



**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).



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DemBiotech®
Science-based natural ingredients

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



Regione del Veneto
Giunta Regionale
Direzione Formazione e Istruzione

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**

1222-2022
800
ANNI



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DemBiotech®
Science-based natural ingredients



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 fitocomplexo 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.



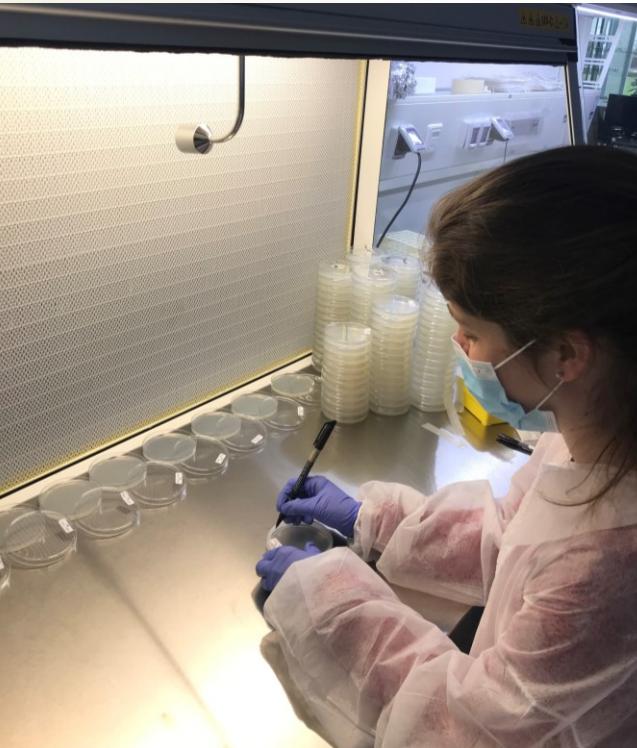
► Richiesta del mercato:

- *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.

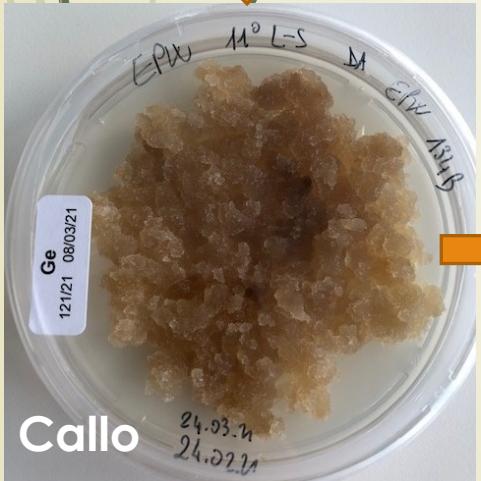
Le colture cellulari vegetali



► Il processo prevede:

