

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

DÉVELOPPEMENT DE MÉTHODOLOGIES ÉCORESPONSABLES
POUR L'EXTRACTION DE LA KÉRATINE PROVENANT DE
DIVERSES MATIÈRES PREMIÈRES RENOUVELABLES

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE EXTENSIONNÉE DE
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PAR
ANABELLE CARBONNEAU

JUILLET 2023

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail de recherche, je tiens à remercier mes directeurs de recherche, André Lajeunesse et le professeur François Brouillette, pour leur soutien et leurs conseils apportés tout au long de ce projet. Je tiens également à remercier mon codirecteur le professeur Simon Barnabé pour ses précieux conseils apportés au cours de la réalisation de ce projet et de la rédaction de ce mémoire.

Je remercie également nos partenaires Michael Germain, Benoit St-Amand et David Cossette pour leur idée, leur support et leur collaboration tout au long du projet.

J'aimerais également remercier Jocelyn Bouchard, Jean-Philippe Martineau, Vickie Beaupré et Alexandre Brisson pour toute l'aide apportée au niveau des différentes analyses réalisées dans le cadre de ce projet.

Je remercie également Isabelle Boulan pour sa collaboration tout au long du projet dans la gestion du matériel et des réactifs commandés pour la réalisation des différents essais.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin à compléter ce projet de recherche.

DÉDICACE

À Lise et Sylvain

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
DÉDICACE	iii
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ÉQUATIONS	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xiii
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xv
RÉSUMÉ	xvi
ABSTRACT	xvii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I REVUE DE LITTÉRATURE	3
1.1 La kératine	3
1.2 Méthodes d'extraction de la kératine.....	5
1.3 Objectifs et stratégie de la recherche.....	9
CHAPITRE II MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	11
2.1 Extraction de la kératine (résultats dans chapitre III).....	11
2.1.1 Optimisation des méthodologies d'extraction de la kératine.....	12
2.2 Caractérisation de la kératine extraite	13
2.2.1 Électrophorèse sur gel (SDS-PAGE).....	13
2.2.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	13
2.3 Quantification de la kératine extraite.....	14
2.3.1 Quantification protéique – Bradford.....	14
2.3.2 Analyse de la composition en acides aminés par chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-PDA)	15

CHAPITRE III OPTIMISATION DE LA MÉTHODE D'EXTRACTION.....	18
3.1 Optimisation des paramètres d'extraction de la kératine provenant des cheveux humains	18
3.2 Optimisation des paramètres d'extraction de la kératine provenant de la laine de mouton	22
CHAPITRE IV CARACTÉRISATION DE LA KÉRATINE EXTRAITE	28
4.1 Électrophorèse sur gel (SDS-PAGE).....	28
4.1.1 Poids moléculaires de la kératine extraite à partir de cheveux humains.....	30
4.1.2 Poids moléculaires de la kératine extraite à partir de la laine de mouton	33
4.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	35
4.2.1 Groupes fonctionnels et liaisons moléculaires de la kératine extraite à partir des cheveux humains.....	35
4.2.2 Groupes fonctionnels et liaisons moléculaires de la kératine extraite à partir de la laine de mouton.....	37
CHAPITRE V QUANTIFICATION DE LA KÉRATINE EXTRAITE	40
5.1 Quantification protéique – Bradford.....	40
5.1.1 Quantification protéique de l'extrait de kératine à partir des cheveux humains.....	41
5.1.2 Quantification protéique de l'extrait de kératine à partir de la laine de mouton	44
5.1.3 Limitations de la méthode d'analyse	46
5.2 Analyse de la composition en acides aminés par chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-PDA).....	48
5.2.1 Limitations de la méthode d'analyse	53
5.2.2 Analyse de la composition en acide aminé dans l'extrait de kératine provenant des cheveux humains	53
5.2.3 Analyse de la composition en acide aminé dans l'extrait de kératine provenant de la laine de mouton.....	58
5.3 Limitations du projet de recherche	62
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	64

ANNEXE A CONDITIONS DE PRÉPARATION DÉTAILLÉES POUR L'ANALYSE DES POIDS MOLÉCULAIRES PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL (SDS-PAGE)	65
ANNEXE B COURBES D'ÉTALONNAGE DE LA MÉTHODE DE DOSAGE BRADFORD.....	68
ANNEXE C CHROMATOGRAMMES INDIVIDUELS DES 18 ACIDES AMINÉS POUR L'IDENTIFICATION DES TEMPS DE RÉTENTION ET DES ÉCHANTILLONS.....	71
RÉFÉRENCES.....	94

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Structures secondaires de la kératine (Feuillets beta et hélices alpha).....	4
1.2 Squelette polypeptidique (a) et structure 3D de la kératine représentant les liaisons inter et intramoléculaires dont les ponts disulfures entre les hélices alpha.....	4
1.3 Différentes méthodes d'extraction de la kératine.....	5
1.4 Mécanisme de réduction de la liaison disulfure par la L-cystéine.....	9
3.1 Rendement de kératine extraite à partir des cheveux humains en fonction du pH, à une concentration d'urée de 8 M et une température de 75-80 °C (n ≥ 2)	19
3.2 Rendement de kératine extraite à partir des cheveux humains en fonction de la concentration d'urée, à une température de 80 °C et un pH de 8 (n ≥ 2).....	20
3.3 Rendement de kératine extraite à partir des cheveux humains en fonction de la température, à une concentration d'urée de 8 mol/L et un pH de 8 (n ≥ 2)	21
3.4 Rendement de kératine extraite à partir de la laine de mouton en fonction du pH, à une concentration d'urée de 8 M et une température de 80 °C (n = 2 à 4).....	23
3.5 Extraits de kératine provenant de la laine. Produits obtenus avec un rendement de 73,25 % (gauche) et 152,63 % (droite).....	24
3.6 Rendement de kératine extraite à partir de la laine de mouton en fonction de la concentration d'urée, à une température de 80 °C et un pH de 8 (n = 2 à 4).....	24

