

Una nueva visión de la degradación del almidón

Lilia Bernal
Investigadora. Escuela de Ciencias Químicas
Universidad La Salle.
E-mail: labg@ulsa.mx

Eleazar Martínez-Barajas
Departamento de Bioquímica
Facultad de Química (UNAM)

Recibido : Agosto de 2005. Aceptado: Octubre de 2005

RESUMEN

Todas las células vegetales sintetizan y degradan almidón en algún punto de su desarrollo; no obstante, existen notables diferencias con relación al destino del almidón producido. En las hojas se sintetiza y acumula durante el día mientras que en la noche se degrada. Esto permite proveer de carbono y mantener diferentes procesos celulares. La regulación de esta vía por lo tanto, deberá estar controlada de tal manera que quede integrada al metabolismo de la planta. La degradación del almidón es un proceso que depende de la estructura del gránulo, de la participación de diversas enzimas y su asociación con el gránulo. Estudios recientes muestran que la degradación del almidón en hojas es diferente a lo que sucede en endospermo y por lo tanto, es necesario construir un modelo particular para este sistema. Los estudios con mutantes y plantas transgénicas muestran que la α -amilasa es responsable de la hidrólisis de la mayor parte del almidón acumulado en hojas y la participación de la β -amilasa parece depender de la especie. Adicionalmente, en este trabajo se propone que las características del gránulo son muy importantes para definir la interacción con las proteínas que van a participar en su degradación.

Palabras clave: gránulo de almidón, degradación de almidón, amilasa, amilopectina, asociación proteína-gránulo de almidón.

ABSTRACT

All plant cells synthesize and degrade starch in determined stage of their development. There are, however, important differences related to its use. In leaves, starch is produced and accumulated at day while it is degraded at night to provide carbon maintaining cellular processes. This means that the pathway regulation is integrated to the whole plant metabolism. Starch degradation is a process that depends on the starch granule structure, the action of several enzymes and the association of these to the starch granule. Recent research reveals that starch degradation in leaves is significantly different from starch endosperm breakdown and these new data have led to build a particular model of this pathway. Studies with mutants and transgenic plants suggest that α -amylase has a major role in the hydrolysis of the accumulated starch in leaves, while the participation of β -amylase is probably species-dependent. Additionally, in this paper is suggested that starch granule characteristics are especially important in regulating the starch interaction between granule and proteins involved in starch metabolism.

Key words: starch granule, starch degradation, amylase, amylopectin, protein-starch granule association.

INTRODUCCIÓN

El almidón es un polímero de glucosa que constituye el principal producto de almacenamiento en semillas y otros órganos (43). Representa el 80% de la ingesta calórica mundial, se utiliza como alimento animal y es una importante materia prima para la industria (10). La importancia económica y social que adquirieron durante el siglo pasado las bebidas alcohólicas producidas a partir de cereales, llevó a una mayor investigación científica dirigida a conocer la naturaleza y regulación del proceso de degradación de almidón en el endospermo, el cual actualmente se entiende con profundidad tanto a nivel bioquímico como molecular (38). Sin embargo, la degradación del almidón en endospermo de cereales puede ser muy diferente a la forma en que este proceso ocurre en otras especies y órganos vegetales.

Todas las células vegetales sintetizan y degradan almidón en algún punto de su desarrollo; no obstante, existen notables diferencias con relación al destino del almidón producido. En órganos de almacenamiento como tubérculos, raíces y embriones puede acumularse por períodos muy largos, en meristemos y órganos en desarrollo la acumulación puede prolongarse por días o semanas, mientras que en las hojas se acumula durante el día y se degrada en la noche. En todos los casos la síntesis y degradación del almidón se llevan a cabo en los plastidios, pero ambos procesos en cada órgano, pueden regularse de manera muy diferente: mientras que el endospermo, al momento de la germinación, puede asemejarse a una bolsa repleta de almidón que recibe a las enzimas hidrolíticas, en las células de las hojas el almidón se degrada y provee de carbono para el mantenimiento de diferentes procesos dentro de la misma; por lo que esta vía debe estar perfectamente integrada a todo el metabolismo. La cantidad de almidón presente en un órgano representa un balance entre los procesos de síntesis y degradación. Si bien existen dudas acerca de algunos puntos críticos del proceso de síntesis, comparativamente se conoce menos acerca del proceso de degradación y de su regulación.

Actualmente se sabe que múltiples isoformas de las enzimas que degradan el almidón, como son α - y β -amilasas, enzimas desramificadoras, almidón fosforilasa, glucosidasas y enzima desproporcionadora están presentes en la mayoría de los órganos estudiados (44). En los últimos años los recursos genómicos disponibles para *Arabidopsis thaliana* y la posibilidad de generar mutantes y plantas transgénicas han contribuido a establecer el papel que cada una de esas enzimas tiene en el proceso.

El objetivo de este trabajo es abordar y discutir el tema de la degradación de almidón desde tres puntos de vista diferentes: el gránulo de almidón, las enzimas involucradas en el proceso y el papel de la interacción gránulo de almidón-enzimas hidrolíticas. Muchos aspectos de la degradación del almidón son comunes a todos los órganos en donde este proceso se ha estudiado; sin embargo, dada la importancia que tiene la degradación del almidón acumulado en las hojas para el desarrollo de las plantas, se buscará hacer énfasis en la regulación de ese proceso en particular.

