

Medios de cultivo a partir de residuos agroindustriales sólidos para el crecimiento de la levadura *saccharomyces cerevisiae*

Polo N Laura D- Ramírez S Julián A*- Álvarez A Adalucy **

RESUMEN

El presente trabajo se llevó acabo para evaluar la promoción del crecimiento de diferentes medios de cultivos naturales frente a los medios comerciales PDA y Agar nutritivo en la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* activada de levadura seca. La promoción del crecimiento fue evaluada con el Índice de Crecimiento Absoluto (ICA) en los diferentes medios de cultivos naturales y utilizando el método ecométrico. Los análisis ICA para comparar el crecimiento de la cepa en los diferentes medios naturales demostraron que el crecimiento fue muy poco, pero la explicación estuvo en que la cepa de *S. cerevisiae* estaba con varios repiques previos y había perdido su vitalidad, ya que ni siquiera el medio de cultivo estandar PDA arrojó un ICA altamente productivo.

Palabras claves: medios naturales, medios comerciales, *Saccharomyces cerevisiae*, método ecométrico.

ABSTRACT

The present work was carried out to evaluate the promotion of the growth of different natural mediums against PDA and nutritive agar in the strain of *Saccharomyces cerevisiae* activated from dry yeast. The promotion of growth was evaluated with the Absolute Growth Index (ICA) in the different natural mediums and using the ecométrico method. The ICA analyzes to compare the growth of the strain in the different natural environments showed that the growth was very little, but the explanation was that the strain of *S. cerevisiae* was with several previous rings and had lost its vitality, since not even the PDA standard culture medium produced a highly productive ICA

Keywords: natural media, trade media, *Saccharomyces cerevisiae*, ecometric method.

INTRODUCCIÓN

Un medio de cultivo, es el sustrato o solución de nutrientes que proporciona una mezcla equilibrada de elementos requeridos en el que los microorganismos crecen y se multiplican. Para realizar el estudio de los microorganismos es necesario recuperarlas del hábitat natural en medios artificiales que proporcionen sus requerimientos nutricionales. Este procedimiento se le conoce como cultivo bacteriano “in vitro”(1).

Entre los requerimientos más importantes para su desarrollo están el carbono, el oxígeno, nitrógeno, dióxido de carbono e hidrógeno. Muchas bacterias sin embargo necesitan del aporte extra de factores de crecimiento específicos en forma de suero, sangre y extracto de levadura entre otros(2).

No obstante el desarrollo adecuado de los microorganismos en un medio de cultivo se ve afectado por una serie de factores de gran importancia y que, en algunos casos, son ajenos por completo al propio medio(3).

1. Disponibilidad de nutrientes adecuados.
2. Consistencia adecuada del medio.
3. Presencia (o ausencia) de oxígeno y otros gases.
4. Condiciones adecuadas de humedad.
5. pH.
6. Temperatura.

7. Esterilidad del medio.

En el mercado podemos encontrar diferentes medios de cultivos comerciales comúnmente utilizados, sin embargo los elevados costos de estas formulaciones han llevado a la realización de investigaciones sobre la evaluación y el uso de sustratos más económicos tales como melaza de azúcar de caña, banano, arroz, papa, avena y otros, obteniéndose buenos resultados y planteándose la posibilidad de ser utilizados como alternativas viables para el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de microorganismos con fines industriales(4,5).

El microorganismo *Saccharomyces cerevisiae* fue utilizado en esta práctica para establecer la epromoción del crecimiento con la cual un medio de cultivo natural sirve para recuperar una cepa o, mejor aún, inducir su crecimiento y desarrollo mediante la comparación que se realiza entre el medio por evaluar y un medio control.

Saccharomyces cerevisiae

Es un organismo unicelular de forma más o menos redondeada, la célula presenta un núcleo diferenciado, siendo por lo tanto un organismo eucariota. En su ciclo de vida alternan dos formas, una haploide y otra diploide. Ambas formas se reproducen de forma asexual por

gemación en condiciones muy determinadas la forma diploide es capaz de reproducirse sexualmente; en estos casos se produce la meiosis en la célula formándose un asca que contiene cuatro ascosporas haploides(6,7).

