

UNIVERSITA' DEGLI STUDI FEDERICO II DI NAPOLI

FACOLTA' DI SCIENZE BIOTECNOLOGICHE

CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN BIOTECNOLOGIE

MOLECOLARI ED INDUSTRIALI

**PURIFICAZIONE ED IDENTIFICAZIONE DELLE
PROTEINE DI RISERVA DAL SEME DI COTONE,**

GOSSYPIUM SPP.

VALERIA AIELLO

TESI SPERIMENTALE DI LAUREA

Relatore: Chiar.^{mo} Prof. Gennaro Marino

ANNO ACCADEMICO 2008/2009

Indice

Introduzione	3
1. Il cotone	4
2. Le proteine di riserva del seme di cotone	6
3. Le Viciline e le Legumine	7
4. La Spettrometria di Massa a Desorbimento /Ionizzazione Laser Assistita da Matrice (MALDI)	9
5. La Spettrometria di Massa applicata agli studi di proteomica	17
6. MASCOT	21
7. Scopo della ricerca	26
8. Materiali e metodi	28
9. Tecniche di solubilizzazione della componente proteica	29
10. Eliminazione dei lipidi dal seme di cotone	29
11. Estrazione totale	30
12. Estrazione frazione solubile/frazione insolubile.	30
13. Desalificazione della frazione solubile	31
14. Separazione mediante RP-HPLC delle frazioni proteiche	31
15. Elettroforesi monodimensionale (SDS-PAGE)	32
16. Elettroforesi bidimensionale su Gel (2D-PAGE)	33
17. Digestione in-gel delle proteine	39
18. MALDI-MS	40
19. Analisi Bio-informatica	42
20. Risultati e discussione	44
21. Analisi RP/HPLC con rivelazione UV ed analisi MALDI/MS off-line delle frazioni	44

22.	MALDI/MS	46
23.	Elettroforesi bidimensionale 2D-PAGE	47
24.	Digestione in-gel delle proteine e analisi MALDI/MS	48
25.	Conclusioni	52
26.	Tabelle e figure	56
	Ringraziamenti	61
	Bibliografia	62

Introduzione

Le principali cause all'origine dei problemi di fermentazione costituiscono un ampio oggetto di studio da diversi anni. Tra i fattori che influenzano l'attività e la vitalità dei microrganismi bisogna considerare la qualità degli elementi nutritivi utilizzati nel brodo di fermentazione. La fonte di azoto organica è di cruciale importanza per un opportuno andamento della processo. Le farine di semi di cotone sono ampiamente utilizzate come nutriente organico nella preparazione dei terreni di coltura. Possono sostenere la crescita di un'ampia varietà di microrganismi e sono utilizzate nella produzione di diversi antibiotici per uso umano o veterinario, steroidi, enzimi, pesticidi biologici ed erbicidi ed altri agenti ottenuti per fermentazione.

La qualità della porzione proteica contenuta riveste una fondamentale importanza per la conduzione del processo fermentativo. Si ritiene pertanto che attraverso la messa a punto di un protocollo di purificazione e identificazione delle proteine di riserva del seme di cotone, si possano fornire elementi utili per la comprensione delle caratteristiche degli sfarinati di origine industriale.