Industria</b>	<b>Uso del almidón/ almidón modificado</b>
Adhesivo	Producción de adhesivos
Agroquímico	Recubrimiento de cereales
Cosméticos	Polvos faciales y talco
Detergentes	Surfactantes, agentes blanqueadores y activadores de blanqueo.
Alimentos	Modificador de viscosidad, agente de recubrimiento.
Médico	Extensor o sustituto de plasma, preservación de órganos de trasplante, productos absorbentes sanitarios.
Papel y cartón	Apresto, encuadernación, revestimiento.
Farmacéutico	Diluyente, aglutinante.
Plásticos	Rellenos biodegradables
Purificación	Floculante
Textil	Acabado e impresión



Los gránulos de almidón no solo contienen amilosa y amilopectina, sino que además contienen proteínas, azúcares, lípidos y otros metabolitos. Los residuos C3 y C6 de las cadenas de glucosa pueden estar también fosforilados (Kötting *et al.*, 2004). La composición de los gránulos es variable según la especie botánica, tejido, etapa de desarrollo y periodo diurno. Todo en su conjunto determina las propiedades físico-químicas de los diversos almidones vegetales, como color, sabor, olor, gelatinización, elasticidad, resistencia a la degradación térmica o enzimática, etc.

### 2.3 Plátano

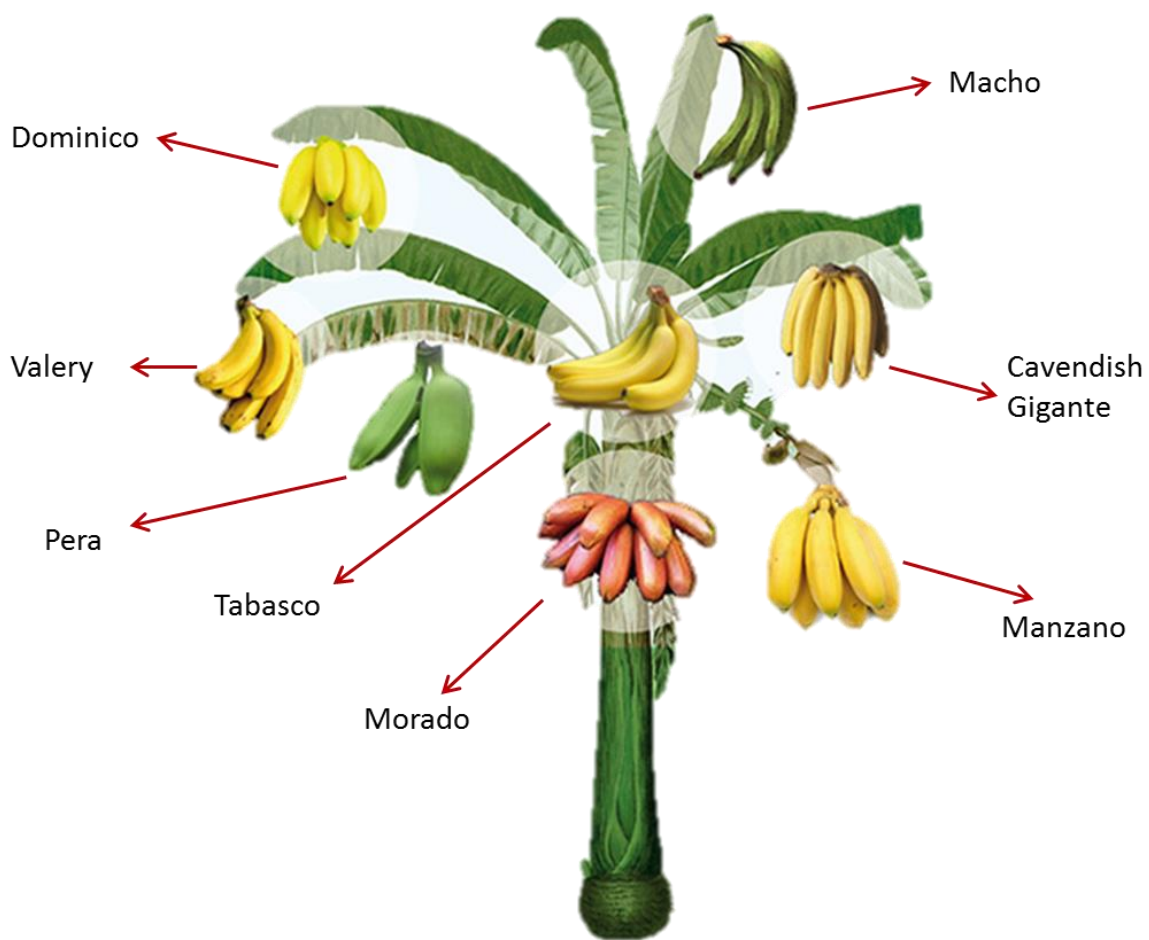
El plátano se considera el cuarto cultivo más importante, después del arroz, trigo y maíz con una producción mundial de alrededor de 100 millones de toneladas (Heslop-Harrison y Schwarzachier, 2007; Salvador *et al.*, 2007). Siendo la India en el año 2010 el principal productor de plátanos, con el 31% del total, seguido de China con 10%, y Filipinas con 9% mientras que México ocupó el noveno lugar con el 2% (SIAP, 2012). En México las regiones donde mayormente se cultiva el plátano son en las zonas costeras del océano pacífico y golfo de México (Vazquez-Castrejon *et al.*, 2005).

La planta de plátano es una especie C3, esta planta es una herbácea monocotiledónea de clima tropical, perteneciente a la familia de las Musáceas. La familia Musáceae está conformada por los géneros *Musa* y *Ensete*. El género *Musa*, comprende los plátanos comestibles con más de 50 variedades; los plátanos comestibles pertenecen a la sección *Emusa* que es la más diversa y ampliamente distribuida.

La mayoría de las variedades de plátano, son derivadas de las especies *Musa acuminata* (genoma AA) y *Musa balbisiana* (genoma BB) (Pillay y Tripathi 2007); al cruzarse dichas especies forman las distintas variedades de plátano, que son híbridos complejos (diploides, triploides y tetraploides). A esto se le conoce como poliploidía, el cual consiste en la repetición de letras en los genomas (Vazquez-

Castrejon *et al.*, 2005), de tal manera que los híbridos se clasifican además por la presencia de uno o más conjuntos de cromosomas. Por ejemplo, un híbrido AB es diploide, uno AAB es triploide y uno ABBB es tetraploide (Pillay y Tripathi, 2007).

En México se cultivan ocho variedades de plátano (Figura 3) conocidas comercialmente como Dominico, Valery, Pera, Tabasco, Morado, Manzano, Cavendish gigante y Macho (SIAP, 2014). Una de las variedades que ha llamado el interés de la industria alimentaria es el plátano Macho debido a su alto contenido de almidón presente en su estado inmaduro. El plátano Macho (*Musa paradisiaca* L.) es la segunda variedad que más se produce en México (SAGARPA, 2008). Su poliploidía consiste en un híbrido “AAB” (Robinson y Galán, 2010).



**Figura 3.** Variedades de plátano producidas en México (SIAP, 2014).

### 2.3.1 Acumulación de almidón en el plátano

El plátano concentra mayor cantidad de almidón en la medida que transcurre el llenado del fruto, es decir durante su desarrollo (Arcila *et al.*, 2002). Además, se ha reportado que el plátano en estado verde o inmaduro contiene hasta un 70% de almidón en base seca (Flores-Gorosquera *et al.*, 2004). El plátano primero madura de verde a amarillo durante el cual incrementa los azúcares y se reducen algunos compuestos astringentes y posteriormente cuando comienza el proceso de maduración de amarillo a negro, el almidón finalmente se degrada hasta desaparecer (Shiga *et al.*, 2011). Por ello es importante conocer al fruto durante su desarrollo, así como comprender la ruta de biosíntesis del almidón en dicho fruto. Ya que con el conocimiento adquirido y futuras investigaciones se podría permitir la manipulación genética del contenido de almidón y dirigirlo en el aumento de su rendimiento.

### 2.3.2 Desarrollo del fruto de plátano

El desarrollo del plátano consiste en dos etapas, una llamada vegetativa, la cual se le denomina así desde el momento de la plantación hasta que sucede la diferenciación floral, y la otra es la reproductiva, durante la etapa reproductiva se establece el número potencial de manos (pencas) y dedos (frutos) del racimo a formarse (Figura 4), esta etapa inicia con la inflorescencia y concluye con la madurez fisiológica del fruto (Aristizábal y Jaramillo, 2010).



**Figura 4.** Etapa reproductiva del plátano macho.

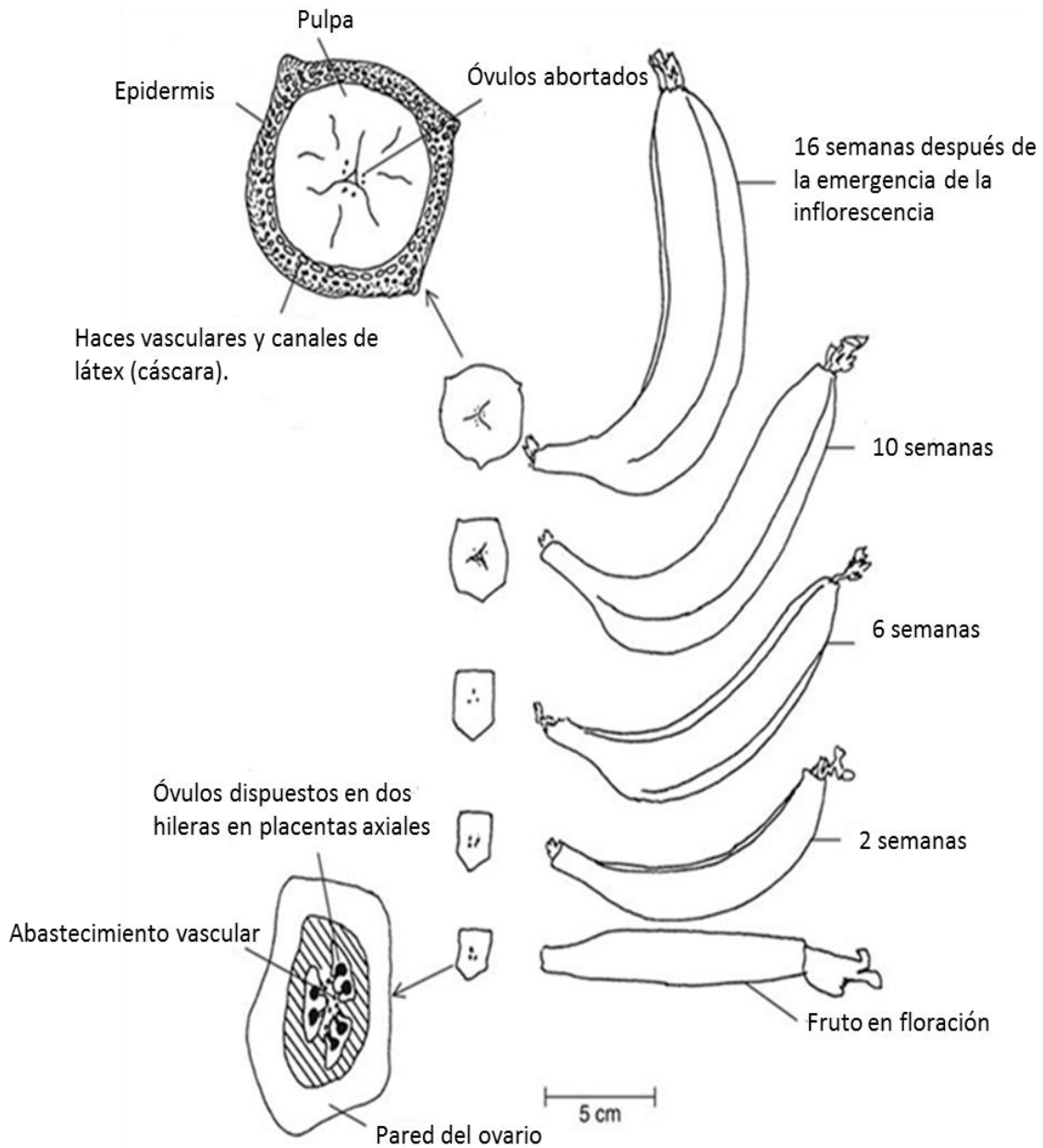
El eje de la inflorescencia surge del tallo floral, del cual emergen numerosas brácteas dispuestas en espiral, dichas brácteas cubren a las flores que se encuentran dispuestas en doble fila unidas a un pedúnculo grueso a este grupo de flores se les denomina “manos”. Cuando las brácteas se abren y dejan al descubierto las flores comienza la floración, las primeras flores diferenciadas son las flores femeninas cuyo ovario origina al fruto o “dedo”, mientras que las flores masculinas tienen ovarios poco desarrollados, por lo que hay poca diferenciación y no se transforma en fruto (Mohan Ram *et al.*, 1962).

Existen tres lóculos en la cavidad del ovario de los plátanos desarrollándose la mayor parte de la pulpa a partir del borde exterior del lóculo (cara interior de la piel donde están situados los haces vasculares) (Figura 5). Los óvulos se marchitan pronto pero se pueden reconocer en los frutos maduros como pequeños puntos marrones incrustados en la pulpa comestible junto al eje central del fruto (Robinson y Saúco, 2010). Posteriormente las brácteas caen y dejan al descubierto las manos, donde después se lleva a cabo el llenado del fruto (Champion, 1978). En el llenado del fruto, la pulpa se desarrolla desde el borde exterior de la cara interna de la cáscara donde se encuentran los haces vasculares.

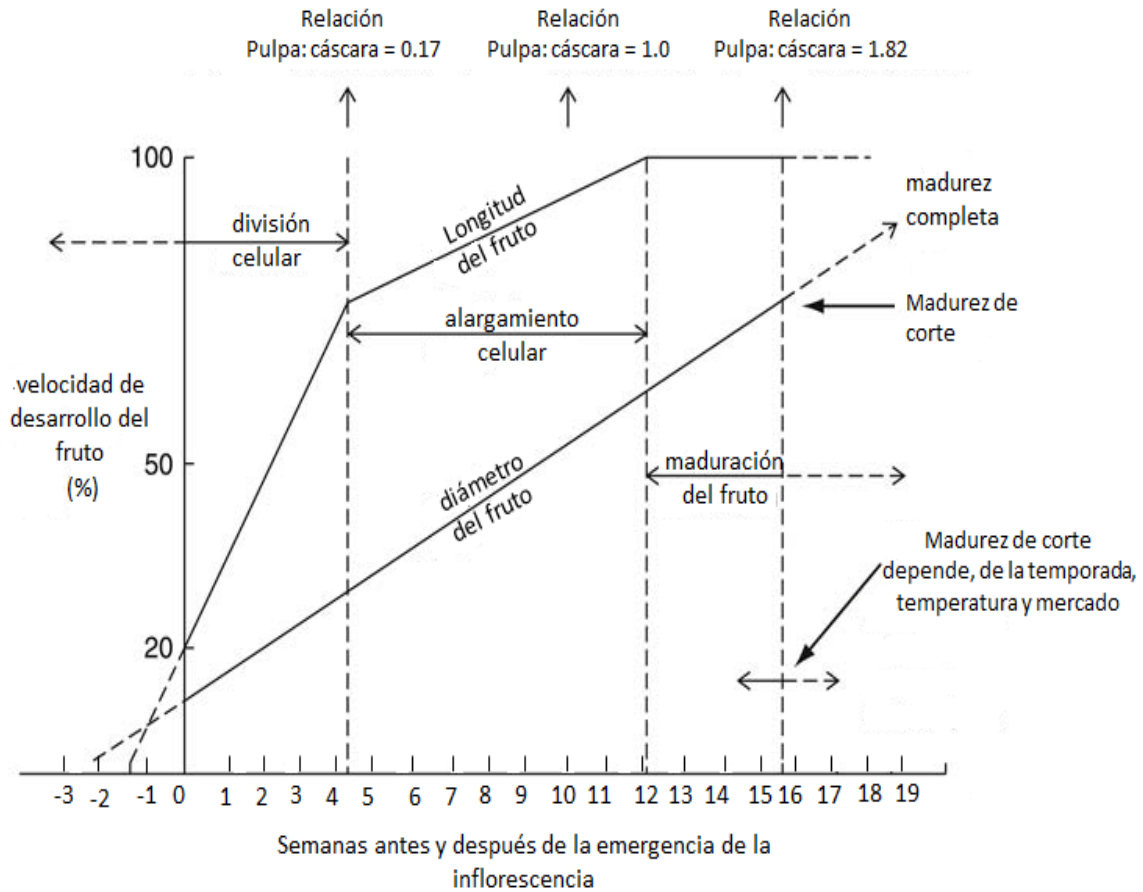
La proporción de pulpa es mayor que la cáscara, siendo el almidón el componente mayoritario. Los gránulos de almidón se depositan inicialmente en las células de la pulpa y este se va acumulando hasta alcanzar la madurez fisiológica. A medida que el fruto de plátano se desarrolla cambia la forma y el tamaño del mismo (Figura 5); debido a que durante el crecimiento del plátano hay un aumento rápido de la longitud de los dedos durante las primeras 4 semanas después de la emergencia de la inflorescencia posteriormente, la velocidad de crecimiento de la longitud del plátano disminuye y se completa de la semanas 6 a la semana 11 después de la inflorescencia, esto depende del área y el clima. En contraste con la longitud del dedo, el aumento del diámetro del dedo es más lento pero continuo hasta la cosecha (Figura 6).

