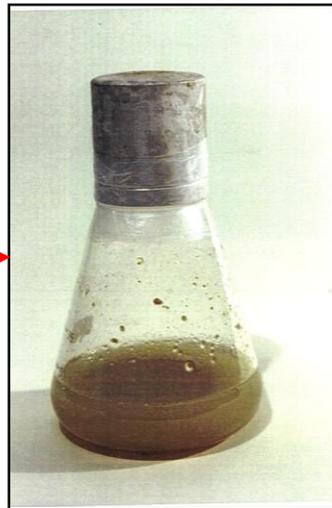


# Biotrasformazione di metaboliti secondari

Uno dei principali fattori limitanti per la biosintesi di taluni metaboliti è rappresentato dalla disponibilità di precursori

Somministrazione  
e di precursori a  
basso costo



Produzione di  
composti ad  
alto valore

# Biotrasformazione di metaboliti secondari

Vi sono delle regole da seguire per ottenere un sistema capace di biotrasformare in modo efficiente:

- le colture devono possedere gli ENZIMI necessari per la biotrasformazione del precursore nel prodotto desiderato;
- la VELOCITÀ DI FORMAZIONE del nuovo prodotto deve essere notevolmente superiore della sua ulteriore trasformazione in un altro composto di valore minore;
- le colture devono essere in grado di TOLLERARE LA PRESENZA DEL PRECURSORE E DEL PRODOTTO BIOTRASFORMATO.

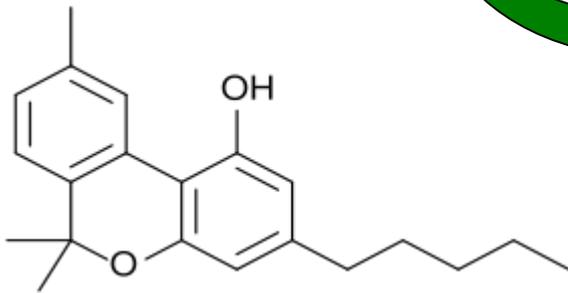
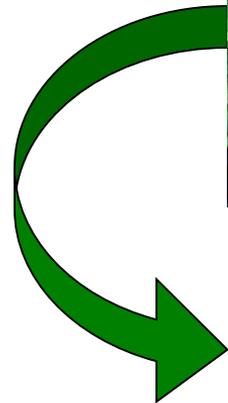
# Biotrasformazione di metaboliti secondari

<b>VANTAGGI</b>	<b>SVANTAGGI</b>
Economici	Sono richieste esperienze biotecnologiche e di apparecchiature per fermentazione come bioreattori
Enzimi e cofattori presenti	Possibilità di reazioni collaterali
	Utilizzo di cosolventi organici per il trasporto dei substrati e/o prodotti dentro e fuori dalle cellule

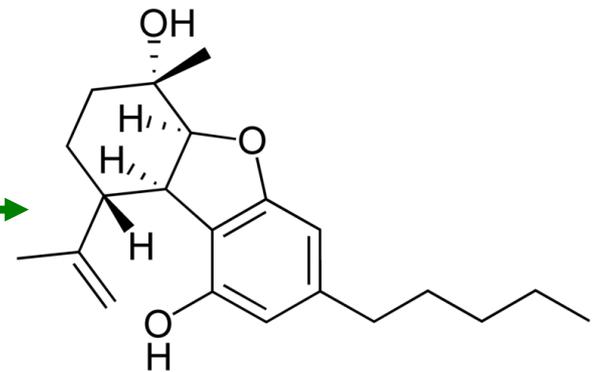
# Biotrasformazione di metaboliti secondari



