

Stima della crescita di popolazioni di lieviti del ceppo *Saccharomyces cerevisiae* in diverse condizioni di coltura

Introduzione

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è un organismo eucariote, unicellulare, appartenente al regno dei funghi. È uno dei lieviti più diffusamente impiegati in ambito alimentare, industriale e di ricerca e facilmente reperibile. Questo organismo cresce a temperatura ottimale di 30 °C, in condizioni anaerobiche facoltative e con terreni con substrati ricchi di composti organici (carboidrati, proteine e lipidi) e fonti di azoto, fosforo e micronutrienti.

Poiché la cellula e il metabolismo cellulare costituiscono temi centrali del corrente anno scolastico, il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è stato utilizzato come modello di studio, centrando l'impianto sperimentale sull'argomento della quindicesima edizione di ScienzaFirenze, Metodi e strumenti dell'indagine scientifica: "Osservare e sperimentare nello studio delle scienze".

È stata stimata la crescita e l'attività metabolica dei lieviti del ceppo *Saccharomyces cerevisiae*, nelle stesse condizioni di temperatura (30 °C), fornendo diversi substrati al fine di valutare quali fossero i terreni migliori per la crescita di questi organismi.

In particolare sono stati misurati due parametri: la crescita delle popolazioni in coltura, attraverso la misura dell'assorbanza e l'attività metabolica, attraverso la misura della variazione di pH.

Il fotometro è stato utilizzato per stimare la crescita nel tempo delle colture di lieviti attraverso la misura dell'assorbanza in tre tempi successivi: prima dell'incubazione (tempo 0) e a 24 ore e 48 ore di incubazione. Il parametro rilevato con il fotometro fornisce una stima della crescita perché la torbidità della coltura è proporzionale al numero di cellule presenti nel campione.

Contemporaneamente, poiché l'attività metabolica centrale del lievito è la fermentazione alcolica, abbiamo misurato il pH dei campioni trattati con i diversi terreni prima dell'incubazione (tempo 0) e a 24 ore e 48 ore di incubazione.

Parte teorica

Caratteristiche generali del lievito *Saccharomyces cerevisiae*

La cellula del lievito *Saccharomyces cerevisiae* (fig.1) è composta da citoplasma delimitato dalla membrana cellulare e più estremamente dalla parete cellulare. All'interno sono presenti il nucleo e tutti gli organuli tipici di una cellula eucariotica (mitocondri, reticolo endoplasmatico, apparato del Golgi, vacuoli, perossisomi). Il diametro medio della cellula è compreso tra 5 e 10 µm.

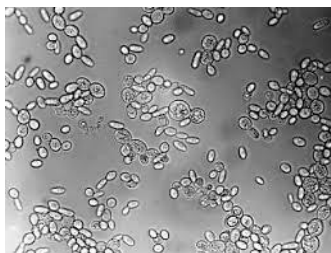


Fig.1 Lieviti del ceppo *Saccharomyces cerevisiae* al microscopio ottico

In condizioni ottimali di crescita *S. cerevisiae* raddoppia la sua massa ogni 90 minuti. Il suo sviluppo avviene per gemmazione multilaterale, nel corso della quale la cellula madre dà origine ad una gemma, la cellula figlia di dimensioni più piccole, che dopo essersi staccata continuerà il suo accrescimento. La cicatrice che si forma sulla parete della cellula madre contiene chitina e in quel punto non si formeranno più altre gemme; ogni cellula madre può formare da 20 a 30 gemme.

Alcuni ceppi di *S. cerevisiae* possono avere una morfologia della colonia diversa durante lo sviluppo, lo pseudomicelio. La formazione dello pseudomicelio avviene quando le cellule, generalmente più allungate, non si staccano dalla cellula madre formando una catena che può essere lineare o ramificata. Le colonie appaiono così sfrangiate e in mezzi liquidi formano veli estesi e spessi.

I ceppi di *S. cerevisiae* possono essere stabilmente aploidi (con 16 cromosomi) o diploidi, entrambi in grado di sporificare, quindi effettuare riproduzione sessuale [1].

Il lievito *S. cerevisiae* trova molte applicazioni in ambito industriale e biotecnologico, venendo utilizzato tradizionalmente per le fermentazioni e quindi la produzione di alcol, vino, birra e pane ma trovando impiego anche per la produzione di proteine eterologhe di origine umana (insulina, eritropoietina, interferone gamma), animale (caseina, mioglobina), virale (HIV-1 trascrittasi inversa) e di origine eucariotica varia (somatostatina, amilasi, cellulasi).

