



**Regione del Veneto**  
**Giunta Regionale**  
**Direzione Formazione e Istruzione**

## **DGR n. 1463 del 08/10/2019**

**Cod. Ente: 2105 Rag. Sociale Università degli studi di Padova Asse Occupabilità**

**Cod. progetto:** 2105-0048-1463-2019; **Titolo progetto:** “Attitudine alla produzione di antociani in biotipi di mirtillo nero selvatico e ottimizzazione dello scaling up di colture in vitro per la preparazione di estratti ad alto titolo di antociani per l'impiego nel cibo biologico”; **COD. CUP:** C94E19000820008

**Cod. Intervento:** 2105/10260354-002/231/DEC/20; **Titolo dell'intervento:** “Ottimizzazione di scaling-up di colture in vitro per la preparazione di estratti ad altro titolo di antociani per il cibo biologico e migliorare la salute e il benessere dei consumatori, attraverso cibi in grado di apportare elementi utili e funzionali”

**Sede:** Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e Ambiente – DAFNAE, Viale dell'Università, 16, 35020 Legnaro (Padova)

**Azienda partner:** DEMETHRA BIOTECH S.r.l., Via dell'Innovazione, 1, 36043 Camisano Vicentino (Vicenza).

1222-2022  
**800**  
ANNI



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA



**DemBiotech®**  
Science-based natural ingredients

**Destinatario del progetto:** Dr. Laura Ravazzolo  
**Responsabile del progetto:** Prof. Silvia Quaggiotti

# Una panoramica sulla ricerca svolta

1. Le colture cellulari vegetali
2. Uno sguardo a mirtillo ed Echinacea: obiettivi ricerca
3. Marcatori molecolari predittivi della biosintesi di metaboliti secondari
4. Colture cellulari di mirtillo per la produzione di **antociani**
  - Risultati
5. Colture cellulari di Echinacea per la produzione di **acido cicorico**
  - Risultati
6. **Conclusioni** e prossimi **traguardi** da raggiungere



Regione del Veneto  
Giunta Regionale  
Direzione Formazione e Istruzione

# Le colture cellulari vegetali

- Il fondamento biologico della coltura in vitro si basa sulla **totipotenza cellulare**, caratteristica che conferisce alle piante la **capacità di replicarsi e riprodursi a partire da un semplice frammento di tessuto vegetale** e che permette la rigenerazione di una nuova pianta con lo stesso profilo morfologico e fitochimico.
- Attraverso questa tecnologia, non OGM e alternativa ai metodi di coltivazione tradizionali, **è possibile ottenere un fitocomplesso altamente standardizzato per un impiego stabile e sicuro** nei settori *health care*, *personal care*, *food*, *veterinario* e *crop care*, **garantendo il completo affrancamento da variazioni geografiche e disponibilità stagionali, unitamente ad un profilo di elevata sicurezza**, eco-sostenibilità e totale rispetto della biodiversità.

# Le colture cellulari vegetali

## ➤ Richiesta dei consumatori:

- cibi biologici ad alto valore nutrizionale, volti a migliorare la salute e il benessere del consumatore.



## ➤ Richiesta del mercato:

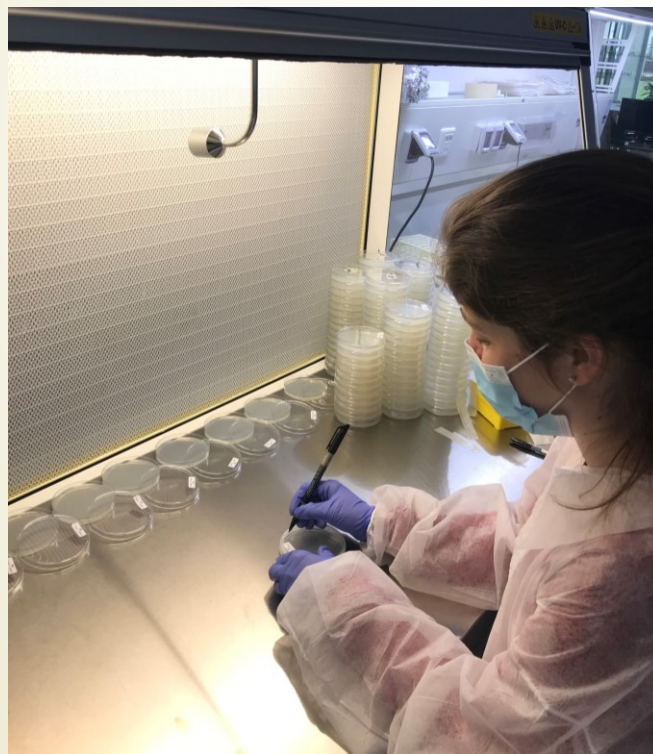
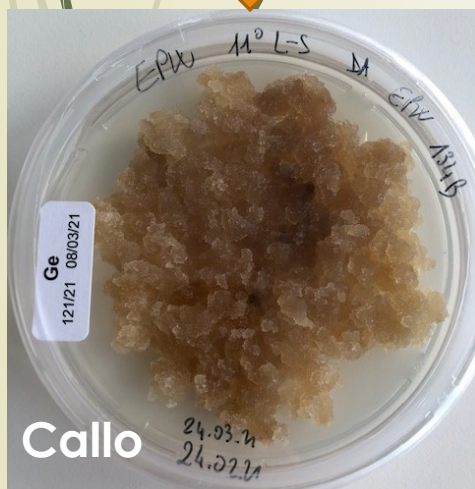
- *botanicals* con elevati standard di qualità e di sicurezza, proteggendo il consumatore da prodotti fraudolenti di scarsa qualità.
- riduzione dei tempi di coltivazione e abolizione dell'uso di contaminanti, solventi e pesticidi.