3.7	Rendement de kératine extraite à partir de la laine de mouton en fonction de la température à une concentration d'urée de 8 mol/L et un pH de 11 ($n \geq 4$)	26
4.1	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12 %) de la kératine extraite à partir de la laine de mouton et des cheveux humains (Rangée 1 : KL 1X, Rangée 2 : KL 2X, Rangée 3 : KC 1X, Rangée 4 : KC 2X).....	29
4.2	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (15%) de la kératine extraite à partir de cheveux humains (Rangée 1 : KC#1, Rangée 2 : KC#2, Rangée 3 : KC#3, Rangée 4 : Blanc).....	31
4.3	Détermination des poids moléculaires des extraits de kératine obtenus à partir de cheveux humains	32
4.4	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (15%) de la kératine extraite à partir de la laine de mouton (Rangée 1 : Blanc, Rangée 2 : KL#1, Rangée 3 : KL#2, Rangée 4 : KL#3).....	33
4.5	Détermination des poids moléculaires des extraits de kératine obtenus à partir de la laine de mouton	34
4.6	Spectres FTIR ($600-4000\text{ cm}^{-1}$) d'un échantillon de cheveux (haut) et d'un échantillon de kératine extraite à partir des cheveux humains (bas)	36
4.7	Spectres FTIR ($600-4000\text{ cm}^{-1}$) d'un échantillon de laine de mouton (haut) et d'un échantillon de kératine extraite à partir de la laine de mouton (bas)....	38
5.1	Échantillons en solution (DTT 60 mM). Extrait de kératine provenant de la laine (gauche) et extrait provenant des cheveux humains (droite)	41
5.2	Angle de contact de l'eau sur l'extrait de kératine à partir des cheveux humains.....	47
5.3	Angle de contact de l'eau sur l'extrait de kératine à partir de la laine de mouton	48
5.4	Chromatogramme de la solution contenant 16 standards d'acides aminés (1-Asp, 2-Glu, 3-Ser, 4-Gly, 5-Thr, 6-Ala, 7-Pro, 8-Arg, 9-Val, 10-Met, 11-Ile, 12-Leu, 13-Phe, 14-FMOC-OH, 15-Orn, 16-Lys, 17-Cys, 18 à 28-Résidus FMOC & pics non identifiés, 29-FMOC-ADAM).....	50
5.5	Structure chimique de l'ornithine	52

5.6	Proportion des différents acides aminés des échantillons de cheveux humains et de la kératine extraite	54
5.7	Proportion des différents acides aminés des échantillons de laine de mouton et de la kératine.....	59

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Méthodes d'extraction de la kératine à partir des cheveux humains.....	6
1.2 Méthodes d'extraction de la kératine à partir de la laine de mouton	7
2.1 Gradient de la chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-PDA) pour l'analyse des acides aminés des standards et des échantillons de kératine à 50 °C	17
3.1 Paramètres optimaux d'extraction de la kératine à partir des cheveux humains.....	22
3.2 Paramètres optimaux d'extraction de la kératine à partir de la laine de mouton	27
4.1 Nombre d'onde du spectre de l'extrait de kératine à partir des cheveux humains et assignation des différentes bandes caractéristiques	37
4.2 Nombres d'onde du spectre de l'extrait de kératine à partir de la laine de mouton et assignation des différentes bandes caractéristiques	39
5.1 Rendements (%) de la quantité de protéines dans les extraits de kératine à partir des cheveux humains obtenus à partir de la courbe d'étalonnage #1...	42
5.2 Rendements (%) de la quantité de protéines dans les extraits de kératine à partir des cheveux humains obtenus à partir de la courbe d'étalonnage #2	43
5.3 Rendements (%) de la quantité de protéines dans les extraits de kératine à partir de la laine de mouton obtenus à partir de la courbe d'étalonnage #2	44
5.4 Rendements (%) de la quantité de protéines dans les extraits de kératine à partir de la laine de mouton obtenus à partir de la courbe d'étalonnage #3	45
5.5 Temps de rétention des différents acides aminés	51

5.6	Résultats obtenus à la suite de l'analyse des acides aminés des échantillons de cheveux humains.....	57
5.7	Résultats obtenus à la suite de l'analyse des acides aminés des échantillons de kératine extraite (à partir des cheveux humains)	58
5.8	Résultats obtenus à la suite de l'analyse des acides aminés des échantillons de laine de mouton.....	60
5.9	Résultats obtenus à la suite de l'analyse des acides aminés de kératine extraite (à partir de la laine de mouton).....	61

LISTE DES ÉQUATIONS

Équation	Page
2.1 $R = \frac{m_{finale}}{P \times m_{initiale}} \times 100$	30

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ADAM.HCl	Adamantane hydrochloride (Chlorhydrate d'adamantane)
Ala	Alanine
Arg	Arginine
Asp	Acide aspartique
BmimCl	1-Butyl-3-methylimidazolium chloride (Chlorure de 1-butyl-3-méthylimidazolium)
Cys	Cystéine
DTT	Dithiothréitol
Fmoc.Cl	9-Fluorenylmethyl chloroformate (chlorure de fluorénylméthoxycarbonyle)
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
Glu	Acide glutamique
Gly	Glycine
His	Histidine
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie liquide à haute performance)
Ile	Isoleucine
KC	Kératine extraite des cheveux
KL	Kératine extraite de la laine
Leu	Leucine

Lys	Lysine
MEC	Mercaptoéthanol
Met	Méthionine
Orn	Ornithine
PDA	Détecteur à barrette de diodes
Phe	Phénylalanine
Pro	Proline
Qté	Quantité
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Dodécylsulfate de sodium)
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
Ser	Serine
TBAH	Hydroxyde de tétrabutylammonium
Thr	Threonine
Tris	Tris(hydroxy-méthyl)-amino-méthane
Tyr	Tyrosine
Val	Valine

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

n	Nombre de répliques
T_{amb}	Température ambiante
t_R	Temps de rétention

RÉSUMÉ

À chaque année, plusieurs tonnes de déchets sont produites. Parmi ceux-ci se trouvent des biomasses comprenant de précieuses matières premières pouvant être réutilisées pour diverses applications. La kératine, la protéine et composante principale entre autres de la laine et des cheveux humains, figure parmi l'une de ces matières premières qui pourraient être récupérées et utilisées dans divers domaines, tels que l'agriculture, l'environnement, le biomédical, les cosmétiques et plusieurs autres. À eux seuls, les salons de coiffure et l'industrie du textile produisent plusieurs tonnes de biomasses pouvant être valorisées dans l'extraction de la kératine. Le but de ce projet consiste à développer une méthode éco-responsable d'extraction de la kératine à partir de deux matières premières renouvelables : les cheveux humains et la laine de mouton. Pour ce faire, des réactifs peu nocifs pour l'environnement seront utilisés, tels que l'urée et la L-cystéine. À partir de cette méthode, il a été possible d'extraire 71 % de kératine à partir de la laine de mouton et 66 % à partir des cheveux humains. Suite à des analyses de spectroscopie infrarouge à transformées de Fourier (FT-IR), de poids moléculaires par électrophorèse sur gel (SDS-PAGE) et la quantification protéique par dosage Bradford ainsi que les proportions d'acides aminés par chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-PDA), il est possible de conclure que l'extrait obtenu est bel et bien la kératine pour les deux matières premières renouvelables.

