

Regulación de la biosíntesis del almidón en plantas terrestres: perspectivas de modificación¹

Adriana Tofiño², Martín Fregene³, Hernán Ceballos³, Diana Cabal⁴

COMPENDIO

En este artículo se revisa el estado del conocimiento sobre el metabolismo del almidón en las plantas superiores y específicamente los mecanismos de control y regulación de las rutas de síntesis y degradación. Se considera que para obtener almidones, mediante manipulación genética, es necesario conocer los mecanismos bioquímicos que intervienen en la formación del gránulo de almidón y las enzimas participantes. Se discuten los mecanismos de la regulación hormonal y circadiana de los azúcares y la genética individual de las principales enzimas implicadas. Se revisan en particular los métodos empleados en la caracterización bioquímica y físico química y el estado del conocimiento actual de la producción de almidones modificados.

Palabras claves: metabolismo, almidón, almidón asimilable, amilopectina, amilosa, regulación fisiológica, almidones modificados, hormonas.

ABSTRACT

Regulation of starch biosynthesis in higher land plants: new avenues for modifying starch. This article reviews current knowledge of starch metabolism in higher plants, and especially the control and regulation of the biosynthetic and degradative pathways. The possibility of designing starches for industrial uses by genetic manipulation requires understanding of the biochemical mechanism of starch granule formation and the control of enzymes and protein complexes. The regulation by hormones, sugars and circadian rhythms is discussed as well as the genetic of key enzymes of this pathway. In particular, the review focuses on the methods for biochemical and physiochemical starch and production of modified starches.

Keywords: starch metabolism digestible starch, amylopectin, amylose, modified starches, physiological regulation, hormones.

INTRODUCCIÓN

El almidón es el carbohidrato de reserva más abundante en las plantas y se encuentra en hojas, diferentes tipos de tallos y raíces así como en flores, frutos y semillas en los cuales se utiliza como fuente de energía durante periodos de dormancia, estrés o reinicio del crecimiento. Los órganos que almacenan almidón son productos alimenticios de importancia; estimativos del Instituto Internacional de Investigación sobre Políticas Alimentarias (IFPRI) indican que el valor de la producción de raíces y tubérculos en el año 2020 representará el 11% del valor total de cereales, soya y carne y que las tasas de crecimiento futuras de yuca, papa y ñame excederán las de arroz y trigo (Scott *et al.*, 2000, Baguma *et al.*, 2003; Tester *et al.*, 2004). De manera creciente, el almidón es utilizado como recurso energético renovable después de su conversión a etanol y para muchas aplicaciones industriales por su versatilidad, bajo costo y la facilidad con que se alteran las propiedades físico químicas, ya sea mediante modificaciones químicas, enzimáticas o tratamientos físicos (Jobling, 2004).

¹ Artículo de Revisión derivado del Seminario II, Doctorado en Ciencias Agrarias, énfasis en Fisiología Vegetal, Universidad Nacional de Colombia – Bogotá, sustentado por la primera de los autores. REC.: 11-28-2005 ACEPT.: 06-02-2006

² Ing. Agr. M.Sc. Universidad Nacional Sede Bogotá. aptofinor@unal.edu.co

³ Líderes de los Programas de genética y mejoramiento de yuca- CIAT.

⁴ Estudiante Ingeniería Agroindustrial Universidad Nacional Sede Palmira.

El almidón es una molécula compuesta por dos tipos de polímeros: la amilosa y la amilopectina. La amilopectina está formada por unidades de glucosyl unidas por enlaces α -1,4 y altamente ramificadas en la posición α -1,6 en intervalos de 10nm a lo largo del eje de la molécula y constituye entre el 85-70% del almidón. La amilosa es una cadena fundamentalmente lineal de glucanos α -1,4 con limitados puntos de ramificación en la posición α -1,6 y constituye entre 15-30 % del almidón. La amilopectina es más estable que la amilosa debido a los limitados enlaces de hidrógeno, que le confieren fluidez, alta viscosidad y elasticidad a las pastas y espesantes. Las proteínas, lípidos y minerales son componentes cuantitativamente menores del almidón (Mclauchlan *et al.*, 2001).

La distribución multimodal de cadenas de glucanos de diferentes longitudes, el agrupamiento de puntos de ramificación dentro de la amilopectina permiten la formación de cadenas en doble hélice, que pueden empaquetarse en arreglos organizados para formar la estructura semicristalina de la matriz del gránulo en el que se alternan regiones de material amorfo (amilosa) y semicristalino (amilopectina) que se conocen como anillos de crecimiento presentes en el almidón de las plantas superiores (Munyakawa, *et al.*, 1997; Smith, 2005). La longitud de las cadenas de glucano, proporción de amilosa-amilopectina y el grado de ramificación de esta última definen drásticamente el tamaño, estructura del gránulo y utilidad del almidón particular de cada especie (**Tabla 1**). Una característica determinante del almidón es la cristalinidad que puede medirse por la amplitud de la dispersión del ángulo de difracción de los rayos X y hace referencia a los almidones tipo A (encontrado en la mayoría de los cereales), tipo B (encontrado en la mayoría de los tubérculos) y tipo C (mezcla de ambas formas encontrada en las legumbres) (**Tabla 2**). Otras características asociadas al gránulo como la forma, tipo de superficie y cantidad de grupos fosfatos también influyen en sus propiedades y usos (Bertoft, 2002; Baguma, *et al.*, 2003; Tetlow, *et al.*, 2004; Mclauchlan *et al.*, 2001 Singh *et al.*, 2005).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la amilosa y la amilopectina del almidón en plantas superiores.

Propiedad	Amilosa	Amilopectina
Estructura molecular	Lineal α (1-4)	Ramificada α (1-4), α (1-6)
Dilución en solución	Inestable	Estable
Geles	Firme e irreversible	Suave y reversible
Formación de complejos	Favorable	Desfavorable
Susceptibilidad a la retrogradación	Grande	Pequeña
Masa molecular	$1-2 \times 10^5$	$>2 \times 10^7$
Longitud de onda de absorción max del complejo de yodo	644 nm	554 nm
Afinidad por el yodo	$20.1 \text{ g (100g)}^{-1}$	$1.1 \text{ g (100g)}^{-1}$
Grado de polimerización	2660	7000

Modificado de White, 1994 y Ayala, 1995.

Tabla 2. Características de los gránulos del almidón en diversas especies cultivadas

tamaño del almidón (μm)	forma	distribución	tipo
cebada 2-5	esférica	Bimodal	(B-gránulos)
cebada 15-25	lenticular	Bimodal	(A-gránulos)
Maíz (waxy y normal) 2-30	esférica/polihedral	Unimodal	
maíz amiloso 2-30	irregular	Unimodal	
mijo 4-12	polihedral	Unimodal	
avena 3-10	polihedral	Unimodal	
arveja 5-10	reniforme	Unimodal	
papa 5-100	lenticular	Unimodal	
arroz 3-8 1	polihedral	Unimodal	
centeno 5-10	esférica	Bimodal	(B-gránulos)
centeno 10-40	lenticular	Bimodal	(A-gránulos)
sorgo 5-20	esférica	Unimodal	
yuca 5-35	esférica /lenticular	Unimodal	
triticale 1-30	esférica	Unimodal	
trigo 2-10	esférica	Bimodal	(B-gránulos)
trigo 15-35	lenticular	Bimodal	(A-gránulos)

Modificado de Tester *et al.*, 2004.

En años recientes, gracias a la utilización de las herramientas de la biología molecular y de la ingeniería genética, se ha incrementado la comprensión de la estructura del almidón y del funcionamiento del intrincado mecanismo de regulación de las enzimas de la biosíntesis. Tales herramientas hacen posible la obtención de diversos tipos de almidones modificados para la industria y la alimentación (Tetlow, *et al.*, 2004).

En este artículo se revisa el estado del conocimiento sobre la biosíntesis del almidón, sus transformaciones y la metodología de investigación y se discuten las perspectivas de los almidones modificados.

AVANCES EN EL ESTUDIO DE LA SÍNTESIS DE SACAROSA

Los fotoasimilados generados en el ciclo de las pentosas (PCR), se acumulan temporalmente en las hojas, durante el día, en forma de sacarosa en las vacuolas o de almidón en el estroma de los cloroplastos de las células del mesófilo y durante la noche son utilizados para suplir el requerimiento de carbono del metabolismo no fotosintético (Santacruz *et al.*, 2002). El transporte de los fotoasimilados hacia los vertederos se efectúa en forma de sacarosa o de compuestos de la serie rafinosa, dependiendo de la especie de planta y del tipo de carga y descarga en el floema (vía simplasto o apoplasto). En esta forma, el metabolismo del almidón en el vertedero (semillas, raíces, tubérculos, hojas en desarrollo) está asociado con la relación de síntesis almidón/ sacarosa en la fuente, la eficiencia de exportación, transporte de sacarosa y con la prioridad y potencia del vertedero (Schöning y Kollman, 1997; Minchin y Lacombe, 2005).