EL GRÁNULO DE ALMIDÓN

El almidón es una mezcla de polímeros de glucosa (amilosa y amilopectina) que las plantas producen y acumulan en forma de gránulos insolubles que presentan formas y tamaños diversos. Los gránulos son estructuras altamente organizadas cuyas dimensiones y características varían entre especies, los gránulos de tubérculos de papa miden 100 μ m (40), mientras que existen otros de 1-3 μ m como los de raíz de taro o

los de hoja de *A. thaliana* (33, 51). Algunos gránulos tienen forma esférica o son esferoides aplanados con un surco ecuatorial, mientras que otros son poligonales (46).

La amilosa

Es un polímero lineal formado por cadenas de glucosas unidas por enlaces α -1,4, que constituyen el 20-30% del gránulo de almidón en los órganos de almacenamiento y 4-20% en los gránulos provenientes de las hojas (51, 11). Su peso molecular se encuentra en el orden de 10^5 - 10^6 (17). La localización exacta de la amilosa en el gránulo no ha sido determinada de manera concluyente, pero se ha sugerido que se encuentra principalmente en la región menos cristalina, la parte amorfa (15, 8). Se sabe que la amilosa se sintetiza por medio de la acción catalítica de la isoforma de almidón sintasa, que está unida al gránulo (GBSS), pues mutantes que carecen de GBSS en maíz (36), arroz (33, 45), trigo (24), papa, sorgo, amaranto, cebada y chícharo (17), sintetizan gránulos de almidón sin amilosa. Además, los estudios realizados en papa y arroz en los que se logró reducir la expresión de GBSS por medio de la expresión de RNA antisentido produjeron gránulos de almidón con contenido de amilosa considerablemente reducido. Estas mutantes en cereales se denominan “cerosas” debido a que dan como resultado endospermos opacos, los cuales son más susceptibles a la degradación, mientras que los almidones de papa y de maíz con alto contenido de amilosa son más resistentes (8).

No se sabe como la GBSS cataliza la síntesis de amilosa, ni que es lo que impide que las enzimas ramificadoras actúen para generar cadenas laterales, pues aunque la GBSS se encuentra siempre unida al gránulo, existen otras enzimas involucradas en el metabolismo del almidón que tienen capacidad de asociarse con él. Por ello no puede atribuirse la síntesis de amilosa al hecho de que las enzimas ramificadoras no se encuentren permanentemente asociadas al gránulo. Se ha especulado que probablemente la GBSS es la única enzima que mantiene su actividad asociada a los gránulos mientras que las enzimas ramificadoras no lo hacen, o que probablemente existen zonas en los gránulos donde la GBSS si tiene actividad mientras que las otras enzimas no (17).

Por otro lado, se han encontrado enzimas ramificadoras bacterianas que sí son capaces de actuar en regiones del gránulo de almidón donde las ramificadoras de plantas no lo hacen, generando un material ramificado considerado como un compuesto intermedio entre la amilosa y la amilopectina (16). Sin embargo, aún no se sabe cuales son las características de estas enzimas bacterianas que definen su capacidad para mantenerse activas en la región de la amilopectina. Otra de las preguntas aún sin resolver en la biosíntesis del almidón se relaciona con la generación, recambio e incorporación en los gránulos de almidón de los intermediarios que están entre ADP-glucosa y el almidón. Éstos se sintetizan *in vitro*, pero se han encontrado sólo escasamente *in vivo*, mientras que es imposible sintetizar almidón *in vitro*. En experimentos en donde, los gránulos de almidón se incubaron con ADP- ^{14}C glucosa se encontró que en períodos cortos (una hora) la marca era incorporada en la amilopectina [6], pero después de períodos largos (24 horas) la marca se encuentra principalmente en la amilosa. De estos resultados se concluyó que la GBSS primero extiende las cadenas de las moléculas de amilopectina y que a partir de estas, por hidrólisis, se obtengan cadenas que constituyen la amilosa (17). Existen varias posibilidades que podrían liberar las cadenas de amilosa; una de ellas es que las endoamilasas hidrolicen a la amilopectina y den lugar a cadenas de amilosa y otra que la GBSS tenga una segunda actividad mediante la cual las cadenas de glucanos se liberan después de una elongación progresiva. Dado que todas las mutantes que se han descrito como libres de amilosa presentan reducción de la actividad de GBSS, la última opción sería la más probable (17).

La amilopectina

La amilopectina es un polisacárido semicristalino, altamente ramificado, con un esqueleto de enlaces α -1,4 y 4-5% de puntos de ramificación α -1,6 (3). La amilopectina es una molécula de mayor tamaño que la amilosa y su peso molecular se encuentra entre 10^7 - 10^8 . El peso molecular y el grado de ramificación de la amilopectina varía ampliamente y esta variedad estructural contribuye a las diferencias en las propiedades químicas y físicas del almidón proveniente de diferentes fuentes (10). El análisis estructural de los gránulos muestra que las cadenas laterales de la amilopectina forman dobles hélices y están arregladas de tal manera que se forman paquetes que contienen entre 9 y 17 cadenas laterales en intervalos regulares de aproximadamente 9-10 nm de largo sobre el eje de la molécula y dan lugar a las lamelas cristalinicas, que se encuentran alternadas con lamelas amorfas formadas por las regiones donde se localizan los puntos de ramificación y por los espacios entre los agregados de dobles hélices (figura 1) (8). El modelo de "empaquetamiento" (figura 2), considera que la amilopectina se constituye de diferentes tipos de cadenas y esto se apoya por las observaciones de tres diferentes clases de cadenas, A, B, y C, que varían en longitud y que se asocian para formar los paquetes.

