



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.

LAUREA DI PRIMO LIVELLO IN BIOTECNOLOGIE

Elaborato di laurea

***Messa a punto di una tecnica di dosaggio dei
lipidi di riserva nei semi e in cellule vegetali***

RELATORE: PROF. BARBARA BALDAN

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

LAUREANDA: FEDERICA FRANCESCATO

ANNO ACCADEMICO 2008-2009

1. INTRODUZIONE

Questo lavoro di tesi riguarda la messa a punto di una tecnica, rapida ed efficiente, di dosaggio dei lipidi di riserva estratti da semi e da colture di calli ed embrioni ottenuti *in vitro*.

Il termine lipidi si riferisce a un gruppo di molecole strutturalmente diverse che sono di preferenza solubili in solventi non acquosi. (Buchanan *et al.*, 2003)

I lipidi sono una frazione relativamente piccola della massa totale del tessuto vegetale e questi, all'interno dell'organismo vegetale, ricoprono vari ruoli. Nelle piante i lipidi svolgono diverse funzioni: vi sono lipidi di membrana costituenti appunto delle membrane delle cellule e fondamentali per mantenere una separazione tra l'ambiente interno ed esterno della cellula e per delimitare i vari compartimenti cellulari; vi sono lipidi che giocano un ruolo fondamentale nella trasduzione dei segnali fungendo da messaggeri e ormoni; altri, come le cere, sono costituenti l'epidermide della pianta; altri ancora fanno parte della categoria dei pigmenti. Altro gruppo, non di minore importanza, è rappresentato dai lipidi di riserva o di deposito che costituiscono una fondamentale riserva di energia e sui quali ci si concentrerà per questo lavoro di tesi.

I lipidi di riserva sono principalmente accumulati sotto forma di triacilgliceroli o trigliceridi: tre acidi grassi legati ad una molecola di glicerolo con tre legami esteri (Figura 1.1).

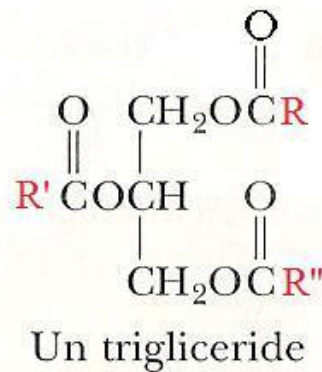


Figura 1.1 Formula di un trigliceride con R, R', R'' acidi grassi. (modificato da Brown W. e Poon T., 2006)

I granuli pollinici e i semi di frutti sono sedi principali di accumulo dei lipidi di deposito. Le riserve del seme si depositano nell'endosperma e nei cotiledoni costituenti l'embrione, dove si localizzano nel citoplasma sotto forma di corpi oleosi delineati da una membrana costituita da un solo strato lipidico (Figura 1.2). I lipidi di riserva nei semi sono fondamentali come fonte di energia necessaria per il processo di germinazione del seme.

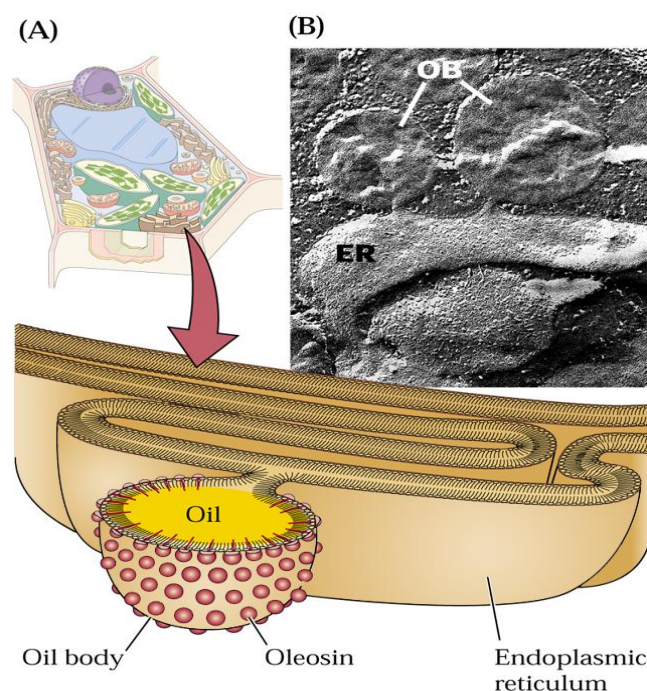


Figura 1.2 (A) Formazione di un corpo oleoso; (B) TEM di una cellula vegetale rappresentante un corpo oleoso (OB) formatosi dal reticolo endoplasmatico (ER). (Buchanan *et al.*, 2003)