*Cannabis sativa*



Tetraidrocannabinolo



Cannabielsoina

# Biotrasformazione di metaboliti secondari

## Alcuni esempi di biotrasformazione in colture cellulari vegetali

SPECIE

SUBSTRATO -->\_PRODOTTO

*Catharanthus roseus*

Catenammina --> ajmalicina

*Digitalis lanata*

Digitossina --> idrossidigitossina

*Daucus carota*

Gitossigenina --> idrossigitossigenina

*Mentha spicata*

Mentone --> neomentolo

*Mucuna pruriensis*

Tirosina --> diidrossifenilalanina

*Ochrosia elliptica*

Papaverina --> papaverinolo

*Panax ginseng*

Panaxatriolo --> glucoside

*Papaver somniferum*

Codeinone --> codeina

# Bioreattori e Fermentatori

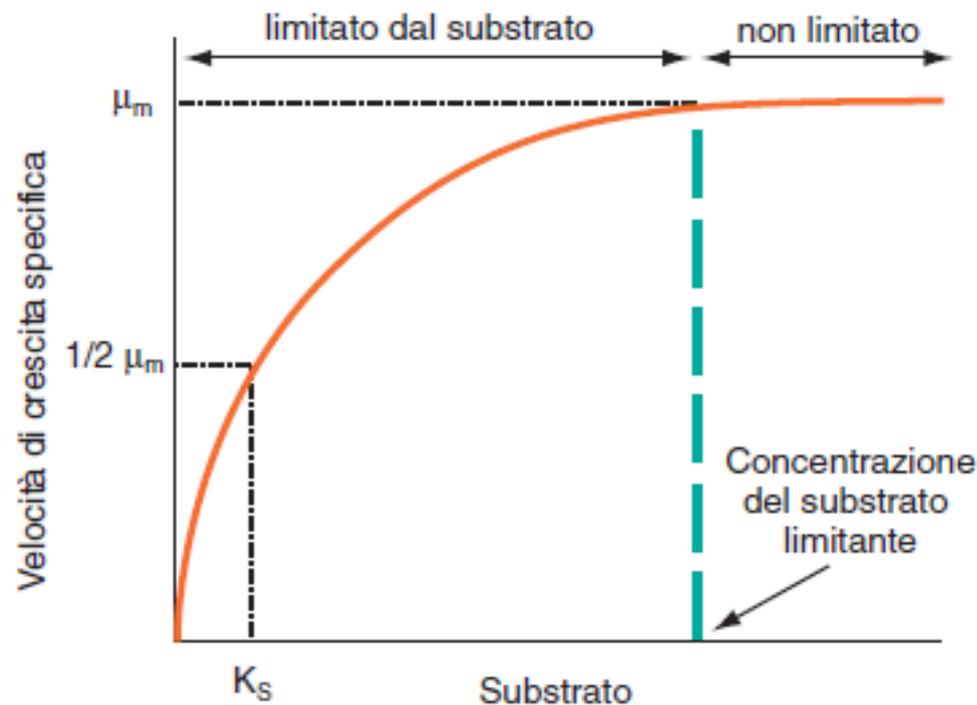
Un efficiente processo industriale richiede che le cellule siano prodotte su larga scala con un volume tale da ottenere un quantitativo proficuo di metaboliti.

Uno degli obiettivi principali è stato quello di sviluppare bioreattori idonei.

I bioreattori permettono la coltura in massa di cellule vegetali in contenitori da 2 ad alcune decine di migliaia di litri.

La crescita di cellule in bioreattori permette un controllo preciso dei parametri quali concentrazione di ossigeno e anidride carbonica, pH e rimescolamento delle sostanze nutritive.





**Figura 24.1**

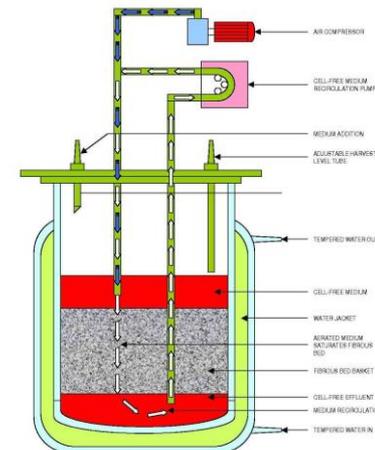
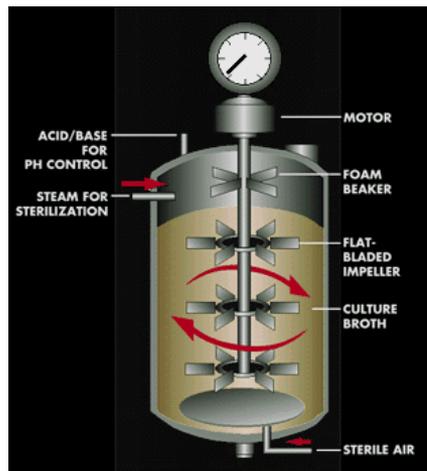
**Grafico del modello cinetico di crescita di Monod**, che mette in relazione la velocità di crescita con la concentrazione del substrato limitante la crescita. Con  $\mu_{max}$  è indicata la velocità specifica massima di crescita cellulare e con  $K_s$ , costante di Monod, cioè la concentrazione del substrato alla quale si raggiunge la metà della velocità massima specifica di crescita. La concentrazione critica del substrato limitante la crescita è anche indicata e corrisponde alla minima concentrazione di S, alla quale non si osserva una riduzione della velocità di crescita massima. Per una coltura ottimale la concentrazione di S deve essere sempre molto più elevata della concentrazione critica.

# Bioreattori e Fermentatori

In genere possiamo distinguere tre tipi di bioreattori, ciascuno caratterizzato da un sistema di approvvigionamento di aria:

Il primo sistema è munito di PALE o CILINDRI che ruotano ad una determinata velocità garantendo il rimescolamento della coltura.

Nel secondo e terzo sistema il rimescolamento è garantito dal movimento delle BOLLE D'ARIA che entrano nella soluzione di coltura.



