

Protezione dei danni da agenti ossidanti con vitamina C ed estratto di mela in lievito

a cura di C.V. Segré

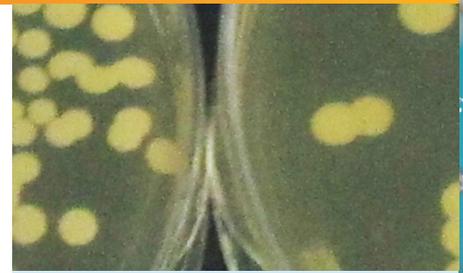
Le molecole ossidanti, come i radicali liberi, hanno un' elevata reattività chimica, e possono danneggiare le macromolecole cellulari, come le proteine e il DNA. Un'altra classe di molecole chimiche, gli antiossidanti, abbondanti in certi alimenti come frutta e verdura, svolgono un'importante azione protettiva contro lo stress ossidativo. In questa esperienza saranno valutati gli effetti protettivi della vitamina C e di un estratto di mele sulla vitalità di cellule di lievito trattate con H_2O_2 .

Obiettivo

Analizzare le differenze di vitalità cellulare di lievito dopo trattamento con agente ossidante in presenza o assenza di estratto di mela.

Procedimento

1. Preparare una coltura di lievito in crescita esponenziale come descritto nel protocollo "Analisi di vitalità di lievito dopo esposizione ad agenti ossidanti" ai punti 1-3.
2. Preparare l'estratto di mela come descritto nel protocollo "Preparazione di un estratto di mela per trattamenti antiossidanti in lievito".
3. Preparare una soluzione madre di vitamina C 250mM: sciogliere 22.015mg di vitamina C in polvere in 0.5ml di acqua sterile.
4. Preparare 4 provette da 1.5ml ognuna etichettato come segue: "0mM H_2O_2 ", "10mM H_2O_2 ", "10mM H_2O_2 + estratto mela", "10mM H_2O_2 + vitamina C".
5. Mettere 15ml di terreno liquido in un tubo da 50 ml.
6. Prelevare 30 μ l di coltura di lievito cresciuta la notte e diluirla nei 15ml di terreno, mescolando bene (spipettando o col vortex).
7. Trasferire 500 μ l della coltura diluita in ciascuna provetta.
8. Effettuare un pre-trattamento con estratto di mela solo nella provetta contrassegnata con la dicitura "+ estratto mela": aggiungere 25 μ l di estratto di mela in modo da raggiungere la diluizione 1:20.
9. Effettuare un pre-trattamento con vitamina C solo nelle provette contrassegnate con la dicitura "+ vitamina C": aggiungere 20 μ l della soluzione madre 250mM in modo da raggiungere una concentrazione finale di vitamina C di 10mM.
10. Ricoprire le provette con carta stagnola e porle in oscillazione a temperatura ambiente per 20 minuti.
11. Aggiungere 5.9 μ l di H_2O_2 in ogni provetta contrassegnata dalla dicitura "+ H_2O_2 ".
12. Ricoprire le provette con carta stagnola e porre in oscillazione a 28°C (o a temperatura ambiente) per 20 minuti.
13. Nel frattempo, preparare le piastre correttamente etichettate, corrispondenti alle diverse condizioni sperimentali.
14. Terminato il trattamento, mescolare bene le colture (spipettando o col vortex) e prelevare 50 μ l.



Tempo previsto

20 minuti per inoculo coltura
1.5 ore per trattamento con estratto di mela e H_2O_2
1-2 giorni per la crescita delle colonie

Materiali e reagenti

- ✓ Lievito in polvere (acquistabile al supermercato)
- ✓ Piastre per lievito con bacto-agar
- ✓ Terreno liquido YPD
- ✓ Provette da 15ml
- ✓ Provette da 50ml
- ✓ Fiasca da 500ml
- ✓ Cilindro graduato da 500ml
- ✓ Ansette a L sterili
- ✓ Bottiglie
- ✓ Carta stagnola (acquistabile al supermercato)
- ✓ Soluzione di H_2O_2 (acqua ossigenata acquistabile al supermercato)
- ✓ Mele varietà Golden Delicious del Trentino
- ✓ Vitamina C in polvere
- ✓ Acetone
- ✓ Garze pulite
- ✓ Ghiaccio e cestello del ghiaccio

Strumentazione

- ✓ Agitatore
- ✓ Bilancia
- ✓ Oscillatore
- ✓ Vortex (facoltativo)
- ✓ Micropipette e relativi puntali
- ✓ Frullatore
- ✓ Coltello
- ✓ Imbuto

15. Depositare le cellule sulle piastre e spatolarle bene con un'ansetta fino a che non sono asciugate.
16. Incubare le piastre a 28°C/30°C per 1-2 giorni o a temperatura ambiente per 2-3 giorni fino a che non sono visibili le colonie.
17. Confrontare i numeri di colonie cresciute nei campioni trattati con agente ossidante in presenza e in assenza di estratto di mela.

Osservazioni

- Una soluzione commerciale di H₂O₂ 10 volumi ha una concentrazione di 893mM.
- I polifenoli e le sostanze nutritive contenute nella buccia e nella polpa della mela si ossidano facilmente quando esposte all'aria, perdendo parte delle loro proprietà. Per ridurre il rischio di ossidazione è opportuno tenere i reagenti e le soluzioni per la preparazione dell'estratto di mela a 4°C e lavorare sempre in ghiaccio.
- La mela è un elemento centrale dell'alimentazione umana; il melo è originario dell'Asia Centrale, coltivato fin da epoche preistoriche. Le mele contengono molteplici nutrienti come fibre, vitamine e diverse molecole ad azione antiossidante, tra cui i più abbondanti sono i polifenoli. I polifenoli proteggono le strutture cellulari e le macromolecole biologiche come il DNA dai danni causati da molecole reattive e ossidanti, contrastando l'invecchiamento cellulare e aiutando a prevenire l'insorgenza del cancro.
- La vitamina C, o acido L-ascorbico, è un potente antiossidante naturale, fondamentale cofattore in molte reazioni di ossido-riduzione che avvengono nelle cellule e importante per inattivare i radicali liberi prodotti dal metabolismo. Svolge un'azione protettiva verso le macromolecole biologiche come il DNA, e per questo contrasta l'invecchiamento cellulare e aiuta a combattere l'insorgenza del cancro. La vitamina C si trova abbondante negli ortaggi a foglia verde, in peperoni, pomodori, fragole, kiwi e agrumi. Altre importanti molecole ad azione antiossidante, anch'esse abbondanti in frutta e verdura, sono ad esempio le vitamine A, B ed E, i carotenoidi e i flavonoli.