Durante el primer mes después de la emergencia de la inflorescencia, la cáscara representa el 80% del peso fresco total de la fruta. Después de esto, la pulpa aumenta rápidamente y la relación pulpa:cáscara incrementa de 0.17 a 1.82 en 11 semanas. La relación pulpa:cáscara de 1.0 es alcanzada alrededor de la semana 10 después de la inflorescencia (Mohan Ram *et al.*, 1962; Robinson y Saúco, 2010).

Por otro lado, a nivel celular, ocurren tres fases de crecimiento del plátano, la primera es la división celular que ocurre 6 semanas antes de la emergencia de la inflorescencia y 4 semanas después de la emergencia de la inflorescencia. El segundo evento es el alargamiento celular que se produce de la semana 4 a la semana 12 después de la inflorescencia y por último la maduración de la fruta, que ocurre después, aproximadamente de la semana 12 a la semana 16 después de la inflorescencia (Figura 6) (Robinson y Saúco, 2010).



**Figura 5.** Cambios en la forma y tamaño del plátano durante su desarrollo. Se muestra la sección transversal a través del fruto joven en el momento de la emergencia de la inflorescencia y del fruto en el momento de la cosecha (Figura adaptada de Robinson y Saúco, 2010).



**Figura 6.** Representación esquemática del desarrollo del plátano (pre- emergencia de la inflorescencia hasta la cosecha) en condiciones climáticas tropicales (Figura adaptada de Robinson y Saúco, 2010).

## **2.4 Metabolismo primario**

El metabolismo primario se refiere a los procesos fotosintéticos que realizan las plantas y dan lugar a los compuestos vitales para la vida del organismo, como son los ácidos nucleicos, lípidos, proteínas y carbohidratos (Guarnizo y Martínez, 2009). Por ello, las plantas transforman la energía luminosa en energía química mediante la fotosíntesis, para su crecimiento y desarrollo; esto ocurre en las hojas y tejidos verdes, pero las hojas son los principales sitios de la fotosíntesis en la mayoría de las plantas. En presencia de luz, las partes verdes de las plantas producen compuestos orgánicos y oxígeno a partir de dióxido de carbono y agua. El material orgánico sintetizado por la fotosíntesis abastece a la planta entera con energía química y esqueletos carbonados para la síntesis de todas las principales moléculas orgánicas de las células; cerca del 50% de dicho material orgánico se consume como combustible por la respiración celular (Campbell y Reece, 2007). A estos compuestos orgánicos se les denomina fotoasimilados, éstos son transportados por el floema a los órganos sumideros o sitios de utilización y almacenamiento como son tallos, raíces, tubérculos, semillas, frutos, etc. (Taíz y Zaiger, 2006). Esto ocurre debido a que las plantas consiguen elaborar más material orgánico del que requieren como combustible respiratorio y precursores biosintéticos, entonces éstas almacenan el azúcar extra, sintetizando almidón (Campbell y Reece, 2007).

### **2.4.1 Transporte de fotoasimilados**

Los principales fotoasimilados transportados por el floema (tejido conductor) son los carbohidratos, siendo la sacarosa el azúcar principal transportado. La sacarosa se incorpora a los elementos cribosos, es decir a las células del floema que conducen los azúcares y otros materiales orgánicos por la planta, a este proceso se le llama carga floemática, dentro de los elementos cribosos, los fotoasimilados se exportan hacia los órganos sumidero (Taíz y Zaiger, 2006). Como los órganos sumideros varían en función y estructura, existen varias formas de descarga del floema (Tofiño *et al.*, 2007).



#### **2.4.2 Enzimas que participan en el transporte de fotoasimilados**

Durante la descarga del floema participan distintas enzimas, las cuales generan dos tipos de transporte de los fotoasimilados en las células de los órganos sumidero; en el transporte simplástico la sacarosa se importa a través de los plasmodesmos, llegando al citosol de la célula, la sacarosa es hidrolizada mediante la invertasa citoplasmática, generando baja producción de glucosa y fructosa, ya que dicha enzima tiene baja actividad enzimática, la sacarosa sintasa también puede participar en la hidrólisis de la sacarosa generando UDP-glucosa y fructosa (Rolland *et al.*, 2006; Tymowska-Lalanne y Kreis, 1998). En el transporte apoplástico, la sacarosa se importa a través de la pared celular, donde es hidrolizada mediante la invertasa de la pared celular, generando cantidades significativas de glucosa y fructosa (Koch, 2004). También la sacarosa puede ser importada y almacenada en la vacuola, donde es hidrolizada por la invertasa vacuolar (Rolland *et al.*, 2006; Tymowska-Lalanne y Kreis, 1998).

El transporte de la sacarosa y los productos generados a partir de su hidrólisis desempeñan un papel clave en la regulación de la asignación de carbono, como la biosíntesis de almidón (Rolland *et al.*, 2006).

#### **2.5 Biosíntesis de almidón**

La biosíntesis del almidón se lleva a cabo dentro de los plastidios de la célula vegetal, estos son compartimientos rodeados por membranas que contiene una variedad de transportadores que regulan el intercambio de metabolitos entre el plastidio y el citosol circundante (Muñoz *et al.*, 2005).

El almidón está conformado de amilosa y amilopectina, la síntesis de estas moléculas se realizan dentro de los plastidios, donde participan la almidón sintasa (SS, *starch synthase*), enzima ramificante (BE, *branching enzyme*) enzima desramificante (DBE, *debranching enzyme*) y enzima unida al gránulo (GBSS, *granule bound starch synthase*); además de que existen isoformas de cada una de

las enzimas mencionadas, las cuales varían con la fuente botánica (Chibbar *et al.*, 2007). La elongación de las cadenas lineales de glucanos es catalizada por SS y GBSS, estas enzimas unen los monómeros de glucosa donados por el ADP-glucosa a través de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4. La SS está involucrada en la síntesis de amilopectina mientras que la GBSS con la síntesis de amilosa. La BE introduce las ramificaciones en las moléculas de amilosa y amilopectina, ya que cataliza los puntos de ramificación por ruptura de enlaces  $\alpha$ -1,4 en poliglucanos y conecta la cadena a través de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,6. La DBE es la responsable de reestructurar las cadenas ramificadas, a través de una hidrólisis en los enlaces  $\alpha$ -1,6 de poliglucanos, evitando la acumulación de polímeros altamente ramificados (Chibbar *et al.*, 2007; Jeon *et al.*, 2010).

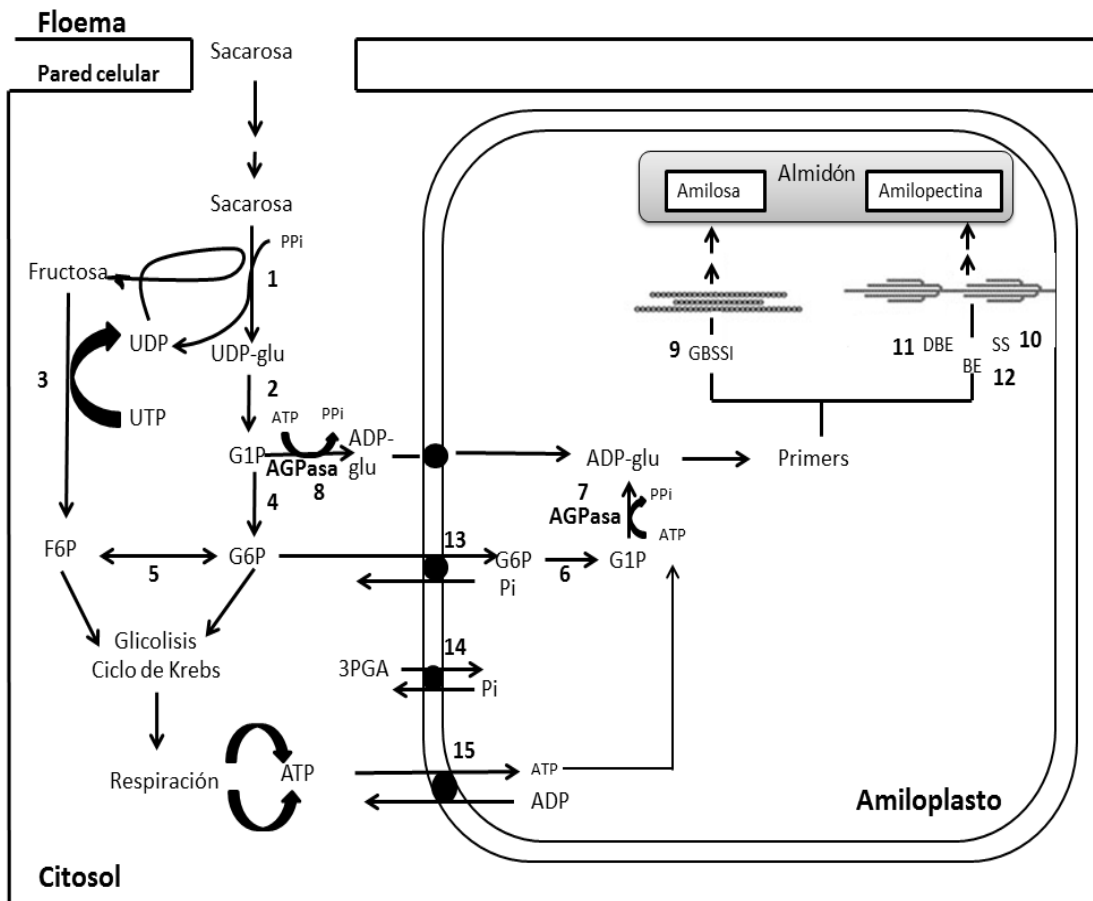
La síntesis de almidón puede llevarse a cabo en los cloroplastos o en los amiloplastos, y de ello dependerá la función que este tenga; por ejemplo, durante el día se forma el almidón en los cloroplastos y posteriormente se degrada en la noche para generar energía en el metabolismo no fotosintético, a este almidón se le conoce como transitorio. Cuando se sintetiza en el amiloplasto, es almacenado y utilizado de acuerdo a las necesidades de la planta, a éste se le conoce como almidón de reserva (Muñoz *et al.*, 2005).

### **2.5.1 Almidón transitorio**

El almidón transitorio es el producto final de una vía directamente vinculada al ciclo de Calvin dentro de los cloroplastos. A través de las triosas fosfatos generadas del ciclo de Calvin se forman las hexosas fosfatos, glucosa-6-fosfato, que posteriormente se convierte a glucosa-1-fosfato, que por medio de la ADP-glucosa pirofosforilasa se genera ADP-glucosa para la síntesis de almidón (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

### **2.5.2 Almidón de reserva**

El almidón de reserva es generado a partir de la sacarosa producida en el citosol, donde posteriormente se convierte en hexosas fosfato, glucosa-1-fosfato donde a través de AGPasa citosólica se produce ADP-glucosa que luego es transportado al amiloplasto para posteriormente ser utilizado para la síntesis de almidón. Sin embargo, la presencia de dicha enzima varía en diferentes fuentes vegetales, por tanto cuando no se cuenta con la presencia de la AGPasa citosólica, las hexosas fosfato, glucosa-6-fosfato se transporta al amiloplasto, para posteriormente ser convertida en glucosa-1-fosfato y por medio de la AGPasa plastídica generar ADP-glucosa para la formación de almidón (Figura 7) (Tiessen *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2013).



**Figura 7.** Ruta de biosíntesis del almidón y función de la AGPasa plastidial y citosólica. 1, Sacarosa sintasa; 2, UDP-glucosa pirofosforilasa; 3, fructoquinasa; 4, fosfoglucomutasa citosólica; 5, fosfoglucoisomerasa; 6, fosfoglucomutasa plastídica; 7, ADP-glucosa pirofosforilasa plastídica; 8, ADP-glucosa pirofosforilasa citosólica; 9, almidón sintasa unida al gránulo; 10, sintasa soluble del almidón; 11, enzima desramificante; 12, enzima ramificante; 13, traslocador hexosa fosfato; 14, traslocador triosa fosfato; 15, traslocador adenilato (Figura adaptada de Tiessen *et al.*, 2002; Azcón-Bieto y Talón, 2008 y Jiang *et al.*, 2013).

## 2.6 ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa)

La enzima ADP-glucosa pirofosforilasa también conocida como AGPasa, es un heterotetramero compuesto de dos subunidades pequeñas de aproximadamente 50-55 kDa y de dos grandes subunidades de aproximadamente 51-60 kDa (Chen y Janes., 1997; Chen *et al.*, 1998), con un un peso molecular de 200 a 240 kDa. Se reportó que cada subunidad tiene diferente funcionalidad en la enzima, las subunidades pequeñas tienen funciones tanto catalíticas como reguladoras, mientras que las subunidades grandes son las encargadas de regular las propiedades alostéricas de cada subunidad pequeña (Baris *et al.*, 2009). Esta enzima es la encargada de producir adenosin difosfato para el inicio de la biosíntesis del almidón (Tiessen, 2003).

La localización subcelular de la AGPasa varía de acuerdo a la fuente vegetal, en tejidos heterotróficos de plantas dicotiledóneas la AGPasa se encuentra en los amiloplastos. Mientras que en cereales se localiza tanto en plastidios como en el citosol; sin embargo, la mayor parte de la AGPasa es citosólica, ya que menos del 10% de su actividad localizada en plastidios no es suficiente para la síntesis de almidón (Muñoz *et al.*, 2005). En el endospermo de cereales, como maíz y cebada, menos del 20% de la actividad de la AGPasa es localizada en plástidio (Beckles *et al.*, 2001), y en arroz alrededor del 90% de la AGPasa total se encuentra en el citosol (Sikka *et al.*, 2001). Mientras que la AGPasa en amiloplastos se ha localizado en papa (Chen *et al.*, 1998) y chícharo (Sikka *et al.*, 2001). También se reportó que en el pericardio del tomate la AGPasa se localiza tanto en plastidios como en el citosol, pero la mayoría de la AGPasa reside dentro del plastidio (Chen *et al.*, 1998).

## 2.7 Mecanismos de regulación enzimática

Las plantas tienen que mantener la composición y las propiedades de su medio interno en equilibrio dinámico, el cual se logra mediante la regulación estricta de la actividad de cada una de las vías metabólicas. Dicha regulación se lleva a cabo gracias a la participación coordinada de las enzimas. La actividad de la AGPasa está regulada por múltiples mecanismos, que pueden tener un efecto positivo o negativo, según las necesidades celulares (Fornaguera y Gómez, 2007). A continuación se mencionan algunos mecanismos básicos de la regulación enzimática:

### Concentración del sustrato

Este mecanismo de regulación ocurre al cambiar (incrementar o disminuir) las concentraciones de sustrato. Bajas concentraciones de sustrato son acompañadas de una disminución de la actividad enzimática. Mientras que al aumentar la concentración de sustrato se incrementa la actividad de la enzima, hasta alcanzar su velocidad máxima (Fornaguera y Gómez, 2007). Debido a que los sustratos están obligados a unirse a una región específica de la enzima llamada sitio activo; cuando la concentración de sustrato es suficientemente alta, todos los sitios catalíticos se saturan por lo que la velocidad de reacción no puede aumentar más (Berg *et al.*, 2002).