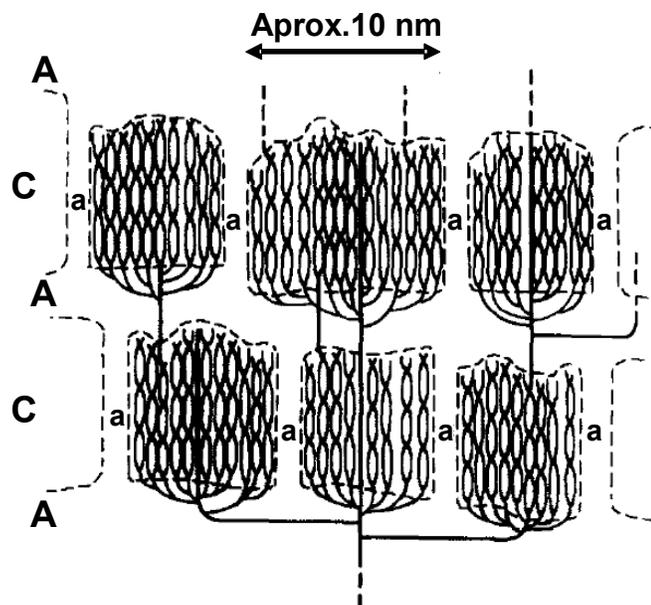


Figura 1. Esquema del empaquetamiento de las cadenas laterales de amilopectina en las lamelas. Cada empaquetamiento contiene entre 9 y 17 cadenas laterales. Las zonas amorfas se localizan entre las lamelas cristalinicas y entre cada paquete de cadenas laterales. A, lamelas amorfas (zona de ramificación) de aproximadamente 4nm de largo; C, lamelas cristalinicas (paquetes de cadenas laterales de amilopectina) de 6 nm de largo en promedio; a, regiones amorfas entre los paquetes cristalinicos. Tomado de Gallant, 1997.

