



LE BIOTECNOLOGIE IN CUCINA E...

Idee per una didattica laboratoriale

Rosa Marina Gandolfo

Mariagrazia Gobbi

ITIS "Caramuel" - Vigevano



BIOTECNOLOGIA = la scienza che usa gli organismi viventi e/o le loro molecole costituenti per la produzione di “prodotti” utili all’uomo.





Oltre 10.000 anni fa l'uomo ha cominciato a mettere a punto i primi processi biotecnologici hanno consentito di

- ottenere la lievitazione del pane
- preparare bevande alcoliche
- produrre derivati del latte (yogurt e formaggi)
- selezionare animali domestici con le caratteristiche desiderate
- selezionare le specie vegetali più produttive



BIOTECNOLOGIE TRADIZIONALI

Lo sviluppo della microbiologia ha consentito di predisporre metodologie per la produzione :

- vaccini
- antibiotici



Quando Watson, Crick e Wilkins scoprirono la struttura a doppia elica del DNA e la sua importanza come “contenitore” e “trasmettitore” di informazioni geniche, iniziarono una serie di studi finalizzati a predisporre metodologie utili a sequenziarlo e utilizzarlo



BIOTECNOLOGIE MODERNE

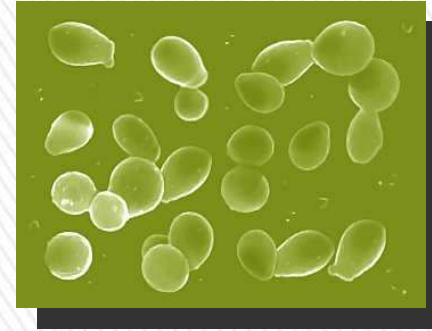
per:

- migliorare i processi produttivi industriali = **BIOTECNOLOGIE BIANCHE**
- migliorare la produttività agroalimentare = **BIOTECNOLOGIE VERDI**
- tutelare la salute umana = **BIOTECNOLOGIE ROSSE**



**TRE PROPOSTE DIDATTICHE:
usiamo delle biotecnologie
tradizionali per**

**PROPOSTA 1: studio della fermentazione alcolica e dei
lieviti del genere *Saccharomyces*
mediante tre attività laboratoriali**



I lieviti del genere *Saccharomyces* in condizioni **anaerobiche** ricavano energia dalla **fermentazione alcolica** degli zuccheri che vengono convertiti in **ALCOOL ETILICO** (etanolo) e **CO₂**



Il processo viene tradizionalmente sfruttato per la lievitazione degli impasti e per la preparazione di bevande alcoliche



PROVA A - Studio della fermentazione alcolica e del suo substrato in lieviti del genere *Saccaromyces*

» OBIETTIVI

- giustificare l'aumento di volume dell'impasto durante la lievitazione
- individuare i substrati del processo di fermentazione

» MATERIALI

- 5 beute da 250 ml o 5 bottigliette di plastica da 500 ml
- 80 g di lievito fresco
- 5 palloncini
- H₂O saccarosio (zucchero da cucina)
- amido
- farina di mais (per polenta)



» Metodologia

- Preparare una sospensione di lievito stemperando 50 g di lievito in 600 ml di H₂O
- Allestire le 5 bottiglie/beute come di seguito indicato:
 - BEUTA 1** 120 ml di sospensione di lieviti (CONTROLLO NEGATIVO)
 - BEUTA 2** 120 ml di sospensione di lieviti + 10 g di saccarosio
 - BEUTA 3** 120 ml di sospensione di lieviti + 10 g di amido
 - BEUTA 4** 120 ml di sospensione di lieviti + 10 g di farina di mais
 - BEUTA 5** 120 ml di H₂O + 10 g di saccarosio (CONTROLLO NEGATIVO) conservando il residuo della sospensione su un termosifone per le indagini successive
- Inserire sul collo di ogni beuta un palloncino, posizionare le beute su un termosifone ed osservarle ogni 15 minuti (rilevando la circonferenza del palloncino)



PROVA B - Studio del metabolismo dei lieviti del genere *Saccaromyces* e dei suoi prodotti

» OBIETTIVI

- dimostrare lo stato fisico dei prodotti ottenuti dal metabolismo
- individuare i prodotti del metabolismo attraverso dei metodi indiretti

» MATERIALI

- beuta con tappo forato
- tubo di vetro a squadra di vetro
- provetta con tappo forato
- soluzione di Ca(OH)_2 (preparazione: aggiungere 2,5% di Ca(OH)_2 ad H_2O , scaldare e filtrare)
- cannuccia
- sospensione di lievito
- saccarosio



» Metodologia

- prelevare 100 ml di sospensione di lievito tenuta a parte e aggiungerlo a alla beuta con tappo forato insieme a un cucchiaino di saccarosio
- tappare la beuta con il tappo forato e inserire il tubo a squadra.
- inserire nella provetta parte della soluzione di Ca(OH)_2 sufficiente ad immergere l'altra estremità del tubo di vetro, e collegarla usando il secondo tappo forato
- adagiare tutto l'allestimento su un termosifone o in incubatore a 30°C per almeno 1 ora

La soluzione di Ca(OH)_2 serve a dimostrare che l'aumento della quantità di CO_2 disciolta reagendo con Ca(OH)_2 secondo la reazione:



determinandone l'intorbidimento.