I lieviti *Saccharomyces cerevisiae* degradano il glucosio utilizzando principalmente la via della glicolisi e sono anaerobi facoltativi, sono cioè in grado di utilizzare il glucosio in presenza o in assenza di ossigeno.

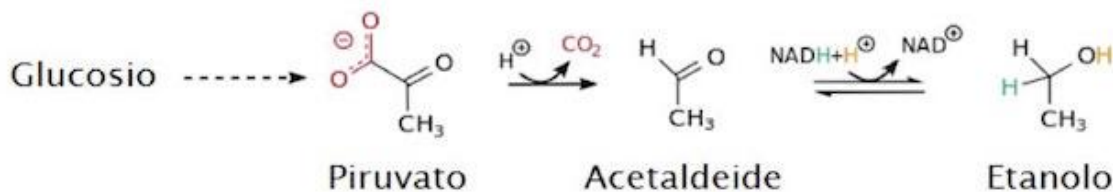
In presenza di concentrazioni di glucosio a partire dai 10 g/L, questi lieviti mostrano respirazione aerobica quantitativamente limitata, prediligendo il metabolismo fermentativo e in particolare la fermentazione alcolica. In *S. cerevisiae* infatti, gli zuccheri, come il glucosio, inibiscono gli enzimi respiratori.

La mancanza di ossigeno limita però la crescita di *S. cerevisiae* a causa della mancata produzione di ergosterolo e alcuni acidi grassi essenziali per la funzionalità delle membrane cellulari.

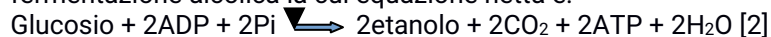
La fermentazione alcolica è la degradazione anaerobica del glucosio o di altri nutrienti per ottenere energia sotto forma di ATP. Il lievito e altri microrganismi sono in grado di svolgere fermentazione alcolica, trasformando il glucosio in etanolo.

Il glucosio viene convertito in piruvato tramite la glicolisi e il piruvato viene poi convertito in etanolo e CO₂ attraverso un processo costituito da due fasi:

nella prima fase il piruvato viene decarbossilato in una reazione irreversibile catalizzata dall'enzima piruvato decarbossilasi (presente nel lievito *S. cerevisiae* e in tutti gli altri organismi che fermentano il glucosio ad etanolo). Nella seconda fase l'acetaldeide viene ridotta ad etanolo ad opera dell'enzima alcol deidrogenasi, con l'intervento del NADH. L'etanolo e la CO₂ sono quindi i prodotti finali della



fermentazione alcolica la cui equazione netta è:



I ceppi di *S. cerevisiae* forniscono etanolo con alte rese, ma producono anche altri prodotti quali glicerolo, acidi organici, esteri, aldeidi e chetoni.

Il glicerolo può formarsi per riduzione del diidrossiacetonfosfato durante la glicolisi. Durante la fermentazione alcolica vengono prodotti inoltre molti acidi organici, tra i quali l'acido acetico.

Gli amminoacidi vengono usati durante la fermentazione per la sintesi proteica o a scopo degradativo, con formazioni di aldeidi e altri alcoli dai quali poi si possono generare esteri.

Spettrofotometria

La spettrofotometria è una tecnica analitica, qualitativa e quantitativa che permette il riconoscimento e la quantizzazione di una sostanza in base al suo spettro di assorbimento della luce.

Il tipo di analisi che verrà eseguito è di tipo quantitativo, quindi si farà uso di raggi monocromatici, costituiti da radiazioni di una sola frequenza.

Le determinazioni quantitative sono basate sul fatto che, quando una radiazione attraversa una soluzione, viene assorbita più o meno intensamente a seconda della concentrazione.

In particolare nella spettroscopia di assorbimento si utilizzano due grandezze (misurate strumentalmente): trasmittanza e assorbanza.

I rivelatori nello strumento sono in grado di misurare l'intensità del flusso luminoso all'ingresso della cella con il campione (intensità della radiazione incidente, I₀) e l'intensità del flusso luminoso all'uscita della cella con il campione (intensità della radiazione trasmessa, I).

Dalla misura dei flussi I₀ e I lo strumento fornisce valori di trasmittanza ed assorbanza, che rappresentano le grandezze caratteristiche della spettroscopia di assorbimento.