La síntesis de sacarosa se realiza en el citosol a partir de glucosa y fructosa fosforiladas (Hopkins y Huner, 2004). En plantas mutantes de *Arabidopsis* se observó que la expresión de la enzima UDP- glucosa pirofosforilasa (Ugp), responsable de la síntesis de UDP-glucosa, depende de la interacción de señales derivadas de la disponibilidad de fósforo, el contenido de sacarosa y el ciclo circadiano (Ciereszco, *et al.*, 2005; Alonso *et al.*, 2005).

La conversión de fructosa y glucosa a sacarosa es catalizada por las enzimas sacarosa fosfosintasa (SPS) y sacarosa fosfato-fosfatasa (SPP). El comportamiento de las enzimas asociadas con la conversión de sacarosa a almidón se describió en frijol mungo y otros cultivos como caña de azúcar, papa, tabaco, tomate, yuca, manzana y arroz (Ishimaru *et al.*, 2005; Cheng, *et al.*, 2005; Lytovchenko *et al.*, 2005; Shuai Chen, *et al.*, 2005; Chopra *et al.*, 2005; Wei-Liang Chen,

et al., 2001). Otra enzima citoplásmica capaz de sintetizar sacarosa es la sacarosa sintetasa (SSS). Las enzimas invertasa (SI), sintetasa fosfatada (SPS) y sintetasa (SuSy) son fundamentales en las transformaciones de la sacarosa y aportan capacidad al vertedero (Baguma *et al.*, 2003; Schäfer, *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2005; Dendooven, 2005).

La relación entre la síntesis de sacarosa y almidón es particular en cada especie vegetal y requiere un balance con la producción de fotosintatos para mantener la provisión de esqueletos carbonados que regeneren ribulosa 1,5 bifosfato, el aceptor primario de CO₂. Mientras que la enzima sintetasa de la sacarosa fosfatada (SPS) determina la capacidad máxima de síntesis de sacarosa, la otra enzima implicada en la síntesis de esta molécula, la fructosa- 1,6- bifosfato fosfatasa (FBPasa) desempeña un papel determinante en el balance del fraccionamiento del carbono entre sacarosa y almidón. En plantas de arveja transformadas con un gen de *Arabidopsis* con bajos niveles de actividad de FBPasa se presentaron altos niveles foliares de carbohidratos y asimilación del carbono en la fotosíntesis además de cambios en la relación sacarosa/almidón (Mustroph *et al.*, 2005; Sahrawy, *et al.*, 2004; Dubos *et al.*, 2005; Casanova *et al.*, 2005; Chen, *et al.*, 2005).

FUNCIONAMIENTO DE LAS ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DEL ALMIDÓN

Aparentemente la ruta postulada para la biosíntesis de almidón es relativamente simple e involucra tres enzimas: la ADP- glucosa pirofosforilasa (AGPasa), la sintetasa de almidón (SS) y la enzima de ramificación del almidón (SBE). Sin embargo, se ha demostrado la participación de varias isoformas de estas enzimas y otras enzimas adicionales que están de alguna manera involucradas en el proceso. Las isoformas difieren en su expresión tisular y temporal, en las propiedades cinéticas y en los productos (**Tabla 3**) (Dennis y Blakeley, 2000; Santacruz *et al.*, 2002).

ADP- glucosa pirofosforilasa (AGPasa)

En las plantas las AGPasas son codificadas por diferentes genes que muestran una fuerte especificidad en su perfil de expresión, por ejemplo algunas se expresan solo en hojas, otros en raíces y otros en el endospermo como en trigo y cebada. La AGPasa es una enzima heterotetramérica y el análisis de mutantes demostró que tanto las dos subunidades grandes como las dos pequeñas son necesarias para la actividad; las subunidades grandes actúan en la regulación y las pequeñas en la catálisis. Se han clonado tres cDNAs en yuca que codifican para las subunidades B, S2 y S3 de la AGPasa. El producto de la actividad de AGPasa es la ADP-glucosa que actúa como precursor inmediato de la síntesis del almidón (Zhou y Cheng, 2005).

Sintetasas de almidón (SS)

Uno de los adelantos importantes en la comprensión de la biosíntesis del almidón, es la explicación de la aparente simultaneidad en la síntesis de los dos polímeros constituyentes del almidón. Las sintetasas del almidón están asociadas con el alargamiento de las cadenas de glucano y se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo con la localización; una (GBSSI) se encuentra firmemente ligada a los gránulos de almidón y cataliza la conversión de ADP-glucosa a cadenas lineales de ∞ (1-4) -glucosa (amilosa) y la otra (SSS) es una forma soluble localizada en el estroma de los amiloplastos y cloroplastos y actúa específicamente en la biosíntesis de amilopectina. Sin embargo, GBSSI responsable de la síntesis de amilosa también contribuye con la síntesis de amilopectina. Aún se desconocen los factores que determinan la partición de la actividad de la enzima en los dos procesos (Denyer, *et al.*, 2005; Smith, 2005).

Se han determinado diversas isoformas de GBSS y SSS. En *Arabidopsis* se han identificado las isoformas SS II y III que actúan en la formación del almidón foliar transitorio. La SSIII actúa directamente en el ensamblaje del almidón y además puede inhibir su biosíntesis. En arroz se encontraron las isoformas III y IV. Adicionalmente, en el endospermo del trigo hexaploide se encontró una isoforma similar a SSIII de maíz. Las alteraciones fisicoquímicas observadas en el

mutante sugary2 de maíz se atribuyeron a la actividad de la sintetasa del almidón IIa que incrementó las cadenas de glucanos cortos en la amilopectina (Dian *et al.*, 2005; Zhongy, *et al.*, 2005).

Tabla 3. Localización y tipo de actividad de las enzimas constituyentes del núcleo de la ruta biosintética del almidón

Nombre de la enzima	Proceso en que participa	Expresión tisular (mono)			Expresión tisular (dico)			Mecanismo de regulación	Acción enzimática	Isoforma	Autor
		endospermo	hoja	gránulo	embri/tub	hoja	gránulo				
AGPasa	síntesis del precursor del almidón	x		S				Modificación del potencial redox modulación alostérica complejos multiproteínicos	síntesis de ADP-glucosa	citosólica plastidial	Denyer <i>et al.</i> , 2001 Kolbe <i>et al.</i> , 2005 Preiss <i>et al.</i> , 1990 Smith <i>et al.</i> , 2004 Smith <i>et al.</i> , 2005 Tetlow <i>et al.</i> , 2004 Zhou y Chen, 2005
		x	x	S	X	x	S				
GBSS	síntesis de amilosa	x		G	X			circadiana complejos multiproteínicos	elongación de la cadena lineal de glucano	GBSS I GBSS II	Araki <i>et al.</i> , 2000 Boggini <i>et al.</i> , 2001 Denyer <i>et al.</i> , 2001 Jacobsen <i>et al.</i> , 1989 Larkin <i>et al.</i> , 2003 McLauchlan <i>et al.</i> , 2001 Miura <i>et al.</i> , 2002 Nishi <i>et al.</i> , 2005 Puentes <i>et al.</i> , 2003 Yamamori y Quynh, 2000
			X	G		X	G				
SS	biosíntesis de amilopectina	X	X	G/S	X	X	G/S	complejos multiproteínicos proteínas 14-3-3	formación de enlaces Alfa1-6	SS I SS II SS II a SS II b SS III SS IV	Bertoff, 2002 Colleoni <i>et al.</i> , 1999 Dian <i>et al.</i> , 2005 Dauvilleé <i>et al.</i> , 2001 Tetlow <i>et al.</i> , 2004 Zhang <i>et al.</i> , 2004 Zhongyi <i>et al.</i> , 2005
		X	X	S	X	X	S				
		?	?	?	?	?	?				
		X	X	S	X	X	S				
SBE	síntesis de amilopectina	X	X	S	X	X	S	estado de desarrollo de la planta circadiana ABA modulación alostérica fosforilación proteínica complejos multiproteínicos	introduce sitios ramificados en la molécula de amilopectina	SBE I SBE I c SBE II a SBE II b SBE II	Baguma <i>et al.</i> , 2003 Bertoff, 2002 Blauth <i>et al.</i> , 2002 Kim <i>et al.</i> , 2005 Satoh <i>et al.</i> , 2005
		X	X	G/S			G/S				
		X	X	G/S			G/S				
		X	X	G/S			G/S				
DBE	incorporación de la amilopectina en el gránulo de almidón	X	X	S	X	X	S	modificación del potencial redox complejos multiproteínicos	desramifica glucanos altamente ramificados	SBE I SBE I c SBE II a SBE II b SBE II	Bertoff, 2002 Dauvilleé <i>et al.</i> , 2001 Mukerjee y Robyt, 2005 Tetlow <i>et al.</i> , 2004 Zeemam <i>et al.</i> , 2002
		X	X	S	X	X	S				
ISA	Formación/degradación del gránulo de almidón	X	X	S	X	X	S		formación/destrucción de enlaces de glucanos en amilopectina	ISA-1 ISA-2 ISA-3	Blennow <i>et al.</i> , 2002 Mukerjee y Robyt, 2005 Baguma <i>et al.</i> , 2003 Smith, 2005 Tester <i>et al.</i> , 2004
		?	?	?	?	?	?				
		?	?	?	?	?	?				
Enzima D	síntesis de amilopectina/degradación de almidón	X	X	S	X	X	S		transfiere glucanos ramificados/desproporciona oligosacáridos de la amilopectina		Blennow <i>et al.</i> , 2002 Mukerjee y Robyt, 2005 Baguma <i>et al.</i> , 2003 Smith, 2005 Tester <i>et al.</i> , 2004 Colleoni <i>et al.</i> , 1999
		X	X	S	X	X	S				
Proteína RI	Formación/degradación del gránulo de almidón	?	X	G/S	X	X	G/S		control putativo de la tasa general de ruptura de almidón		Blennow <i>et al.</i> , 2002 Mukerjee y Robyt, 2005 Baguma <i>et al.</i> , 2003 Smith, 2005 Tester <i>et al.</i> , 2004
		?	X	G/S	X	X	G/S				
ADP-glucosapirofosfatasa	formación del gránulo de almidón							giberelinas	regula nivel de ADPG		Blennow <i>et al.</i> , 2002 Mukerjee y Robyt, 2005 Baguma <i>et al.</i> , 2003 Smith, 2005 Tester <i>et al.</i> , 2004 Lu <i>et al.</i> , 2005
Endoamilasas	degradación/síntesis de almidón	X	X	S	X	X	S	sacarosa	remoción de unidades de maltosa/hidrólisis de enlaces glucosil	α amilasa β amilasa	Blennow <i>et al.</i> , 2002 Mukerjee y Robyt, 2005 Baguma <i>et al.</i> , 2003 Smith, 2005 Rodriguez <i>et al.</i> , 2006 Tester <i>et al.</i> , 2004
		X	X	S	X	X	S				
Enzima P	degradación/síntesis del almidón	X	X	S	X	X	S		transferencia reversible de unidades de glucosil al extremo no reducido de glucano		Blennow <i>et al.</i> , 2002 Mukerjee y Robyt, 2005 Baguma <i>et al.</i> , 2003 Smith, 2005 Tester <i>et al.</i> , 2004
		X	X	S	X	X	S				
GWD	degradación/síntesis del almidón								fosforila residuos de glucosa en la amilopectina		Blennow <i>et al.</i> , 2002 Mukerjee y Robyt, 2005 Baguma <i>et al.</i> , 2003 Smith, 2005 Tester <i>et al.</i> , 2004