# Bioreattori e Fermentatori

Il bioreattore può essere costituito da un contenitore chiuso in cui la coltura ha inizio ad un determinato tempo ed è arrestata ad un tempo successivo, tale sistema è definito “Batch” o «**Shake flasks**». Le beute vengono agitate meccanicamente dall'esterno. Questi sistemi non hanno ricambio continuo e ricircolo di terreno. Utile per colture in piccola scala



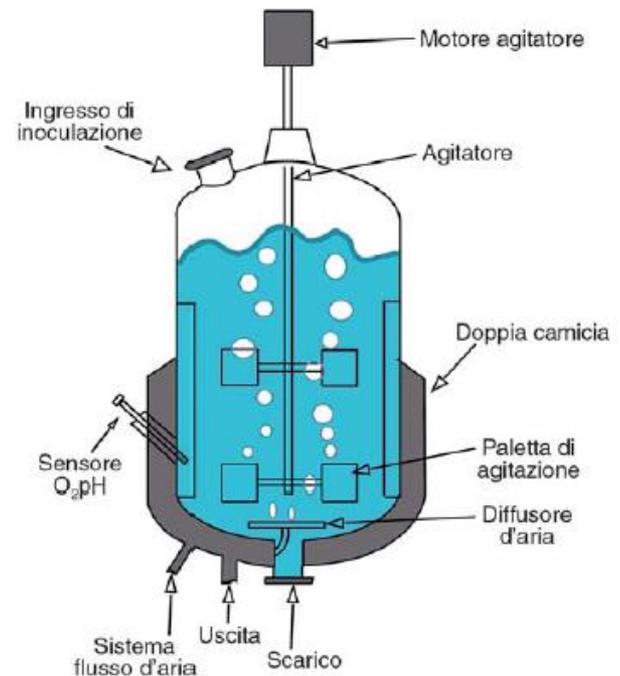
Figura 24.3

# Bioreattori e Fermentatori

## Stirred tank reactors

Bioreattori con ricambio di terreno per ricircolo esterno chiuso o con ricambio totale del mezzo di coltura. L'areazione viene garantita da agitazione meccanica del fluido attraverso palette o in associazione con dispersori di aria.

Particolarmente utilizzati per colture di cellule in sospensione. Rischio di danno cellulare dovuto a shear stress



**Figura 24.5**

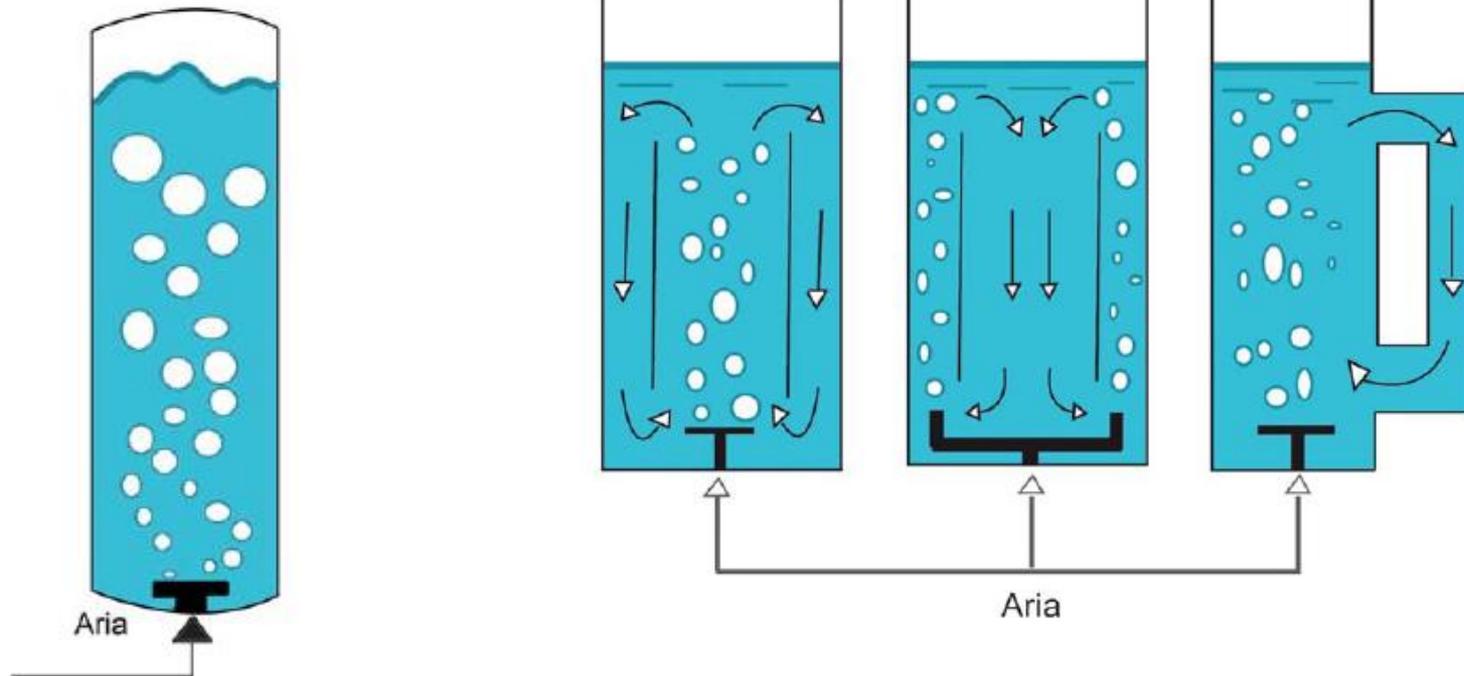
Rappresentazione schematica di un tipico bioreattore *stirred tank* (disegno di F. Miccheli).