Es uno de los modelos más adecuados para el estudio de problemas biológicos. Es un sistema eucariota, con una complejidad sólo ligeramente superior a la de la bacteria pero que comparte con ella muchas de sus ventajas técnicas(6). Además de su rápido crecimiento, la dispersión de las células y la facilidad con que se replican cultivos y aíslan mutantes, destaca por un sencillo y versátil sistema de transformación de ADN(8). Por otro lado, la ausencia de patogenicidad permite su manipulación con las mínimas precauciones. Además son capaces de llevar a cabo el proceso de fermentación, propiedad que se ha explotado desde hace muchos años en la producción de pan y de bebidas alcohólicas(9).

El objetivo de la presente práctica fue evaluar la promoción del crecimiento de diferentes medios de cultivos naturales a partir de guayaba agria, avena, zanahoria, papa, arroz, vaina de frijol, corazón de piña, hojas de maíz y jugos de vegetales frente a medios comerciales

METODOLOGÍA

Preparación de medios de cultivo.

Los medios comerciales empleados fueron: agar papa dextrosa PDA y agar natural.

Los medios de cultivos naturales se prepararon a distintas concentraciones:

- Agar avena: 3%
- Agar zanahoria: 15%
- Agar papa: 25%
- Agar guayaba agria: 10%
- Agar arroz: 3%
- Agar vaina frijol: 3,5%
- Agar corazón de piña: 15%
- Agar hojas de maíz: 3,5%
- Agar jugo de vegetales: 50%

A cada medio de cultivo natural se le agrego agar-agar al 2% ya que este actúa como un agente solidificante; luego se llevó a calentar el preparado de cada medio homogenizando en distintas ocasiones hasta su ebullición, con el fin de asegurar una completa disolución del agar. Cabe resaltar que para los agares guayaba agria, corazón de piña y jugo de vegetales se hizo una medición de su pH arrojando resultados de pH muy ácidos por lo que se tuvo que ajustar agregando una base en este caso se utilizó hidróxido de sodio, esto se hizo porque al presentar un pH muy ácido el agar no va a solidificar.

Por último, se llevaron todos los medios a esterilizar en autoclave durante 15 minutos por 15 psi. Y una vez estéril se sirvieron en las cajas de Petri dejándose en reposo hasta que solidificaran.

Es importante aclarar que no se utilizó como tal la fruta, si no los desechos (cascaras, semillas), pues lo más importante para nosotros es saber cómo aprovechar estos residuos que se generan cotidianamente en empresas agroindustriales.

Microorganismo utilizado.

El microorganismo utilizado fue *Saccharomyces cerevisiae* para la activación se siguieron los siguientes pasos:

- Se llevaron 100ml de agua destilada a la autoclave para su esterilización durante 15 minutos.
- Luego se adiciono la levadura al agua destilada a temperatura ambiente, dejándose reposar durante 30 minutos.
- Se sembro en PDA la levadura
- Por último se utilizó la escala de McFarland ajustándolo a un patrón de 2, equivalente a $6,0 \times 10^8$ UFC/mL para luego poder realizar la inoculación.

Inoculación del medio de cultivo.

Para la inoculación de los diferentes medios de cultivos naturales se utilizó el método ecométrico. Esta técnica consiste en realizar una siembra en estrías en una placa del medio que se va a evaluar, a partir de una suspensión de un microorganismo de prueba. Es decir cada caja de Petri se dividió en cuatro cuadrantes en la base y en cada cuartete se trazaron cinco líneas paralelas y una línea en el centro; posteriormente se realizó la inoculación de la levadura por cada línea trazada.

Es importante recordar que en la prueba se considera cualquier estría que crezca más del 25% de la línea; cada estría tiene un valor de 0,2 y la estría central un valor de 1, es decir, que el crecimiento máximo que se puede presentar es de 5.

Para calcular el índice de crecimiento absoluto (ICA) en cada caja de Petri se debe multiplicar el número de estrías que presentan crecimiento por 0,2 y sumar 1 en caso de que se haya presentado crecimiento en la estría central. El ICA permite clasificar a los medios de cultivo: ICA = 4,5 - 5, medios altamente productivos; ICA = 2,5 - 4,4 medios medianamente productivos; ICA < 2,5, medios poco productivos; ICA = 0, medios no productivos(10).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis ecométrico establece la productividad con la cual un medio de cultivo sirve para recuperar un microorganismo, mediante la comparación que se realiza entre el medio a evaluar y un medio control.