I lipidi di deposito hanno un ruolo cruciale nelle applicazioni industriale ed alimentare. Questi sono un'importante fonte di grassi alimentari sia per l'uomo che per altri animali e sono largamente utilizzati nell'industria manifatturiera come lubrificanti, detergenti, vernici, cosmetici e rivestimenti. (Buchanan *et al.*, 2003)

Gli oli vegetali sono inoltre di largo utilizzo come biocombustibili, basti pensare che la maggior parte dell'olio di colza europeo è utilizzato per la produzione di biodiesel. L'estrazione e la quantificazione dei lipidi di riserva è perciò un processo di grande importanza a livello industriale e di ricerca. Vi sono diversi metodi per valutare la quantità di lipidi presenti in un tessuto:

1. Peso fresco/secco : per questo metodo si utilizza materiale vegetale fresco o secco pesato, si compie l'estrazione dei lipidi e si pesa successivamente il materiale rimanente dopo l'estrazione, una volta seccato. Il rapporto tra il peso iniziale del campione ed il peso finale del campione portato a secco fornisce la quantità di lipidi estratta. Al prodotto macinato e pesato viene aggiunto alcol etilico 95°. È aggiunto successivamente acido cloridrico al 25% per fare avvenire poi la reazione di idrolisi acida a 70-80°C per 30 min. L'estrazione degli acidi grassi avviene tramite lavaggi successivi con etere etilico ed etere di petrolio. Si porta poi a secco il campione rimuovendo il solvente in stufa a 100°C. (Bisogno, 2009)

2. HPLC (cromatografia liquida ad alta pressione) : consiste in una tecnica cromatografica quantitativa e qualitativa che sfrutta il principio di equilibrio di affinità tra una fase stazionaria, presente all'interno della colonna cromatografica ed una fase mobile che viene fatta scorrere all'interno della colonna. Tramite questa tecnica è possibile separare più composti presenti all'interno di un solvente e di individuare, nel caso di un estratto di lipidi, diversi trigliceridi e acidi grassi.

3. Metodo spettrofotometrico : sui lipidi estratti dal campione si effettuano una colorazione e una lettura allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda specifica per il tipo di reazione utilizzata. Confrontando poi il valore di assorbanza del campione ottenuto con una retta standard costruita utilizzando concentrazioni note di un olio di riferimento, si può risalire alla percentuale di lipidi estratta dal campione in esame.

2. MATERIALI E METODI

La tecnica del dosaggio lipidico è stata messa a punto utilizzando come materiale di partenza semi secchi oleaginosi appartenenti a varie specie vegetali quali: *Brassica napus* (colza), *Helianthus annuus* (girasole) e *Arachis hypogaea* (arachide). È stato utilizzato anche materiale proveniente da colture cellulari in callo di girasole ed embrioni somatici ottenuti a partire da espianti di semi di arachide.

Durante questo lavoro di tesi è stata messa a punto una tecnica di dosaggio lipidico basata sul metodo ideato da Neri e Frings (1973) per determinare il livello di trigliceridi presente nel siero umano .

Durante il saggio sono stati utilizzati diversi reagenti quali:

- *Isopropanolo* $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$: un alcool incolore utilizzato per l'estrazione dei lipidi dalle cellule vegetali.
- *Alumina* Al_2O_3 : utilizzata per la purificazione dei trigliceridi presenti in soluzione. Le impurità, mediante un processo di centrifugazione, precipitano con l'alumina a costituire il pellet, mentre in soluzione restano quasi esclusivamente trigliceridi.
- *Idrossido di potassio* KOH : reagente utilizzato per la reazione di saponificazione in concentrazione 1N.
- *Sodio metaperiodato* : ossida il glicerolo a dare formaldeide, composto necessario alla successiva reazione di colorazione. Il sodio metaperiodato è stato utilizzato ad una concentrazione 3 mM.
- *Ammonio acetato* $\text{CH}_3\text{COONH}_4$: reagente necessario in fase di colorazione, utilizzato ad una concentrazione 20 mM.

- *Acetilacetone* : reagisce con la formaldeide e con l'ammonio acetato a dare 3,5-diacetil-1,4-diidrolutidina, soluto colorato misurabile allo spettrofotometro (condensazione di Hantzsch). L'acetilacetone è stato utilizzato in concentrazione 4 mM.
- *Trioleina* : olio di riferimento utilizzato per costruire la retta standard di taratura.

Questa tecnica di dosaggio lipidico prevede una prima fase di estrazione dei trigliceridi dal materiale di partenza (semi, calli, embrioni), una seconda fase di purificazione dei trigliceridi estratti, una fase di saponificazione e di colorazione del glicerolo ottenuto dai trigliceridi e per finire una fase di quantificazione indiretta dei lipidi estratti.