Da mirtillo → **Antocianine**: proprietà antiossidanti, antinfiammatorie ed antitumorali.

Da echinacea → **Acido cicorico**: proprietà immunostimolanti e marcata attività antivirale e antiossidante, molto utili per rinforzare il sistema immunitario durante le sindromi influenzali.



# Le colture cellulari vegetali

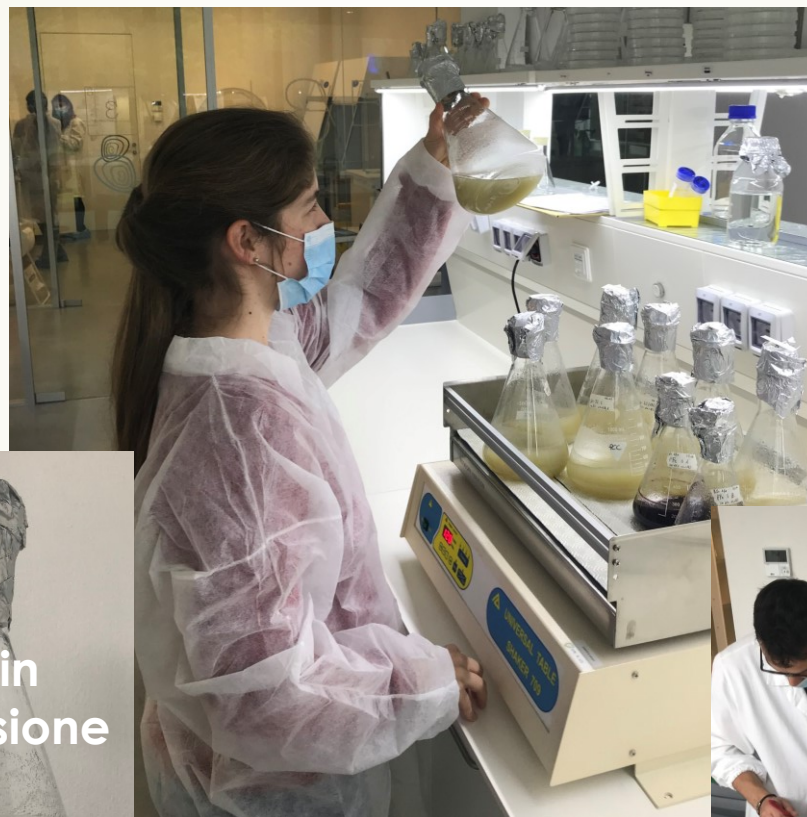
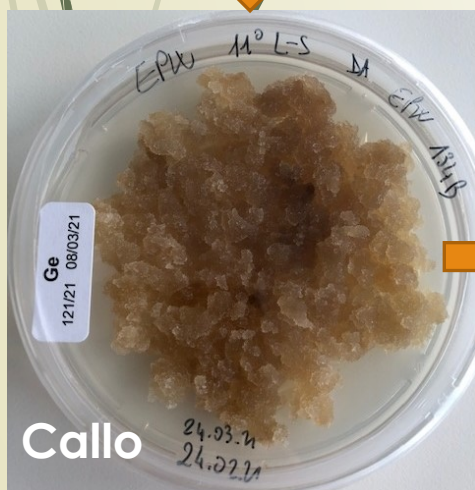


➤ Il processo prevede:

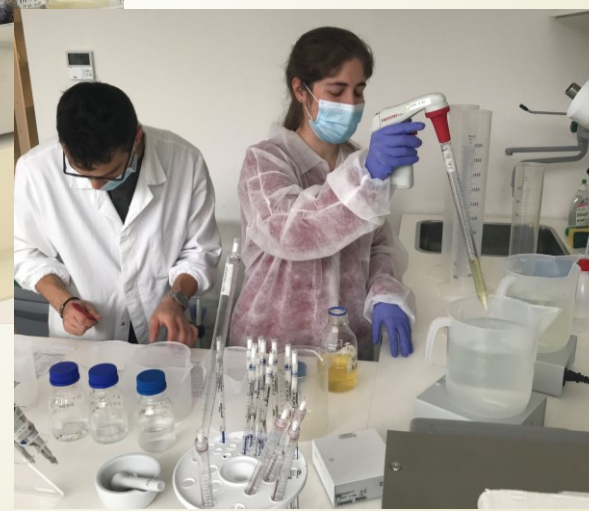
1. Dalla pianta madre alla coltura madre tramite selezione della pianta o dei semi, analisi DNA *fingerprint*, sanitizzazione del tessuto/semi e crescita in vitro
2. Espianti ed induzione della callogenesi tramite preparazione degli espianti e trasferimento in diversi terreni di coltura, fino alla selezione dei calli
3. Stabilizzazione su terreno solido ed analisi metabolica: selezione dei calli e crescita della biomassa, ottimizzazione e crescita stabile su terreno solido, analisi UPLC-MS del profilo metabolico, selezione della coltura madre