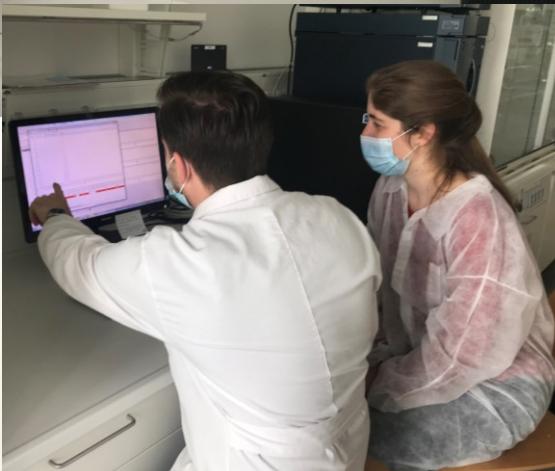
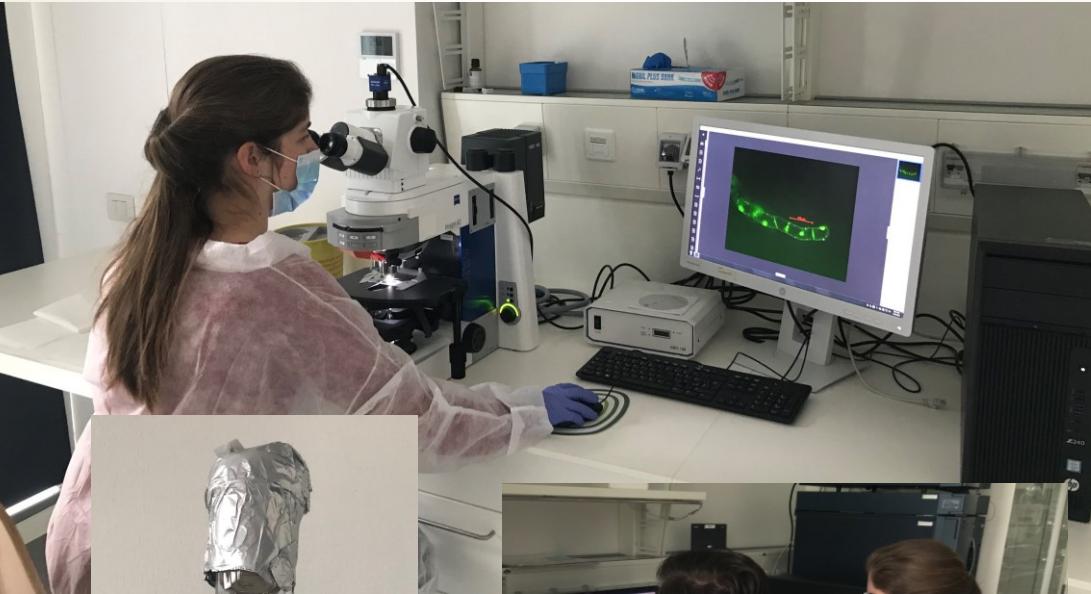
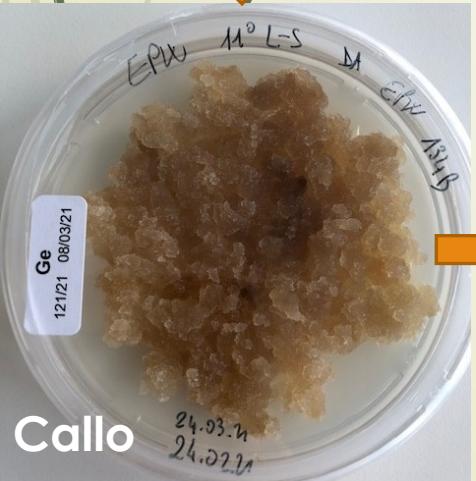
1. Dalla pianta madre alla coltura madre tramite selezione della pianta o dei semi, analisi DNA *fingerprint*, sanitizzazione del tessuto/semi e crescita in vitro
2. Espianti ed induzione della callogenesi tramite preparazione degli espianti e trasferimento in diversi terreni di coltura, fino alla selezione 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 myrtillus 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 **colture 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.

2



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



Uno sguardo a mirtillo...



Micropropagazione in vasi di coltura su terreno agarizzato in condizioni sterili



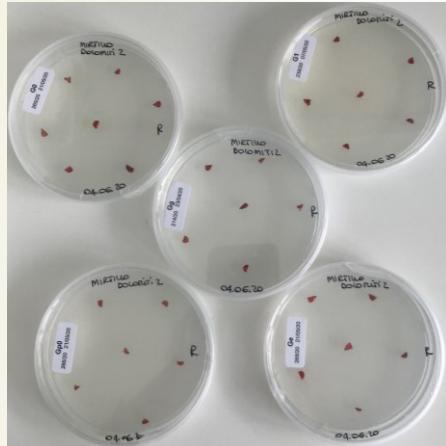
Primi step di ambientamento in serra:
plantule in alveoli di terra