### Concentración de la enzima

Esta regulación sucede cuando la cantidad de un enzima puede ser modificada, ya que las enzimas al igual que otros constituyentes celulares, están siendo formados y destruidos constantemente, lo que lleva a una alteración en la velocidad de síntesis o en la velocidad de degradación (McGilvery, 1977). Es decir, se ha observado que a una concentración de enzima constante, aumenta la velocidad de

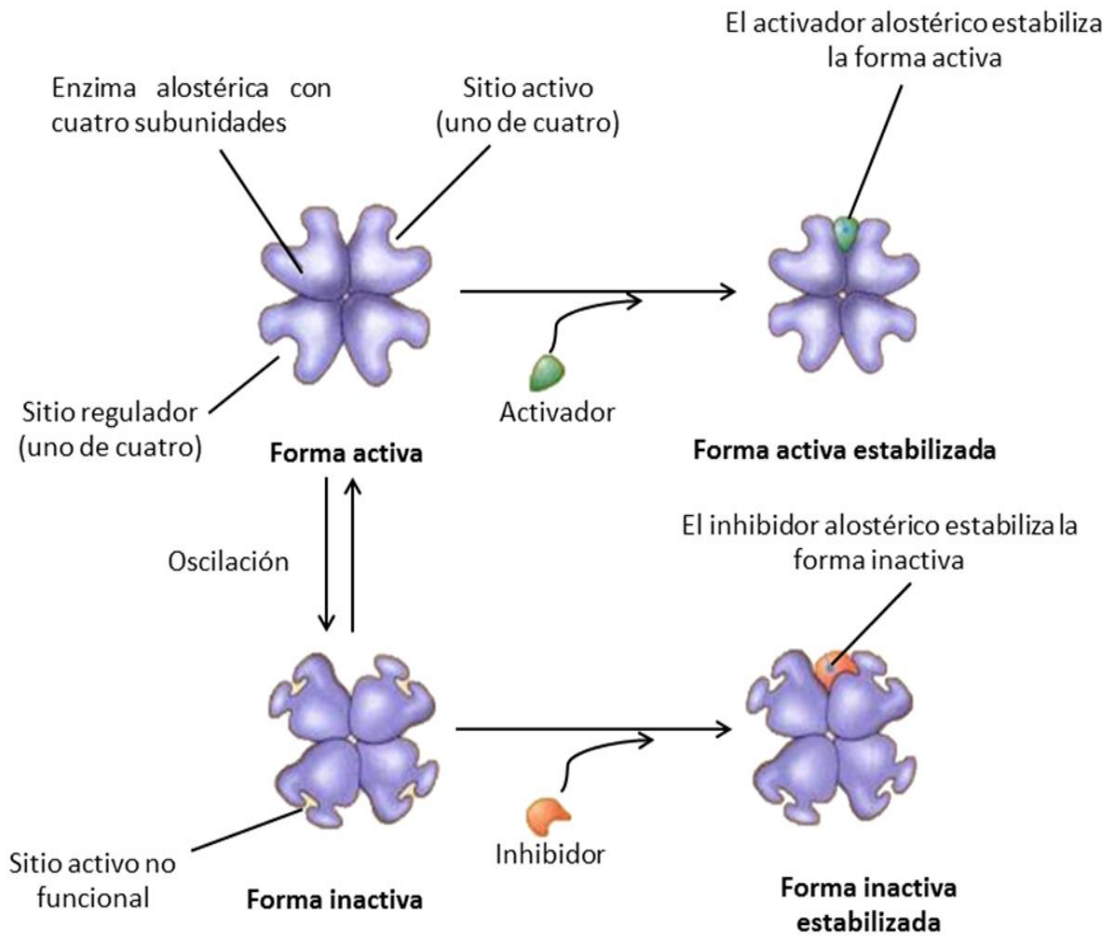
reacción siempre y cuando se incremente la concentración de sustrato hasta que se alcanza una velocidad máxima (Berg *et al.*, 2002).

### Modulación covalente

En esta regulación, la actividad puede aumentarse o disminuirse por alguna reacción covalente, es decir, mediante la adición o remoción de un grupo químico a la enzima. Aunque son varios los grupos que se utilizan en este tipo de regulación, los que se observan con más frecuencia son los grupos fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), los grupos metilo ( $-\text{CH}_3$ ) y la adenosina (Fornaguera y Gómez, 2007).

### Regulación alostérica

Este mecanismo de regulación se produce cuando se unen reversiblemente ciertas sustancias a la enzima, en sitios que son diferentes del sitio activo. Este sitio es específico y se denomina sitio alostérico o regulador (Fornaguera y Gómez, 2007). Esto puede resultar en la inhibición o estimulación de la actividad de la enzima (Campbell y Reece, 2007). La mayor parte de las enzimas reguladas alostéricamente se construyen a partir de dos o más subunidades. Cada subunidad tiene su propio sitio activo. El complejo entero (conjunto de subunidades) oscila entre dos estados conformacionales, uno catalíticamente activo y el otro inactivo. Cuando una molécula reguladora (efector) se une a un sitio regulador (sitio alostérico), puede activar o inhibir la enzima. La unión de un activador a un sitio alostérico, estabiliza la estructura y tiene sitios activos funcionales, mientras que la unión de un inhibidor estabiliza la forma inactiva de la enzima (Figura 8). Las subunidades de una enzima alostérica encajan de modo que un cambio de conformación de una subunidad se transmite a todas las otras. A través de esta interacción de subunidades, una única molécula, activadora o inhibidora, que se une a un sitio regulador, afectará los sitios activos de todas las subunidades (Campbell y Reece, 2007).



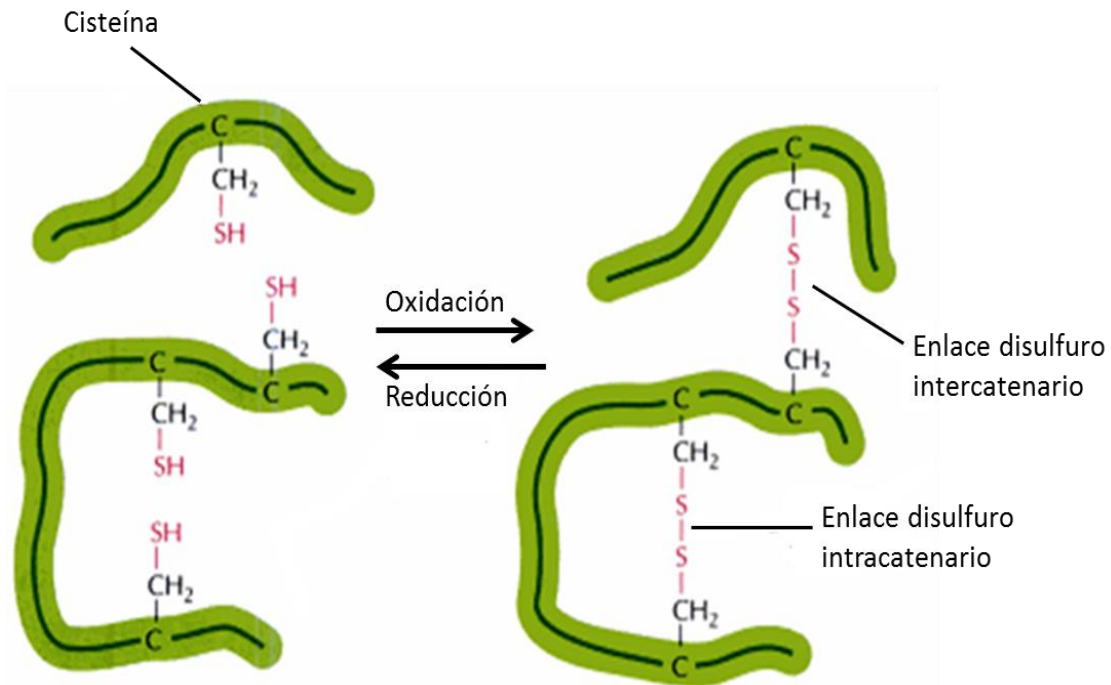
**Figura 8.** Regulación alostérica de enzimas. Las formas activas e inactivas de una enzima dependen de la unión de moléculas reguladoras en un lugar distinto del sitio activo (Campbell y Reece, 2007).

### Regulación óxido-reducción

En las reacciones óxido-reducción redox (redox), además de los electrones ( $e^-$ ), a menudo también se transfieren o se liberan protones ( $H^+$ ). En el caso de las enzimas, la reducción se lleva a cabo por una transferencia de átomos de hidrógeno mientras que la oxidación involucra la pérdida de estos (Kolman y Röhm, 2004). Numerosas enzimas tienen enlaces disulfuro, para la estabilización



de la estructura tridimensional de la enzima. La regulación de este mecanismo en algunas enzimas es través de la oxidación y reducción de enlaces disulfuro. En el proceso de oxidación, un puente disulfuro es formado por dos grupos sulfhidrilo (-SH), cada uno de ellos perteneciente a un residuo de cisteína (Cys), se unen de manera covalente para formar un residuo de Cys. Este enlace disulfuro se puede dar entre dos Cys de la misma enzima (intracatenario) o entre dos Cys de cadenas diferentes (intercatenario). Cuando ocurre el proceso de reducción, el enlace disulfuro se rompe, cambiando su estabilización estructural (Figura 9) (Alberts *et al.*, 2006).



**Figura 9.** Regulación óxido-reducción de enzimas. Se muestran los enlaces disulfuro covalentes entre cadenas laterales de cisteínas adyacentes, en condiciones oxidantes y reductoras (Alberts *et al.*, 2006).

## 2.9 Mecanismos de regulación enzimática de la ADP-glucosa pirofosforilasa

Los primeros estudios sobre la actividad de la AGPasa *in vitro* han reportado que dicha enzima es sensible a efectores alostéricos (Preiss, 1982; Tiessen, 2003). La regulación alostérica de la ADP-glucosa pirofosforilasa se caracteriza por su activación por ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA) un precursor inmediato de la fijación de CO<sub>2</sub>, e inhibición por fosfato inorgánico (Pi). La relación de estos dos efectores alostéricos se cree que desempeñan un papel importante en el control de la biosíntesis de almidón (Tetlow *et al.*, 2003). Este mecanismo es muy importante en la partición de carbono entre sacarosa y almidón, por ejemplo cuando la síntesis de sacarosa se satura por la incapacidad de los órganos fuente para asimilar este hidrato de carbono y convertirla en energía y materia seca, los niveles de triosas fosfato suben y se bajan los niveles de Pi resultando un incremento de 3-PGA ocasionando que la actividad de la AGPasa aumente y, por lo tanto, dirige el flujo de carbono en almidón (Tuncel y Okita, 2013). En órganos de almacenamiento también se ha presentado tal comportamiento, por ejemplo se ha reportado que la regulación de la AGPasa del endospermo de arroz y papa, muestra una activación fuerte por 3-PGA e inhibición por Pi (Sikka *et al.*, 2001). Sin embargo, en ciertos tejidos de almacenamiento, como embriones de chícharo en desarrollo, cotiledones de frijol, y endospermo de trigo la AGPasa tiene una pequeña sensibilidad por la relación 3-PGA/Pi (Sikka *et al.*, 2001; Tetlow *et al.*, 2003). Mientras que en el endospermo de cebada tiene una insensibilidad por la regulación 3-PGA y Pi (Tetlow *et al.*, 2003).

Otros estudios han establecido que la AGPasa está regulada por otros dos mecanismos importantes, como la regulación transcripcional y de óxido-reducción. En la regulación transcripcional, los niveles de transcrito de la AGPasa aumentan por la luz y azúcares y disminuyen por nitrato y fosfato (Tiessen, 2003). El mecanismo de óxido-reducción (redox), consiste en una modificación post-traducciona. Debido a que las primeras investigaciones en extractos de papa se encontró que en la enzima bajo condiciones oxidantes, el residuo Cys82 de la subunidad pequeña, formó puentes disulfuro intramoleculares, produciendo un

dímero inactivo (Tetlow *et al.*, 2004); se observó que la AGPasa se activó mediante ditioneitol (DTT), dicho compuesto reduce los enlaces disulfuro intermoleculares, aumentando la estabilidad térmica de la enzima (Tiessen, 2003). Además de papa, existen reportes que la AGPasa de chicharo y *Arabidopsis* también están sujetos a la regulación redox (Tuncel y Okita, 2013).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa) es considerada como la enzima clave para la biosíntesis de almidón, por ser la encargada de producir adenosin difosfato glucosa, que es la molécula donadora que se necesita para el inicio de la biosíntesis del almidón. Dicha enzima ha sido estudiada en distintas fuentes vegetales; sin embargo, en frutos tropicales la información es limitada. Una especie de interés económico es el plátano macho, por su alto contenido de almidón en estado inmaduro, 70% a 80% de almidón, en base seca. El almidón de plátano se ha caracterizado por presentar propiedades funcionales y nutricionales de interés para diversas industrias, por lo que sin duda la siguiente estrategia es modificar su contenido en el fruto. Comprender el metabolismo de los azúcares que dan inicio la ruta de biosíntesis del almidón, la localización subcelular y los mecanismos implicados en la regulación de la actividad de la AGPasa, ayudará a conocer la mejor la influencia que tiene sobre el contenido de almidón, además de elucidar y ampliar el conocimiento sobre el metabolismo primario de tejidos fuente y demanda. Esta información junto con otros aportes científicos se facilitará el diseño de estrategias de selección y mejoramiento genético para optimizar los rendimientos de almidón en plátano.

#### **4. HIPÓTESIS**

La acumulación progresiva del almidón se debe a la alta concentración de sacarosa y la actividad de la ADP-glucosa pirofosforilasa aumenta durante el desarrollo del fruto de plátano macho. Así mismo, la AGPasa es activada por 3-fosfoglicerato (3-PGA), inhibida por fosfato inorgánico (Pi) y regulada por un mecanismo óxido-reducción.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

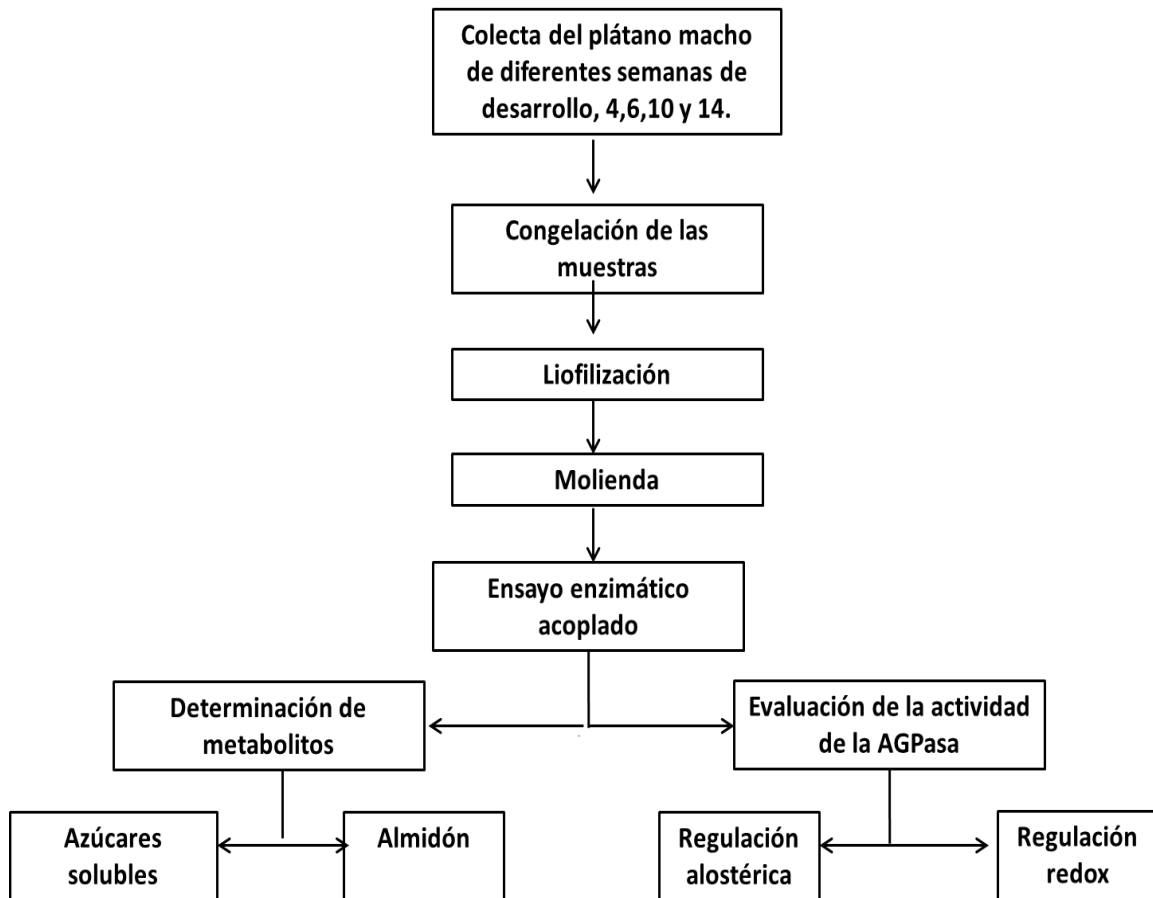
Determinar los niveles de los carbohidratos principales y elucidar la regulación de la actividad de la AGPasa durante el desarrollo del fruto de plátano Macho inmaduro, con el fin de conocer sus mecanismos de activación o inhibición, así como la relación de su actividad con los sustratos y la acumulación del almidón en el fruto.