Per verificarne la funzionalità insufflare l'aria espirata in una provetta contenente Ca(OH)_2 avanzata con l'ausilio di una cannuccia finchè non si intorbidisce per la produzione di carbonato di calcio è insolubile in acqua



PROVA C - Studio morfologico dei lieviti del genere *Saccaromyces*

» OBIETTIVI

- conoscere le caratteristiche morfologiche dei lieviti
- osservare la loro riproduzione asessuata per gemmazione

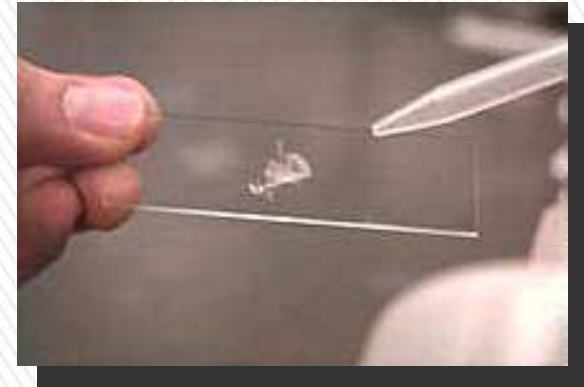
» MATERIALI

- microscopio ottico
- vetrino portaoggetto
- vetrino coprioggetto
- pipetta Pasteur
- blu di metilene (colorante)
- sospensione di lievito



» Metodologia

- porre una goccia d'acqua sul vetrino portaoggetto con una pipetta pasteur
- porre con la stessa pipetta una goccia della sospensione di lievito avanzato sul vetrino portaoggetti in corrispondenza della goccia d'acqua
- aggiungere infine una goccia di blu di metilene
- stemperare il tutto con l'ausilio della pipetta
- coprire con vetrino coprioggetti
- tamponare l'eccesso di liquido
- osservare al microscopio ottico con obiettivo 40X


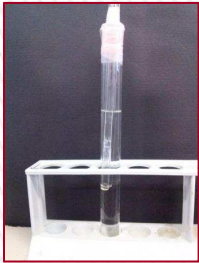


I coloranti sono sali nei quali uno dei due ioni è colorato.
In un **colorante basico**, il cromoforo è un catione.
In un **colorante acido**, il cromoforo è un anione.

- Colorazione semplice: utilizza solo un colorante.
- Colorazione differenziale: utilizza due o più coloranti.



» RISULTATI

PROVA	RISULTATI	DISCUSSIONE
PROVA A		Con gli studenti ...
PROVA B		
PROVA C		



**TRE PROPOSTE DIDATTICHE:
usiamo delle biotecnologie
tradizionali per**

**PROPOSTA 1: studio della fermentazione alcolica in
lieviti del genere *Saccharomyces***

**PROPOSTA 2: conservare un vegetale e ottenere un
alimento**



PROPOSTA 2

Conservare un vegetale e ottenere un alimento

I batteri lattici in condizioni **anaerobiche** ricavano energia dalla **fermentazione lattica** degli zuccheri che vengono convertiti in **ACIDO LATTICO** (lattato)



Il processo viene tradizionalmente sfruttato in cucina per la trasformazione e la conservazione di molti alimenti es.

yogurt, formaggi, crauti, cetrioli, olive.

L'acido lattico rilasciato riduce il pH rendendo l'ambiente sfavorevole alla crescita di altre specie (pH 4.6) anche per la presenza di tossine microbiche.



BATTERI LATTICI

Sono batteri Gram positivi, immobili, chemioeterotrofi a forma di bastoncino o cocco. Il loro nome deriva dal fatto che formano acido lattico come principale, (per gli eterofermentanti) o unico, (per gli omofermentanti), prodotto finale del loro metabolismo energetico; sono tutti anaerobi ossigeno-tolleranti.