# Le colture cellulari vegetali

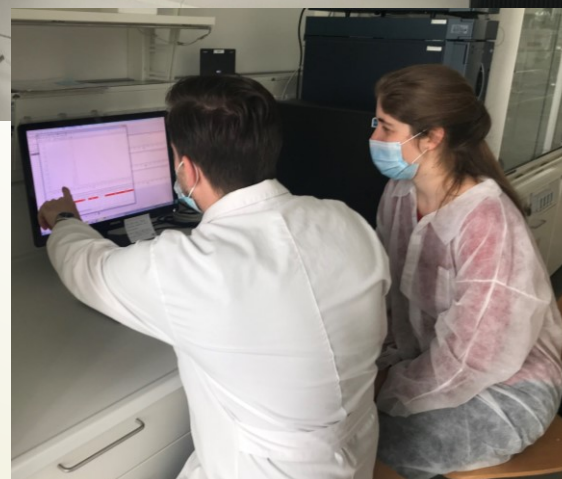
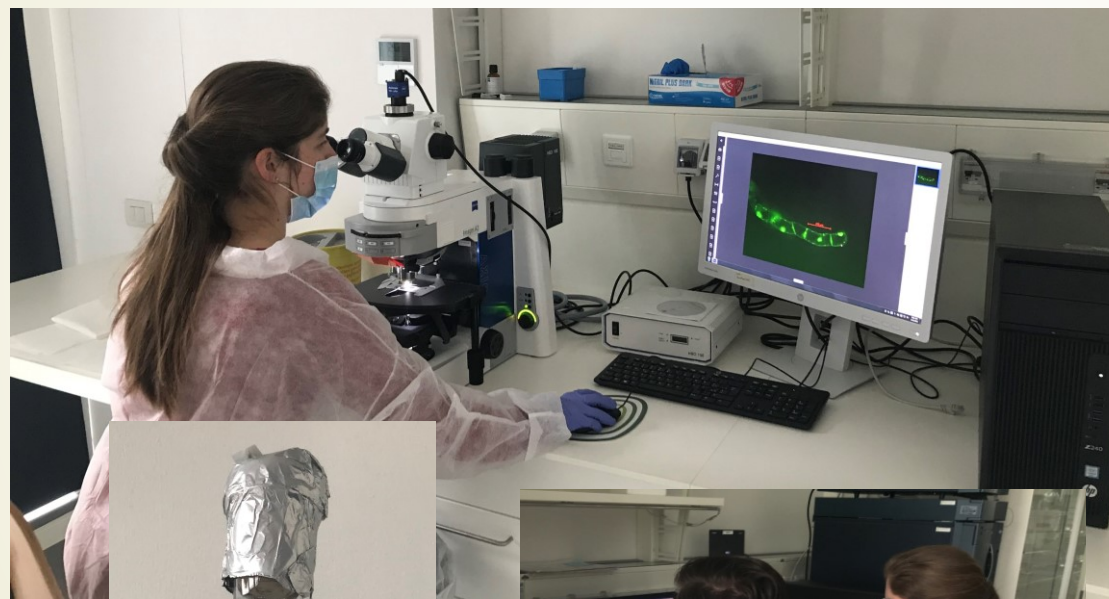
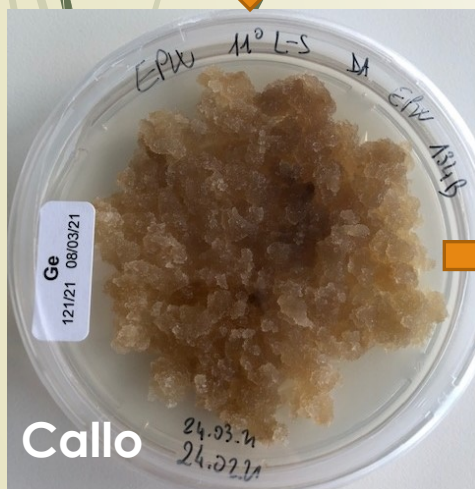


- Il processo prevede:
4. Stabilizzazione su terreno liquido: trasferimento della coltura selezionata in terreno liquido, ottimizzazione e crescita stabile su terreno liquido





# Le colture cellulari vegetali



Il processo prevede:

5. Profilo fitochimico: analisi UPLC-DAD del contenuto di marker analitici, ottimizzazione della produzione di metaboliti secondari e primari, caratterizzazione del profilo metabolico
6. Scale up: definizione parametri di crescita e fermentazione in bioreattore.

## Uno sguardo a mirtillo...



➤ **Mirtillo nero** → *Vaccinium myrthillus* L.

- Pianta arbustiva alta 20-50 cm
- In Italia è presente soprattutto su Alpi e Appennini ad altitudini tra 1200 e 2000 m
- Non sono disponibili cultivar: le bacche vengono raccolte su piante spontanee
- Elevato contenuto di composti antiossidanti (flavonoidi e tannini)
- Frutti ricchi di pigmenti naturali (antociani e carotenoidi)

➤ **Obiettivo della ricerca:** mettere a punto degli **approcci biotecnologici verdi** basati sulle **culture cellulari** per la **produzione di antociani** da impiegarsi come **additivi naturali** per preparati alimentari biologici salutistici.