Mots clés : kératine, cheveux humains, laine, protéine, extraction

ABSTRACT

Every year, many tons of waste are produced. Among these are biomasses containing valuable raw materials that can be reused for various applications. Keratin, the protein and main component of wool and human hair, is one of these raw materials that could be recovered and used in various fields, such as agriculture, environment, biomedical, cosmetics and many others. Hair salons and the textile industry alone produce several tons of biomass that could be used in the extraction of keratin. The goal of this project is to develop an eco-responsible method of extracting keratin from two renewable raw materials: human hair and sheep's wool. To do so, reagents that are not harmful to the environment will be used, such as urea and L-cysteine. Using this method, it was possible to extract 71% keratin from sheep wool and 66% from human hair. Following analyses of Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), molecular weight by gel electrophoresis (SDS-PAGE) and protein quantification by Bradford assay as well as the proportions of amino acids by liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-PDA), it is possible to conclude that the extract obtained from the two renewable raw materials is indeed keratin.

Keywords: Keratin, human hair, wool, protein, extraction

INTRODUCTION

La production de plusieurs tonnes de déchets par de nombreuses industries ne cesse d'augmenter chaque année. Parmi ceux-ci, il y en a qui proviennent de produits naturels et de matières premières renouvelables. Au sein de ces biomasses retrouvées en abondance figurent celles dont la composante principale est la kératine. Plusieurs produits contenant de la kératine (plumes, laine de mouton, sabot de bovins et cheveux humains coupés) sont jetés en grande quantité chaque année sans utilisations ultérieures. Il est estimé qu'environ 0,3 million de tonnes de cheveux humains sont jetées annuellement [1]. Quant à la laine, plus de 2,5 millions de tonnes sont produites chaque année à travers le monde [2]. Les déchets de laine comprennent entre autres la laine de faible qualité, les sous-produits de la fibre de laine et les produits secondaires obtenus par l'industrie du textile [2]. Par conséquent, ces déchets dits « naturels » sont gaspillés et deviennent dans certains cas des polluants pour l'environnement puisque de larges quantités sont jetées ou brûlées annuellement [2].

À ce jour, quelques études rapportent l'utilisation d'une partie de matières premières renouvelables provenant de plumes, de laine et de cheveux humains afin d'extraire la kératine qui est la principale composante de ces biomasses (jusqu'à 80 à 95 % de la composition) [3-6]. En comparaison à d'autres produits, la kératine ne contient pas de composants néfastes ou toxiques; elle peut donc être utilisée dans la conception de produits utiles pour de nombreuses applications dans la société. À titre d'exemples, la kératine représente un grand intérêt en pharmaceutiques et cosmétiques (fabrication de crèmes, shampoings, etc.), en agriculture et dans l'industrie bovine (transformation en fertilisants et suppléments alimentaires pour les ruminants) et en environnement

(conception d'adsorbants pour la purification des eaux usées) [4, 7]. Plus précisément, il est connu que les matières kératineuses peuvent absorber des substances toxiques telles que des ions de métaux lourds [7, 8] et d'autres composés dangereux tels que le formaldéhyde [9]. Ainsi, il y aurait possibilité d'utiliser la kératine extraite pour la purification de l'eau et le nettoyage de l'air [10].

Ce travail est présenté en trois sections principales : d'abord, la revue de littérature (Chapitre I) énumère les différentes méthodes d'extraction possibles de la kératine ainsi que les différentes propriétés de celle-ci. La seconde section (Chapitre II) décrit la méthode d'extraction utilisée ainsi que les différentes méthodes de caractérisation et de quantification du produit obtenu. La troisième section (Chapitres III, IV et V) présente les résultats obtenus et leurs interprétations. Ce travail se conclut par une discussion générale et une présentation de perspectives.

CHAPITRE I

REVUE DE LITTÉRATURE

Dans ce chapitre, les éléments théoriques sur la kératine ainsi que sur les méthodes d'extraction courantes seront présentés.

1.1 La kératine

La kératine est un polypeptide hautement stable tridimensionnel composé d'une triple hélice de chaînes protéiques qui sont maintenues par des interactions covalentes (liaisons disulfures de l'acide aminé : la cystéine) et non covalentes [4, 11]. L'ensemble de ses liaisons la rend insoluble dans la majorité des solvants organiques [4]. La kératine se trouve principalement sous deux formes : α -kératine et β -kératine [4]. La principale différence entre ces deux types de kératine est au niveau de la structure secondaire de la protéine, comme représentée à la figure 1.1. D'un point de vue structurel, sa haute stabilité est en majeure partie due à la liaison disulfure de la cystéine, mais également par la présence de liaisons ioniques et hydrogènes ainsi que des interactions hydrophobes (voir Figure 1.2) [11].

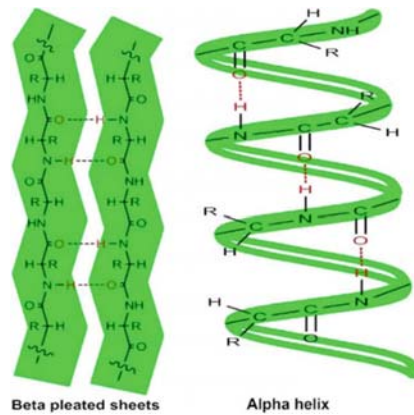


Figure 1.1 Structures secondaires de la kératine (Feuillets beta et hélices alpha) [12].

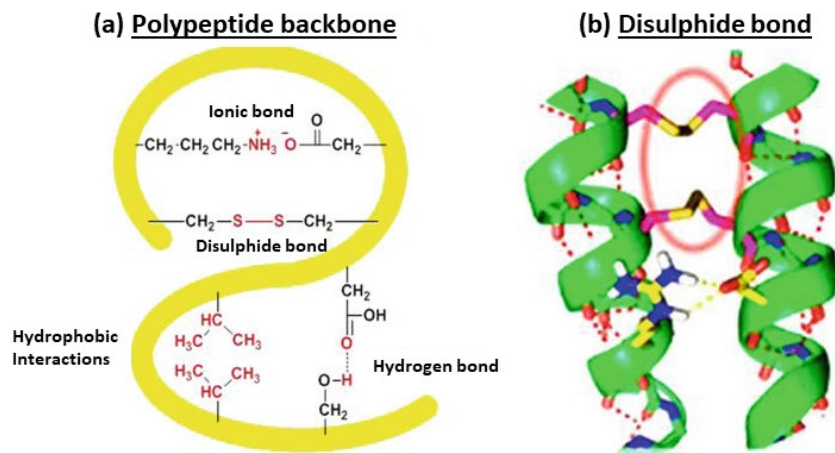


Figure 1.2 Squelette polypeptidique (a) et structure 3D de la kératine représentant les liaisons inter et intramoléculaires dont les ponts disulfures entre les hélices alpha [12, 13].