Una caratteristica propria dei batteri lattici è la loro elevata acido-resistenza il che consente loro di crescere anche quando il pH raggiunge valori inferiori a 5. Questa caratteristica fisiologica è di grande importanza ecologica, perché permette loro di vincere la competizione di altri batteri in ambienti ricchi di materia organica



Determinazione dell'acidità e dell'acido lattico in un preparato alimentare fermentato da batteri lattici

» **OBIETTIVI**

- verificare che l'acidità sia il fattore responsabile della conservazione dell'alimento
- quantificare per titolazione l'acido lattico nei liquidi dell'alimento
- osservare la presenza di lattobacilli nei liquidi dell'alimento

» **MATERIALI**

- | | |
|------------------------|------------------------|
| • cavolo cappuccio | • sale da cucina |
| • blu di metilene | • cartina indicatrice |
| • NaOH 0,05 M | • fenolftaleina |
| • buretta | • diversi becker |
| • microscopio ottico | • vetrino portaoggetto |
| • vetrino coprioggetto | • pipetta Pasteur |
| • olio da immersione | |

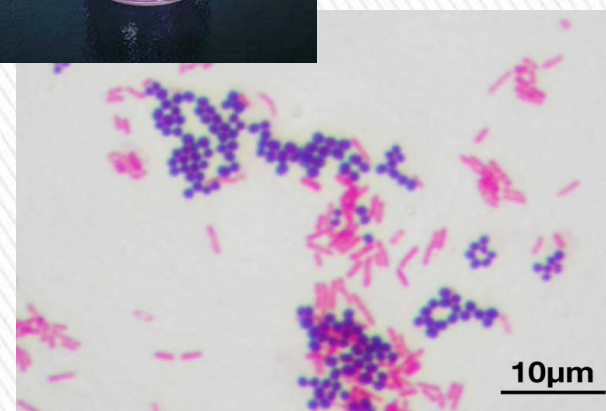


» Metodologia

- Tagliare un cavolo cappuccio a listarelle sottili.
- Porre il cavolo tagliato in un becker adatto (500 ml).
- Aggiungere una quantità di sale (NaCl) pari al 3% del peso del cavolo e mescolare.
- Pressare con energia le foglie, coprirle e tenerle pressate con un peso sulla copertura. L'osmosi indotta dalla salatura dovrebbe produrre una quantità di liquido sufficiente a ricoprire completamente la massa del cavolo (se il liquido prodotto non fosse sufficiente a sommergere completamente il cavolo, preparare una salamoia al 6% di NaCl e aggiungerne in quantità sufficiente da ricoprire completamente il cavolo).
- Eseguire una misura del pH iniziale con la cartina universale e incubare ad una temperatura massima di 30°C.



- Dopo una settimana di incubazione misurare il pH e registrare colore, aspetto e odore del fermentato
- Prelevare un campione del liquido e determinare la concentrazione di acido lattico prodotto con una titolazione con NaOH 0,05M e fenolftaleina come indicatore
- Allestire con una goccia di liquido dell'alimento uno striscio colorato con la stessa metodologia utilizzata per i lieviti (o con colorazione di Gram) e osservare ad immersione al microscopio ottico con obiettivo 100X
- Eseguire le stesse prove dopo 14 giorni



» RISULTATI

PROVA	RISULTATI	DISCUSSIONE
Determinazione pH	pH Aumentato o diminuito?	Con gli studenti ...
Determinazione acido lattico	Concentrazione Aumentata o diminuita?	
Osservazione batteri lattici	Presenza Si o no?	



TRE PROPOSTE DIDATTICHE: usiamo delle biotecnologie tradizionali per

**PROPOSTA 1: studio della fermentazione alcolica in
lieviti del genere *Saccharomyces***

**PROPOSTA 2: conservare un vegetale e ottenere un
alimento**

**PROPOSTA 3: produrre biodiesel da microalghe
autoctone**

» OBIETTIVO

Il lavoro svolto dalla classe si propone di dimostrare che le **ALGHE UNICELLULARI o PLURICELLULARI** presenti nei corsi d'acqua locali, costituiscono una risorsa energetica insospettabile da cui è possibile estrarre il **BIODIESEL**.

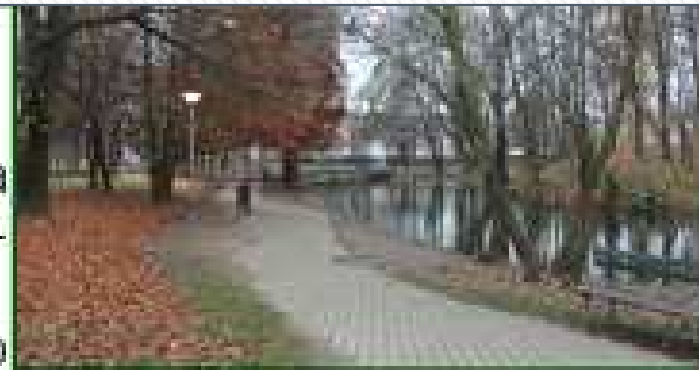
» METODOLOGIA

L'attività svolta si è articolata in sei fasi:

1) RACCOLTA DEI CAMPIONI DI ALGHE

Sono stati raccolti due campioni d'acqua (circa 150 ml ciascuno) con il relativo contenuto di microrganismi:

- un campione d'acqua del laghetto "Parco F. Parri" di Vigevano (foto)
- un campione d'acqua stagnante di un sottovaso.



