

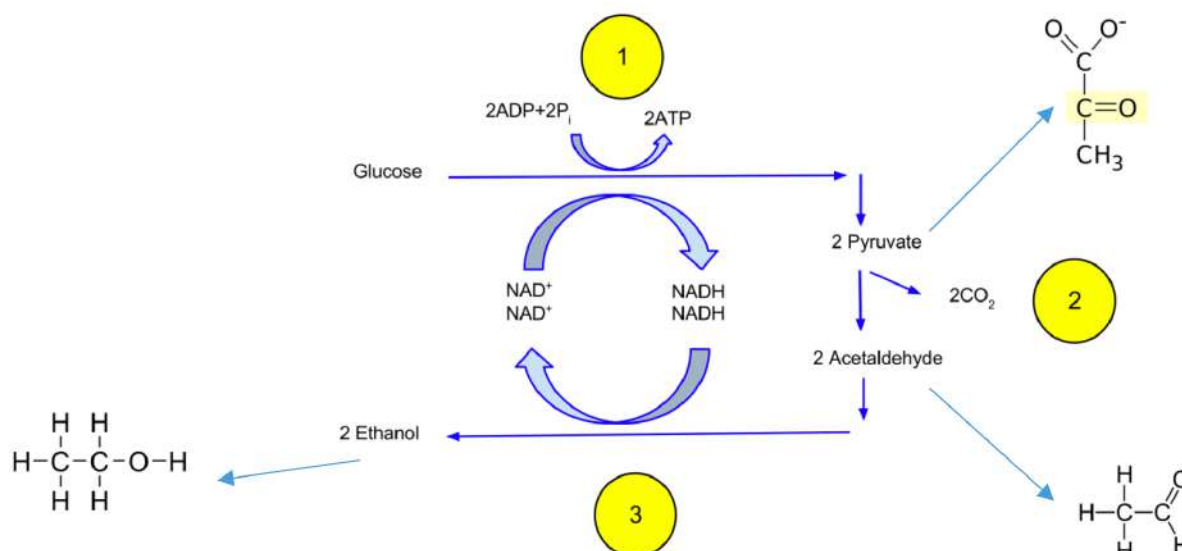
PREPARAZIONE DEGLI ESPERIMENTI per il Tema N°1: *Bollicine*

EUSOit 2019-20 Prova di Istituto di BIOLOGIA

Lista dei materiali e indicazioni per allestire la prova

6 novembre 2019

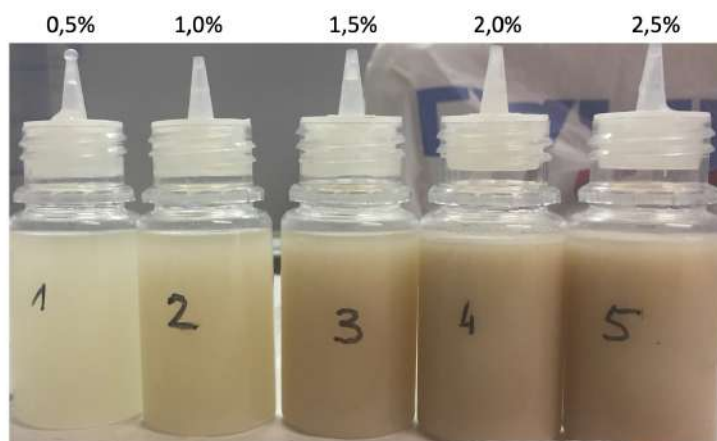
La prova di biologia di quest'anno è incentrata sulle proprietà del lievito *Saccharomyces cerevisiae* e il meccanismo della fermentazione alcolica. I lieviti convertono il glucosio in piruvato tramite la glicolisi, e poi trasformano il piruvato in acetaldeide e infine l'acetaldeide in etanolo secondo la seguente successione di reazioni:



Il piruvato è decarbossilato in una reazione irreversibile [2] che libera CO₂. L'attività enzimatica in questa tappa fornisce un modo immediato per "visualizzare" la trasformazione in atto: variando la temperatura e la concentrazione di substrato (saccarosio) gli studenti verificano sperimentalmente in che modo questi parametri influiscono sull'attività cellulare di *S. cerevisiae*. La prova si articola in:

1A Quanto è attivo il tuo lievito?