ESTRAZIONE DEI TRIGLICERIDI

Durante questa prima fase si estrae il contenuto di trigliceridi dal materiale di partenza quale semi, calli o embrioni.

- Se il materiale di partenza è costituito da semi secchi si procede all'eliminazione del tegumento tramite bisturi, fatta eccezione per alcuni semi quali quelli di *Brassica napus*, troppo piccoli per essere privati del tegumento.
- Il campione è pesato e raccolto in una eppendorf da 1.5 ml (il campione può essere congelato a -70°C per analisi seguenti). Sono sufficienti 10 mg di tessuto per l'analisi dei semi mentre per tessuti di tipo calloso sono necessari almeno 50-200 mg.
- Si aggiungono 100 µl di isopropanolo e si omogeneizzano i tessuti usando un pestello e azoto liquido.
- Si porta il volume a 1 ml con isopropanolo e si continua l'estrazione ponendo i campioni in agitazione per 15 minuti.
- Si centrifugano successivamente le eppendorf a 14000 rpm per 2 minuti.

Si preparano i campioni per fare la retta standard utilizzando la trioleina come trigliceride di riferimento. La retta standard può essere ottenuta portando ad 1 ml con isopropanolo quantità arbitrarie dell'olio scelto come riferimento.

PURIFICAZIONE DEI TRIGLICERIDI

La purificazione permette di isolare i trigliceridi dagli estratti grezzi cellulari. In questa fase è utilizzata l'alumina che, alla fine del processo, viene fatta sedimentare tramite centrifugazione: i trigliceridi si troveranno nel supernatante. Per ognuno dei campioni di materiale precedentemente centrifugati e dei campioni creati per ottenere la retta standard si prelevano 400 µl di supernatante e li si aggiunge in una eppendorf da 2 ml contenente 0.4 g di alumina e 1 ml di isopropanolo.

- Si mantengono in agitazione i campioni per almeno 5 minuti.

1. Triglycerides + KOH \rightarrow Glycerol + Fatty Acids
2. Glycerol + Periodate \rightarrow Formaldehyde
3. Formaldehyde + NH_4^+ + Acetylacetone \rightarrow Diacetyldihydrolutidine

Figura 2.2 Reazione di purificazione e colorazione dei trigliceridi. (Conkey and Feirer, 1988)

QUANTIFICAZIONE DEI TRIGLICERIDI

La soluzione ottenuta dalla colorazione va misurata allo spettrofotometro ad un'assorbanza di 410 nm. Attraverso la lettura allo spettrofotometro si quantifica il contenuto dei trigliceridi nella soluzione, misurando il soluto colorato 3,5-diacetil-1,4-diidrolutidina.

La colorazione risulta essere abbastanza stabile, ma è conveniente misurare l'assorbanza entro 20 min. (Feirer R. *et al* ,1989)

3. RISULTATI E COMMENTI

Per poter determinare la quantità di trigliceridi estratti dai vari campioni di partenza è necessario allestire una retta standard, utilizzando un trigliceride di riferimento. Per questo dosaggio lipidico è stata utilizzata la *trioleina*, trigliceride composto da tre molecole di acido oleico (18:1). La retta standard è stata costruita allestendo 5 campioni contenenti ognuno una diversa concentrazione di trioletina in 1 ml di isopropanolo, partendo da una soluzione madre di trioletina a concentrazione nota.

