



Consiglio Nazionale  
delle Ricerche

**INAIL**

ISTITUTO NAZIONALE PER L'ASSICURAZIONE  
CONTRO GLI INFORTUNI SUL LAVORO

# Sviluppo di nuovi collanti a base organica e inorganica per la riduzione dell'emissione della formaldeide nei processi di lavorazione di prodotti legnosi usati nell'edilizia e negli arredi



Caratterizzazione mediante tecniche biochimiche e spettroscopiche di proteine vegetali da utilizzare come possibili sostituenti di collanti tradizionali

**Antonio Varriale, Angela Pennacchio, Maria Staiano, Antonio Ottobriano e Sabato D'Auria**

**Istituto di Scienze dell'Alimentazione (ISA-CNR)**

[antonio.varriale@cnr.it](mailto:antonio.varriale@cnr.it)

[www.freefores.cnr.it](http://www.freefores.cnr.it)

**12 novembre 2019**

Logge Uffizi Corti, Firenze

**Workshop finale progetto FREEFORES**



ACCADEMIA DEI GEORGOFILII

# Obiettivi Specifici (OS)



## Obiettivi Specifici (OS)

1. Determinazione del contenuto proteico mediante saggio Bradford e Kjeldahl
2. Caratterizzazione mediante elettroforesi su gel di poli-acrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE) dei campioni
3. Caratterizzazione mediante spettroscopia di assorbimento
4. Caratterizzazione mediante spettroscopia di fluorescenza statica

Farina	Nota
Farina di Fagiolo	NA
Zeina	Materiale arricchito in proteine del mais
Soia	Isolato proteico della soia
Jatropha	Cake non raffinato da una lavorazione industriale della Jatropha Curcas. Residuo secco: 41,1%
Farina di vinacciolo	NA
Farina di cotone	NA
SOYAD TS8200	Farina di soia industriale
Jatropha PEC	Cake di Jatropha Curcas raffinata
Jatropha VIS	Cake ulteriormente raffinata della Jatropha Curcas, rispetto agli altri campioni di Jatropha dovrebbe avere un contenuto di proteine sul secco più elevato

5. Ottimizzazione di un protocollo sperimentale di purificazione delle proteine contenute nella miscela di Jatropha

# OS1: Determinazione del contenuto proteico delle farine



Concentrazione della parte solubile		
Campioni	Biorad 1° set sperimentale (mg/ml)	Biorad 2° set sperimentale (mg/ml)
Farina di fagiolo	0,04	0,029
Zeina	0,004	0,004
Soia	0,04	0,052
Jatropha	0,006	0,011
Farina di vinacciolo	0,03	0,09
Farina di cotone	0,05	0,022
SOYAD TS8200	0,11	0,043
Jatropha PEC	0,02	0,01
Jatropha VIS	0,015	0,012

- ✓ Solubilizzazione in 20 mM fosfato di sodio pH 7.4 ON a 25 °C
- ✓ Centrifugazione 30 min a 13000 rpm a 4°C
- ✓ Preparazione dei campioni per il saggio Bradford

