

## Strategie per l'accumulo nelle piante di metaboliti di interesse nutrizionale e industriale

I metaboliti secondari costituiscono un largo sottoinsieme delle sostanze chimiche vegetali la cui importanza per le piante e per l'uomo è stata riconosciuta solo recentemente. Questo perché, a differenza dei cosiddetti metaboliti primari, carboidrati, lipidi e proteine che svolgono un ruolo importante come intermedi delle vie anaboliche e cataboliche e che sono ubiquitariamente presenti in elevate concentrazioni in tutti i tessuti vegetali, i metaboliti secondari, presenti in concentrazioni molto basse e solo in specifici tessuti della pianta, apparentemente sembravano non avere un ruolo diretto nel metabolismo. E così pure nell'alimentazione umana, l'attenzione dei nutrizionisti è stata per anni focalizzata sul fabbisogno energetico da ottenere mediante una corretta combinazione nella dieta di carboidrati, lipidi e proteine; ancora una volta i metaboliti primari la facevano da padrone.

Solo recentemente è stato compreso il ruolo determinante che i metaboliti secondari svolgono sia per la pianta che per l'uomo (fig. 1). Nella pianta questa classe di composti è coinvolta nella formazione di simbiosi a livello radicale, nei meccanismi di difesa atti a contrastare stress abiotici e biotici, nei processi riproduttivi, giocando un ruolo nell'attrazione degli animali implicati nell'impollinazione o nella dispersione del seme (Verpoorte, 2000). Alla luce di ciò appare evidente che questi metaboliti sono tutt'altro che secondari dato il ruolo cruciale che svolgono per la fitness delle piante.

Inoltre, il riconoscimento delle proprietà biologiche di migliaia di metaboliti secondari ha portato a una rivalutazione di questi composti anche dal punto di vista nutrizionale e del loro impiego nel settore industriale. Sebbene

\* Fondazione "Istituto Scienze della Salute"

\*\* CRA-Centro di Ricerca per la Cerealicoltura, Foggia

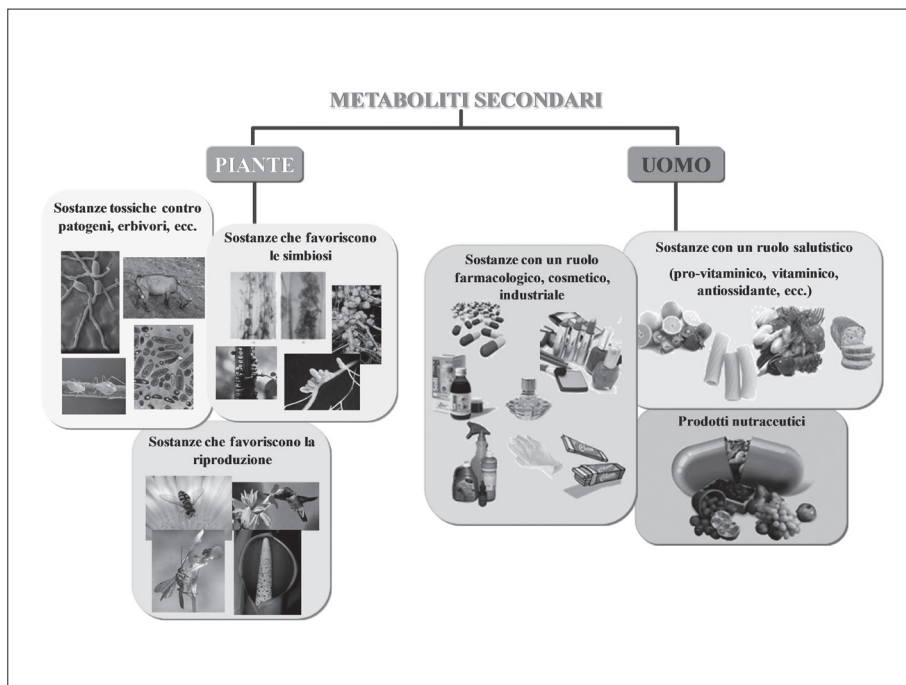


Fig. 1 *Ruolo dei metaboliti secondari nella fisiologia della pianta e nella salute dell'uomo*

