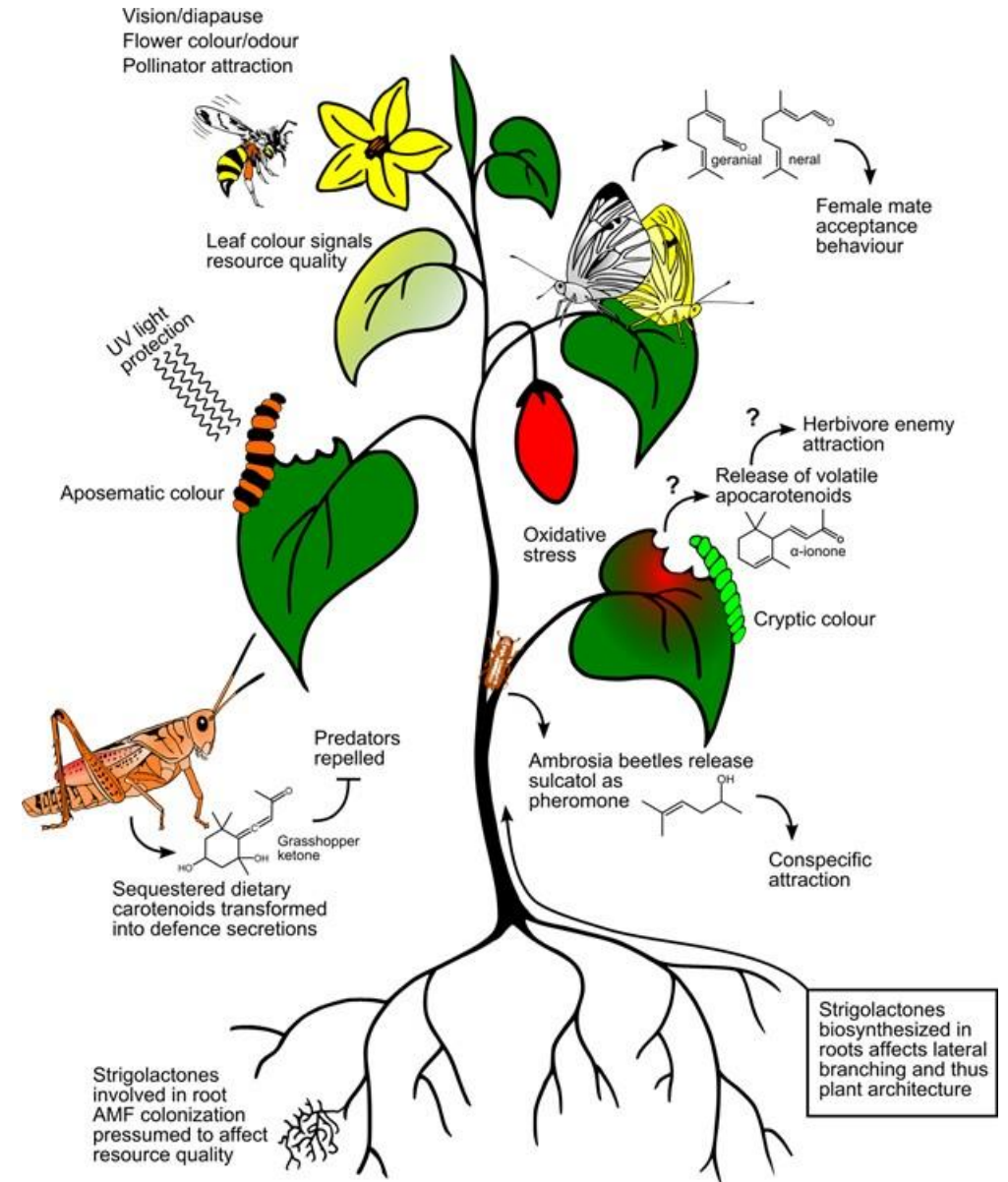
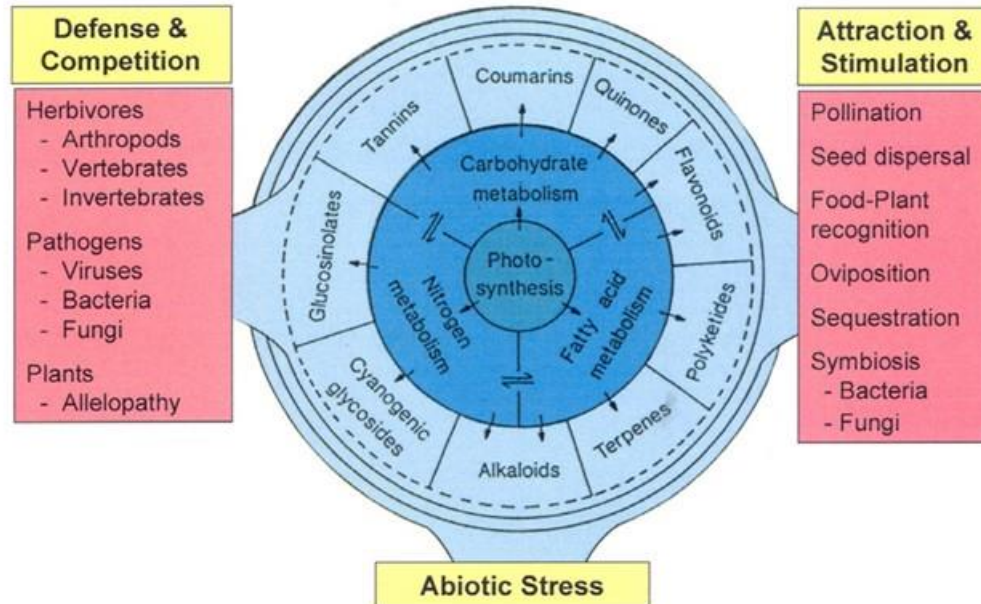
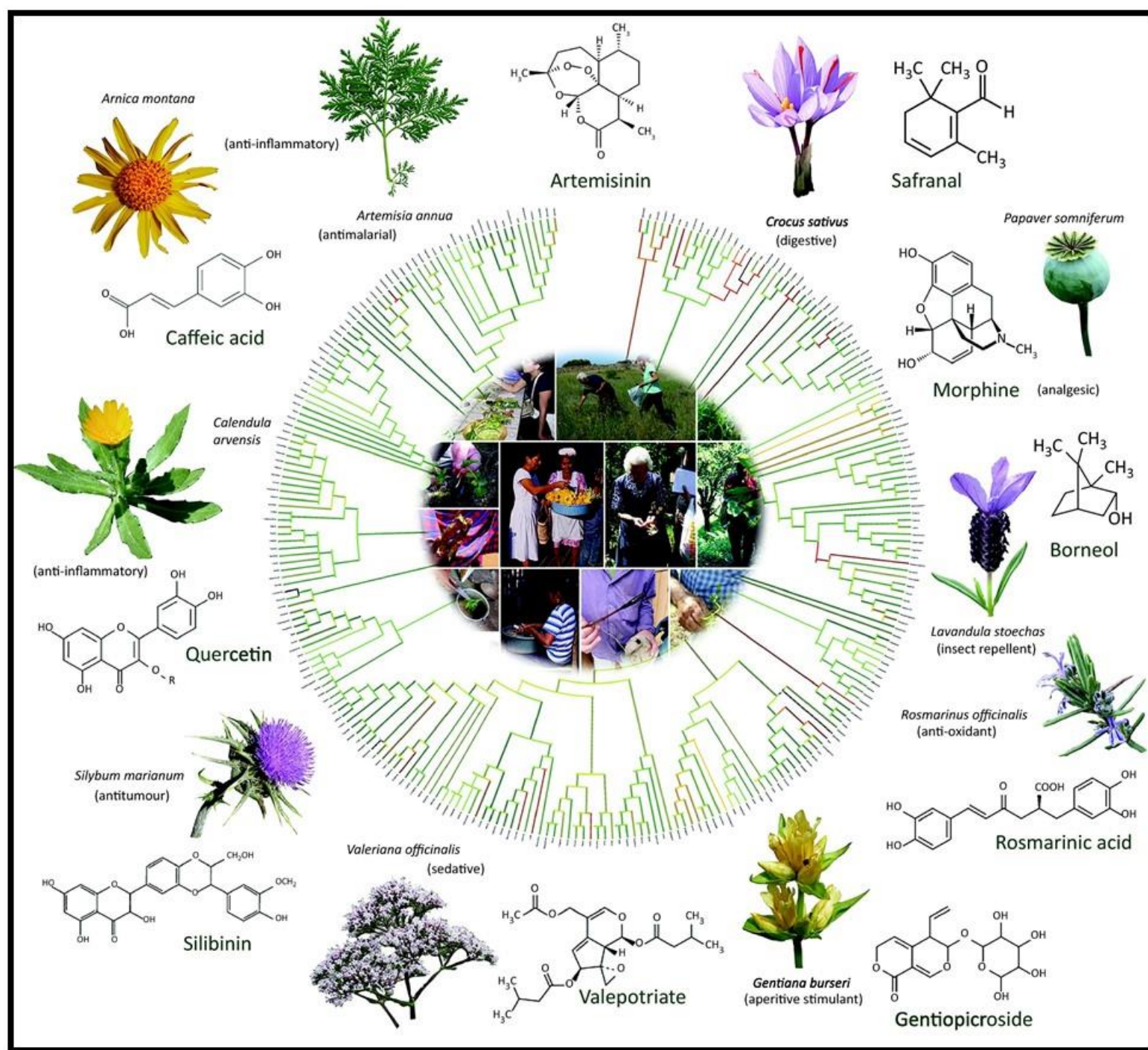


Metaboliti secondari e loro bio-produzione

I metaboliti secondari sono una categoria di molecole bioattive che funzionano a basse concentrazioni e che vengono utilizzati principalmente per definire relazioni tra piante e altri organismi. Sono composti spesso cellula / tessuto o organo specifici che possono essere sintetizzati costitutivamente a livello basso ma che possono subire incrementi ed elicitazioni in seguito a risposte esterne come regolatori della crescita, condizioni di stress biotici o abiotici piuttosto che fasi di sviluppo e stagionalità.



Le vie metaboliche che sono responsabili della biosintesi di determinati metaboliti sono spesso conservate a livello di specie/generi affini. Per questa ragione lo studio della filogenesi abbinato alla metabolomica può permettere di individuare specie iperproduttive di un certo composto. Queste piante possono essere coltivate (se coltivabili) per produrre biomassa da cui estrarre il composto desiderato oppure possono essere coltivate in coltura ed elicitate a produrre il prodotto desiderato.

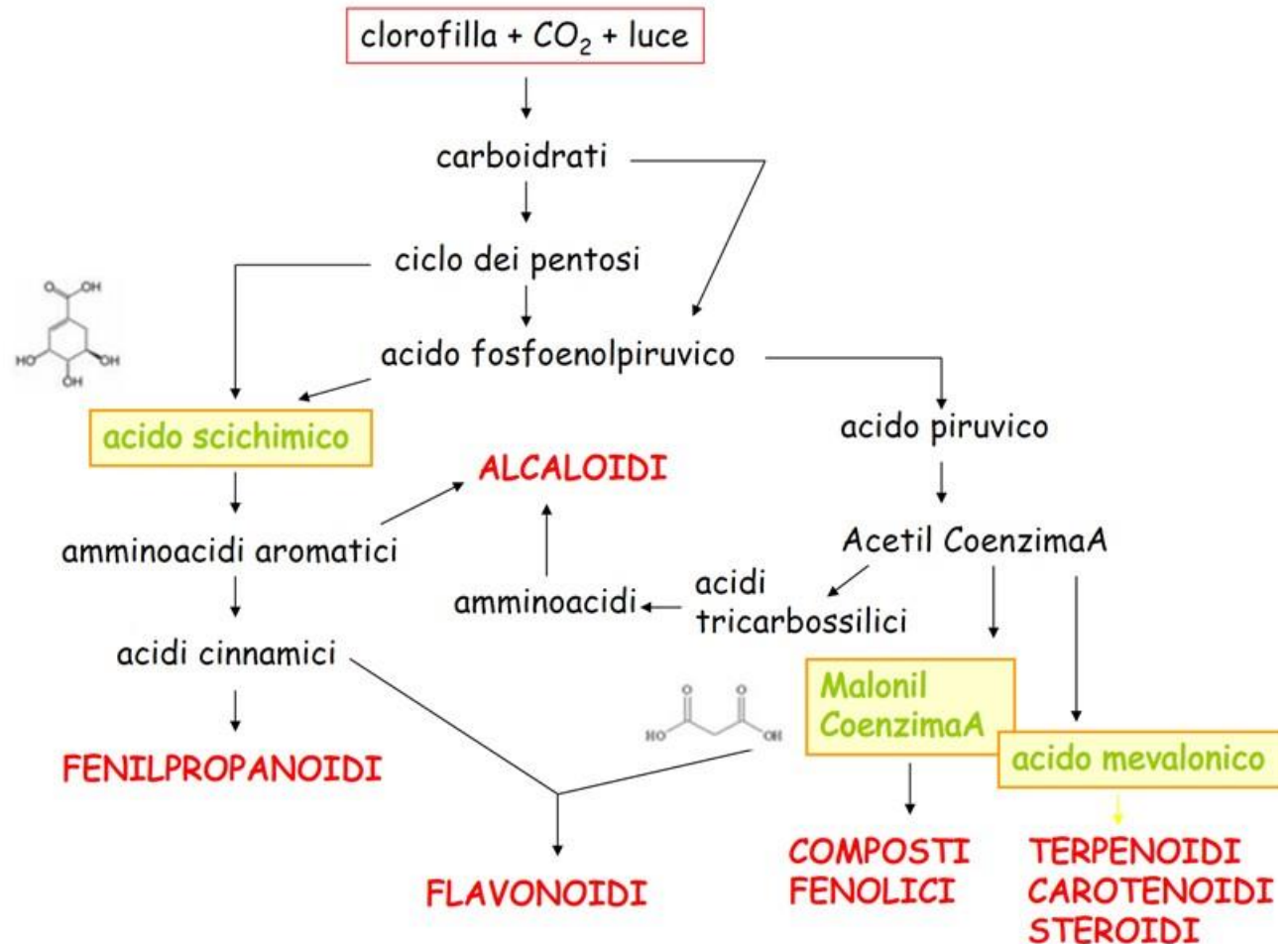
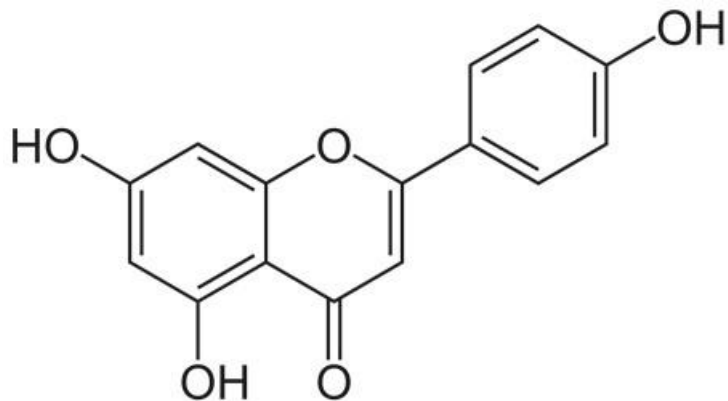


METABOLITI SECONDARI DI INTERESSE

I METABOLITI SECONDARI delle piante vengono suddivisi in tre gruppi principali: **fenoli, terpeni e alcaloidi**.

Si tratta di composti che derivano da varianti delle vie metaboliche primarie che si sono sviluppate nel tempo in risposta all'ambiente e alla biodiversità che si relaziona con la pianta.

I **composti fenolici** sono caratterizzati dall' avere un anello benzenico con un gruppo $-OH$. A questo gruppo appartengono la grande classe dei **flavonoidi** composti da due anelli fenolici tenuti insieme da uno scheletro eterociclico contenente 3 atomi di carbonio.



L'evoluzione ha portato a modificazione di questi metaboliti base introducendo per esempio il legame con zuccheri piuttosto che promuovendo vari gruppi sostituenti come gruppi metossilici e ossidrilici.

Molti di questi composti per la loro struttura chimica sono capaci di assorbire ed emettere radiazioni luminose e quindi sono responsabili del colore di fiori e frutti. Altri hanno funzioni strutturali e sono alla base della formazione di lignina.