G: asociada al gránulo; S: soluble; AGPasa: ADP-glucosa pirofosforilasa; GBSS: enzima almidón soluble ligada al gránulo; SS: sintetasa del almidón soluble; SBE: enzima de ramificación del almidón; DBE: enzima de deramificación del almidón; ISA: isoamilasas; Enzima D: lucanotransferasa; Enzima P: almidón fosforilasa; GWD: glucano-H₂O dikinasa.

Enzima de ramificación del almidón (SBE)

La enzima ramificadora SBE también presenta múltiples isoformas que varían entre especies y su actividad entre genotipos debido a cambios en el extremo N y C terminal de la proteína. En yuca, se encontró una isoforma similar en 70-75% a SBEI (foliar) pero con alta expresión en las raíces. La actividad de SBE es importante en la calidad y cantidad de almidón. La ausencia de esta enzima ocasiona varios efectos como bajas concentraciones de amilopectina y almidón pero elevada cantidad de azúcares (Baguma *et al.*, 2003; Baguma, 2004).

La deficiencia en la enzima SBEI en el endospermo de mutantes de arroz (*sbe1*) altera la estructura fina de la amilopectina (disminuye tanto las cadenas largas como el grado de polimerización) sin alterar el nivel normal del almidón (Kim, *et al.*, 2005; Satoh *et al.*, 2005). La función de SBEIIb no se suplió por otras isoformas, lo cual indica el papel específico de esta enzima en la transferencia de cadenas cortas en la amilopectina del endospermo de arroz y en la morfología de la semilla de arveja (Nishi, *et al.*, 2005).

El estado de desarrollo de la planta regula la expresión de las enzimas ramificadoras del almidón I y II por lo cual se pueden observar granos de almidón de forma diferente con el transcurso del tiempo. Mutantes defectuosos demuestran que se requieren ambas isoformas para el desarrollo completo de los granos de almidón (Baguma, *et al.*, 2003).

Biosíntesis de amilosa

El aumento en longitud de la cadena de amilosa se realiza mediante GBSSI en los órganos de almacenamiento y por GBSSII en las hojas y otros tejidos que acumulan almidón transitorio. En yuca la enzima GBSSII presenta 30% de similaridad con la enzima GBSSI (Baguma *et al.*, 2003). La isoforma GBSSI es estimulada por los malto oligosacáridos (MOS) cuando sintetiza amilosa. Experimentos *in vivo* demuestran que a partir de la amilopectina se puede producir amilosa y que la síntesis previa de la cadena lineal de glucano no se requiere para la formación de gránulos semicristalinos (Tetlow *et al.*, 2004).

Biosíntesis de amilopectina y formación del gránulo de almidón

La amilopectina se forma por la acción de SBE y SS. SBE introduce sitios ramificados en la molécula de amilopectina por hidrólisis de cadenas α (1, 4) glucano a 15-20 unidades del extremo no reductor. Cuando cataliza la formación de enlaces α (1-6) une el extremo reductor de cadenas adheridas con otros residuos de glucosa. SS sintetiza cadenas de glucanos de diferente longitud de acuerdo con la isoforma que esté actuando. El estudio de mutantes del endospermo de maíz y arroz, que acumulan fitoglicógeno, condujo a la descripción del modelo de “proceso simultáneo”, el cual postula que la síntesis de amilopectina y su incorporación en el gránulo de almidón resulta de la “poda”, por la DBE, de los glucanos altamente ramificados sintetizados por la SS y la SBE (Baguma, 2004).

La molécula de amilopectina se auto-organiza en arreglos regulares en la fase soluble de la superficie del gránulo en crecimiento y al cristalizarse constituye la nueva matriz del material. Se ha encontrado que el trabajo de la DBE está asociado con la acción de otro grupo de enzimas ISA1, ISA2 e ISA3 (Mukerjee y Robyt, 2005; Smith, 2005) y que se requiere la acción concertada de otras enzimas como la almidón fosforilasa (enzimaP), la lucanotransferasa (enzimaD), la UDPglucosa (amilogenina), la isoamilasa 1, la proteína RI y la ADP-glucosapirfosfatasa. Recientemente se ha demostrado que varias enzimas relacionadas con la degradación del almidón como β amilasa, α amilasa, enzimas D, α glucosidasa (maltosa), α -1,4 glucanotransferasa, glucano – H₂O dikinasa (GWD) y α glucano fosforilasa actúan también en la síntesis de almidón (Tabla 3) (Baguma *et al.*, 2003; Jobling, 2004; Smith, 2005).

Degradación del almidón en los plastidios

De manera similar al proceso de síntesis del almidón, en la degradación realizada tanto en los plastidios foliares como en los de los vertederos, se conoce la casi totalidad de las enzimas implicadas pero se desconocen los detalles de la regulación del funcionamiento de las mismas (**Tabla 3**). Recientemente se ha encontrado que las diferencias en el dominio de ligamiento entre el almidón y las enzimas degradativas influyen su capacidad amilolítica (Tetlow *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2005).

La amilasa apoplástica (β -amilasa) presente en las paredes celulares de los órganos en crecimiento de gramíneas cataliza la hidrólisis y remoción de unidades sucesivas de maltosa del extremo no reducido de la cadena de glucanos. La α -amilasa hidroliza los enlaces glucosil α -(1-4) del almidón, genera malto oligosacáridos lineales y ramificados que a su vez producen glucosa, maltosa y un amplio rango de α -dextrinas límite. La fosforilasa del almidón también puede degradar los enlaces glicosílicos. La GWD controla putativamente la tasa general de rompimiento del almidón. A partir del estudio de mutantes de *Arabidopsis* se sugiere que la proteína D es fundamental en la degradación del almidón al igual que la proteína R1 y su producto (residuos glucosil fosforilados de amilopectina). El análisis del metabolismo del almidón en el mutante de la enzima fosforilasa del almidón (enzima P) de *Arabidopsis* indica que se requiere fosforilación previa para la degradación del almidón. Recientemente se ha evidenciado la preponderancia de la β -amilasa y la GWD en la ruptura del almidón transitorio (Uno-Okamura, *et al.*, 2004; Lloyd *et al.*, 2005).

ASPECTOS PRINCIPALES DEL CONTROL REFINADO DE LAS RUTAS METABÓLICAS DEL ALMIDÓN.

La regulación de la síntesis del almidón está relacionada con una red flexible pero compleja de reacciones catabólicas y anabólicas altamente interactivas que ocurren en el citosol y los plastidios. Por otro lado existe evidencia que sugiere que la totalidad de la red de regulación de la síntesis se sustenta en la genética, el estado metabólico celular y en factores ambientales (Baguma, 2003; Mukerjea, *et al.*, 2005).