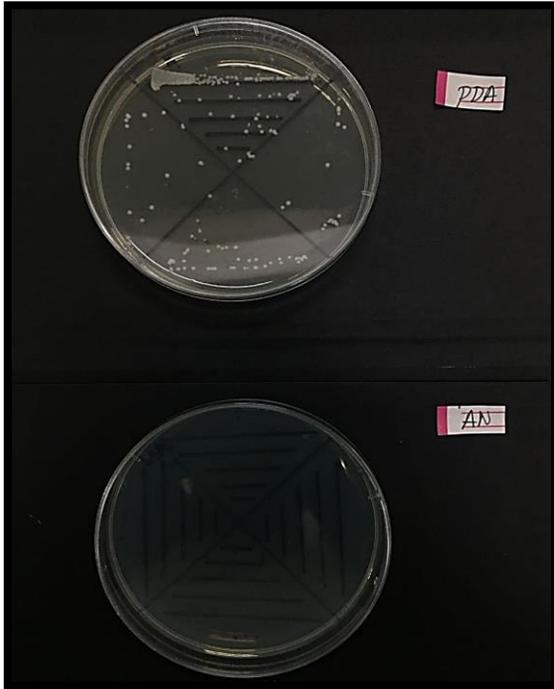


Fig. 1 Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio control PDA y agar natural.

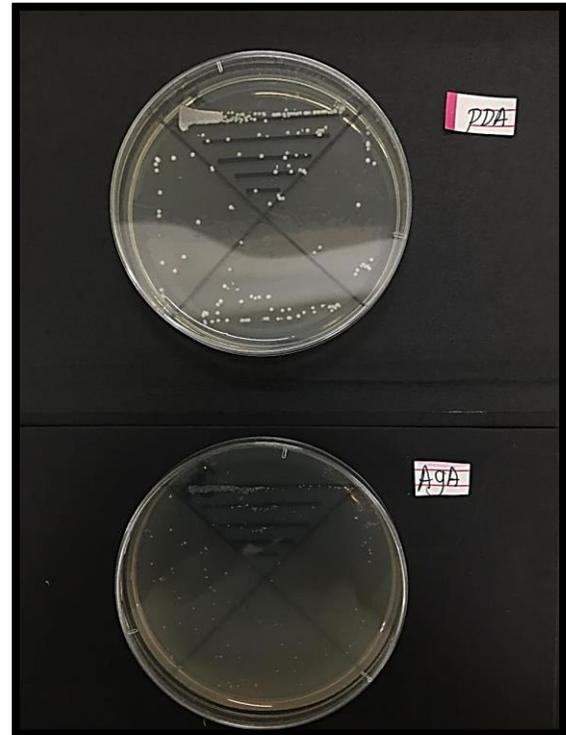


Fig. 2 Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio control PDA y agar guayaba agria

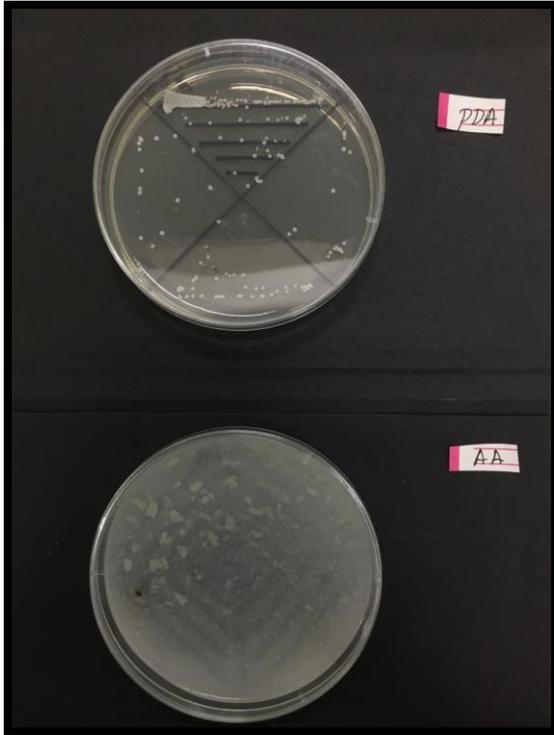


Fig. 3 Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio control PDA y agar avena.



Fig. 4 Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio control PDA y agar arroz.



Fig. 5 Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio control PDA y agar papa.