### 5.2 Objetivos específicos

- ❖ Determinar el contenido de sacarosa, glucosa y fructosa en plátano inmaduro, mediante ensayos enzimáticos acoplados. Relacionar el efecto de los sustratos disponibles sobre la actividad de la AGPasa.
- ❖ Determinar el contenido de almidón en el plátano inmaduro y su relación entre la acumulación masiva de almidón y la actividad total de la AGPasa.
- ❖ Medir la actividad total de la AGPasa en dirección pirofosforolisis durante el desarrollo del fruto, usando un ensayo acoplado a NADPH.
- ❖ Evaluar la actividad de la AGPasa en plátano inmaduro en condiciones reductoras y no reductoras para conocer si la isoenzima del fruto está regulada por el mecanismo redox.
- ❖ Evaluar el efecto del 3-fosfoglicérico (3-PGA) y fosfato inorgánico (Pi) sobre la actividad de la AGPasa de plátano inmaduro, para elucidar si es regulada alostéricamente.

## 6. METODOLOGÍA

En la figura 10 se muestra el diagrama experimental del trabajo de investigación.



**Figura 10.** Diagrama del trabajo experimental.

## 6.1 Material vegetal

El plátano macho (*Musa paradisiaca* L.) en estado inmaduro se colectó en la plantación “Mundo Nuevo” ubicada en el municipio de Tuxtepec, Oaxaca; en el mes de Enero del 2014. Los frutos se colectaron a diferentes semanas de su desarrollo (semana 4, 6, 10 y 14) las cuales se contaron a partir de que fue visible la segunda mano o penca, es decir 2 semanas después de la emergencia de la inflorescencia.

Se estableció el método de la colecta de la siguiente manera: se colectaron 4 réplicas biológicas por cada semana de desarrollo, cada replica biológica estuvo constituida por un “pool” o concentrado de 4 plátanos de 4 plantas diferentes. El fruto se rebanó e inmediatamente se congeló con nitrógeno líquido para detener el metabolismo y por tanto minimizar la entrada de oxígeno a los tejidos. Se guardaron en bolsas de *Glassine* respectivamente etiquetadas y se colocaron en hielo seco para su traslado al laboratorio. En el laboratorio, las muestras se liofilizaron, posteriormente se separó la cáscara y pulpa. Se molió la pulpa y finalmente se almacenaron en tubos *Falcón* a temperatura ambiente para su posterior análisis.

## 6.2 Determinación del contenido de azúcares solubles y almidón en plátano

Se analizó el contenido de azúcares y almidón de acuerdo al método de Ortiz-Vargas (2013). La reacción comienza con la invertasa (Inv) que rompe la molécula de sacarosa en fructosa y glucosa, donde la glucosa es fosforilada por la hexoquinasa (HK) dando lugar a la glucosa-6-fosfato (G6P). También la fructosa es fosforilada por la HK generando fructosa-6-fosfato (F6P) y posteriormente la fosfoglucosa Isomerasa (PGI) la transforma G6P, esta última en presencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) reduce al NADP<sup>+</sup> formando NADPH (Figura 11). La absorbancia obtenida del NADPH a 340 nm generado en la reacción es utilizada para la determinación de los azúcares.

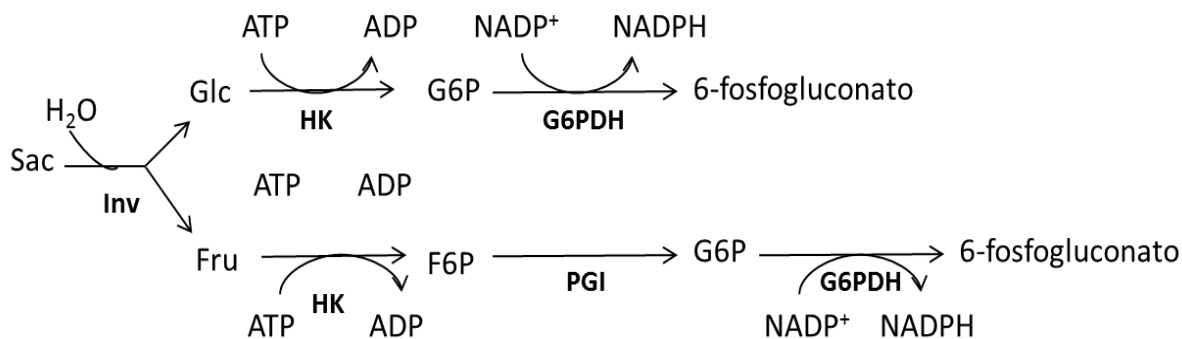


### **6.2.1 Extracción de los azúcares solubles**

Se pesaron 20 mg de muestra liofilizada en una placa tipo “*Deepwell*” de 96 pocillos con 1 ml de capacidad por pozo. Se resuspendió en 500  $\mu$ l de buffer de extracción de azúcares solubles (50 mM Hepes-KOH pH 7.4; 5mM  $MgCl_2$ ; etanol 80% v/v). Se incubó durante 10 min en el termoagitador (Thermomixer compact), con agitación (650-850 rpm). Se centrifugó a 4000 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se coloca en otra placa “*Deepwell*”. Se realiza una segunda extracción, a la pastilla se procesó nuevamente con los pasos anteriores, juntando los sobrenadantes con el primero. La pastilla resultante de la extracción etanolica, se utilizó para la determinación de almidón.

### **6.2.2 Determinación de azúcares solubles**

Se colocaron 20  $\mu$ l de extracto y 200  $\mu$ l de solución para ensayo de azúcares (12 mg NADP, 20 mg ATP, 20  $\mu$ l G6PDH [Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase from yeast grade II, Roche] en 19.8 ml Hepes-KOH pH 7 +  $MgCl_2$ ). La placa se agitó y se realizaron 5 lecturas de absorbancia a 340 nm (absorbancias blanco). Luego se retiró del lector de microplacas (Synergy II, Biotek) y se determinó el contenido de glucosa con la adición de 2  $\mu$ l hexoquinasa y se leyó la absorbancia a 340 nm cada dos minutos (absorbancia HK) hasta que la absorbancia fue constante. Se retiró la microplaca y se adicionaron 2  $\mu$ l de fosfoglucoisomerasa PGI, (phosphoglucose-isomerase from yeast; Roche) para la determinación de fructosa y se leyó la absorbancia a 340 nm cada dos minutos (absorbancia PGI), hasta que el valor de absorbancia fue constante. Se retiró la placa y finalmente para la determinación de sacarosa se le adicionaron 2  $\mu$ l de la enzima invertasa y se leyó la absorbancia 340 nm (absorbancia Inv) hasta que la absorbancia fue constante. Durante la determinación de los azúcares ocurren las siguientes reacciones (Figura 11):



**Figura 11.** Sistema de enzimas acopladas para la determinación de los azúcares solubles (Ortiz-Vargas, 2013).

Para determinar los micromoles de los azúcares presentes en cada gramo de peso seco de muestra ( $\mu\text{mol/gPS}$ ) se realizaron los cálculos con la ecuación 1:

$$\text{Glucosa o fructosa} \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{g PS}} \right) = \frac{\Delta\text{Abs}(\text{OD340})}{17.7 \mu\text{mol}^{-1}} * \frac{\text{Vol.Total extracto} (\mu\text{l})}{\text{Vol.Extracto} (\mu\text{l})} * \frac{\text{Factor de dilución}}{\text{Peso muestra}} * \frac{1000\text{mg}}{1\text{g}}$$

Ec.1 (Ortiz-Vargas, 2013).

**Dónde:**

**$\Delta\text{abs}$** = Para glucosa (Absorbancia HK- Absorbancia blanco), para fructosa (Absorbancia PGI- Absorbancia HK), para sacarosa (Absorbancia Inv- Absorbancia PGI)

**17.7**= Coeficiente de extinción de NADPH para una placa de 96 pozos.

**Vol. extracto**= Volumen de extracto ensayado en la placa (20  $\mu\text{l}$ )

**Vol. extracto total**= Volumen total de extracción de azúcares (2000  $\mu\text{l}$ )

**PS**= Peso seco de la muestra (20 mg).

Para el cálculo de sacarosa se utiliza la ecuación 1 pero el valor final se multiplica por el factor de 0.5 (Ecuación 2), ya que la reacción que ocurre en el proceso de determinación de azúcares, la invertasa hidroliza la sacarosa en glucosa y

fructosa, lo que al final genera un doble NADPH obteniéndose un valor doble de absorbancia.

$$\text{Sacarosa} \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{g PS}} \right) = \left( \frac{\Delta\text{Abs}(\text{OD340})}{17.7 \mu\text{mol}^{-1}} * \frac{\text{VolTotal extracto} (\mu\text{l})}{\text{VolExtracto} (\mu\text{l})} * \frac{\text{Factor de dilución}}{\text{Peso muestra}} * \frac{1000\text{mg}}{1\text{g}} \right) * (0.5)$$

Ec. 2 (Ortiz-Vargas, 2013).

### 6.2.3 Determinación del almidón

La pastilla resultante de la extracción de azúcares, se resuspendió en 500  $\mu\text{l}$  de 10 mM KOH (esto se realizó en la placa tipo “*Deepwell*” donde estaba reservada la pastilla) y se incubó en una estufa a 99°C por 1 h. Se llevó a una autoclave a 120°C por 30 min. Este paso es necesario para desnaturalizar los gránulos de almidón y facilitar la degradación enzimática. Después de enfriar en hielo, se le adicionaron 500  $\mu\text{l}$  buffer de acetato (50 mM Na-acetato pH 5-se ajusta con ácido acético). En una microplaca se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de solución de degradación de almidón no diluida (17 mg de amiloglucosidasa [59.9 U/mg Fluka 10115] 20 mg  $\alpha$ -amilasa [Type VI-B. 25 U/mg, Fluka 10070] 20mg  $\alpha$ -amilasa [Bacillus, 55 U/mg, Fluka 10070] en 10 ml de buffer de acetato [50 mM Na-acetato pH 5]). Se incubó a 37°C toda la noche (8-16 h). Luego se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. Posteriormente se colocó el sobrenadante en una nueva placa. La pastilla se resuspendió nuevamente en 200  $\mu\text{l}$  de solución de degradación no diluida, se incubó a 37°C por 30 min y luego se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se mezcló con el obtenido anteriormente. El cálculo de los micromoles de glucosa liberados a partir del almidón se realizó de la misma manera que en la determinación de azúcares solubles.

### 6.3 Evaluación de la actividad de la AGPasa

La extracción y medición de la actividad de la AGPasa se realizó esencialmente de acuerdo al método descrito por Tiessen *et al.* (2002). El ensayo de la actividad de la AGPasa se realizó en dirección opuesta (pirofosforolisis) (Figura 12):



**Figura 12.** Sistema de enzimas acopladas para determinar la actividad de la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa). La AGPasa actúa sobre el ADP-glucosa para generar glucosa-1-fosfato (G1P), que finalmente con la fosfoglucomutasa (PGM) y G6PDH producen 6-fosfogluconato reduciendo al NADP<sup>+</sup> a NADPH (Tiessen *et al.*, 2002).

### 6.3.1 Extracción de la AGPasa

Se pesaron 50 mg de muestra en tubos eppendorf de 1.5 ml y se les adicionaron 500 µl de buffer de extracción (50mM Hepes-KOH pH 7.8 y 5 mM MgCl<sub>2</sub>). Después se centrifugaron a 13000 rpm durante 1.5 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante (extracto) para la evaluación de la actividad de la AGPasa.

### 6.3.2 Evaluación de la actividad de la AGPasa en presencia del agente reductor ditioneitol (DTT)

En una microplaca de 96 pozos se adicionaron 200 µl de buffer de ensayo (50 mM Hepes-KOH pH 7.8 y 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µM Glucosa-1,6-bifosfato, 0.6 mM NADP, 2.5 U/ml de G6PDH, 1 U/ml PGM), 5µl de 100 mM NaPPi (Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) y 10µl ADP-glucosa a diferentes concentraciones (200 µM, 400 µM, 600 µM y 1000 µM), se adicionó 10 µl de 200 mM DTT y finalmente 10 µl de extracto.

La medición se realizó en un lector de microplacas (Biotek), durante 30 min, usando el programa Gen5. La actividad de la AGPasa se calculó, con el valor de la absorbancia a 340 nm que corresponde a la velocidad máxima en que un mol de ADP-glucosa es convertida a glucosa-1-fosfato por min, y que estequiómetricamente libera un NADPH al final de la reacción. Para calcular la actividad de la enzima en µmol/gPS\*min se utilizó la ecuación 3:

$$\text{Actividad AGPasa} \frac{\mu\text{mol}}{\text{g PS}} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$= \frac{V_{\text{max}}(\text{OD340} \cdot \text{min}^{-1})}{17.7 \mu\text{mol}^{-1}} * \frac{\text{Vol. Total extracto } (\mu\text{l})}{\text{Vol. extracto } (\mu\text{l})} * \frac{\text{Factor de dilución}}{\text{Peso muestra (mg PS)}} * \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}}$$

Ec. 3 (Tiessen *et al.*, 2002).

### 6.3.3 Evaluación de la actividad de la AGPasa mediante la presencia de 3-fosfoglicerato (3-PGA) y fosfato inorgánico (Pi)

Se preparó la microplaca con 200  $\mu\text{l}$  de buffer de ensayo (50 mM Hepes-KOH pH 7.8 y 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu\text{M}$  Glucosa-1,6-bifosfato, 0.6 mM NADP, 2.5 U/ml de G6PDH, 1 U/ml PGM), 5  $\mu\text{l}$  de 100 mM NaPPi ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) y 10  $\mu\text{l}$  ADP-glucosa a diferentes concentraciones (200  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$  y 1000  $\mu\text{M}$ ) y se le adicionó 0.3 mM 3-PGA (D-(-)-3-Phosphoglyceric acid disodium salt; Sigma P8877) y 1.2 mM Pi (monobasic sodium phosphate monohydrate; Sigma S9638) (que son concentraciones estimadas en el amiloplasto, de acuerdo a Tiessen *et al.* 2002), y 10  $\mu\text{l}$  de extracto. La medición de la actividad de la AGPasa se realizó de la misma forma que el análisis anterior. La adición del extracto en la microplaca se realizó en un tiempo de 2:5 min.