Regulación del metabolismo del almidón por el estado de desarrollo de la planta

La regulación de los genes de la síntesis de almidón durante el desarrollo de la planta está gobernada por el interjuego entre control genético, actividad mitótica, histodiferenciación y estado metabólico celular (Tabla 3). En cebada, haba, trigo y maíz se ha demostrado que la expresión de los genes asociados con el almacenamiento está influida por los cambios en los niveles de sacarosa dependientes de la histodiferenciación y presenta perfiles de expresión específicos de acuerdo con la isoforma (Baguma *et al.*, 2003; Mukerjea, *et al.*, 2005; Muñoz *et al.*, 2005).

Regulación del metabolismo del almidón por la luz

Se ha registrado que la expresión de algunos genes relacionados con el metabolismo del almidón está ajustada al ritmo circadiano de la planta mediante un mecanismo de control por luz similar al encontrado en la fotosíntesis en el sistema del fitocromo. Este mecanismo común permite la activación simultánea por la luz de la fotosíntesis y el metabolismo del almidón para garantizar el balance entre el carbono fijado durante la fase bioquímica de la fotosíntesis y el metabolismo del almidón. En papa se han registrado mecanismos de regulación diurna del contenido de una gama amplia de metabolitos primarios y carbohidratos (Urbanczyk-Wochniak *et al.*, 2005). Se han identificado elementos G, GT1 y GATA que responden a la luz para promover la transcripción de algunos genes de la síntesis de almidón. Adicionalmente se han descrito elementos, que también actúan en forma cis, los cuales se ligan a factores de transcripción específicos en el promotor gbsbI de *Antirrhinum majus* y sbe2-1 en *Arabidopsis*. La oscilación diurna conjunta de AGPasa en

Chlamydomonas, GBSSI y SSII en *A. majus* sugiere que hay efecto regulatorio circadiano. En análisis de micro arreglos se ha encontrado que varios genes de *Arabidopsis* que codifican para enzimas de síntesis y degradación del almidón [por ejemplo isoformas cloroplásticas de α - y β -amilasa, maltosa, glucano- H₂O dikinasa (GWD), *sbe2-1*], están bajo la influencia del reloj circadiano al igual que el suministro del carbono desde la ruta del almidón hacia la ruta de la lignina (**Tabla 3**) (Baguma, 2004; Tetlow *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004; Rogers, *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2005).

Señalización por azúcares de la biosíntesis del almidón

La señalización por azúcares es un fenómeno bien establecido en muchas plantas, está relacionada con tres pasos críticos: percepción del azúcar/señal, transducción de señales y la acción en los genes objetivo. Por ejemplo, los genes de la síntesis de almidón, el promotor de la patatina y el gen $\text{At}\beta\text{-Amy}$ que codifica la β amilasa son activados por la sacarosa. Contrariamente, la expresión de la α - amilasa es reprimida por ésta. Se ha registrado en *Arabidopsis* el activador transcripcional ASML1/WRI1, asociado a los genes sensibles al azúcar y al control del flujo de carbono en la semilla. A pesar de esta evidencia no se sabe cómo los efectos del azúcar son percibidos y/o transducidos a los genes objetivo, aunque los HXK (hexokinasa) se han identificado e implicado en el proceso (Baguma *et al.*, 2003). Sin embargo, recientemente, fue identificado un sensor de sacarosa que funciona putativamente como un transportador activo de sacarosa o como una señal metabólica derivada. Por otro lado, se han identificado y clonado en muchas especies los genes (*SUT11*, *SUC2*) implicados en la codificación del transportador sacarosa- H⁺ que actúa en el transporte activo de sacarosa al floema. El modo de transporte de la sacarosa y la naturaleza de los transportadores están relacionados con los cambios en pH extracelular y del potencial de la membrana. En este punto se presenta activación de la H⁺ - AT Pasa de la membrana plasmática (**Tabla 3**) (Muñoz *et al.*, 2005; Rogers *et al.*, 2005; Sasaki *et al.*, 2005; Masaki *et al.*, 2005).

Por otro lado, la AGPasa, una enzima clave en la regulación del almidón en los plastidios de los tubérculos de papa, está sujeta a modificaciones redox postraduccionales en respuesta a la luz y los azúcares. Algunos de los componentes de la ruta de señales ocasionan cambios en el nivel de azúcar citosólico de los plastidios (Geigenberger *et al.*, 2004).

Señalización hormonal en la biosíntesis del almidón

Se ha demostrado que el ácido abscísico (ABA) incrementa el papel inductivo de los azúcares sobre la expresión de los genes *Apl3* y *sbe2.2* en *Arabidopsis*. Algunos mutantes insensibles al ABA son también defectuosos en la percepción de azúcares y viceversa. Lo anterior indica que una ruta de transducción específica relacionada con el ABA participa en la percepción de los azúcares (Baguma, 2004; Tetlow *et al.*, 2004). Otros fitorreguladores que afectan el metabolismo del almidón son las giberelinas y las citocininas. Las giberelinas actúan en el desarrollo de las semillas de *Arabidopsis*, mediante la inducción de los genes de α -amilasa. Algunos investigadores sugieren que las citocininas también juegan un papel crucial en la partición de la biomasa y en la moderación de la potencia relativa del vertedero (**Tabla 3**) (Kim *et al.*, 2005a).

Modulación alostérica de la biosíntesis del almidón por diversos metabolitos.

Las actividades de gran número de enzimas implicadas en la biosíntesis del almidón presentan modulación por moléculas efectoras que con frecuencia son metabolitos intermediarios. Por ejemplo, la AGPasa en las plantas superiores es estimulada por el 3- fosfoglicerato (3-PGA) e inhibida por el ortofosfato inorgánico. La sensibilidad relativa a estos metabolitos depende de la clase de tejido, del tipo de plastidio o de la ubicación subcelular de la enzima. La isoforma Pho1 de la enzima almidón fosforilasa es inhibida fuertemente por concentraciones fisiológicas de ADP glucosa. La enzima de ramificación del almidón (SBE) es controlada por un gran número de

metabolitos; en particular, la forma SBEI en trigo es estimulada por Pi. En mutantes de maíz se observa que las altas concentraciones de sacarosa actúan inhibiendo la actividad de la enzima SBE tipo polulonasa (**Tabla 3**) (Tetlow *et al.*, 2004; Walters *et al.*, 2004; Zhou y Chen, 2005).

Modificaciones postraduccionales en las enzimas de la biosíntesis del almidón

Las modificaciones postraduccionales en el metabolismo del almidón están relacionadas con mecanismos de fosforilación, ajuste mediante el potencial redox, formación de complejos multiproteínicos y la actividad de las proteínas tipo 14-3-3. Las modificaciones postraduccionales posibilitan el balance entre los componentes del metabolismo general de la planta de acuerdo con el estado de desarrollo y las fluctuaciones ambientales. Además permiten la regulación del nivel metabólico entre compartimientos celulares. Por ejemplo, la trehalosa, que se produce en el citosol estimula la síntesis de almidón dentro de los plastidios al participar en la activación de la ADP-glucosa pirofosforilasa mediante modificación redox en respuesta al nivel de azúcar citosólico. La luz también induce modificaciones similares en la enzima (Tabla 3) (Kolbe *et al.*, 2005).

Ajuste del metabolismo del almidón mediante el potencial redox.

Existe evidencia de que la reducción de enlaces disulfido puede regular el almacenamiento y la partición del almidón en las plantas. La síntesis foliar de almidón en un amplio rango de plantas es controlada por la regulación redox de la enzima DBE del tipo pululonasa como se ha hecho evidente en hojas de espinaca y en el endospermo de cebada y maíz. Estudios *in vitro* de β -amilasa sugieren la existencia de actividad reversible vía intercambios disulfídicos. En papa la modificación post traduccional de AGPasa involucra la tioredoxina que ocasiona la inactivación reductiva de la enzima al suministrar sacarosa a los tubérculos. El sitio de regulación puede ser una cisteína en el sitio 82 (Cys82) de la subunidad pequeña de la enzima (Geigeberger *et al.*, 2004; Tetlow *et al.*, 2004).

Fosforilación proteínica

Estudios preliminares con plastidios heterotróficos sugieren un papel probable para este mecanismo de regulación. En amiloplastos aislados del endospermo de trigo se han identificado numerosas fosfoproteínas, algunas de ellas implicadas en el metabolismo del carbono, lo cual sugiere que algún aspecto de la biosíntesis de amilopectina puede controlarse por la fosforilación proteínica. Las isoformas estromales de SBE y SP (Pho1) presentaron fosforilación en uno o más residuos de serina por proteína kinasas en los amiloplastos. *In vivo* la defosforilación de las fosfoproteínas reduce la actividad de SBEIIa y SBEIIb en amiloplastos y SBEIIa en cloroplastos. Las fosfoproteínas también se detectaron en gránulos de almidón de amiloplastos del endospermo de trigo (Ritte *et al.*, 2004; Tetlow *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Mustroph *et al.*, 2005).