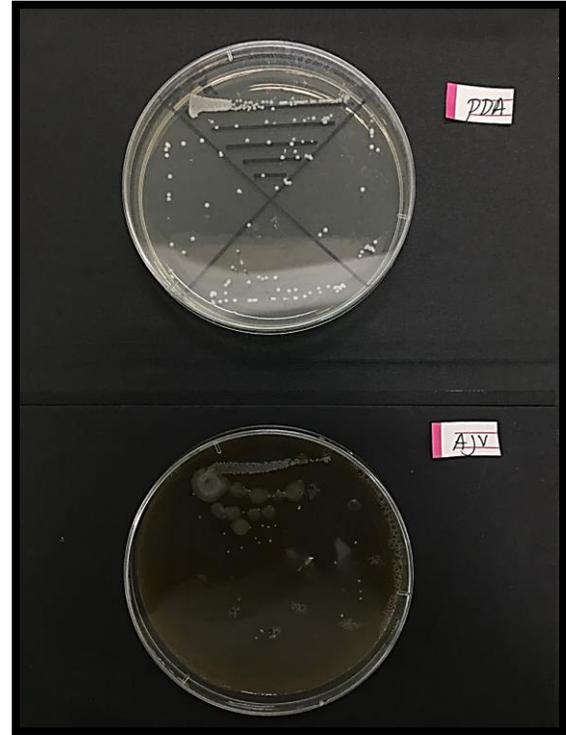


Fig. 6 Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio control PDA y agar jugo de vegetales.

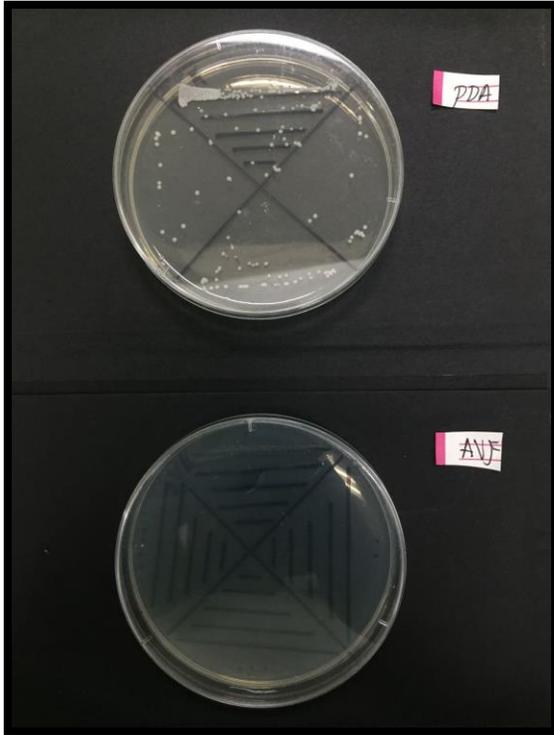


Fig. 7 Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio control PDA y agar vaina de frijol.



Fig. 8 Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio control PDA y agar hoja de maíz.



Fig. 9 Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio control PDA y agar corazón de piña.



Fig. 10 Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en medio control PDA y agar zanahoria.

Tabla 1 Relación entre la productividad obtenida en los medios de cultivo (incluyendo los controles) de acuerdo con el método ecométrico de Mossel. (AP: altamente productivo; MP: medianamente productivo; PP: poco productivo; NP: no productivo)

Medio	ICA	Productividad
Agar PDA	1,8	PP
Agar nutritivo	0	NP
Agar guayaba agria	1,4	PP
Agar avena	0	NP
Agar arroz	0	NP
Agar papa	0,8	PP

Agar jugo de vegetales	0,6	PP
Agar vaina de frijol	0,4	PP
Agar hoja de maíz	0,2	PP
Agar corazón de piña	1,2	PP
Agar zanahoria	1,4	PP

Tras la realización de cada uno de los pasos descritos en la metodología, se obtuvieron los resultados mostrados anteriormente.

Se evaluó el parámetro de presencia de crecimiento microbiano según el método de ecometría de Mossel.

Agar PDA

El crecimiento en este medio por parte del microorganismo no fue el esperado, puesto que se ha demostrado que este agar es específico para el crecimiento de este tipo de microorganismos eucariotas presentando una alta productividad. Se presentó un crecimiento escaso (fig. 1), un ICA de 1,8 (tabla 1), lo cual no es ideal partiendo de la composición de este medio que es óptima para levaduras por su composición de glucosa puesto que la gran mayoría de los microorganismos como *S. cerevisiae* tienen predilección por este carbohidrato(11). Este medio fue tomado como control.