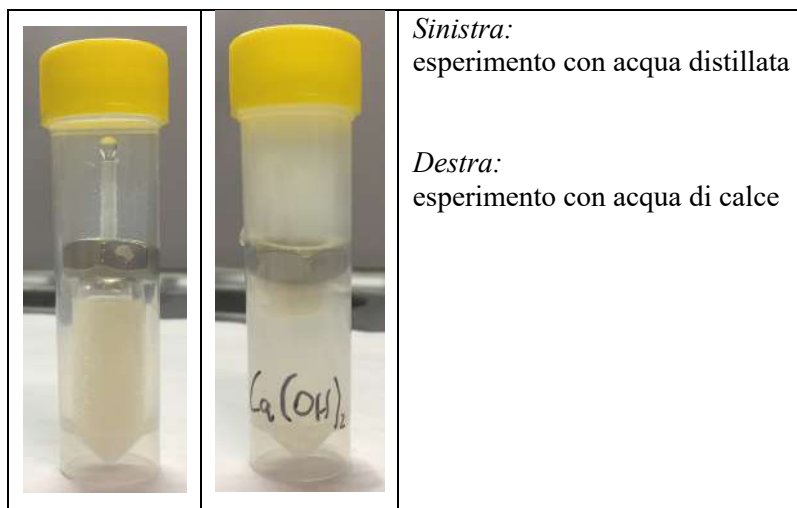
Mantenendo costante la concentrazione di substrato [5% saccarosio], si misura l'attività del lievito alla temperatura ideale (28° – 32°C) e a temperatura ambiente (18° – 22°C). In questa parte gli studenti sciolgono il lievito secco a 5 diverse concentrazioni:





1B Fermentazione alcolica

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

Prelevando una soluzione di lieviti e zucchero preparata in precedenza, si inserisce una pipetta contagocce in acqua di calce [soluzione di Ca(OH)₂]. Il lievito fermentando produce CO₂ che reagisce con l'acqua di calce formando carbonato di calcio (CaCO₃). In tempi relativamente brevi la soluzione diventa torbida perché CaCO₃ precipita come sale insolubile biancastro. Se l'emissione di CO₂ continua più a lungo, la soluzione schiarisce un po' alla volta, perché il carbonato insolubile è convertito in bicarbonato solubile.




Sicurezza	Note
Idrossido di calcio Ca(OH) ₂   CORROSIVO NOCIVO	Indossare guanti e occhiali di protezione quando si maneggia la polvere di Ca(OH) ₂ : può provocare irritazione cutanea e irritare le vie respiratorie. Evitare il contatto con gli occhi. Attenzione! Le sostanze irritanti devono essere segnalate con il relativo pittogramma e gli studenti dovranno essere istruiti prima sui rischi derivanti dal loro uso (in questo caso il pericolo è minimo quando la polvere è sciolta in acqua).

1B.2 Effetto della CO₂ sul pH

Non è necessario ripetere l'esperimento mostrato nel testo: gli studenti sono semplicemente invitati a spiegare nel Foglio risposte in che modo la CO₂ disciolta acidifica la soluzione in cui si discioglie.

1C Sopravvivenza cellulare

In questo esperimento di microscopia ottica, gli studenti identificano le cellule di lievito in divisione e producono un disegno possibilmente fedele del rapporto tra cellula madre e figlia. Devono anche determinare la percentuale di sopravvivenza a una temperatura > 50°C, ricavandola dal rapporto: cellule vive / cellule totali (=cellule vive + cellule morte)

Sicurezza	Note
Blu di metilene (o altro colorante vitale) 	Il colorante permette d'identificare le cellule morte. Attenzione! Le sostanze irritanti devono essere segnalate con il relativo pittogramma e gli studenti dovranno essere istruiti prima sui rischi derivanti dal loro uso (in questo caso il pericolo è minimo).

In condizioni ideali di crescita, le cellule di *S. cerevisiae* completano il ciclo di divisione cellulare in circa 90 minuti. Poiché il lievito secco è metabolicamente inattivo, ci vuole tempo perché le cellule immerse in soluzione zuccherina si “risvegliano”. Il numero di cellule “gemmanti” sale lentamente con il trascorrere del tempo: più si aspetta e maggiore è la possibilità di inquadrarne una nel campo visivo scelto.

Per l’osservazione al microscopio ottico è **importante diluire la coltura di lievito con acqua distillata**, perché anche il campione meno concentrato (0,5 % lievito) contiene moltissime cellule! Fare delle prove per verificare se le indicazioni del protocollo sono soddisfacenti o è necessario diluire ulteriormente il preparato.

1D Quantità di substrato

Diversamente dal primo esperimento, qui la concentrazione di lievito è costante [1,5%] e si verifica come varia l’attività calando la concentrazione di substrato [1 – 3 – 5% saccarosio].