BSA è utilizzata per la determinazione della retta di taratura

# OS1.1 Determinazione mediante metodo Kjeldahl



Mineralizzazione



Distillazione dell'NH<sub>3</sub>

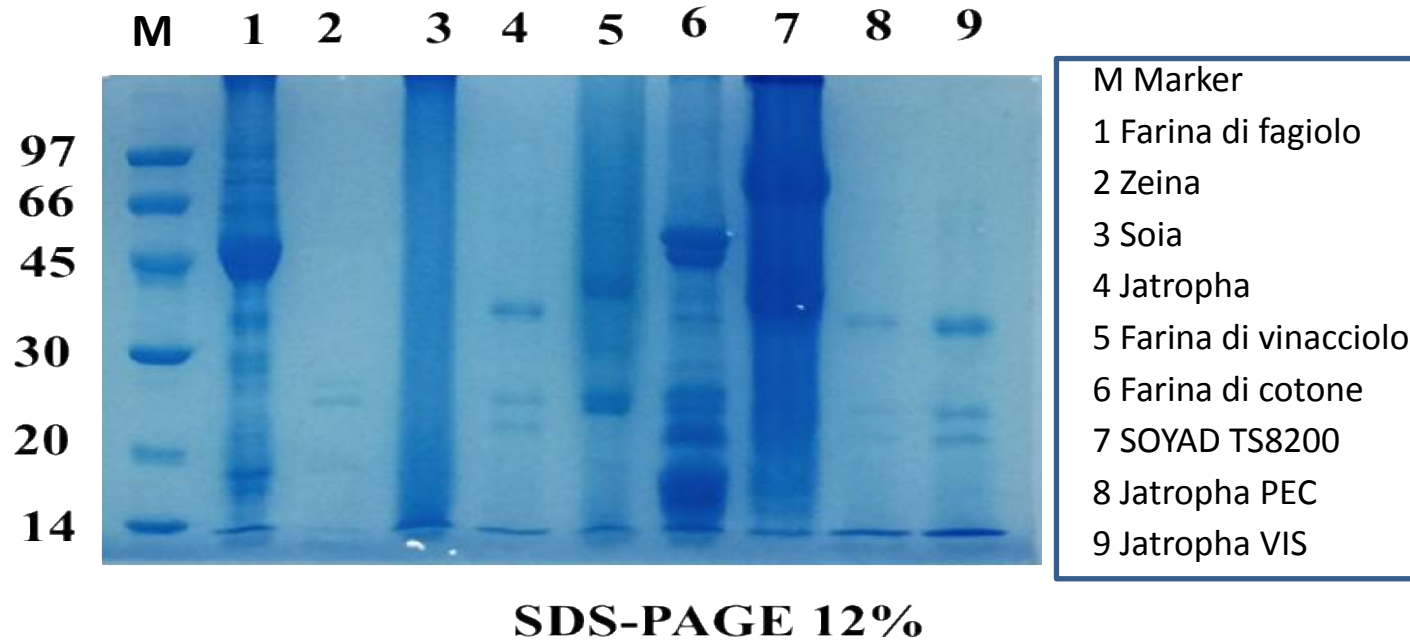


Titolazione dell'ammonica prodotta



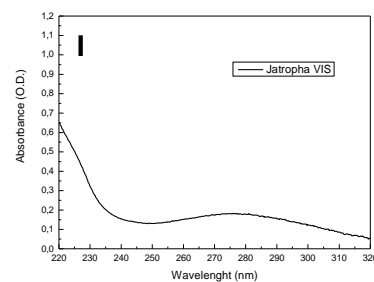
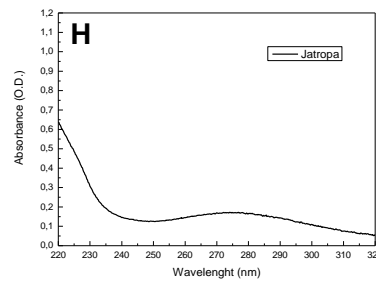
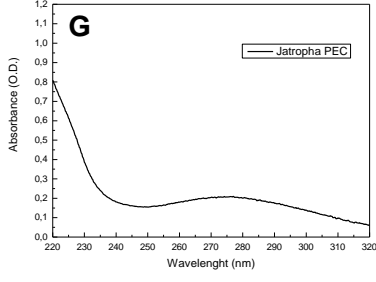
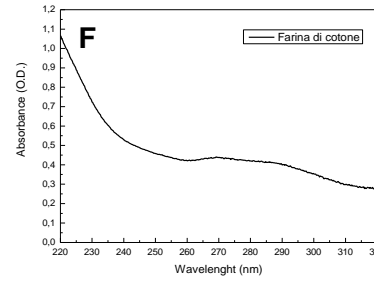
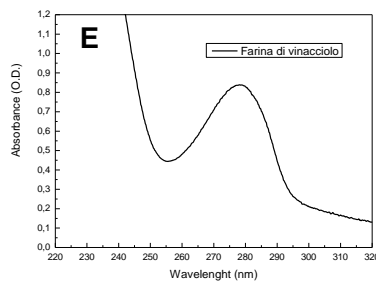
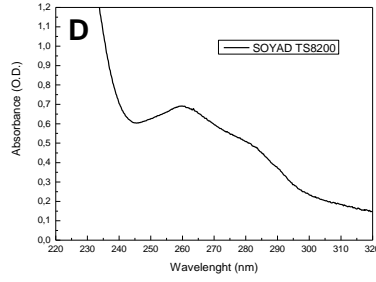
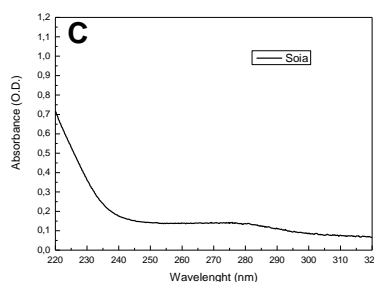
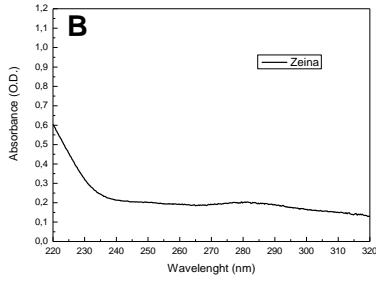
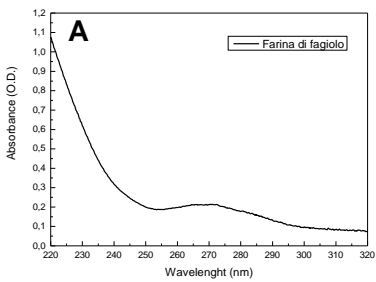
Campione	Proteine %
Cotone	52.7
Fagiolo	25.1
Soia	77.1
Saoyad 1582	48.3
Vinacciolo	12.7
Zeina	61.3
Jatropha VIS	67.9
Jatropha PEC	55.9
Jatropha	61.4