Agar nutritivo

El crecimiento de *S. cerevisiae* en este medio estuvo completamente inhibido (fig. 1), se presentó un ICA de 0 (tabla 1). Esto es explicado con la teoría del medio de cultivo, pues esta diseñado para crecimiento bacteriano y no de levaduras, ya qo presenta los nutrientes necesarios para que se desarrolle un crecimiento de bueno a óptimo(12).

Agar guayaba agria (*Psidium araca*)

El crecimiento que se presentó en este medio fue el mejor en comparación con los demás medios naturales (fig. 2), teniendo en cuenta el hecho de que el crecimiento de este microorganismo no fue el más óptimo durante todo el estudio. El ICA que este medio obtuvo fue de 1,4, es decir, su productividad fue poca (tabla 1). Se ha demostrado la gran concentración de fructosa presente en las frutas de este género, el cual es un carbohidrato que este microorganismo degrada de una forma óptima(13,14).

Agar avena (*Avena sativa*)

El crecimiento en este medio fue inhibido (fig. 3). No se presentó formación de colonias ni en la primera estría de la siembra. El ICA de este medio fue de 0, es decir, no productivo para esta levadura (tabla 1). Esto se debe a que un gran porcentaje de los carbohidratos

contenidos en la *Avena sativa* son almidones, glúcido que *S. cerevisiae* no es capaz de degradar debido a que no produce la enzima amilasa, necesaria para la degradación de las moléculas de almidón(15).

Agar arroz (*Oryza sativa*)

En este medio se presentó inhibición total del microorganismo, no hubo crecimiento ni en la estría de inóculo (fig. 4). La productividad fue igual a cero, no fue un agar productivo para nuestra levadura (tabla 1). De forma similar a la obtenida en el agar avena, los resultados obtenidos concuerdan con el hecho de que el porcentaje de carbohidratos de arroz radica principalmente en almidón, y sólo un pequeño porcentaje pertenece a un monosacárido(16).

Como anteriormente se indicó, *S. cerevisiae* no es capaz de degradar el almidón por su incapacidad de producir amilasa para desdoblar este glúcido de estructura más compleja en comparación con los demás carbohidratos. Aunque existe una cepa de este microorganismo, *S. cerevisiae sake*, que tiene la capacidad de fermentar el almidón contenido dentro de la estructura del arroz(17).

Agar papa (*Solanum tuberosum*)

Contrario al PDA, en este agar no se agregó ningún carbohidrato de más. El resultado obtenido no fue el mejor puesto que el ICA obtenido en este

medio fue de 0,8, lo que lo cataloga como poco productivo (tabla 1), pero sí hubo crecimiento (fig. 5). Esto probablemente se deba a que aun así la papa contenga una gran proporción de almidón dentro de los carbohidratos contenidos, también presenta un porcentaje moderado de glucosa, monosacárido que para el microorganismo de estudio utiliza de manera ideal(18). Para este medio no se utilizaron las cortezas de estos tubérculos, los cuales fueron utilizados para el siguiente medio de cultivo natural.

Agar jugo de vegetales

El crecimiento en este medio fue casi similar al resultado obtenido con el agar papa (fig. 6). Este medio contenía tallos de hojas de de lechuga (*Lactuca sativa*); tallos de hojas de repollo blanco (*Brassica oleracea* var. *capitata*); corteza de los tubérculos de patata (*Solanum tuberosum*); raíces de cebollín (*Allium schoenoprasum*) y piel del fruto de tomate (*Solanum lycopersicum*). La concentración de estos ingredientes para el agar tuvo una proporción igual, de 50% por cada uno de ellos. Debido a la gran variedad de fuentes de nutrientes en este medio, se esperaba fuese el que obtuviera los mejores resultados, puesto que la composición de carbohidratos iba desde monosacáridos a glúcidos complejos como el almidón y la celulosa(18–22). El ICA de este

medio fue de 0,6, por lo que se toma como un medio poco productivo (tabla 1). Se produjo crecimiento en el medio, no fue el ideal pero sí fue bueno teniendo en cuenta que los carbohidratos contenidos en este medio eran en gran parte aquellos que *S. cerevisiae* es incapaz de degradar.