**Antocianine: molecole di interesse nutraceutico, in quanto con proprietà antiossidanti, antinfiammatorie ed antitumorali.**





## Uno sguardo a mirtillo...



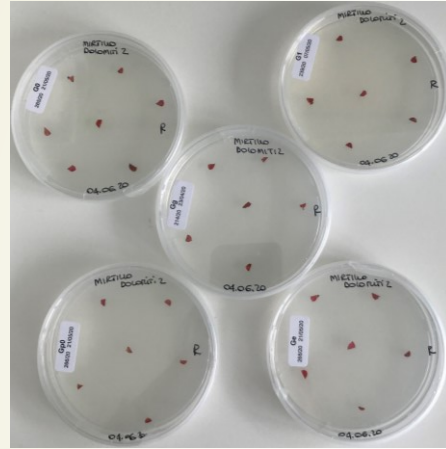
Micropropagazione in vasi di  
coltura su terreno agarizzato  
in condizioni sterili



Primi step di ambientamento in  
serra:  
plantule in alveoli di terra



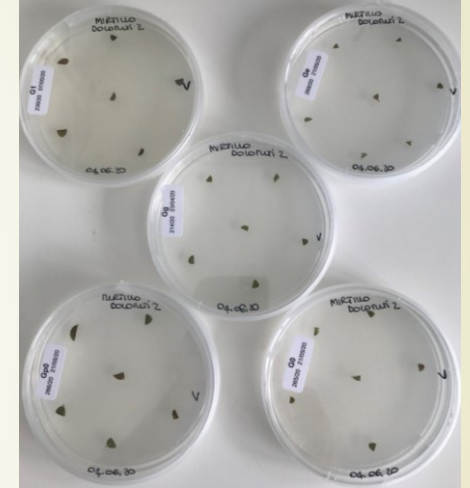
## Uno sguardo a mirtillo...



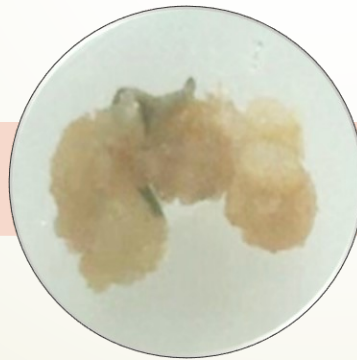
Espianti da tessuto fogliare da  
plantule micropropagate



**Callogenesi**



2 settimane



3 settimane



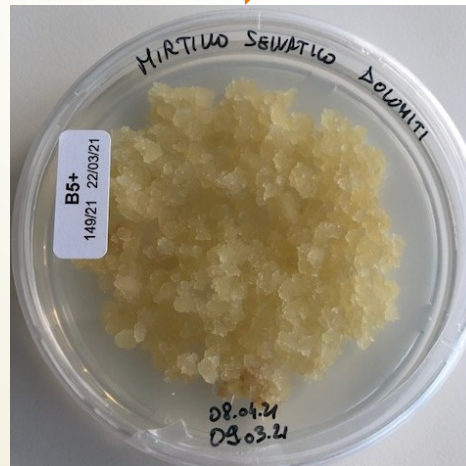
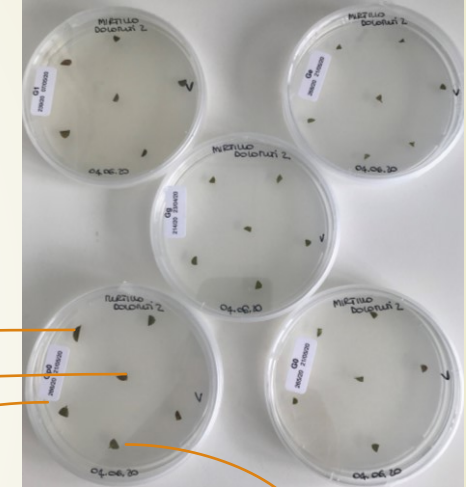
4 settimane



## Uno sguardo a mirtillo...



Colture cellulari, in 4 terreni diversi, derivate da callogenesi degli espianti



...ed uno sguardo ad Echinacea!



➤ ***Echinacea purpurea* L.**

- Pianta erbacea perenne della famiglia delle Asteraceae alta fino a 120 cm
- Nativa del Nord America, ma con notevole adattabilità alle diverse condizioni ambientali (crescono fino ad oltre 1500 m di altitudine)
- I suoi estratti sono ricchi in derivati dell'acido caffeico come echinacoside ed acido cicorico, studiati per le loro proprietà immunostimolanti.

- **Obiettivo della ricerca:** messa a punto di un protocollo rapido e affidabile per lo studio degli effetti di vari elicitori chimici o fattori ambientali sulla **produzione di polifenoli e acido cicorico** in ***Echinacea purpurea***, portando quindi a identificare alcuni **marcatori genetici predittivi della biosintesi** di queste molecole.



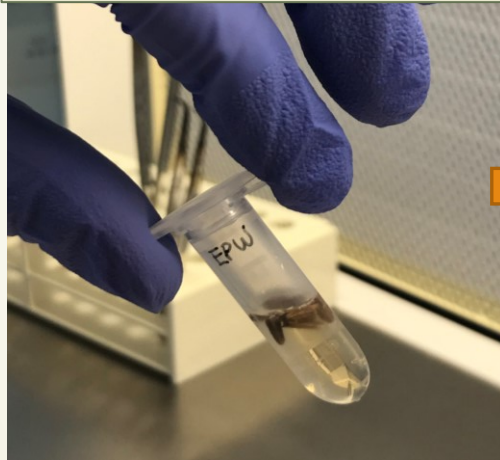
**Acido cicorico: proprietà immunostimolanti e marcata attività antivirale e antiossidante, molto utili per rinforzare il sistema immunitario durante le sindromi influenzali.**



...ed uno sguardo ad Echinacea!