## OS2: Caratterizzazione mediante elettroforesi su gel di poli-acrilammide (SDS-PAGE) in condizione denaturanti dei campioni



- ✓ Centrifugazione 30 minuti a 15000 rpm (1.5 ml di campione)
- ✓ Campioni sono stati portati a secco in Savant e risospesi in 30  $\mu$ L di acqua e *loading buffer*.
- ✓ Denaturazione 10 minuti a 100 °C e 10  $\mu$ L di ogni campione è stato caricato su un gel in condizioni denaturanti alla concentrazione di acrilamide 12%.

# OS3: Caratterizzazione mediante spettroscopia di assorbimento delle farine

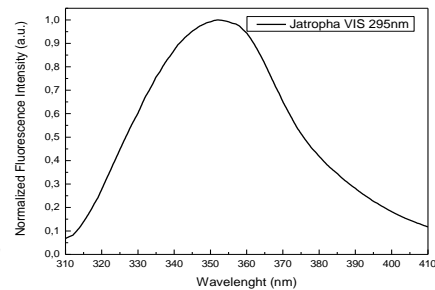
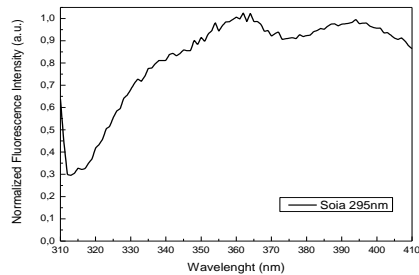
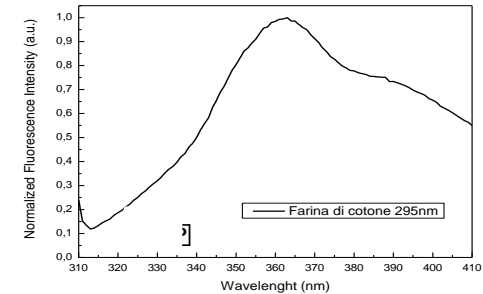
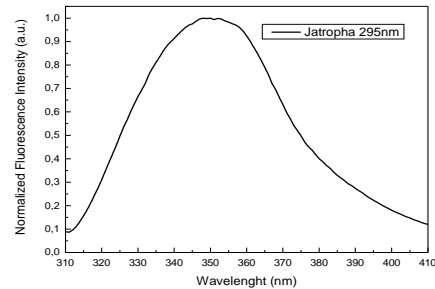
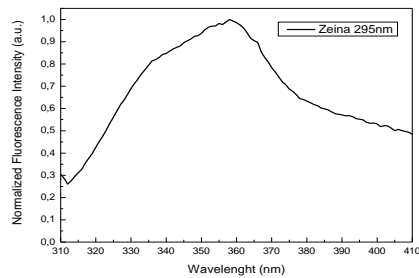
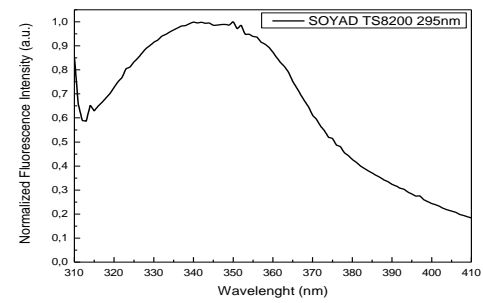
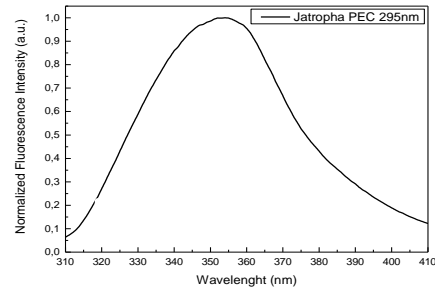
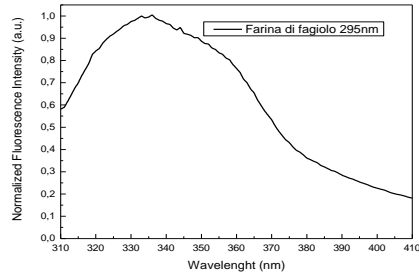