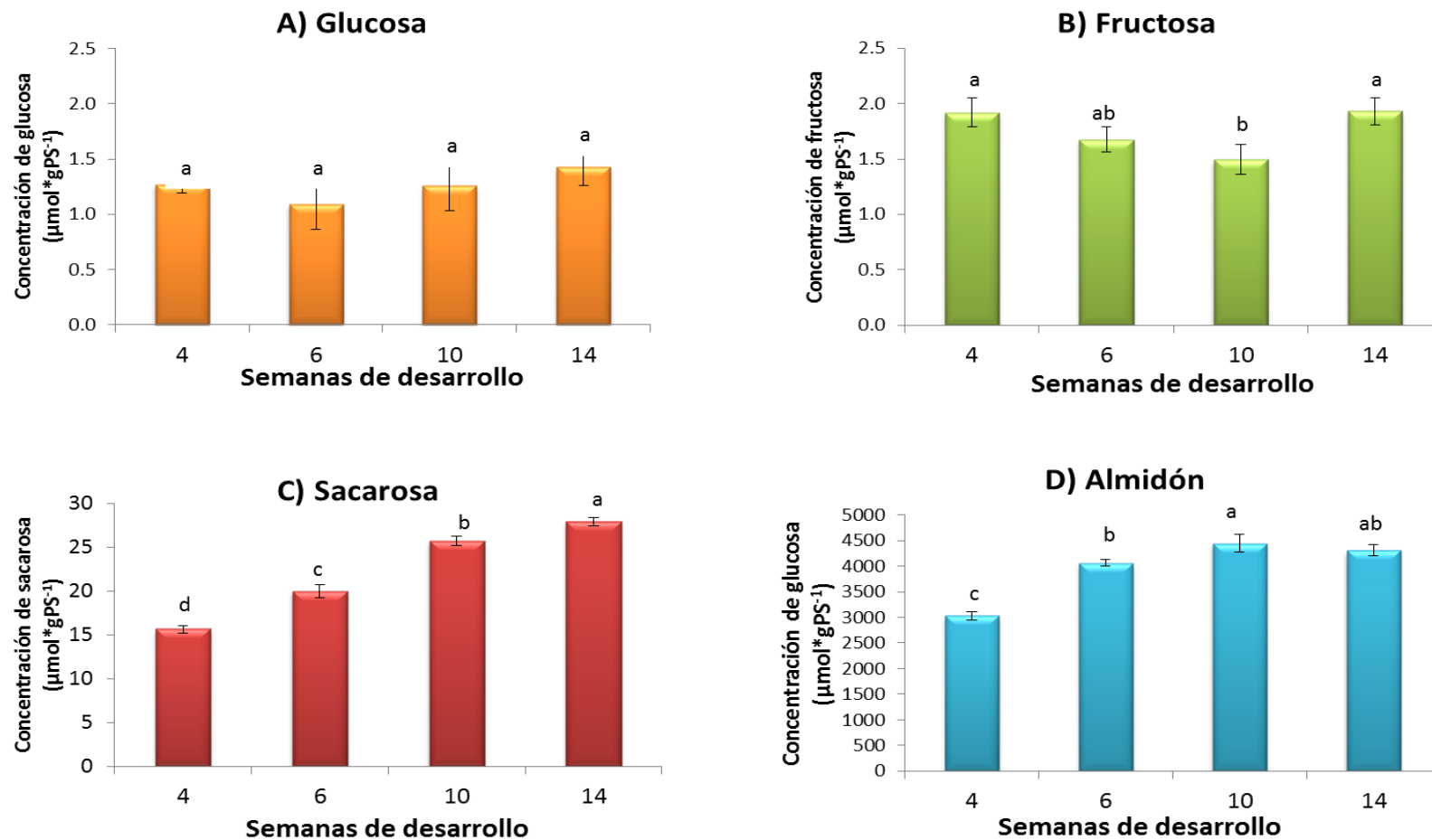
#### **6.4 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos referentes al contenido de azúcares solubles, almidón, y actividad enzimática, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 5% ( $\alpha=0.05$ ). Cuando se encontraron diferencias estadísticas significativas se utilizó el método TUKEY de comparación de medias mediante la prueba DMS= diferencia mínima significativa. Esto a través del programa estadístico "R" versión 3.0 (R Development Core Team, R., 2008).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Contenido de azúcares solubles y almidón

Los azúcares, están involucrados en la regulación del desarrollo de las plantas, debido a la producción de sustratos metabólicos (Roitsh y González, 2004) y porque generan señales metabólicas que afectan a la expresión de diferentes genes; por ejemplo: las hexosas favorecen la división y proliferación celular, mientras que la sacarosa favorece la diferenciación y maduración (Koch, 2004). En la figura 13 se muestra el contenido de azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) y almidón presentes en la pulpa de plátano macho a diferentes semanas de desarrollo (4, 6, 10 y 14) (Figura 13 A-D). El contenido de glucosa y fructosa fue menor, 1.2 a 1.4  $\mu\text{mol/gPS}$  y de 1.4 a 1.9  $\mu\text{mol/gPS}$  respectivamente (Figura 13 A y B) comparado con el contenido de sacarosa a las cuatro semanas de desarrollo (15 a 28  $\mu\text{mol/gPS}$ ) (Figura 13C). El comportamiento en el contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en el plátano fue similar a la reportada del endospermo de arroz y de maíz, la glucosa (10.1-116  $\mu\text{g/mgPS}$  y 0-117  $\text{mg/gPS}$  respectivamente) y fructosa (5.1-83  $\mu\text{g/mgPS}$  y 0-86  $\text{mg/gPS}$ , respectivamente) se encontraban en pequeñas cantidades y la sacarosa (207-649  $\mu\text{g/mgPS}$  y 19-229  $\text{mg/gPS}$ , respectivamente) en mayor proporción durante el desarrollo del endospermo (Nakamura y Yuki, 1992; Doehlert y Kuo, 1993). Este comportamiento puede deberse a que la sacarosa es el principal metabolito sintetizado en órganos fuente de las plantas, y es transportada a través del floema hacia los órganos sumidero (frutos) (Chiou y Bush, 1998; Tofiño *et al.*, 2007), proporcionando la fuente de carbono, para su desarrollo. Esto indica que la sacarosa está implicada en la regulación de productos de almacenamiento como es la biosíntesis del almidón (Rolland *et al.* 2006; Aoki *et al.* 2012). Esto explica el aumento en el contenido de sacarosa con las semanas de desarrollo.

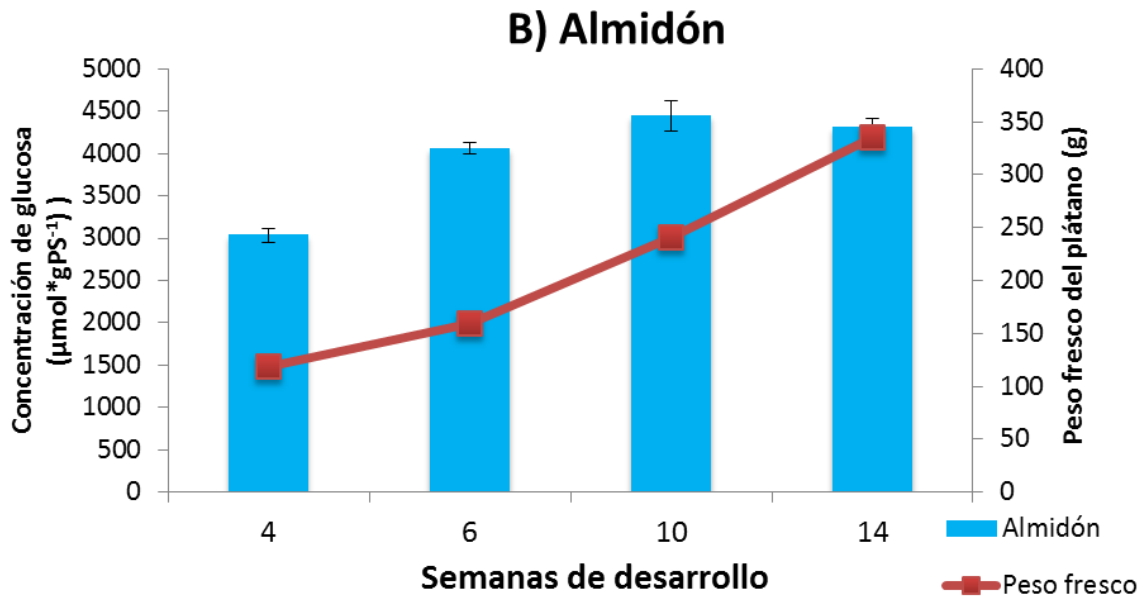
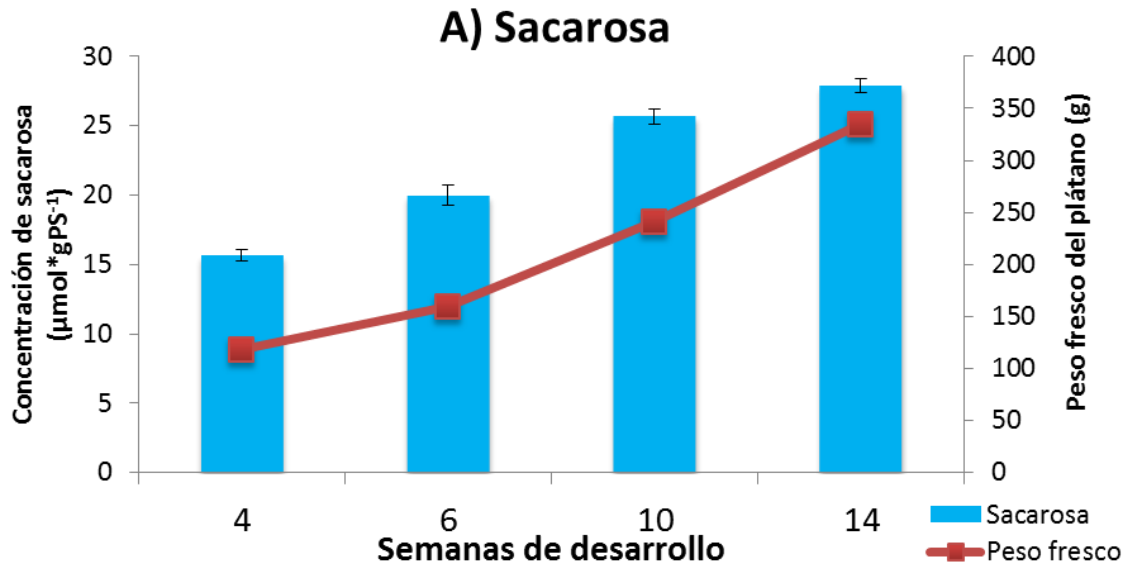


**Figura 13.** Contenido de azúcares solubles y almidón durante el desarrollo del plátano macho. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar ( $n=4$ ). Letras diferentes representan diferencias mínimas significativas ( $p \leq 0.05$ , prueba DSM).



Por otro lado, el bajo contenido de glucosa y fructosa en el plátano puede deberse a que estos azúcares son productos intermediarios entre la hidrólisis de la sacarosa, glicolisis y biosíntesis del almidón, por lo que no se acumulan. Es decir, en la medida que son producidos, son inmediatamente utilizados como sustratos para generar las glucosas fosforiladas necesarias para la síntesis de almidón. Kumar y Singh, (1981) reportaron que durante el desarrollo del endospermo de trigo, en los primeros 14 días de desarrollo (después de la anthesis), se acumularon azúcares reductores, pero a partir del día 14 de desarrollo el contenido de almidón comenzó a aumentar y los azúcares reductores tendieron a disminuir hasta mantenerse constantes (26.8- 6.7 mg/g PS) por esto sugirieron que son utilizados en la síntesis de almidón.

En este estudio, el contenido de almidón incrementó en función de las semanas de desarrollo, obteniendo valores de 3033  $\mu\text{mol/gPS}$ , 4064  $\mu\text{mol/gPS}$ , 4448  $\mu\text{mol/gPS}$  y 4310  $\mu\text{mol/gPS}$  de glucosa, para la semana 4, 6, 10 y 14, respectivamente; y en la semana 14, ya no se observó aumento significativo (Figura 13D). La síntesis de almidón tiene relación con el contenido de sacarosa, que también ésta en función del desarrollo del fruto, así mismo se ve reflejado con el peso fresco del plátano (Figura 14). Se conoce que partir de sacarosa se generan las hexosas fosfato para el comienzo de la biosíntesis del almidón (Rolland *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2013). Contrario a este estudio en plátano, el contenido de sacarosa en papa disminuyó mientras que el almidón aumentó (Tiessen *et al.*, 2002); esta diferencia podría ser debido a que el plátano es un órgano fotosintético (Azcón-Bieto y Talón, 2008) y la papa no lo es (Tiessen, 2003). Es decir, además de los fotoasimilados generados por las hojas, también podrían ser producidos en la cáscara del plátano, por ello la sacarosa podría ser acumulada en la pulpa. Se ha reportado que en la cáscara y pulpa se incrementa la concentración de carbohidratos durante el proceso de llenado de los frutos, debido a que la síntesis de almidón se encuentra activa (Morales *et al.*, 1998).



**Figura 14.** Relación del contenido de sacarosa y almidón con el peso fresco del plátano macho durante su desarrollo. Los valores representan la media ± error estándar (n=4).

Los resultados del contenido del almidón en el plátano coinciden con otros estudios, ya que se ha reportado que durante el llenado del fruto ocurre una acumulación progresiva de almidón hasta que el fruto alcanza la madurez fisiológica de cosecha (Arcila *et al.*, 2002; Shiga *et al.*, 2011), El incremento en el contenido de almidón se ve reflejado en el peso y diámetro del fruto, ya que a medida que transcurren las semanas de desarrollo, estas dos variables incrementan, (118 g y 11 cm, 159 g y 12 cm, 241 g y 14 cm, y 335 g 15 cm para la semana 4, 6, 10 y 14 de desarrollo, respectivamente) (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Características físicas de los plátanos con cáscara. Peso, longitud y diámetro promedio del plátano macho a diferentes semana de desarrollo.

	Semanas de desarrollo			
	4	6	10	14
Peso fresco (g)	118± 2.18d	159± 2.92c	241 ± 5.28b	335 ± 13.04a
Longitud (cm)	25 ± 0.41b	25 ± 0.3b	25 ± 0.3b	27 ± 0.25a
Diámetro (cm)	11 ± 0.1d	12 ± 0.12c	14 ± 0.12b	15 ± 0.13a

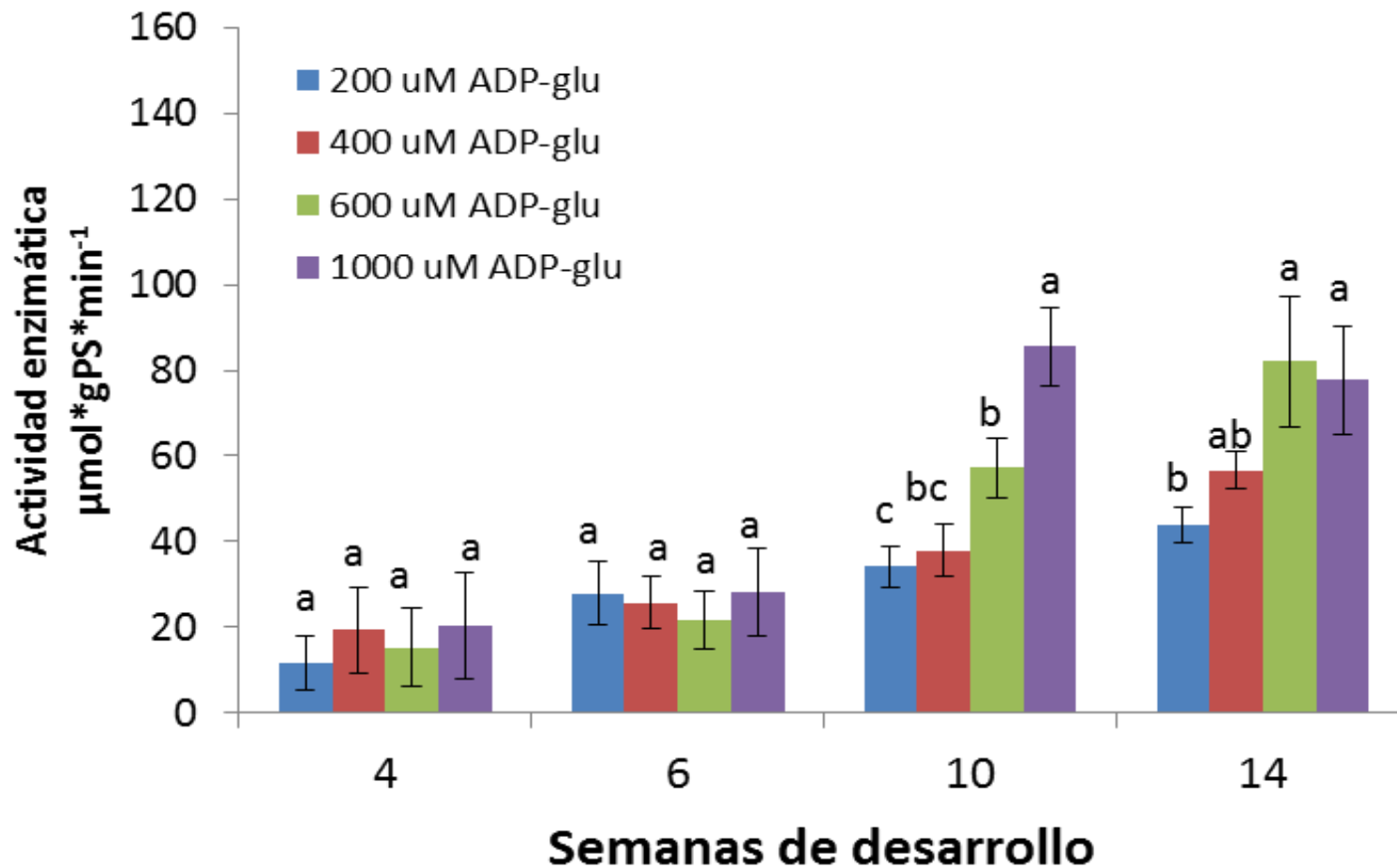
Media ± error estándar (n=16)

Valores con diferente letra en una misma columna son estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ , prueba DSM).