# Bioreattori e Fermentatori

## Bioreattori pneumatici (airlift reactors)

Bioreattori a colonna senza ricambio di terreno, in cui l'agitazione del fluido e la sua aerazione avviene per erogazione di bolle di aria da un dispersore posto sul fondo. Questi bioreattori vengono utilizzati per colture sensibili allo shear come colture di radici.

Bioreattore pneumatico  
a colonna di bolle



# Bioreattori e Fermentatori

Un fattore importante nella produzione di cellule vegetali in bioreattori è la preparazione dell'inoculo, la quantità nota di cellule vegetali da inserire in un bioreattore per la coltura.

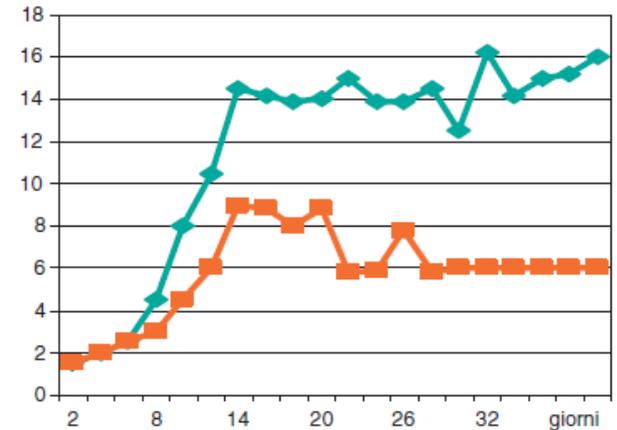
I bioreattori hanno una densità di inoculo sotto la quale non si ha crescita e di solito corrisponde al 10% del volume della coltura. Questo significa che per iniziare una coltura con un bioreattore da 20 litri è sufficiente introdurre un inoculo preparato con una beuta da due litri, ma per far partire una coltura in un bioreattore da 10.000 litri occorre un inoculo da circa 1.000 litri.

# Colture cellulari immobilizzate

La maggior parte delle cellule accumula i metaboliti secondari nel vacuolo o in strutture specializzate quali tricomi ghiandolari o altri tessuti secretori e questo limita notevolmente lo sfruttamento di sistemi cellulari immobilizzati per la produzione di tali sostanze.

L'immobilizzazione reprime la divisione cellulare attraverso processi da contatto cellula-cellula, in dipendenza della densità cellulare o attraverso condizioni meccaniche di contenimento.

Una buona parte degli studi sulle colture immobilizzate è dedicata proprio alla possibilità di indurre il rilascio del metabolita di interesse dalle cellule immobilizzate e in molti casi il risultato si ottiene solamente tramite la permeabilizzazione delle membrane.



**Figura 23.1**

Confronto tra curve di crescita di colture di cellule di *Galphinia glauca* immobilizzate in alginato (in arancio) e cellule in sospensione (in verde).

# Colture cellulari immobilizzate

## VANTAGGI:

1. organizzazione cellulare e differenziamento;
2. rallentamento della instabilità genetica;
3. controllo della dimensione degli aggregati cellulari;
4. possibilità di disaccoppiare le fasi di crescita e di stazionarietà cellulare nei processi di produzione di biomassa e di metaboliti secondari;
5. riduzione dell'effetto dello *shear stress* sulla vitalità e funzionalità cellulare;
6. favorire l'esternalizzazione di metaboliti secondari e di proteine ricombinanti prodotte;
7. possibilità di riutilizzo della biomassa dopo la fase di produzione;

# Colture cellulari immobilizzate

Le principali ragioni per cui si opera l'immobilizzazione di cellule vegetali in alternativa a colture in sospensione per la produzione di metaboliti secondari sono elencate di seguito:

- riutilizzo della biomassa,
- separazione fisica delle cellule dal mezzo di coltura e quindi dai prodotti rilasciati;
- utilizzo di bioreattori a basso costo ed efficienti tramite l'impiego di contenitori ad alta biomassa e basso volume;
- utilizzo del sistema in continuo.