La trasmittanza è il rapporto tra l'intensità del raggio uscente e quella del raggio raggio entrante,

l'assorbanza, detta anche densità ottica (OD) o estinzione è $-\log T$ ed è utilizzata nelle stime quantitative perché direttamente proporzionale alla concentrazione della soluzione.

L'analisi spettrofotometrica è applicabile, con determinati accorgimenti a tutte le sostanze; se la sostanza in esame è fotoassorbente alla lunghezza d'onda scelta è possibile una misura diretta, se non lo è allora si può farla partecipare ad una reazione chimica nella quale la sostanza stessa o un suo derivato reagisce con un colorante dando un prodotto finale colorato.

La spettrofotometria nel visibile può essere applicata alla stima del numero di cellule in una coltura tramite la misurazione della densità ottica a 600 μm . Il parametro rilevato indica la torbidità della coltura ed è proporzionale al numero di cellule presenti. La conta effettuata attraverso questo strumento fornisce una stima della crescita, ma non della vitalità delle cellule nel campione.

Parte sperimentale

Materiale utilizzato

Vetreria

- matracci da 50 mL e 100 mL
- becher da 50 mL e 100 mL
- pipette Pasteur
- pipette graduate
- Falcon da 15 mL
- vetrino d'orologio
- cuvette in plastica

Strumenti

- bilancia analitica
- vortex
- Incubatore Isco Micra 9
- Blocco Fotometro We Lab
- pHmetro Eutech Instruments

Reagenti

- Glucosio
- Fruttosio
- Saccarosio
- Peptone
- Terreno completo: Nutrient Broth ("Lab-Lemco" Powder 1.0; Yeast extract 2.0; Peptone 5.0; Sodium Chloride 5.0)
- Cloruro di Sodio
- H₂O distillata
- Lieviti ceppo *Saccharomyces Cerevisiae*.

Metodi

Preparazione dei terreni di coltura

Sono stati preparati otto diversi terreni di coltura per l'incubazione dei lieviti *Saccharomyces Cerevisiae*.

I terreni sono stati scelti utilizzando i nutrienti utili al metabolismo di *S. cerevisiae*, sia singolarmente (terreni n.1, n.2, n.3, n.4) che combinati (terreni n.5 e n.6). Inoltre è stato preparato un terreno sfavorevole alla crescita dei lieviti (terreno n.7) e un terreno di controllo (terreno n.8).

Le soluzioni sono state preparate a queste concentrazioni:

1. Glucosio 20 g/L in H₂O distillata
2. Fruttosio 20 g/L in H₂O distillata
3. Saccarosio 20 g/L in H₂O distillata
4. Peptone 20 g/L in H₂O distillata
5. Completo 13 g/L in H₂O distillata

6. Completo (13 g/L) + Glucosio (20 g/L) in H₂O distillata
 7. Completo (13 g/L) + Glucosio (20 g/L) + NaCl a saturazione in H₂O distillata
 8. H₂O distillata come controllo
- Tutte le soluzioni sono state preparate con H₂O distillata e portate a 30°C.

Preparazione delle colture di lieviti

E' stata preparata una madre di lievito *Saccharomyces cerevisiae* pesando 1 g di lievito compatto (ceppo *Saccharomyces cerevisiae*) e disciogliendolo in 10 ml di H₂O distillata a 30°C.

Sono state preparate due diverse soluzioni seriali, a partire dalla madre, per ciascun terreno. La prima soluzione è stata preparata con fattore di diluizione pari a 10 (10X) ed è stata ottenuta prelevando 1 ml dalla soluzione di partenza e aggiungendo 9 ml di terreno di coltura (30°C). La seconda soluzione è stata preparata con fattore di diluizione pari a 100 (100X) ed è stata ottenuta prelevando 1 ml dalla soluzione diluita 10 volte e aggiungendo 9 ml di terreno di coltura (30°C).

Sono state preparate in questo modo due diverse diluizioni della madre per ogni terreno preparato (fig. 2) [3] [4].

Prima di incubare le colture di *S. cerevisiae*, sono stati misurati i due parametri da seguire nel tempo, il pH e il valore di assorbanza, per avere i dati al tempo 0.

Dopo avere effettuato le misure, le colture di lieviti in terreno liquido sono state incubate a 30°C (fig. 3).