2



Regione del Veneto
Giunta Regionale
Direzione Formazione e Istruzione

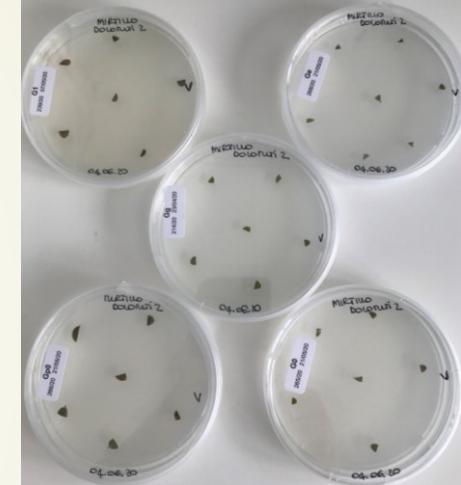


Uno sguardo a mirtillo...

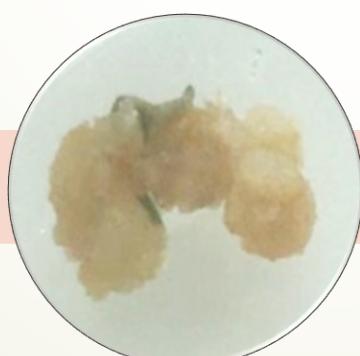
Espianti da tessuto fogliare da plantule micropropagate



Callogenesi



2 settimane



3 settimane

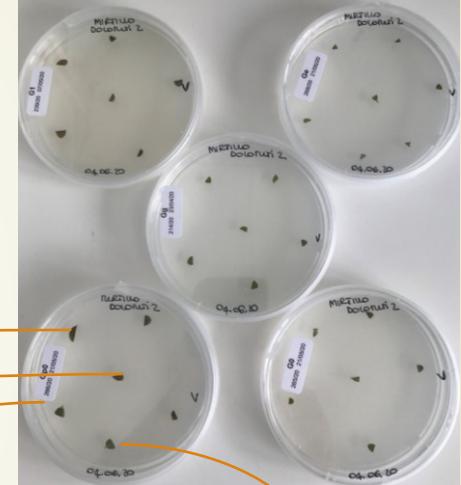
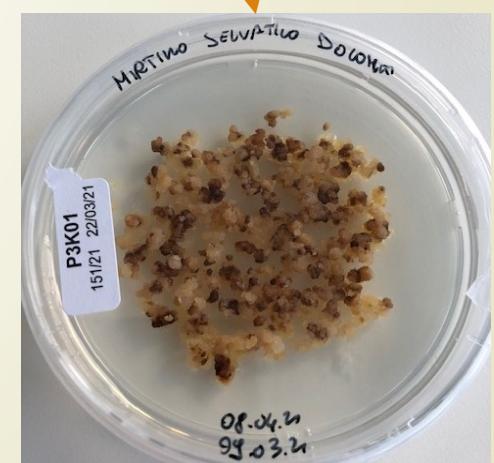


4 settimane



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 caffeo 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.

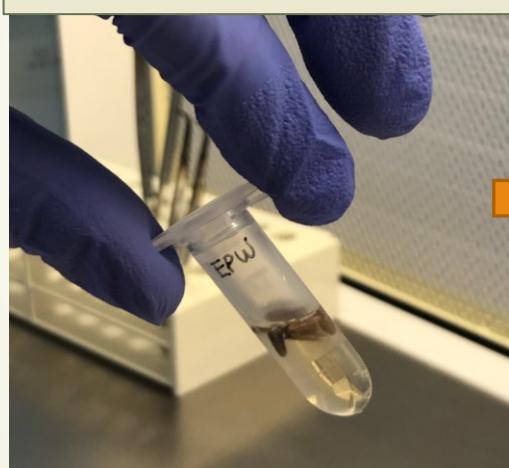


Acido cicorico: proprietà immunostimolanti e marcata attività antivirale e antiossidante, molto utili per rinforzare il sistema immunitario durante le sindromi influenzali.

...ed uno sguardo ad Echinacea!