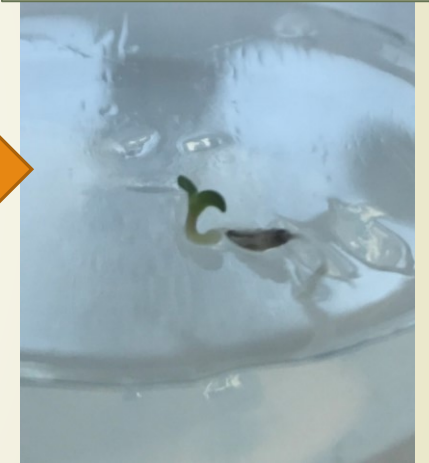
Sanitizzazione dei  
semi



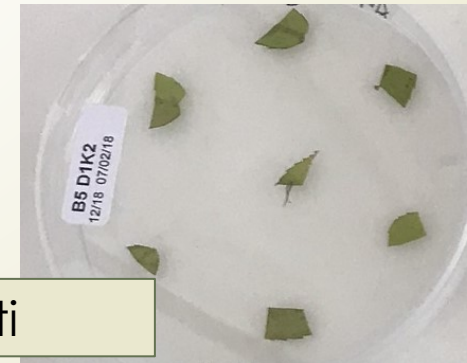
Semina in terreno  
solido



Germinazione  
dei semi



Espianti



...ed uno sguardo ad Echinacea!



Cellule in coltura  
solida



Cellule in coltura  
liquida





## Marcatori molecolari predittivi della biosintesi di metaboliti secondari

- ▶ Con la **biologia molecolare** possiamo **identificare geni** responsabili della biosintesi e/o regolazione di **metaboliti secondari di interesse** (es. antociani) di cui vogliamo **elevate concentrazioni** (titolo) una volta prodotti dalla coltura cellulare nel bioreattore.
- ▶ Per ottenere indicazioni sulla **regolazione dell'espressione genica**, abbiamo bisogno di estrarre l'**mRNA** dai campioni di colture cellulari.



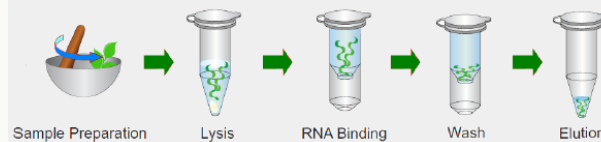
- ▶ I **livelli di espressione genica** possono essere analizzati tramite un **approccio a singolo gene** chiamato **Real-time PCR**, cioè l'amplificazione di un **singolo trascritto** mediante l'utilizzo di **primer specifici** (sequenze di oligonucleotidi che identificano SOLO la sequenza del gene di interesse) usando come template dei **cDNA** ottenuti da **retro-trascrizione** a partire **dall'RNA estratto dalla coltura cellulare** in diverse condizioni di crescita.

# Marcatori molecolari predittivi della biosintesi di metaboliti secondari

Individuazione di:

- Tesi da analizzare
- Geni target (putativi marcatori molecolari)

Estrazione RNA



Disegno primers

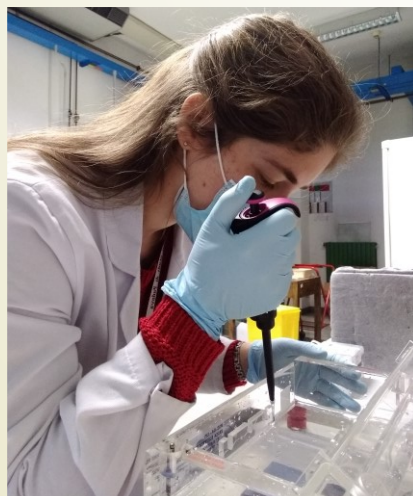
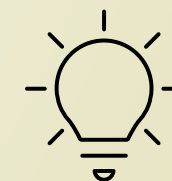
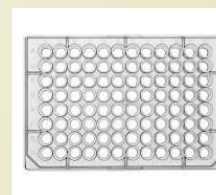
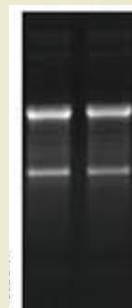
Quantificazione RNA  
(500 ng)

Sintesi cDNA

Real-time PCR

Analisi dei livelli di  
ESPRESSIONE GENICA

IDENTIFICAZIONE DEI  
MARCATORI MOLECOLARI  
predittivi della biosintesi del  
metabolita secondario di  
interesse



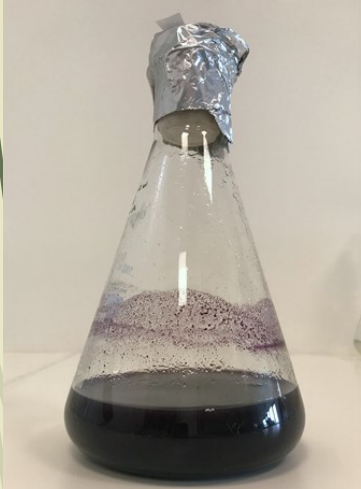


# Colture cellulari di mirtillo per la produzione di antociani

**Obiettivo:** ricerca di **nuovi protocolli per ottimizzare la produzione di antociani** delle colture cellulari di mirtillo durante la fase di pre-coltura e il successivo trasferimento in coltura su larga scala.