I campioni inseriti in recipienti puliti e trasparenti (per favorire il passaggio della luce necessaria alla sopravvivenza delle eventuali alghe presenti) sono stati trasportati in laboratorio.

2) PREPARAZIONE TERRENO DI COLTURA. Per favorire la crescita e la coltivazione delle alghe contenute nei campioni, si è allestito un particolare terreno di coltura che è stato denominato *Medium Alghe*.





3) ALLESTIMENTO DI COLTURE DI ALGHE

Ciascun campione d'acqua è stato posto in una beuta da 500 ml a cui è stato aggiunto analogo volume di *Medium Alghe*. All'interno di ogni beuta è stata inserita una pietra porosa collegata a una pompa d'aria (per facilitare la diffusione dei gas) e l'imboccatura della stessa è stata tappata con cotone idrofilo. Le beute sono state lasciate a temperatura ambiente, esposte alla luce e settimanalmente rabboccate con circa 30-40 ml di *Medium Alghe*. Trascorso un mese il contenuto di ogni beuta è stato suddiviso in due cilindri sempre collegati con pompa ad aria e rabboccati con *Medium Alghe*.



Preparazione Medium Alghe

Si preparano due soluzioni:

- Soluzione sali minerali: si ottiene mescolando 0,02 g CaCl_2 + 0,30 g MgCl_2 + 0,18 g ml di Na_2HPO_4 + 0,30 g di NaH_2PO_4 + 0,003 g di FeSO_4 e portando a volume di 1 litro con una soluzione di KNO_3 0,005 M
- Soluzione terriccio con microelementi si ottiene mescolando 55 g di terreno con 200 ml di acqua distillata. La miscela è stata bollita per 15 minuti e filtrata con garze sovrapposte e rifiltrata con carta da filtro

Il Medium alghe si ottiene mescolando 1 litro di soluzione sali minerali con tutta la soluzione di terriccio.

Autoclavare Medium alghe e conservare a temperatura ambiente fino al momento dell'utilizzo.



4) ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE

Durante l'allestimento della coltura sono state svolte indagini:

- microbiologiche
- microscopiche

finalizzate all'identificazione delle specie algali presenti nella coltura.

Indagini microbiologiche

Periodicamente campioni di coltura sono stati seminati con la tecnica dello striscio e dello spatolamento in piastre contenenti *Medium Alghe Solido* (ottenuto aggiungendo a 60 ml di *Medium Alghe* 0,9 grammi di agar). Le piastre incubate a temperatura ambiente e in luogo esposto alla luce diurna dopo almeno 10 giorni evidenziavano la crescita di numerose e piccole colonie.

Indagini microscopiche

Settimanalmente sono state svolte indagini microscopiche sia sulle colonie cresciute su piastra sia su campioni prelevati direttamente dalle colture algali. Complessivamente **sono state isolate ed identificate 8 specie algali.**



5) RACCOLTA ALGHE PER FILTRAZIONE

Settimanalmente si procedeva alla raccolta delle alghe sottoponendo parte del liquido di coltura a filtrazione aspirata su buchner con filtro di carta. I filtri erano successivamente posti ad asciugare in stufetta a temperatura di circa 40°C. I filtri venivano preventivamente pesati prima della filtrazione per poter successivamente determinare il quantitativo di alghe raccolto. La restante parte del liquido di coltura era utilizzata per allestire nuove colture e consentire ulteriori e successive raccolte.



6) ESTRAZIONE OLI E TRANSESTERIFICAZIONE

Gli oli algali sono stati estratti direttamente dalle alghe essiccate su filtro con la tecnica del Soxhlet e successivamente separati dal solvente di estrazione per distillazione.

Gli oli così ottenuti sono stati successivamente posti in un pallone a tre colli, portati a 50°C e mescolati a una soluzione di metilato di sodio (0.3 g di NaOH + 20 ml di CH₃OH) per 90 minuti. La miscela risultante, lasciata decantare in un imbuto separatore ha dato origine a due fasi:

il biodiesel e la glicerina.

Di seguito è rappresentata la reazione chimica tra gli oli e l'alcool metilico detta **transesterificazione** con relativi prodotti.