Agar vaina de frijol (*Phaseolus sp.*)

El ICA en este medio fue de 0,4, es decir, el agar vaina de frijol es un medio poco productivo para este microorganismo (tabla 1). Aunque escaso, en este medio hubo presencia de crecimiento de nuestro microorganismo en estudio en unas cuantas de las estrías de inoculación (fig. 7). Esto concuerda con estudios que han demostrado que las vainas de frijol (*Phaseolus sp.*) además de contener un alto porcentaje de almidón, también contiene un escaso contenido de fructosa, carbohidrato que *S. cerevisiae* degrada con facilidad, por lo que se puede concluir que en este medio el crecimiento de la levadura no sería el ideal(23).

Agar hoja de maíz (*Zea mays*)

El ICA de este medio es de 0,2 (poco productivo) (tabla1). Aunque se esperaba que en este medio el crecimiento fuera inhibido debido a que el material utilizado posee una gran concentración de celulosa, para sorpresa nuestra, aunque hubiese sido poco, hubo formación de unas

escasas colonias (fig. 8). Esto corresponde a que se ha descrito que dentro de los componentes de las hojas de maíz (*Zea mays*) que cubren la “mazorca” además de los grandes porcentajes de holocelulosa y α -celulosa, también hay un notable contenido de azúcares solubles, los cuales en este caso *S. cerevisiae* pudo degradar(24–26).

Agar corazón de piña (*Ananas comosus*)

El crecimiento en este medio fue uno de los mejores (fig. 9), reiterando el hecho de que en cada uno de ellos, el crecimiento fue moderado porque el microorganismo no presentó una buena formación de colonias ni en el medio con más productividad. El ICA obtenido en este medio fue de 1,2 (tabla 1). El crecimiento obtenido en este agar compuesto únicamente por el corazón de una piña (*Ananas comosus*) se debe a que esta porción de la fruta contiene un alto contenido de azúcares solubles que *S. cerevisiae* puede utilizar(27). Adicional a esto, se tuvo en cuenta el hecho de que en esta porción de la piña se encuentra una alta concentración de bromelina (EC 3.4.22.32), enzima proteolítica característica de las bromeliáceas, por lo cual el pH del corazón de la piña es más ácido con respecto al resto de la fruta(28).

Agar zanahoria (*Daucus carota* subsp. *sativus*)

En este medio de cultivo natural, el resultado del método ecométrico fue exactamente igual al agar guayaba agria. Se obtuvo un ICA de 1,4 (tabla 1). Teniendo en cuenta las condiciones anteriormente enunciadas acerca de las características de crecimiento celular de *S. cerevisiae* en este estudio, fue uno de los mejores resultados (fig. 10). Esto se debe a que es un medio rico en carbohidratos ideales para el metabolismo de esta levadura, ya que contiene porcentajes altos de sacarosa, fructosa y glucosa, y solo un escaso porcentaje de celulosa y almidón(29).

CONCLUSIONES

El aprovechamiento de los residuos sólidos de las empresas agroindustriales para la producción de medios de cultivo es una idea muy factible, puesto que muchos de estos residuos que se desechan contienen nutrientes como carbohidratos que pueden ser aprovechados de una forma productiva y darle valor agregado a los residuos.

Dentro de nuestro estudio, en los medios en los que se produjo un mayor crecimiento microbiano con respecto a los demás fueron el agar guayaba agria y el agar zanahoria,

seguidos del agar corazón de piña. Estos fueron los más indicados para el cultivo de microorganismos con características similares al utilizado en este estudio, puesto que son medios ricos en azúcares de fácil degradación, tales como sacarosa, glucosa y fructosa. Teniendo en cuenta de que los mejores medios tuvieron un ICA de poca productividad, pero ese fue el comportamiento del medio de cultivo control PDA.

Constatando el resultado del medio agar papa dextrosa, se notó que el crecimiento de la levadura *S. cerevisiae* presentó un pobre incremento en su número de UFC. Esto pudo ser debido a que la muestra de donde se tomó el microorganismo no presentaba las condiciones de viabilidad para hacer un cultivo con un desarrollo óptimo, por lo que valdría la pena repetir los experimentos, ya que sin un ICA de 5,0 en el PDA es una señal de falta de viabilidad microbiana.

