

TEMA 1: BOLLICINE

Hai mai fatto il pane in casa? Si scalda un po' l'acqua per sciogliere *lievito* e zucchero, si amalgama con la farina e si lascia riposare per un po'. Dopo 15 – 20 minuti si lavora la pasta aggiungendo sale, olio e farina quanto basta: come per incanto l'impasto inizia a *lievitare* e il processo continua per ore. Quando la pasta è pronta, si cuoce in un forno preriscaldato.

Il nome scientifico del *lievito* utilizzato per fare pane, vino e birra è *Saccharomyces cerevisiae*.



S. cerevisiae appartiene al regno dei funghi ed è un organismo unicellulare: osservare le sue cellule è relativamente facile, così come studiare la funzione delle sue proteine, molte delle quali sono attive come enzimi. In questa prova cercherai di capire cosa succede quando il lievito ingerisce gli zuccheri che forniscono l'energia necessaria alla sua crescita. Buon lavoro!

TROVI SUL BANCO DI LAVORO

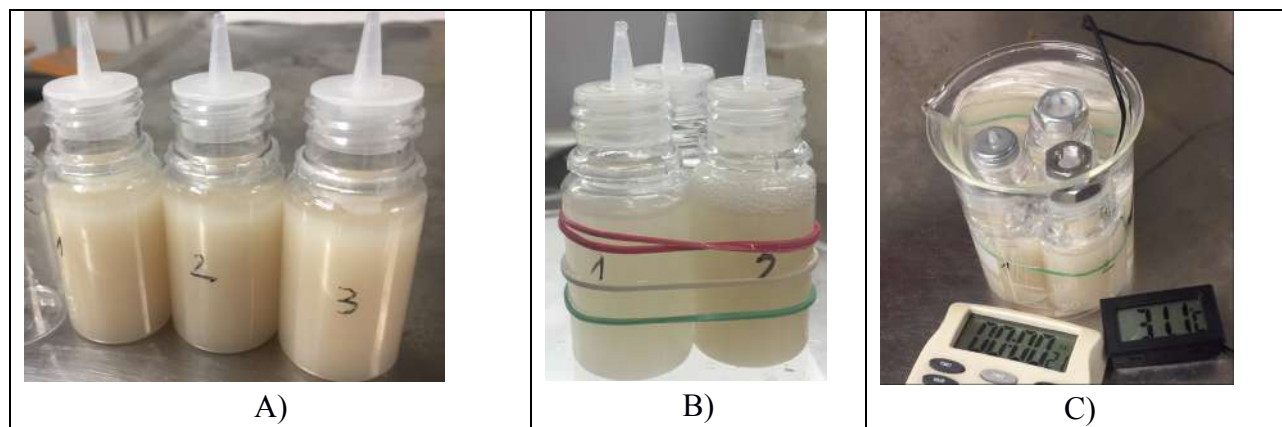
Materiali e reagenti

- | | |
|---|--|
| ✓ Lievito secco in busta (10 grammi) | ✓ Dadi, elastici |
| ✓ Soluzione di saccarosio al 5% (350 mL) | ✓ Pipette da 25 o 10 mL, pipettatore |
| ✓ Acqua di calce – $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (25 mL) | ✓ 1 Pipetta da 2 mL |
| ✓ Colorante vitale (blu di metilene, trypan blue) | ✓ 2 Becher/vasetto in vetro da 250 mL |
| ✓ Imbutino | ✓ Vetrini da microscopia, vetrini coprioggetto |
| ✓ 6 Tubi Falcon 50 mL, portaprovette | ✓ Cronometro/orologio |
| ✓ 2 Tubi universali 25 mL | ✓ Termometro |
| ✓ 5 Bottigliette da 30 mL | ✓ Matita, righello |
| ✓ 5 Pipette contagocce | ✓ Pennarello indelebile |

A DISPOSIZIONE NEL LABORATORIO

- ✓ Bilancia, rotolo di alluminio, spatoline
- ✓ Microscopio ottico (uno ogni 2 – 3 gruppi), stuzzicadenti
- ✓ Contenitore con zucchero (saccarosio, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)
- ✓ Fonte di acqua tiepida (28 – 32°C)
- ✓ Thermos con acqua quasi bollente (80 – 90°C)
- ✓ Parafilm, forbice
- ✓ Acqua deionizzata
- ✓ Rotolo di carta assorbente
- ✓ Guanti protettivi in lattice o nitrile

Figura 1. L'attività di un preparato di lievito si può misurare immergendo in acqua le bottigliette contenenti le cellule in una soluzione di zucchero e poi misurando il numero di bolle sviluppate.