Généralement, l' α -kératine est présente chez les mammifères et il s'agit du constituant majoritaire de la laine, des cheveux, des ongles, des cornes et de la couche externe de la peau. Quant à la β -kératine, elle se trouve davantage chez les oiseaux et les reptiles. Il s'agit de la composante principale des plumes, des griffes, des becs d'oiseaux ainsi que des écailles et des griffes de reptiles [14, 15].

Une des principales distinctions entre les sources naturelles de kératine est la proportion de l'acide aminé cystéine présente dans chacune d'elle. Le contenu en cystéine est d'environ 7 % dans les plumes, 11-17 % dans la laine et 7-8 % dans les cheveux humains [16, 17]. La teneur en cystéine supérieure de la laine est d'ailleurs une des raisons pour laquelle le rendement d'extraction de cette biomasse est inférieur. Comme sa proportion en cystéine est plus grande, elle possède une plus grande quantité de ponts disulfures, ce qui augmente la difficulté de sa solubilisation [18].

En fait, le principal défi dans la valorisation de la kératine demeure la capacité d'extraire une quantité suffisante de celle-ci pour que l'efficacité de la méthode d'extraction soit maximale tout en procurant une bonne rentabilité selon le coût des réactifs utilisés.

1.2 Méthodes d'extraction de la kératine

Jusqu'à présent, plusieurs méthodes d'extraction de la kératine ont été évaluées : oxydation, réduction, explosion de vapeur, hydrolyse enzymatique, sulfitolyse, etc. Un schéma résume l'ensemble de ces méthodes d'extraction à la figure 1.3.

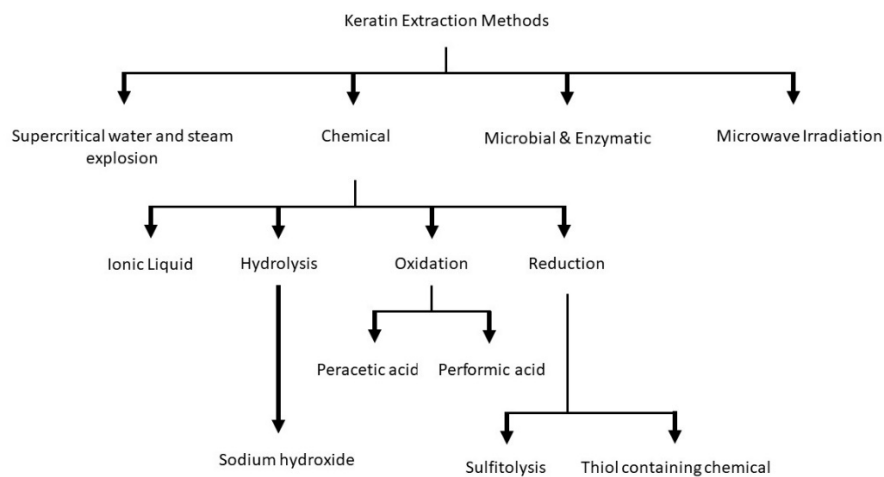


Figure 1.3 Différentes méthodes d'extraction de la kératine [12].

À cause de sa structure et de ses chaînes polypeptidiques, la kératine figure parmi les protéines les plus complexes à solubiliser [5, 6, 19]. En effet, pour y parvenir, il faut cliver les liaisons disulfures et hydrogènes de la protéine sans briser ses liens peptidiques [20, 21]. Ainsi, les principaux moyens utilisés pour parvenir à la solubilisation sont par l'utilisation d'acides ou de bases, par hydrolyse enzymatique et par sulfitoxydation. Cependant, les agents réducteurs ou oxydants utilisés pour le clivage de la liaison disulfure, soit les sulfites, les thiols ou les peroxydes, sont nocifs, toxiques et difficiles à manipuler [10]. D'autres méthodes employant des moyens « physiques » sont également utilisées, telles que l'extraction par explosion de vapeur et l'irradiation micro-onde. Un résumé de toutes ces différentes méthodes, pour chacune des deux matières premières, ainsi que leur rendement d'extraction respectif, se trouve dans les tableaux 1.1 et 1.2.

Tableau 1.1

Méthodes d'extraction de la kératine à partir des cheveux humains

Méthodes	Réactifs	Conditions	Rendement	Référence(s)
Réduction	Tris-HCl (0.25 M), Thio-urée (5.2 M), urée (5 M) et 15 % MEC	50 °C pendant 24 h	64 %	[22]
	Urée (5 M), Thio-urée (2.4 M), DTT (5 %) et Tris-HCl (0.25 M)	50 °C, pH 8.5 pendant 48 h	67 %	[23]
Oxydation	Acide peracétique (2 %)	37 °C pendant 10 h	Extraction : N/A Protéines dans l'extrait sec : 99,2 %	[24]
Hydrolyse alcaline	NaOH (6 g/L) et SDS (15 g/L)	80 °C pendant 3 h	75,3 %	[25]
Liquides ioniques	TBAH (40 %)	Atmosphère d'azote gazeux à T _{amb} pendant 9 h	36-38 %	[5]

Tableau 1.2

Méthodes d'extraction de la kératine à partir de la laine de mouton

Méthodes	Réactifs	Conditions	Rendement (%)	Référence(s)
Réduction	MEC (mercaptoéthanol) (0.14 M) et urée (8 M)	pH = 10,5 à 20 °C pendant 3 h	80	[26]
	Acide thioglycolique (0.2 M) et urée (6-10 M)	pH = 11 à 40 °C pendant 2 h	91	[27]
Oxydation	Acide performique (CH ₂ O ₃)	N/A	5-6	[28]
Irradiation micro- onde	N/A	150-180 °C jusqu'à 60 minutes	60	[29]
Hydrolyse alcaline	Hydroxyde de sodium (NaOH) (5 %)		43,5	
	Oxyde de calcium (CaO) (10 %)	80 °C sous agitation (12 h) et statique (8 h)	36,2	[30]
	Hydroxyde de potassium (KOH) (5 %)		16,2	
Explosion de vapeur	Eau	220 °C pendant 10 minutes + ↓ rapide de la pression	62,7 (solide) 18,7 (protéines solubles)	[10]
Sulfitolyse	NaHSO ₃ (0,5 M), LiBr (0,1 M), SDS (0,02 M)	90 °C pendant 4 h, pH = 12	50,2	[31]
Liquides ioniques	[Bmim]Cl	120 °C pendant 30 minutes Ratio solide/liquide : 1:6	57,4	[32]

Certaines de ces méthodes procurent des rendements plutôt élevés, mais le temps de réaction nécessaire à la dissolution de la kératine et la toxicité de la plupart des réactifs utilisés dans ces méthodes les rendent moins attrayantes. De plus, la quantité et la qualité de kératine régénérée peuvent être affectées par la méthode d'extraction choisie et cela limite son potentiel d'utilisation pour de futures applications [33]. Cet aspect explique en grande partie pourquoi la plupart des méthodes ne sont pas viables à grande échelle ou à un niveau industriel : un temps de réaction trop long, des conditions réactionnelles trop agressives auxquelles fait face la kératine, ou encore un faible rendement global. Dans les faits, la majorité de ces méthodes utilisent des réactifs chers et toxiques qui ne sont pas rentables selon le rendement d'extraction de kératine visé dans un procédé à grande échelle. De plus, la plupart de ces réactifs ne sont pas réutilisables, ce qui cause un impact au niveau de l'empreinte environnementale [33].