**Metodologia:** Individuazione di **marcatori genetici rappresentativi della via biosintetica degli antociani**, permettendo di effettuare una rapida e sistematica previsione del contenuto in antociani delle colture in diverse condizioni sperimentali.

- **Preparazione di campioni** sia da materiale vegetale micro-propagato che da colture indifferenziate per le analisi di marcatori genetici.
- Impiego di **metodi spettrofotometrici e colorimetrici** per valutare il contenuto e lo stato di ossidazione degli estratti antocianici.
- Ottimizzazione di un **protocollo di estrazione di RNA** adatto a colture cellulari
- Retrotrascrizione di RNA in **cDNA** ed analisi **espressione genica** tramite Real-time PCR.

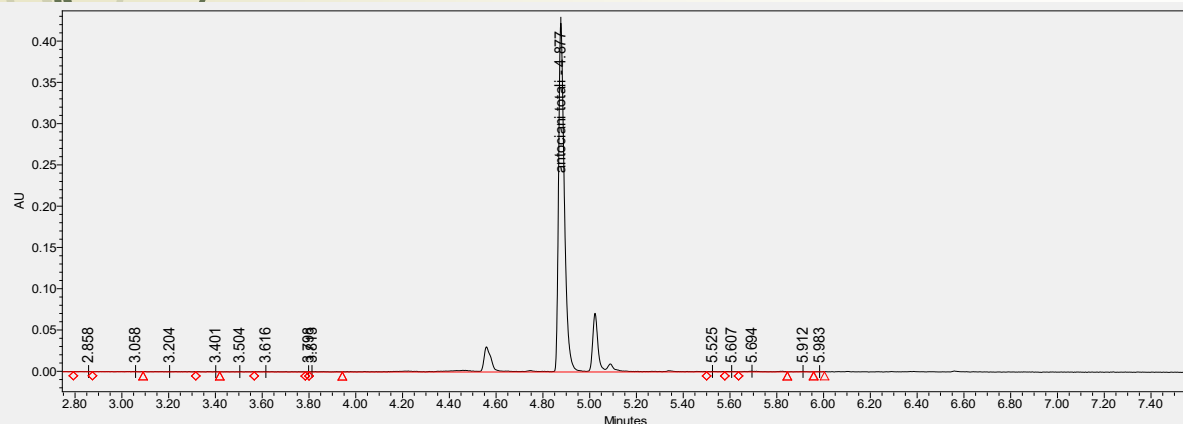
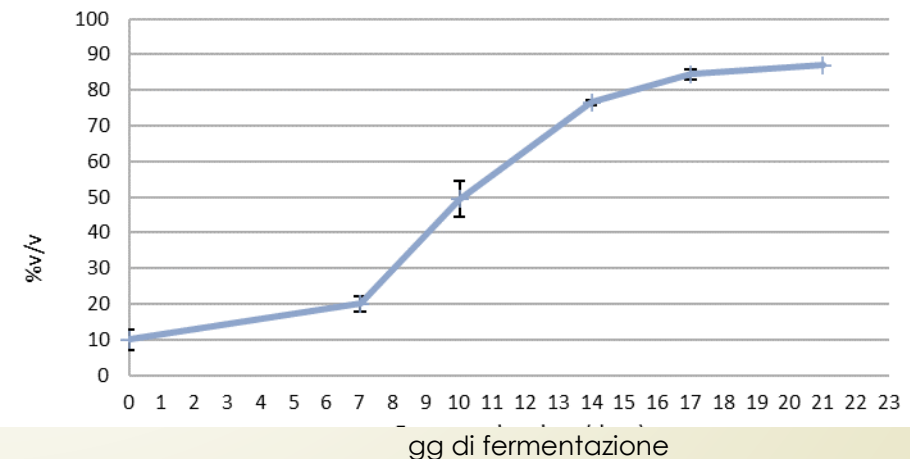


# Colture cellulari di mirtillo per la produzione di antociani



**Risultati:** una volta individuati i **marcatori genetici predittivi** di una attivazione della biosintesi di antociani (es. *ANS*), si è messo a punto **un metodo di screening rapido, sistematico e a costi contenuti** del **potenziale antocianico** delle diverse colture e condizioni sperimentali.

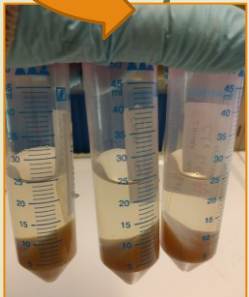
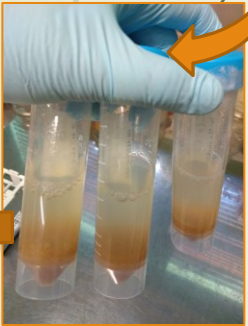
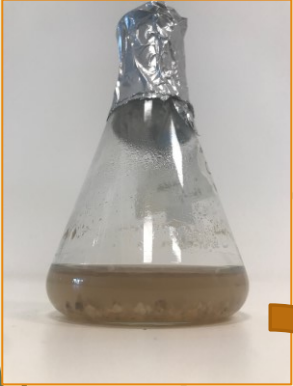
Curva di crescita







# Colture cellulari di Echinacea per la produzione di acido cicorico



**Obiettivo:** messa a punto di un **protocollo rapido e affidabile** per lo studio degli effetti di vari elicitori (es. jasmonato) o fattori ambientali sulla produzione di polifenoli e **acido cicorico** in ***Echinacea purpurea***, portando quindi a identificare alcuni **marcatori genetici predittivi della biosintesi** di queste molecole.