- A. Farina di fagiolo
- B. Zeina
- C. Soia
- D. SOYAD TS8200
- E. Farina di vinacciolo
- F. Farina di cotone
- G. Jatropha PEC
- H. Jatropha
- I. Jatropha VIS

[Farina] = 1mg/ml  
V = 1 ml  
T = 25°C  
Lunghezza d'onda: 220-320 nm



# OS4: Caratterizzazione mediante spettroscopia di fluorescenza statica

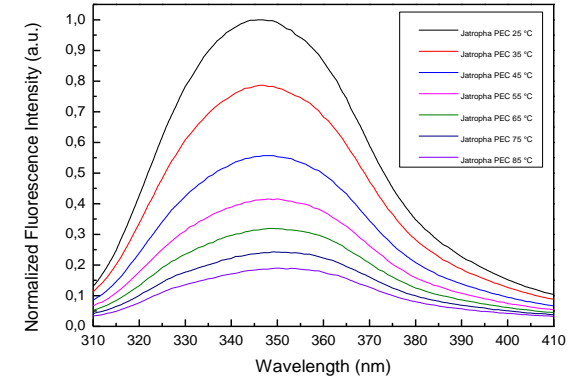
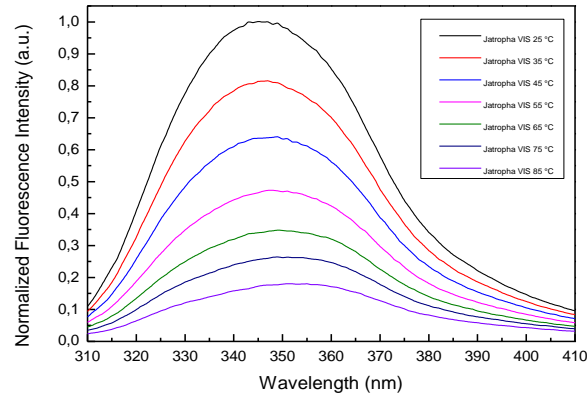
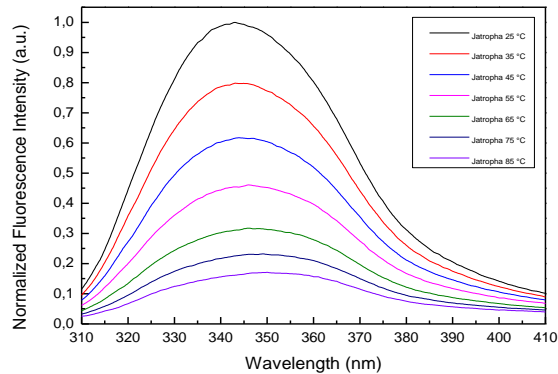