Fig.2 Colture di *S.cerevisiae*



Fig.3 Incubazione delle colture di *S. cerevisiae* a 30°C

Misure di pH

Per ogni coltura di lieviti alle due diverse diluizioni e trattata con i diversi terreni, è stato misurato il valore di pH ai diversi tempi di incubazione, tempo 0, 24 ore e 48 ore, utilizzando un pHmetro digitale precalibrato (fig.4).

Ogni valore di pH è stato ottenuto dalla media di 2 misure.



Fig.4 Misura del pH delle colture di *S. cerevisiae*

Misure di assorbanza

Le misure di assorbanza di ogni coltura di lieviti a diversa concentrazione trattata con i diversi terreni, sono state registrate utilizzando il modulo Fotometro del pacchetto WeLab (fig. 5) [5].

Le misure di assorbanza delle colture di lieviti incubate nei diversi terreni liquidi descritti in precedenza, sono state effettuate a intervalli di tempo di 0, 24 ore e 48 ore.

Per effettuare le misure si sono trasferiti 2 mL di coltura in una cuvetta pulita e dopo aver impostato lo strumento ad una lunghezza d'onda di 600 μm , si sono effettuate le misure di assorbanza di tutti i campioni azzerando lo strumento con il rispettivo terreno (bianco).

La misura di assorbanza registrata, indica la torbidità della coltura ed è proporzionale al numero di cellule presenti: maggiore è la densità ottica rilevata, maggiore è il numero di cellule in soluzione.

Il dato sperimentale indica che un OD_{600} , cioè una densità ottica misurata alla lunghezza d'onda di 600 μm pari a 0,1, è equivalente a circa 1×10^6 cellule/mL [3] [4].

Attraverso le misure di assorbanza dei campioni è quindi possibile stimare la crescita delle popolazioni di lieviti.

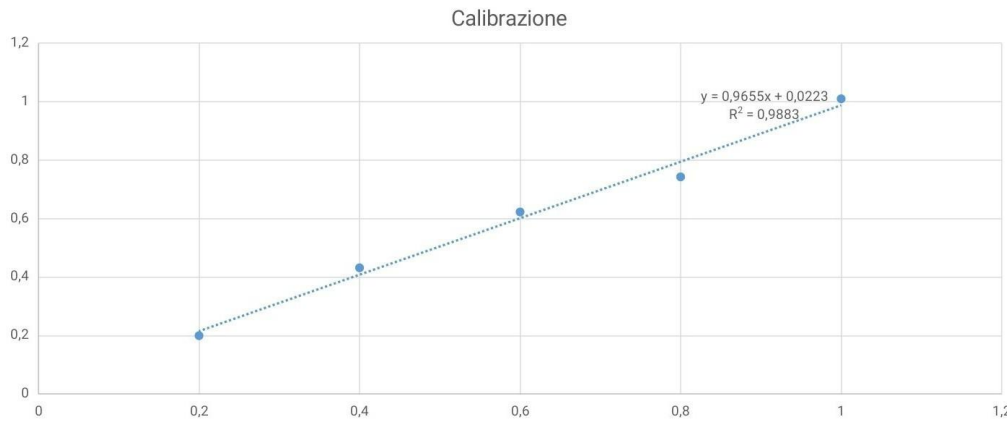
Per limitare il margine di errore sono state preparate più repliche, i dati riportati nei grafici delle figure 6 e 7 sono il risultato della media di più valori di assorbanza registrati su colture effettuate in doppio agli stessi tempi di incubazione; alle medie è stata applicata la deviazione standard.



Fig.5 Modulo Fotometro WeLab

Verifica della proporzionalità diretta tra la concentrazione di lievito e la densità ottica

Per verificare la linearità della relazione tra concentrazione di lievito e densità ottica sono state preparate diluizioni seriali a partire da una madre di lievito sciolto in 10 ml di H_2O distillata. I valori di assorbanza delle diverse diluizioni preparate, sono stati registrati a 600 μm con un volume di 2 mL in cuvette di plastica dopo aver azzerato lo strumento con una cuvetta con sola acqua distillata e messe in relazione al fattore di diluizione, come riportato nel grafico seguente.



Analisi dei dati

I dati di assorbanza presentati nei grafici delle figure 6 e 7, sono valori medi derivati da misurazioni in doppio e in triplo effettuate su due campioni per ogni diluizione, trattati ciascuno con i terreni preparati e incubati in momenti diversi, ma mantenendo gli stessi tempi di incubazione (0, 24 e 48 ore). Ogni valore medio ha la propria deviazione standard che fornisce indicazioni sulla significatività del dato.