## **Metodologia:**

1. Ricerca bioinformatica di geni coinvolti nella biosintesi dell'acido cicorico in *E. purpurea*
2. Disegno di primers specifici per i geni selezionati
3. Prelievo in azienda delle colture cellulari in mezzo liquido (beuta) ad ogni time-point (6 time-points, 3 repliche biologiche ciascuno)
4. Ottenimento del pellet cellulare tramite centrifuga in falcon da 50 mL

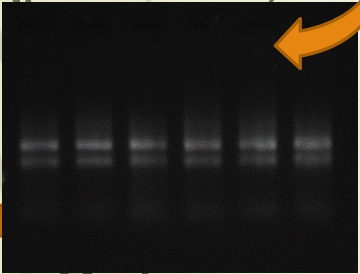
# Colture cellulari di Echinacea per la produzione di acido cicorico



**Obiettivo:** messa a punto di un **protocollo rapido e affidabile** per lo studio degli effetti di vari elicitori (es. jasmonato) o fattori ambientali sulla produzione di polifenoli e **acido cicorico** in ***Echinacea purpurea***, portando quindi a identificare alcuni **marcatori genetici predittivi della biosintesi** di queste molecole.

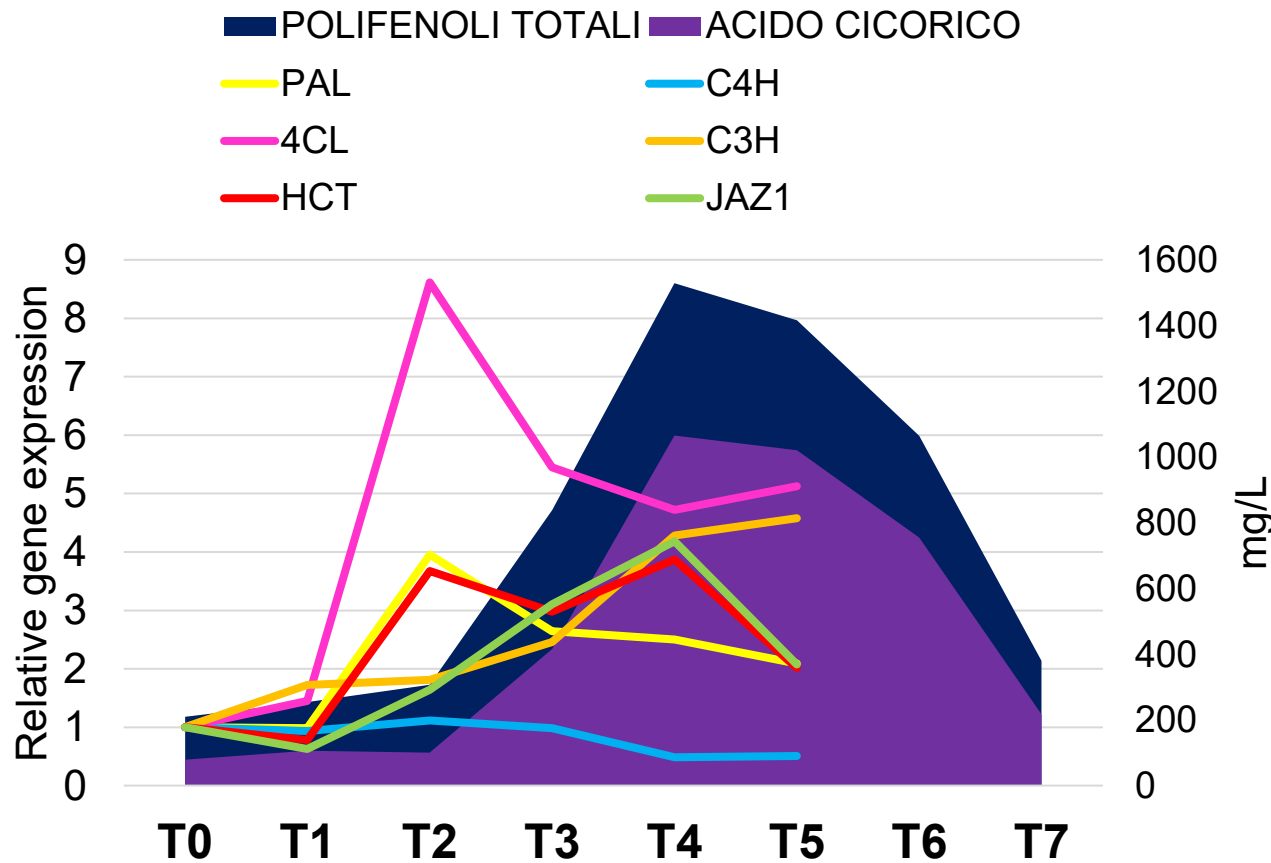
## **Metodologia:**

5. messa a punto di un metodo di **estrazione di RNA** da coltura cellulare per permettere l'analisi dell'espressione genica in campioni prelevati a tempi diversi nelle fasi di pre-produzione (6 time-points, 3 repliche biologiche ciascuno).
6. **Valutazione qualitativa e quantitativa dell'RNA** estratto.
7. Retro-trascrizione di RNA in **cDNA** e analisi di espressione genica tramite **Real-time PCR**.