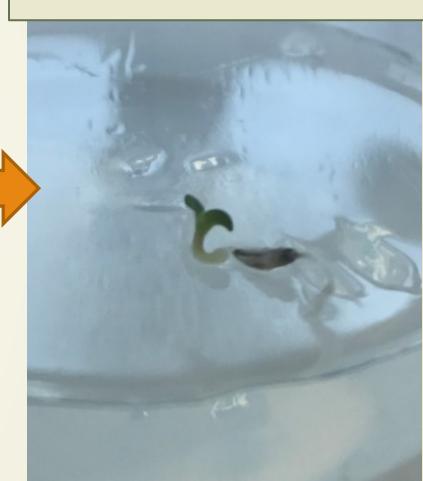
Sanitizzazione dei
semi



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.



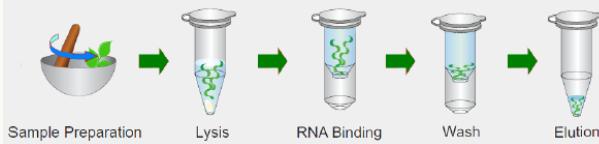
- ▶ I **livelli di espressione genica** possono essere analizzati tramite un **approccio a singolo gene** chiamato **Real-time PCR**, cioè l'amplificazione di un **singolo trascritto** mediante l'utilizzo di **primer specifici** (sequenze di oligonucleotidi che identificano SOLO la sequenza del gene 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

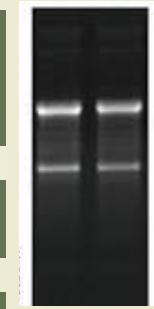
Individuazione di:

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

Estrazione RNA



Quantificazione RNA
(500 ng)



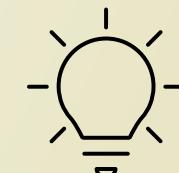
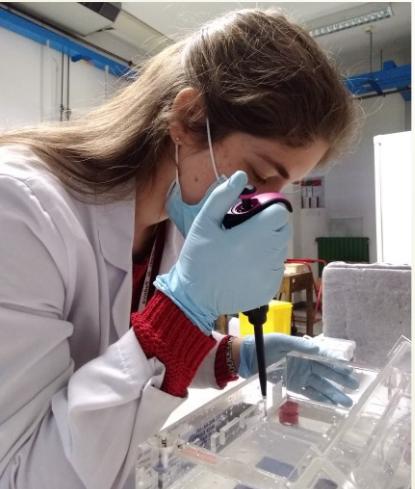
Sintesi cDNA

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.