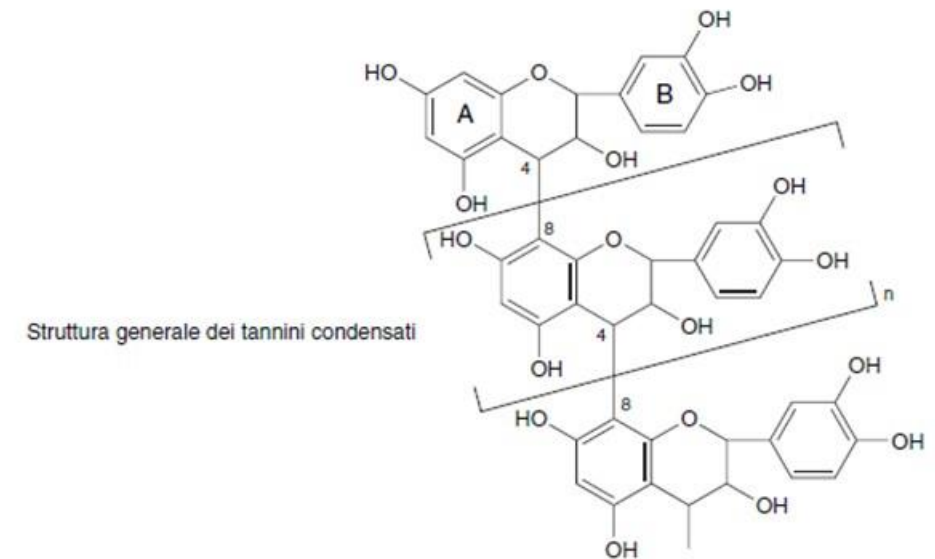
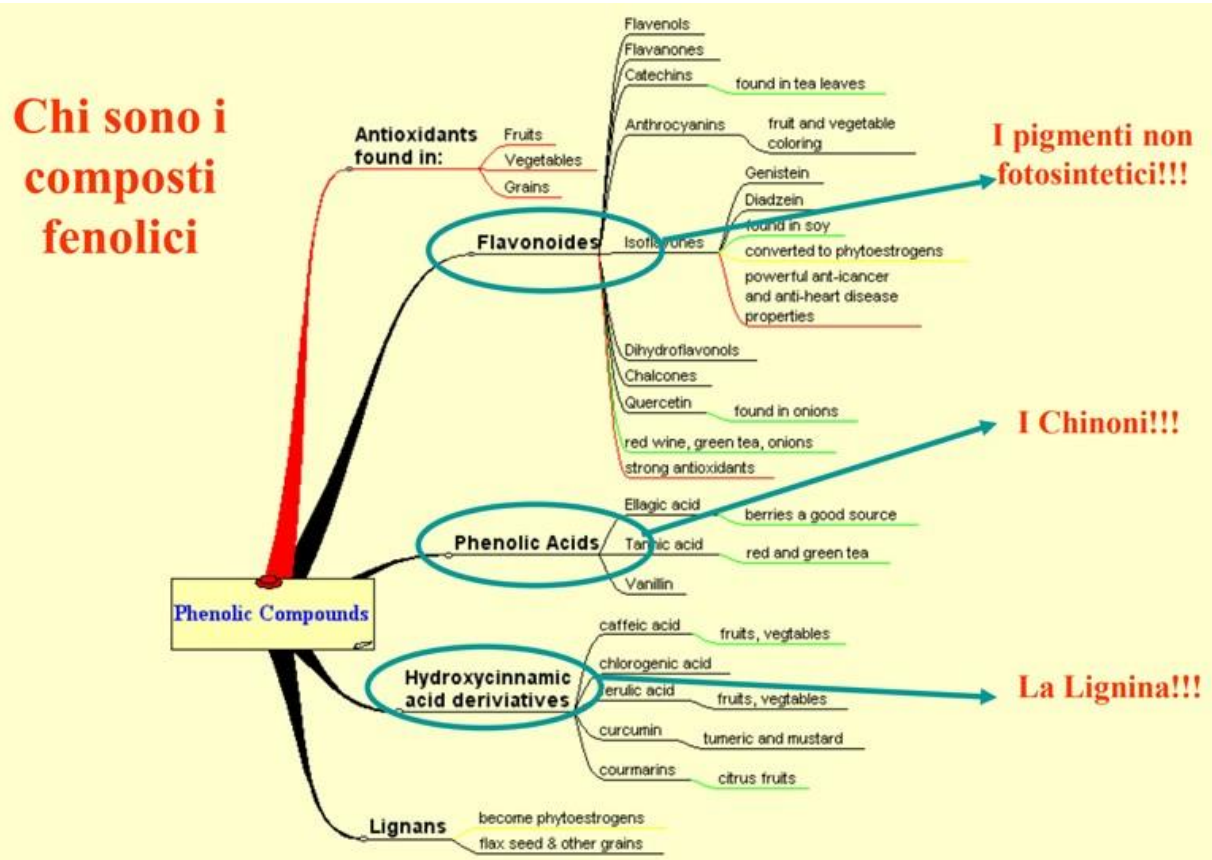
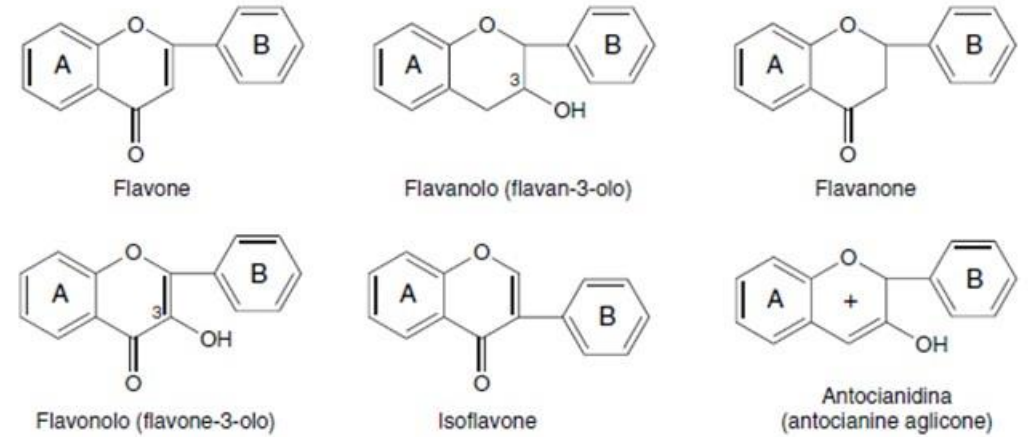
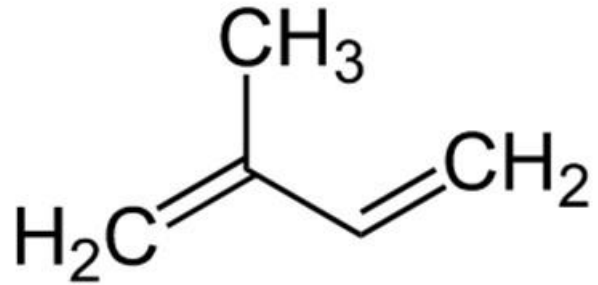


Figura 6.3 Formule di struttura delle principali classi di flavonoidi.

I Terpeni detti anche isoprenoidi, sono composti costituiti appunto da unità di isoprene che si possono legare a formare molecole multiple e avere vari sostituenti. In generale vengono classificati in base al numero di unità di isoprene.



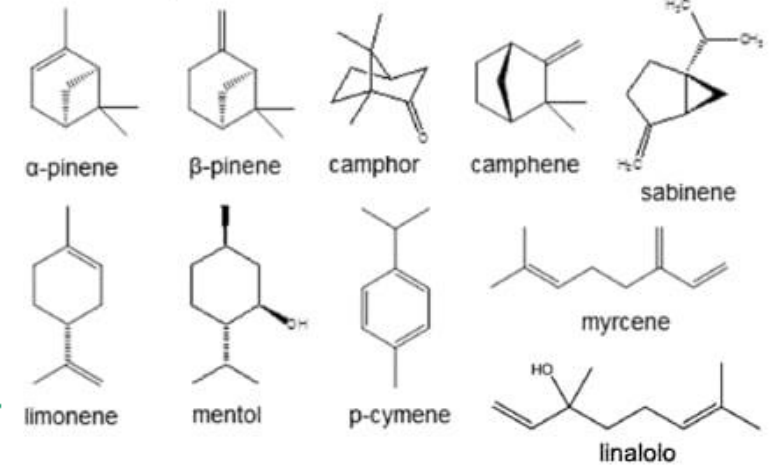
Molti terpeni sono composti volatili e come tali il ruolo principale è quello di dare segnali ad organismi terzi.

Alcuni sono molecole di difesa. Altri hanno ruolo strutturale, per esempio alcune gibberelline sono terpeni.

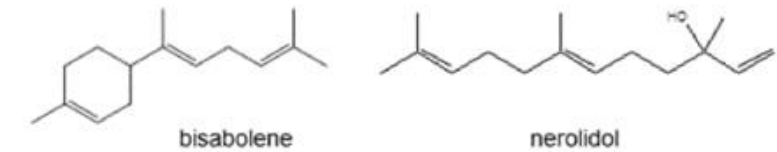
Tabella 6.1 Classificazione dei terpeni in base al numero di unità isopreniche

Tipo	Unità isopreniche	Atomi di C	Esempio
Monoterpeni	2	10	Mentolo, canfora, limonene, pinene
Sesquiterpeni	3	15	Farnesolo, cariofillene
Diterpeni	4	20	Fitolo, vitamina A
Triterpeni	6	30	Squalene, lanosterolo
Tetraterpeni	8	40	β -carotene (provitamina A)
Politerpeni	n	>40	Gomma

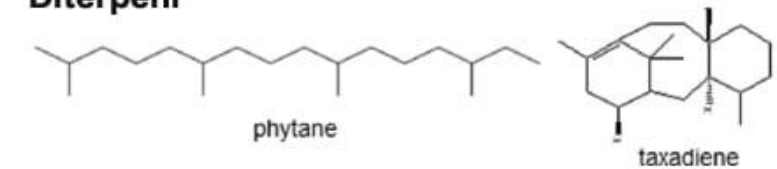
Monoterpeni



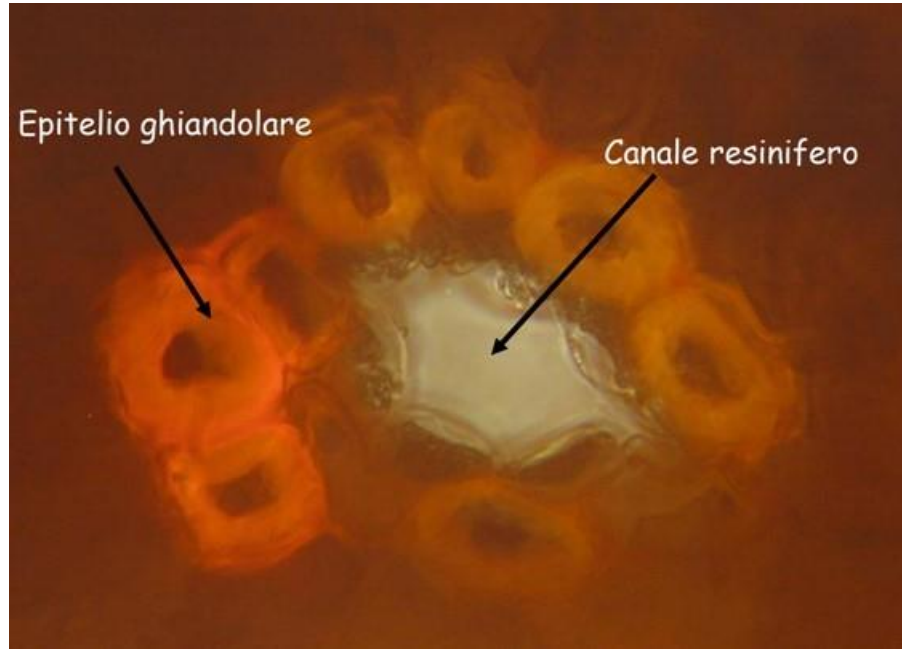
Sesquiterpeni



Diterpeni



I Terpeni sono tra i componenti più importanti degli oli essenziali che vengono prodotti e secreti in particolari organi e strutture della pianta. La loro funzione è molto variegata in quanto possono essere elementi di difesa nei confronti di erbivori o di attacchi microbici ma possono anche promuovere attività di cicatrizzazione.



Per quanto riguarda le attività di protezione, cicatrizzale e difensiva a seguito di un attacco da parte di patogeni, si possono sintetizzare delle gomme ovvero polimeri complessi composti da 1.500 a 15.000 unità isopreniche.

Solitamente vengono prodotti in cellule specializzate anche in strutture pluricellulari organizzate.

La secrezione avviene in determinati momenti o in risposta a stimoli specifici.

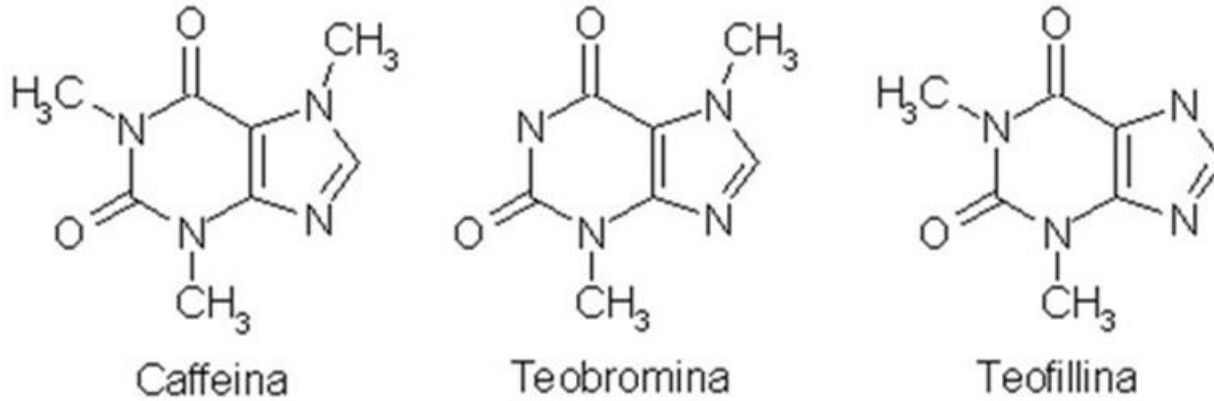


Latice in uscita da una «albero della gomma», *Hevea brasiliensis*.



Lattiche di *Euphorbia pulcherrima*

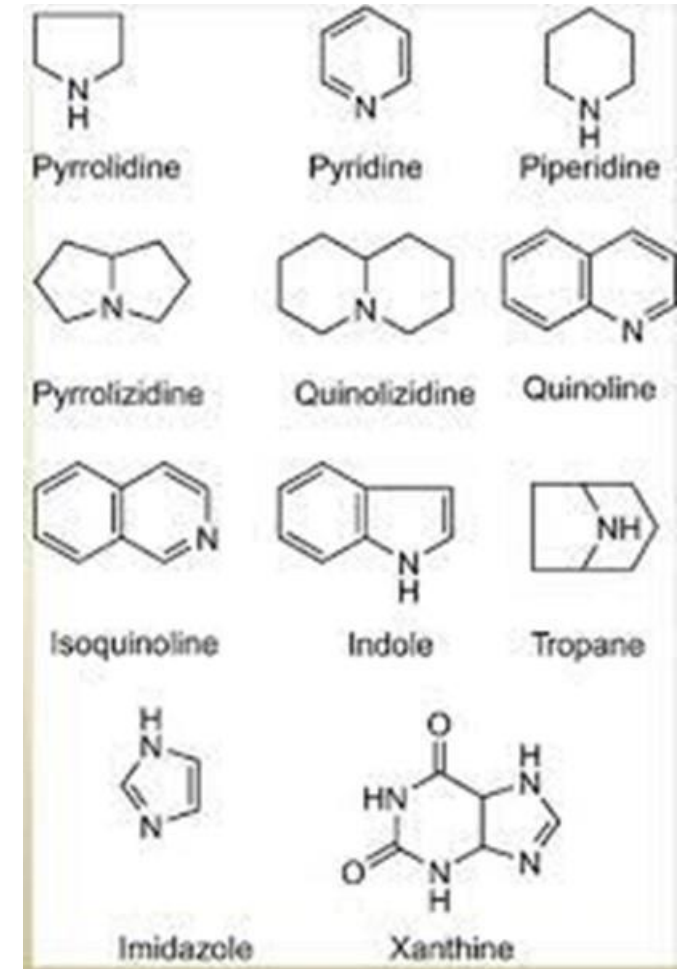
Gli Alcaloidi sono metaboliti secondari contenenti N, presenti in molte famiglie di piante superiori. L'atomo di N deriva da un aminoacido e lo scheletro carbonioso è conservato intatto nella molecola finale. La presenza di uno o più atomi di azoto, normalmente come ammine, conferisce a queste molecole una certa basicità. In generale sono composti usati dalle piante come difesa e si trovano prevalentemente nelle porzioni esposte della pianta ovvero quelle accessibili a patogeni di varia natura.