Il existe toutefois des méthodes d'extraction de la kératine qui emploient des réactifs moins nocifs pour l'environnement, tels que l'urée et la L-cystéine. En fait, l'urée est couramment utilisée dans plusieurs méthodes d'extraction puisqu'elle permet de dénaturer les protéines [34]. Plus précisément, l'urée permet de briser certaines liaisons de la kératine, telles que les liaisons hydrogènes et ioniques, ce qui cause un gonflement de la protéine et facilite l'attaque de l'agent réducteur sur celle-ci. L'agent réducteur, soit la L-cystéine, permet la rupture de la liaison disulfure (voir Figure 1.4) [19, 21]. De plus, la L-cystéine est un réducteur inoffensif pour l'environnement et il y a possibilité de le produire commercialement par fermentation [35].

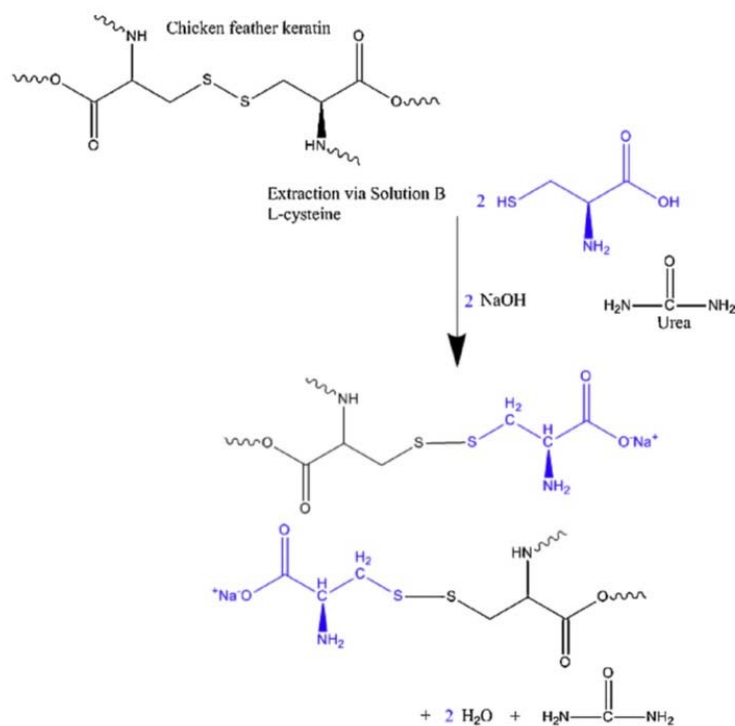


Figure 1.4 Mécanisme de réduction de la liaison disulfure par la L-cystéine [21].

Wang et al. (2016) sont parmi les quelques chercheurs à avoir effectué des tests sur l'extraction de la kératine par une méthode de réduction utilisant une solution d'urée (8 M) et de L-cystéine (0.165 M). Cependant, aucun rendement d'extraction de la kératine de la laine n'est mentionné dans cette étude. Pourjavaheri et al. (2019) ont également testé cette méthode et seulement 66 % de rendement a été obtenu pour l'extraction de la kératine des plumes. Aucun test avec cette méthode de réduction n'a été effectué sur l'extraction de la kératine à partir des cheveux humains.

1.3 Objectifs et stratégie de la recherche

Ce projet de recherche porte sur le développement d'une méthode écoresponsable d'extraction de la kératine à partir de différentes matières premières. Plus précisément, l'extraction de la kératine se fera à partir d'échantillons de cheveux humains et de laine

de mouton. L'objectif général du projet consiste à développer et optimiser une ou des méthodes écoresponsables d'extraction de la kératine à partir de ces matières premières renouvelables abondantes pour de futures applications dans divers domaines. Les objectifs principaux du projet sont de limiter l'utilisation de réactifs nocifs à l'environnement et de favoriser davantage les réactifs qui peuvent être récupérés ou « recyclés », tout en optimisant la quantité ainsi que la qualité de la kératine extraite.

Ainsi, le premier objectif de ce projet de recherche consiste à optimiser la méthode d'extraction de la kératine. Pour ce faire, différents paramètres seront évalués, tels que le pH de la solution d'urée et de L-cystéine, la température ainsi que la concentration d'urée. Ensuite, le deuxième objectif du projet est de caractériser l'extrait obtenu afin d'évaluer sa qualité. Pour ce faire, plusieurs analyses seront effectuées : l'analyse des acides aminés par chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-PDA), l'analyse des groupements fonctionnels et des liaisons moléculaires de la kératine extraite par la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), la détermination des poids moléculaires par électrophorèse sur gel (SDS-PAGE) et la quantification protéique par la méthode de dosage Bradford. Une analyse complémentaire a également été effectuée, soit la mesure de l'angle de contact de l'eau sur la kératine extraite de chacune des matières premières, afin d'évaluer le caractère hydrophobe du produit extrait.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Dans ce chapitre, les différentes méthodes de synthèse suivies au cours de ce travail sont présentées. Les différentes techniques de caractérisation et de quantification sont décrites brièvement. L'évaluation du caractère hydrophobe est également présentée dans ce chapitre.

2.1 Extraction de la kératine (résultats dans chapitre III)

Un prétraitement des biomasses est requis préalablement à l'extraction de la kératine. D'abord, un nettoyage à l'eau savonneuse doit être réalisé afin d'éliminer tous les contaminants de surface présents sur les échantillons. Ensuite, le retrait des lipides est réalisé par l'immersion des échantillons dans une solution de méthanol/chloroforme (1 :2, % v/v) pendant 24 h à température ambiante. Une fois ce prétraitement complété, les échantillons sont ajoutés dans une solution d'urée et de L-cystéine. Une fois la réaction complétée, la solution est filtrée afin de retirer l'excédent des échantillons non solubles. Afin de précipiter la protéine soluble et de maximiser le retrait de l'urée et la L-cystéine, 1 volume de filtrat recueilli est ajouté à 9 volumes d'éthanol 100 % glacial puis entreposé au minimum 1h au congélateur à une température de -20 °C. L'isolation de la kératine extraite est réalisée par centrifugation, à 4000 RPM pour une durée de 30 minutes, suivie d'une filtration sous vide. Le précipité recueilli est ensuite séché

pendant 48 h dans une étuve à une température de 80-85 °C afin d'éliminer tout solvant résiduel.