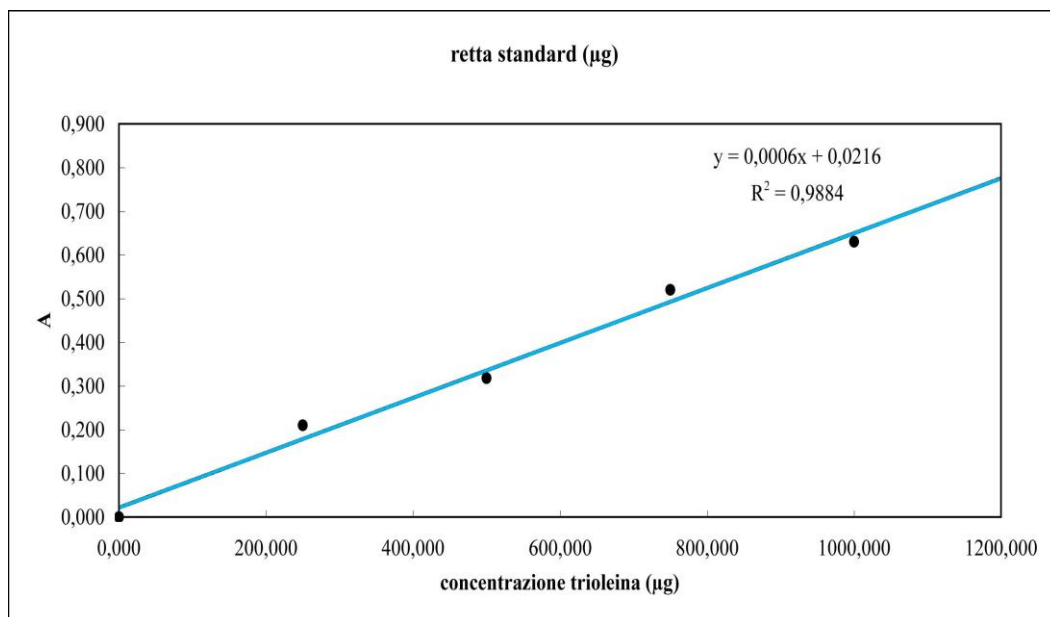


Figura 3.1 Retta standard di taratura per il dosaggio lipidico.

Tali campioni sono stati sottoposti alla procedura del dosaggio lipidico descritta precedentemente (in MATERIALI E METODI) a partire dallo step di purificazione. Ad una lunghezza d'onda di 410 nm sono stati misurati i valori di assorbanza dei campioni; la colorazione assunta dai campioni è direttamente proporzionale al contenuto lipidico dei campioni stessi. Una volta ottenuta la retta standard è possibile quantificare il contenuto di trigliceridi estratti dai campioni di semi, calli ed embrioni utilizzando tale retta come riferimento, purchè i valori di assorbanza misurati dai campioni dei tessuti vegetali siano contenuti nella retta. Sono stati compiuti diversi tentativi per stabilire le concentrazioni di trigliceride di riferimento ottimali per la costruzione di una retta efficiente. Dopo vari saggi è stato definito un range ottimale di concentrazioni, che stabilisce come limite massimo 1 mg/ml di trioleina. Per costruire la retta sono state utilizzate le seguenti quantità di trioleina: 0 µg, 250 µg, 500 µg, 750 µg, 1000 µg. Dall'interpolazione delle misure ricavate allo spettrofotometro si è ottenuta l'equazione della retta standard (Figura 3.1).

Le prove del dosaggio lipidico sono state compiute utilizzando semi di colza, girasole e arachide come semi di riferimento. L'attendibilità della tecnica è stata valutata confrontando i risultati ottenuti, in percentuali di lipidi, con i valori di riferimento forniti dalla Ditta Biochemical Service s.n.c., Castelfranco Veneto – TV (Figura 3.2).

Semi	% lipidi totali
Colza	42,9
Girasole	46,4
Arachide	52,7

Figura 3.2 Percentuale di lipidi totali presenti nei semi di riferimento.

Sono stati compiuti diversi tentativi di ottimizzazione del dosaggio lipidico:

1. Utilizzo dei semi con o senza il tegumento

Ci si può trovare di fronte a semi di grandi dimensioni come il girasole e l'arachide o di piccole dimensioni come la colza. Partendo da semi di girasole o di arachide, si è proceduto alla privazione del tegumento del seme in quanto questo non contiene lipidi di riserva e perciò non risulta utile al dosaggio. Per tali semi la privazione del tegumento risulta relativamente semplice, essendo questi di grandi dimensioni. Tale operazione viene compiuta in quanto la presenza del tegumento altera il calcolo dei rapporti tra lipidi estratti e peso totale del seme.

Lavorando, al contrario, con semi di piccole dimensioni, come la colza, l'eliminazione del tegumento risulta molto laboriosa e lenta. Sono state effettuate perciò delle prove per valutare la possibilità di utilizzare tali semi senza privarli del loro tegumento. Sono stati utilizzati semi di colza sia senza che con il tegumento per valutare se per entrambi i materiali di partenza fosse possibile ottenere il medesimo quantitativo totale di trigliceridi.

È stato perciò effettuato il dosaggio lipidico per i due campioni e le percentuali di lipidi estratti ottenute sono risultate simili: 43,05% per i semi privi di tegumento e 39,81% per i semi di colza con il tegumento (Figura 3.3).