## **7.2 Evaluación de la actividad de la AGPasa**

### **7.2.1 Evaluación de la actividad de la AGPasa mediante diferentes concentraciones de ADP-glucosa**

En la figura 15 se muestra el efecto de la concentración de ADP-glucosa sobre la actividad de la AGPasa del plátano. El aumento de la concentración de ADP-glucosa no tuvo efecto sobre la actividad de la AGPasa del plátano para la semana 4 y 6 de desarrollo, ya que no se observó diferencias estadísticamente significativas. Mientras que en la semana 10 y 14 se observó que la actividad de la AGPasa aumentó conforme incrementaba la concentración de ADP-glucosa. Se conoce que a medida que se aumenta la concentración de sustrato, incrementa la actividad de la enzima, debido a que las moléculas de enzima se unen a las moléculas de sustrato y lo convierte en producto, hasta alcanzar una velocidad máxima (Alberts *et al.*, 2004). La velocidad máxima es una medida relativa de la concentración de enzima presente, expresada en términos de su capacidad catalítica por ello cuando la concentración de enzima es más bajo que de sustrato, la velocidad de reacción es baja ocasionando una baja concentración de producto ya que la tendencia del sustrato a ocupar el centro activo es despreciable (McGilvery, 1977), esto podría explicar que no hay efecto del ADP-glucosa en la semana 4 y 6 de desarrollo.

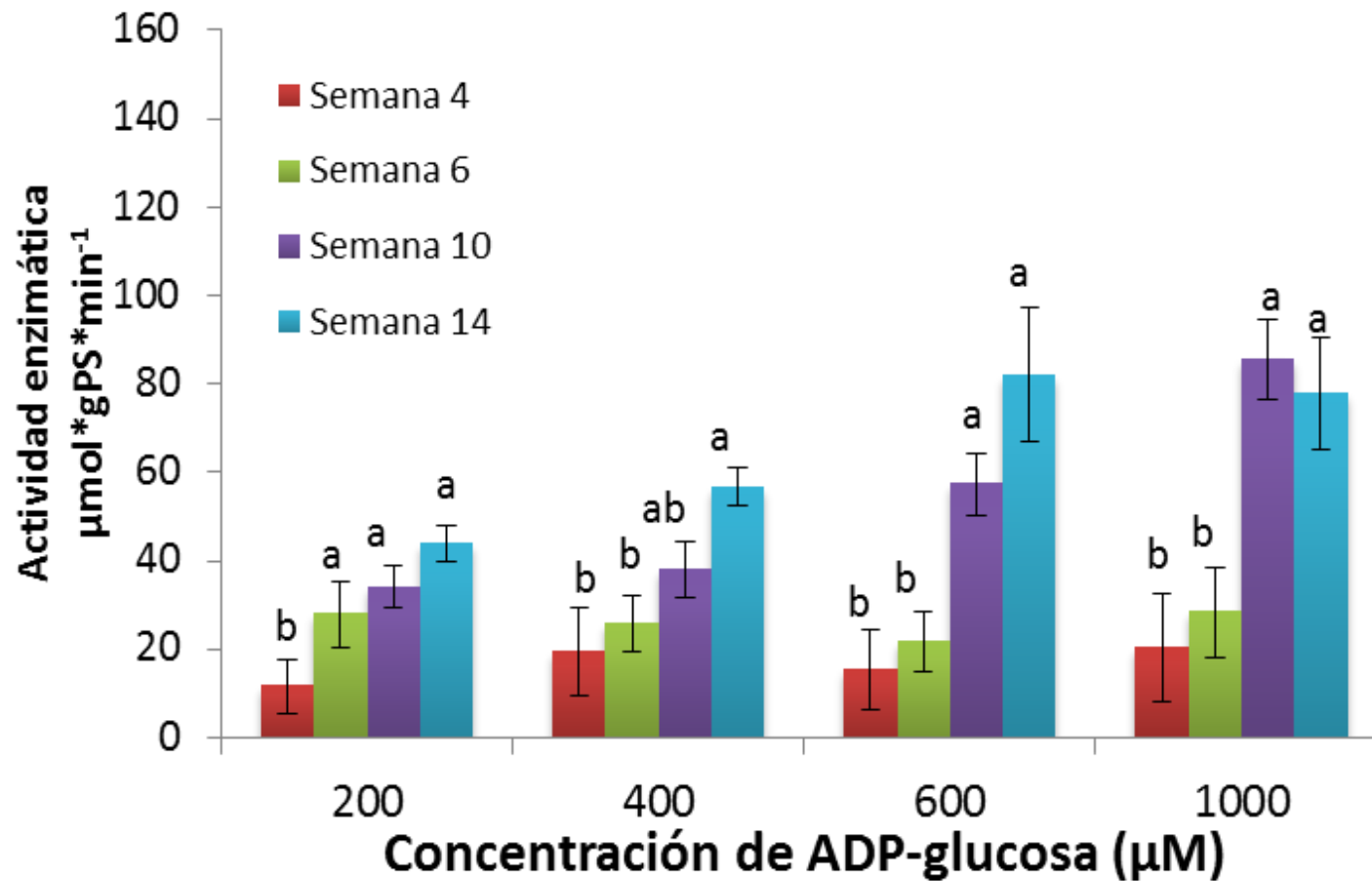


**Figura 15.** Efecto de la concentración de ADP-glucosa sobre la actividad de la AGPasa en plátano macho inmaduro a diferentes semanas de desarrollo. El ensayo se realizó sin ditioteitol. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar ( $n=4$ ). Letras diferentes representan diferencias significativas en cada semana de desarrollo ( $p \leq 0.05$ , prueba DSM).

También se muestra las diferencias significativas de la actividad de la AGPasa comparando las semanas de desarrollo por cada concentración de ADP-glucosa (Figura 16). Los valores de la actividad de la AGPasa de plátano en la semana 4 y 6 son bajos en comparación a la semana 10 y 14. Este resultado parece tener una relación con la cantidad de almidón presente en las distintas semanas de desarrollo del plátano (Figura 13D), ya que a medida que aumenta la actividad de la AGPasa incrementa la cantidad de almidón. Este comportamiento fue similar al reportado por da Mota *et al.*, (2002), que encontraron que hay un incremento en el contenido de almidón en plátano (*Musa acuminata*) a las 11 semanas de desarrollo (80 días después de la floración), así como también un aumento en la actividad enzimática de fosforilasas.

La baja actividad de la AGPasa en las primeras semanas de desarrollo (semanas 4 y 6) del plátano coincide con un estudio en arroz; Nakamura y Yuki, (1992), reportaron que la actividad de la AGPasa en el endospermo de arroz fue baja en los primeros días de su desarrollo, e incrementó considerablemente a partir de los 13 días después de la polinización. Así mismo atribuyen el incremento de la actividad de la AGPasa con el aumento del contenido de almidón.

Por otra parte se observó que con la concentración de 200  $\mu\text{M}$  de ADP-glucosa, la actividad fue diferente entre la semana 4 y la semana 6, 10 y 14, ya que en estas últimas fueron mayores respecto a la semana 4 pero entre ellas no mostraron diferencias significativas. Mientras que con la concentración 400  $\mu\text{M}$  y 600  $\mu\text{M}$  en la semana 14 mostró mayor actividad respecto a la semana 4 y 6. Para la concentración 1000  $\mu\text{M}$  de ADP-glucosa la actividad de la AGPasa de la semana 4 y 6 fue menor respecto a la semana 10 y 14.



**Figura 16.** Actividad de la AGPasa en las diferentes semanas de desarrollo de plátano macho inmaduro a diferentes concentraciones de ADP-glucosa sin ditioteitrol. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar (n=4). Letras diferentes representan diferencias significativas para una misma concentración de ADP-glucosa ( $p \leq 0.05$ , prueba DSM).

## 7.2.2 Evaluación de la actividad de la AGPasa por el mecanismo de óxido-reducción

Se realizó el análisis de la actividad de la AGPasa en condiciones reductoras y no reductoras, con y sin la adición de un agente reductor: ditioneitol (DTT). Se observó que el DTT no mostró efecto significativo sobre la actividad enzimática en la semana 4 y 6 con las diferentes concentraciones de ADP-glucosa (200  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$  y 1000  $\mu\text{M}$ ) (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Actividad AGPasa en plátano macho inmaduro a diferentes semanas de desarrollo.

Tiempo de desarrollo (Semanas)	ADP glucosa ( $\mu\text{M}$ )	Actividad AGPasa ( $\mu\text{mol}\cdot\text{gPS}\cdot\text{min}^{-1}$ )	
		Sin DTT	Con DTT
4	200	11.5 <sup>aA</sup>	15.0 <sup>aA</sup>
	400	19.4 <sup>aA</sup>	13.8 <sup>aA</sup>
	600	15.3 <sup>aA</sup>	24.1 <sup>aA</sup>
	1000	20.3 <sup>aA</sup>	23.2 <sup>a</sup>
6	200	27.9 <sup>aA</sup>	11.6 <sup>aAB</sup>
	400	25.8 <sup>aA</sup>	18.5 <sup>aAB</sup>
	600	21.7 <sup>aA</sup>	9.6 <sup>aB</sup>
	1000	28.3 <sup>aA</sup>	28.1 <sup>aA</sup>
10	200	34.1 <sup>aC</sup>	42.0 <sup>aB</sup>
	400	37.9 <sup>bBC</sup>	58.8 <sup>aB</sup>
	600	57.3 <sup>aB</sup>	65.8 <sup>aB</sup>
	1000	85.5 <sup>aA</sup>	110.5 <sup>aA</sup>
14	200	43.8 <sup>aB</sup>	43.2 <sup>aC</sup>
	400	56.7 <sup>aAB</sup>	71.1 <sup>aB</sup>
	600	82.0 <sup>aA</sup>	90.8 <sup>aB</sup>
	1000	77.8 <sup>bA</sup>	130.1 <sup>aA</sup>

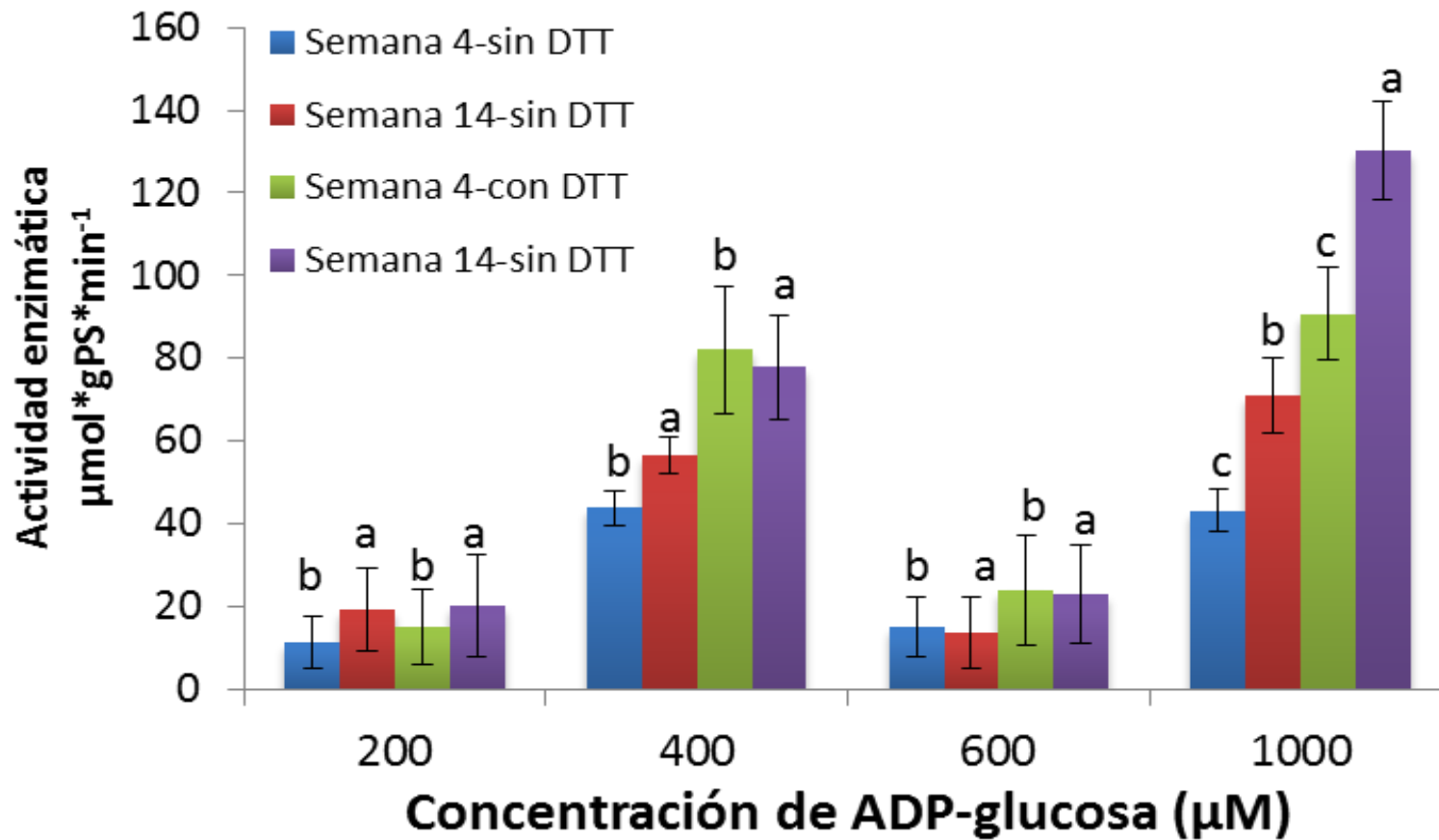
Para realizar la comparación del cambio de la actividad por el mecanismo óxido-reducción, se tomaron los valores de actividad de la AGPasa sin DTT de la figura 15. Letras minúsculas diferentes en la misma fila en cada muestra, representan diferencias mínimas significativas. Letras mayúsculas diferentes en cada columna representan diferencias mínimas significativas en cada muestra sin y con DTT a diferentes concentraciones de ADP-glucosa.



La semana 10 mostró un aumento de su actividad considerable del 55%, con la adición del DTT a una concentración de 400  $\mu\text{M}$  de ADP-glucosa y para la semana 14 un aumento del 67% de su actividad con la concentración de 1000  $\mu\text{M}$  de ADP-glucosa (Cuadro 4).

Dado a los resultados obtenidos en la actividad de la AGPasa, se puede inferir que la AGPasa de plátano no es regulada todo el tiempo por el mismo mecanismo de óxido-reducción. Por ejemplo, en la semana 6 se observó una disminución de la actividad por DTT, mientras que en la semana 10 y 14 hubo un aumento en su actividad por redox. Se ha reportado que la AGPasa del tubérculo en condiciones reductoras forma monómeros activos y en condiciones oxidantes forma un dímero inactivo, es decir tiene interacciones puente disulfuro que une las dos pequeñas subunidades por un residuo de cisteína (Fu *et al.*, 1998; Tiessen, 2003; Ballicora *et al.*, 2004). Sin embargo, además del mecanismo redox, también se ha reportado que la AGPasa puede ser fosforilada (Huber y Hardin, 2004; Kötting *et al.*, 2010) lo que pudiera indicar que durante una etapa se active y en otra se inhiba. Se sabe también que en diferentes tejidos y especies, la actividad de la AGPasa se comporta de forma diferente con relación al efecto por DTT y 3-PGA, y que a veces es necesario hacer una extracción especial con 10% ácido tricloroacético (TCA) en éter para analizar los estados monoméricos/diméricos de la proteína desnaturalizada en geles de poliacrilamida en presencia de duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) no reductores (Hendriks *et al.*, 2003), posiblemente por la presencia de efectores desconocidos en los extractos de tejidos verdes (Axel Tiessen comunicación personal, Noviembre 7, 2014).