Se encontró que el pH es un factor influyente en la solidificación del agar, puesto que si este presentaba una alta acidez, o una alta alcalinidad no ocurría la solidificación del medio, por lo que se recomienda medir el pH de la solución con la que se vaya a realizar el medio natural, puesto que algunos de los materiales utilizados

pueden no tener una neutralidad en la concentración de hidrogeniones.

En un balance general se pudo observar que de acuerdo al microorganismo al cuál esté destinado el medio natural, se debe mejorar la composición de acuerdo con sus necesidades tales como: uso de fuentes de carbono, actividad enzimática, pH ideal para el crecimiento, entre otros factores que podrían afectar la eficacia del crecimiento celular, esto para futuros estudios en los que se pretenda utilizar residuos o mejorar alguna composición de los nutrientes de un medio para el cultivo de microorganismos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Condayan C. Culture media. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2008 Sep 1 [cited 2017 Nov 18];6(9):646–646. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrmicro1981>
2. Crisley Fd, Peeler Jt, Angelotti R. Comparative evaluation of five selective and differential media for the detection and enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods. *Appl Microbiol* [Internet]. 1965 Mar [cited 2017 Nov 19];13(2):140–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14325870>
3. Wang JD, Levin PA. Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2009 [cited 2017 Oct 4];7(11):822–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19806155>
4. Berde C V, Berde VB. Vegetable Waste as Alternative Microbiological Media for Laboratory and Industry. *World J Pharm Pharm Sci* 4 (5), 1488. 2015;4(5):1488 – 1494.
5. Basu S, Bose C, Ojha N, Das N, Das J, Pal M, et al. Evolution of bacterial and fungal growth media. *Bioinformation* [Internet]. 2015 [cited 2017 Nov 19];11(4):182–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26124557>
6. Mohamed Mohamed Yasseen Elghandour M. *Saccharomyces cerevisiae* y su impacto sobre la capacidad fermentativa microbiana en herbívoros. 2016 [cited 2017 Nov 17]; Available from: <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/59209>
7. Reis VR, Bassi APG, Silva JCG da, Ceccato-Antonini SR. Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2013 [cited 2017 Nov 19];44(4):1121–31. Available from:

- http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822013000400014
8. American Society of Enologists. CL, Brown JA, Olineka TL, Cocolin L, Mills DA, Bisson LF. American journal of enology and viticulture. [Internet]. Vol. 52, American Journal of Enology and Viticulture. American Society of Enologists; 2001 [cited 2017 Nov 17]. 198-203 p. Available from: <http://www.ajevonline.org/content/52/3/198>
 9. van Maris AJA, Abbott DA, Bellissimi E, van den Brink J, Kuyper M, Luttk MAH, et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: Current status. Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol. 2006;90(4):391–418.
 10. Mossel DA, Bonants-Van Laarhoven TM, Ligtenberg-Merkus AM, Werdler ME. Quality assurance of selective culture media for bacteria, moulds and yeasts: an attempt at standardization at the international level. J Appl Bacteriol [Internet]. 1983 Jun [cited 2017 Nov 19];54(3):313–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6348012>
 11. Uthayasooryan M, Pathmanathan S, Ravimannan N, Sathyaruban S. Formulation of alternative culture media for bacterial and fungal growth. Der Pharm Lett. 2016;8(1):444–9.
 12. Schneider-Poetsch T, Ju J, Eyer DE, Dang Y, Bhat S, Merrick WC, et al. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. Nat Chem Biol [Internet]. 2010 Mar [cited 2017 Nov 19];6(3):209–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20118940>
 13. Mantilla C, Mendoza C, Oviedo L. Productividad y selectividad del medio de cultivo a partir de guayaba agria (*Psidium araca*) en el crecimiento de levaduras nativas del género *Candida* sp. Rev Colomb Biotecnol [Internet]. 2010;12(2):116–23. Available from: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/18549>
 14. Wilson CW, Shaw PE, Campbell CW. Determination of organic acids and sugars in guava (*Psidium guajava* L.) cultivars by high-performance liquid chromatography. J Sci Food Agric [Internet]. 1982 Aug 1 [cited 2017 Nov 17];33(8):777–80. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2740330815>
 15. Chang S, Cho MH, Kang BG, Kaufman PB. Changes in starch content in oat (*Avena sativa*) shoot pulvini during the gravitropic response. J Exp Bot