Formación de complejos multiproteínicos

Un mecanismo potencialmente importante para la coordinación de múltiples acciones de las proteínas involucradas en la síntesis de almidón es la interacción proteína-proteína. Los efectos pleiotrópicos producidos por algunas mutaciones en genes individuales asociados a la biosíntesis del almidón pueden atribuirse a asociación proteínica. Se han observado efectos pleiotrópicos asociados al mutante de *Arabidopsis* con deficiencia en el transportador TPT como producción excesiva de almidón, agotamiento de las hexosas del cloroplasto, restricción del transporte electrónico, reducción en la tasa de fotosíntesis y del crecimiento general de la planta (Walters *et al.*, 2004).

Otros ejemplos de interrupciones de asociaciones proteínicas en el metabolismo del almidón incluyen al mutante de amilosa extender (*ae*), que pierde la actividad de SBEII, pérdida de actividad

de SBEI y también alteraciones de las propiedades de DBE (sul-st) tipo isoamilasa. Adicionalmente, en los mutantes ZPUL-204 SUL-ST el polipéptido acumulado de la enzima SBEIIa, es inactivo en niveles normales, lo cual sugiere la posibilidad de modificaciones postraduccionales e interacciones alteradas con DBEs. Por otro lado, las isoformas III y IV de SS influenciaron la expresión de las enzimas GBSS, SSII, ADP- glucosa pirofosforilasa y la enzima de ramificación (Dian *et al.*, 2005).

La mutación *ae* en el endospermo de arroz causa reducción significativa en la actividad de la enzima soluble sacarosa sintetasa I. El mutante sex 6 de SSIIa en cebada sugiere que las proteínas asociadas al gránulo de almidón forman complejos proteínicos cuya ruptura ocasiona desligamiento del SSI, SBEIIa y SBEIIb dentro de la matriz del gránulo, sin deterioro de la afinidad por la amilopectina (Tetlow *et al.*, 2004).

La inactivación de un gene de la subunidad grande de la AGPasa reduce el nivel de almidón y aumenta el contenido de amilopectina. La fosforilación de SBEI, SBEIIb y SP por la proteinaquinasas plastídicas consolida un complejo proteínico. La formación de complejos de las enzimas del metabolismo del almidón mediante la interacción proteína-proteína puede alterar directamente las propiedades cinéticas de los componentes individuales (Tetlow *et al.*, 2004; Dauvillé *et al.*, 2001).

Ajuste asociado con el efecto de las proteínas tipo 14-3-3

La regulación directa de la actividad enzimática o de series de reacciones por la formación de complejos proteínicos involucra, en algunos casos, la fosforilación de proteínas objetivo seguida por la formación de un complejo con proteínas 14-3-3. Se han identificado isoformas de estas proteínas en los cloroplastos de las hojas de arveja y en el almidón del polen de maíz inmaduro. La supresión de estas proteínas ligadas al gránulo en *Arabidopsis* ocasiona la acumulación de almidón foliar y se especula que un posible blanco para ellas es SSIII, debido a la fosforilación de un motivo de ligamiento conservado 14-3-3 putativo que ocasiona la inactivación de la enzima. Las isoformas, T14-3d y T14-3g, interactúan con la SPS en tabaco con afinidad y especificidad funcional diferente asociada a la variabilidad de su extremo C Terminal (Tetlow *et al.*, 2004; Börnke, 2005).

ALMIDONES ESPECIALES PARA LA INDUSTRIA Y LA ALIMENTACIÓN

La industria de almidones genera mundialmente riqueza económica y social (valor estimado de US\$20 mil millones). En el caso del maíz existe una amplia variabilidad de mutaciones que dan lugar a diferentes tipos de almidón (ceroso, dulce, opaco, tipo crispeta, etc) las cuales han sido ampliamente explotadas. En otros cultivos, entre ellos la yuca, no se han identificado mutaciones naturales del almidón (FAO/FIDA, 2000).

Almidones con alto contenido de amilosa

La producción de niveles elevados de amilosa (70-90%) por algunos genotipos de maíz y otros cereales se debe a una mutación en el gen que codifica para (SBE I y II) "amilosa extender". Investigaciones en papa indican que los contenidos de amilosa superiores al 60%, se deben a la inhibición tanto en SBEI como en SBE II. En cebada un mutante sex6, deficiente en la actividad de la enzima SSIIa, ocasiona el aumento del contenido de amilosa. Este tipo de almidón especial es importante para la fabricación de golosinas debido al alto poder de gelificación. Se ha identificado otro tipo de almidones especiales, por ejemplo una nueva línea de papa dulce, debido a la mutación de almidón sintetasa y raíces de yuca con alto contenido de azúcar libre asociadas a la disrupción en las actividades de las enzimas ADPG pirofosforilasa y de ramificación (Castelo Branco *et al.*, 2004; Jobling, 2004).

Almidón tipo ceroso

El almidón ceroso (waxy) de bajo contenido de amilosa es de bajo contenido de grasa y de alta digestibilidad, por lo cual es de importancia en la producción de alimentos. Este almidón se produce por transformación y mutagénesis del gene (GBSS) especialmente en cereales. También es útil en la

industria de películas y adhesivos por su baja retrogradación (Jobling, 2004). Las consecuencias fisiológicas y fisicoquímicas de esta mutación se han caracterizado en diversas especies como en líneas deficientes de trigo con diferentes combinaciones de presencia y ausencia de las proteínas: Wx-A1, Wx-B1 y Wx-D1. Adicionalmente, en alelos nulos Wx de sets de líneas recombinantes de sustitución (cromosomas 7A, 4A y 7D) no se afectó el grado de ramificación de la amilopeptina. De manera similar se observó que la ausencia de algunos de los tres genes estructurales de GBSS en trigo de pan ocasiona la reducción parcial o ausencia de amilosa en el almidón (Boggini *et al.*, 2001; Miura, *et al.*, 2002).

METODOLOGÍAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL ALMIDÓN Y SU METABOLISMO

La importancia del almidón en la alimentación y la industria hace necesario el desarrollo de técnicas nuevas y baratas para la evaluación cualitativa y cuantitativa de características determinantes de la utilidad potencial como la afinidad por el yodo (IA), la longitud promedio de la cadena, el grado de polimerización, el peso promedio y la distribución molecular, entre otras. El avance en el estudio del metabolismo y caracterización del almidón requiere la integración de análisis genómicos, bioquímicos y físicos. Por ejemplo, los análisis basados en espectrometría/purificación por afinidad en tándem (TAP-MS) facilitan la identificación *in vivo* de los componentes de los complejos proteínicos de las enzimas implicadas en el metabolismo del almidón, así mismo las técnicas basadas en espectrometría de masas (MS) permiten la identificación de modificaciones post traduccionales de las enzimas como la fosforilación. Las diferentes técnicas de microscopía y difracción de rayos X, se utilizan para la caracterización de la microestructura del gránulo de almidón y la distribución de las moléculas que lo componen. Por otro lado, el análisis de control de flujo metabólico, es una herramienta importante en el estudio de la regulación de la

Tabla 4. Metodologías para el estudio del metabolismo del almidón.

Metodologías	Alcance de los estudios	Especie	Autores
difracción de rayos X; analizador laser de partículas; digestión isoamilasas; determinación de amilosa por yodo-colorimetría; determinación de glucosa por glucosa oxidasa-peroxidasa; análisis de alfa-poliglucanos; protein blot; hidrólisis enzimática.	cuantificación del almidón. caracterización fisico-química del gránulo y sus macromoléculas componentes	yuca; maíz, trigo papa y arroz	(Demiate <i>et al.</i> , 2001; Walters <i>et al.</i> , 2004; Castelo Branco <i>et al.</i> , 2004; Rickard <i>et al.</i> , 1991)
análisis cromatográficos GPC y HPAEC; flujo de separación por tamaños y formas (FFF); digestión por isoamilasas; cromatografía (SEC); reómetro; resonancia del gradiente de pulsaciones del campo magnético nuclear PFG-nmr; microscopía; sistema de electro separación capilar (CEC).	discriminación de los componentes del almidón	papa, maíz, trigo y arroz	(Wahlund <i>et al.</i> , 2002; Bertoft, 2002; Yasui <i>et al.</i> , 2005; Baker 2001; Vermeylen <i>et al.</i> , 2001; Santacruz <i>et al.</i> , 2002; Jobling, 2004; Callaghan y Lelievre, 1985; Yoo y Yoo, 2005)
cuantificación de carbohidratos; partición de asimilados mediante CO ₂ radioactivo; la genética reversa basada en PCR; microarreglos; cromatografía (SEC); cromatografía de intercambio catiónico; digestión por isoamilasas; cinética michaeliana; immunoblot; hibridaciones Northern; TAP-MS (espectrometría/purificación por afinidad en tándem)/MS espectrometría de masas; cuantificación del intercambio gaseoso; clorofila fluorescente.	cuantificación del almidón/ relación con el desarrollo general de la planta. caracterización bioquímica y molecular.	<i>Arabidopsis</i> . Maíz; Células humanas. papa, maíz waxy y caña; arroz	(Walters <i>et al.</i> , 2004; Blauth <i>et al.</i> , 2002; Lloyd <i>et al.</i> , 2005; Schäfer <i>et al.</i> , 2005; Dian <i>et al.</i> , 2005; Salomón <i>et al.</i> , 2003; Manelius y Bertoft, 2002; Larkin <i>et al.</i> , 2003; Rodríguez <i>et al.</i> , 2005)
espectrofotometría; Differential Scanning calorimeter (DSC); Rapid Visco Analyzer (RVA); DSC; dispersión del ángulo de los rayos X, Bravender; microscopía.	caracterización fisico-química del almidón	uyuco, arracacha y papa; <i>Artocarpus</i> ; maíz normal, dulce, con alto contenido de amilosa y waxy; trigo; arroz	(Espín <i>et al.</i> , 2004; Tulyathan <i>et al.</i> , 2002; Singh <i>et al.</i> , 2005; Buleón, 2002; Pérez <i>et al.</i> , 1999; Larkin <i>et al.</i> , 2003; Bao y Corke, 2003; Charles <i>et al.</i> , 2004; Vermeylen <i>et al.</i> , 2001)
tiling	detección de mutaciones en la secuencia de genes específicos de las enzimas/almidón	papa, maíz, <i>Arabidopsis</i>	(Mc Callum <i>et al.</i> , 2000; Ahloowalia <i>et al.</i> , 2001; Henikoff y Comal, 2003; Till <i>et al.</i> , 2003; Slade <i>et al.</i> , 2005)