# Colture cellulari immobilizzate

Per sviluppare un sistema cellulare immobilizzato efficiente occorre:

- ottenere una coltura cellulare con definite proprietà, per esempio **alta resa** e **bassa velocità di crescita**;
- definire un metodo di immobilizzazione adeguato con una geometria ben definita in modo da **garantire la vitalità delle cellule** e la **produzione del metabolita desiderato**;
- ottenere la **liberazione del metabolita nel mezzo di coltura** e allo stesso tempo **mantenere in vita le cellule**, particolarmente quando in natura i prodotti sono accumulati nei vacuoli.

# Colture cellulari immobilizzate - Tecniche di immobilizzazione

L'alginato di calcio è uno dei composti più utilizzati per intrappolare cellule vegetali. Il polimero si presta bene alla sterilizzazione in autoclave e si può facilmente avere il processo inverso aggiungendo un agente chelante del calcio come l'acido etilen-diamminotetraacetico (EDTA) o il citrato, che distruggono il gel solubilizzando il legame  $\text{Ca}^{2+}$ .

L'alginato è un polisaccaride che forma un gel stabile in presenza di cationi. In pratica la tecnica consiste nel formare "palline" di alginato che contengono le cellule vegetali e questo si ottiene facendo gocciolare una miscela di alginato e cellule in una soluzione di cloruro di calcio.



# Colture cellulari immobilizzate

## -Tecniche di immobilizzazione

Il k-carrageen è un polisaccaride contenente esteri di solfato ed è insolubile in acqua fredda. Può essere invece solubilizzato in acqua calda e al raffreddamento forma un gel. Anche in questo caso la qualità del gel dipende dalla concentrazione del polimero come anche dalla quantità e dal tipo di catione presente. Il k-carrageen è spesso utilizzato per intrappolare cellule vegetali e di solito si utilizza un polimero che richiede per essere solubilizzato in acqua una temperatura di 25-30 °C.



*Chondrus crispus* è un'alga rossa molto diffusa lungo le coste dell'[Irlanda](#) e della [Gran Bretagna](#), ma si trova anche sulle coste dell'[Islanda](#),

# Vitalità delle cellule

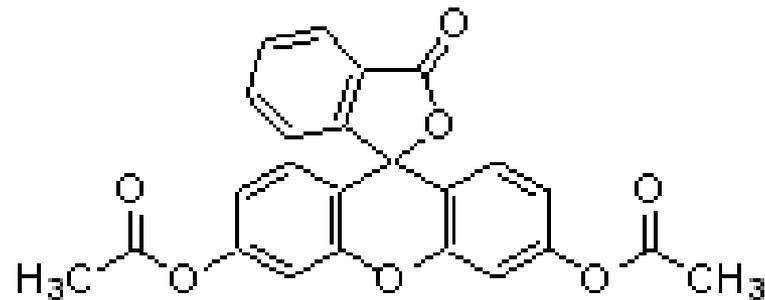
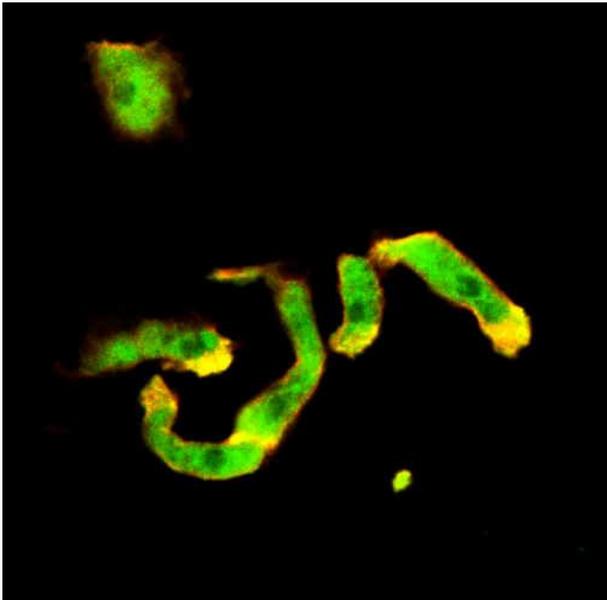
L'immobilizzazione cellulare non deve prescindere dalle capacità biosintetiche delle cellule in coltura e dalla possibilità di assorbire i precursori e liberare i prodotti della reazione biochimica.

Se si esclude la semplice biotrasformazione, la formazione di un composto può dipendere dalla vitalità prolungata delle cellule immobilizzate e per vitalità è intesa in questo contesto la capacità biosintetica della cellula.

Per valutare la vitalità di un sistema cellulare immobilizzato si utilizzano vari metodi tramite l'uso di coloranti, attraverso la misurazione di crescita, divisione cellulare, respirazione, assorbimento di substrato e rilascio di metaboliti.

