



Laboratorio di Microbiologia Industriale e Molecolare

**Caratterizzazione di cellule di lievito utilizzate in
ambito alimentare e industriale.**

Ivan Orlandi

23 Marzo 2021

Introduzione

I microrganismi, procarioti ed eucarioti unicellulari, sono la forma di vita più abbondante sulla terra e sono in grado di crescere in diverse tipologie di ambienti, anche in alcuni considerati estremi per le altre forme di vita.

Molti di questi organismi producono sostanze bioattive di interesse in vari ambiti quali, ad esempio: agroalimentare, chimico, farmaceutico e medico-diagnostico.



Da migliaia di anni il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, microrganismo eucariote unicellulare, è stato utilizzato dall'uomo per la produzione di pane, vino e birra. Esso è quindi l'organismo che per primo è stato inconsapevolmente utilizzato per una serie di "processi biotecnologici naturali" di cui oggi si conoscono i meccanismi chimici e molecolari. In questo laboratorio sarà proposta una serie di esperienze basate su metodiche di genetica, biologia molecolare e biochimica comunemente utilizzate per la caratterizzazione ed il miglioramento dei ceppi di lievito utilizzati in ambito biotecnologico.

Durante l'incontro Webex sarà presentato un percorso articolato come segue:

- allestimento di colture di lievito in diverse fonti nutrizionali;
- monitoraggio della di crescita e del consumo/ accumulo di metaboliti (es. glucosio, etanolo, acetato);
- determinazione di attività enzimatiche (es. alcol deidrogenasi ed acetaldeide deidrogenasi);
- determinazione della vitalità e saggi di sensibilità

PROTOCOLLI SPERIMENTALI

Allestimento di colture cellulari di lieviti per panificazione e birra e osservazione delle cellule al microscopio ottico

Le preparazioni commerciali di lievito per panificazione e lievito per la produzione di birra contengono cellule di lievito quiescenti, ma vitali. Se queste cellule vengono poste in un terreno ricco di nutrienti, esse recuperano la loro capacità proliferativa.

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* è un lievito che si divide per gemmazione (ed è quindi chiamato lievito gemmante). Nelle varie fasi di crescita, le cellule presentano una morfologia caratteristica, osservabile al microscopio ottico.

In questa esperienza saranno visualizzate al microscopio cellule di lievito quiescenti e in attiva proliferazione e sarà valutata la crescita cellulare in coltura.

Procedimento:

a. Allestimento di colture cellulari di lievito:

1 - preparare una sospensione di cellule partendo dal panetto di lievito per panificazione (P) commerciale e una da quello usato per la produzione di birra (B), stemperando circa 0,2 g di cellule in 2 ml di terreno di crescita YEPD (Yeast Extract, Peptone, Destrosio).

2 - a partire da queste sospensioni iniziali molto dense preparare altre 3 sospensioni cellulari attraverso 3 diluizioni consecutive di 10 volte ciascuna.

3 - valutare la concentrazione cellulare (numero di cellule/ml di terreno) delle colture cellulari più diluite mediante valutazione della densità ottica (OD 600 nm) allo spettrofotometro.

4 - a partire dalle concentrazioni cellulari stimate, diluire opportunamente le colture in modo da allestire colture cellulari alla concentrazione di 1×10^3 cell/ml in un volume finale di 10 ml in beute sterili da 100 ml. Incubare le beute in bagnetto termostato a 25°C per una notte.

5 - il giorno successivo valutare la crescita delle colture valutando la concentrazione cellulare allo spettrofotometro (OD 600 nm).

b. Osservazione delle cellule di lievito al microscopio ottico:

1 - prelevare con una micropipetta 4 μ l dalle sospensioni cellulari diluite di lievito per panificazione (P) e lievito per birra (B) preparate al punto a.2 e depositare le due gocce su un vetrino da microscopia. Coprire con un coprivetrino ciascuna goccia.

2 - allestire un secondo vetrino con 3 gocce prelevate da colture in fase esponenziale di crescita in terreno YEPD dei due ceppi P e B più un ceppo di lievito da laboratorio aploide.

Titolo vitale di lieviti per panificazione e birra e confronto tra ceppi di lievito industriali e di laboratorio

In molte applicazioni sperimentali e industriali è necessario conoscere il numero di cellule di lievito a disposizione e per questo viene determinata la loro concentrazione nella sospensione. La **concentrazione cellulare** è il numero di cellule per unità di volume (n cellule/ml) e viene determinata attraverso il conteggio del numero di cellule presenti in un volume noto. Questo conteggio non permette però di distinguere cellule vitali e non vitali.

Il conteggio delle cellule presenti in una sospensione può essere effettuato in due diverse modalità: **conta totale** o **conta vitale**. Mentre la conta totale considera tutte le cellule presenti nella coltura, la conta vitale permette di distinguere tra cellule vive e morte all'interno della coltura e consiste nel diluire la sospensione e piastrarla su terreno solido fino ad ottenere un numero contabile di colonie, dopo opportuna incubazione alla temperatura ottimale di crescita del lievito.