conversión de sacarosa a almidón (**Tabla 3**) (Blennow *et al.*, 2002; Salomón *et al.*, 2003; Bornke, 2005; Kolbe *et al.*, 2005; Geigenberger *et al.*, 2004; Korban, 2005; Demiate *et al.*, 2001). En la (**Tabla 4**) se relacionan algunos trabajos desarrollados para la identificación y caracterización de las enzimas, las moléculas involucradas en la ruta biosintética del almidón y su interacción en la dinámica de la formación del gránulo.

MUTAGÉNESIS E INGENIERÍA GENÉTICA EN EL MEJORAMIENTO DEL ALMIDÓN

Mundialmente se han producido, en los últimos 70 años, más de 2250 variedades de diferentes especies vegetales por medio de mutaciones inducidas con modificaciones en rasgos como la cantidad y calidad de aceites, proteínas y almidón (Ahloowalia *et al.*, 2004; Micke, 1999). En yuca con el desarrollo de la variedad mutante “TekBankye”, se mejoraron las cualidades culinarias del clon original por el cambio de las propiedades del almidón (Maluszynski *et al.*, 2000).

Además se han desarrollado plantas transgénicas y mutantes como: *ae*, *amf*, *sug*, *wx*, *shr1*, *shr2* y *flo* con características alteradas de almidón en las especies cultivadas: cebada, maíz, pera, arroz, papa y trigo. En papa se ha incrementado en 30% el rendimiento de almidón debido a la alteración de la actividad de la enzima AGPasa por la expresión de un heterólogo de *E. coli* y por el incremento de los niveles de un transportador plastídico ATP-ADP (Chen *et al.*, 2005; Korban, 2005). Otras modificaciones notables en papa y arroz incluyen plantas transgénicas con SBEI antisentido y alteraciones simultáneas de la actividad de la SS. En el último caso se modificaron características como el contenido de almidón, la longitud de las cadenas de glucano, la morfología de los gránulos y las propiedades del almidón. Mediante la inhibición antisentido simultánea de los genes para 3 isoformas de sintetasa de almidón se obtuvo almidón con amilopectinas de cadena corta y baja amilasa (Satoh *et al.*, 2005; Tetlow *et al.*, 2004).

La transformación por *Agrobacterium* en arroz, generó líneas con alta expresión de SBE de *E. coli* con amilopectina de mayor ramificación y predominio de cadenas cortas en comparación con los genotipos salvajes (Kim *et al.*, 2005). También en arroz se han encontrado diferencias estructurales debido a la mutación de SSII en el tipo japónica. En el genotipo de cebada Hymalaya 292, derivado de un cambio individual en *ssIIa*, se encontró un mayor porcentaje de amilosa que en el genotipo original. En avena se han obtenido 17 líneas transgénicas con baja amilosa mediante la inhibición antisentido del gene *gbssI*. En trigo la alteración de la actividad de SBE produce baja amilosa, mayor proporción de gránulos del tipo A y la pérdida de uno o dos de sus genes *gbssI*. En el mutante EM557 que carece de la proteína BEI se afectó la estructura fina de la amilopectina. Adicionalmente, la reducción en la actividad de la proteína ISO1 del endospermo altera notablemente la amilopectina transformándola en parcialmente insoluble en agua (Ahloowalia *et al.*, 2001; Jobling, 2004).

Más recientemente se asoció el mutante deficiente para la isoamilasa *notch2* en cebada con un aparente incremento en fitoglicógeno al igual que en STA8 y STA7 de *Clamidomonas* y *su1* de maíz. Estos presentan cambios en la estructura del almidón y en la expresión de otras enzimas como la isoamilasa. En maíz la alteración de la actividad de la AGPasa condujo al incremento del 18% en el almidón (Dauvillé *et al.*, 2001).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

El funcionamiento del metabolismo del almidón en la planta intacta aún no se ha develado totalmente, debido, en esencia, a su compleja interacción con las respuestas a las fluctuaciones ambientales, a la diversidad de mecanismos de regulación enzimática y la presencia putativa de asociaciones proteínicas entre las enzimas involucradas. Los principales avances en el entendimiento de los aspectos moleculares de la síntesis y degradación del almidón se han obtenido a partir del análisis del genoma completo de arroz y *Arabidopsis* que ofrece una visión global de los genes involucrados en el metabolismo del almidón y las principales diferencias entre los dos sistemas modelo en términos del número de isoformas, especificidad tisular y temporal (Ciereszko,

2005). Adicionalmente, se han observado efectos pleiotrópicos asociados con la modificación de un solo gen lo cual plantea la posibilidad de disrupciones putativas de varios complejos proteínicos o sus asociaciones y por consiguiente la existencia de muchas más interacciones entre enzimas de la ruta de la biosíntesis del almidón de las que se han identificado a la fecha. Una complejidad mayor del metabolismo del almidón se desprende de la variación en la importancia relativa de cada enzima en la formación del gránulo de acuerdo con el nivel de crecimiento de los anillos, cantidad y estructura de este polímero. Adicionalmente, las características de algunas enzimas se alteran continuamente tanto en el funcionamiento individual en el gránulo como en el comportamiento dentro de los diferentes complejos multienzimáticos en respuesta a la genética, estado metabólico celular de la planta y la fluctuación de factores ambientales. El siguiente paso para el entendimiento del metabolismo *in vivo* del almidón es el enfoque multidisciplinario en el que se combinen el análisis bioquímico de los complejos enzimáticos putativos de las enzimas relacionadas con el metabolismo del almidón; la ingeniería metabólica y la bioinformática para identificar los dominios de interacción comunes entre especies y genotipos como por ejemplo, los motivos de ligamiento de las proteínas 14-3-3 (Bornke, 2005; Kolbe *et al.*, 2005; Geigenberger *et al.*, 2004; Ritte *et al.*, 2004; Korban, 2005).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración del doctor Guillermo Riveros y los doctores Hernán Mauricio Romero y Oscar Oliveros, profesores de las Facultades de Agronomía y Biología de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá por la revisión y valoración del manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahloowalia, B; Maluszynsky, M; Nichterlein, K. 2000. Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica* 135:187-201.
- Alonso, AP; Vigeolas, H; Raymond, P; Rolin, D; Dieuaide-Noubhani, M. 2005. A new substrate cycle in plants. evidence for a high glucose-phosphate-to-glucose turnover from *in vivo* steady-state and pulse-labeling experiments with [C-13] glucose and [C-14] glucose. *Plant Physiol.* 138 (4): 2220-2232.
- Ayala, A. 1995. Textura y reología de alimentos. Caracterización de las propiedades reológicas de harinas y almidones. Memorias del seminario de la Universidad del Valle. Cali, abril 21.
- Baguma, Y; Sun, Ch; Ahlandsberg, S; Mutisya, J; Palmqvist, S; Rubaihayo, P; Magambo, M; Egwang, T; Larsson, H & Jansson, C. 2003. Expression patterns of the gene encoding starch branching enzyme II in the storage roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Plant Sci* 164: 833-839.
- Baker, A; Miles, M; Helbert, W. 2001. Internal structure of the starch granule revealed by AFM. 2001. *Carb Res* 330 (2001) 249-256.
- Bao, J; Corke, H. 2002. Analysis of the genetic behavior of some starch properties in indicarice (*Oryza sativa* L.): thermal properties, gel texture, swelling volume *Theor Appl Genet* 104:408-413
- Blauth, S; Kim, K; Klucinec, J; Shannon, C; Thompson, D; Guiltinan, M. 2002. Identification of Mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 1 (sbe1) in *Zea mays* L. *Plant Mol Biol* 48: 287-297.
- Boggini, G; M. Cattaneo, C. Paganoni; P. Vaccino. 2001. Genetic variation for waxy proteins and starch properties in Italian wheat germplasm. *Euphytica* 119: 111-114.
- Börnke, F. 2005. The variable C-terminus of 14-3-3 proteins mediates isoform-specific interaction with sucrose-phosphate synthase in the yeast two-hybrid system. *J Plant Physiol.* 162: 161-168.
- Callaghan, P; Lelievre, J. 1985. The size and shape of amylopectin: A study using pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance. *Biopolymers*, vol.24, 441-460.