non svolgano un ruolo come nutrienti, sempre maggiori evidenze supportano il ruolo di alcuni di questi composti nel ridurre l'incidenza di patologie cronico-degenerative, tra cui le patologie cardio-vascolari, le degenerazioni osteo-articolari e a carico della retina, nonché diverse forme di tumori (Zhao, 2007). Alcune di queste molecole hanno funzione vitaminica o pro-vitaminica, molte altre devono la loro azione benefica alla loro attività antiossidante che si esplica in maniera diversa a seconda delle proprietà chimico-fisiche di ciascuna molecola (fig. 1). Numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato che queste molecole, se assunte regolarmente nella dieta e in quantità significative, possono avere considerevoli effetti a lungo termine.

Nei confronti dei metaboliti secondari esiste anche un grosso interesse industriale dal momento che alcune di queste molecole costituiscono i principi attivi di molti prodotti presenti in commercio tra cui farmaci, pesticidi e cosmetici (fig. 1). Infine, a metà strada tra il ruolo nutrizionale e quello farmacologico si colloca la cosiddetta nutraceutica che si propone di realizzare preparazioni farmaceutiche in forma di pillole, capsule o opercoli contenenti i principi attivi presenti negli alimenti funzionali ma in forma purificata e dosata.

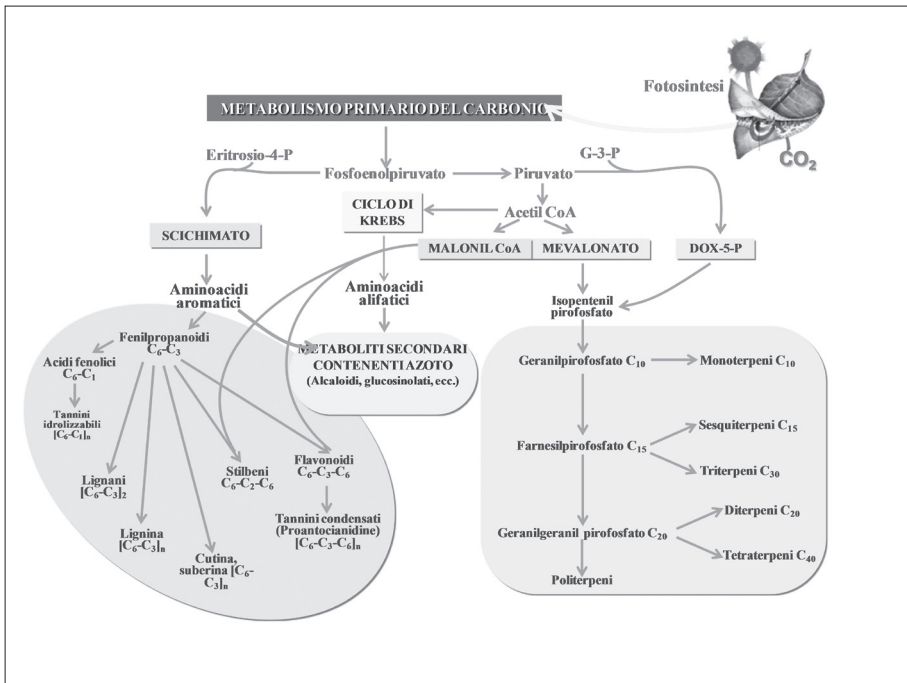










Fig. 2 Rappresentazione schematica delle vie biosintetiche dei metaboliti secondari

I metaboliti secondari vengono tutti prodotti a partire da intermedi del metabolismo primario e possono essere distinti essenzialmente in tre classi principali sulla base della struttura e della via metabolica di sintesi: la classe dei composti fenolici, la classe dei metaboliti secondari contenenti azoto (alcaloidi e glucosinolati) e la classe dei terpenoidi (Herbert, 1989).