2.1.1 Optimisation des méthodologies d'extraction de la kératine

Plusieurs paramètres de réaction ont été testés afin de déterminer les conditions de réaction optimales pour maximiser l'extraction de la kératine au niveau de la quantité extraite. Les différents paramètres qui ont été évalués dans ce projet de recherche sont le pH de la solution de solubilisation de la kératine (urée et L-cystéine), la concentration de l'agent dénaturant (urée) ainsi que la température de la réaction. La valeur de chaque paramètre (pH, concentration de l'agent dénaturant et température) a été jugée optimale lorsque la valeur subséquente testée résultait en un rendement nettement supérieur à 100 % ou que la différence de rendement n'était pas significative. De plus, ayant comme but de développer une méthode écoresponsable, les paramètres nécessitant le moins de réactifs ont été priorisés lorsque les rendements d'extraction étaient équivalents.

Pour la détermination du rendement d'extraction, plusieurs facteurs sont considérés. D'abord, l'échantillon brut initial est pesé et la masse obtenue est comparée à celle de la kératine régénérée afin d'évaluer le rendement (%) de la méthode. Comme la quantité de kératine présente dans les différentes biomasses est connue statistiquement, il est possible d'évaluer le rendement en tenant compte du facteur de conversion exprimé en pourcentage. Ainsi, le rendement calculé est plus représentatif et il peut être déterminé selon l'équation 2.1.

$$R = \frac{m_{finale}}{P \times m_{initiale}} \times 100 \quad \text{Équation 2.1}$$

où $\begin{cases} m_{finale} & = \text{masse de l'extrait obtenu (g)} \\ m_{initiale} & = \text{masse de l'échantillon de matière première (g)} \\ P & = \text{Pourcentage de kératine dans la biomasse (80\% dans les cheveux et 95\% dans la laine)} \end{cases}$

2.2 Caractérisation de la kératine extraite

Afin de valider que le produit obtenu suite à l'extraction était bel et bien la kératine, les poids moléculaires des extraits obtenus ont été analysés par électrophorèse sur gel ainsi que les groupes fonctionnels par spectroscopie à transformée de Fourier.

2.2.1 Électrophorèse sur gel (SDS-PAGE)

Les poids moléculaires des extraits de kératine ont été déterminés par électrophorèse sur gel (SDS-PAGE). Cette méthode, développée par Ulrich K. Laemmli, permet de séparer les particules selon leur charge électrique et dans le cas de charges identiques, elles sont séparées en fonction de leur taille [36]. Comme les protéines sont en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS), elles ont toutes une charge négative, ce qui occasionne leur migration vers l'anode. Cela signifie également qu'elles sont séparées seulement par leur poids moléculaire. Plus précisément, les protéines de plus petite taille sont moins retenues par le gel, donc elles migrent plus loin que celles de plus grande taille [37].

Un gel d'acrylamide 15 % a été fraîchement préparé pour chaque analyse de poids moléculaires des échantillons. À une concentration inférieure (c.-à-d. 12 %), les petits fragments (10 et 15 kDa) n'étaient pas présents sur le gel puisqu'ils n'étaient pas suffisamment retenus. C'est pourquoi une plus haute concentration a été utilisée, soit 15 %. À cette concentration, les différents poids moléculaires du standard étaient bien séparés et tous présents sur le gel. Quant à la préparation des échantillons d'extrait de kératine, les différents ratios de réactifs utilisés ainsi que les conditions de dénaturation sont détaillés en Annexe A.

2.2.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est une technique couramment utilisée pour identifier des composés ou évaluer la pureté d'un échantillon.

L'échantillon est irradié par un rayonnement infrarouge, que la matière organique absorbe et convertit l'énergie, résultant en la vibration des liaisons chimiques. Plusieurs facteurs influencent les nombres d'ondes auxquelles les molécules absorbent, soit la masse des atomes, les constantes de liaison et la géométrie des atomes. Les régions d'absorption de plusieurs groupes sont connues, ce qui permet de comparer le spectre obtenu aux valeurs connues et ainsi identifier un composé [38]. Les échantillons de kératine extraite à partir des cheveux humains et de la laine de mouton ainsi que leur matière première respective ont été analysés par FTIR afin d'évaluer toute modification dans la structure chimique du produit obtenu.

2.3 Quantification de la kératine extraite

2.3.1 Quantification protéique – Bradford

Afin de déterminer la quantité de protéines présentes dans l'extrait de kératine obtenu pour chacune des matières premières, les extraits ont été dosés par la méthode Bradford. Il s'agit d'une méthode de dosage par colorimétrie impliquant l'utilisation d'un colorant : le Bleu de Coomassie, aussi nommé le *Brilliant Bleu* [39]. Le colorant se lie plus fortement aux résidus d'acides aminés arginine et lysine présents dans la protéine ainsi qu'aux résidus d'histidine et d'acides aminés aromatiques, tels que la tyrosine et la phénylalanine [40]. Cette spécificité peut influencer la réponse de la méthode sur différentes protéines. Effectivement, l'analyse d'une protéine ayant une faible concentration en ces acides aminés ciblés peut résulter en la sous-estimation de sa concentration à la suite de sa quantification par cette méthode.

Afin de quantifier la quantité de protéine dans les extraits de kératine, 20 à 30 mg d'échantillon ont été solubilisés dans une solution de DTT (60 mM). Pour maximiser la solubilisation, les échantillons en solution ont été immergés dans un bain de sonication pendant 30 minutes, suivi d'un chauffage à 95 °C pendant 30 minutes. Ils ont ensuite été dilués et le réactif de Bradford a été ajouté afin de permettre la mesure

de l'absorbance par spectrophotométrie à 595 nm, soit la longueur d'onde maximale d'absorption du colorant [39].

2.3.1.1 Analyse de l'angle de contact de l'eau

Une mesure de l'angle de contact de l'eau sur les extraits obtenus de chacune des matières premières a été effectuée afin d'évaluer leur caractère hydrophobe. Cette méthode consiste à déposer une goutte d'eau sur la surface de l'échantillon et de mesurer son angle de contact dans le temps. Si le matériau est hydrophobe, l'angle de contact de la goutte d'eau ne devrait pas varier significativement au cours de l'analyse (environ 30 secondes dans ce cas). Dans le cas contraire, s'il y a un changement significatif de l'angle mesuré entre le début et la fin de l'analyse, cela indique que le matériau possède de l'affinité pour l'eau.