# Vitalità delle cellule

Il colorante più utilizzato è il diacetato di fluoresceina (FDA). Il colorante, utilizzato allo 0,5 %, è assorbito dalle cellule dove le esterasi citosoliche rompono il legame estere deacetilando la molecola che diventa fluorescente quando irradiata da una radiazione nell'ultravioletto. L'osservazione avviene attraverso un microscopio ottico tramite il quale si possono effettuare conteggi ed esprimere la percentuale di cellule vitali sulla biomassa totale.



Dopo colorazione le cellule sono osservate con un microscopio che utilizza radiazioni ultraviolette che evidenziano i punti della cellula in cui è avvenuta la reazione chimica che libera la fluoresceina dall'acetato.

# Elicitazione

Stress abiotici di natura fisica come radiazione UV, temperatura, salinità possono indurre, nella pianta, una produzione maggiore di metaboliti secondari.

Stress biotici, come infezione di patogeni, stimolano la produzione di metaboliti secondari come risposta di difesa della pianta (fitoalessine).

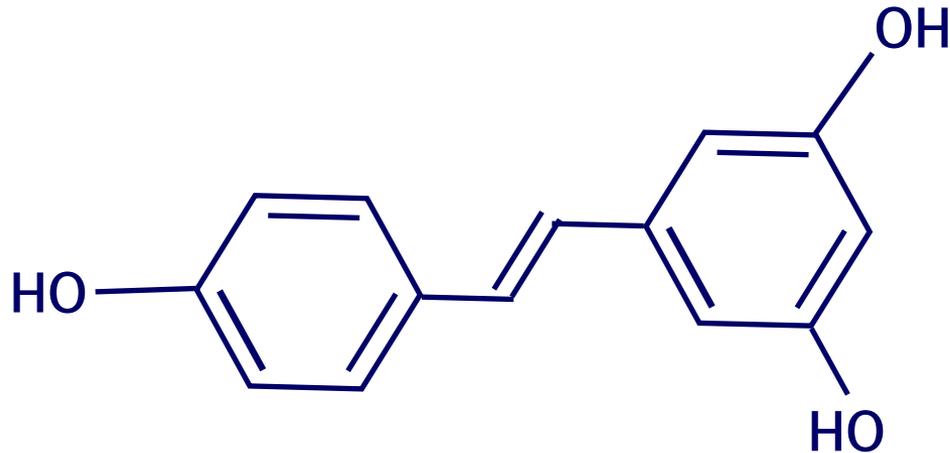
Le colture cellulari possono essere sottoposte a stress per stimolare la produzione di metaboliti secondari. Uno degli elicitori utilizzati è il metilgiasmonato che mima un'infezione fungina, attivando geni coinvolti nella difesa della pianta

# STILBENI

Il resveratrolo (3,5,4'-triidrossistilbene) è una fitoalessina prodotta nella pianta in risposta ad infezioni fungine (*Botrytis cinerea* e *Plasmopora viticola*) o in risposta a stress abiotici come ozono, metalli pesanti, radiazioni UV.

## NELLA VITE SI ACCUMULA:

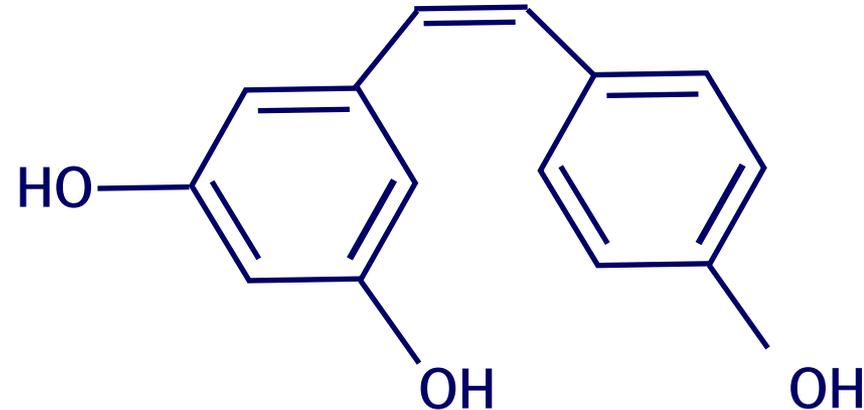
- Buccia delle bacche
- Foglie
- Fusto
- Radici



*Trans*-resveratrolo

## ATTIVITA' BIOLOGICA:

- Antiossidante
- Cardioprotettivo
- Chemiopreventivo
- Chemioterapeutico
- Antivirale