Si riciclano tre bottigliette utilizzate nell’attività 1A e in prima battuta si misura l’attività contando il numero di bolle per minuto, con lo stesso metodo seguito in precedenza.

1D.2 Misura dell’attività con un respirometro

Il principio di funzionamento di questo strumento è semplice: la CO₂ 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.

I dati prodotti sono trasferiti su carta millimetrata per costruire un grafico che mette in relazione il volume di CO₂ (mL, – ordinate) con il tempo trascorso (minuti, centesimi – ascisse).

MATERIALE PER GRUPPO

I materiali indicati in rosso si preparano per tutti e poi si dividono in aliquote per gruppo.

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 – Ca(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, C₁₂H₂₂O₁₁)
- ✓ Fonte di acqua tiepida (28 – 32°C)
- ✓ Thermos con acqua quasi bollente (80 – 90°C)
- ✓ Parafilm, forbice
- ✓ Acqua deionizzata
- ✓ Rotolo di carta assorbente
- ✓ **Guanti di protezione in lattice o nitrile**

Può essere utile avere a disposizione un po’ di ghiaccio, per raffreddare l’acqua a temperatura ambiente.

EUSOit 2019-20 Allestimento della Prova di Istituto di BIOLOGIA

È molto importante che l'insegnante responsabile per la biologia provi l'esperimento prima della data della gara, in tempo per controllare il materiale a disposizione.

Per risolvere eventuali difficoltà scrivere all'indirizzo biologia@euso.it o, meglio ancora, utilizzare il Forum del sito EUSOit <http://www.euso.it/forum-eusoit/>

Lievito

Le preparazioni di lievito disponibili in commercio (secco o in panetti) danno risultati variabili. Ecco alcuni consigli per gestire questa variabilità.

1) **Evitare i panetti**, che invecchiano in fretta e ci mettono molto tempo per acquistare vitalità.

Il lievito secco si riprende più in fretta.

2) Le bustine di lievito disidratato che si acquistano al supermercato (da sole o insieme alla farina) vanno bene: **riunire più bustine e mescolare il tutto**, poi dividere in aliquote di circa 10 grammi. Il lievito secco teme l'umidità, perciò va conservato come si deve (ideale sottovuoto, ma anche un tubo in plastica ben chiuso va bene).

Attività di fermentazione

Una volta sciolto in acqua e zucchero, il lievito ci mette un po' a "risvegliarsi"; in genere l'attività cresce nei primi 20 - 30 minuti, anche se dopo 10 minuti è già gagliarda.

Nella prima mezz'ora è normale che le tre conte di bolle per minuto non siano concordi, ma il numero di bolle tenda a salire nel tempo. Per lo stesso motivo, la velocità di produzione CO₂ nel respirometro all'inizio non è costante.

L'attività di fermentazione aumenta in funzione della temperatura, perciò non è facile dare istruzioni precise in un protocollo. **Attenzione:** ad alta concentrazione di saccarosio [5%] e lievito [2,0 - 2,5 %] la fermentazione può essere così energica a 28° - 32°C che non si formano più bolle singole, ma schiuma che fuoriesce dalla bottiglietta.

Per questo motivo si utilizzano i campioni di lievito meno concentrato per l'attività 1A.1 (misure alla temperatura ideale di crescita con le bottigliette 1-2-3) e i campioni più concentrati per l'attività 1A.2 (misure a temperatura ambiente con le bottigliette 3-4-5).

C'è di buono che variando la temperatura possiamo "aggiustare" i risultati:

se il preparato è poco attivo si scalda il bagnetto con acqua tiepida,

se viceversa si formano troppe bolle il bagnetto va raffreddato.

Fonti di acqua calda e tiepida

- Le scuole dotate di un bagnetto termostato lo metteranno a disposizione di tutti gli studenti.
- In alternativa si possono usare dei contenitori di polistirolo da riempire con acqua tiepida; in questo caso controllare che la temperatura non scenda mai sotto i 28°C.
- Con un ebollitore o una pentola su fornello elettrico si prepara acqua quasi bollente (80 - 90°C), da suddividere nei termos.

Numero bilance

All'inizio della prova ciascun gruppo deve fare cinque pesate di lievito secco, da trasferire in tubi Falcon da 50 mL contenenti 25 mL di saccarosio al 5% (peso/volume). Per evitare lunghe attese, sarebbe opportuno dotare il laboratorio di una bilancia ogni 2 - 3 gruppi. Ideale la precisione al centesimo di grammo, ma anche al decimo può andare bene.