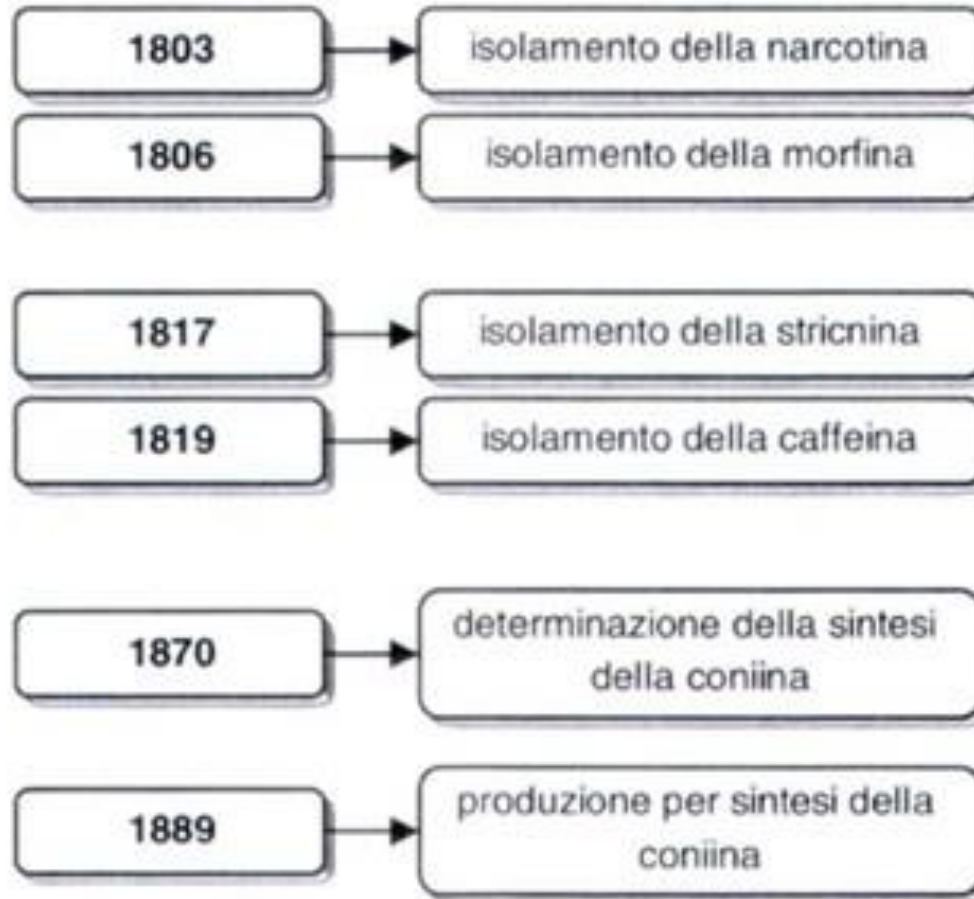
Commercialmente hanno svariate applicazioni spesso legate alla loro concentrazione. Essendo infatti generalmente prodotti tossici per uomo e animali vanno utilizzati a dosi controllate. Tra gli alcaloidi troviamo quelli ad azione stimolante che troviamo nel caffè e nel tè (caffeina) così come quelli presenti nelle sigarette (nicotina) sono alcaloidi.



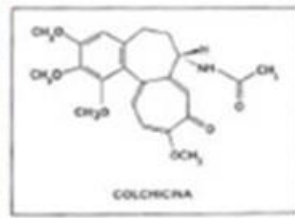


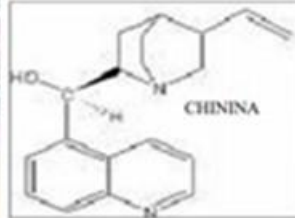


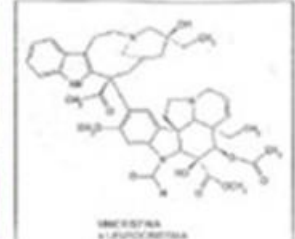
Alcaloidi sono anche molecole importanti impiegate per la cura della malaria (chinino), del cancro (tassolo e vinblastina) e delle infezioni batteriche (antibiotici come la penicillina).

Anche la cocaina, la morfina e il suo derivato di sintesi, l'eroina, sono alcaloidi.



Sono stati tra i primi metaboliti ad essere usati dall'uomo per le terapie. La codeina del papavero da oppio (*Papaver somniferum*) fu usata inizialmente come anestetico e analgesico. La Chinina: un alcaloide antimalarico, sintetizzata in *Chincona officinalis*. La Camptotechina: un potente agente anticancro, da *Camptotheca acuminata*. La Vinblastina: da *Catharanthus roseus*, usata nel trattamento della malattia di Hodgkin e di altri linfomi.



		 COLCHICINA
		 CHININA
		 VINCISTINA VINOORELBINA

L'importanza di produrre alcaloidi in vitro è legata anche al controllo delle produzioni oltre che alla possibilità di avere estratti utilizzabili per modificazioni chimiche legate per esempio alla stabilizzazione degli attivi.

PRODURRE METABOLITI IN VITRO

La produzione di metaboliti secondari si ottiene generalmente procedendo con l'estrazione da piante coltivate. Sebbene questo funzioni bene, può avere alcuni inconvenienti come:

- Difficoltà di coltivare le piante in ambienti diversi da quello di origine
- Difficoltà di reperire adeguate quantità di piante
- Difficoltà di promuovere la produzione di metaboliti di interesse in quanto alcuni di questi sono legati alla stagionalità, alla fase di sviluppo della pianta, a specifici organi ecc.

I vantaggi della produzione in vitro mediante colture di cellule sono:

1. Standardizzazione e controllo della produzione.
2. Riduzione della presenza di metaboliti di disturbo ed elicitazione dei metaboliti di interesse.
3. Potenziale incremento delle rese (ad esempio espianti di *Theobroma cacao* hanno avuto rese in polifenoli del cacao fino a 40% superiori a quelli presenti nelle fave; risultati analoghi sono stati ottenuti per la caffeina).
4. La possibilità di allevare specifici organi permette sia di individuare quali organi sfruttare per avere rese e qualità e al tempo stesso garantisce una migliore stabilità produttiva.

Tabella 6.3 Metaboliti secondari prodotti con alte rese da colture cellulari

Specie	Metabolita prodotto	Resa (mg/g peso secco)
<i>Echinacea purpurea</i>	Acido cicorico	27
<i>Eleutherococcus koreanum</i>	Eleuterosidi	303
<i>Gentiana scabra</i>	Secoiridoidi	25
<i>Panax ginseng</i>	Ginsenosidi	30
<i>Polygonum multiflorum</i>	Flavonoidi	53
<i>Plumbago indica</i>	Plumbagina	20
<i>Salvia officinalis</i>	Acido rosmarinico	36
<i>Vitis labrusca</i>	Resveratrolo	7
<i>Morus alba</i>	Mulberoside A	32
<i>Artemisia annua</i>	Artemisina	11
<i>Corylus avellana</i>	Paclitaxolo	404.5
<i>Stevia rebaudiana</i>	Steviosidi	93

INCREMENTARE LE PRODUZIONI

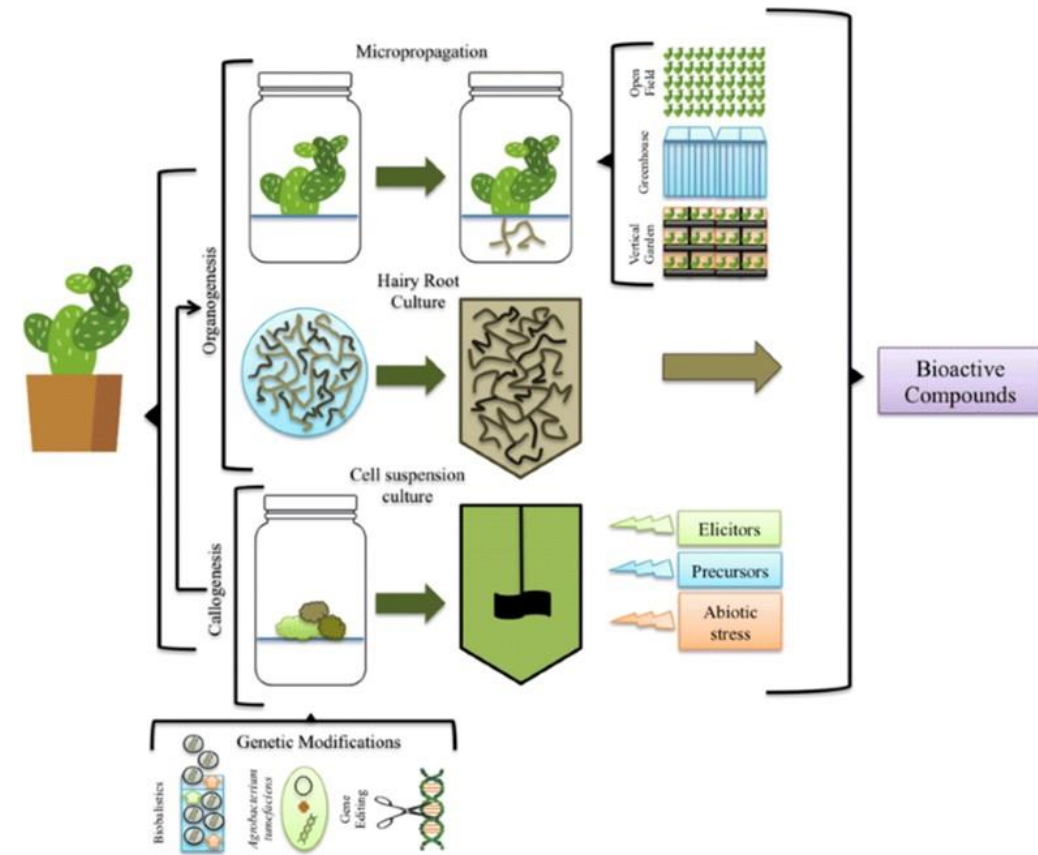
La botanica applicata e le biotecnologie lavorano a strategie volte a migliorare le rese attraverso diversi approcci.

1. Ottimizzazione delle condizioni colturali

Sappiamo che in coltura le cellule vegetali si comportano da eterotrofe, pertanto una delle condizioni essenziali è fornire un'adeguata quantità di nutrienti per la crescita a partire dai carboidrati.

Altri elementi chiave sono sicuramente le fonti di azoto e di fosforo che devono essere adeguate alle esigenze delle diverse specie. Si stima che già agendo su questi fattori la resa di biomassa può aumentare anche di 5-8 volte.

Stress e ormoni sono altri fattori importanti che possono agire direttamente sul metabolismo delle cellule. Per esempio è noto che alcuni stress come quello osmotico possono aumentare la biosintesi di antociani; lo stress luminoso può indurre la sintesi di taluni terpeni e l'agitazione meccanica delle colture che favorisce gli scambi gassosi ha un incremento notevole sulla sintesi di alcaloidi.



TUTTE QUESTE VARIABILI VANNO VALUTATE IN RELAZIONE ALLA SPECIE E AL METABOLITA DI INTERESSE

2. Selezione di linee altamente produttive

Un approccio per incrementare le rese è agire sulle varianti genetiche e metaboliche delle specie e delle linee cellulari. E' possibile infatti o selezionare piante/ecotipi particolarmente produttive per una certa sostanza oppure indurre mutazioni genetiche causali e procedere alla selezione delle cellule 'migliorate'

L'alternativa è sfruttare tecniche di ingegneria metabolica usando sistemi di trasformazione genetica mirata.



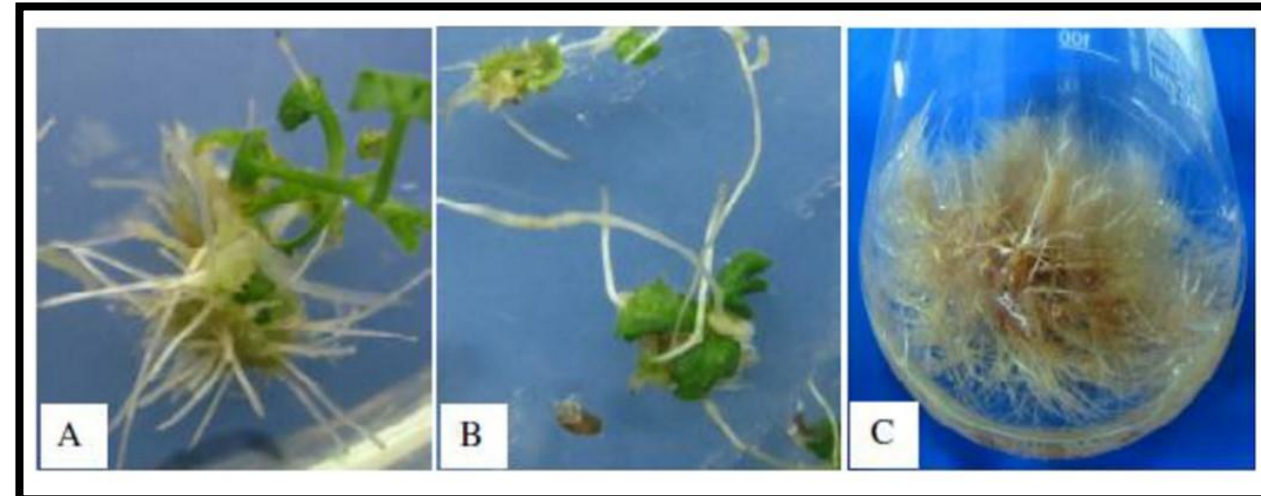
Artemisia annua L. è ampiamente usata per la produzione di artemisina. La specie originaria la produce nelle aree pilifere in quantità modeste e inducibili da stress da contatto.

Biotechnological Approaches for Production of Artemisinin, an Anti-Malarial Drug from *Artemisia annua* L.

by  Jameel M. Al-Khayri ^{1,*} ,  Wudali N. Sudheer ² ,  Vasantha V. Lakshmaiah ² ,
 Epsita Mukherjee ³ ,  Aatika Nizam ⁴ ,  Muthu Thiruvengadam ⁵ ,  Praveen Nagella ^{2,*} ,
 Fatima M. Alessa ⁶ ,  Muneera Q. Al-Mssallem ⁶ ,  Adel A. Rezk ¹ ,  Wael F. Shehata ¹  and
 Mahesh Attimarad ⁷ 

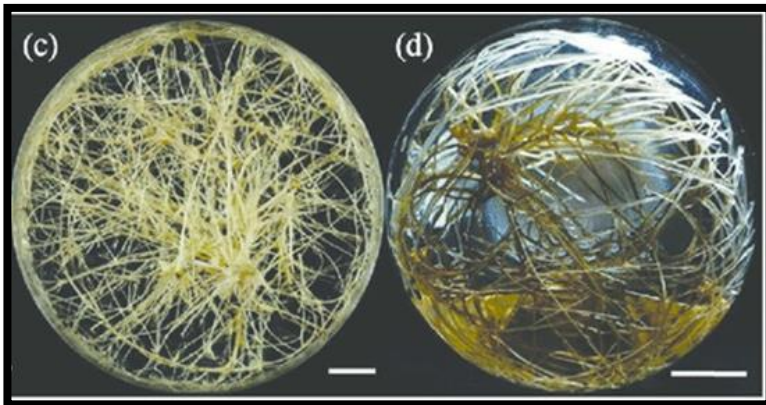
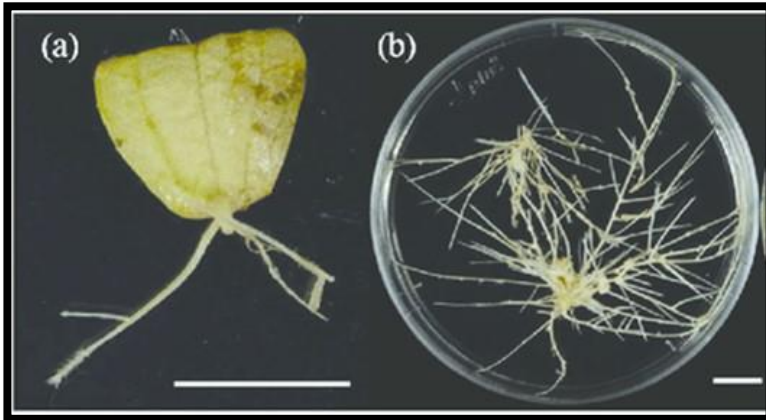
Abstract

Artemisinin is an anti-malarial sesquiterpene lactone derived from *Artemisia annua* L. (Asteraceae family). One of the most widely used modes of treatment for malaria is an artemisinin-based combination therapy. Artemisinin and its associated compounds have a variety of pharmacological qualities that have helped achieve economic prominence in recent years. So far, research on the biosynthesis of this bioactive metabolite has revealed that it is produced in glandular trichomes and that the genes responsible for its production must be overexpressed in order to meet demand. Using biotechnological applications such as tissue culture, genetic engineering, and bioreactor-based approaches would aid in the upregulation of artemisinin yield, which is needed for the future. The current review focuses on the tissue culture aspects of propagation of *A. annua* and production of artemisinin from *A. annua* L. cell and organ cultures. The review also focuses on elicitation strategies in cell and organ cultures, as well as artemisinin biosynthesis and metabolic engineering of biosynthetic genes in *Artemisia* and plant model systems.