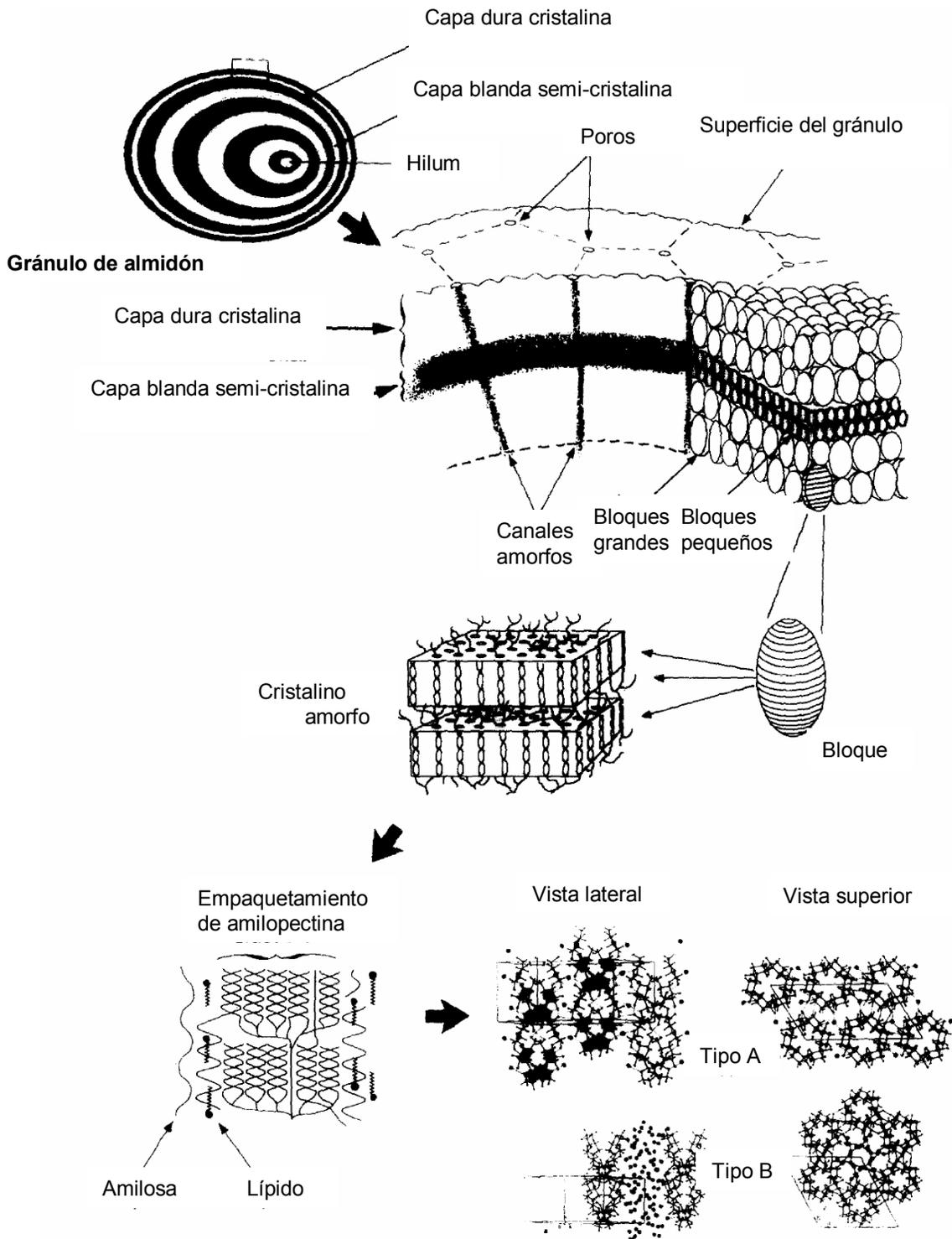


Figura 2. Estructura del gránulo de almidón

Los patrones de difracción de rayos X que se obtienen de almidones de diferentes plantas se pueden agrupar en dos tipos principales. El tipo A es característico del almidón de cereales y se distingue por el denso empaquetamiento de las dobles hélices y el tipo B, en el que las dobles hélices están arregladas de tal manera que permiten que moléculas de agua queden incluidas en el arreglo. En algunos almidones principalmente del tipo A, se ha observado la presencia de canales amorfos o poros que podrían estar relacionados con la mayor o menor susceptibilidad del almidón a la degradación enzimática, pues los almidones cuyos gránulos presentan estas estructuras tienden a ser más fácilmente degradados (17). La variación en la susceptibilidad a la degradación de los gránulos de almidón también depende del origen botánico, lo cual evidencia algunas diferencias estructurales (90). Durante la α -amilolisis del almidón, las regiones menos cristalinas, son más fácilmente degradadas que las regiones cristalinas (8). Se ha sugerido que la velocidad de hidrólisis del almidón depende, en gran medida, de la distribución de las zonas cristalina y semi-cristalina, así como del tamaño e interacción de sus componentes.

La amilopeptina se sintetiza predominantemente en la superficie del gránulo y participan por lo menos nueve isoformas de enzimas, entre las que se encuentran la enzima almidón sintasa (SS) y las enzimas ramificadoras. Se han identificado numerosas isoformas de SS en plantas (10) y se conoce poco con relación a su función y especificidad. Para entender la función de la enzima SS en la biosíntesis de almidón es necesario también conocer cuál es su interacción con las enzimas desramificadoras pues múltiples isoformas actúan de manera concertada para sintetizar la amilopeptina y determinar su estructura (17).

Otros componentes del gránulo

Además del peso molecular, la amilosa y la amilopeptina presentan diferencias en la capacidad para asociarse con otras moléculas. La naturaleza química de la amilosa provoca que forme asociaciones con pequeñas moléculas hidrófobas, por lo que es común que a la fracción de amilosa se encuentre asociada una proporción alta de lípidos (23), mientras que la amilopeptina contiene grupos fosfatos unidos de manera covalente. El nivel de fosforilación varía con el origen botánico del almidón, encontrándose que el almidón que proviene de cereales presenta niveles de fosforilación apenas perceptibles (<0.01%), mientras que el almidón de papa está altamente fosforilado (0.5%) (21). En las hojas el almidón transitorio presenta aproximadamente 0.1% de residuos de glucosas fosforiladas (49). Los grupos fosfato están unidos como monoésteres en las posiciones C-3 y C-6 de las unidades de glucosa y esta fosforilación parece que ocurre tanto durante la síntesis como durante la degradación del almidón (25, 28). La fosforilación en la posición C-3 principalmente, puede modificar el empaquetamiento de las dobles hélices (3) y esto de alguna manera puede alterar el ordenamiento del gránulo y cambiar la interacción con las proteínas que se asocian con el almidón para llevar a cabo su degradación, pues se tienen evidencias de que si se disminuye el grado de fosforilación también la degradación se ve disminuida (2, 49, 52).

ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA DEGRADACIÓN DEL ALMIDÓN

Durante el día las células de las hojas toman carbono que se convierte a partir de la fotosíntesis en sacarosa y almidón. La sacarosa se exporta a los tejidos no fotosintéticos y el almidón se almacena en el cloroplasto. En la noche este almidón se degrada para proveer a la célula y a otros órganos de carbono, energía y poder reductor. El suministro de carbono a partir del almidón degradado en la noche es esencial para el desarrollo de la planta.

La degradación del almidón involucra la asociación temporal de los gránulos con muchas enzimas (30). El primer paso en este proceso debe ser catalizado por una enzima capaz de actuar en la superficie semicristalina del gránulo. Aunque existen varias enzimas capaces de degradar los gránulos de almidón *in vitro* la única enzima que se ha encontrado que puede hacerlo *in planta* es la α -amilasa (1); esta endoenzima hidroliza los enlaces glicosídicos α -1,4 en polímeros de glucanos (47). En el genoma de *Arabidopsis*, existen tres genes que pueden codificar tres isoformas de α -amilasa, una de las cuales (AMY3) se encuentra en el cloroplasto (tabla 1) (19); sin embargo, Yu, *et al.* [48] mostraron que en ausencia de AMY3 la degradación del almidón ocurre de manera normal. Esto sugiere que el ataque inicial en la superficie de los gránulos no requiere una endoamilasa, o que *A. thaliana* posee otra endoamilasa cuya secuencia de aminoácidos es muy diferente, por lo que no ha sido identificada como tal. Mientras que Asatsuma *et al.* (1) encontraron evidencias de la participación de la isoforma I-1 de α -amilasa en la degradación de almidón de hoja en arroz. Por lo que aún cabe la duda de si es la α -amilasa la enzima responsable de iniciar la degradación del gránulo de almidón y si este evento depende de la especie.

Tabla 1. Enzimas que se sabe actúan ó podrían actuar en *Arabidopsis* sobre enlaces glicosídicos α -1,4 ó α -1,6.