- [Internet]. 2001 May 1 [cited 2017 Nov 19];52(358):1029–40. Available from: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jexbot/52.358.1029>
16. Xing S, Meng X, Zhou L, Mujahid H, Zhao C, Zhang Y, et al. Proteome Profile of Starch Granules Purified from Rice (*Oryza sativa*) Endosperm. PLoS One [Internet]. 2016 [cited 2017 Nov 19];11(12):e0168467. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27992503>
 17. Akao T, Yashiro I, Hosoyama A, Kitagaki H, Horikawa H, Watanabe D, et al. Whole-Genome Sequencing of Sake Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai no. 7. DNA Res [Internet]. 2011 Dec 1 [cited 2017 Nov 18];18(6):423–34. Available from: <https://academic.oup.com/dnaresearch/article-lookup/doi/10.1093/dnares/dsr029>
 18. Duarte-Delgado D, Núñez-López C-E, Narváez-Cuenca C-E, Restrepo-Sánchez L-P, Melo SE, Sarmiento F, et al. Natural variation of sucrose, glucose and fructose contents in Colombian genotypes of *Solanum tuberosum* Group Phureja at harvest. J Sci Food Agric [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2017 Nov 19];96(12):4288–94. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.7783>
 19. Changes in carbohydrate and glucosinolate composition in white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) during blanching and treatment with acetic acid. Food Chem [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2017 Nov 19];95(2):226–36. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881460500701>
 20. Nutritional value, bioactive compounds and health benefits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). J Food Compos Anal [Internet]. 2016 Jun 1 [cited 2017 Nov 19];49:19–34. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157516300230>
 21. Castillo B, Pinzón AM, Londoño MT. Characterization of the mechanical properties of chives (*Allium schoenoprasum* L.). Agron Colomb [Internet]. 1983 Jan 1 [cited 2017 Nov 19];31(1):83–8. Available from: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/34328>
 22. Dorais M, Ehret DL, Papadopoulos AP. Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. Phytochem Rev [Internet]. 2008 Jul 6 [cited 2017 Nov 19];7(2):231–50. Available from:

- <http://link.springer.com/10.1007/s11101-007-9085-x>
23. Kalavacharla V, Liu Z, Meyers BC, Thimmapuram J, Melmaiee K. Identification and analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) transcriptomes by massively parallel pyrosequencing. *BMC Plant Biol* [Internet]. 2011 Oct 11 [cited 2017 Nov 19];11(1):135. Available from: <http://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-11-135>
 24. Russell SH, Evert RF. Leaf vasculature in *Zea mays* L. *Planta* [Internet]. 1985 [cited 2017 Nov 19];164(4):448–58. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00395960>
 25. Fiala V, Glad C, Martin M, Jolivet E, Derridj S. Occurrence of soluble carbohydrates on the phylloplane of maize (*Zea mays* L.): variations in relation to leaf heterogeneity and position on the plant. *New Phytol* [Internet]. 1990 Aug 1 [cited 2017 Nov 19];115(4):609–15. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00492.x>
 26. Leach KA, Braun DM, Leach KA, Braun DM. Soluble Sugar and Starch Extraction and Quantification from Maize (*Zea mays*) Leaves. In: *Current Protocols in Plant Biology* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2016 [cited 2017 Nov 19]. p. 139–61. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cp.pb.20018>
 27. Cordenunsi B, Saura-Calixto F, Diaz-Rubio ME, Zuleta A, Tiné MA, Silveira Buckeridge M, et al. Carbohydrate composition of ripe pineapple (cv. perola) and the glycemic response in humans. 2009 [cited 2017 Nov 19];(5004023). Available from: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v30n1/v30n1a41.pdf>
 28. Bromelain, the enzyme complex of pineapple (*Ananas comosus*) and its clinical application. An update. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 1988 Feb 1 [cited 2017 Nov 19];22(2):191–203. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378874188901274>
 29. Bongoni R, Stieger M, Dekker M, Steenbekkers B, Verkerk R. Sensory and health properties of steamed and boiled carrots (*Daucus carota* ssp. *sativus*). *Int J Food Sci Nutr* [Internet]. 2014 Nov 25 [cited 2017 Nov 19];65(7):809–15. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/09637486.2014.931360>