Le colture cellulari di peli radicali sono quelle che meglio rispondono alla over -produzione di artemisina.

Le colture di *hairy roots* sono ampiamente utilizzate soprattutto negli ultimi anni per le loro rese e perché sono facilmente trasformabili geneticamente. Vi sono diversi modi per generarle ma quello più semplice è infettare le radici con *Agrobacterium* che stimola la formazione di radici sottili. Se questo *Agrobacterium* viene armato con un T-DNA può anche trasformare la pianta introducendo geni esogeni.



Come si può osservare dalla tabella vi sono molte colture radicali usate per la produzione di numerose molecole ad elevato valore aggiunto.

Table 4 Secondary metabolite production through hairy root cultures

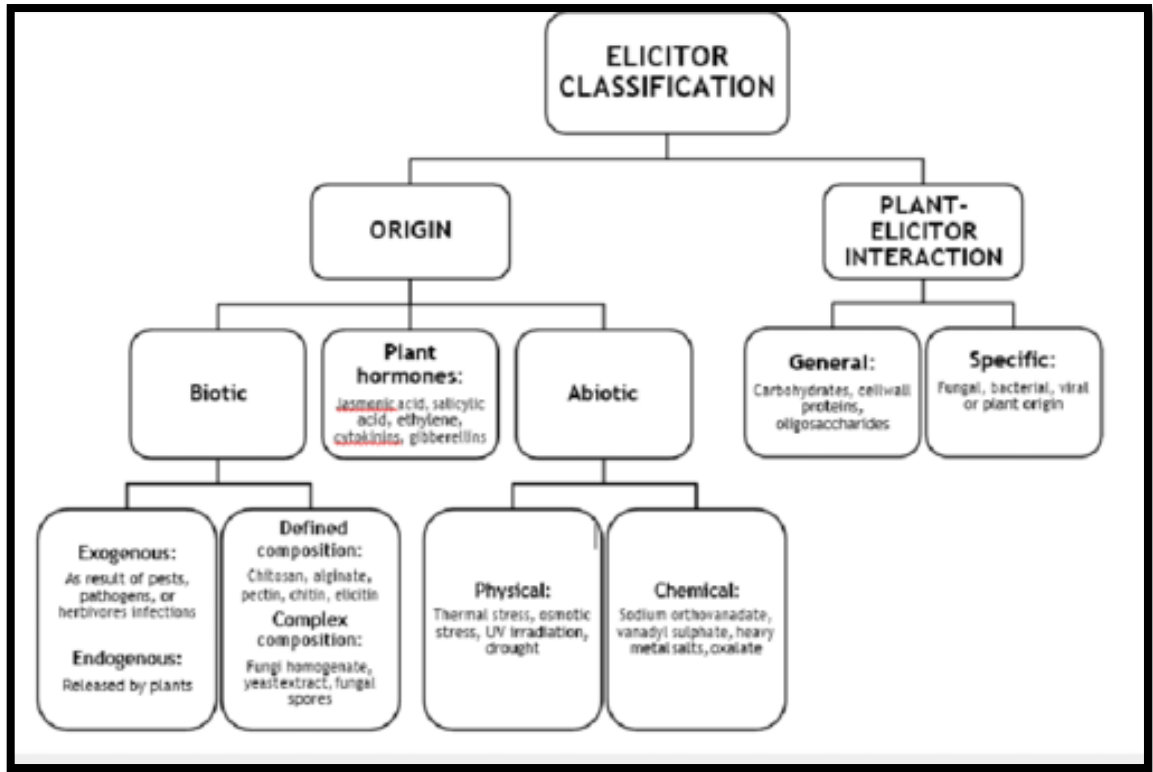
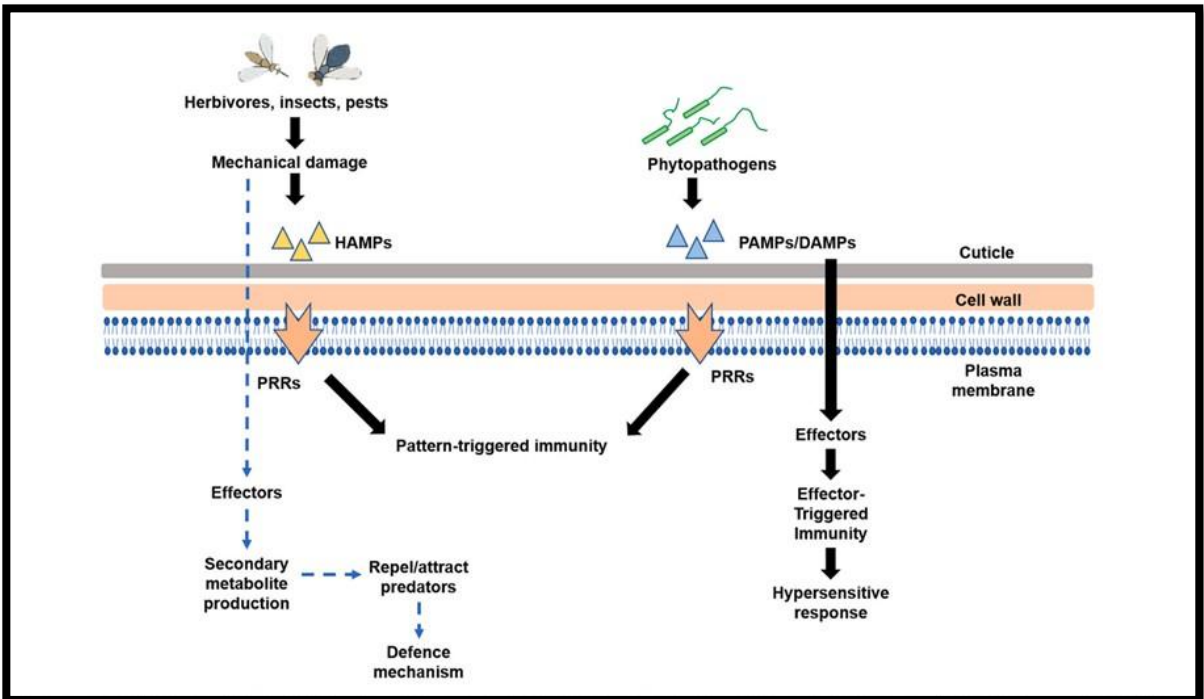
S. no	Plant name	Secondary metabolite	References
1	<i>Brugmansia candida</i>	Tropane alkaloids	Spollansky et al. (2000)
2	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Licoagrodin	Li et al. (2000)
3	<i>Atropa belladonna</i>	Scopolamine	Bonhomme et al. (2000)
4	<i>Ammi majus</i>	Furanocoumarins (psoralen, xanthotoxine, bergapten and imperatorin)	Krolicka et al. (2001)
5	<i>Ophiorrhiza pumila</i>	Camptothecin	Sudo et al. (2002)
6	<i>Panax ginseng</i>	Ginsenosid	Palazón et al. (2003)
7	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Tanshinones, Tanshinone I, Tanshinone IIA, Cryptotanshinone	Zhang et al. (2004)
8	<i>Beta vulgaris</i>	Betalain	Pavlov et al. (2005)
9	<i>Echinacea purpurea</i>	Cichoric acid	Liu et al. (2006)
10	<i>Fagopyrum esculentum M</i>	Rutin	Lee et al. (2007)
11	<i>Silybum marianum L</i>	Silymarin	Rahnama et al. (2008)
12	<i>Rauvolfia serpentine</i>	Vomilenine, reserpine	Madhusudanan et al. (2008)
13	<i>Angelica gigas Nakai</i>	Pyranocoumarins	Xu et al. (2009)
14	<i>Arnebia hispidissima</i>	Shikonin	Chaudhury et al. (2010)
15	<i>Ophiorrhiza alata Craib</i>	Camptothecin	Ya-ut et al. (2011)
16	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Glycyrrhizin and isoliquiritigenin	Shirazi et al. (2012)
17	<i>Withania somnifera (L.)</i>	withanolide A, withanone, withaferin A	Sivanandhan et al. (2013)
18	<i>Tripterygium wilfordii Hook. F</i>	Triptolide and Wilforine	Zhu et al. (2014)
19	<i>Arachis hypogaea</i>	Resveratrol, Piceatannol, Arachidin-1, Arachidin-3	Yang et al. (2015)
20	<i>Linum usitatissimum</i>	Lignan	Gabr et al. (2016)
21	<i>Hyoscyamus reticulatus L</i>	Hyoscyamine and scopolamine	Moharrami et al. (2017)
22	<i>Brassica rapa subsp. Pekinensis</i>	Glucosinolates (GSLs)	Chung et al. (2018)
23	<i>Withania somnifera L</i>	Withaferin-A	Thilip et al. (2019)
24	<i>Centella asiatica</i>	Madecassoside, asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid	Baek et al. (2019)

E' possibile incrementare le rese sul tessuto più produttivo sia con elicitori biotici, sia con mezzi fisici e chimici.

Table 3. Various biotic and abiotic elicitors and culture conditions used for the production of artemisinin.			
Elicitor	Culture Type	Culture Conditions	Yield of Artemisinin
Biotic elicitors			
Cell wall's oligosaccharide from <i>Colletotrichum</i> sp. B501	Hairy root culture	MS medium + 20 mg/L elicitor	Increased by 68.29%
Cerebroside from fungal source	Hairy root culture	MS medium + 10–70 µg/mL cerebroside	Increased by 2.3 folds
Oligosaccharide from <i>Fusarium oxysporum</i> mycelium	Hairy root culture	MS medium + 0.3 mg total sugar/mL elicitor	Increased from 0.7 mg/g DW to 1.3 mg/g DW
Mycelial extract of <i>Colletotrichum</i> sp.	Hairy root culture	MS medium + 0.4 mg total sugar/mL elicitor	Increased from 0.8 mg/g DW to 1 mg/g DW
<i>Penicillium oxalium</i> B4	In vitro grown Rooted plantlets	MS medium + 5.0 mg/L BAP + 1.0 mg/L NAA + <i>P. oxalium</i> B4 (30 days exposure)	Increased by 43.5%
Abiotic elicitors			
Ag-SiO ₂ nanoparticles	Hairy root culture	MS medium + 900 mg/L nano elicitor	Increased by 3.9 folds
Chitosan nanoparticles	Cell suspension culture	MS medium + 0.5 mg/l NAA + 0.5 mg/L BAP + 15 mg/L Elicitor	NA
Cobalt nano particles	Callus culture	MS medium + 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L BAP + 5 mg/L elicitor	Increased by 2.25 folds
Chitosan	Hairy root culture	MS medium + 150 mg/L chitosan	Increased by 6 folds
Oligogalacturonides	Hairy root culture	MS medium + 0.01 mg/L gibberellic acid +60 g/mL elicitor	Increased by 55.2%
Heptakis (2,6-di-O-methyl)-β-cyclodextrin (DIMEB) and methyl jasmonate	Cell suspension culture	MS medium + 2.0 mg/L 2,4-D + 0.15 mg/L BAP + 50 mM DIMEB + 100 µM Methyl jasmonate	Increased by 300 folds (27 µmol/g DW)

ELICITARE Un approccio per incrementare le rese è quello di sfruttare meccanismi di difesa delle piante e di introdurre nelle colture molecole che mimano o un attacco di patogeni o uno stress abiotico. Si possono usare molecole di varia natura come oligo o polisaccaridi, peptidi, proteine, enzimi, chitosani, lipidi sino a pezzi di microorganismi inattivati, tossine fungine alterate, metalli, ecc.

Fig. 1. An overview of plant defense mechanism against pests, insects, and pathogens. Herbivore-, pathogen- or damage-associated molecular patterns (HAMPs, PAMPs or DAMPs, respectively) are recognized by pattern recognition receptors (PRRs). The interaction leads to pattern-triggered immunity (PTI). Effector-like molecules from pathogens are recognized by resistance proteins (R proteins) and initiate effector-triggered immunity (ETI), which culminates in hypersensitive response (HR). The effector molecules from herbivores and pests stimulate the biosynthesis of secondary metabolites, which either repel insects or attract predators to kill pests. Dashed lines indicate uncharacterized elements.

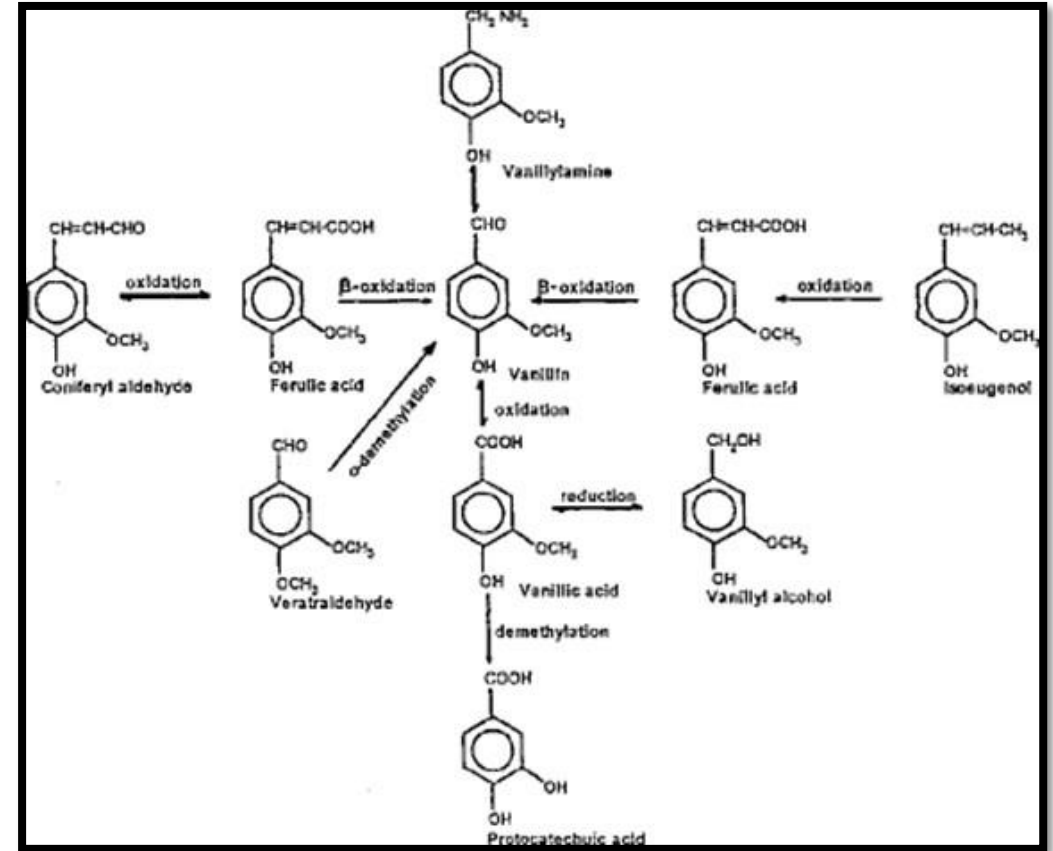


Oltre a sistemi di elicitazione biotica e abiotica si possono avere sistemi più generici e quelli più specifici per determinate colture e/o vie metaboliche.