Enzima	Gen	Localización en plastidios (predicha) ^a
α -Amilasa 1	AMY1	No
α -Amilasa 2	AMY2	No
α -Amilasa 3	AMY3	Sí
α -Amilasa 1	BAM 1	Sí
α -Amilasa 2	BAM2	Sí
α -Amilasa 3	BAM3	Sí
α -Amilasa 4	BAM4	No
α -Amilasa 5	BAM5	No
α -Amilasa 6	BAM6	No
α -Amilasa 7	BAM7	No
α -Amilasa 8	BAM8	No
α -Amilasa 9	BAM9	No
Glucan agua dicinasa	GWD1	Dudoso
Fosfoglucan agua dicinasa	PWD	Sí
Almidón fosforilasa cloroplástica	PHS1	Sí
Almidón fosforilasa citosólica	PHS2	No
Enzima desproporcionadora	DPE1	Sí
Transglucosidasa	DPE2	Sí
Isoamilasa 1	ISA1	Dudoso
Isoamilasa 2	ISA2	Sí
Isoamilasa 3	ISA3	Sí
Pululanasa	LDA1	Sí
α -glucosidasa		

Modificada de Lloyd J, 2005.

^aLa predicción se hizo mediante los programas TargetP (Emanuelsson, 2000) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) y Predatar (<http://www.inra.fr/predotar/>). El término dudoso se aplicó cuando los resultados en ambos programas eran contradictorios.

Por otro lado, independientemente de cuál es la enzima que inicie el ataque, actualmente se sabe que la enzima glucan, agua dicinasa (GWD) es necesaria en el proceso de degradación de almidón (4, 49, 52]. En papa, se mostró que la enzima GWD transfiere el γ -fosfato del ATP a los carbonos 3 o 6 de los glicosilos que forman la amilopectina (22, 29) y aparentemente esta fosforilación *in vivo* ocurre tanto durante el período de síntesis como en el período de degradación (25, 28). La función de la proteína GWD en la degradación se podría explicar con base en que los grupos fosfato influyen en el empaquetamiento del gránulo y, de esta manera, modifican la susceptibilidad de la superficie al ataque enzimático; o bien, que la proteína, a través del dominio que está en el extremo N-terminal y cuya función es hasta ahora desconocida, promueva la actividad de alguna enzima ya sea interaccionando con la superficie del gránulo o bien con la misma proteína (37). El descubrimiento de que una segunda dicinasa (PWD, fosfoglucon, agua dicinasa), se requiere en la degradación del almidón ha incrementado la complejidad de este proceso. Se ha sugerido que GWD actúa junto con PWD generando un patrón de fosforilación de la amilopectina en la superficie del gránulo que lo hace accesible al ataque enzimático, sin embargo, la información al respecto es incompleta (18).

Una vez iniciada la degradación del gránulo del almidón, se generarán glucanos solubles en el estroma del cloroplasto, que pueden metabolizarse a través de fosforólisis por la enzima glucan fosforilasa cloroplástica, generándose glucosa 1-fosfato (53) o por la enzima α -amilasa que cataliza la producción de α -maltosa a partir del extremo no reductor de α -1,4-glucanos. Los estudios que se han realizado indican que la α -amilasa es responsable de la hidrólisis de la mayor parte del almidón acumulado en hojas de papa (35) y en cloroplastos de *A. thaliana* (50) y que la maltosa producida se exporta al citosol por medio de un transportador específico (26).

Las enzimas α -amilasa y α -amilasa hidrolizan los enlaces α -1,4, pero no los α -1,6; esto significa que existen otras enzimas para romper los enlaces que dan lugar a las ramificaciones, mismas que se han nombrado enzimas desramificadoras, que pueden dividirse en isoamilasas o dextrinasas límite, dependiendo de su especificidad por el sustrato. El genoma de *A. thaliana* contiene cuatro genes de enzimas desramificadoras, tres isoamilasas (ISA1, ISA2 e ISA3; tabla1) y una dextrinasa límite. Sin embargo, aparentemente esta última no está involucrada en la degradación de almidón en hojas de *A. thaliana*, pues existe una mutante *knockout* sin actividad de dextrinasa límite que no mostró cambio en su velocidad de degradación del almidón (37). El papel de las isoamilasas no es claro, pues se ha visto que también están involucradas en la síntesis de almidón. En hojas de *A. thaliana*, tubérculos de papa y endospermo de cereales existe evidencia que al reducir o suprimir la actividad de estas enzimas se altera la síntesis de almidón, incrementándose el número de gránulos, reduciéndose su tamaño y promoviendo la síntesis de fitoglucógeno, un polímero soluble de glucosas con enlaces α -1,4 y α -1,6 (37, 19). Aunque ISA1 e ISA2 son necesarias en la síntesis de almidón en hojas de *A. thaliana*, estas enzimas no parecen ser necesarias en la degradación de almidón durante la noche, pues las mutantes *isa1* e *isa2* (*dbe1*) presentan una degradación total del almidón y del fitoglucógeno (19, 37).

Dado que ni la dextrinasa límite ni las enzimas ISA1 e ISA2 parecen participar en la degradación del almidón en hojas, podría sugerirse que la hidrólisis de los puntos de ramificación del almidón se cataliza por ISA3, sin embargo, no existen mutantes en las que se haya reprimido la actividad de esta enzima que pongan de manifiesto la importancia de su participación, pero estudios recientes en los que se utilizaron microarreglos, mostraron que el patrón de expresión de ISA3 es similar al de otras enzimas involucradas en la degradación del almidón (39). No obstante, debe considerarse la posibilidad de que estén involucradas otras enzimas todavía no identificadas.

asociación de algunas proteínas depende del estado metabólico de la célula como es el determinado por los períodos de luz-oscuridad.