I composti fenolici rappresentano una classe molto ampia di metaboliti secondari che si forma a partire dall'aminoacido aromatico fenilalanina e in alcuni casi anche tirosina, attraverso la via dello scichimato (fig. 2). Da questi aminoacidi aromatici si formano i fenilpropanoidi, cosiddetti perché contengono un anello aromatico a cui è legata una catena laterale propenica (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>). Il *cleavage* dalla catena laterale di due atomi di carbonio produce i cosiddetti acidi fenolici (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) dalla cui polimerizzazione originano i cosiddetti tannini idrolizzabili (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>)<sub>n</sub>. La dimerizzazione o polimerizzazione dei fenilpropanoidi porta alla formazione di lignani, lignina, cutina e suberina, mentre l'aggiunta di un secondo anello aromatico, catalizzata dalla stilbene sintasi e dalla calcone sintasi, porta alla formazione di stilbeni e flavonoidi, i composti fenolici più abbondanti nelle piante. La polimerizzazione dei flavonoidi porta alla formazione dei tannini condensati.

SORGENTE	COMPOSTO	QUANTITA' PRESENTE
 Tè verde	Catechine (flavonoidi)	25-30% del peso secco
 Caffè	Acido clorogenico (caffeilchinico)	6-10% del peso secco
 Cacao	Catechine ed epicatechine (flavonoidi) Proantocianidine (tannini condensati)	3-5% di cacao puro 1-2% di cioccolato fondente "Dark"
 Vino rosso	Antocianine, catechine ed epicatechine (flavonoidi)	40-150mg/L
	Proantocianidine (tannini condensati)	1-20 mg/L
	Stilbeni (resveratrolo)	
 Mela Pera	Proantocianidine (tannini condensati)	2300-5000 mg/Kg 1200-2500 mg/Kg
 Arancia rossa	Antocianine (flavonoidi)	
 Fava	Flavanoli (flavonoidi)	150 mg/Kg
 Fagiolo rosso	Proantocianidine (tannini condensati)	5 g/Kg








Tab. 1 *Principali composti fenolici con azione benefica sulla salute umana*

Tra i composti fenolici ad azione benefica sulla salute umana si possono citare le antocianine, composti fenolici presenti in tutti i frutti e ortaggi a colorazione blu-violacea, le catechine presenti nel cacao e nel tè verde e le proantocianidine presenti in alcuni frutti e nei legumi (tab. 1).

Un'altra classe di metaboliti secondari è quella che comprende i composti contenenti azoto, in cui possiamo distinguere gli alcaloidi, composti eterociclici azotati in cui almeno uno degli atomi di azoto presenti deriva da un aminoacido, e i glucosinolati, cosiddetti perché contengono nella loro molecola un gruppo glucosidico solforato (fig. 2). Si tratta di sostanze tossiche, compartimentalizzate nel vacuolo, che vengono utilizzate dalla pianta per difendersi dagli attacchi di patogeni e animali erbivori.

Gli alcaloidi con funzioni narcotiche, stimolanti del sistema nervoso o antitumorali (tab. 2), una volta purificati dalle piante, sono utilizzati come precursori di una serie di molecole di interesse farmaceutico. Nei confronti dei glucosinolati esiste, invece, un interesse legato agli effetti benefici che questa classe di composti esercita sulla salute umana; i glucosinolati sono abbondanti nelle Brassicacee (tab. 2) e numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato che una dieta ricca di vegetali appartenenti a questa famiglia riduce il rischio dell'insorgenza di cancro, in particolare del tumore del polmone e di quelli che interessano l'apparato gastro-intestinale.