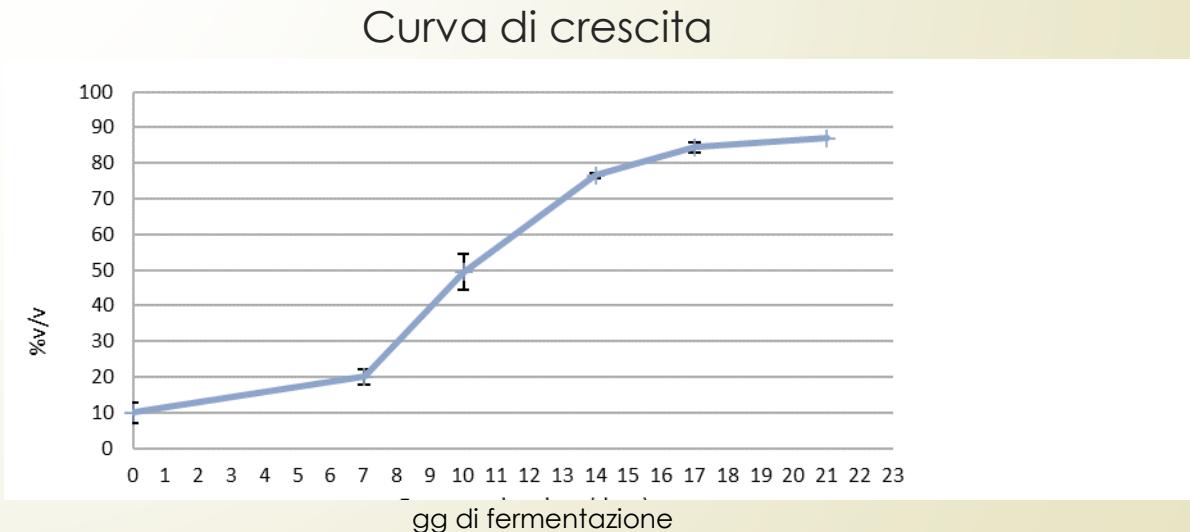
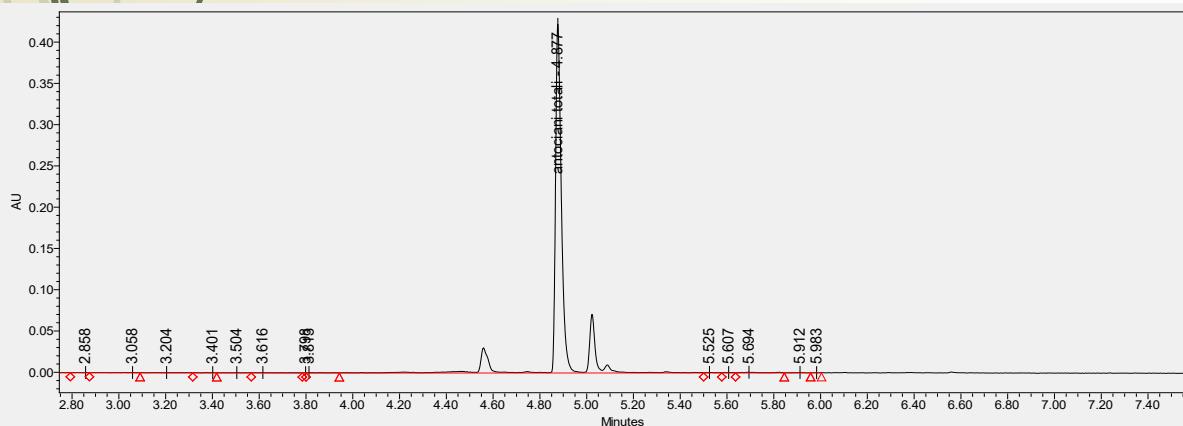
- **Preparazione di campioni** sia da materiale vegetale micro-propagato che da colture indifferenziate per le analisi di marcatori genetici.
- Impiego di **metodi spettrofotometrici e colorimetrici** per valutare il contenuto e lo stato di ossidazione degli estratti antocianici.
- Ottimizzazione di 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.

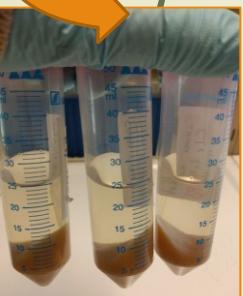
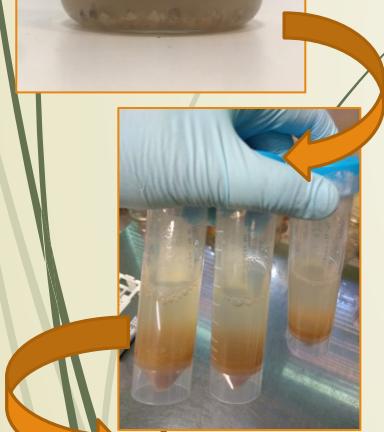
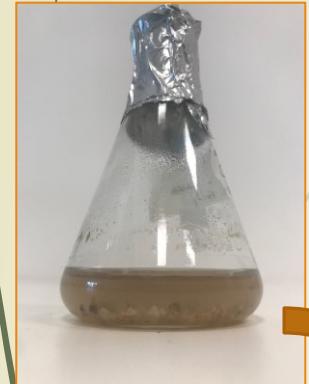


Colture cellulari di Echinacea per la produzione di acido cicorico

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





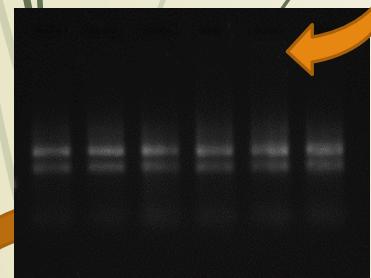
Colture cellulari di Echinacea per la produzione di acido cicorico