En el caso de la proteína GWD (anteriormente llamada R1) se ha mostrado que su asociación a los gránulos de almidón es reversible y que la asociación es una interacción proteína-carbohidrato, que no involucra a otras proteínas, al menos *in vitro* (30). En hojas de *A. thaliana*, papa, chícharo y frijol, aparentemente la cantidad de la proteína GWD permanece constante (30, 49); sin embargo, para las últimas tres especies se ha mostrado que la proporción de proteína GWD asociada al gránulo se incrementa considerablemente durante el período de degradación (2, 28). Los estudios anteriores muestran que existe una coincidencia entre la unión de GWD y el grado de fosforilación, pero no se han definido aún las modificaciones que ocurren en la superficie del gránulo durante su degradación que llevan a una mayor asociación de proteínas e incrementan su actividad. Existen evidencias que muestran que en condiciones *in vitro*, los gránulos de almidón con mayor grado de fosforilación son mejores sustratos para la proteína GWD y además son más susceptibles a la degradación amilolítica (2, 28), lo que podría estar sugiriendo que la fosforilación de la superficie del gránulo facilita también la asociación de otras enzimas y que características del gránulo como el nivel de fosfato son relevantes en este proceso.

También se ha reportado que la proporción de amilosa y amilopectina, así como el largo de las cadenas de amilopectina, contribuyen en la degradación del almidón. Los almidones que presentan altos contenidos de amilosa tienen mayor resistencia a la degradación enzimática que los almidones con niveles bajo (8), no se conoce cuál es la razón de esta relación pero cabría la posibilidad de que dado que la proporción de amilopectina en estos gránulos es menor, entonces la capacidad de fosforilación que sólo se da en esta fracción, también será menor y en consecuencia la asociación de proteínas se verá reducida. Por otro lado, existen evidencias de que la actividad de la proteína GWD se ve favorecida por cadenas largas de amilopectina (DP 30-100) (22); sin embargo, en los estudios reportados por Ritte *et al.* (28) no se observaron cambios relevantes durante el ciclo luz-oscuridad en el largo de la cadena de las moléculas periféricas de amilopectina, lo que sugiere que aparentemente este factor no contribuye a la mayor interacción proteína-almidón.

Además, se sabe que varias de las proteínas que están involucradas en el metabolismo de almidón poseen módulos de unión a almidón diferentes del dominio catalítico (32). Una de las funciones de estos dominios es unir a la enzima a la superficie insoluble del gránulo de almidón y existen evidencias de que la actividad de estas enzimas sobre sustratos insolubles se pierde si el dominio se remueve, mientras que su actividad hacia sustratos solubles se mantiene (14). Se ha sugerido que estos dominios también modifican la superficie del gránulo (41), lo que probablemente permitiría la unión al almidón de otras proteínas que no poseen estos dominios pero que están involucradas en la degradación del almidón. Se ha reportado la presencia de estos dominios en α -amilasa, β -amilasa y pululanases de microorganismos y plantas como maíz y cebada (13, 31, 32, 42).

CONCLUSIONES

El avance en el conocimiento del genoma de *A. thaliana* ha permitido lograr un mayor entendimiento del proceso de degradación del almidón acumulado en las hojas y hace posible proponer un modelo como el de la figura 3. Sin embargo, no se puede generalizar ni a otros órganos ni a otras especies. Aún no se sabe quién inicia la degradación del gránulo de almidón ni se conoce con exactitud como se da la asociación de las proteínas con el gránulo por lo que se requieren otras investigaciones que permitan conocer la relación entre la fosforilación y la asociación de las proteínas con el gránulo. Por otro lado, es poco lo que se conoce acerca de la regulación de este proceso

y aunque recientemente se han mostrado evidencias de que la actividad de las enzimas biosintéticas se controla post-traduccionalmente (regulación REDOX y fosforilación) y se ha propuesto que el proceso de degradación requiere activación post-traducciona l y/o la formación de complejos proteicos, aún se está lejos de poder entender cómo se controla el flujo a través de esta vía.

RECONOCIMIENTOS

Se agradece el apoyo de Jimena Rojas Bernal y Javier Andrés Juárez Díaz en la revisión de este documento y el financiamiento otorgado por CONACYT (beca), Facultad de Química UNAM (PAIP 6290-14), DGAPA IN201502 y ULSA Q063/2004.

REFERENCIAS

1. Asatsuma S., Sawada C., Itoh K., Okito M., Kitajima A. "Involvement of α -Amylase I-1 in Starch Degradation in Rice Chloroplasts". *Plant Cell Physiol.*, vol. 46, pp. 858-869, 2005.
2. Bernal, L., Coello, P., Martínez-Barajas E. "Possible Role Played by R1 Protein on Starch Accumulation in Bean Seedlings (*Phaseolus Vulgaris*) under Phosphate Deficiency". *J. Plant Physiol.*, vol. 162, pp. 970-976, 2005.
3. Blennow A, Engelsen SB, Nielsen TH, Baunsgaard L, Mikkelsen R. "Starch Phosphorylation: New Front Line in Starch Research". *Trends Plant Sci.*, vol. 7, núm. 10, pp. 445-450, 2002.
4. Caspar T, Lin TP, Kakefuda G, Benbow L, Preiss J, Somerville C. "Mutants of Arabidopsis with Altered Regulation of Starch Degradation". *Plant Physiol.*, vol. 95, pp. 1181-1188, 1991.
5. Chia T., Thorneycroft D., Chapple A., Messerli G., Chen J. "A Cytosolic Glucosyl-Transferase is Required for Conversion of Starch to Sucrose in *Arabidopsis* Leaves at Night". *Plant J.*, vol. 37, pp. 853-863, 2004.
6. Denyer K, Clark B, Hilton C, Tatge H, Smith A. "The Elongation of Amylose and Amylopectin Chains in Isolated Starch Granules". *Plant J.*, vol. 10, pp. 1135-1143, 1996.
7. Emanuelsson O. *et al.* "Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence". *J. Mol. Biol.*, vol. 300, pp. 1005-1016, 2000.
8. Gallant, D., Bouchet, B., Baldwin P. "Microscopy of Starch: Evidence of a New Level of Granule Organization". *Carbohydrate Polymers*, vol. 32, pp. 177-191. 1997.
9. Gallant, D., Bouchet, B., Buléon A, Perez S. "Physical Characteristics of Starch Granules and Susceptibility to Enzymatic Degradation". *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 46, pp. S3-S16, 1992.
10. Guan, HP y Keeling, PL. "Starch Biosynthesis: Understanding the Functions and Interactions of Multiple Isozymes of Starch Synthase and Branching Enzyme". *Trends in Glycosci and Glycotechnol*, vol. 10, pp. 307-319, 1998.
11. Hovenkamp-Hermelink J, De Vries J, Adamse P, Jacobsen E, Witholt B, Feenstra J. "Rapid Estimation of the Amylose/Amylopectin Ratio in Small