Acqua di calce

L'idrossido di calcio è poco solubile in acqua (1,7 g/l a 293 K). Pesare la quantità di polvere necessaria e aggiungere acqua mescolando bene. Filtrare la soluzione e dispensare in recipienti ben chiusi poco prima della prova: può assorbire l'anidride carbonica dell'aria formando sulla superficie una patina bianca di carbonato di calcio.

L'acqua di calce si può acquistare già pronta in qualche farmacia e drogheria.

Flaconi contagocce per dispensare liquidi (es. ricariche inchiostro, etc)


Avendo la punta sottile sviluppano bolle d'aria molto regolari; la base piatta le rende stabili. Ci vogliono dei pesi per farle stare a fondo quando sono immerse nell'acqua e a questo scopo si possono utilizzare alcune rondelle o dadi di fissaggio (come da foto), acquistabili dal ferramenta. È importante trovare un contenitore che si adatti alle dimensioni delle bottigliette acquistate: nell'esempio della foto un becher di vetro da 250 mL.



Pipette di trasferimento contagocce

Sono in sostanza pipette Pasteur modificate, con un bulbo più grande ed un tubo corto e stretto. Si possono acquistare su Amazon in confezioni da 100 pezzi da 4 mL (**9,49 Euro**)

Parole chiave: OOTSR-contagocce-trasferimento-plastica-Cioccolato

	<p>Uso in cucina: le pipette di trasferimento sono adatte per decorare i dolci.</p> <p>Avendo un bulbo più grande rispetto alle pipette Pasteur, possono ospitare volumi maggiori di coltura.</p>
---	---

Costruzione di un respirometro

Gli studenti possono scegliere il campione più adatto per fare le misure: è ovvio che più i lieviti sono attivi prima si completano le letture. Le bottigliette 3, 4 o 5 dovrebbero andar bene con misure fatte a temperatura ambiente*. Se però l'attività è molto alta, la goccia sale troppo in fretta e uno studente da solo può avere qualche difficoltà a trascrivere i dati.

**Con lo stesso campione, l'attività cambia parecchio se la stanza è a 25°C rispetto a misure effettuate in un locale non riscaldato (< 20°C).*

Procedimento

Trovate il sistema che vi sembra più semplice ed efficace con il materiale in dotazione nella vostra scuola, poi modificate di conseguenza le istruzioni in Appendice per gli studenti.