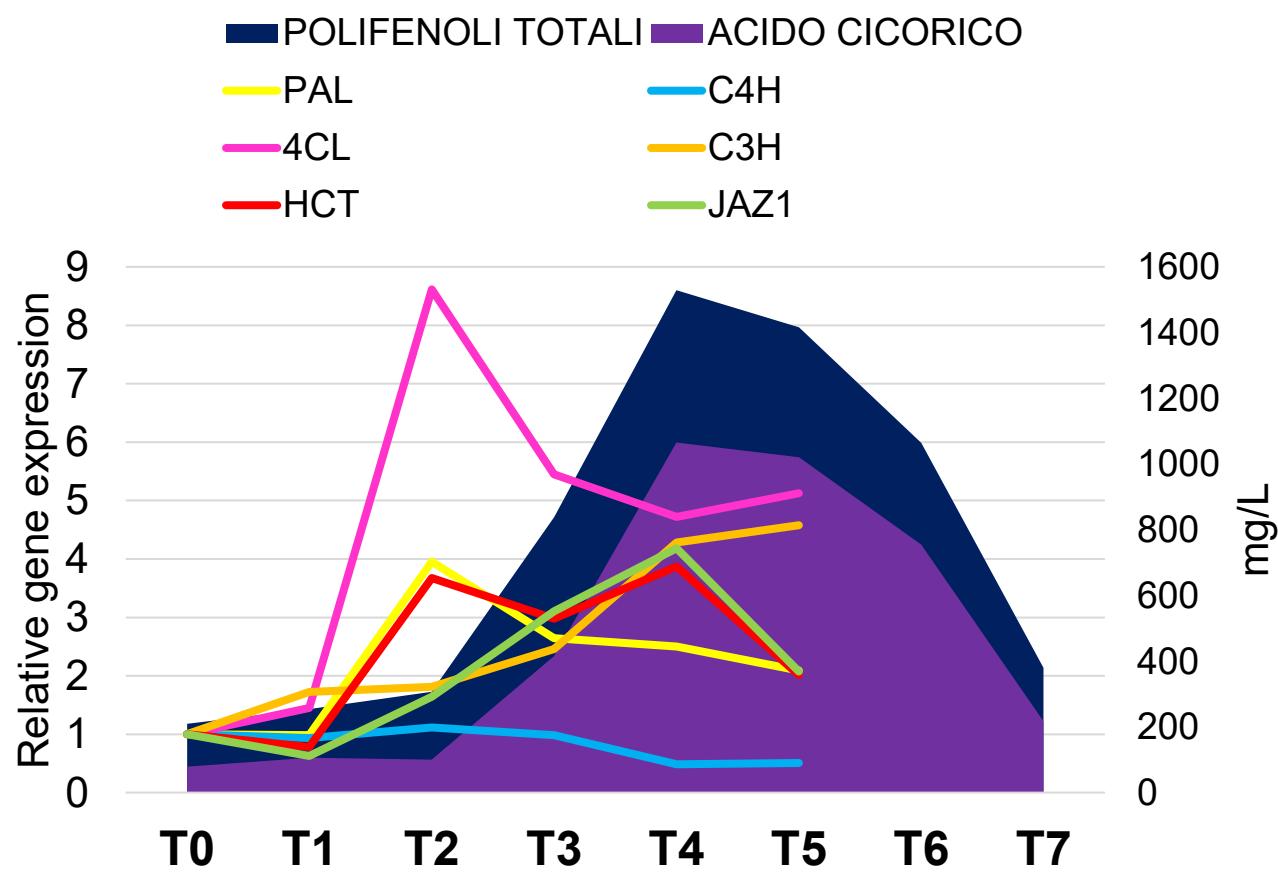
Obiettivo: messa a punto di un **protocollo rapido e affidabile** per lo studio degli effetti di vari elicitori (es. jasmonato) o fattori ambientali sulla produzione di polifenoli e **acido cicorico** in *Echinacea purpurea*, portando quindi a identificare alcuni **marcatori genetici predittivi della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