- Casanova, M; Hoffman, G; Schrier, A; Fangmeier, A; Jäger, H. 2005. Increase of photosynthesis and starch in potato under elevated CO₂ is dependent on leaf age. *J Plant Physiol.* 162: 429- 438.
- Castelo Branco, L; Batista de Sousa, C; De Mattos Cardo, C; Bloch, C; Campos, L. 2004. Identification and characterization of a novel cassava *Manihot esculenta* Crantz clone with high free sugar content and novel starch. *Plant Mol Biol* 56: 643-659.
- Ciereszko, I; Johansson, H; Kleczkowski L. 2005. Interactive effects of phosphate deficiency, sucrose, and light/dark conditions on gene expression of UDP- glucose pyrophosphorylase in arabidopsis. *J Plant Physiol.* 162: 343-353.
- Cheng Lailiang; Rui Zhou; E. Reidel; T, Sharkey; A, Dandekar. 2005. Antisense inhibition of sorbitol synthesis leads to up-regulation of starch synthesis without altering CO₂ assimilation in apple leaves. *Planta* 220:767-776.
- Chen Shuai; Mohammad H; M, Peisker; H, Tschiersch; U, Sonnewald; F, Börnke. 2005a. Decreased sucrose-6-phosphate phosphatase level in transgenic tobacco inhibits photosynthesis, alters carbohydrate partitioning, and reduces growth. *Planta* 221:479 .492.
- Chopra, J; Kaur N; Gupta A. 2005. Role of enzymes of sucrose-starch conversion in seed sink strength in mung bean. *Biol Plant.* 49 (4): 561-566.
- Demiate, I; Konkel, F; Pedroso, R. 2001. Enzymatic determination of starch in doce de leite using dialysis. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 21(3): 339-342.
- Dennis, D; Blakeley, S. 2000. Carbohydrate metabolism In: Biochemistry & molecular biology of plants. Ed. By B. B. Buchanan, W. Gruissem and R. L. Jones. American Society of Plant Physiologists, Rock Ville, Md., USA.
- Dian, W; H, Jiang; Ping Wu. 2005. Evolution and expression analysis of starch synthase III and IV in rice. *J Exp Bot.* Vol.56,No.412,pp.623-632.
- Dauville E, D; C, Colleoni; G, Mouille; A, Buleon; D, Gallant; B, Bouchet; M, Morell; C, Døhulst; A, Myers; S, Ball. 2001. Two Loci Control Phytoglycogen Production in the Monocellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* *Plant Physiol.*, Vol. 125, pp. 1710–1722.
- Dubos, C; J Willment; D, Huggins; G, Grant; M, Campbell1. 2005. Kanamycin reveals the role played by glutamate receptors in shaping plant resource allocation. *Plant J* (2005) 43, 348–355
- Espín, S; Villacrés, E; Brito, B. 2004. Caracterización físico - química, nutricional y funcional de raíces y tubérculos andinos, Universidad Central del Ecuador. In: Raíces y tubérculos andinos capítulo IV pp 91-126. Ecuador.
- Fao/Fida, 2000. La economía mundial de la yuca: hechos, tendencias y perspectivas. Roma. 60 p.
- Gutiérrez-Miceli, Fa; Rodríguez-Mendiola, Ma; Ochoa-Alejo, N; Méndez-Salas, R; Arias-Castro, C; Dendooven, L. 2005. Sucrose accumulation and enzyme activities in callus culture of sugarcane. *Biol. Plant* 49 (3): 475-479.
- Geigenberger, P; A, Kolbe; A, Tiessen. 2004. Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. *J Exp Bot* 55(406):2131-2145.
- Henikoff, S; Comai, L. 2003. Single-Nucleotide mutations for plant functional genomics. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:375-401.
- Hopkins, W; Huner, N. 2004. Introduction to plant Physiology. New York: John Wiley.
- Ishimaru, T; Hirose, T; Matsuda, T; Goto, A; Kazunari, T; Sasaki, H; Terao, T; Ishii, R; Ohsugi, R; Yamagishi, T. 2005. Expression Patterns of Genes Encoding Carbohydrate-metabolizing Enzymes and their Relationship to Grain Filling in Rice (*Oryza sativa* L.): Comparison of Caryopses Located at Different Positions in a Panicle. *Plant Cell Physiol.* 46(4): 620–628.
- Jobling, S. 2004. Improving starch for food and industrial applications. *Curr Opinion Plant Biol.* 7:210- 218.
- Kim, W; Kim, J; Krishnan, H; Nahm, B. 2005. Expression of Escherichia colibranching enzyme in caryopses of transgenic rice results in amylopectin with an increased degree of branching. *Planta* 220: 689–695.

- Kim, Yc; Nakajima, M; Nakayama, A; Yamaguchi, I. 2005a. Contribution of gibberellins to the formation of Arabidopsis seed coat through starch degradation. *Plant Cell Physiol.* 46 (8): 1317-1325.
- Kolbe, A; A, Tiessen; H, Schluepmann; M, Paul; S, Ulrich; P, Geigenberger. 2005. Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc Nat Acad Sci* 102 (31): 11118-11123 Aug 2 2005.
- Korban, S. 2005. Genetic and metabolic engineering for value- added traits. *Crop Sci.* 45:435-436.
- Larkin, P; Mcclung, A; Ayre, N; Park, W. 2003. The effect of the Waxy locus (Granule Bound Starch Synthase) on pasting curve characteristics in specialty rices (*Oryza sativa* L.) *Euphytica* 131: 243–253.
- Lee, Jw; Lee, Ds; Bhoo, S; Jeon, Js; Lee, Yh; Hahn, Tr. 2005. Transgenic *Arabidopsis* plants expressing *Escherichia coli* pyrophosphatase display both altered carbon partitioning in their source leaves and reduced photosynthetic activity. *Plant Cell reports* 24 (6): 374-382.
- Lu, Y; Gehan, Jp; Sharkey, T. 2005. Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose *Met Plant Physiol* 138 (4): 2280-2291.
- Lytovchenko, A; Schauer, N; Willmitzer, L; Fernie, A. 2005. Tuber-specific Cytosolic Expression of a Bacterial Phosphoglucomutase in Potato (*Solanum tuberosum* L.) Dramatically Alters Carbon Partitioning. *Plant Cell Physiol.* 46(4): 588–597.
- Lloyd, J; Kossmann, J; Ritte, G. 2005. Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends Plant Sci* Vol.10 No.3: 130-137.
- Maluszynski M, K; Nichterlein K, L; Van Zaten, L & Ahloowalia, S. 2000. Officially released mutant varieties – The FAO/IAEA database. En: Mutation Breeding Review. No 12.
- Manelius, R; Bertoft, E. 2005. Studies on the substitution pattern of cationic starch using enzymes. Third Nordic Starch Network Symposium. Institute of Life Sciences, Aalborg, Denmark. November 24-25. 18 pp.
- Masaki T; Mitsui, N; Tsukagoshi, H; Nishii, T; Morikami, A; Nakamura, K. 2005. ACTIVATOR of Spo min ::LUC1/Wrinkled1 of Arabidopsis thaliana Transactivates Sugar-inducible Promoters. *Plant Cell Physiol.* 46(4): 547–556 .
- Mclauchlan, A; Ogbonnaya, F; Hollingsworth, B; Carter, M; Gale, K; Henry, R; Holton, T; Morell, M; Rampling, L; Sharp, P; Shariflou, M; Jones, M; Appels, R. 2001. Development of robust PCR-based DNA markers for each homoeo-allele of granule-bound starch synthase and their application in wheat breeding programs. *Aust J Agric Res.* 52(11-12):1409-1416.
- Mccallum, C; Comai, L; Greene, E & Henikoff, S. 2000. Targeting Induced Local Lesions in Genomes (TILLING) for Plant Functional Genomics. *Plant Physiol.* 123: 439-442.
- Micke, A. 1999. Breeding in Crop Plants: Mutations & *in vitro* Mutation Breeding; Editors Bahar A. Siddiqui and Samiullah Khan; Kalyani Publishers, Ludhiana (India) p. 1-19.
- Minchin, P; Lacoite, A. 2005. New understanding on phloem physiology and possible consequences for modelling long-distance carbon transport. *New Phytol* 166.771-779.
- Miura, H; M, Wickramasinghe; R, Subasinghe; E, Araki; K, Komae. 2002. Development of near-isogenic lines of wheat carrying different null Wx alleles and their starch properties. *Euphytica* 123: 353–359.
- Mustroph, A; Albrecht, G; Hajirezaei, M; Grimm, B; Biemel, Ts. 2005. Low levels of pyrophosphate in transgenic potato plants expressing *Ecoli* pyrophosphatase lead to decreased vitality under oxygen deficiency. *Ann Bot.* 96 (4) 717-726.
- Mukerjea, R; Robyt, Jf. 2005. Starch biosynthesis: further evidence against the primer nonreducing-end mechanism and evidence for the reducing-end two-site insertion mechanism. *Carb Res* 340 (13): 2206-2211.
- Muñoz, F; Baroja-Fernández, E; M, Morán-Zorzano; A, Viale; E, Etxeberria; N, Alonso-Casajús; J, Pozueta-Romero. 2005. Sucrose Synthase Controls Both Intracellular ADP Glucose Levels and Transitory Starch Biosynthesis in Source Leaves. *Plant Physiol.*, Vol. 138, pp. 663-674.

