

Prova funzionale dei mutanti *petite* in lievito

a cura di V. Soglio e G. Nappo

Dopo aver identificato un ipotetico mutante '*petite*' tramite la selezione descritta nel protocollo 'Selezione dei mutanti *petite* in lievito' è possibile utilizzare questo ceppo per una prova funzionale. Di seguito si descrive come valutare il diverso grado di tolleranza all'etanolo tra lieviti di un ceppo selvatico e uno '*petite*'.

Obiettivo

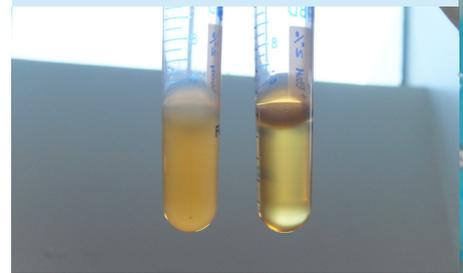
Valutare nei mutanti *petite* il grado di tolleranza all'etanolo presente nel mezzo di coltura.

Procedimento

1. Riportare rispettivamente su 2 provette la scritta 'selvatico-controllo' e 'mutante-controllo' e riempirle con 5 ml di terreno liquido YPD.
2. Su altre 2 provette riportare la scritta 'selvatico-etanolo' e 'mutante-etanolo' e riempirle con 5 ml di terreno liquido di coltura e 200 µl di etanolo assoluto (corrisponde al 4% del volume totale).
3. Toccare con uno stuzzicadente una colonia di lieviti selvatici e stemperarla nel terreno della provetta denominata 'selvatico-controllo'.
4. Toccare con uno stuzzicadente una colonia di lieviti selvatici e stemperarla nel terreno della provetta denominata 'selvatico-etanolo'.
5. Toccare con uno stuzzicadente una colonia di lieviti *petite* e stemperarla nel terreno della provetta denominata 'mutante-controllo'.
6. Toccare con uno stuzzicadente una colonia di lieviti selvatici e stemperarla nel terreno della provetta denominata 'mutante-etanolo'.
7. Miscelare bene il contenuto di ciascuna provetta usando il vortex o invertendola più volte.
8. Incubare le provette a 30°C per due giorni o a temperatura ambiente per quattro giorni (meglio se in agitazione).
9. Osservare e confrontare la torbidità e di conseguenza la crescita della coltura di lievito selvatico e mutante in presenza di etanolo.
10. Prelevare 1ml di coltura in presenza di etanolo del lievito mutante e del lievito selvatico per quantificare allo spettrofotometro la differente torbidità (lunghezza d'onda 600 nm).
11. Per una stima più precisa del diverso grado di crescita è possibile, in alternativa, contare le cellule usando un vetrino con reticolo, come descritto nel protocollo 'La conta dei lieviti tramite l'utilizzo di un vetrino con reticolo'.

Osservazioni

- Nonostante il lievito sia per eccellenza uno dei microorganismi produttori di etanolo, esso è sensibile alle elevate concentrazioni di questo alcool. Eccetto il lievito del vino che tollera concentrazioni di etanolo fino al 10-15%, gli altri ceppi, tra cui *S.cerevisiae*, tollerano concentrazioni fino al 5-6%. La presenza di etanolo nel mezzo di coltura inibisce la crescita e la sopravvivenza modificando l'integrità e la fluidità della membrana cellulare e di conseguenza alterando la permeabilità ai diversi soluti (come ioni,



Tempo previsto

20 minuti

Materiali e reagenti

- ✓ Piastra con colonie di lievito *petite*
- ✓ Piastra con colonie di lievito selvatico
- ✓ Terreno liquido YPD
- ✓ Etanolo assoluto
- ✓ Provette da 15 ml
- ✓ Vetrino con reticolo
- ✓ Stuzzicadenti (sterili)
- ✓ Pipette pasteur
- ✓ Cuvette

Strumentazione

- ✓ Blocchetto termostato o bagnetto
- ✓ Vortex (facoltativo)
- ✓ Micropipette e relativi puntali
- ✓ Microscopio ottico
- ✓ Spettrofotometro

zuccheri). La conformazione delle proteine viene perturbata, compromettendo la funzionalità degli enzimi coinvolti in tutte le vie metaboliche.