0.1 OD at 295 nm  
Ecc= 295 nm  
Em= 310-410 nm  
T = 25 °C

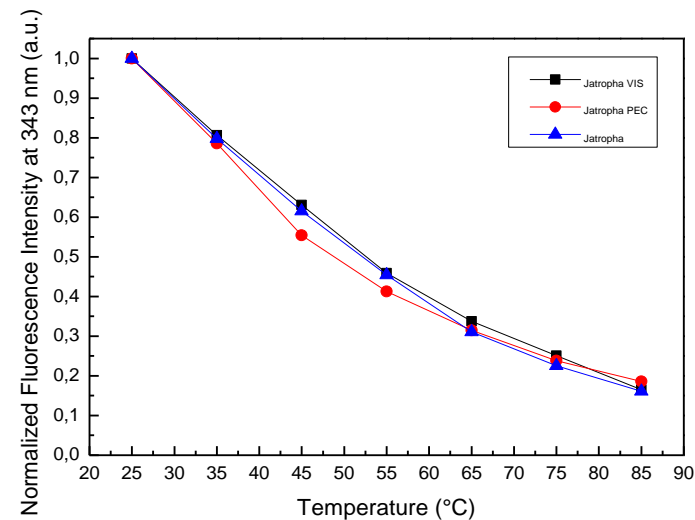
# OS5. Determinazione della stabilità termica dei campioni di Jatropha