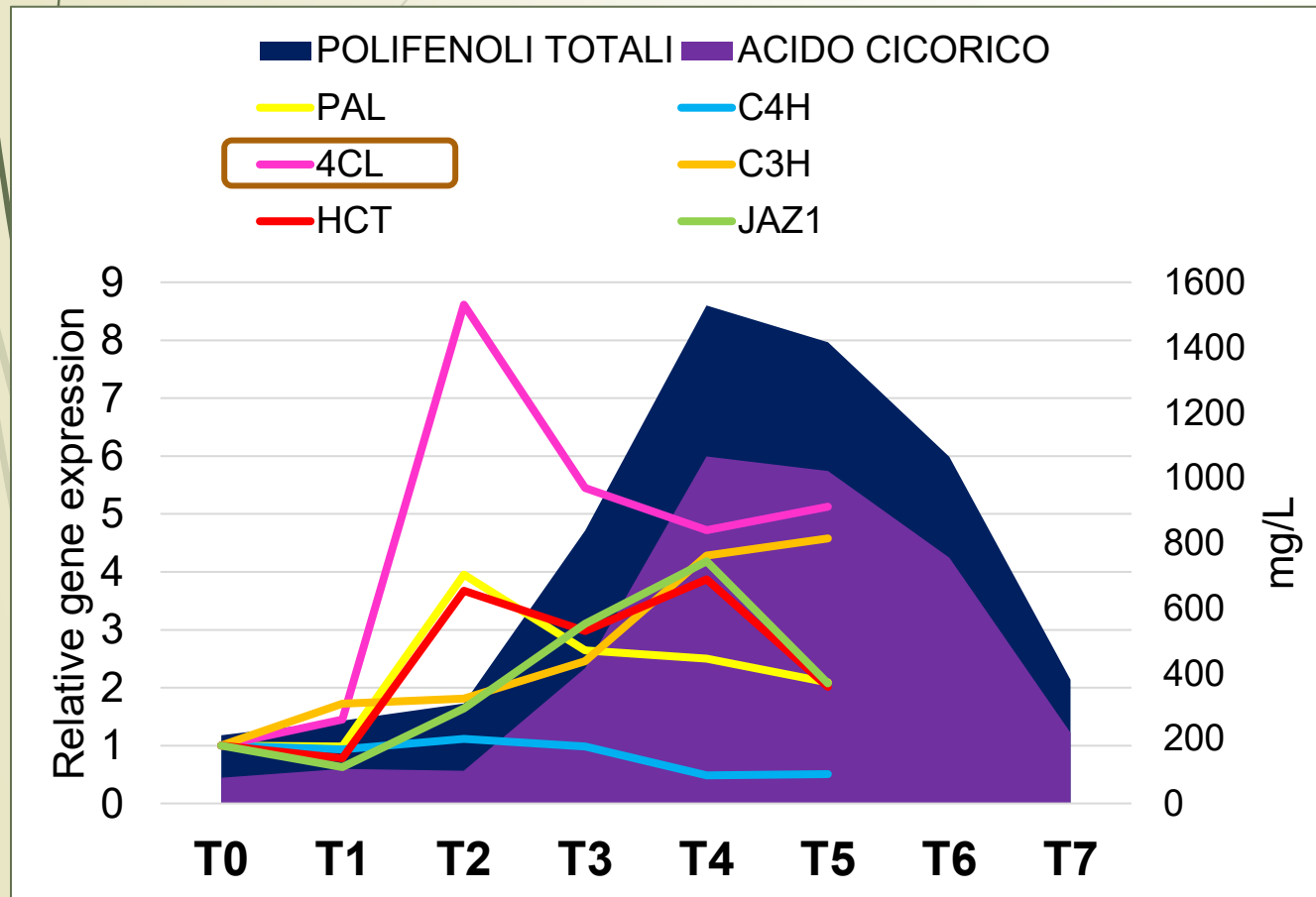


# Colture cellulari di Echinacea per la produzione di acido cicorico



**Risultati:** Dall'analisi dell'espressione genica in *Echinacea purpurea*, sono stati **identificati alcuni potenziali marcatori tra i geni annotati tra cui 5 geni legati alla biosintesi di acido cicorico (PAL, C4H, C3H, 4CL, HCT) e un gene marker dell'attivazione della via di segnalazione del jasmonato (JAZ1)** in colture cellulari di *Echinacea purpurea* in 6 diversi time-points (da T0 a T5).

# Colture cellulari di Echinacea per la produzione di acido cicorico



**Risultati:** L'obiettivo era valutare la possibilità di **individuare marcatori genetici predittivi della biosintesi di polifenoli ed acido cicorico** ed è stato raggiunto con l'**individuazione di 4CL**.



## Conclusioni e prossimi traguardi da raggiungere



- ▶ L'utilizzo di colture cellulari come bioreattori per la produzione di metaboliti secondari «green» permette di:
  - ▶ ottenere un fitocomplesso altamente standardizzato per un impiego stabile e sicuro nei settori *health care*, *personal care*, *food*, veterinario e *crop care*,
  - ▶ garantire il completo affrancamento da variazioni geografiche e disponibilità stagionali,
  - ▶ Fornire un profilo di elevata sicurezza, eco-sostenibilità e totale rispetto della biodiversità.
- ▶ Individuazione di marcatori molecolari predittivi per la biosintesi di antociani in mirtillo (ANS) e per la biosintesi di acidi cicorico in Echinacea (4CL).