

LABORATORIO DI SCIENZE NATURALI

ESPERIENZA: LA FERMENTAZIONE ALCOLICA

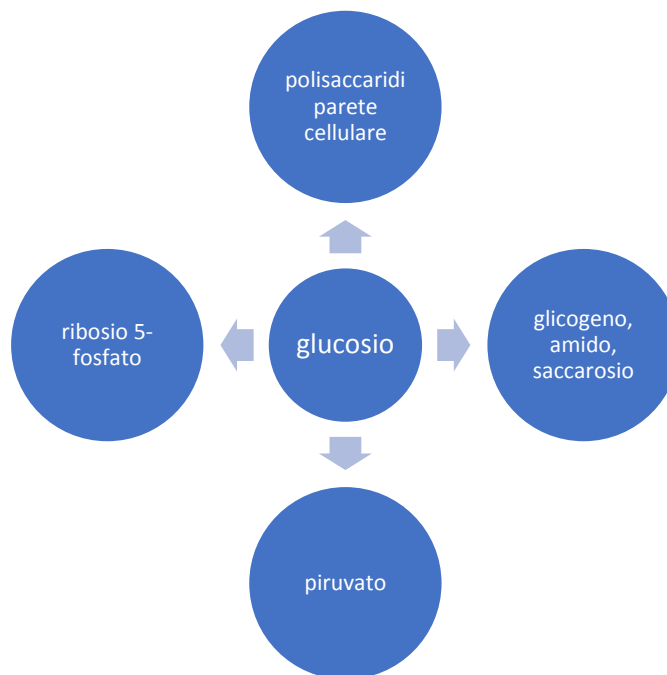
Indice dei contenuti

- Obiettivo
- Introduzione
 - La reazione
 - I lieviti
 - I substrati
 - L'idea portante dell'esperimento
- Lista dei reagenti e degli strumenti
- Procedure
 - Scheda per lo studente
- Come elaborare i dati
- Bibliografia/ sitografia

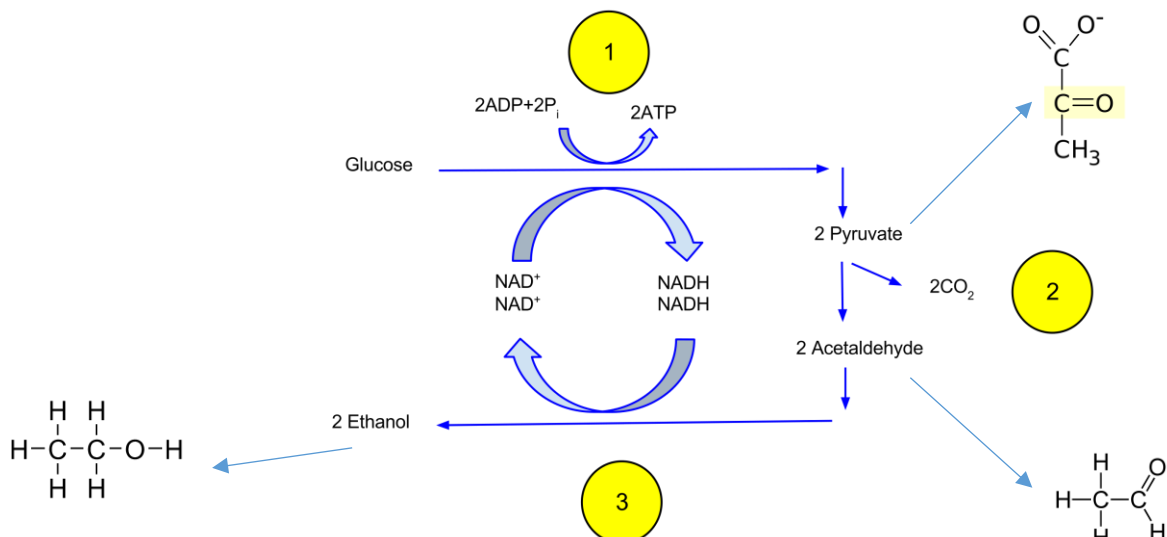
OBIETTIVO: VERIFICARE SPERIMENTALMENTE IL MODO IN CUI DIVERSI FATTORI (T,CONCENTRAZIONE DEL SUBSTRATO, PH, TIPOLOGIA DEL SUBSTRATO...) INFLUISCONO SULLA ATTIVITA' DI *S.CEREVISIAE*.

INTRODUZIONE

Il glucosio occupa una posizione centrale nel metabolismo delle piante, degli animali e di molti microrganismi. Le principali vie di utilizzo del glucosio sono rappresentate in figura:

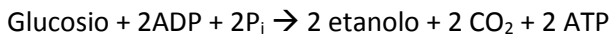


In questo esperimento ci occuperemo della fermentazione alcolica, che si inserisce in parte nello schema precedente. Infatti i lieviti ed altri microrganismi convertono il glucosio in piruvato tramite la glicolisi e trasformano poi il piruvato in acetaldeide e l'acetaldeide infine in etanolo secondo la seguente successione di reazioni:



Il piruvato viene decarbossilato in una reazione irreversibile catalizzata dalla piruvato decarbossilasi (è una semplice decarbossilazione e il piruvato non viene ridotto) e in una seconda tappa l'acetaldeide viene ridotta ad etanolo ad opera dell'alcol deidrogenasi, con l'intervento del NADH derivato dalla deidrogenazione della gliceraldeide 3-fosfato (fase della glicolisi).