Il **titolo vitale** è il rapporto tra conta vitale e conta totale di una coltura o sospensione e viene valutato depositando su piastre di terreno solido ricco un numero noto di cellule (cellule totali). Dopo aver incubato viene determinato il numero di unità formanti colonia o u.f.c. (cellule vitali).

Procedimento:

- 1 – si utilizzano due sospensioni cellulari di lievito (P e B) di cui è nota la concentrazione (cellule/ml).
- 2 - effettuare opportune diluizioni seriali per ottenere una sospensione cellulare alla concentrazione di 3×10^3 cellule/ml.
- 3 - Depositare su una piastra di terreno YEPD (Yeast Extract + Peptone + Destrose) $100 \mu\text{l}$ della sospensione alla concentrazione di 3×10^3 cellule/ml in modo da piastrare 300 cellule per piastra.
- 4 - Capovolgere le piastre e incubarle a 30°C per almeno una notte.
- 5 - Contare il numero di u.f.c. e determinare il titolo vitale della coltura.

Analisi dell'acidificazione del terreno da parte del lievito *Saccharomyces cerevisiae*

Durante la crescita il lievito *S. cerevisiae* acidifica l'ambiente extracellulare e questa sua caratteristica gli consente di prevalere sui batteri che prediligono valori di pH prossimi alla neutralità limitandone fortemente la crescita.

Questo aspetto della fisiologia del lievito può essere facilmente evidenziato utilizzando un terreno solido in cui è stato sciolto insieme ai nutrienti un indicatore di pH, il blu di bromofenolo, BBF. Questa molecola a valori di pH superiori a 6 è di colore blu mentre in ambiente acido vira nettamente al giallo/arancio.

Procedimento:

- a partire da sospensioni cellulari di lievito commerciale per panificazione (P) e per la produzione di birra (B) a concentrazione nota, preparare altre 3 sospensioni cellulari attraverso 3 diluizioni consecutive di 10 volte ciascuna.
- dalle sospensioni diluite ottenute prelevare 8 microlitri con una micro pipetta e depositarle su una piastra contenente BBF. Una volta asciugate le gocce collocare la piastra in un incubatore a 30°C e lasciar crescere fino al completo sviluppo delle colonie di lievito.

Analisi del metabolismo in *Saccharomyces cerevisiae*

I lieviti sono comunemente utilizzati dall'uomo per la loro capacità di trasformare con il loro metabolismo fermentativo gli zuccheri in altri composti di nostro interesse. Tipicamente nel processo per l'ottenimento della birra si usa il lievito per ottenere etanolo dal maltosio. Con due semplici dosaggi enzimatici è possibile monitorare la conversione di glucosio in etanolo nel terreno di coltura di lievito.

Dosaggio del glucosio:

Per il dosaggio del glucosio la miscela di reazione prevede:

- Acqua deionizzata: 950µl (1050 µl per il bianco);
- Campione: 100 µl;
- Buffer pH 7,6: 50 µl;
- NADP⁺ e ATP: 50 µl;
- Enzimi esochinasi (HK) e glucosio 6P-deidrogenasi (G-6-PDH): 10 µl.

Di seguito è mostrato lo schema delle reazioni su cui si basa il dosaggio:

1. Il D-glucosio viene fosforilato dall'enzima esochinasi (HK) a glucosio-6-P con l'utilizzo di una molecola di ATP. In presenza dell'enzima glucosio-6-P deidrogenasi (G6P-DH) e di NADP⁺, il glucosio-6-P viene ossidato a gluconato-6-P con la formazione di NADPH⁺ e H⁺.



2. In presenza dell'enzima glucosio-6-P deidrogenasi (G6P-DH) e di NADP⁺, il glucosio-6-P viene ossidato a gluconato-6-P con la formazione di NADPH + H⁺.



A questo punto, misurando l'incremento di assorbanza dato dal NADH è possibile determinare la concentrazione di glucosio.

Dosaggio dell'etanolo:

Per il dosaggio dell'etanolo la miscela di reazione prevede:

- Acqua deionizzata: 950 µl (1050 µl per il bianco);
- Campione: 100 µl; • Buffer pH 9: 50 µl;
- NAD⁺: 100 µl;
- Enzima aldeide deidrogenasi (ALDH): 10 µl;
- Enzima: 10 µl.

Di seguito lo schema delle reazioni:

1. L'etanolo viene ossidato ad acetaldeide dall'enzima alcol deidrogenasi (ADH) che utilizza come cofattore ossidante il NAD⁺.



2. Poiché la reazione è all'equilibrio, occorre accoppiarne una irreversibile che prevede l'ossidazione dell'acetaldeide ad acido acetico grazie all'enzima aldeide deidrogenasi (ALDH) che utilizza come cofattore il NAD⁺



Come spiegato in precedenza per il glucosio, a questo punto, misurando l'incremento di assorbanza a 340 nm dato dal NADH è possibile risalire alla concentrazione dell'etanolo.