## Denaturazione nell'intervallo 25-85 °C Jatropha, Jatropha Vis e Jatropha PEC

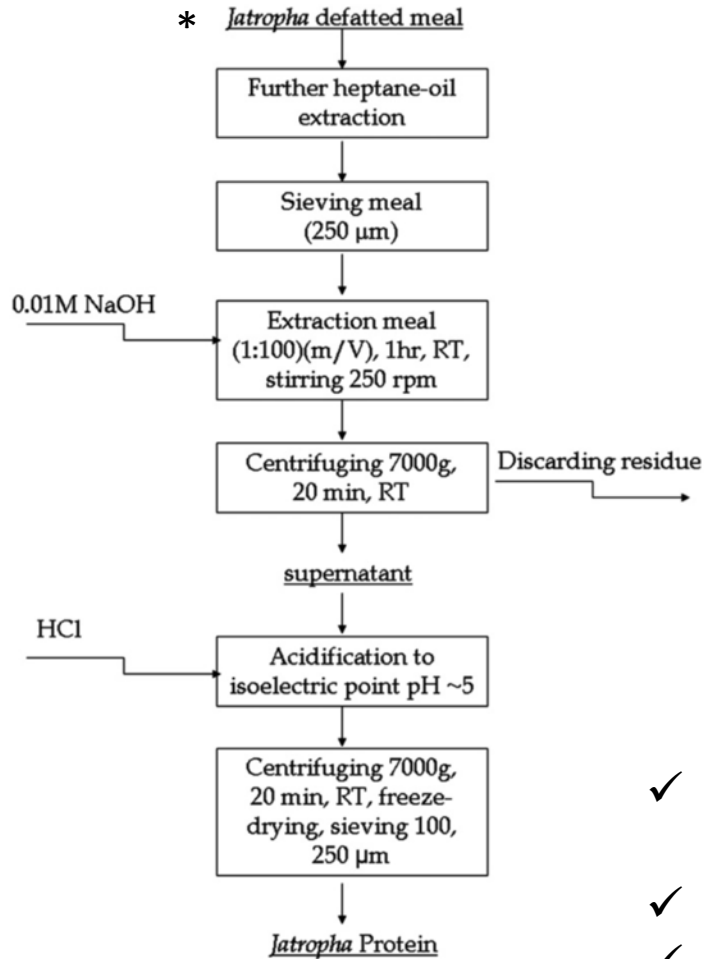


0.1 OD at 295 nm  
Ec.= 295 nm  
Em.= 310-410 nm  
T = 25-85 °C





# OS5: Ottimizzazione di un protocollo sperimentale di purificazione delle proteine contenute nella miscela di Jatropha



## Estratto proteico Jatropha



## Solubilizzazione

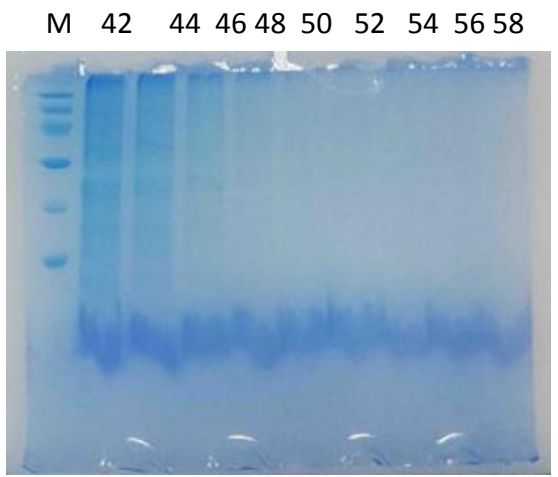
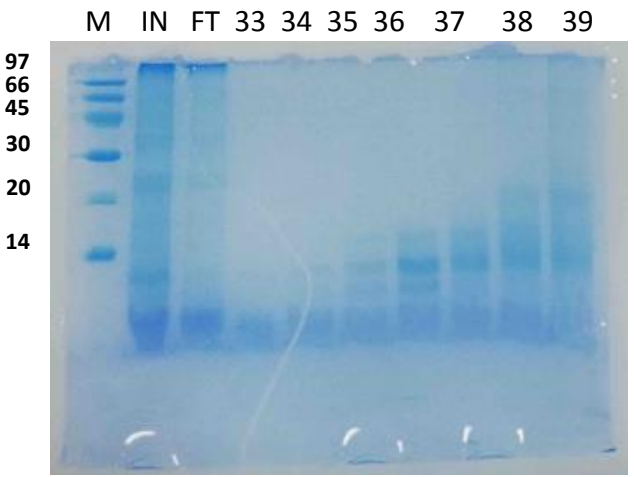
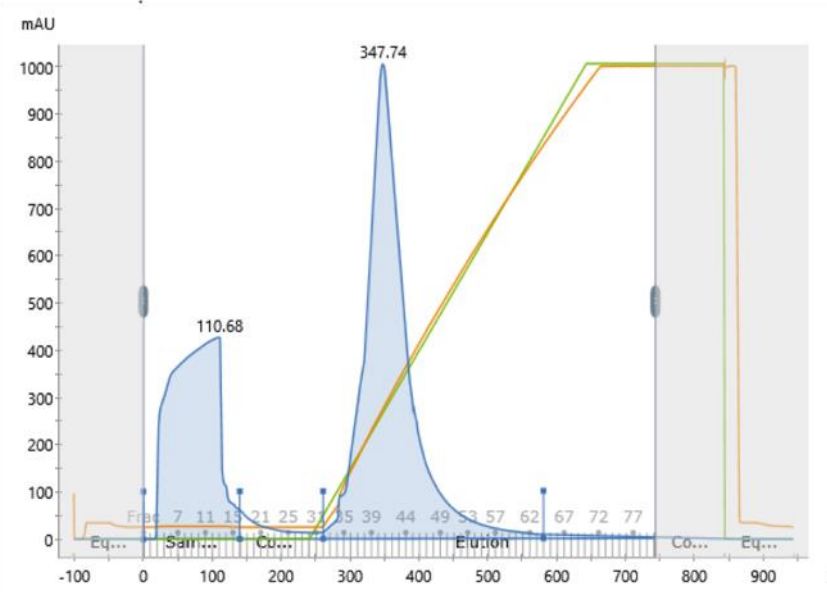
- ✓ 1.0 g estratto proteico solubilizzato a RT per 48 h sotto agitazione pH 11.5
- ✓ Centrifugazione 30 min a 14000 rpm
- ✓ Dialisi ON contro PBS pH.7.4

# OS5: Ottimizzazione di un protocollo sperimentale di purificazione delle proteine contenute nella miscela di Jatropha



## DEAE-Sepharose Fast Flow

- ✓ Equilibrata in 20 mM fosfato di Sodio, pH 7.0.
- ✓ Lavaggio 20 mM fosfato di Sodio, pH 7.0
- ✓ Gradiente lineare 0 -1,5 M NaCl in 20 mM fosfato di Sodio, pH 7.0.



Liofilizzazione delle  
miscela  
e prove d'incollaggio

# Conclusioni



- ✓ Determinato mediante saggio Kjeldahl il contenuto proteico dei diversi campioni
- ✓ Caratterizzato il profilo proteico mediante elettroforesi in condizioni denaturanti.
- ✓ Caratterizzato mediante spettroscopia di assorbimento e fluorescenza statica i campioni di farina selezionati
- ✓ Determinato la stabilità a diverse temperature dei campioni di Jatropha, Jatropha ViS e Jatropha PEC.
- ✓ Messa a punto e ottimizzato un protocollo per la purificazione delle proteine contenute nella miscela di Jatropha.



Istituto di Scienze dell' Alimentazione  
Consiglio Nazionale delle Ricerche

**Dr. Sabato D'Auria**

Laboratory Head and Acting Director of ISA -CNR

Dr. Maria Staiano

Dr. Antonio Varriale

Dr. Alessandra Camarca

Dr. Angela Pennacchio

Dr. Alessandro Capo