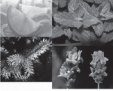





La terza classe di metaboliti secondari è rappresentata dai terpeni, anche

SORGENTE	FAMIGLIA	COMPOSTI	AZIONE
 <i>Atropa belladonna</i>	Solanacee	Atropina	Antispasmodico, midriatico
 <i>Papaver somniferum</i>	Papaveracee	Codeina Morfina	Analgesico, antitussivo Analgesico
 <i>Mucuna deeringiana</i>	Fabacee	L-Dopa	Anti-Parkinson
 <i>Avena sativa</i>	Poacee	Melatonina	Miorilassante
 <i>Cinchona ledgeriana</i>	Rubiacee	Chinino	Antimalarica, tonico
 <i>Catharanthus roseus</i>	Apocynacee	Vinblastina Vincristina	Antitumorale
 <i>Broccoli, cavolini di Bruxell, cavolo cappuccio, cavolo verde, cavolfiore</i>	Brassicacee	Sinigrina, gluconapina, glucobrassicapina, ecc.	Antitumorale

Tab. 2 *Principali alcaloidi e glucosinolati di interesse farmacologico e nutrizionale*

definiti isoprenoidi in quanto l'unità di base di queste molecole è rappresentata dall'isoprene, una molecola a 5 atomi di carbonio. Il precursore dei terpeni è l'isopentenilpirofosfato che si forma o dalla via citosolica del mevalonato o da quella cloroplastica del deossixilulosio 5-fosfato. A seconda del numero di ripetizioni isopreniche si distinguono mono, sesqui, di, tri e tetraterpeni fino ad arrivare a polimeri complessi (fig. 2). A questa classe di composti appartengono molecole che svolgono le funzioni più disparate nella pianta: 1) molecole implicate nella crescita della pianta, tra cui alcuni costituenti dell'apparato fotosintetico (clorofilla e carotenoidi), ormoni (gibberelline), 2) molecole con funzioni ecologiche coinvolte in azioni di difesa, 3) molecole coinvolte nell'attrazione di animali impollinatori. Nei confronti dei composti terpenoidi esiste sia un interesse industriale che nutrizionale (tab. 3); i composti aromatici come alcuni monoterpeni, sesquiterpeni e triterpeni, sono interessanti per l'estrazione di sostanze aromatiche da impiegare nella cosmetica e nel settore alimentare, mentre altri, come l'importante classe di tetraterpeni rappresentata dai carotenoidi e presente in tutti i vegetali di colore giallo-arancio, hanno un importante valore nutrizionale; studi epidemiologici hanno, infatti, dimostrato che un consumo assiduo e abbondante di questi vegetali è associato a un ridotto rischio di malattie cronico-degenerative. Infine, sono interessanti da un punto di vista industriale alcuni politerpeni con proprietà elastiche come la gomma e la guttaperca.

Alla luce di quanto detto appare evidente che qualunque sia l'interesse per uno di questi composti, sia esso un interesse farmacologico, cosmetico

SORGENTE	COMPOSTI	CLASSE
 Limone, aghi di pino, menta, lavanda, fiori e frutti	Limonene, pinene, mentolo, lavandulolo, canfora, geraniolo, ecc	Monoterpeni
 Camomilla, patchouli, vetiver, chiodi di garofano	Bisabololo, patchoulolo, vetivone, cariofillene	Sesquiterpeni
 Rosmarino, caffè, gimnosperme	Cafestolo, cafeolo, carnosolo, acido abietico Gibberelline, fitolo	Diterpeni
 Basilico, origano, timo, mela,	Acido oleanolico, acido ursolico, acido morolico, acido betulico	Triterpeni
 Carote, pomodori, peperoni, mais, pesche, ecc.	Carotenoidi: $\beta$ -carotene, licopene, luteina, zeaxantina	Tetraterpeni
 <i>Hevea brasiliensis</i> <i>Palaquium gutta</i>	Gomma Gutta-percha	Politerpeni