La reazione complessiva della fermentazione alcolica è quindi :



Noi possiamo renderci conto in modo immediato della trasformazione in atto in quanto viene liberata CO₂, uno dei due metaboliti primari (l'altro è l'etanolo).

I LIEVITI

Nei nostri esperimenti useremo *Saccharomyces cerevisiae*, un organismo unicellulare eucariota appartenente al Regno dei Funghi.

S.cerevisiae è compagno di strada dell'uomo da millenni: prodotti come il vino, la birra e il pane sono frutto di un processo biotecnologico "inconsapevole ed empirico " elaborato da artigiani lontani da noi migliaia di anni. Il ruolo svolto dai lieviti nel processo di fermentazione che porta alla produzione di bevande alcoliche fu messo in luce alla metà del XIX sec dagli studi fondamentali condotti da L.Pasteur che accompagnarono la nascita della microbiologia. Per noi, nel XXI secolo, *S.cerevisiae* è un organismo modello: il suo genoma è stato sequenziato interamente (Goffeau et al. 1996) . La possibilità di usare i lieviti come organismo ospiti nella tecnologia del DNA ricombinante volta alla produzione di proteine umane è stata ampiamente valutata: i lieviti sono infatti organismi eucarioti, facili da manipolare e rapidi nella crescita, capaci di attuare la maggior parte delle modificazioni post-traduzionali necessarie per la produzione di proteine di mammiferi biologicamente attive. Problemi nella resa della reazione stanno orientando gli scienziati verso altre forme di lieviti oltre a *Saccharomyces*, con risultati incoraggianti (*Kluyveromyces lactis*)

IL SUBSTRATO

I lieviti *S.cerevisiae* hanno un alto vigore fermentativo nei confronti del glucosio mentre il comportamento è variabile nei confronti del galattosio, del saccarosio, del maltosio o del raffinosio. A seconda del ceppo, dato che vengono richieste reazioni preliminari (idrolisi), l'amido può essere un substrato interessante. Anche altri composti organici, come l'acido malico e la glicerina, possono essere utilizzati dai lieviti in questione.

Il fabbisogno di N è quantificabile in un valore di 150-180 mg/L , al di sotto del quale si ha arresto della fermentazione: fonti azoto sono l'azoto ammoniacale, aminoacidi e piccoli peptidi. Alcune vitamine sono ugualmente necessarie: Biotina, Tiamina e Acido Pantotenico , in quantità dell'ordine dei µg.

La T ottimale si fissa tra i 25-35°C (i lieviti sono organismi mesofili) e il pH ottimale è tra 3,5-4,5.

Infine i *S.cerevisiae* sono organismi anaerobi facoltativi: entra in attività fermentativa quando la concentrazione di zucchero nel substrato supera 0,15-0,2 g/L.

L'idea portante dell'esperimento

Il fatto che uno dei due metaboliti primari della fermentazione sia la CO₂ ci permette di seguire il decorso della reazione rilevando il numero di bolle di CO₂ prodotte.





Si può pensare di testare l'efficienza dei lieviti su diversi substrati nelle stesse condizioni di pH e T oppure di variare la T o il pH a parità di altre condizioni sperimentali (concentrazione della soluzione di lieviti, concentrazione del substrato).

Come ulteriore spunto di sperimentazione si potrebbe pensare di immettere inibitori della fermentazione quali l'etanolo, acidi grassi (ottanoico e decanoico), esteri etilici o come il metabisolfito di potassio e studiarne gli effetti a diversa concentrazione.

Un secondo modo per seguire il decorso della reazione potrebbe passare attraverso la rilevazione delle variazioni di pH di una soluzione acquosa nella quale far gorgogliare la CO₂ prodotta (adoperando un opportuno indicatore)

LISTA DEI REAGENTI E DEGLI STRUMENTI

Materiali e reagenti

- Lievito disidratato (*S.cerevisiae*) 30 g
- Glucosio, saccarosio, maltosio, amido....
- Acqua di rubinetto
- Indicatore di pH : Rossometile, Metilarancio  H 301, P 301+310
- Etanolo  H225, P210
- Metabisolfito di potassio   H318, H335, P 280 - 305+351+388 - 313

Strumenti / vetreria

- Beuta da 250 mL
- Beuta da 150 mL
- Tappo forato
- Tubicino di plastica
- ...