1A Quanto è attivo il tuo lievito? [14 punti]

Il lievito si acquista al supermercato in bustine con le cellule disidratate. Per risvegliarle, vengono immerse in acqua e zucchero: le cellule riacquistano la loro vitalità e iniziano a fermentare formando bolle di gas. In questa sezione devi determinare qual è la concentrazione di lievito ideale per i tuoi esperimenti: se ci sono poche cellule vive diventa noioso contare le bolle, se invece l'attività è troppo alta si forma così tanta schiuma che fuoriesce dalla bottiglia.

Operazioni preliminari

Numera sei tubi Falcon da 0 a 5 e cinque bottigliette da 1 a 5.

Aggiungi circa 25 mL di saccarosio 5% in ogni tubo Falcon: aiuta a sciogliere il lievito.

Pesa la quantità di lievito secco indicata in tabella:

Campioni da preparare							
0	1	2	3	4	5	Quantità	Ingredienti
0,0	0,25	0,5	0,75	1,0	1,25	g	Lievito
50	50	50	50	50	50	mL	Saccarosio 5%
0,0	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%	2,5%	%	% Lievito

(usa un foglio di alluminio e trasferisci il lievito nella Falcon servendoti dell'imbutino)

Con la soluzione di saccarosio 5%, riempi un tubo Falcon alla volta fino alla tacca di 50 mL; chiudi il tappo e mescola le cellule agitando con energia. Devi sciogliere tutto il lievito secco, facendo scomparire il deposito di cellule presente sul fondo del tubo.

Il tubo n.0 è un controllo per dimostrare che la fermentazione non avviene se il lievito è assente: chiudi il tappo e verifica che in effetti non si formano mai bolle di gas.

Trasferisci la soluzione di lieviti e zucchero nelle bottigliette da 1 a 5 in questo modo:

- con la pipetta preleva 25 mL dal tubo Falcon n. 1 e versali nella relativa bottiglietta; metti il beccuccio e mescola bene chiudendo l'apertura con un dito
- ripeti l'operazione precedente con gli altri campioni; alla fine verifica che il livello di lieviti e zucchero sia lo stesso in tutte le bottigliette (Figura 1A).

1A.1 Attività del lievito alla temperatura ideale (28° – 32°C)

Le bottigliette n. 1-2-3 hanno la concentrazione più bassa di cellule, che varia tra 0,5 e 1,5 %; uniscile con degli elastici, come mostrato in Figura 1B.

La temperatura ideale di crescita per il lievito è intorno a 28° – 32°C: inserisci le 3 bottigliette in un becher e aggiungi acqua tiepida fino alla tacca dei 25 mL, lasciando libero il beccuccio.

Attendi circa 5 – 10 minuti: si capisce se il lievito fermenta perché si formano bolle.

Inserisci un peso (es. dado) sul beccuccio di ogni bottiglia per evitare che galleggi, poi riempi il becher di acqua tiepida finché le bottigliette sono completamente immerse (Figura 1C).

Qualche millimetro sopra il beccuccio è sufficiente

La temperatura iniziale del bagnetto deve essere compresa tra 28 e 32 °C.

Fai partire il cronometro e conta quante bolle si sviluppano in 30 secondi:

esegui almeno 3 conte per ogni campione e riporta i risultati nel Foglio risposte [Tabella 1A.1].

Verifica la temperatura del bagnetto alla fine dell'esperimento.

1A.2 Attività del lievito a temperatura ambiente (18° – 22°C)

Come varia l'attività del lievito se abbassiamo la temperatura di reazione? Prendi la bottiglietta n. 3 e legala con gli elastici ai campioni n. 4 e 5, che hanno la concentrazione più alta di cellule.