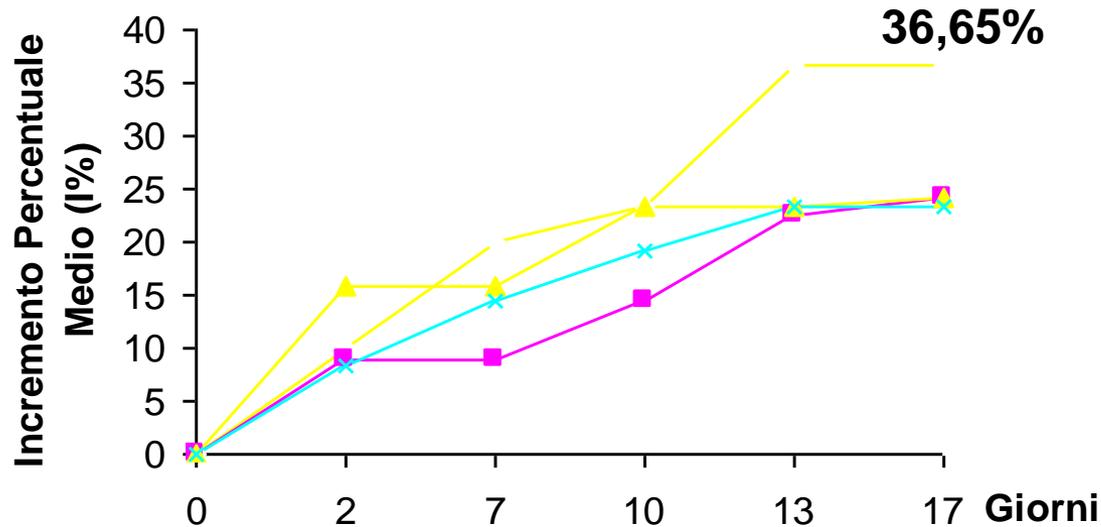
*Cis*-resveratrolo

← Forme isomeriche: →

# Elicitazione:

inoculo in un mezzo induttivo e aggiunta di metilgiasmonato (25  $\mu$ M) durante la prima metà della fase esponenziale della curva di crescita

Curva di crescita in condizioni di stress



$$I\% = \frac{V_f - V_i}{V_i} \times 100$$

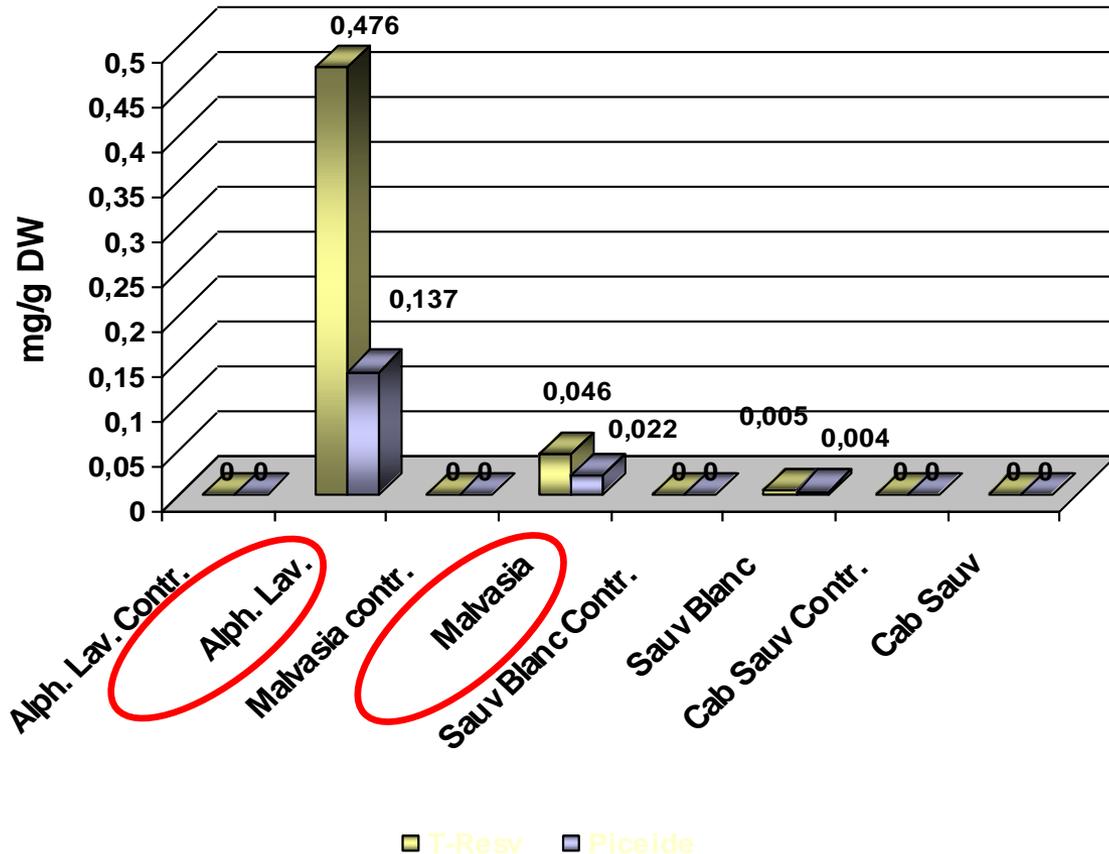
[12,5%] = inoculo

— A Lavallée    ■ Malvasia    ▲ Cabernet    × Sauv Blanc

MI	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 mM	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 2.2 mM	$\text{Mg SO}_4$ 2 mM	Sacc 60 g/l
----	--------------------------------------	-------------------------------------	--------------------------	----------------