- Amounts of Tuber and Leaf Tissue of the Potato". *Potato Res.*, vol. 31, pp. 241-246, 1988.
12. Huber KC y BeMiller, JN. "Visualization of Channels and Cavities of Corn and Sorghum Starch Granules". *Cereal Chem.*, vol. 74, pp. 537-545, 1997.
 13. Janecek S y Sevcik J. "The Evolution of Starch Binding Domain". *FEBS Lett.*, vol. 456, pp. 119-125, 1999.
 14. Ji Q, Vincken J, Suurs L, Visser R. "Microbial Starch Binding Domain as a Tool for Targeting Proteins to Granules During Starch Biosynthesis". *Plant Mol. Biol.*, vol. 51, pp. 789-801, 2003.
 15. Jobling, S. "Improving Starch for Food and Industrial Applications". *Curr. Opinion Plant Biol.*, vol. 7, pp. 210-218, 2004.
 16. Kortstee A, Vermeesch A, de Vries B, Jacobsen E, Visser R. "The Influence of an Increased Degree of Branching on the Physico-Chemical Properties of Starch from Genetically Modified Potato". *Carbohydr. Polymers*, vol. 37, pp. 173-184, 1998.
 17. Kossmann J y Lloyd J. "Understanding and Influencing Starch Biochemistry". *Crit Rev Plant Sci.*, vol. 19, pp. 171-226, 2000.
 18. Kotting O, Pusch K, Tiessen A, Geigenberger P, Steup M, Ritte G. "Identification of a Novel Enzyme Required for Starch Metabolism in Arabidopsis Leaves. The Phosphoglucan, Water Dikinase". *Plant Physiol.*, vol. 137, pp. 242-252, 2005.
 19. Lloyd J, Kossmann J, Ritte G. "Leaf Starch Degradation Comes out of the Shadows". *Trends Plant Sci.*, vol. 10, pp. 130-137, 2005
 20. Lloyd JR, Springer F, Buléon A, Muller-Röber B, Willmitzer L, Kossmann J. "The Influence of Alteration in ADP-Glucose Pyrophosphorylase Activities on Starch Structure and Composition in Potato Tubers", *Planta*, vol. 209, pp. 230-238, 1999.
 21. Mikkelsen R y Blennow A. "Functional Domain Organization of the Potato α -glucan, Water Dikinase (GWD): Evidence for Separate Site Catalysis as Revealed by Limited Proteolysis and Deletion Mutants". *Biochem. J.*, vol. 385, pp. 355-361, 2005.
 22. Mikkelsen R y Blennow A. "Functional Characterization of α -glucan, Water Dikinase, the Starch Phosphorylating Enzyme". *Biochem J.*, vol. 377, pp. 525-532, 2004.
 23. Morrison W. "Starch Lipids and How They Relate to Starch Granule Structure and Functionality". *Cer. Foods World*, vol. 40, pp. 437-446, 1995.
 24. Nakamura T, Yamamori M, Hirano H, Hidaka S, Nagamine T. "Production of Waxy (Amylose-Free) Wheats". *Mol. Gen. Genet.*, vol. 248, pp. 253-259, 1995.
 25. Nielsen TH, Wischmann B, Enevoldsen K, Moller BL. "Starch Phosphorylation in Potato Tubers Proceeds Concurrently with *de Novo* Biosynthesis of Starch". *Plant Physiol.*, vol. 105, pp. 111-117, 1994.