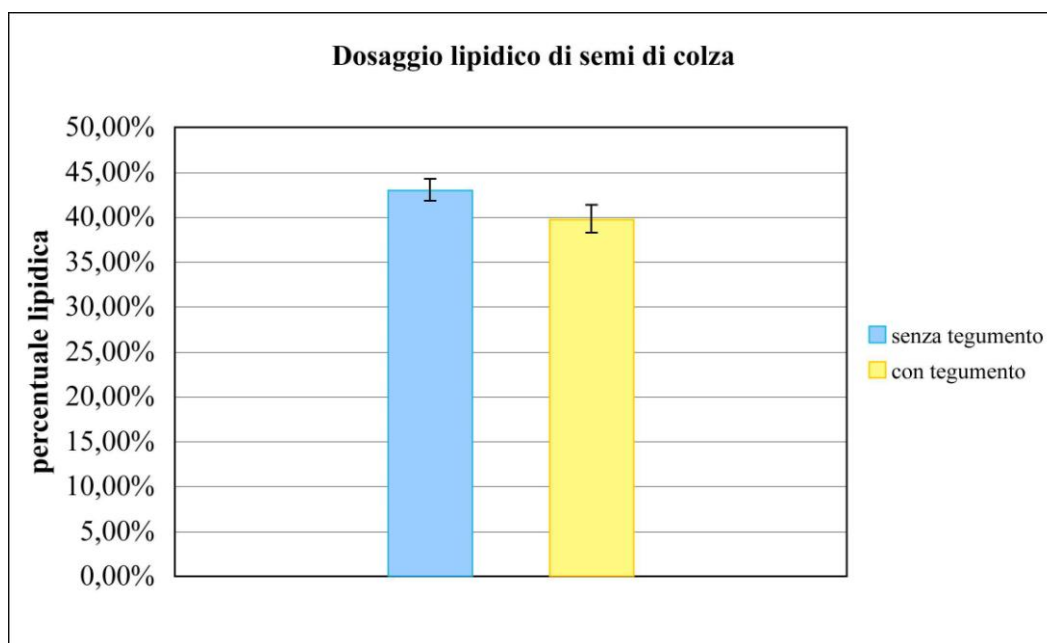


Figura 3.3 Dosaggio lipidico di semi di colza con e senza tegumento.

È stato dimostrato perciò che l'utilizzo dei semi molto piccoli con il tegumento permette di rendere il dosaggio lipidico per tale seme più rapido e allo stesso modo efficiente.

2. Tempi di estrazione differenti

Sono state effettuate delle prove a diversi tempi di estrazione dei trigliceridi in isopropanolo. Le prove sono state attuate mantenendo il campione in isopropanolo in agitazione per 10, 15, 20, 25 o 30 minuti. Si è concluso che sottoporre il campione ad un tempo di estrazione superiore al tempo definito dal protocollo, 15 minuti, non comporta variazioni eccessive nel contenuto di lipidi estratto durante il saggio. Tutte le prove successive sono state perciò condotte sottoponendo il campione ad un tempo di estrazione di 15 minuti, come da protocollo.

3. Quantità di materiale di partenza da utilizzare

Sono state effettuate delle prove per valutare la quantità di semi ottimale per ottenere dal dosaggio la percentuale di lipidi più vicina a quella di riferimento fornita dalla Ditta Biochemical Service s.n.c., Castelfranco Veneto – TV (Figura 3.2).

Il dosaggio lipidico è stato compiuto per 10 mg, 50 mg e 100 mg di semi di colza e di girasole. Dal dosaggio si può osservare che all'aumentare della quantità di semi si ottiene una minore percentuale di lipidi estratti. Questo avviene in quanto la quantità di isopropanolo utilizzata per l'estrazione è stata mantenuta la medesima per tutti i campioni, 1 ml, e tale aliquota di isopropanolo risulta insufficiente per estrarre tutti i trigliceridi dai campioni a quantità maggiore di materiale di partenza. Con 50 mg e 100 mg di semi, infatti, l'isopropanolo va a saturazione (Figure 3.4 e 3.5).

Quantità (mg)	Girasole: % lipidi totale	Colza: % lipidi totale
10	46,32	42,30
50	5,84	5,87
100	2,97	2,62

Figura 3.4 Tabella rappresentante le percentuali di lipidi estratti dai diversi campioni.