Colture di *Datura stramonium* trattate con sali di rame e di cadmio incrementano la produzione di sesquiterpeni che sono note molecole di difesa ad elevato potere antiossidante.



La vanillina può facilmente essere prodotta in vitro da colture cellulari di *Vanilla planifoliadi* opportunamente elicitate con ciclodestrina e l'adsorbimento in situ di prodotti grazie a uso di carboni per superare l'inibizione del feedback enzimatico.



Ogni anno vengono consumate circa 12.000 tonnellate di vanillina, di cui solo 20 tonnellate vengono estratte dai baccelli di vaniglia.

3. Uso di substrati dedicati

Le cellule e i tessuti vegetali possono essere utilizzati per 'biotrasformare' dei substrati solitamente di basso valore in composti ad elevato valore aggiunto. In generale questa tecnica si utilizza per i prodotti vegetali che hanno un grande mercato e che sono difficilmente sintetizzabili attraverso approcci chimici.

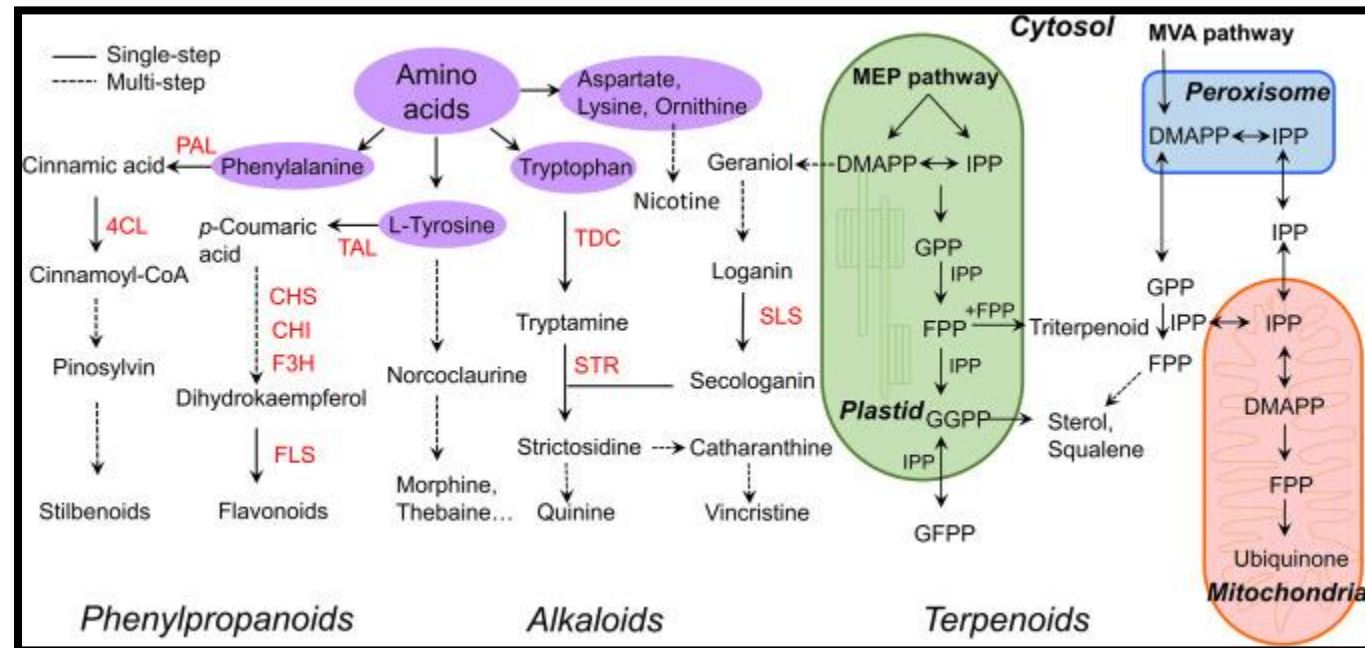
Vi sono molti esempi di questo sistema di incremento delle rese. Per esempio l'aggiunta della fenilalanina alle colture di *Taxus cuspidata* stimola la produzione di tassolo. L'uso di acido ferulico in colture di *Vanilla planifolia* incrementa le rese di vanillina.

In molti casi i substrati sono veri e propri elementi della via biosintetica o componenti capaci di stimolare enzimi chiave delle vie principali per la sintesi dei metaboliti di interesse.

Table 3

Groups of natural products that were so far isolated from tissue and suspension cultures of higher plants

Phenylpropanoids	Alkaloids	Terpenoids	Quinones	Steroids
1. Anthocyanins	1. Acridines	1. Carotenes	1. Anthroquinones	1. Cardiac glycosides
2. Coumarins	2. Betalaines	2. Monoterpenes	2. Benzoquinones	2. Pregnenolone derivatives
3. Flavonoids	3. Quinolizidines	3. Sesquiterpenes	3. Naphthoquinones	
4. Hydroxycinnamoyl derivatives	4. Furoonquines	4. Diterpenes		
5. Isoflavonoids	5. Harringtonines	5. Triterpenes		
6. Lignans	6. Isoquinolines			
7. Phenolenones	7. Indoles			
8. Proanthocyanidins	8. Purines			
9. Stilbenes	9. Pyridines			
10. Tanins	10. Tropane alkaloids			



APPLICAZIONI DI PLANT CELL FACTORY

Nonostante il valore di molti metaboliti secondari, le colture cellulari vegetali sono ancora poco fruttate. Una delle ragioni è legata alle migliori rese di altri tipi di colture come quelle batteriche e di lievito.

Va precisato che essendo eucarioti superiori le piante potrebbero tuttavia sostituire i sistemi animali nella produzione di molecole farmacologiche come peptidi e proteine. Il mercato globale delle proteine ha un valore superiore a 170 miliardi di dollari. La produzione di proteine eterologhe è quindi un business di valore.

I vantaggi di usare le piante come fabbriche di metaboliti sono la sicurezza, scalabilità e risparmio in termini di costi di produzione. Un sistema di produzione a base vegetale si è anche dimostrato efficace nel mediare l'elaborazione post-traduzionale richiesta per molte proteine complesse. Alcuni esempi eccellenti sono stati la produzione di antigeni per vaccini come quelli per SARS-CoV-2.

Plant Molecular Farming as a Strategy Against COVID-19 – The Italian Perspective

Chiara Lico¹, Luca Santi², Selene Baschieri¹, Emanuela Noris³, Carla Marusic¹, Marcello Donini¹, Emanuela Pedrazzini⁴, Giovanni Maga⁵, Rosella Franconi⁶, Paola Di Bonito⁷ and Linda Avesani^{8*}

We calculate the amount of infrastructure and production capacity needed to deal with predictable subsequent waves of COVID-19 in Italy by pooling expertise in plant molecular farming, epidemiology and the Italian health system. We calculate the investment required in molecular farming infrastructure that would enable us to capitalize on this technology, and provide a roadmap for the development of diagnostic reagents and biopharmaceuticals using molecular farming in plants to complement production methods based on the cultivation of microbes and mammalian cells.

TABLE 1 | Yields of selected purified molecules transiently expressed in plant systems.

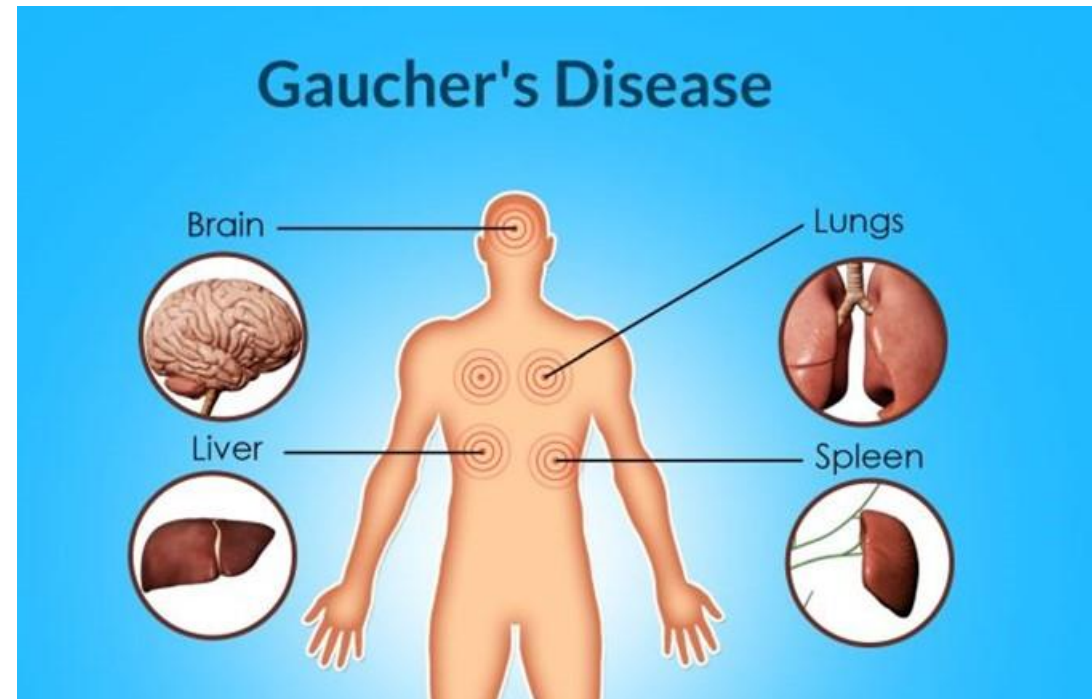
Diagnostic reagent	Yields (μg purified protein/g LFW)	References
Bet V 1	23.4	Santoni et al., 2019
Du151	4.9	Margolin et al., 2019
CAP256 SU	6.2	Margolin et al., 2019
NS1-ELP-ER	220	Marques et al., 2020
rHAO	200	Kanagarajan et al., 2012
SARS N protein	10	Demurtas et al., 2016
Antibodies		
mAb 2G12 (anti-HIV)	100	Sainsbury et al., 2010
mAb 6D8 (anti-Ebola)	500	Huang et al., 2010
mAb 2A10G6 (anti-Zika)	1,500	Diamos et al., 2020
mAb 4E10 (anti-HIV)	250	Zischewski et al., 2016
mAb M12 (tumor-specific)	2,000	Zischewski et al., 2016
Other therapeutics		
Griffithsin	1,000	O'Keefe et al., 2009
Griffithsin	519	Fuqua et al., 2015
Subunit vaccine		
HAC1	90	Shoji et al., 2011
HAI-05	50	Shoji et al., 2011

SICUREZZA

Una svolta fondamentale per lo sfruttamento commerciale di coltura cellulare vegetale è stata raggiunta nel 2012, quando colture cellulari di carota sono state utilizzate per produrre un enzima umano la taliglucerasi alfa (Elelyso®) e questo farmaco sperimentale è stato approvato dal FDA statunitense come farmaco orfano per il trattamento della malattia di Gaucher.

La malattia di Gaucher è causata dal deficit dell'enzima glucocerebrosidasi, che provoca l'accumulo di lipidi nella milza, nel fegato, nei reni e in altri organi. I segni principali della malattia includono danni al fegato o alla milza, anemia, basso numero di piastrine e problemi ossei. Una versione sana del gene è stata introdotta in cellule di carote, molto più robuste ed il prodotto è stato estratto e adoperato nelle terapie con ottimi risultati.

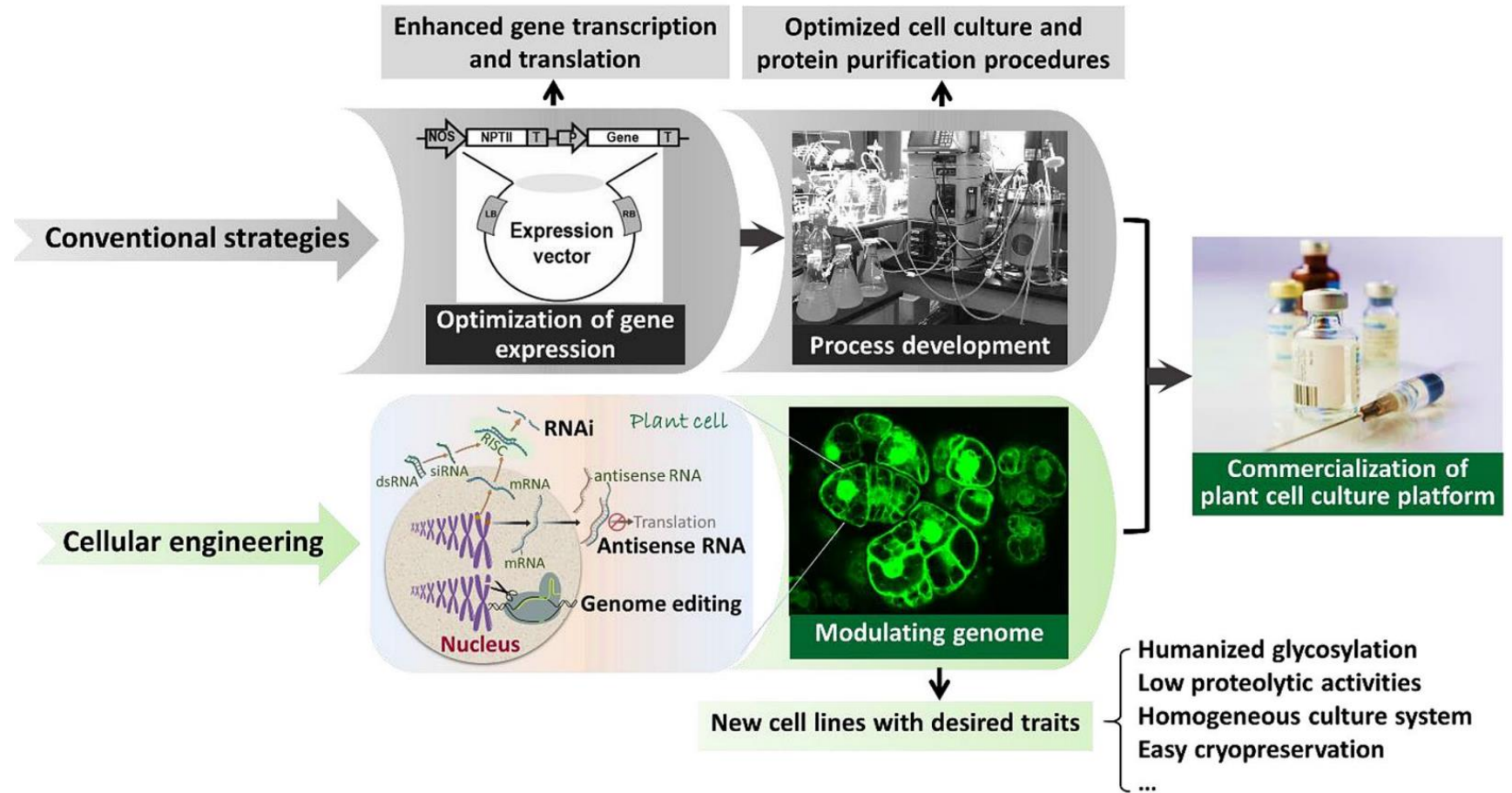
Il farmaco ottenuto è più economico del 75 per cento rispetto al Cerezyme commerciale ottenuto da cellule animali GM.



Oltre ad ottimizzare le condizioni di crescita ed elicitarle le vie produttive, il processo di industrializzazione impone precisione. E' necessario sapere se c'è un solo gene /via metabolica coinvolta in modo da evitare interazioni sgradite. E' fondamentale sviluppare sistemi di purificazione dei prodotti di interesse che variano sia sulla base delle proprietà chimiche della molecola di interesse, sia in base al comparto dove si localizza il prodotto (vacuolo, cellula, medium, ecc).

L'ingegneria genetica si rivolge sia a introdurre specifici enzimi e vie metaboliche per far produrre molecole eterologhe, sia a aumentare rese e qualità.

Uno dei punti più sensibili dell'utilizzo dei sistemi eucariotici vegetali sono per esempio le modificazioni post traduzionale; non sempre le glicosilazioni delle piante sono analoghe a quelli che si realizzano per esempio su proteine umane.