26. Niittylä T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeeman. "A Previously Unknown Maltose Transporter Essential for Starch Degradation in Leaves". *Science*, vol. 303, pp. 87-89, 2004.
27. Reimann R, Ritte G, Steup M, Appenroth KJ. "Association of α -amylase and the R1 Protein with Starch Granules Precede the Initiation of Net Starch Degradation in Turions of *Spirodela polyrhiza*". *Physiol Plant.*, vol. 114, pp. 2-12, 2002.
28. Ritte G, Scharf A, Eckermann N, Häbel S, Steup M. "Phosphorylation of Transitory Starch is Increased During Degradation". *Plant Physiol.*, vol. 135, pp. 2068-2077, 2004.
29. Ritte G, Lloyd JR, Eckermann N, Rottmann A, Kossmann J, Steup M. "The Starch-Related R1 Protein is an α -glucan, Water Dikinase". *PNAS*, vol. 99, núm. 10, pp. 7166-7171, 2002.
30. Ritte G, Loberth R, Steup M. "Reversible Binding of the Starch-Related R1 Protein to the Surface of Transitory Starch Granules". *Plant J.*, vol. 21, núm. 4, pp. 387-391, 2000.
31. Robert X, Haser R, Gottschalk T, Ratajczak F, Driguez H, Svensson B, Aghajari N. "The Structure of Barley α -amylase Isozyme 1 Reveals a Novel Role of Domain C in Substrate Recognition and Binding: A Pair of Sugar Tongs". *Structure*, vol. 11, pp. 973-984, 2003.
32. Rodríguez-Sanoja R, Oviedo N Sanchez S. "Microbial Starch-Binding Domain". *Curr. Opinion in Microb.*, vol. 8, pp. 260-267, 2005.
33. Sano Y. "Differential Regulation of *Waxy* Gene Expression in Rice Endosperm". *Theor. Appl. Genet.*, vol. 68, pp. 467-473, 1984.
34. Santacruz S, Koch K, Andersson R, Aman P. "Characterization of Potato Leaf Starch". *J Agric Food Chem.*, vol. 52, pp. 1985-1989, 2004.
35. Scheidig A, Frölich A, Schulze S, Lloyd JR, Kossmann J. "Downregulation a Chloroplast-Targeted α -amylase Leads to Starch-Excess Phenotype in Leaves". *Plant J.*, vol. 30, núm. 5, pp. 581-591, 2002.
36. Shure M, Wessler S, Fedoroff N. "Molecular Identification and Isolation of the *Waxy* Locus in Maize". *Cell.*, vol. 35, pp. 225-233, 1983.
37. Smith AM, Zeeman SC, Smith SM. "Starch Degradation". *Annu Rev Plant Biol.*, vol. 56, pp. 73-98, 2005.
38. Smith AM, Zeeman SC, Thorneycroft D, Smith SM. "Starch Mobilization in Leaves". *J Exp Bot.*, vol. 54, pp. 577-583, 2003.
39. Smith A., Fulton D., Chia T., Thorneycroft D., Chapple A. "Diurnal Changes in the Transcriptome Encoding Enzymes of Starch Metabolism Provide Evidence for both Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation". *Plant Physiol.*, vol. 135, pp. 2687-2699, 2004.
40. Smith AM. "The Biosynthesis of Starch Granules". *Biomacromolecules*, vol. 2, pp. 335-341, 2001.

41. Southall, S.M., Simpson, P.J., Gilbert, H.J., Williamson, G., Williamson, M.P. "The Starch Binding Domain from Glucoamylase Disrupts the Structure of Starch". *FEBS Lett.*, vol. 447, pp. 58-60, 1996.
42. Svensson B, Jespersen H, Sierks M, MacGregor E. "Sequence Homology Between Putative Raw-Starch Binding Domains from Different Starch Degrading Enzymes". *Biochem. J.*, vol. 264, pp. 309-311, 1989.
43. Tetlow IJ, Morell MK, Emes J. "Recent Developments in Understanding the Regulation of Starch Metabolism in Higher Plants". *J Exp Bot.*, vol. 55, pp. 2135-2145, 2004.
44. Trethewey R y Smith A. "Starch Metabolism in Leaves". En RC Leegood, TD Sharkey, S von Caemmerer, eds, *Advances in Photosynthesis*, vol. 9, *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 205–231, 2000.
45. Villareal C y Juliano B. "Waxy Gene Factor and Residual Protein of Rice Starch Granule". *Starch/Staerke*, vol. 38, pp. 118-119, 1986.
46. Wang L, Wang Y, Porter R. "Structures and Physicochemical Properties of Six Wild Rice Starches". *J Agric Food Chem.*, vol. 50, pp. 2695-2699, 2002.
47. Whitaker JR. "Principles of Enzymology for the Food Sciences". Marcel Dekker Inc. U.S.A., pp 400-412, 1994.
48. Yu T, Zeeman SC, Thorneycroft D, Fulton DC, Dunstan H, Lue W, Hegemann B, Tung S, Umemoto T, Chapple A, Tsai D, Wang S, Smith AM, Chen J, Smith SM. "α-amylase is not Required for Breakdown of Transitory Starch in *Arabidopsis* Leaves". *J. Biol. Chem.*, vol. 280, pp. 9773-9779, 2005
49. Yu TS, Kofler H, Häusler RE, Hille D, Flügge U, Zeeman SC, Smith AM, Kossmann J, Lloyd J, Ritte G, Steup M, Lue WL, Chen J, Weber A. "The *Arabidopsis* *Sex1* Mutant Defective in the R1 Protein, a General Regulator of Starch Degradation in Plants, and not in the Chloroplast Hexose Transporter". *Plant Cell.*, vol. 13, pp. 1907-1918, 2001.
50. Zeeman SC, Thorneycroft D, Schupp N, Chapple A, Weck M, Dunstan H, Haldimann P, Bechtold N, Smith AM, Smith SM. "Plastidial α-glucan Phosphorylase is not Required for Starch Degradation in *Arabidopsis* Leaves but Has a Role in the Tolerance of Abiotic Stress". *Plant Physiol.*, vol. 135, pp. 849-858, 2004.
51. Zeeman SC, Tiessen A, Pilling E, Kato KL, Donald AM, Smith A. "Starch Synthesis in *Arabidopsis*. Granule Synthesis, Composition and Structure". *Plant Physiol.*, vol. 129, pp. 516-529, 2002.
52. Zeeman SC, ap Rees T. "Changes in carbohydrate metabolism and assimilate export in starch-excess mutants of *Arabidopsis*". *Plant Cell Env.*, vol. 22, pp. 1445-1453, 1999.
53. Zeeman SC, Northrop F, Smith AM, ap Rees T. "A Starch-Accumulating Mutant of *Arabidopsis Thaliana* Deficient in a Chloroplastic Starch-Hydrolyzing Enzyme". *Plant J.*, vol. 15, pp. 357-365, 1998.