I dati relativi al pH presentati nei grafici delle figure 8 e 9, sono il risultato della media di due valori ottenuti sugli stessi campioni sottoposti alle misure di assorbanza.

I dati sono stati elaborati con il software GraphPad [6].

Risultati e discussione

Le figure 6 e 7 riportano i valori di assorbanza delle colture di lieviti *Saccharomyces cerevisiae* incubate con diversi substrati, registrati al tempo 0 e dopo 24 ore e 48 ore di incubazione a 30°C.

La figura 6 riporta i risultati delle letture di assorbanza dei campioni diluiti 10 volte (10X) e la figura 7 riporta i risultati delle letture di assorbanza dei campioni diluiti 100 volte (100X).

In tabella 1 sono riportati gli aumenti percentuali di assorbanza, calcolati sui valori medi comprensivi delle deviazioni standard riportati nei grafici delle figure 6 e 7, relativi alle popolazioni di *S.cerevisiae* dopo 24 ore di incubazione a 30°C.

L'analisi dei risultati mostra con evidenza l'aumento dei valori di assorbanza misurati nei campioni delle popolazioni coltivate in terreni preparati con monosaccaridi (Glucosio 20 g/L e Fruttosio 20 g/L) e il disaccaride Saccarosio 20 g/L per entrambe le popolazioni di lieviti, diluiti 10X e 100X. Si evidenzia un aumento di assorbanza anche per le popolazioni coltivate in terreno Completo 13 g/L addizionato con Glucosio 20 g/L.

Il terreno Completo 13 g/L addizionato con Glucosio 20 g/L in soluzione con NaCl a saturazione, mostra invece valori medi di assorbanza senza aumenti o diminuzioni significative dopo 24 e 48 ore, indici della mancata crescita delle popolazioni trattate con questo terreno.

Non si registra un aumento significativo di assorbanza nei campioni diluiti 10X trattati con terreno senza nutrienti (solo acqua distillata), mentre è stato rilevato un aumento dell'assorbanza seppure percentualmente molto basso nei campioni diluiti 100X.

Le popolazioni coltivate in terreno Completo 13 g/L e in terreno preparato con solo Peptone 20 g/L mostrano un comportamento diverso a seconda della diluizione: si assiste ad un aumento significativo di assorbanza per le popolazioni diluite 100X, mentre i valori medi di assorbanza delle popolazioni 10X si mantengono significativamente costanti, dopo 24 e 48 ore.

I valori di assorbanza misurati a 48 ore di incubazione rimangono costanti o calano significativamente nei campioni analizzati, questo è indice del blocco della crescita cellulare. Poiché la misura di assorbanza non rappresenta un indice di vitalità, ma fornisce una stima del numero di cellule totali, la diminuzione significativa di assorbanza rilevata in alcuni campioni potrebbe essere causata dal disgregamento della struttura cellulare.

In generale si registra un maggiore incremento di assorbanza, correlato ad una maggiore crescita, nei campioni diluiti 100X rispetto ai campioni più concentrati.

Questo comportamento potrebbe essere determinato dalla maggiore disponibilità di substrati: i terreni utilizzati per entrambe le popolazioni (diluite 10X e 100X) infatti, sono alle stesse concentrazioni di

nutrienti.

Contemporaneamente alle misure di assorbanza, abbiamo misurato il pH dei campioni.

La figura 8 mostra i valori medi di pH registrati al tempo 0, dopo 24 ore e 48 ore di incubazione a 30°C delle colture di lieviti diluiti 10X e trattati con i diversi terreni.

La figura 9 mostra i valori medi di pH registrati al tempo 0, dopo 24 ore e 48 ore di incubazione 30°C delle colture di lieviti diluiti 100X e trattati con i diversi terreni.

E' interessante notare la diminuzione significativa del pH nelle popolazioni di lieviti coltivate in terreni ricchi di carboidrati: il pH vira verso valori acidi in presenza di Glucosio 20 g/L, Fruttosio 20 g/L, Saccarosio 20 g/L e Completo 13 g/L addizionato con Glucosio 20 g/L.

Non si assiste ad una diminuzione significativa del pH nelle popolazioni coltivate in terreni senza fonti di carboidrati e nelle popolazioni trattate con il terreno sfavorevole (Completo 13 g/L addizionato con Glucosio 20 g/L, in soluzione con NaCl a saturazione) o la coltura controllo con sola acqua.