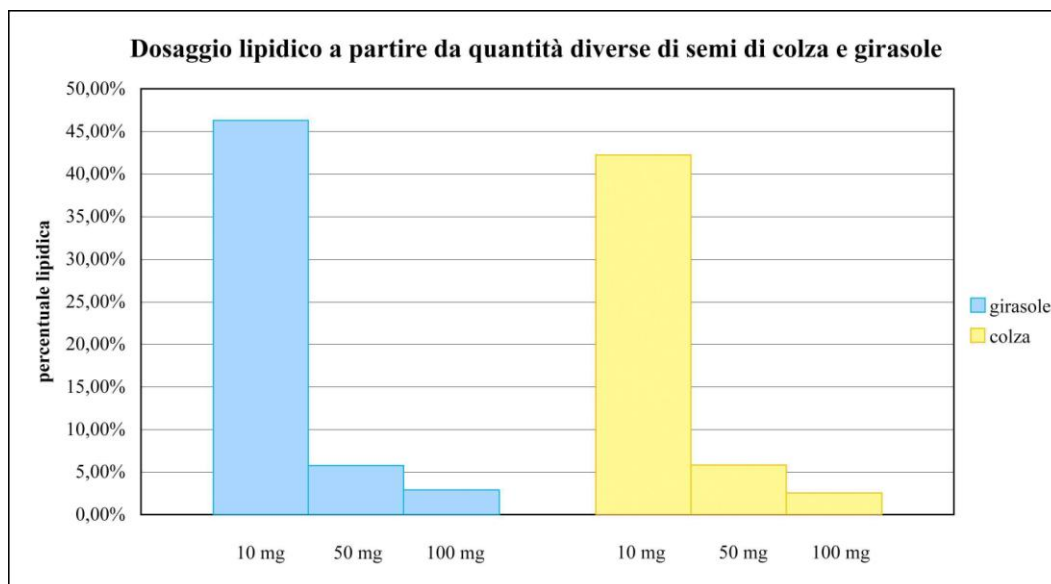


Figura 3.5 Dosaggio lipidico a partire da quantità diverse di semi di colza e girasole.

Si è concluso che per ottenere un dosaggio efficiente sono sufficienti 10 mg di semi di partenza. Questo quantitativo non eccessivo permette di ottenere percentuali di lipidi estratti vicini ai valori attesi.

Dopo diverse prove la procedura utilizzata è quella descritta nei MATERIALI E METODI. Una volta messa a punto l'estrazione e la tecnica in sé si è proceduto con il dosaggio lipidico in girasole e arachide.

DOSAGGIO DEFINITIVO IN GIRASOLE E IN ARACHIDE

Da semi di girasole e arachide sono state ottenute precedentemente in laboratorio colture cellulari in solido e da queste, per quanto riguarda l'arachide, sono stati successivamente ottenuti embrioni.

È stato effettuato il dosaggio lipidico in semi e in calli di girasole (Figure 3.6 e 3.7).

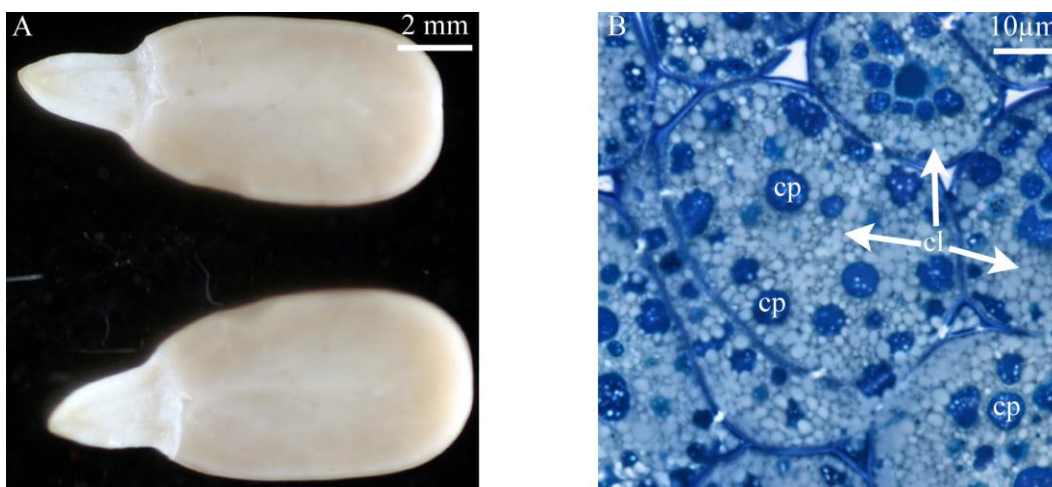


Figura 3.6 (A) seme di girasole; (B) ottico delle cellule del tessuto del seme di girasole. All'interno del citoplasma delle cellule sono visibili i corpi lipidici=cl e i corpi proteici=cp. (Bisogno, 2009)