- Nishi Aiko; Yasunori Nakamura, Naoki Tanaka; Hikaru Satoh. 2005. Biochemical and Genetic Analysis of the Effects of Amylose-Extender Mutation in Rice Endosperm. *Plant Physiol.*, Vol. 137, pp. 43-56.
- Pérez, E; Borneo, R; Melito, C; Tovar, J. 1999. Chemical, physical and morphometric properties of peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza* B.) starch. *Acta Cient Venez* 50: 240–244.
- Rodríguez, R; Ruiz, B; Guyot, J; Sánchez, S. 2005. Starch-binding domain affects catalysis in two lactobacillus α -amylases. *Appl Envir Microbiol*, Vol. 71, No. 1, p. 297–302.
- Rogers, La; C, Dubos; If, Cullis; C, Surman; M, Poole; J, Willment; S, Mandsfield; Mm, Campbell. 2005. Light, the circadian clock, and sugar perception in the control of lignin biosynthesis. *J Exp Bot* 56(416): 165
- Sahrawy, M; Ávila, C; Chueca, A; Canovas, F; López, J. 2004. Increased sucrose level and altered nitrogen metabolism in Arabidopsis thaliana transgenic plants expressing antisense chloroplastic fructose-1,6-bis phosphatase. *J Exp Bot.*, Vol.55, No.408, pp.2495 –2503.
- Santacruz, S; Andersson, R; Åman, P. 2002. Amylose and amylopectin characterisation of potato leaf starch Third Nordic Starch Network Symposium. Institute of Life Sciences, Aalborg, Denmark. November 24-25. 24pp.
- Satoh, H; A, Nishi; K, Yamashita; Y, Takemoto; Y, Tanaka; Y, Hosaka; A, Sakurai; N, Fujita; Y, Nakamura. 2005. Starch-Branching Enzyme I-Deficient Mutation Specifically Affects the Structure and Properties of Starch in Rice Endosperm. 2005. *Plant Phys.*, Vol. 133, pp. 1111–1121.
- Sasaki, H; Edo, E; Uehara, N; Ishimaru, T; Kawamitsu, Y; Suganuma, S; Ueda, D; Ohsugi, R. 2005. Effect of sucrose on activity of starch synthesis enzymes in rice ears in culture. *Physiol Plant*. 124:301-310.
- Schäfer, W; Rohwer, J; Botha, F. 2005. Partial purification and characterisation of sucrose synthase in sugar cane. *J Plant Physiol*. 162: 11-20.
- Schöning, U; Kollmann, R. 1997. Phloem translocation in regenerating in vitro heterografts of different compatibility. *J Exp Bot* Vol 48 N° 307, pp 289- 295.
- Scott, G; Rosegrant, M; Ringler, C. 2000. Tendencias y proyecciones para los cultivos de raíces y tubérculos para el año 2020. Alimentos, Agricultura y Medio Ambiente. Documento de discusión IFPRI-CIP. Washington, DC.
- Shuai Chen; M. Hajirezaei; M. Peisker; H. Tschiersch; U. Sonnewald; F. Börnke. 2005. Decreased sucrose-6-phosphate phosphatase level in transgenic tobacco inhibits photosynthesis, alters carbohydrate partitioning, and reduces growth. *Planta* (2005) 221: 479–492
- Singh, N; Singh, K; Kaur, M. 2005. Physicochemical Properties Including Granular Morphology, Amylose Content, Swelling and Solubility, Thermal and Pasting Properties of Starches from Normal, Waxy, High Amylose and Sugary Corn. Progress in food biopolymer research. Vol 1: 44- 56 pp.
- Slade, Aj; Fuerstenberg, Si; Loeffler, D; Steine, Mn & Facciotti, D. 2005. A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nat Biotech*. 23(1):75-81.
- Smith, S; D, Fulton; T, Chia; D, Thorncroft; A, Chapple; H, Dunstan; C, Hylton; S, Zeeman; A, Smith. 2004. Diurnal Changes in the Transcriptome Encoding Enzymes of Starch Metabolism Provide Evidence for Both Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Starch Metabolism in Arabidopsis Leaves. *Plant Physiol.*, Vol. 136, pp. 2687–2699.
- Smith, A. 2005. How plants make and degrade starch granules. In Proceedings Starch Update 2005: The third conference on Starch Technology: 7-13 p. 4-5 november- 2005 Bangkok, Thailand.
- Till, B; Reynolds, S; Greene, E; Codomo, C; Enns, L; Johnson, J; Burtner, C; Odden, A; Young, K; Taylor, N; Henikoff, J; Comai, L & Henikoff, S. 2003. Large-Scale Discovery of Induced Point Mutations With High-Throughput tilling. *Genom Res* 13: 524-530.
- Tester, R; Karkalas, J; Qi, X. 2004. Starch structure and digestibility Enzyme-Substrate relationship. *World's Poul Sci J*, Vol. 60: 186-196.

- Tetlow, I; M, Morell; M, Emes. 2004. Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J Exp Bot* Vol 55 N° 406 pp 2131- 2145.
- Tulyathan, V; Tananuwong, K; Songjinda, P; Jaiboon, N. 2002. Some Physicochemical Properties of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam) Seed Flour and Starch. *Science Asia* 28 : 37-41.
- Uno-Okamura, K; Sogaa, K; Wakabayashia, K; Kamisakab, S; Hosona, T. 2004. Purification and properties of apoplastic amylase from oat (*Avena sativa*) seedlings. *Physiol Plant*. 121: 117–123.
- Urbanczyk-Wochniak, E; Baxter, C; Kolbe, A; Kopka, J; Sweetlove, Lj; Fernie A. 2005. Profiling of diurnal patterns of metabolite and transcript abundance in potato (*Solanum tuberosum*) leaves. *Planta* 221 (6): 891-903.
- Vermeulen, R; B. Goderis; V, Derycke; Ge, Vandeputte; E, Theunissen; Mhj, Koch; Ja, Delcour And H, Reynaers. 2001. Influence of molecular structure on annealing properties of starch. AACC Annual Meeting ,Oral presentation/Program Book p.108.
- Wahlund, K; Seungho, Lee; Van Bruijnsvoort, M; Nilsson, G; Andersson, M; Arfvidsson, C. 2002. Molar mass distributions by FIFFF-MALS-RI of amylopectin, cationic amylopectin, and modified starches. Recent developments in the study of starch structure Third Nordic Starch Network Symposium. Institute of Life Sciences, Aalborg, Denmark. November 24-25.13pp.
- Wei-Liang Chen; Dong-Jiann Huang; Pang-His Liu; Heng-Long Wang; Jong-Ching Su; Ping Dulee. 2001. Purification and characterization of sucrose phosphate synthase from sweet potato tuberous roots. *Bot Bull Acad Sin.*42:123-129.
- White, Pj. 1994. Property of corn starch. In: Specialty corns. Ed. By A. R. Hallauer. CRC Press, Boca Ratón, Fla, USA.
- Yasui, T; Sasaki, T; Matsuki, J. 2005. Variation in the chain-length distribution profiles of endosperm starch from *Triticum* and *Aegilops* species. *Starch* 57: 521-530.
- Yoo, D; Yoo, B. 2005. Rheology of Rice Starch-Sucrose Composites. *Starch/Stärke* 57: 254 –261.
- Zhang Xiaoli; C, Colleoni; V, Ratushna; M, Sirghie-Colleoni; M, James; A, Myers. 2004. Molecular characterization demonstrates that the *Zea mays* gene sugary2 codes for the starch synthase isoform SSIIa. *Plant Mol Biol* 54: 865–879.
- Zhongyi, LI; G, Mouille; B, Kosar-Hashemi; S, Rahman; B, Clarke; K, Gale; R, Appels; M, Morell. 2005. The Structure and Expression of the Wheat Starch Synthase III Gene. Motifs in the Expressed Gene Define the Lineage of the Starch Synthase III Gene Family. *Plant Physiol.*, Vol. 138, pp. 184-195.
- Zhou, R; Cheng, Ll. 2005. Binding of 3-phosphoglycerate leads to both activation and stabilisation of ADP-glucose pyrophosphorylase from apple leaves. *Funct. Plant Biol.* 32 (9): 839-848.