Fig.6

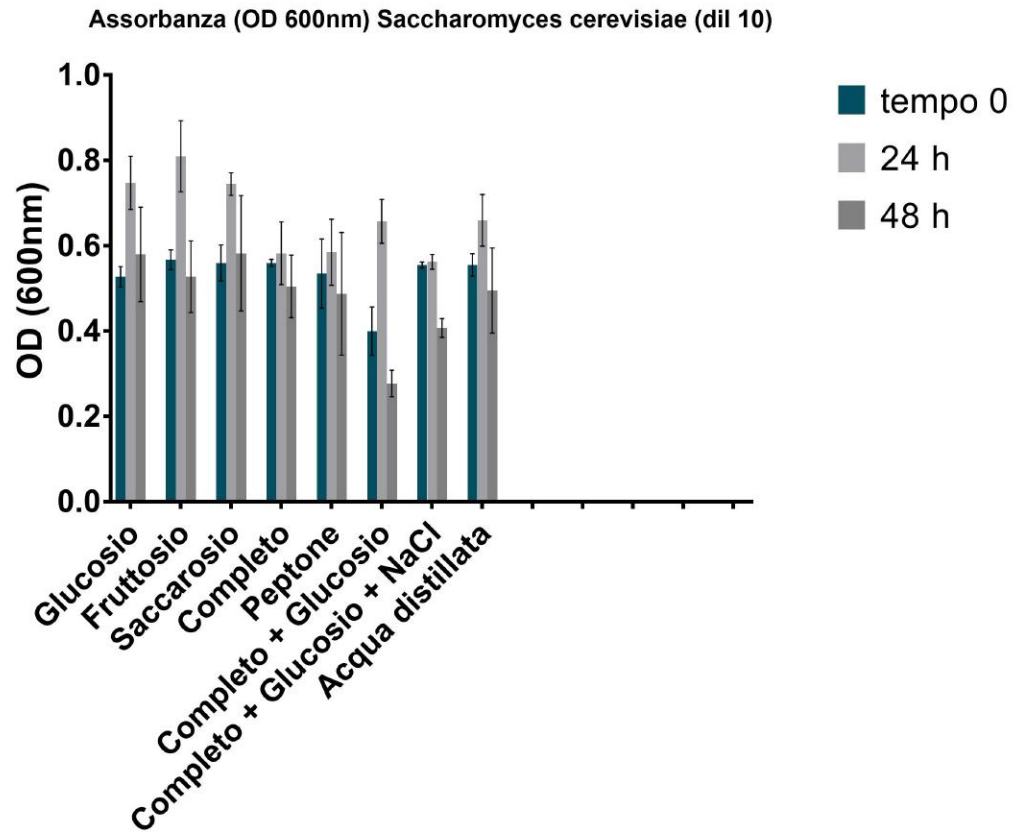
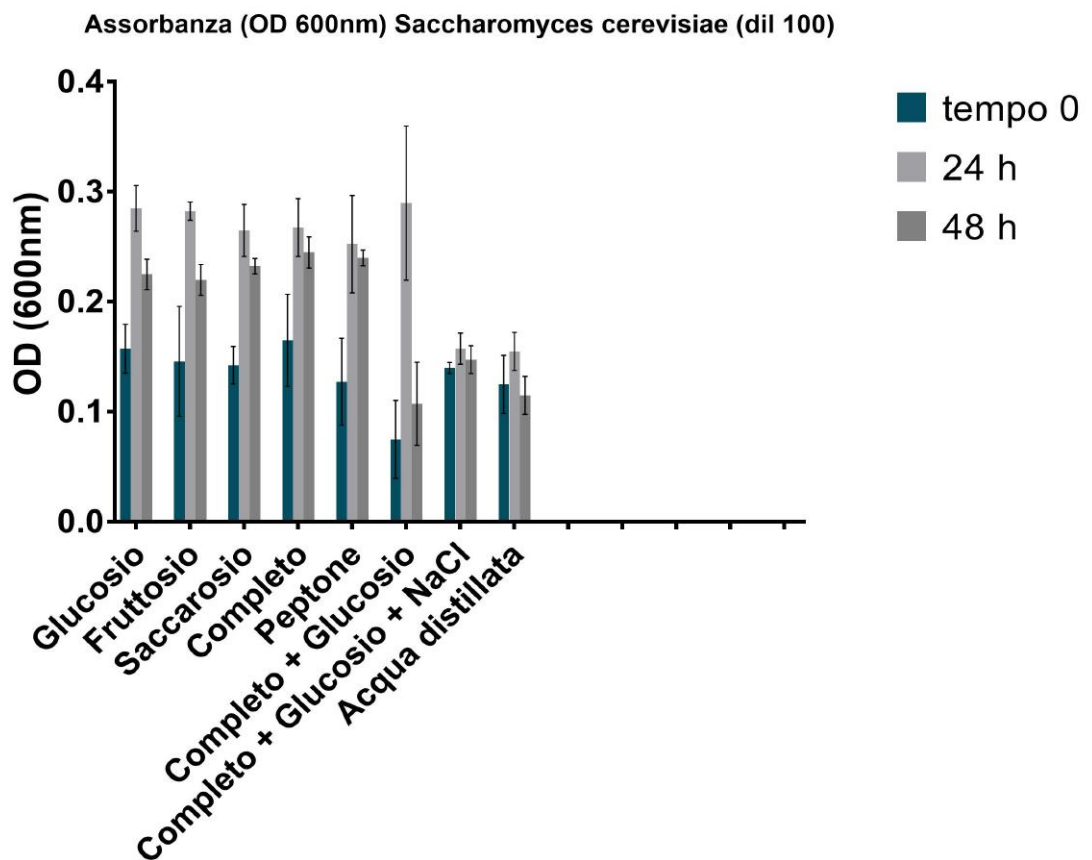