SCHEDA PER LO STUDENTE

La fermentazione alcolica

MATERIALE

- Lievito disidratato, 30 g
- Collezione di substrati (glucosio, saccarosio, fruttosio, maltosio...)
- Acqua di rubinetto
- Collezione di tossine/inibitori: etanolo, metabisolfito, sali di metalli pesanti..

STRUMENTAZIONE E VETRERIA

- Becher da 250 mL
- Beuta da 500 mL
- Cilindro graduato 50 mL
- Beuta con tappo forato
- Tubicino flessibile in plastica
- Becher da 400 mL

PROCEDIMENTO

- Preparazione della coltura di lievito: rilevare la temperatura ambiente, riscaldare 150 mL di acqua del rubinetto sino a T ambiente e sciogliervi 30 g di lievito disidratato, mescolando leggermente sino a raggiungere una soluzione piuttosto omogenea.
- Assemblaggio dell'apparato strumentale: prendere una beuta, forarne il tappo e inserire all'interno un invito e un tubicino di plastica che sarà poi inserito all'interno di un becher, posto vicino alla beuta.
- Preparazione della soluzione di controllo: riempire con 225 mL di acqua a T ambiente la beuta in dotazione, aggiungere 10 g di glucosio e 25 mL di soluzione "madre". Chiudere la beuta con il tappo preparato in precedenza, immettere il tubicino di plastica nel becher pieno a metà d'acqua, attendere almeno 5 minuti (per saturare di CO₂ l'acqua nel becher)
- Rilevare, con una lettura di 1 minuto ripetuta tre volte, il numero di bolle di CO₂ liberate nel becher.
- Procedere ora secondo diverse linee di indagine.

SCHEDA PER LO
STUDENTE

La fermentazione alcolica

- Effetti della variazione di concentrazione del substrato
 - Si preparano soluzioni a diversa concentrazione di glucosio (5-15-20 g) – volume 225 mL acqua. Si aggiungono 25 mL di coltura di lieviti. Rilevare il numero di bolle liberate seguendo la procedura indicata precedentemente.

- Effetti della variazione di concentrazione della coltura di lieviti
 - Si preparano tre soluzioni di glucosio (10 g in 225 mL di acqua), si aggiungono a ciascuna rispettivamente 12,5-25-50 mL di soluzione di coltura. Rilevare il numero di bolle liberate seguendo la procedura indicata precedentemente.

- Effetti della variazione del tipo di substrato
 - Si preparano tre (o tante soluzioni quante le tipologie di substrato disponibili) soluzioni con 225 mL di acqua, 10 g di substrato e 25 mL di coltura di lieviti. Rilevare il numero di bolle seguendo la procedura indicata precedentemente

- Effetti della presenza di inibitori
 - Si preparano tre soluzioni contenenti 25 mL di coltura di lieviti, 225 ml di acqua, 10 g di glucosio e 7.5-15-25 mL di etanolo. Rilevare il numero di bolle seguendo la procedura indicata precedentemente.
 - Si preparano tre soluzioni contenenti 25 ml di coltura di lieviti, 225 mL di acqua, 10 g di glucosio e di metabisolfito di potassio. Rilevare il numero di bolle seguendo la procedura indicata precedentemente.

COME ELABORARE I DATI

Per ciascuno del set di dati rilevati occorre preparare una tabella e un grafico individuando la variabile indipendente e quella dipendente. Ad esempio per il primo set di misure

Concentrazione substrato (% p/V)	Numero di bolle in 1 minuto			
	Prova 1	Prova 2	Prova 3	Media
Controllo				

DOMANDE – SPUNTI PER L'APPROFONDIMENTO

- I dati ottenuti sono in linea con le previsioni ipotizzate al momento di iniziare l'esperimento? Possiamo dal confronto con altri gruppi evidenziare eventualmente risultati poco attendibili e scartarli? In tal caso, si riesce a evidenziare l'errore sperimentale compiuto? Se i dati sono confermati, ricercare in letteratura l'eventuale spiegazione della apparente anomalia.
- Quali sono i "punti deboli" della procedura? In che modo si potrebbe rendere più precisa la rilevazione dei dati?

Il limite dell'esperienza proposta è nella difficoltà di misurare la quantità di CO₂ prodotta durante la fermentazione delle nostre colture di lieviti. L'utilizzo pertanto di un sensore di pressione ci permetterebbe di ottenere risultati più attendibili e precisi.

Le condizioni di temperatura potrebbero essere portate a quelle ottimali per i lieviti tramite l'utilizzo di un bagno termico.

BIBLIOGRAFIA / LINK DI RIFERIMENTO

- David L Nelson, Michael M Cox, *Introduzione alla biochimica del Lehninger*, Zanichelli 2011
- John E Smith, *Biotechnologie*, Zanichelli 2002

- www.molecularlab.it/public/data/imy85x/200852513223_lieviti.pdf
- http://www.instruction.greenriver.edu/kmarr/biology%20211/Labs%20and%20ALEs/B211%20Labs/B211%20Labs/5%20Lab%205_Alc%20Ferm%20in%20Yeast_F2009.pdf