Tab. 3 *Principali composti terpenoidi di interesse industriale e nutrizionale*

o nutrizionale, l'innalzamento del contenuto di questo composto nella parte edibile di una coltura in cui esso è naturalmente presente rappresenta un obiettivo valido da perseguire. A questo scopo possono essere messi in atto interventi di *breeding* finalizzati all'ottenimento di nuovi genotipi migliorati relativamente ai livelli del composto di interesse. Uno degli strumenti più all'avanguardia attualmente disponibili nel *breeding* è rappresentato dalla selezione assistita da marcatori molecolari (*Marker Assisted Selection*, MAS). Questo tipo di approccio presuppone l'identificazione delle varianti geniche associate al carattere di interesse, che possono essere utilizzate per identificare e selezionare i genotipi più interessanti per quel dato carattere. Nel caso in cui il carattere di interesse sia rappresentato dall'elevato contenuto di un metabolita secondario, è possibile condurre un'analisi funzionale della via metabolica che determina l'accumulo del composto al fine di identificare l'enzima chiave che regola l'intera via metabolica; di questo è necessario poi identificare la variante, ovvero l'isoforma, associata a un'elevata velocità di accumulo del composto, e, quindi, risalire alla variante genica che la codifica; quest'ultima potrà essere utilmente impiegata per la selezione di genotipi caratterizzati da elevati livelli del composto di interesse.

A titolo di esempio si riporta di seguito uno studio condotto dal nostro gruppo di ricerca in cui questo tipo di approccio è stato utilizzato per iden-

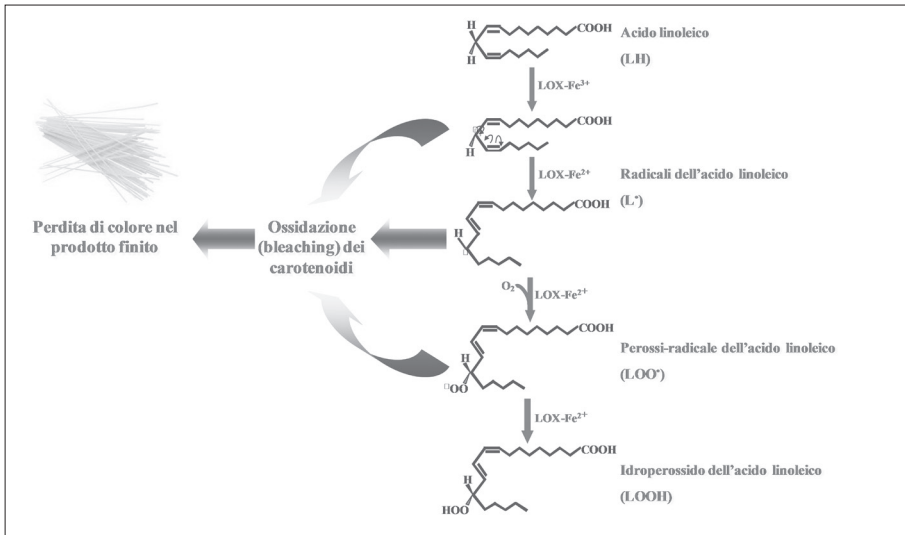



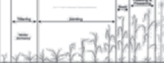
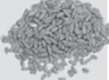




Fig. 3 Reazioni catalizzate dall'enzima Lipossigenasi (LOX)

tificare i determinanti genici responsabili del contenuto in composti carotenoidi, in particolare luteina, nei prodotti derivati dalla semola, come ad esempio la pasta. Si tratta di un carattere importante sia dal punto di vista sensoriale, perché il colore giallo-ambra che caratterizza la pasta a elevato contenuto in carotenoidi è molto apprezzato dal consumatore, sia dal punto di vista salutistico, dal momento che il consumo di luteina è associato a una minore incidenza di patologie degenerative a carico della retina. La pasta, uno dei prodotti trasformati della semola, ha un largo consumo pro-capite e, pertanto, una volta arricchita in luteina, meglio di altri alimenti può contribuire a soddisfare il fabbisogno giornaliero di questo composto che a oggi rimane ancora troppo basso.