Ripeti le operazioni descritte in precedenza al punto 1A.1, ma questa volta riempi subito tutto il becher con acqua a temperatura ambiente, compresa tra 18° e 22°C.

Annota sul Foglio risposte la temperatura iniziale del bagnetto [Tabella 1A.2].

Fai partire il cronometro e conta quante bolle si sviluppano in 30 secondi:

esegui almeno 3 conte per ogni campione.

Verifica la temperatura del bagnetto alla fine dell'esperimento.

Confronta l'attività del campione n.3 alla temperatura ideale (Tabella 1A.1) con quella misurata a temperatura ambiente (Tabella 1A.2): il numero di bolle aumenta o diminuisce? Riporta le tue osservazioni nel Foglio risposte (1A.3).

1A.3 Verifica dei risultati con il campione n. 4

Cosa succede se alziamo di nuovo la temperatura di reazione?

Prendi la bottiglietta n. 4 e legala con gli elastici ai campioni n. 1 e 2, che hanno la concentrazione più bassa di cellule. Metti le 3 bottigliette nel becher e riempi completamente di acqua tiepida.

Fai partire il cronometro e conta quante bolle si sviluppano in 30 secondi.

Riporta il numero di bolle nella Tabella 1A.4 del foglio risposte.



Con il bagnetto a una certa temperatura, il numero di bolle contate in 30 secondi è costante, oppure tende ad aumentare nel tempo? Riporta le tue osservazioni nel Foglio risposte (1A.5).



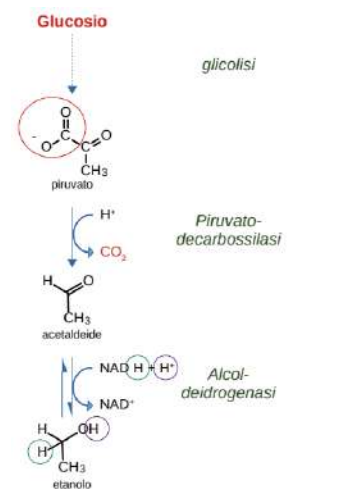
1B. Fermentazione alcolica [12 punti]

Lo zucchero da cucina, o saccarosio, è composto da due zuccheri più semplici: glucosio e fruttosio. Quando i lieviti “mangiano” lo zucchero, si attivano i suoi catalizzatori biologici (enzimi) e aumenta la velocità delle reazioni che rompono i legami chimici del saccarosio.

Ci sono più fasi:

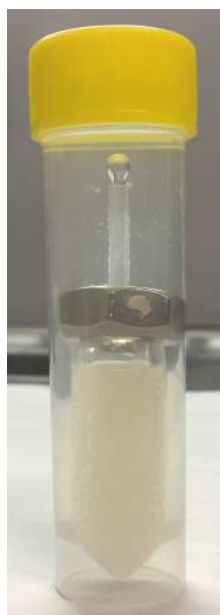
- 1) inizialmente l'enzima invertasi divide il saccarosio nei due zuccheri più semplici che lo formano: glucosio e fruttosio;
- 2) durante la **glicolisi** ogni molecola di glucosio [6 atomi di carbonio] produce due molecole di piruvato [3 atomi di carbonio];
- 3) la **fermentazione alcolica** (figura a lato) forma molecole ancora più piccole [2 atomi di carbonio] e infine l'etanolo. In questo processo si libera CO_2 (diossido di carbonio o anidride carbonica) che crea le bolle di gas.

La parola enzima significa letteralmente all'interno del lievito (in greco ἐν ζύμῳ - en zýmō) perché questi catalizzatori sono stati scoperti proprio studiando le cellule di lievito.



Schema della fermentazione alcolica
(Grazie a Paolo Centomo)

Prima di eseguire l'esperimento con l'acqua di calce della prossima pagina, ti consigliamo di fare una prova immergendo in acqua la pipetta contagocce con i lieviti. Per aspirare più facilmente la soluzione di lievito e zucchero, puoi riunire il liquido rimasto nei tubi Falcon da 50 mL; usa due campioni che creano numerose bolle a temperatura ambiente, ma non formano troppa schiuma (es. 3-4 o 4-5).