- La mancata integrità del genoma mitocondriale dei lieviti *petite* causa, oltre all'incapacità di respirare, anche una minor tolleranza all'etanolo presente nel terreno di coltura. La minor tolleranza all'etanolo del lievito *petite* comporta un ulteriore rallentamento della crescita delle cellule e la loro progressiva morte, di conseguenza le colture appaiono meno torbide se confrontate con quelle di ceppi selvatici.

Le figure riportate di seguito mostrano i lieviti selvatici o mutanti cresciuti in terreno YPD o in terreno con etanolo al 4%. Per la conta è stato usato un vetrino con reticolo (griglia in giallo).

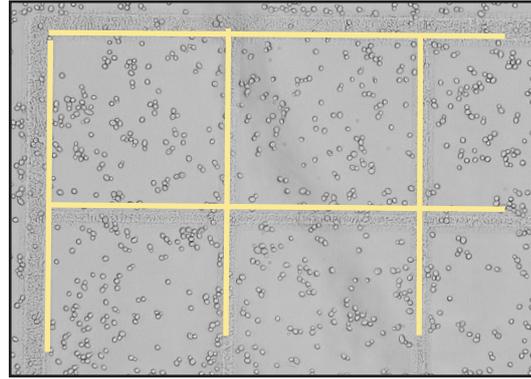
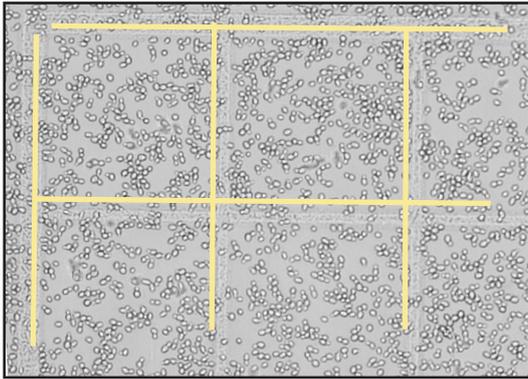


Figura 1 (10x)

Cellule di lievito cresciute in terreno YPD: a sinistra il selvatico (selvatico-controllo), a destra il 'petite' (mutante-controllo).

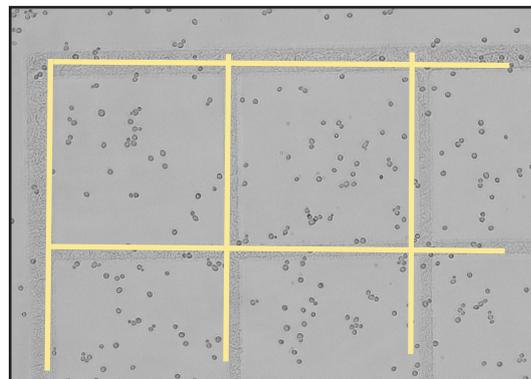
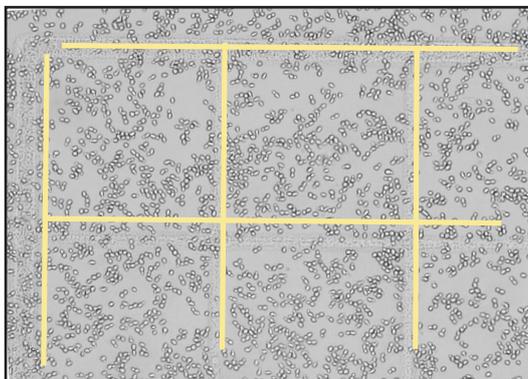


Figura 2 (10x)

Cellule di lievito cresciute in terreno con etanolo al 4%: a sinistra il selvatico (selvatico-etanolo), a destra il 'petite' (mutante-etanolo).

Referenze

A. Hutter and S.G. Oliver - Ethanol production using nuclear petite yeast mutants - Applied Microbiology and Biotechnology (1998) 49: 511-516

Menggen Ma and Z. Lewis Liu - Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* - Applied Microbiology and Biotechnology (2010) 87: 829-845