Fig.7



	S. cerevisiae (dil 10)	S. cerevisiae (dil100)
Glucosio	+ 25,4%	+ 44,4%
Fruttosio	+ 23,7%	+ 35%
Saccarosio	+ 18,3%	+ 56,3%
Completo	0%	+ 14,3%
Peptone	0%	+ 23,5%
Completo + Glucosio	+ 32,6%	+ 75%
Completo + Glucosio + NaCl	0%	0%
Acqua distillata	+ 3,4%	0%

Tabella 1.

Aumento percentuale di assorbanza delle popolazioni di S.cerevisiae diluite 10X e 100X, dopo 24 ore di incubazione a 30°C

Fig.8

Variatione di pH *Saccharomyces cerevisiae* (dil 10)

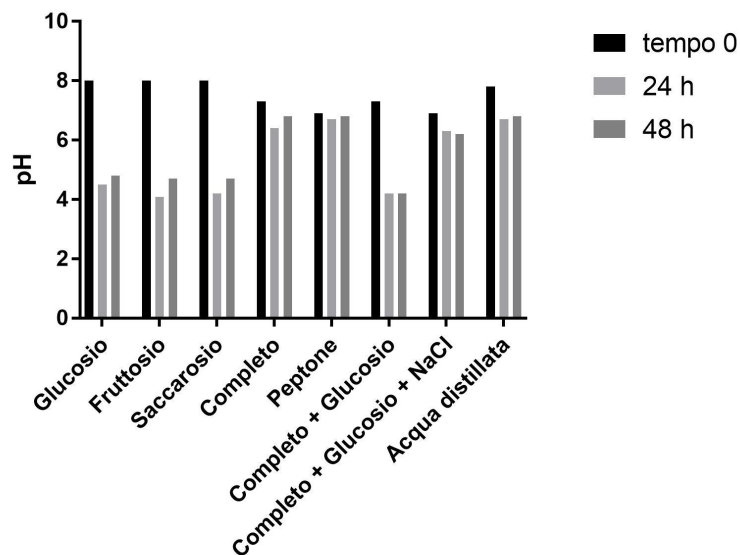
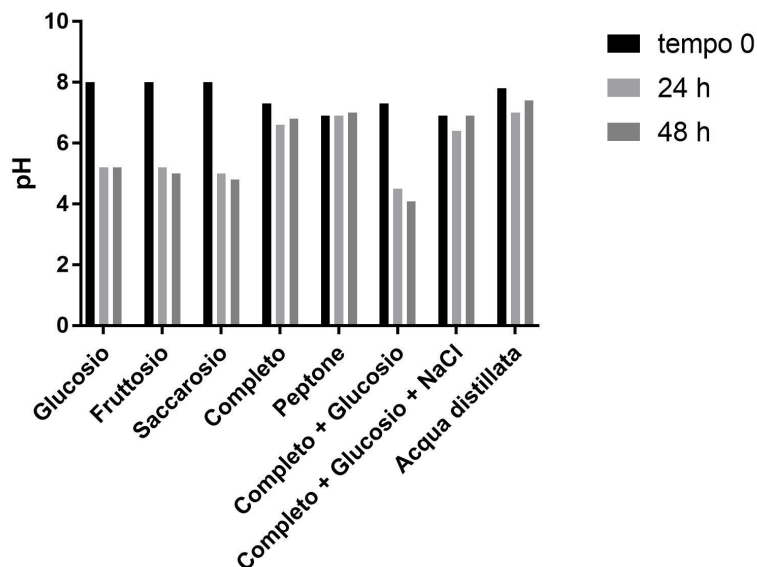