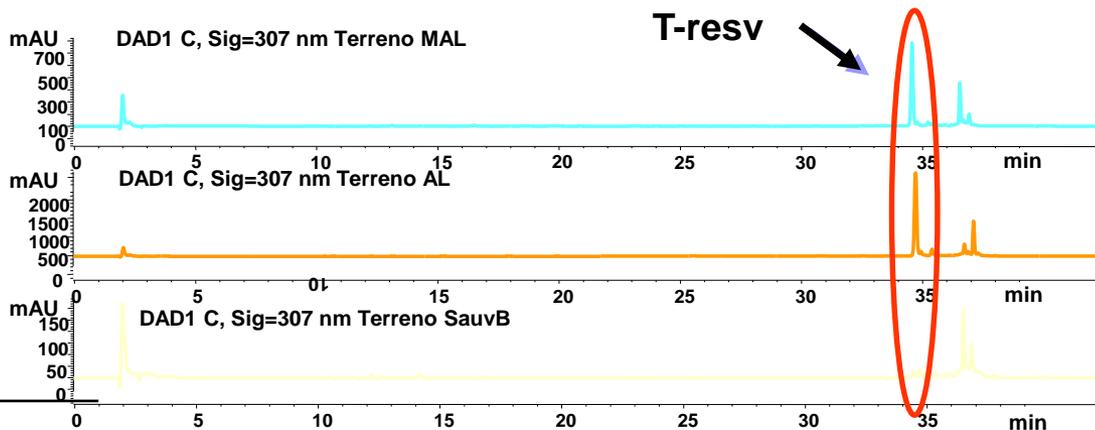
# Analisi quali-quantitativa HPLC/DAD/MS di *trans*-resveratrolo e *trans*-piceide nelle cellule in sospensione elicitate

Cellule in sospensione elicitate

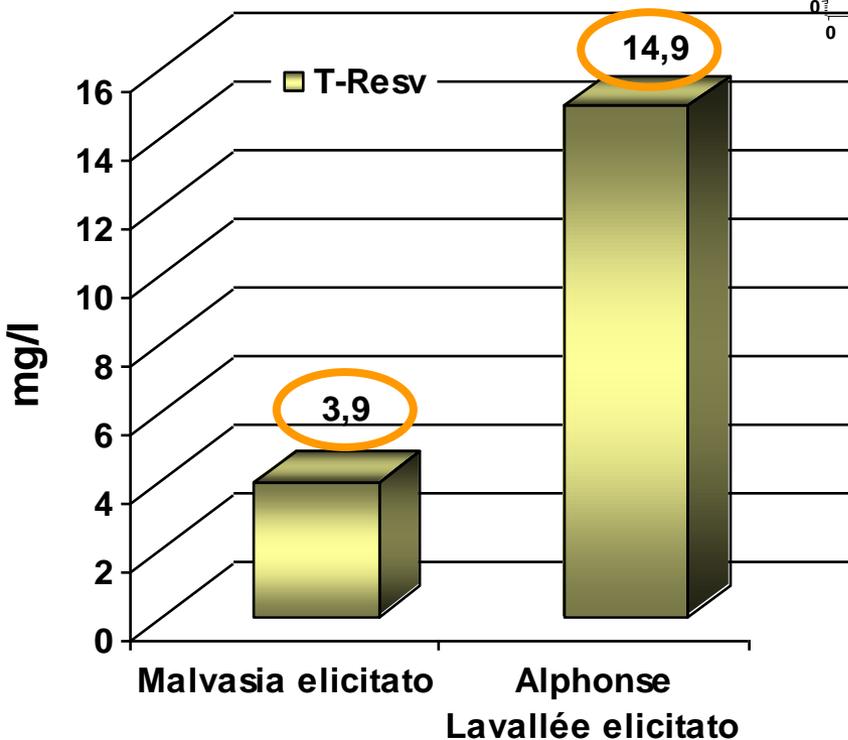


➤ Le cv. più rispondenti all'elicitazione sono Alphonse Lavallée e Malvasia, è prodotto prevalentemente resveratrolo

# Analisi quali-quantitativa HPLC/DAD/MS di *trans*-resveratrolo nei terreni di coltura



Terreni di coltura



Le cellule in sospensione della cv. Alphonse Lavallée e Malvasia hanno rilasciato nel terreno di coltura oltre il 90% del *trans*-resveratrolo totale prodotto.