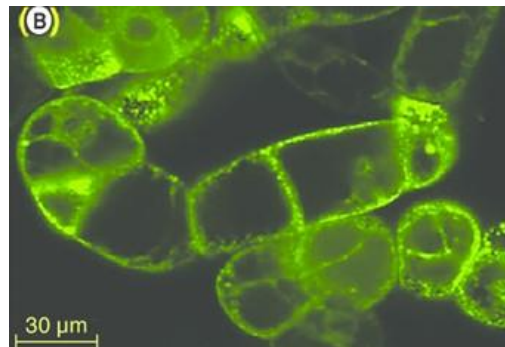


PRODURRE PROTEINE ETEROLOGHE

La produzione di proteine eterologhe in pianta ha numerosi vantaggi:

- 1) Poiché le cellule vegetali vengono coltivate in ambienti sterili, le condizioni di crescita cellulare possono essere controllate con precisione: questo garantisce la coerenza del prodotto da lotto a lotto e quindi lo sviluppo di produzioni allineate con cGMP
- 2) Le proteine ricombinanti possono essere secrete nei terreni di coltura, rendendo molto più semplice la purificazione delle proteine
- 3) Le cellule vegetali sono spesso esenti da patogeni animali anche di natura virale e ciò esclude contaminazione microbiologiche dei prodotti finiti.

La coltura cellulare vegetale più famosa è quella di cellule di tabacco nota come BY-2 (Kato et al., 1972). Le sue peculiarità sono: rapida crescita (tempo di raddoppio ridotto a 11 h), facilità di modifica mediata da *Agrobacterium*; bassi costi di gestione. Nella tabella alcuni esempi di utilizzo.



Protein	Expression type	Protein targeting	Protein yield	Reference
Hepatitis B surface antigen	Stable	ER	226 ng/mg TSP	Sojikul et al. (2003)
Human monoclonal antibody against hepatitis B virus	Stable	Apoplast	0.6% TSP	Yano et al. (2004)
Human interferon $\alpha 2b$	Stable	Apoplast	35 mg/L	Xu et al. (2007)
Human α -L-iduronidase	Stable	Apoplast	10 mg/L	Fu et al. (2009)
Human monoclonal anti-HIV antibody 2G12	Stable	Apoplast	8 mg/L	Holland et al. (2010)
Human growth hormone	Stable	Apoplast	28 mg/L	Xu et al. (2010)
Human serum albumin	Stable	Cytosol, Vacuole	11.88 mg/L	Sun et al. (2011)
Human erythropoietin	Stable	ER, Apoplast	N/A	Pires et al. (2012)
Human monoclonal anti-vitronectin antibody M12	Stable	Apoplast	20–107 mg/L	Kirchhoff et al. (2012), Vasilev et al. (2013), Raven et al. (2015)
Human interleukin-10-ELP (elastin-like polypeptide)	Stable	ER	3.057% TSP	Kaldis et al. (2013)
Green fluorescent protein (GFP)	Stable	Apoplast	125 mg/L	Zhang et al. (2016a, b)
TNF α receptor (TNFR)-Fc fusion	Stable	ER	N/A	Almon et al. (2017), Ilan et al. (2017)
DNase I	Stable	Apoplast	N/A	Hanania et al. (2017)
GFP-hydrofobin (HFBI)	Stable	Apoplast	300–1100 mg/L	Reuter et al. (2014, 2016), Hakkinen et al.

SCEGLIERE L'APPROCCIO E LA TECNOLOGIA

RETURN TO ISSUE | < PREV REVIEW NEXT >

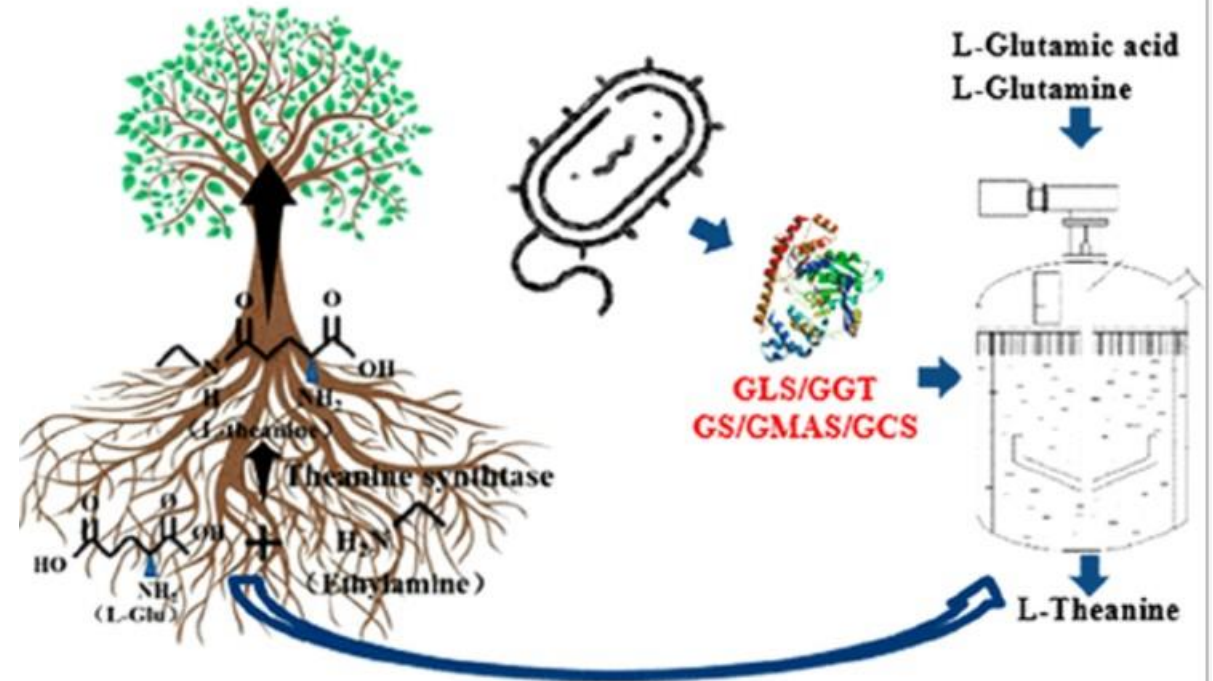
From Tea Leaves to Factories: A Review of Research Progress in L-Theanine Biosynthesis and Production

Zhen Chen, Zhi Wang, Hongyu Yuan, and Ning He*

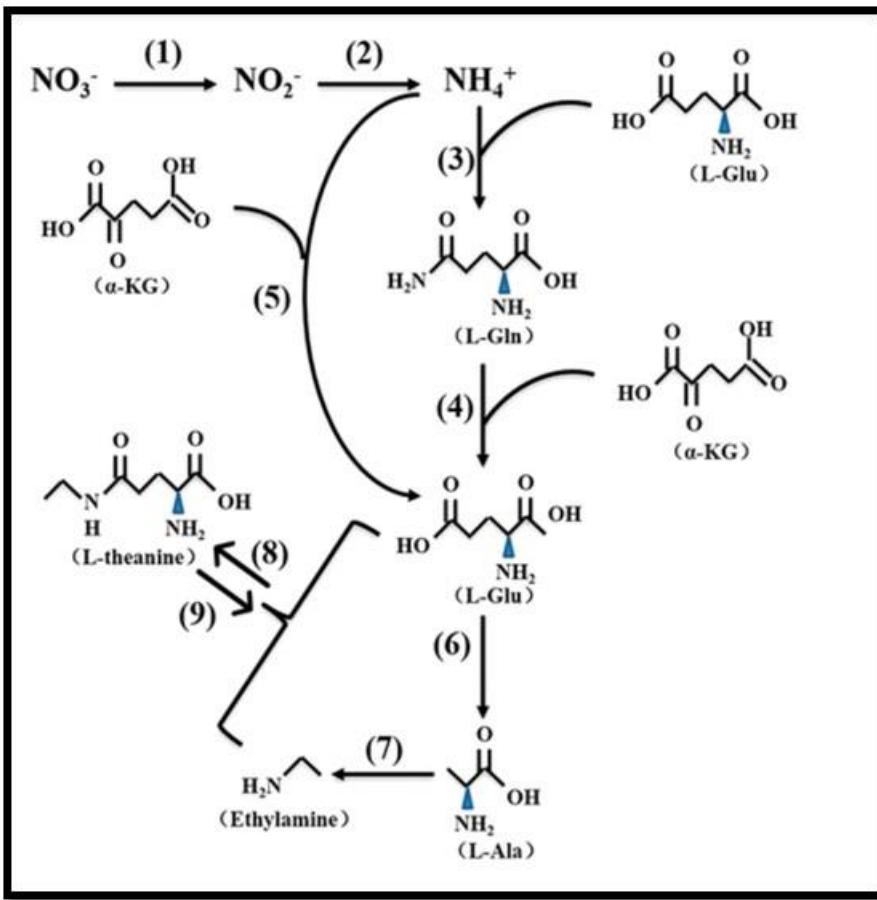
📌 Cite this: *J. Agric. Food Chem.* 2021, 69, 4, 1187– Article Views | Altmetric | Citations

Abstract

L-Theanine is the most popular nonprotein amino acid contained in tea leaves. It is one of the umami components of green tea, contributing to the unique flavor of tea. Because of its various health functions, L-theanine has been commercially developed as a valuable ingredient easily used for various applications in food and pharmaceutical industries. Nowadays, L-theanine is mass-produced by plant extraction, chemical synthesis, or enzymatic transformation in factories. This review embodies the available up to date information on the L-theanine synthesis metabolism in the tea plant as well as approaches to produce it, placing emphasis on the biotransformation of L-theanine. It also gives insight into the challenges of L-theanine production on a large scale, as well as directions for future research. This review comprehensively summarizes information on L-theanine to provide an approach for an in-depth study of L-theanine production.



La L-TEANINA è un aminoacido non proteico con numerose proprietà bioattive che vanno dall'azione antistress alla cura dei tumori. La sintesi di questa molecola è stata oggetto di numerosi studi. Gli enzimi della biosintesi di questa molecola così come quelli di degradazione sono ormai noti.



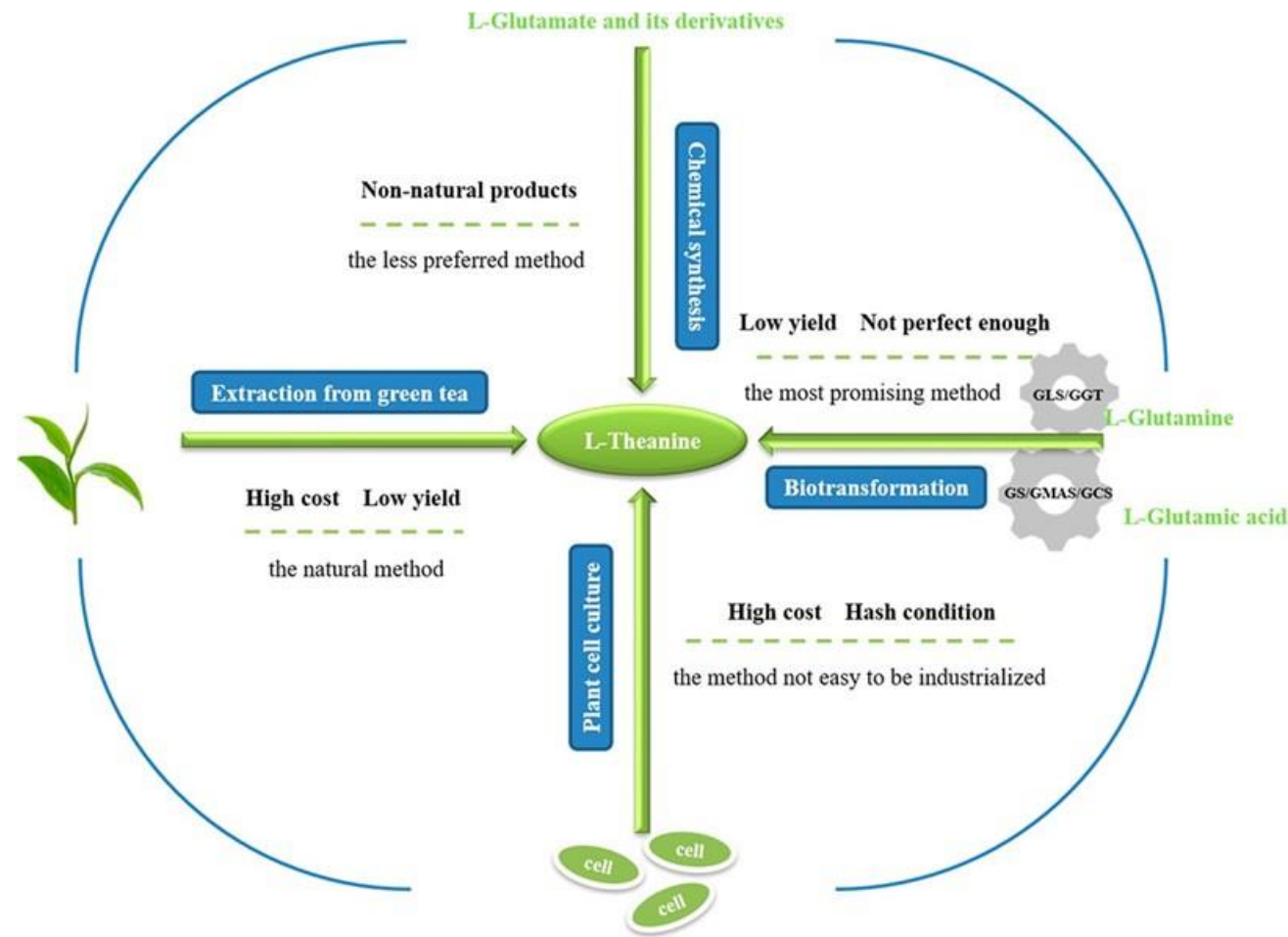
Il primo approccio è studiare la via metabolica per capire come agire per potenziare il processo!

Nonostante la codifica degli enzimi ancora oggi non si conoscono esattamente le copie di geni che codificano per ciascun enzima, non si conosce se vi sono isoforme più attive e soprattutto, essendo la pianta del tè difficilmente modificabile, non è possibile né introdurre un potenziamento genetico della via, né studiare l'effetto di mutazioni e variazioni degli enzimi della via metabolica.

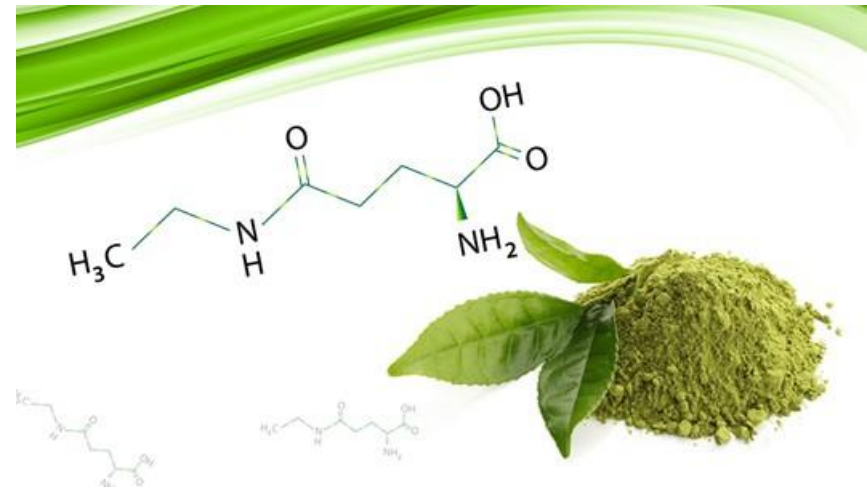
Figure 1. Biosynthetic and catabolic pathway of L-theanine in tea plant. Enzymes involved are (1) nitrate reductase, (2) nitrite reductase, (3) glutamine synthetase, (4) glutamate synthase, (5) glutamate dehydrogenase, (6) alanine transaminase, (7) alanine decarboxylase, (8) theanine synthetase, and (9) theanine amidohydrolase. L-Ala, L-alanine; L-Glu, L-glutamic acid; L-Gln, L-glutamine; α -KG, 2-oxoglutarate.

In genere la prima strategia che viene seguita è quella dell'ESTRAZIONE CHIMICA.