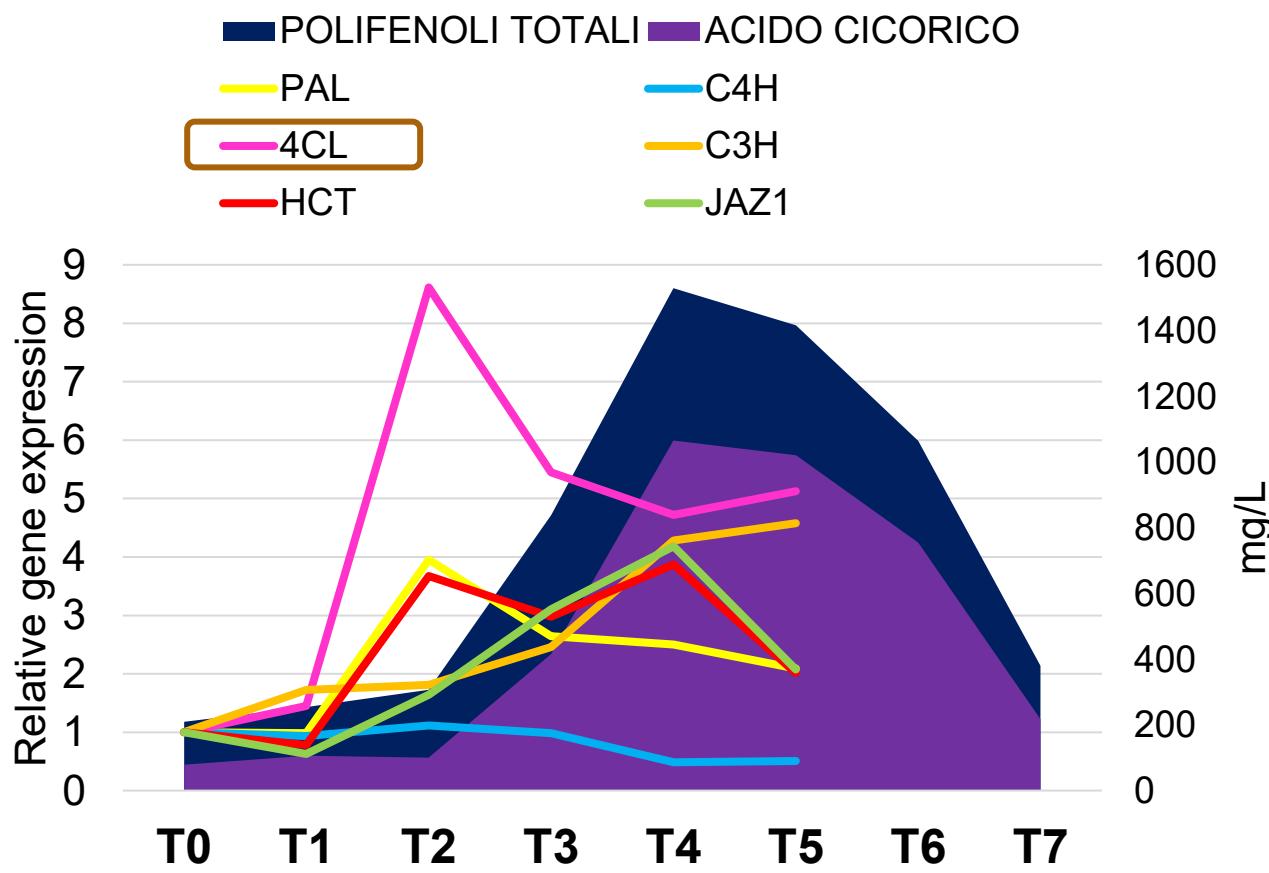


Colture cellulari di Echinacea per la produzione di acido cicorico



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**.



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

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).

1222-2022
800 ANNI



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



DemBiotech®
Science-based natural ingredients