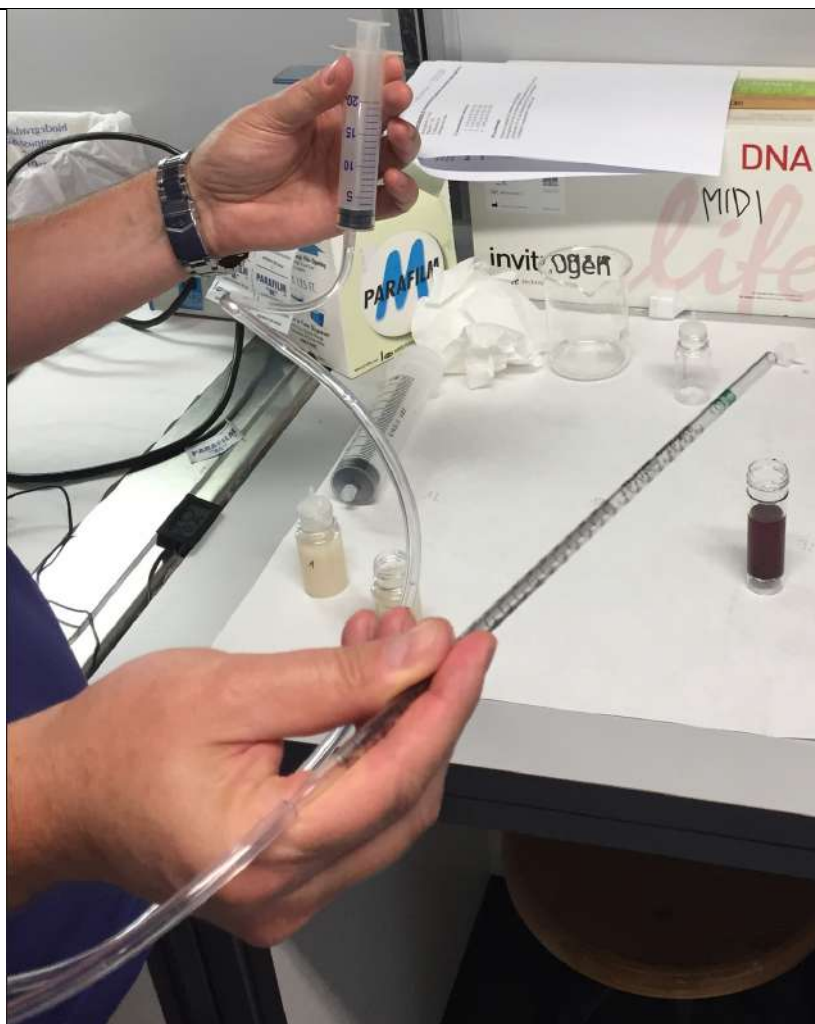
Aspirare la goccia

Infilare la pipetta da 2 ml in un'altra siringa e aspirare una piccola goccia d'acqua da un contenitore, farla entrare nella pipetta fino alla tacca "0 ml".

In alternativa, collegare la siringa ad un tubo in PVC, da applicare sulla punta della pipetta (foto). In questo modo, si può spostare facilmente la posizione della goccia e poi inserire direttamente la pipetta nel supporto.

Le siringhe con tubo dosatore si possono acquistare su Amazon in confezioni da 2 pezzi (**12,99 Euro**) Parole chiave: ManYee Siringa Plastica 100ML Tubo PVC 80CM

Si dovrebbero trovare anche nei negozi di ferramenta.



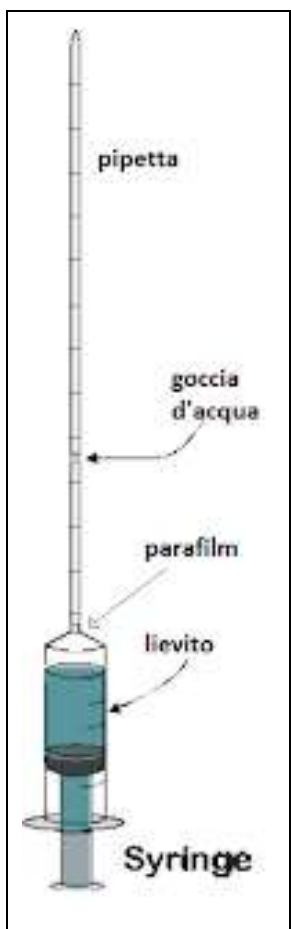

Completare il montaggio del respirometro staccando la pipetta da 2 ml dalla siringa avendo cura di non far uscire la goccia d'acqua e infilarla nella bottiglietta contenente la miscela di lievito.

Sigillare la giuntura tra la pipetta e la bottiglietta con del parafilm, per evitare la fuoriuscita di gas (Figura successiva). **È molto importante che la sezione interna della pipetta si adatti in modo perfetto al beccuccio del contenitore in cui è inserita (bottiglietta o siringa)!**

In genere le pipette da 5 o 10 mL non vanno bene, perché hanno una sezione troppo larga.

Due modi alternativi per costruire il respirometro

- 1) Utilizzando una siringa (sinistra)
- 2) Con una bottiglietta (destra)

		<p>In alternativa alla bottiglietta si può usare una siringa in plastica da 50 ml. In tal caso, bisogna versare la soluzione con i lieviti in un contenitore largo a sufficienza da poter aspirare senza fatica la miscela con la siringa.</p> <p><i>Con la siringa è più semplice posizionare la goccia d'acqua in corrispondenza dello zero. Diventa però complicato mantenere in equilibrio la siringa per fare le misurazioni, se non si fissa ad un supporto con nastro adesivo.</i></p>
--	--	---

Riferimenti bibliografici

Ci sono molti esempi in letteratura di esperimenti sulla fermentazione proposti a studenti di scuola superiore o primi corsi universitari. La classe è divisa in gruppi, a ciascuno dei quali è affidato il compito di misurare l'effetto di una singola variabile. Alla fine si discutono insieme i risultati.

1. Kam Ho (Kennedy) Chan. A Simple Microscale Setup for Investigating Yeast Fermentation in High School Biology Classrooms. The American Biology Teacher, Vol. 78 No. 8, October 2016; (pp. 669-675)

<https://pdfs.semanticscholar.org/3a83/8713ad0eb18f12da09bd1f880e74d51cb5af.pdf>

2. What Affects Yeast Growth? IFT Experiments in Food Science Series – Activity #1

<http://www.math.unl.edu/~jump/Center1/Labs/What%20Affects%20Yeast%20Growth.pdf>

3. Steven R. Spilatro. Yeast on the Rise: Investigative Study of Fermentation in the Introductory Biology Curriculum. Marietta College, Ohio

<https://pdfs.semanticscholar.org/1ff2/ca97cd1cff1719fe2f0e4b04980cbf49bfa7.pdf>