Procedura di prova

- 1) Elimina più aria possibile dal bulbo della pipetta contagocce.

Aspira circa 3 mL di sospensione di lievito e zucchero
devi lasciare una piccola camera d'aria, come in figura

- 2) Inverti la pipetta e lascia depositare i lieviti sul fondo del bulbo.
Verifica che non sia rimasto liquido nella parte stretta del tubo
elimina eventuali gocce di liquido premendo leggermente il bulbo

- 3) Aggiungi un peso (es. dado) e trasferisci il contagocce nel tubo di plastica.
Riempi il tubo con acqua a temperatura ambiente e chiudi con il tappo.

Osserva le bolle sviluppate e il loro effetto sulla soluzione.

Rispetto al sistema precedente è più facile osservare cambiamenti nella soluzione in cui si scioglie la CO_2 perché il volume è inferiore.

1B.1 Effetto della CO₂ sull'acqua di calce

L'acqua di calce è una soluzione satura di idrossido di calcio Ca(OH)₂. Avendo un pH alcalino, si usa in farmacia come antiacido. La soluzione filtrata è limpida, ma in contatto con l'anidride carbonica diventa torbida perché si forma carbonato di calcio (CaCO₃), che precipita come sale insolubile biancastro.



Attenzione! L'acqua di calce non è una sostanza pericolosa, ma può dare irritazione alla pelle e agli occhi. Indossa i guanti di protezione quando la maneggi.

Scopo dell'esperimento: dimostrare che il gas liberato durante la fermentazione è veramente CO₂. Usa il contagocce con i lieviti dell'esperimento precedente e lavora come nella procedura di prova. Trasferisci il contagocce nel tubo di plastica e riempi con acqua di calce a temperatura ambiente. Chiudi con il tappo e prendi nota dell'ora in cui hai iniziato l'esperimento [Foglio risposte, **1B.1**]. Quando la soluzione è diventata torbida, scrivi sul Foglio risposte a che ora hai finito l'esperimento.

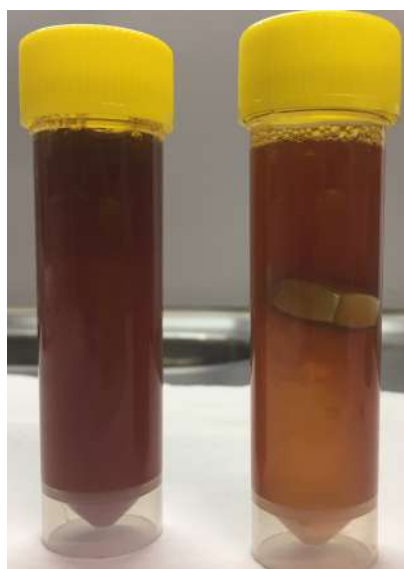


Chiama il docente che assiste alla prova e mostragli il tubo con l'acqua di calce torbida: certificherà che il tuo esperimento è riuscito bene [Foglio risposte, **1B.1**].



Rispondi sul Foglio risposte alle domande **1B.1.1** (scissione del saccarosio) e **1B.1.2**.

1B.2 Effetto della CO₂ sul pH



Abbiamo fatto un esperimento simile al precedente:

- il tubo a sinistra è stato riempito con tè
- il tubo a destra contiene il contagocce con la soluzione di lievito e zucchero, immerso nella stessa bevanda.

I lieviti fermentando producono CO₂, che si scioglie nel tè. Come puoi notare, dopo qualche ora il tè cambia aspetto diventando di colore più chiaro.

Saprai che il tè schiarisce anche quando aggiungiamo succo di limone: ciò accade perché la soluzione è diventata **più acida**. Le sostanze presenti nel tè, infatti, sono sensibili al pH e in soluzione acida assumono un colore più chiaro.

Questo esperimento dimostra in definitiva che la fermentazione produce CO₂, che sciolta in acqua rende più acida la soluzione.



Scrivi la reazione chimica della CO₂ con l'acqua e spiega cosa causa l'osservata acidificazione [Foglio risposte, **1B.2**].



Suggerisci altri modi per dimostrare che la fermentazione produce CO₂ [Foglio risposte, **1B.3**].