Il contenuto in luteina nell'endosperma di frumento duro e, quindi, nella semola è determinato dalla via biosintetica dei carotenoidi. Tuttavia, un elevato contenuto di luteina nella semola non garantisce un altrettanto elevato contenuto nel prodotto trasformato. Questo perché durante il processo di pastificazione si attivano processi degradativi che possono determinare l'ossidazione dei pigmenti carotenoidi e il conseguente sbiancamento (*bleaching*) del prodotto finito. La classe di enzimi responsabile di questo processo è rappresentata dalle Lipossigenasi (LOX). Le LOX catalizzano, in presenza di ossigeno, l'idroperossidazione di acidi grassi poliinsaturi con struttura 1,4 *cis, cis*-pentadienica, come ad esempio il linoleato, che nella semola è il più abbondante della categoria (fig. 3); i radicali intermedi prodotti nel corso di



ISOFORMA 	GENE 	CROMOSOMA 	STADIO 
<b>LOX-1</b>	<b>Lpx-1</b>	<b>Gruppo 4</b>	<b>Semi maturi</b> 
<b>LOX-2</b>	<b>Lpx-3</b>	<b>Gruppo 4</b>	<b>Semi in germinazione</b> 
<b>LOX-3</b>	<b>Lpx-2</b>	<b>Gruppo 5</b>	<b>Semi in germinazione</b> 

Tab. 4 *Isoforme di LOX e relativi geni presenti nei cereali*

questa reazione possono catalizzare diverse reazioni secondarie tra cui l'ossidazione dei pigmenti carotenoidi che durante il processo di pastificazione determina lo sbiancamento del prodotto finito.

Nei cereali esistono tre diverse isoforme di LOX: la LOX-1, la LOX-2 e la LOX-3 (tab. 4); mentre le isoforme LOX-2 e LOX-3 sono particolarmente abbondanti nei semi in germinazione, la LOX-1 è l'isoforma preponderante nelle cariossidi mature e quiescenti e, quindi, la principale responsabile dell'ossidazione dei pigmenti carotenoidi che si verifica durante la pastificazione (Holtman et al., 1996).

I risultati ottenuti dal nostro gruppo di ricerca hanno evidenziato l'esistenza, in frumento duro, di tre geni presenti sul braccio corto del cromosoma 4B e codificanti per l'isoforma LOX-1: *Lpx-B1.1*, *Lpx-B1.2* e *Lpx-B1.3* (fig. 4). Il gene *Lpx-B1.1* presenta, a sua volta, tre varianti alleliche denominate *Lpx-B1.1a*, *Lpx-B1.1b* e *Lpx-B1.1c* (tab. 5). Di queste tre varianti, l'allele *Lpx-B1.1c* presenta una grossa delezione della porzione centrale; ne consegue che, anche qualora la relativa proteina venisse sintetizzata, questa non sarebbe funzionale (Verlotta et al., 2010).

Lo studio di un'ampia collezione di genotipi (85) di frumento duro ha evidenziato la presenza, in ciascun genotipo, del gene *Lpx-B1.2* o *Lpx-B1.3* associato con uno degli alleli del gene *Lpx-B1.1*. La determinazione, nelle cariossidi degli stessi genotipi, dell'attività LOX, ha consentito di distinguere tre diversi gruppi: il gruppo di genotipi ad alta attività LOX, ad attività intermedia e a bassa attività; di questi è riportato un campione rappresentativo in figura 5. È interessante osservare come ognuno di questi gruppi possieda un allele diverso del gene *Lpx-B1.1* (fig. 5); in particolare, il gruppo a bassa attività possiede l'allele deleto *Lpx-B1.1c*, il quale, non generando una isoforma