La L-Teanina è abbastanza stabile in ambiente acquoso quindi può essere ottenuta dalle foglie di tè attraverso il processo di infusione utilizzando acqua bollente. Nell'industria, l'estrazione della L-teanina dal tè si basa principalmente sul metodo di estrazione dell'acqua calda combinato con agitazione, circolazione, ultrasuoni, microonde o trattamento enzimatico. Tuttavia, le sostanze disciolte nell'acqua includono anche altri ingredienti come i polifenoli e la caffeina. Per ottenere L-teanina con elevata purezza, è necessario rimuovere ulteriormente gli altri componenti. Al momento, esistono tre metodi di separazione principali nel settore, tra cui la precipitazione, la resina a scambio ionico e la separazione della membrana. Tutti metodi validi che comunque hanno un costo tecnico e ambientale.



SINTESI CHIMICA: La sintesi chimica è fattibile partendo da etilammina e glutammato o suoi derivati; tuttavia le rese sono molto basse. Inoltre la separazione della L-teanina dalla miscela racemica chemiosintetica è molto difficile. Spesso sono presenti impurità indesiderabili nella soluzione di reazione di sintesi come solventi organici e ioni metallici che sono dannosi per la salute umana.



BIOTRASFORMAZIONE

La biotrasformazione può basarsi su alcuni enzimi chiave come la L-teanina sintetasi presente in diverse piante. Va però detto che questo enzima è ATP-dipendente, altamente instabile e difficile da separare. Pertanto, è difficile da utilizzare ampiamente nell'industria. Di recente sono stati considerati anche enzimi microbici tra cui L-glutaminasi (GLS), γ -glutamyltranspeptidasi (GGT), L-glutamina sintetasi (GS), γ -glutamylmetilammide sintetasi (GMAS) e γ -glutamyl cisteina sintetasi (GCS) ma le rese sembrano comunque abbastanza modeste ed il processo è difficile da controllare.

COLTURE CELLULARI:

E' stato dimostrato che ovviamente l'accumulo di L-teanina in colture di callo o cellule è significativamente correlato positivamente alla crescita ma anche alle caratteristiche genetiche della cultivar del tè.

Resta il tema della definizioni delle condizioni di crescita e di elementi elicitori: è stato per esempio dimostrato che l'aggiunta di 25 mM di etilamina cloridrato e la coltura al buio a 25 °C incrementano l'accumulo di L-teanina. Altri elementi importanti sono nitrati, fosfati e concentrazioni appropriate di K⁺ e Mg²⁺ nel mezzo che miglioravano la crescita.

I principali problemi nella coltura di cellule di tè sono l'essudazione di fenoli dagli espianti e la contaminazione delle colture da parte di microrganismi, causando gravi perdite.

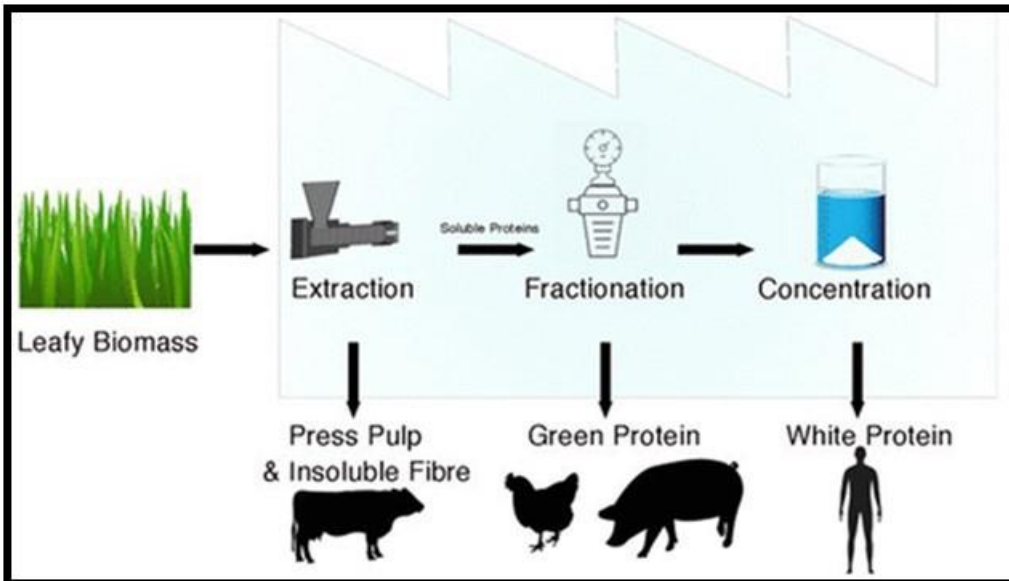
I vantaggi sono che le coltura cellulari o di tessuti non risentono delle variazioni geografiche o stagionali, sono ottimizzabili manipolando le condizioni in vitro e non si producono eccessive biomasse di scarto.



LE BIOMASSE

Le biomasse, soprattutto quelle residue o di scarto, sono considerate un'alternativa sostenibile alla produzione in campo o in colture cellulari e di organi o tessuti. Ma cosa sono?

Le BIOMASSE sono matrice organica (vegetale, animale, microbiche) che possono generarsi spontaneamente in natura oppure possono derivare da agricoltura, allevamento e attività antropiche in generale.



Inizialmente sono state considerate un'opportunità per produrre energia sia attraverso processi di combustione, sia di trasformazione (biodiesel, bioetanolo).

Oggi si guarda alle biomasse come a una possibile fonte di prodotti ad elevato valore aggiunto che si possono ottenere con diversi approcci di trattamento, estrazione e purificazione.

La scelta della biomassa dipende ovviamente dall'utilizzo. Si possono avere biomasse miscelate (materiali legnosi e non legnosi) che non permettono di eseguire estrazioni mirate. In questo caso il valore è l'uso dell'intera biomassa come fonte di carboni per fare per esempio energia.

A seconda del grado di purezza della biomassa e della natura principale si eseguendo pretrattamenti specifici e successivamente si possono sfruttare principi biologici come la fermentazione per ottenere bioetanolo.

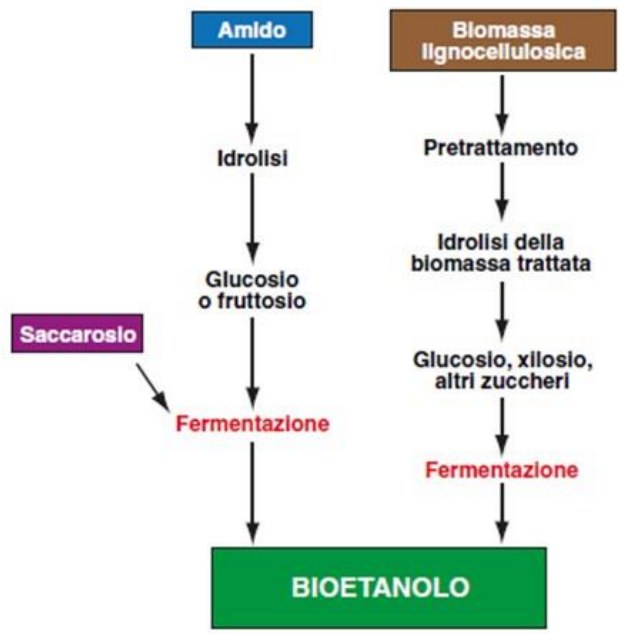
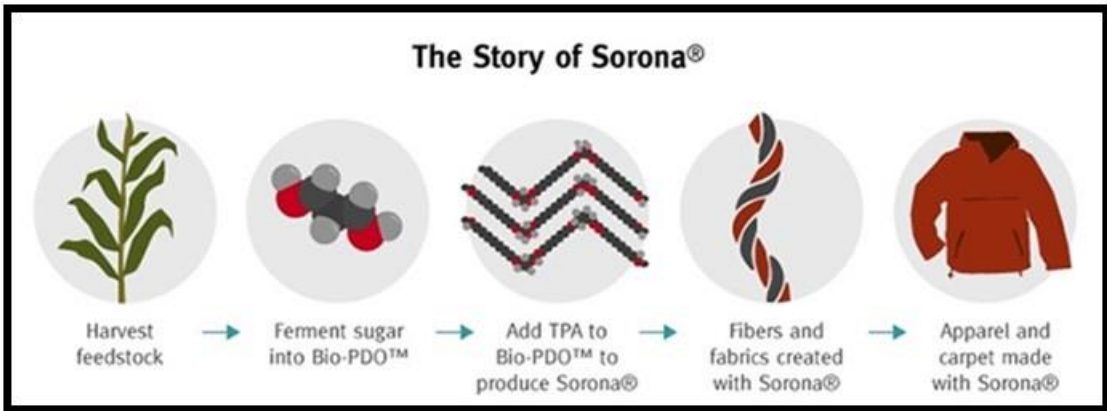


Figura 9.2 Trattamenti necessari per ottenere la produzione di bioetanolo da amido, saccarosio e materiale lignocellulosico.



Una seconda opportunità di uso delle biomasse vegetali è quella di ottenere polimeri alternativi a quelli ottenuti da petrolio. Per esempio la Dupont ha prodotto un composto alternativo al nylon 1-3 propanediolo (nome commerciale Sorona).

L'amido di mais se viene miscelato con sostanze 'plasticizzanti' come il sorbitolo o la glicerina dà origine a materiali plastici biodegradabili. Tra i più noti in Italia vi è la produzione di Mater-Bi (Novamont) ottenuto per via biotecnologica da amido di mais.

Alcune biomasse vegetali hanno oggi un mercato rilevante per la presenza di molecole di interesse specifiche ma soprattutto anche grazie ai volumi prodotti e alla stabilità produttiva.



Review

Valorization of Wine-Making By-Products' Extracts in Cosmetics

Israa Hoss ^{1,†}, Hiba N. Rajha ^{1,2,*,†}, Rindala El Khoury ¹, Sahar Youssef ¹, Maria Letizia Manca ³, Maria Manconi ³, Nicolas Louka ¹ and Richard G. Maroun ¹

Abstract: The increased demand for conscious, sustainable and beneficial products by the consumers has pushed researchers from both industries and universities worldwide to search for smart strategies capable of reducing the environmental footprint, especially the ones connected with industrial wastes. Among various by-products, generally considered as waste, those obtained by winemaking industries have attracted the attention of a wide variety of companies, other than the vineries. In particular, grape pomaces are considered of interest due to their high content in bioactive molecules, especially phenolic compounds. The latter can be recovered from grape pomace and used as active ingredients in easily marketable cosmetic products. Indeed, phenolic compounds are well known for their remarkable beneficial properties at the skin level, such as antioxidant, antiaging, anti-hyperpigmentation and photoprotective effects. The exploitation of the bioactives contained in grape pomaces to obtain high value cosmetics may support the growing of innovative start-ups and expand the value chain of grapes. This review aims to describe the strategies for recovery of polyphenols from grape pomace, to highlight the beneficial potential of these extracts, both in vitro and in vivo, and their potential utilization as active ingredients in cosmetic products.

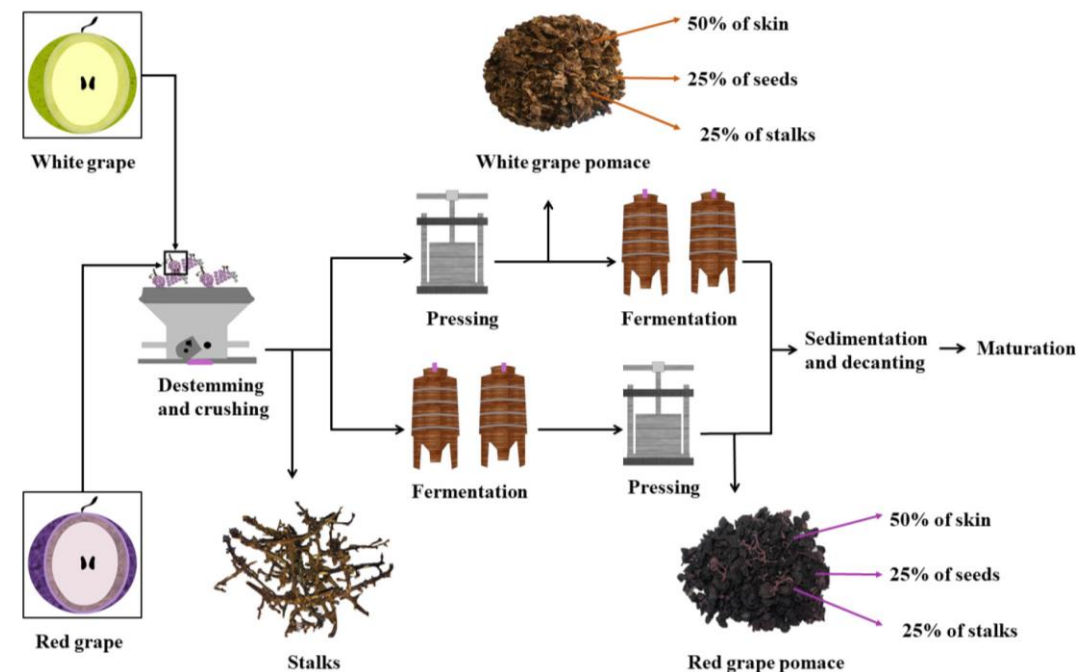


Figure 1. Grape pomace derived from the wine making process.

Durante il processo di raccolta e trasformazione dell'uva vi sono numerosi 'scarti' che possono essere valorizzati. E' improntate anche considerare che questi 'scarti' sono raccolti in determinati comparti e quindi sono accessibili.

Le biomasse vitivinicole si prestano bene a processi di estrazione chimica sia per ottenere miscele antiossidanti (polifenoli miscelati), sia per estrarre e purificare singole molecole. Questi prodotti possono essere sfruttati in diversi contesti incluso quello cosmetico che in generale chiede prodotti ad un discreto livello di purezza, in grandi volumi e soprattutto a costi moderati.

Figure 2. Schematic representation of phenolic compounds' groups.