Se comparó la actividad de la AGPasa de la semana 4 con la semana 14 sin y con DTT (Figura 17) y se observó que la actividad de la AGPasa cambió no por el DTT si no por la semana de desarrollo, lo que indicaría que la concentración de enzima cambia durante el desarrollo del plátano, presentando un comportamiento diferente.



**Figura 17.** Actividad de la AGPasa en la semana 4 y 14 de desarrollo de plátano macho a diferentes concentraciones de ADP-glucosa. Se realizó una comparación de la actividad sin y con DTT para cada semana. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar (n=4). Letras diferentes representan diferencias significativas para una misma concentración de ADP-glucosa ( $p \leq 0.05$ , prueba DSM).

Existen reportes de que en tejidos fotosintéticos la reducción podría desempeñar un papel en la regulación de la AGPasa mediada por el sistema de Ferredoxina-tiorredoxina (Ballicora *et al.*, 2004); Geingenberger *et al.*, 2005), ya que este sistema reduce enzimas específicos en presencia de luz. Es decir la tiorredoxina es una proteína que facilita la reducción de otras enzimas a través de un intercambio tiol-disulfuro (convierte -S-S- en -SH HS-) en la cisteína como por ejemplo la AGPasa, de esta forma se promueve su activación (Taiz y Zeiger, 2006). Este sistema se encuentra en los cloroplastos, el cual se podría decir que la tiorredoxina reduce u oxida la AGPasa cloroplástica durante el ciclo de luz/oscuridad, proporcionando así una regulación de la síntesis de almidón transitorio en los plastidios.

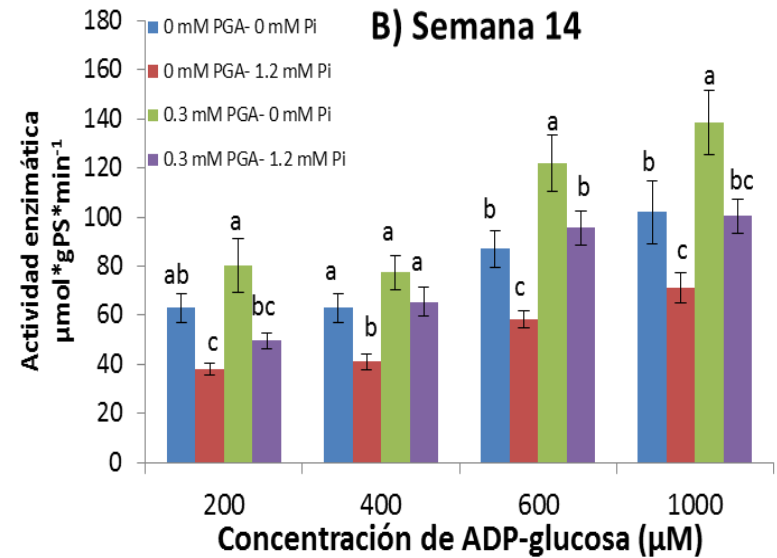
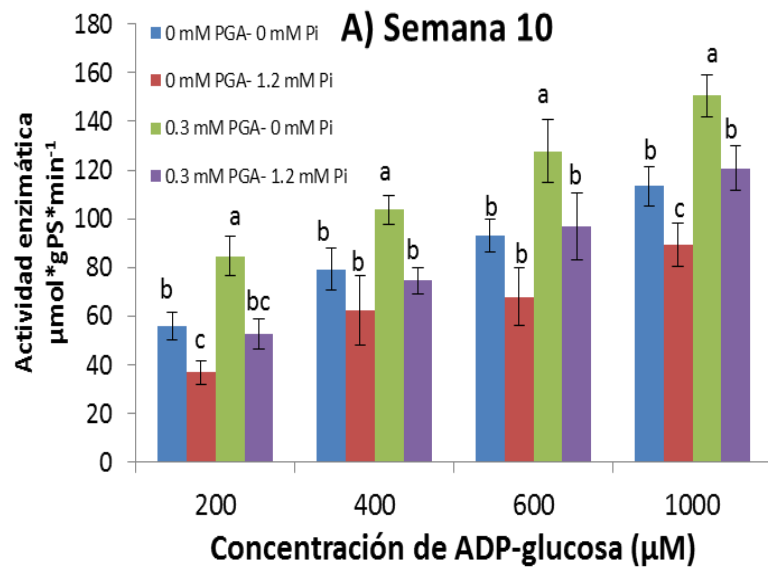
En el caso de la AGPasa del amiloplasto, podría estar regulada por la vía de las pentosas que genera poder reductor NADPH, en un proceso de luz-independiente (Ballicora *et al.*, 2004) el NADPH es utilizado para la reducción de los puentes de disulfuro presentes en los residuos de cisteína que se encuentran en la AGPasa. Sin embargo los resultados de este estudio sugieren que la AGPasa mayoritaria del plátano podría ser una AGPasa citosólica, ya que se ha reportado que la isoforma citosólica de AGPasa de las monocotiledóneas no presenta el residuo de Cys82 y Cys12, que son los residuos de cisteína presentes en la AGPasa de papa, los cuales forman los puentes de disulfuro intramoleculares entre las subunidades pequeñas en condiciones oxidantes (Ballicora *et al.*, 2004; Tetlow *et al.*, 2004). Por ello este tipo de regulación sucede solo para la AGPasa plastidial.

### 7.2.3 Evaluación de la actividad de la AGPasa mediante la presencia de 3-PGA y Pi

El efecto de 3-fosfoglicerato (3-PGA) y fosfato inorgánico (Pi) sobre la actividad de la AGPasa se evaluó en las muestras de plátano de la semana 10 y 14 (Figura 18), debido a que a estos tiempos se presentó la mayor actividad de la enzima.

En la semana 10, como en los resultados anteriores la actividad incrementó conforme aumentó la concentración de ADP-glucosa, y cuando se le adicionó Pi se obtuvo una disminución significativa de la actividad de la AGPasa con las concentraciones de 200 y 1000  $\mu\text{M}$  ADP glucosa ( $36.8 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$ , y  $89.4 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$ , respectivamente) comparadas con las que no tienen efectores a las mismas concentraciones de ADP-glucosa ( $55.8 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$  y  $113.4 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$ , respectivamente). Pero la actividad de la AGPasa con este efector incrementó conforme aumentaba la concentración de ADP-glucosa ya que cuando la concentración de sustrato aumenta, la reacción va más rápida (McGilvery, 1977) sin embargo la actividad de la AGPasa es más baja en comparación a las muestras que no tienen Pi.

Cuando se adicionó 3-PGA se observó un aumento significativo de la actividad de la AGPasa con todas las concentraciones de ADP glucosa analizadas, ya que de  $55.8 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $79.2 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $93 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$  y  $113.4 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$ , incrementó a  $84.6 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $103.8 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$   $127.8 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$  y  $150.6 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$  respectivamente. Así mismo, la actividad de la AGPasa con el efector 3-PGA incrementó conforme aumentaba la concentración de ADP-glucosa, esto podría ser a que cuando se une el 3-PGA a la AGPasa, modifica la actividad catalítica de esta enzima provocando la alteración de la afinidad por el sustrato y un aumento en su velocidad de reacción (Campbell y Reece, 2007).



**Figura 18.** Efecto del 3-fosfoglicerato (3-PGA) y fosfato inorgánico (Pi) sobre la actividad de la AGPasa en plátano macho inmaduro de las semanas 10 y 14 de desarrollo, con y sin 3-PGA y Pi. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar (n=4). Letras diferentes representan diferencias significativas en la actividad enzimática en cada concentración de ADP-glucosa ( $p \leq 0.05$ , prueba DSM).

En la semana 14, al igual que la semana 10 de desarrollo a actividad de la AGPasa aumentó en función de la concentración de ADP-glucosa.

Mientras con la adición de Pi, la actividad de la AGPasa disminuyó significativamente con todas las concentraciones de ADP-glucosa, de  $63 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $63 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $87 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $102 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$ , a  $38 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $41 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $58.2 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $71.1 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$ , respectivamente. Por otro lado, con la adición de 3-PGA aumentó significativamente la actividad de la AGPasa con la concentración de ADP-glucosa de 600 y 1000  $\mu\text{M}$  de  $87 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $102 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$  a  $121.8 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$  y  $138.6 \mu\text{mol} \cdot \text{gPS} \cdot \text{min}^{-1}$  respectivamente (Figura 18).

Estos resultados coinciden con otros estudios, que mencionan que la AGPasa se activa por 3-PGA y se inhibe por Pi (Smith *et al.*, 1997; Cross *et al.*, 2004; Geingenberger, 2011; Boehlein *et al.*, 2013), la AGPasa de tejidos fotosintéticos como hoja de espinaca, cebada y papa (Ballicora *et al.*, 2004) y algunas AGPasas de órganos no fotosintéticos como papa, endospermo de arroz y maíz muestran un efecto en su actividad por medio de dichos efectores (Sikka *et al.*, 2001). Contrario a estos resultados la actividad de la AGPasa de endospermo de trigo, chícharo y frijol presentaron poco o ningún cambio en su actividad con 3-PGA y Pi. El efecto del 3-PGA y Pi va a depender de la localización subcelular de la AGPasa. La mayoría de las AGPasas citosólicas presentan poco o nulo efecto sobre su actividad por 3-PGA y Pi comparadas con las AGPasas plástidicas (Sikka, 2001; Cross *et al.*, 2004). Esto se debe a que los residuos ubicado en los extremos N y C-terminal de las subunidades de la AGPasa se requieren para el control alostérico (Laughlin *et al.*, 1998).

En la hoja de espinaca se encontró que la subunidad pequeña de la AGPasa contiene un residuo de lisina en el extremo C-terminal que es esencial para la activación por 3-PGA, además de que se sugirió que existe un segundo residuo de arginina, que puede unir grupos carboxilatos y fosfatos, por lo que es involucrado en la activación e inhibición de la AGPasa (Ball y Preiss, 1992).

En base a los resultados de regulación enzimática obtenidos en este estudio, se plantea que la AGPasa de plátano podría ser citosólica, así mismo se ha reportado

que los residuos en los extremos de las subunidades involucrados en la regulación alostérica podrían no estar presentes, sin embargo en este estudio la AGPasa mostró un comportamiento alostérico, debido a una posible modificación post-traducciona (Laughlin *et al.*, 1998; Sikka *et al.*, 2001) dando origen a cambios estructurales en los extremos de las subunidades de la AGPasa, dejando al descubierto los residuos involucrados en la activación e inhibición de la AGPasa (Laughlin *et al.*, 1998).

Cuando se evaluó el efecto del 3-PGA y Pi juntos, la actividad de la AGPasa no mostró diferencias significativas con respecto a las muestras a las cuales no se les adicionaron ambos compuestos. Comparadas con las muestras que solo se les adicionó 3-PGA se observó un aumento significativo con todas las concentraciones de ADP-glucosa para la semana 10. Este comportamiento es similar a la AGPasa del endospermo de maíz, la actividad aumentó con la adición de 3-PGA pero cuando se adicionó Pi el efecto de 3-PGA se invirtió (Tuncel *et al.*, 2014). Es probable que Pi inhibe la actividad de la AGPasa; cambiando su conformación en una subunidad transformando las demás subunidades por lo tanto afecta los sitios activos de todas las subunidades y es así como disminuye la actividad de la AGPasa (Campbell y Reece, 2007).

## 8. CONCLUSIONES

El contenido de sacarosa incrementó en función de las semanas del desarrollo de plátano, representando disponibilidad de sustrato para la producción de glucosa y fructosa durante la maduración del fruto.

El contenido de almidón incrementó linealmente y después se mantuvo alto durante la maduración del plátano macho, representando una reserva de carbono y un producto de interés para la industria almidonera.

La actividad total de la AGPasa está linealmente relacionada con el contenido de almidón, ya que ambos incrementan conforme el desarrollo del plátano.

La glucosa y fructosa fueron más bajas que la sacarosa, y no se observó un aumento de estos azúcares durante las diferentes semanas de desarrollo del plátano, por lo que se concluye que la actividad de hexoquinasa fue alta, y que los intermediarios fosforilados son rápidamente utilizados como sustrato por la AGPasa para producir el ADP-glucosa para la síntesis de almidón.

En condiciones reductoras y no reductoras la actividad de la AGPasa mostró cambios variables durante el desarrollo, por lo que se concluye que las isoenzimas no son reguladas por el mismo mecanismo de óxido-reducción que en papa.

La AGPasa fue activada por 3-PGA e inhibida por Pi, por lo tanto se infirió que es regulada alostéricamente durante todo el desarrollo del fruto.

Las propiedades cinéticas de la enzima AGPasa cambiaron durante las diferentes semanas de desarrollo, por lo que se concluye que la regulación de esta enzima es más complicada de lo que inicialmente se esperaba, ya sea que se presentan modificaciones post-transcripcionales (fosforilación) o que en el genoma del plátano macho contiene varios genes de AGPasa que codifican para diversas isoenzimas, que se expresan diferencialmente.



## 9. PERSPECTIVAS

Para un proyecto de doctorado se pudiera continuar el trabajo con los siguientes objetivos:

Medir un perfil más amplio de metabolitos usando diversos métodos analíticos, incluyendo HPLC y espectrometría de masas (DIESI-MS).

Determinar la localización subcelular de la AGPasa y de la ADP-glucosa por medio de fraccionación acuosa y no acuosa.

Probar si la AGPasa de plátano es regulada por fosforilación.

Secuenciar el transcriptoma del fruto de plátano macho y determinar los isogenes que se expresan en los diferentes tejidos durante el desarrollo.

Clonar los genes de plátano para la AGPasa y expresarlos heterológicamente.

Generar plantas transgénicas de plátano que sobre expresen o estén mutadas en una u otra AGPasa.

## 10. LITERATURA CITADA

- Aoki N., Hirose T. and Furbank R. T. 2012. Sucrose transport in higher plants: Form source to sink. pp. 703-729. En: Photosynthesis: plastid biology, energy conversion and carbon assimilation, advances in photosynthesis and respiration. 892 p.
- Arcila P. M. I., Celis L. D. y Morales O. H. 2002. Influencia de la edad de cosecha sobre la maduración del fruto de dominico hartón, en el departamento de Quindío. Corporación colombiana de investigación agropecuaria, CORPOICA. Armenia, Quindío, Colombia.
- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P. 2004. Estructura y función de las proteínas. pp. 103-105. Introducción a la Biología Celular. 2da Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 842 p.
- Aristizábal L. M. y Jaramillo G. C. 2010. Identificación y descripción de las etapas de crecimiento de plátano dominico Hartón (*Musa AAB*). *Agrociencia*. 18: 29-20.
- Azcón-Bieto J. y Talón M. 2008. Fundamentos de Fisiología vegetal. 2da Edición. Interamericana-McGraw-Hill, Madrid, España.
- Ball K. L. and Preiss J. 1992. Evidence for an arginine residue at the allosteric sites of spinach leaf ADPglucose pyrophosphorylase. *Journal of Protein Chemistry*. 11(3): 231-238.
- Ballicora M. A., Iglesias A. A. and Preiss J. 2004. ADP-glucose pyrophosphorylase: a regulatory enzyme for plant starch synthesis. *Photosynthesis Research*. 79: 1-24.
- Baris I., Tuncel A., Ozber N., Keskin O. and Kavakli I. H. 2009. Investigation of the interaction between the large and small subunits of potato ADP-glucose pirofosforylase. *PLoS Computational Biology*. 5: 1-14.
- Beckles D.M., Smith A. M. and ap Rees T. 2001. A cytosolic ADP-glucose pyrophosphorylase is a feature of graminaceous endosperms, but not of other starch-storing organs. *Plant Physiology*. 125: 818-827.