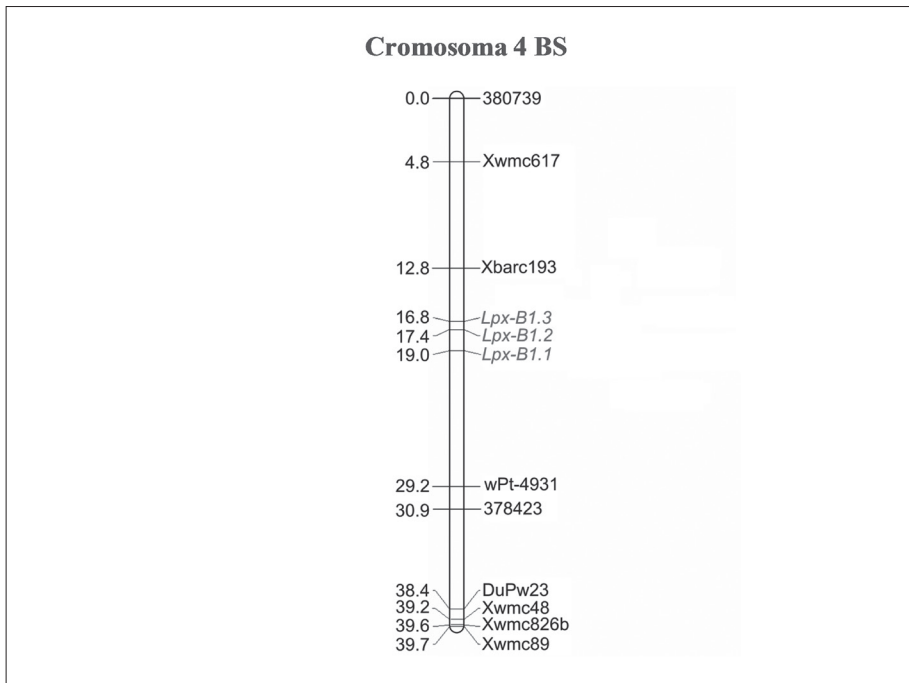


Fig. 4 Localizzazione dei tre geni codificanti per la LOX-1 in frumento duro sul cromosoma 4B

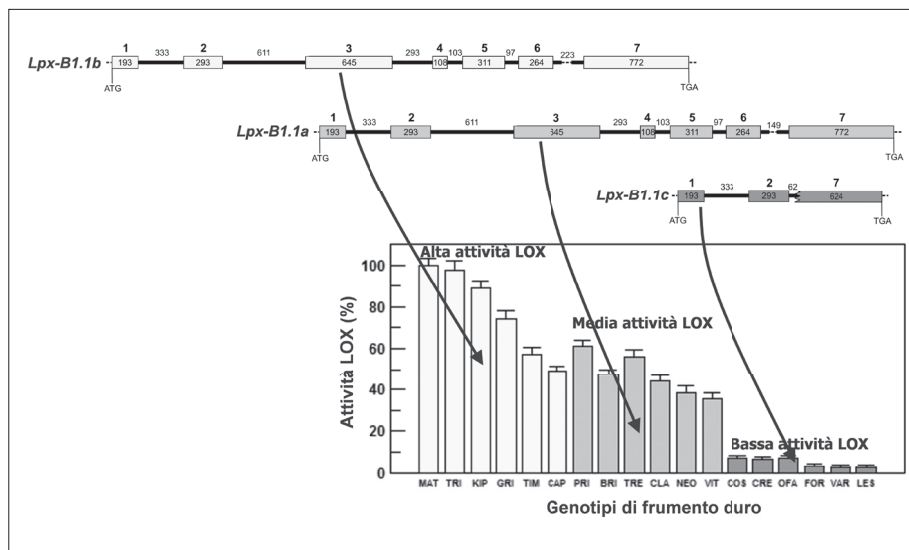


Fig. 5 Attività LOX nelle cariossidi e distribuzione dei tre alleli del gene *Lpx-B1.1* in diversi genotipi di frumento duro