1C Sopravvivenza cellulare [8 punti]

Le cellule di *S. cerevisiae* hanno forma circolare-ellissoidale e un diametro di circa 5-10 micrometri. *S. cerevisiae* si moltiplica con un processo di gemmazione: quando la cellula madre è matura, inizia a produrre una piccola “gemma” che cresce un po’ alla volta fino a separarsi dal genitore (freccia).

Un colorante vitale (es. blu di metilene) entra per diffusione in tutte le cellule: quelle vive lo espellono subito, quelle morte non ci riescono e rimangono colorate di blu.



Per osservare bene le cellule al microscopio è necessario prima diluire la coltura di lievito! Con una pipetta contagocce aspira un po’ di coltura dal Tubo Falcon n.1 (lievito meno concentrato).

Deponi una decina di gocce in un Tubo Falcon da 50 mL pulito.

Riempi il tubo con acqua distillata fino alla tacca dei 50 mL.

Chiudi con il tappo e mescola bene il tubo per inversione.

Suggerimento: deponi sul vetrino una goccia di coltura diluita e osserva le cellule al microscopio: se sono troppo vicine o troppo lontane ripeti la diluizione finché ottieni una concentrazione ottimale. Quando hai trovato la giusta concentrazione di cellule potresti iniziare la parte 1D, che all’inizio ha dei tempi morti (operazioni preliminari). A quel punto prosegui con la colorazione.

1C.1 Colorazione delle cellule

Con il pennarello numera due provette contagocce.

Aspira lo stesso volume di coltura diluita in ciascuna provetta (circa 0,3 mL, foto a lato).

In un bicchiere resistente al calore miscela l’acqua calda del thermos (attento a non scottarti!) e acqua a temperatura ambiente, per creare un bagnetto con temperatura superiore a 50°C



- La provetta n.1 è un controllo, lasciato a temperatura ambiente
 - La provetta n.2 è immersa per 10 minuti nel bagnetto a > 50°C.
- Togli la provetta dal bagnetto e aspetta che le cellule si raffreddino un po’.

- Trasferisci una goccia dalla provetta n.1 sul vetrino portaoggetti.
- Aggiungi una goccia di colorante vitale (blu di metilene), mescola con lo stuzzicadenti e copri il vetrino con il coprioggetto senza fare bolle d’aria.

Ripeti i due punti precedenti con la provetta n. 2.

Aspetta 10 minuti: ci vuole tempo perché il colorante penetri nelle cellule.

Osserva i preparati al microscopio.



Determina la percentuale di sopravvivenza cellulare nei due campioni [Foglio risposte, 1C.1].



Esegui uno schizzo il più possibile accurato di una cellula di lievito in divisione (madre e figlia) [Foglio risposte, 1C.2].

1D Quantità di substrato [13 punti]

In questa sezione verificherai se, mantenendo costante la quantità di lievito, l'attività delle cellule diminuisce quando “mangiano” meno zucchero. Devi riciclare gli stessi materiali della sezione 1A, perciò svuota nel lavandino il contenuto delle bottigliette e dei tubi Falcon che non ti servono più.

Operazioni preliminari

Sciogli 1,5 grammi di lievito secco in 100 mL di acqua tiepida (becher). Devi sciogliere tutto il lievito secco, facendo scomparire il deposito di cellule presente sul fondo del recipiente.

Aspetta almeno 10 minuti perché le cellule acquistino vitalità.

Finché aspetti puoi continuare l'attività 1C al microscopio.

1C.1 Misura dell'attività contando il numero di bolle

Questo esperimento è simile all'attività 1A; usa le tre bottigliette numerate da 1 a 3.

Pesa la quantità di saccarosio indicata in tabella:

Campioni da preparare				
1	2	3	Quantità	Ingredienti
0,25	0,75	1,25	g	Saccarosio
25	25	25	mL	Lievito
1,0%	3,0%	5,0%	%	% Saccarosio

(usa un foglio di alluminio e trasferisci il lievito nella bottiglietta servendoti dell'imbutino)

Con la pipetta trasferisci 25 mL di lieviti in ciascuna bottiglietta; metti il beccuccio e mescola bene chiudendo l'apertura con un dito. Verifica che il livello dei lieviti sia lo stesso nelle tre bottigliette.