Fig.9

Variatione di pH *Saccharomyces cerevisiae* (dil 100)



Conclusioni

Nel complesso, analizzando i dati di assorbanza ottenuti, si osserva che il terreno migliore per la crescita dei lieviti *S. cerevisiae* è il Completo 13 g/L addizionato con Glucosio 20 g/L e dove i terreni sono costituiti da un solo nutriente (monosaccaridico, disaccaridico, amminoacidico e lipidico) sono risultati più efficaci, quelli che hanno fornito carboidrati come substrato.

Come già accennato nella discussione dei risultati, si è osservato un aumento percentuale di assorbanza maggiore nei campioni di lieviti più diluiti, attribuibile alla maggiore disponibilità dei substrati nel terreno.

Nella progettazione dell'esperimento era stata ipotizzata inoltre una crescita delle popolazioni di lieviti anche in terreni senza carboidrati, ma che fornissero substrati di natura amminoacidica e lipidica (il terreno Completo 13 g/L e il Peptone 20 g/L). Questa ipotesi è stata confermata dall'aumento significativo di assorbanza delle popolazioni di lieviti diluite 100X, ma non così evidente nelle popolazioni diluite 10X, nonostante le concentrazioni dei substrati non fossero limitanti.

Questo comportamento potrebbe essere oggetto di ulteriori indagini, procedendo per esempio ad una titolazione di questi substrati correlata alla crescita delle popolazioni.

Analizzando la variazione di pH in funzione della crescita delle popolazioni, possiamo notare che dove non si è verificato un aumento significativo dell'assorbanza, quindi presumibilmente i lieviti non sono cresciuti, non si è avuta neanche una variazione significativa del pH.

Questo è osservabile nei campioni trattati con terreno Completo 13 g/L addizionato con Glucosio 20 g/L in soluzione con NaCl a saturazione e nel terreno con sola acqua distillata. La mancanza di substrati ha impedito il metabolismo energetico che avrebbe dovuto sostenere la divisione cellulare.

Nelle popolazioni di lieviti cresciute in presenza di fonti diverse dai carboidrati, è stata registrata crescita cellulare, indicata dall'aumento dell'assorbanza, ma il pH è rimasto invariato. In questi casi le cellule di lievito sono probabilmente ricorse a un metabolismo diverso da quello legato alla fermentazione alcolica (respirazione aerobica), con mancata produzione di acidi organici ed etanolo in grado di abbassare significativamente il pH del mezzo.

Dove i terreni fornivano substrati utili per avviare il metabolismo fermentativo, Glucosio 20g/L, Fruttosio 20g/L, Saccarosio 20g/L e il terreno Completo 13g/L addizionato con Glucosio 20g/L, si è registrato un calo significativo del pH indice dell'avvenuta fermentazione alcolica con conseguente produzione di acidi organici in grado di abbassare il pH del terreno di coltura.

La crescita delle popolazioni di lieviti si è arrestata a 48 ore di incubazione, come indicato dai valori di assorbanza significativamente costanti o in calo. Questo può essere dovuto in parte all'esaurimento dei substrati e dove i lieviti hanno utilizzato il metabolismo fermentativo, la mancanza di ossigeno non ha permesso la produzione di lipidi utili alla formazione delle strutture membranose cellulari e la crescita è stata inibita dall'abbassamento del pH del terreno dovuto ai prodotti della fermentazione alcolica.

Bibliografia - Sitografia

- [1] www.cusmibio.unimi.it>LIEVITOfinale.pdf
- [2] Nelson D.L., Cox M.M., Principi di biochimica di Lehninger V ed. Zanichelli
- [3] Wei Xiao. "Yeast Protocols" Humana Press
- [4] <http://www.ifom.eu/it>
- [5] <https://www.we-lab.it>
- [6] www.graphpad.com