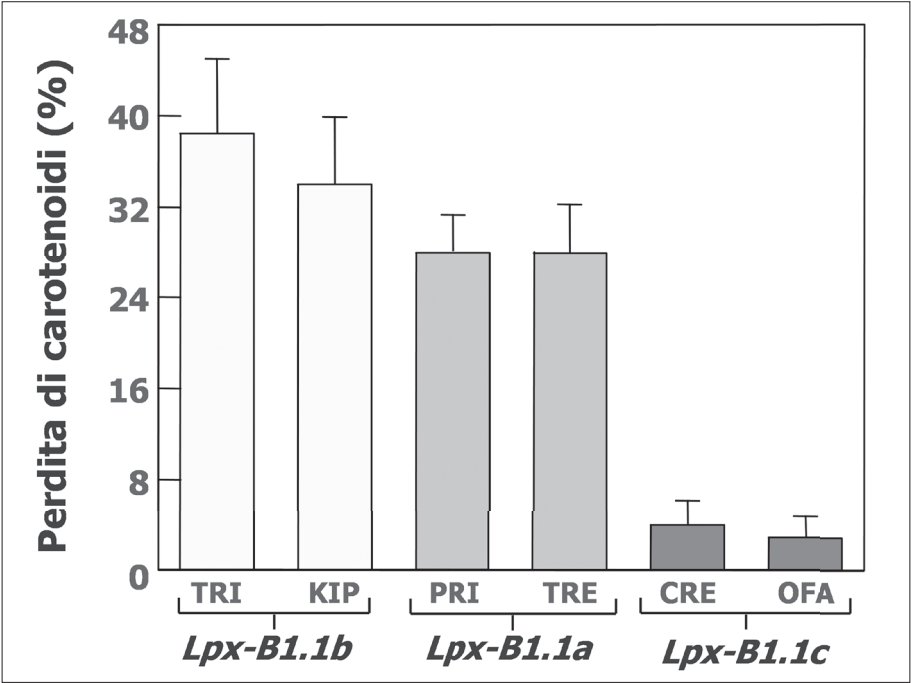


Fig. 6 Perdita percentuale di composti carotenoidi durante il processo di pastificazione in genotipi di frumento duro ad alta, intermedia e bassa attività LOX nelle cariossidi

ISOFORMA	GENE	ALLELE	CROMOSOMA	STADIO
LOX-1	Lpx-B1.1	Lpx-B1.1a	4BS	Semi maturi
		Lpx-B1.1b		
		Lpx-B1.1c		
	Lpx-B1.2	Lpx-B1.2		
	Lpx-B1.3	Lpx-B1.3		

Tab. 5 Diverse isoforme di LOX-1 e relativi geni e alleli in frumento duro

LOX-1 funzionale, è probabilmente responsabile dei bassi livelli di attività che caratterizzano questo gruppo.

Ciò ha delle ricadute importanti sulle proprietà del prodotto finito; infatti, la perdita percentuale di carotenoidi che si verifica durante il processo di

pastificazione è minima nei genotipi che presentano l'allele *Lpx-B1.1c* e una bassa attività LOX nelle cariossidi (fig. 6).

Alla luce di ciò è possibile concludere che nel miglioramento genetico del frumento duro è necessario selezionare genotipi portatori dell'allele *Lpx-B1.1c* al fine di ottenere paste caratterizzate da un elevato contenuto in composti carotenoidi.

#### BIBLIOGRAFIA

- HERBERT R.B. (1989): *The biosynthesis of secondary metabolites*, Chapman & Hall, London, UK.
- HOLTMAN W.L., VAN DUIJN G., SEDEE N.J.A., DOUMA A.C. (1996): *Differential expression of lipoxygenase isoenzymes in embryos of germinating barley*, «Plant Physiology», 111, pp. 569-576.
- VERLOTTA A., DE SIMONE V., MASTRANGELO A.M., CATTIVELLI L., PAPA R., TRONO D. (2010): *Insight into durum wheat Lpx-B1: a small gene family coding for the lipoxygenase responsible for carotenoid bleaching in mature grains*, «BMC Plant Biology», 10:263, <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/10/263>.
- VERPOORTE R. (2000): *Secondary metabolism*, in *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*, Verpoorte R. and Alfermann A.W. eds, Kluwer Academic Publishers, pp. 1-29.
- ZHAO J. (2007) *Nutraceuticals, nutritional therapy, phytonutrients, and phytotherapy for improvement of human health: A perspective on plant biotechnology application*, «Recent Patents on Biotechnology», 1, pp. 75-97.