- Bello-Pérez L. A., Ságado-Ayerdi S. G., Villagómez-Méndez J. y Montiel-Salas L. 2000. Almidón de plátano y calidad sensorial de dos tipos de galletas. *Agrociencia*. 34 (5): 553-560.
- Bello-Pérez L. A., González-Soto R. A., Sánchez-Rivero M. M., Gutiérrez-Meraz F. y Vargas-Torres A. 2006. Extrusión de almidones de fuentes no convencionales para la producción de almidón resistente. *Agrociencia*. 40: 441-448.
- BeMiller J. N. 2009. Starch: Chemistry and Technology. In Structural features of starch granules I. *Elsevier*, USA. Pp. 150-155.
- Berg J. M. y Tymoczko J. L. 2008. Enzimas: conceptos básicos y cinética. Pp. 213. Bioquímica. Editorial Reverté. Barcelona, España. 1026 p.
- Boehlein S. K., Shaw J. R., McCarty D. R., Hwang S.-K., Stewart J. D. and Hannah L. C. 2013. The potato tuber, maize endosperm and a chimeric maize-potato ADP-glucose pyrophosphorylase exhibit fundamental differences in Pi inhibition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 537: 210-216.
- Buleón A., Colonna P., Planchot V. and Ball S. 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*. 23: 85-112.
- Campbell N. A. and Reece J. B. 2007. La célula. Pp. 156- 198. En: Biología. Séptima edición. Editorial medica Panamericana S. A. Madrid, España. 1532 p.
- Carlos-Amaya F., Osorio-Díaz P., Agama-Acevedo E., Yee-Madeira, H. and Bello-Pérez L. A. 2011. Physicochemical and digestibility properties of double-modified Banana (*Musa paradisiaca* L.) starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 1376–1382.
- Cayón-Salinas, D. G. 2004. Ecofisiología y productividad del plátano (*Musa AAB* Simmonds). XVI Reunión Internacional Acorbat. Oaxaca, México. pp. 172-183.
- Champion, J. 1978. Botánica y genética. Principales variedades de frutos exportables. En El plátano. Técnicas agrícolas y producciones tropicales. Ed. Blume. Cuarta reimpression. Barcelona, España. pág. 13
- Chen B. Y. and Janes H. W. 1997. Multiples forms of ADP-glucose pyrophosphorylase from tomato fruit. *Plant Physiology*. 113:235-241.

- Chen B. Y., Wang Y. and Janes H. W. 1998. ADP-glucose pyrophosphorylase is localized to both the cytoplasm and plastids in developing pericarp of tomato fruit. *Plant Physiology*. 116:101-106.
- Chibbar R. N., Ganeshan S. and Baga M. 2007. In plant novel starch synthesis. *Improvement of Crop Plants for Industrial end Uses*. 1:181-208.
- Chiou T.-J. and Bush D. R. 1998. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95: 4784-4788.
- Copeland L., Blazek J., Salman H. and Chiming M. T. 2009. Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*. 23: 1527-1534.
- Cross J. M. , Clancy M., Shaw J. R., Greene T. W. Schmidt R. R., Okita T. W. and Hannah C. 2004. Both subunits of ADP-glucose pyrophosphorylase are regulatory. *Plant Physiology*. 135: 137-144.
- Development Core Team, R., 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>.
- Doehlert D. C. and Kuo T. M. 1993. Characteristics of carbohydrate metabolism in sweet corn (*sugary-1*) endosperm. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 118(5): 661-666.
- Englyst, H.N., Kingman, S.M., and Cummings, J.H. 1992. Classification and measurement of nutritional important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46, S33- S50.
- Ellis R. P., Cochrane M. P., Dale M. F. B., Duffus C. M., Lynn A., Morrison I. M., Prentice R. D. M., Swanston J.S., and Tiller S. A. 1998. Starch production and industrial use. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 77: 289-311.
- Flores-Gorosquera E., García-Suárez F., Flores-Huicochea E., Núñez-Santiago M. C., González-Soto R. A. y Bello-Pérez L. A. 2004. Rendimiento del proceso de extracción de almidón a partir de frutos de plátano (*Musa paradisiaca*). Estudio en planta piloto. *Acta Científica Venezolana*. 55: 86-90.

- Fornaguera J. y Gómez G. 2007. Los aminoácidos y las proteínas. Pp. 61-63. En: Bioquímica: La ciencia de la vida. Editorial Universidad estatal a distancia. San José Costa Rica, Centroamérica. 319 p.
- Fu Y., Ballicora M. A., Leykam J. F. and Preiss J. 1998. Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pirofosforilasa. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(39): 25045-25052.
- Funglie K. C., and Oates C. G. 2001. Starch markets in asia. In: Sweetpotato post-harvest research and development in china. Funglie, K. O. and Hermann, M. (Eds) Proceedings of an international workshop. Chengdu, China. November 7-8, 2001.
- Geigenberger P., Kolbe A. and Tiessen A. 2005. Redox regulation of carbon storage and portioning in response to light and sugars. *Journal of Experimental Botany*. 56 (416): 1469-1479.
- Geigenberger P. 2011. Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment. *Plant Physiology*. 155:1566-1577.
- Giroux M. J., Shaw J., Barry G., Cobb B. G., Greene T. W., Okita T. W and Hannah L. C. 1996. A single mutation that increases maize seed weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93: 5824–5829.
- Guarnizo** A. F., Martinez P. Y. 2009. Los seres vivos: fuente de compuestos orgánicos. Pp 3-4. En: Experimentos de química orgánica. Ediciones Elizcom. Armenia, Quindío, Colombia. P. 187.
- Hendriks J. H. M., Kolbe A., Gibon Y., Stitt M. and Geigenberger P. 2003. ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of Arabidopsis and other plant species. *Plant Physiology*. 133 (2): 838-849.
- Heslop-Harrison J. S. and Schwarzachier T. 2007. Domestication, genomics and the future for banana. *Annals of Botany*. 100: 1073-1084.
- Huber S. C. and Hardin S. C. 2004. Numerous posttranslational modification provide opportunities for the intricate regulation of metabolic enzymes at multiples levels. *Current Opinion in Plant Biology*. 7(3): 318-322.

- Huber K. C. and BeMiller J. N. 2010. Modified starch. pp. 141-203. En: Bertolini A. C. (Ed.). *Starches: Characterization, properties and applications*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 270 p.
- Jane J., Kasemsuwan T., Leas S., La, A., Zobel H. and Robyt J.F. 1994. Anthology of starch granule morphology by scanning electron microscopy. *Starch/Starke*. 46: 121-129.
- Jiang L., Yu X., Qi X., Yu Q., Deng S., Bai B., Li N., Zhang A., Changfu Z., Liu B. y Pang J. 2013. Multigene engineering of starch biosynthesis in maize endosperm increases the total starch content and the proportion of amylose. *Transgenic Research*. 1: 1-10.
- Jobling S. 2004. Improving starch for food and industrial applications. *Current Opinion in Plant Biology*. 7: 210-218.
- Jeon J.-S., Ryoo N., Hahn T.-R., Walia H., Nakamura Y. 2010. Starch biosynthesis in cereal endosperm. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48: 383-392.
- Koch K. 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*. 7: 235-246.
- Kossmann J. and Lloyd J. 2000. Understanding and influencing starch biochemistry. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(3): 171–226.
- Kötting O., Pusch K., Tiessen A., Geigenberger P. and Steup M., Ritte G. 2004. Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in Arabidopsis leaves: the phosphoglucan, water dikinase (PWD). *Plant Physiology*. 137(1): 242-252.
- Kötting O., Kossmann J., Zeeman S. C. and Lloyd J. R. 2010. Regulation of starch metabolism: the age of enlightenment? *Current Opinion in Plant Biology*. 13 (3): 320-328.
- Kumar R. and Singh R. 1981. Free sugars and their relationship with grain size and starch content in developing wheat grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 32: 229-234.

- Laughlin M. J., Chantler S. E. and Okita T. W. N- and C-terminal peptide sequences are essential for enzyme assembly, allosteric, and/or catalytic properties of ADP-glucose pyrophosphorylase. *The Plant Journal*. 14(2): 159-168.
- Le Corre D., Bras J. and Dufresne A. 2010. Starch nanoparticles: a review. *Biomacromolecules*. 11: 1139-1153.
- Lindeboom N., Chang P. R. and Tyler R. 2004. Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review. *Starch/Stärke*. 56: 89-99.
- McGilvery R. W. 1977. Regulación metabólica. Pp. 532- 534. En: Conceptos bioquímicos. Editorial Reverté, S. A. Barcelona, España. 594 p.
- Michalska J., Zauber H., Buchanan B. B., Cejudo F. J. and Geigenberger P. 2009. NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106 (24): 9908-9913.
- Mohan Ram H. Y., Ram, M. and Steward F. C. 1962. Growth and development of the banana plant. *Annals of Botany*. 26(104):657-672.
- Morales, H., Belalcázar, S., Cayón, G. 1998. Efecto de la época de cosecha sobre la composición físicoquímica de los frutos en cuatro clones comerciales de musáceas. En: Seminario Internacional sobre Producción de Plátano. Armenia, Colombia. Memorias. CORPOICA, Universidad del Quindío, COMITECAFÉ QUINDÍO, SENA. pp. 237-246
- Muñoz J. F., Morán-Zorzano M. T., Alonso-Casajús N., Baroja-Fernández E., Etxeberria E.D. and Pozueta-Romero J. 2005. New enzymes, new pathways and an alternative vie won starch biosynthesis in both photosynthetic and heterotrophic tissues of plants. *Biocatalysis and Biotransformation*. 24:63-76.
- Nakamura Y. and Yuki K. 1992. Changes in enzyme activities associated with carbohydrate metabolism during the development of rice endosperm. *Plant Science*. 82: 15-20.

- Pérez S., Baldwin P. M. and Gallant D. J. 2009. Structural features of starch granules I. In: BeMiller J. N. Starch: Chemistry and technology. 3<sup>era</sup> Edition. p. 150- 152.
- Pillay M. and Tripathi L. 2007. Banana. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Volume 4. Chapter 15. International Institute of Tropical Agriculture.
- Preiss J. 1982. Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 33: 431-454.
- Robinson J. C. and Galán Sauco V. 2010. Morphological characteristics and plant development. Pp. 51-65. En: Bananas and plantains. 2nd edition. CAB international. Wallingfor, Uk. 271 p.
- Rodríguez G. M., Morales Ch. J.L. y Chavarría C. J. A. 1985. Producción de plátanos (*Musa* AAB, ABB). Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza (CATIE), Departamento de producción vegetal. Turrialba, Costa Rica.
- Roitsch T. and González M.-C. 2004. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science*. 9(12): 606-613.
- Rolland F., Baena-Gonzalez E. y Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 675-709.
- Rosales-Reynoso O.L., Agama-Acevedo E., Aguirre-Cruz A., Bello-Perez L.A., Dufour D. and Gibert O. Evaluación fisicoquímica de variedades de plátanos de cocción y postre. *Agrociencia*. En prensa.
- SAGARPA. (Secretaría de Agricultura, ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2008. Estudio para determinar zonas de alta potencialidad del cultivo del plátano macho (*Musa paradisiaca*) en el estado de tabasco. Gobierno del Estado de Tabasco. Tomo XV.
- Salvador A., Sanz T. and Fiszman S. M. 2007. Changes in color and texture and their relationship with eating quality during storage of two different dessert bananas. *Postharvest Biology and Technology*. 43: 319-325.
- Seymour R. B. y Carraher C. E. 1995. Introducción a la química de los polímeros. 1<sup>a</sup> Edición. Editorial Reverté, S. A. Barcelona, España. Pág. 191.



- Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera. 2012.  
<http://www.siaprendes.siap.gob.mx/contenidos/2/04-platano/contexto-5.html/>  
(Consulta: Septiembre 2013).
- Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera (SIAP). 2014. Disponible en:  
<http://www.siap.gob.mx/siaprendes/contenidos/2/04-platano/contexto-4.html>  
(Consultada: en Octubre del 2014).
- Shiga T. M. Soares c. A., Nascimento J. RO., Purgatto E., Lajolo F. M. and Cordenunsi B. R. 2011. Ripening-associated changes in the amounts of starch and non-starch polysaccharides and their contributions to fruit softening in three banana cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.91:1511-1516.
- Sikka V. K., Choi S. B., Kavakli H., Sakulsingharoj C., Gupta S., Ito H. and Okita T. W. 2001. Subcellular compartmentation and allosteric regulation of the rice endosperm ADPglucose pyrophosphorylase. *Plant Science*. 161:461-468.
- Smith A. M., Denyer K. and Martin C. 1997. The synthesis of the starch granule. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48: 67-87.
- Smith A. M. 2001. The biosynthesis of starch granules. *Biomacromolecules*. 2:335-341.
- Stark D. M., Timmerman K. P., Barry G., Preiss J. and Kishore G. M.1992. Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP-glucose pyrophosphorylase. *Science*. 258:287-292.
- Taíz L. y Zeiger E. 2006. Fisiología vegetal. Universitat Jaume I. 3era Edición
- Tester R., Karkalas J. and Qi X. 2004. Starch-composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*. 39: 151-165.
- Tetlow I. J., Davies E. J., Vardy K. A., Bowsher C. G., Burrell M. M. and Emes M. J. 2003. Sucellular localization of ADPglucose pyrophosphorylase in developing wheat endosperm and analysis of the properties of a plastidial isoform. *Journal of Experimental Botany*. 54:715-725.

- Tetlow I. J., Wait R., Lu Z., Akkasaeng R., Bowsher C. G., Esposito S., Kosar-Hashemi B., Morell M. K and Emes M. J. 2004. Protein phosphorylation in amiloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions. *The Plant Cell*. 16: 694-708.
- Tiessen A. Hendriks J. H. M., Stitt M., Branscheid A., Gibon Y., Farré E. M. and Geigenberger P. 2002. Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply. *The Plant Cell*. 14: 2191-2213.
- Tiessen A. 2003. The regulation of starch synthesis in sink organs of plants through physiological signals. Thesis of the degree of Doctor of natural sciences. Germany. Combined Faculties for the Natural Sciences and for Mathematics of the Ruperto-Carola University of Heidelberg. 131 p.
- Tofiño A., Romero H. M. y Ceballos H. 2007. Efecto del estrés abiótico sobre la síntesis y degradación de almidón. *Agronomía Colombiana*. 25(2): 245-254.
- Tuncel A. and Okita T. W. 2013. Improving starch yield in cereals by over-expression of ADPglucose pyrophosphorylase: Expectations and unanticipated outcomes. *Plant Science*. 211: 52-60.
- Tuncel A., Kawaguchi J., Ihara Y., Matsusaka H., Nishi A., Nakamura T., Kuhara S., Hirakawa H., Nakamura Y., Cakir B., Nagamine A., Okita T. W., Hwang S.-K. and Satoh H. 2014. The rice endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit is essential for optimal catalysis and allosteric regulation of the heterotetrameric enzyme. *Plant Cell Physiology*. 55(6): 1169-1183.
- Tymowska-Lalanne Z. and Kreis M. 1998. The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology. *Advances in Botanical Research*. 28: 71-117.
- Vargas-Ortiz E. 2013. Identificación y análisis de respuestas bioquímicas y fisiológicas que contribuyen a la resistencia/tolerancia del amaranto de grano (*Amaranthus sp.* L) a la folivoría. Tesis de grado de doctor en ciencias en la especialidad de biotecnología de plantas. Centro de investigación y de estudios avanzados del instituto politécnico nacional. Irapuato, Guanajuato. México. 64 p.

- Vazquez-Castrejon R., Romero-Cadena A. y Figueroa-Viera J. 2005. Paquete tecnológico para cultivo del plátano. En: paquetes tecnológicos para cultivos agrícolas, en el estado de Colima. Colima, México. 72 p.
- Zeeman S. C., Kossmann J. and Smith A. M. 2010. Starch: Its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annual Reviews*. 61:209-234.
- Zhang P., Whistler R. L., BeMiller J. N. and Hamaker B. R. 2005. Banana starch: production, physicochemical properties and digestibility-a review. *Carbohydrate Polymers*. 59: 443-458.
- Zhang, G., and Hamaker, B.R. 2009. Slowly digestible starch: concept, mechanism, and proposed extended glycemic index. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 49: 852-867.