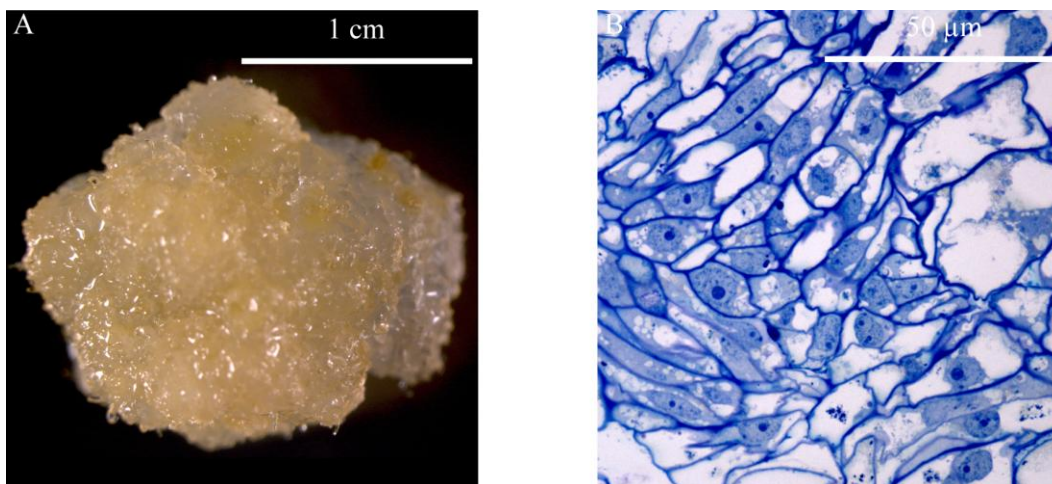


Figura 3.7 (A) callo di girasole; (B) ottico delle cellule del callo di girasole. All'interno del citoplasma delle cellule sono difficilmente visibili corpi lipidici. (Bisogno, 2009)

Il dosaggio lipidico effettuato nei semi di girasole ha fornito una percentuale totale di lipidi estratti del 46,4%, mentre dal callo il contenuto in lipidi estratti è

stato dello 0,16%. Dai dati ottenuti si osserva come il contenuto totale di lipidi cali in modo repentino dal seme al callo e questo è visibile anche dalle immagini ottenute al microscopio ottico (Figure 3.6 B e 3.7 B).

I lipidi sono visibili all'ottico come depositi citoplasmatici traslucidi e dalle immagini si nota infatti una maggior presenza di tali depositi nel tessuto del seme piuttosto che nel tessuto calloso.

È stato effettuato il dosaggio lipidico in semi e in embrioni di arachide (Figure 3.8 e 3.9).

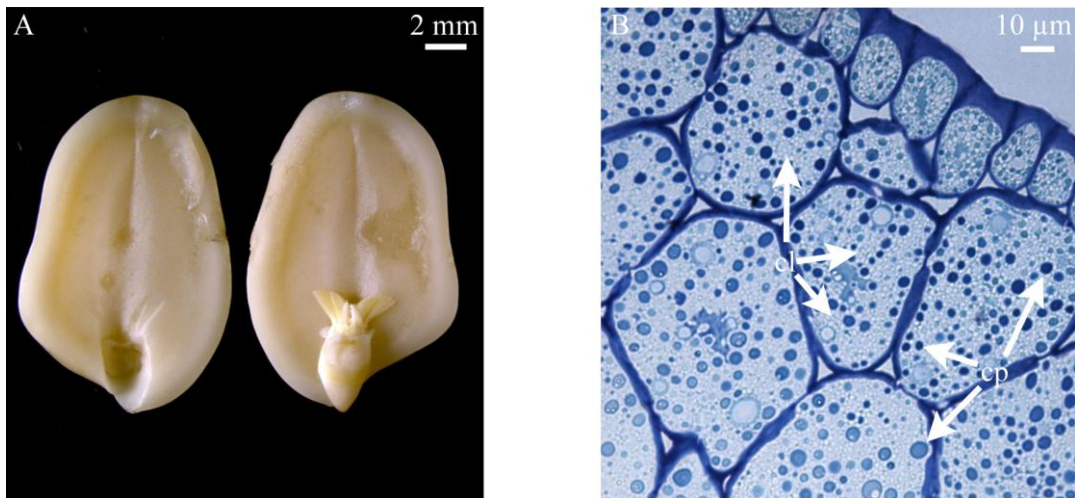


Figura 3.8 (A) seme di arachide; (B) ottico delle cellule del tessuto del seme di arachide. All'interno del citoplasma delle cellule sono visibili i corpi lipidici=cl e i corpi proteici=cp. (Bisogno,2009)