La bottiglia n.3 in questo esperimento ha la stessa concentrazione di lievito (1,5%) e zucchero (5%) del campione n.3 nell'attività 1A. Controlla le conte registrate alla temperatura ideale (Tabella 1A.1) e a temperatura ambiente (Tabella 1A.2): imposta la temperatura del bagnetto in modo che il campione n.3 produca più di 10 e meno di 60 bolle al minuto.

Raggruppa le 3 bottigliette con due elastici, aggiungi un peso e inseriscile nel becher.

Riempi il becher con acqua a una temperatura compresa tra 20 e 30 °C.

Annota la temperatura iniziale del bagnetto nel Foglio risposte [Tabella 1D.1].

Fai partire il cronometro e conta quante bolle si sviluppano in 30 secondi:

esegui almeno 3 conte per ogni campione e riporta i risultati nel Foglio risposte.

Verifica la temperatura del bagnetto alla fine dell'esperimento.



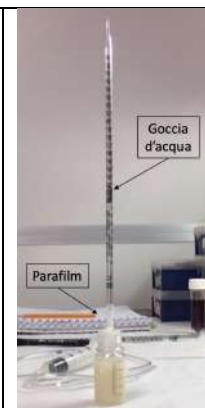
Calcola quanto varia in percentuale l'attività del lievito abbassando la quantità di saccarosio a disposizione delle cellule [Foglio risposte, 1D.1.1].

1D.2 Misura dell'attività con un respirometro

*Contare le bolle di gas prodotte per minuto è un metodo facile e abbastanza efficace; non tutte le bollicine però hanno le stesse dimensioni. Per aumentare il tuo punteggio prova a costruire un **respirometro**, come descritto in appendice. Con questo strumento puoi misurare in modo ancora più preciso il volume di CO_2 prodotto dai lieviti*

Il principio di funzionamento di un respirometro è semplice: la CO_2 rilasciata durante la fermentazione spinge in alto una piccola goccia d'acqua colorata chiusa in una pipetta. A intervalli regolari, si registra lo spostamento della goccia leggendo i valori raggiunti sulla scala graduata. Dalle letture si ricava il volume di CO_2 prodotta nel tempo.

- Trascrivi i dati dell'esperimento in **Tabella 1D.2** del Foglio risposte.
- Con i dati della tabella costruisci **Grafico 1D.3** per ricavare il tasso di fermentazione del lievito.



Per costruire il respirometro in modo semplice, esegui le misure a temperatura ambiente. Scegli il campione che ti sembra più adatto per fare le misure, in base all'esperimento precedente. È ovvio che più i lieviti sono attivi prima riesci a completare le letture, ma se la goccia sale troppo in fretta potresti avere qualche difficoltà a trascrivere i dati.

Infila la pipetta da 2 mL sul beccuccio della bottiglietta e sigilla il punto di giunzione con parafilm, per evitare la fuoriuscita di gas (vedi foto). Prima d'inserire la pipetta, però, devi aspirare al suo interno una goccia d'acqua, meglio se colorata. Questa operazione è piuttosto complessa: leggi attentamente le istruzioni in appendice e fatti aiutare.

- Fai in modo che la goccia d'acqua si trovi leggermente sotto lo zero quando inserisci la pipetta sul beccuccio della bottiglietta.
- Inizia le misurazioni quando la goccia raggiunge lo zero: puoi prendere come riferimento la parte superiore o inferiore della goccia, l'importante è essere coerenti.
- Registra i dati nel Foglio risposte, **Tabella 1D.2**.

Può accadere che all'inizio delle misure non ci sia un andamento lineare. In questo caso, quando costruisci il **Grafico 1D.3** per determinare il tasso di produzione di CO_2 unisci con una retta solamente la parte lineare della curva.



C'è un'ultima domanda per completare la prova: ora che sei diventato un esperto di lievito progetta un esperimento per dimostrare che l'etanolo può inibire gli enzimi della fermentazione [Foglio risposte, **1E**].

Fine del Tema n. 1