



## INFLUENCIA DE DIVERSAS FUENTES DE CARBONO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE NOR-TRITERPENOS EN CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE *GALPHIMIA GLAUCA*

Jennifer Arenas García, Alexandre Cardoso Taketa y Ma. Luisa Villarreal

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. 777-329730; luisav@cib.uaem.mx, ataketa@uaem.mx

Palabras clave: *Galphimia glauca*, nor-secotriterpenos, nor-friedelanos.

**Introducción.** *Galphimia glauca* (Gg) es una planta utilizada tradicionalmente para tratar desórdenes del SNC como la ansiedad e insomnio. Los compuestos responsables de estas actividades son los nor-secotriterpenos conocidos como galfininas. Como estrategia para una producción controlada y aumentada de sus metabolitos activos se ha logrado la transformación genética de Gg mediante *Agrobacterium rhizogenes*<sup>1</sup>. Las raíces transformadas excretan al medio de cultivo nuevos nor-triterpenos denominados glaucetalinas, siendo la glaucetalina A (GlauA) la más abundante. El conocimiento de las rutas metabólicas de estos triterpenos, a través de experimentos de marcaje con <sup>13</sup>C y análisis por RMN, permitiría dirigir la vía biosintética de dichos metabolitos y lograr tener un control sobre sus productividades. El objetivo de este proyecto de investigación es determinar la fuente de carbono más apropiada para el estudio de la ruta biosintética de nor-friedelanos en raíces transformadas de Gg.

**Metodología.** La metodología de cultivo y análisis de las raíces transformadas se llevo a cabo de acuerdo a lo descrito por Nader<sup>1</sup>. Se realizó una cinética en que se modificó únicamente la fuente de carbono sacarosa (sac) por glucosa (glu), y otra cinética en dos fases con glu/acetato de sodio (AcONa). En esta última, se utilizó en la primera fase cultivos en medio B5 con 30 g/l de glucosa por 16 días, a ese día el medio fue reemplazado por uno nuevo constituido por B5 y 450 mg/l de AcONa hasta completar un período de 40 días.

**Resultados y discusión.** Cinética con glu como fuente de carbono: el crecimiento de las raíces de Gg mostró un comportamiento típico con una fase lag de 9 días, una fase exponencial que duró 18 días y una fase estacionaria a partir del día 27 hasta el día 45. La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) fue de 0.12 días<sup>-1</sup> con un tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de 6 días (Tabla 1). Con relación a la producción de GlauA, su detección comenzó a partir del día 9 de cultivo, presentando una producción máx. de 6.71 mg/l al día 30.

Cinética en dos fases: las raíces presentaron una fase lag de 5 días, una fase exponencial que duró 25 días y una fase estacionaria que comenzó a partir del día 30 hasta el día 40. La  $\mu$  fue de 0.05 días<sup>-1</sup> con un  $t_d$  de 14 días (Tabla 1). La producción de GlauA se registró a partir del día 5 de cultivo

con una concentración de 0.55 mg/l hasta llegar a un máximo de 1.08 mg/l al día 25.

Tabla 1. Comparación de parámetros cinéticos de crecimiento y producción de triterpenos en cultivos de células y raíces transformadas de *G. glauca* en diferentes fuentes de carbono.

Cultivo	*Células en sacarosa	**Raíces en sacarosa	Raíces en glucosa	Raíces en glucosa/AcONa
Inóculo (PF)	3.0 g/l	1.0 g/l	1.0 g/l	1.0 g/l
Biomasa máx. (PS)	11.4 g/l	11.0 g/l al día 33	11.0 g/l al día 45	3.5 g/l al día 35
Biomasa máx. (PF)	no reportada	117.0 g/l al día 29	137.9 g/l al día 45	30.9 g/l al día 25
Vel. espec. crec. ( $\mu$ )	0.09 días <sup>-1</sup>	0.12 días <sup>-1</sup>	0.12 días <sup>-1</sup>	0.05 días <sup>-1</sup>
Tiempo dupl. ( $t_d$ )	8 días	6 días	6 días	14 días
GlauA	no detectada	2.06 mg/l al día 23	6.71 mg/l al día 30	1.08 mg/l al día 25

\*Osuna, 2002; \*\*Nader, 2004.

Las concentraciones máximas de biomasa en peso seco (PS) tanto en glu como en sac fueron muy similares para células y para raíces, la diferencia en crecimiento se presentó en la cinética en dos fases, registrando un valor de aproximadamente la tercera parte de los crecimientos en las otras dos fuentes de carbono. Esta inhibición en crecimiento probablemente se deba a los altos valores registrados de pH (7.86) ocasionados por la adición del AcONa al medio de cultivo, ya que los valores de pH óptimos para cultivos vegetales es de 5.0–6.5.

**Conclusiones.** Se observa que los mejores crecimientos y producciones del compuesto de interés se presentan cuando las raíces crecen en gluc como fuente de carbono. Se debe optimizar las condiciones de crecimiento con AcONa, ya que este presenta la ventaja de menor costo para un experimento de marcaje isotópico (<sup>13</sup>C) comparado con otras fuentes de carbono.

### Bibliografía.

- 1.Nader, B, Taketa, A, Iturriaga, G, Pereda-Miranda, R, Villarreal, M. (2004). Genetic transformation of *Galphimia glauca* by *Agrobacterium rhizogenes* and the production of norfriedelanos. *Planta Med* 70: 1174-1179.
- 2.Osuna, L, Pereda-Miranda, R, Villarreal, M. (2002). *In vitro* production of sedative galphimine B by cell suspension cultures of *Galphimia glauca*. *Biotechnol Lett.* 24:257-261.