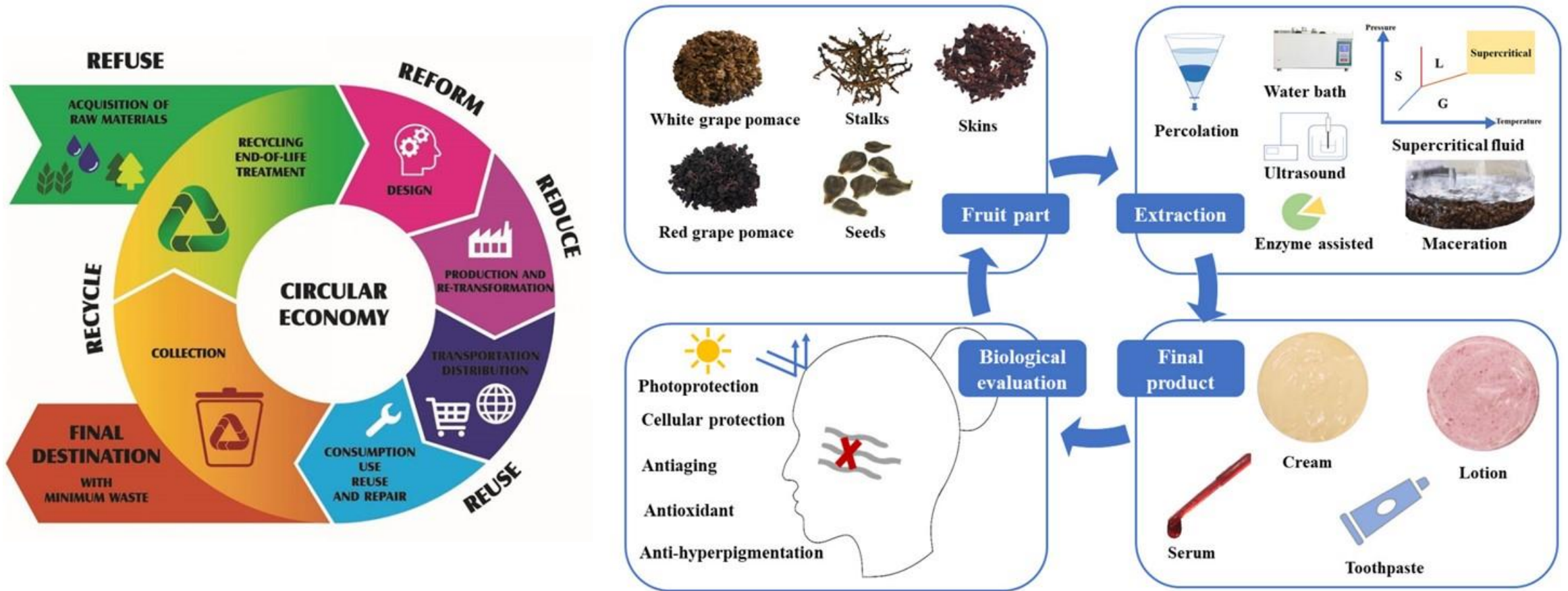
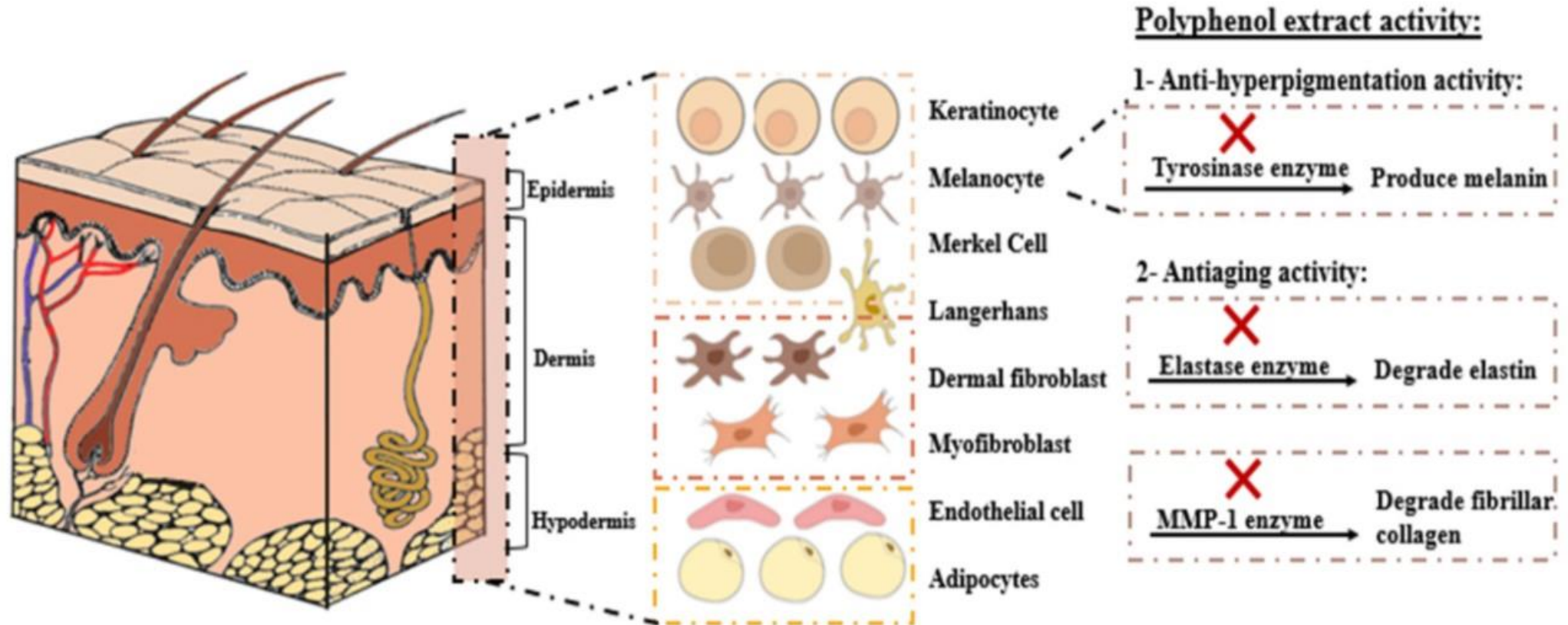


Figure 3. Schematic representation of the life cycle of *Vitis vinifera*, starting by the studied by-product, then the extraction technique, the cosmetics products in which polyphenols were formulated and finally the acquired biological activities.

La pigmentazione della pelle è associata all'accumulo e alla produzione di melanina che viene sintetizzata dall'enzima tirosinasi. È noto che i composti fenolici hanno analogie strutturali con il substrato di tale enzima e possono quindi inibire la produzione di melanina.

I sottoprodotti dell'uva rossa e bianca sono stati studiati per le loro attività inibitorie dell'enzima tirosinasi. I risultati ottenuti da bacche ma anche foglie hanno mostrato importanti azioni inibitorie della tirosinasi. Test su cellule e pelli sintetiche hanno confermato la potenziale applicazione cosmetica dei polifenoli di vite come ingrediente attivo contro l'iperpigmentazione e nella cosmesi in generale.



Le biomasse di maggiore valore e interesse sono ovviamente anche quelle che risultano abbondanti. Per esempio la filiera di produzione del carciofi e dei finocchi raggiunge anche il 50-60% di scarti.

Artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) by-products as a source of inulin: how to valorise an agricultural supply chain extracting an added-value compound

Sofia Cavini, Lorenzo Guzzetti , Francesca Givoia, Maria Elena Regonesi, Patrizia Di Gennaro , Chiara Magoni , Luca Campane , Massimo Labra  & Ilaria Bruni  [...show less](#)

Pages 2140-2144 | Received 06 Aug 2020, Accepted 18 Oct 2020, Published online: 29 Oct 2020

Abstract

This study is aimed at valorizing artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) by-products as source of inulin, a fiber showing relevant prebiotic properties, through the realization of a waste value chain. Starting from artichoke by-products, the inulin fraction was assessed both in terms of total amount and degree of polymerization as a function of the harvest season and storage conditions. These parameters have been found significant at influencing inulin yield of extraction. For the first time, artichoke wastes were proposed to be exploited taking into account the optimal conditions to preserve their high-added chemical value. Our data suggest that Italian farms could obtain from their wastes a total amount of 16 t/year of inulin with an average polymerization degree higher than 40 and would allow the development of a circular economy process within the artichoke supply chain, by exploiting its wastes representing 70% of the total artichoke biomass.



Il contenuto di fruttani, la lunghezza delle catene inuliniche varia sia dall'organo analizzato, sia dalla stagione.

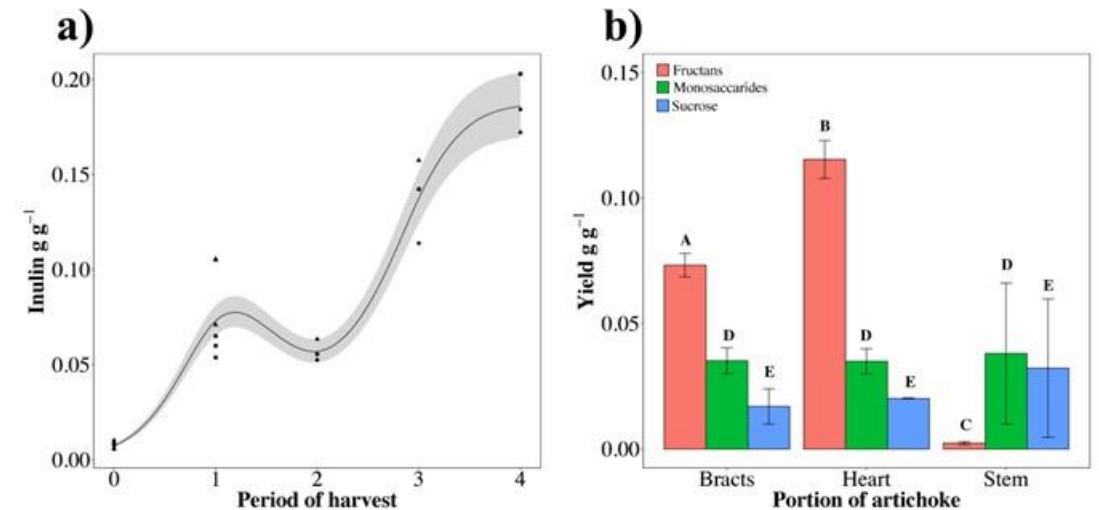
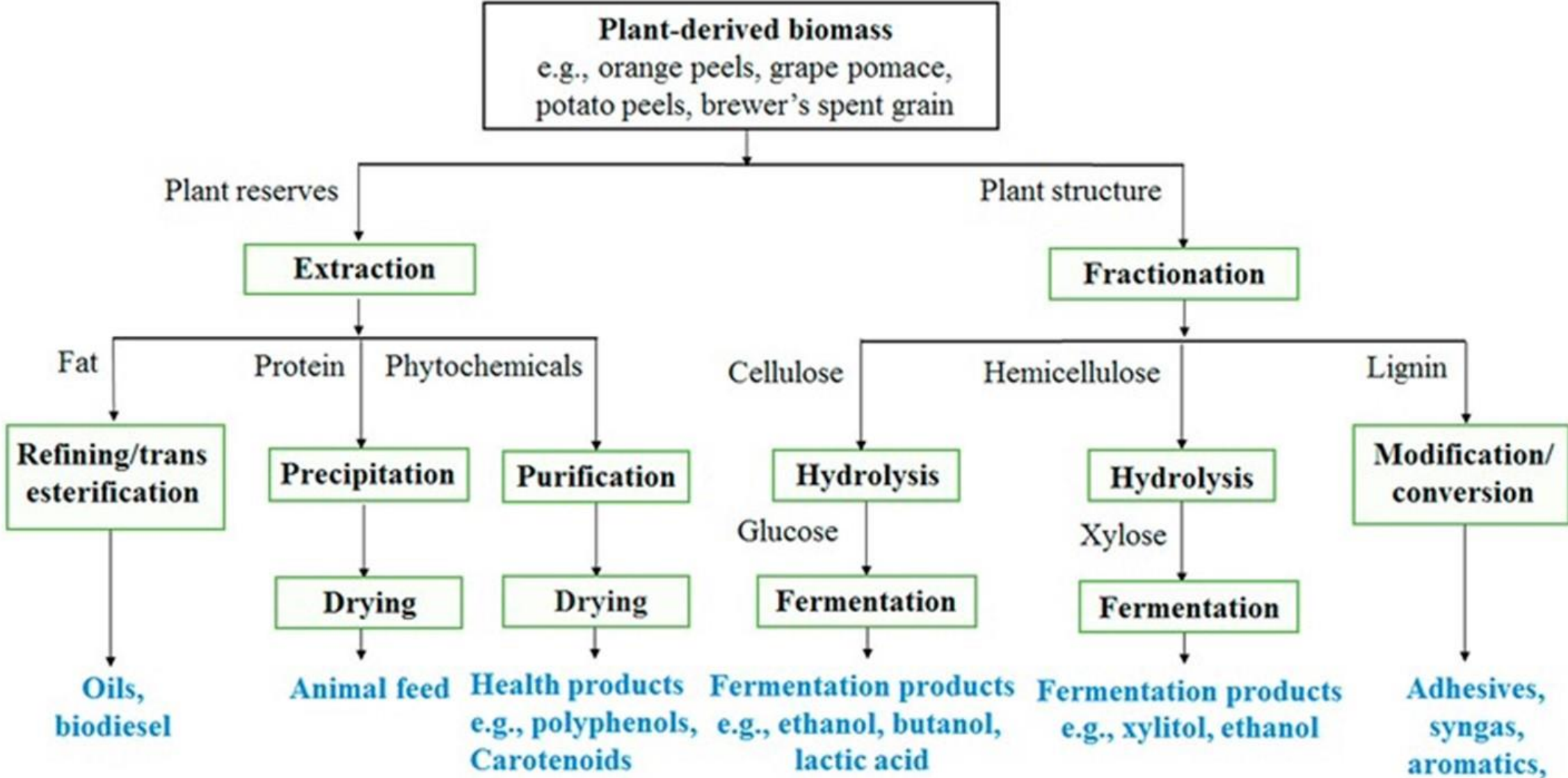


Figure S1. A) GAMM showing the trend between inulin content (g*g⁻¹ dry matter) and the progress of the harvest season in artichoke heads. Sampling sites were considered the random component in the model. 0 = January; 1 = March, 2 = May, 3 = June, 4 = July. Shapes indicate different sampling sites ●: Apulia; ▲: Calabria; ■: Lombardy. Apulia sites lack of the observation from March (1). **B)** Fructans (red), sucrose (green) and monosaccharides (glucose and fructose) (blue) content in hearts,

Tecnologicamente è fondamentale capire quali tipi di molecole si intende ottenere e procedere con processi di estrazione o di frazionamento. Tempi, costi e impatto (ambientale, sociale, ecc.) sono punti chiave che devono essere presi in considerazione per decidere come sfruttare al meglio la biomassa.



Nonostante alcune linee di produzione primaria siano già passate da una procedura lineare ad una circolare, vi sono ancora biomasse orfane che non hanno una valorizzazione definita. In generale le aree di valorizzazione devono portare ad un ritorno economico rilevante in quanto il costo gestionale del processo sommato alle tecnologie di processamento hanno comunque costi non trascurabili.



QUANTE SONO LE BIOMASSE?

Si stima che la produzione globale di biomasse raggiunga 150 Gt (1 Gt= 1000.000.000 tonnellate).

A livello globale, il 66% della biomassa vegetale residua proviene dalla paglia di cereali (stelo, foglie e materiale della guaina), con oltre il 60% di questi residui prodotti nei paesi a basso reddito.

I gambi e le foglie della canna da zucchero sono i secondi maggiori contributori, con altri residui di biomassa comprese le "colture oleaginose", radici e tuberi, noci, frutta e verdura. Molti di questi possono essere utilizzati nella produzione di energia.

Table 1 Cumulative generation potential of agricultural residues in selected countries

Country of origin	Amount of residue (Mt fresh weight)
China	716
United States of America	682
India	605
Europe	580
Brazil	451
Argentina	148
Canada	105
Total	3287

TRATTO DA; Tripathi, N., Hills, C. D., Singh, R. S., & Atkinson, C. J. (2019). Biomass waste utilisation in low-carbon products: harnessing a major potential resource. *NPJ climate and atmospheric science*, 2(1), 1-10.

Si stima tuttavia che soprattutto nei Paesi in via di sviluppo non vi siano sistemi efficaci di valorizzazione soprattutto per i residui di cereali. Si stima che a livello globale almeno 600 Mt tonnellate vengano sprecate.

La produzione globale di biomassa derivata dal legno è di circa 4,6 Gt all'anno, di cui il 60% va alla produzione di energia, il 20% ad alti usi industriali mentre il restante 20% rimane sul campo fino al degrado !



La seconda tipologia di biomasse è quella di origine forestale che deriva dalla produzione del legno ma anche dalla gestione delle foreste. Se si considera che dei 4 miliardi di ettari globali di foresta, circa il 50% ricade nei paesi in via di sviluppo, è plausibile pensare che molta di questa biomassa vada sprecata.

La generazione e il recupero di residui (ad es. ceppi, rami e foglie) e di lavorazione (ad es. tronchi e segatura) dipendono da fattori quali specie arboree e condizioni geografiche. In media per ogni metro cubo di materiale tagliato rimosso, nella foresta rimane un metro cubo di rifiuti. Gli scarti di lavorazione iniziale comprendono la rifilatura dei rami e la rimozione della corteccia (circa il 12% di questo materiale arriva al mulino), lastre/blocchi/ulteriori rifili (circa il 34%) e segatura (circa il 12%). Dopo l'essiccazione in forno, trucioli (circa 6%) e segatura/rifilatura (circa 2%) si aggiungono alla quantità totale di rifiuti.

Sebbene questi volumi siano rilevanti, oggi vi è una crescita modesta solo dell'uso energetico. Se i rifiuti di biomassa hanno il potenziale per altri usi, il loro spostamento dovrebbe seguire una "gerarchia di gestione dei rifiuti", che riconosce il recupero energetico e lo smaltimento come le opzioni meno favorevoli.



Un pezzo di corteccia può essere usato per produrre energia ma forse è uno spreco. La ricerca offre alternative! E' stato scoperto che la corteccia delle varie specie arboree contiene composti con ruolo farmacologico. La prima scoperta è stata fatta da Stone sul Salice per il trattamento della malaria! La salicina è stata isolata dalla corteccia del salice, che ha dato origine alla produzione di aspirina.

L'abete rosso (*Picea abies*) contiene composti potenzialmente bioattivi come acidi grassi, terpeni, cere, steroli, saccaridi e composti fenolici come stilbeni, tannini e flavonoidi. Alcuni composti identificati nella corteccia dell'abete mostrano proprietà benefiche per la salute inclusa l'attività antitumorale.

BIOPROSPECTING = UNA LEVA PER VALORIZZARE GLI SCARTI