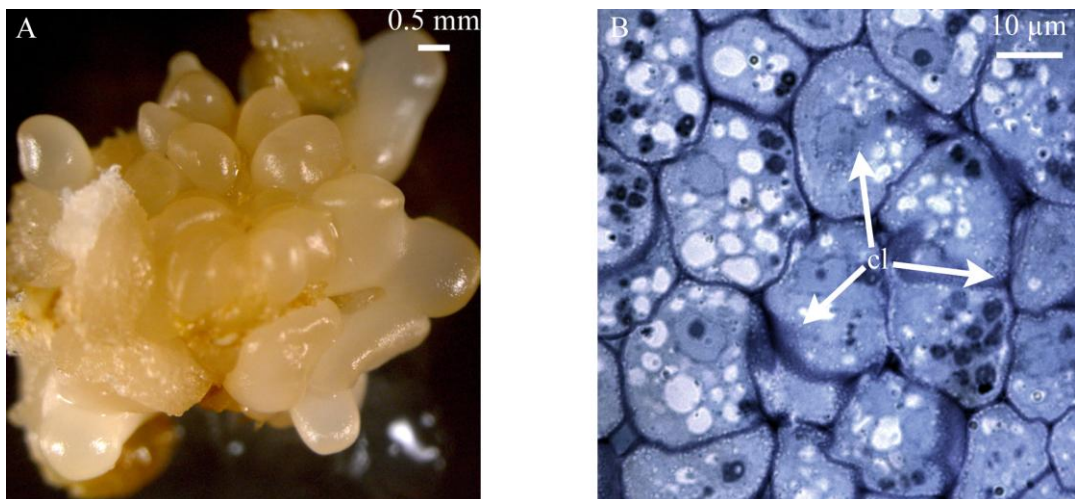


Figura 3.9 (A) embrione di arachide; (B) ottico delle cellule del tessuto dell'embrione di arachide. All'interno del citoplasma delle cellule sono visibili i corpi lipidici. (Bisogno, 2009)

Dal dosaggio sui semi si è ottenuta una percentuale totale in lipidi estratti del 52,70%, mentre il dosaggio sugli embrioni ha fornito una percentuale in lipidi dello 0,42%.

Durante la formazione di embrioni somatici può aumentare l'accumulo di sostanze di deposito, soprattutto lipidi, rispetto a colture cellulari in attiva proliferazione (calli). L'aumento dei lipidi di riserva risulta essere inferiore rispetto alle attese: si passa infatti dallo 0,16% ottenuto dal dosaggio in calli solamenta ad uno 0,42% ottenuto per gli embrioni. Questa incongruenza probabilmente è dovuta allo stadio di sviluppo in cui si trovavano gli embrioni al momento dell'estrazione. L'embrione infatti attraversa diversi stadi di sviluppo: globulo, cuore, torpedine. L'embrione allo stadio globulo e cuore contiene un elevato contenuto di sostanze di riserva che cala nello stadio torpedine in quanto, in tale stadio, le sostanze di deposito vengono consumate per lo sviluppo dei cotiledoni dell'embrione. Durante questo saggio sono stati utilizzati soprattutto embrioni allo stadio di torpedine e questo giustifica la bassa percentuale in lipidi totali ottenuta dal dosaggio. L'induzione di embrioni somatici in vitro potrebbe essere una strategia per ottenere grandi quantitativi di lipidi di riserva di origine vegetale.

4. CONCLUSIONI

Durante questo lavoro di tesi è stata messa a punto una tecnica di dosaggio lipidico rapida ed efficiente da poter utilizzare in laboratorio. La tecnica risulta essere attendibile e permette di ottenere percentuali in lipidi di riserva, per i campioni in esame, molto vicine alle percentuali ottenute da altri metodi di dosaggio come *peso fresco/secco*.

Variazioni nelle percentuali ottenute possono derivare comunque da genotipi diversi dei semi di partenza; semi della stessa specie possono contenere quantitativi differenti di trigliceridi di riserva. La tecnica del dosaggio lipidico risulta essere in continua ottimizzazione.

5. BIBLIOGRAFIA

Bisogno Stefano (anno accademico 2008-2009). Selezione e caratterizzazione di colture vegetali di alto contenuto lipidico. *Tesi di laurea*.

Bob B. Buchanan, Wilhelm, Grisse and Russell L. Jones (2003). Biochimica e biologia molecolare delle piante. Editore Zanichelli s.p.a. pp: 421-477.

Brown W. and Poon T. (2005). Introduzione alla chimica organica. Edizione EdiSES.

Conkey J. H. and Feirer R.P. (1988). Determination of triglycerides in plant tissues. *IPC Technical Paper Series*, 316: 1-5.

Feirer R. P., Conkey J. H., and Verhagen S. A. (1989). Triglycerides in embryogenic conifer calli: a comparison with zygotic embryos. *IPC Technical Paper Series*, 326: 1-13.

Mhaske V. B., Cengalrayan K. and Hazra S. (1998). Influence of osmotica and abscisic acid on triglyceride accumulation in peanut somati embryos. *Plant Cell Reports*, 17: 742-746.

Neri B. P. and Frings C. S. (1973). Improved method for Determination of Triglycerides in Serum. *Clinical Chemistry* 19/10: 1202-1204.