2.3.2 Analyse de la composition en acides aminés par chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-PDA)

La chromatographie liquide à haute performance est une technique analytique couramment utilisée dans plusieurs domaines. Elle nécessite un faible volume d'échantillon, qui est injecté dans la colonne composée d'une phase stationnaire. Grâce à la phase mobile, l'échantillon est élué dans la colonne et est en constante interaction avec la phase stationnaire. Plus les affinités entre les analytes et la phase stationnaire sont grandes, plus le temps de rétention sera élevé puisque les analytes seront davantage retenus par la phase stationnaire. Quant aux éluants de la phase mobile, ils peuvent être en mode isocratique ou gradient. Le mode isocratique est une élution durant laquelle la composition de la phase mobile ne sera pas modifiée tout au long de l'analyse. Quant au mode gradient, il est souvent utilisé lorsque plusieurs analytes sont présents dans un même échantillon. La variation de la composition de la phase mobile au cours de l'analyse permet d'améliorer la séparation des différents composés. Ce mode permet également d'introduire une phase de lavage plus efficace pour éluer certains composés dont la rétention est trop grande. Le couplage de la

chromatographie liquide à haute performance avec un détecteur ultra-violet à barrette de diodes permet de détecter les acides aminés qui ont été dérivés chimiquement.

Afin d'analyser les acides aminés dans les échantillons de kératine, ces derniers ont été hydrolysés pendant 24 h à 110 °C dans une solution de HCl 6 M puis neutralisés à un pH de 7,2 à l'aide d'une solution de NaOH (5 M). Ensuite, les échantillons ont été dérivés chimiquement à l'aide du chlorure de fluorénylméthoxycarbonyle (FMOC), tel que décrit dans la méthodologie de Jám bor et Molnár-Perl (2009). La longueur d'onde utilisée pour la détection des acides aminés est de 263 nm puisqu'elle a été évaluée maximale à cette valeur.

La séparation chromatographique a été réalisée avec la colonne Biozen Peptide-XB-C18 et par gradient. Le tableau 2.1 décrit le gradient d'élution qui a été utilisé lors de l'analyse par chromatographie liquide.

Tableau 2.1

Gradient de la chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-PDA) pour l'analyse des acides aminés des standards et des échantillons de kératine à 50 °C

Débit (mL/min)	Temps (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0,6	0	70	30	0
0,6	3	63	37	0
0,6	14	27	73	0
0,6	20	0	100	0
0,6	30	0	100	0
0,6	32	2	0	98
0,6	33	2	0	98
0,6	35	70	30	0
0,6	40	70	30	0

A : 0,05 M Acétate de sodium (pH = 7,2)

B : 0,10 M Acétate de sodium/Acétonitrile (23 : 22, % v/v), pH = 7,2

C : Acétonitrile

CHAPITRE III

OPTIMISATION DE LA MÉTHODE D'EXTRACTION

Dans ce chapitre, le processus d'optimisation des différents paramètres de réaction est présenté ainsi que les conditions optimales d'extraction établies.

3.1 Optimisation des paramètres d'extraction de la kératine provenant des cheveux humains

Le premier paramètre qui a été optimisé est le pH de la solution de solubilisation de la kératine. Pour ce faire, les autres paramètres, soit le temps de réaction, la concentration des réactifs, l'agitation ainsi que la température de réaction, sont demeurés constants.

Les rendements d'extraction obtenus selon le pH utilisé de la solution d'extraction sont présentés à la figure 3.1.

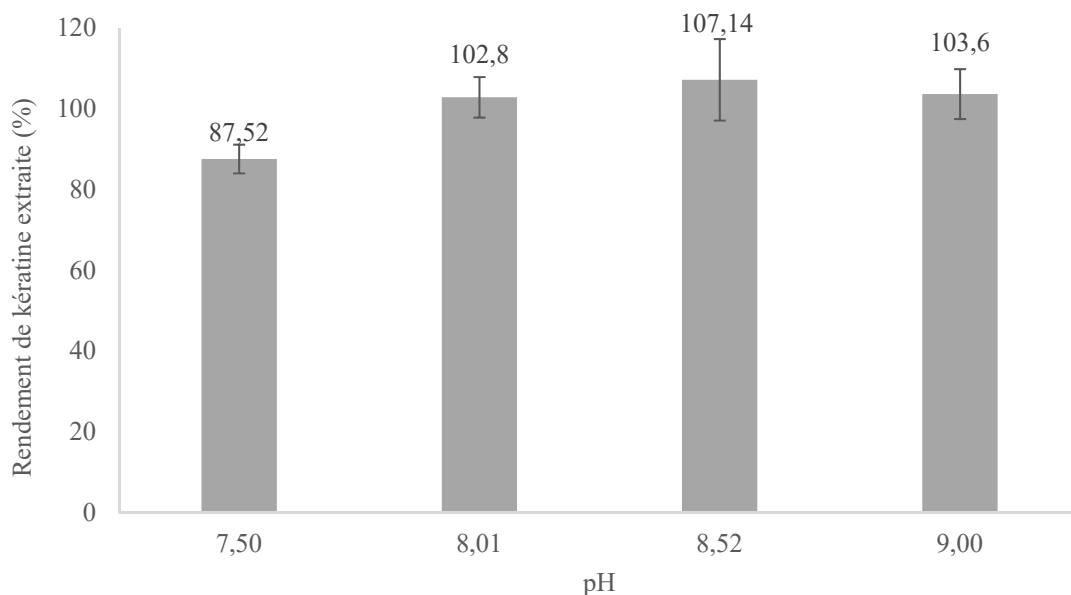


Figure 3.1 Rendement de kératine extraite à partir des cheveux humains en fonction du pH, à une concentration d'urée de 8 M et une température de 75-80 °C (n ≥ 2).

Dans la figure 3.1, il est possible d'observer un plafonnement du rendement d'extraction avec un pH de 8 à 9. Ainsi, un pH de 8 sera considéré optimal puisqu'il nécessite une plus faible quantité de NaOH pour son ajustement qu'un pH plus élevé. Ayant comme objectif de développer une méthode écoresponsable, les conditions nécessitant le moins de réactifs sont priorisées dans le cas où les résultats obtenus sont équivalents. À noter que les rendements supérieurs à 100 % obtenus pour les pH de 8 à 9 sont jugés acceptables puisque la teneur en kératine de 80 % est une valeur théorique et elle peut varier selon les individus. Étant donné que les cheveux humains utilisés pour les essais sont un mélange de cheveux appartenant à plusieurs personnes, il est probable que la teneur en kératine ne soit pas exactement égale au 80 % théorique attendu.

Le second paramètre optimisé est la concentration de l'agent dénaturant, soit l'urée. De même que pour le pH, les autres paramètres de réaction sont demeurés constants

lors des différents tests. Les rendements d'extraction obtenus selon la concentration d'urée utilisée sont présentés à la figure 3.2.

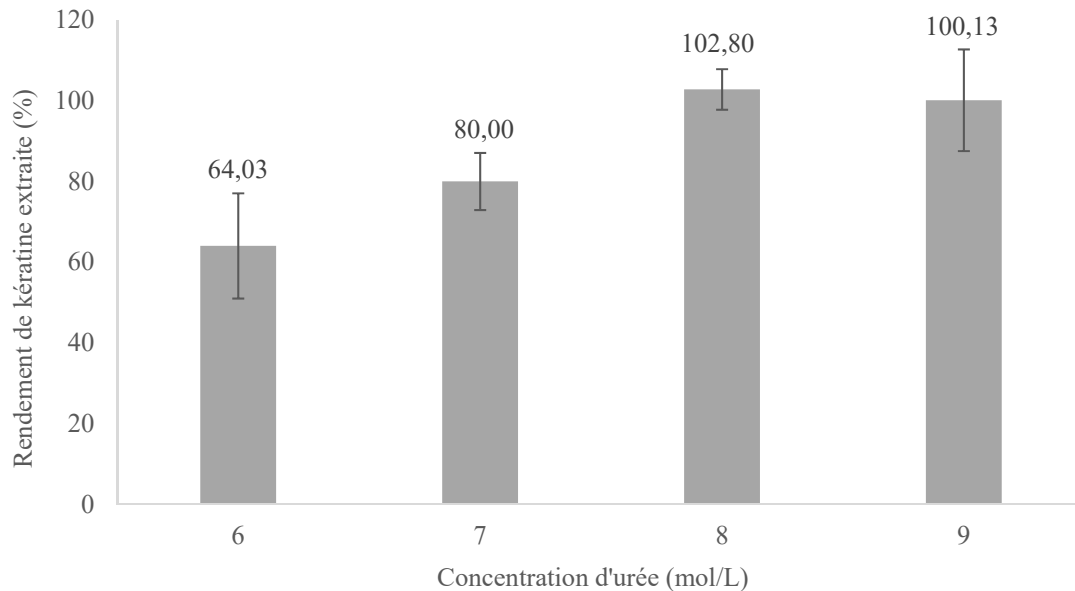


Figure 3.2 Rendement de kératine extraite à partir des cheveux humains en fonction de la concentration d'urée, à une température de 80 °C et un pH de 8 ($n \geq 2$).

Selon les résultats obtenus et présentés dans la figure 3.2, une concentration d'urée inférieure à 8 mol/L diminue le rendement d'extraction de la kératine et une concentration supérieure à 8 mol/L procure un rendement équivalent. Ainsi, la concentration d'urée de 8 mol/L est jugée optimale pour l'extraction de la kératine à partir des cheveux humains.

Le troisième paramètre optimisé est la température de la réaction. De même que pour les deux autres paramètres évalués, les autres paramètres sont demeurés constants lors des différents essais de température. Les rendements d'extraction obtenus en fonction des différentes températures de réaction utilisées sont présentés à la figure 3.3.

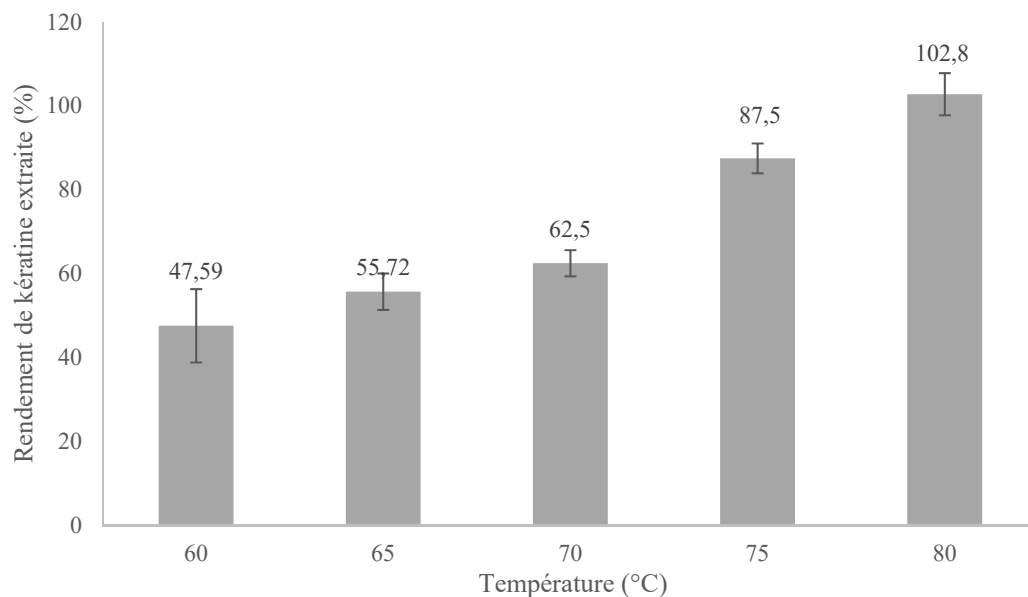


Figure 3.3 Rendement de kératine extraite à partir des cheveux humains en fonction de la température, à une concentration d'urée de 8 mol/L et un pH de 8 ($n \geq 2$).

À partir des résultats obtenus et présentés dans la figure 3.3, il est possible d'évaluer que la température optimale pour l'extraction de la kératine à partir des cheveux humains est entre 75 et 80 °C. Une température supérieure n'a pas été testée puisqu'un rendement de 100 % a été atteint et qu'un chauffage trop élevé peut dénaturer la protéine et affecter la qualité du produit obtenu [41, 42]. À partir des résultats présentés à la figure 3.3, il est possible d'observer que la température a un impact significatif sur l'extraction de la kératine. Cela a également été affirmé par d'autres auteurs avec l'utilisation de méthodes différentes.

Ainsi, les paramètres optimaux d'extraction de la kératine à partir des cheveux humains sont résumés dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1

Paramètres optimaux d'extraction de la kératine à partir des cheveux humains

Paramètres	Cheveux humains
Température	75 – 80 ± 1 °C
pH	8,0 ± 0,1
Concentration d'urée	8,00 ± 0.01 mol/L

3.2 Optimisation des paramètres d'extraction de la kératine provenant de la laine de mouton

Les trois mêmes paramètres ont également été optimisés pour l'extraction de la kératine à partir de la laine de mouton, soit le pH, la concentration d'urée et la température de réaction. Le premier paramètre optimisé est le pH de la solution. Les rendements d'extraction obtenus selon les différents pH sont présentés dans la figure 3.4.

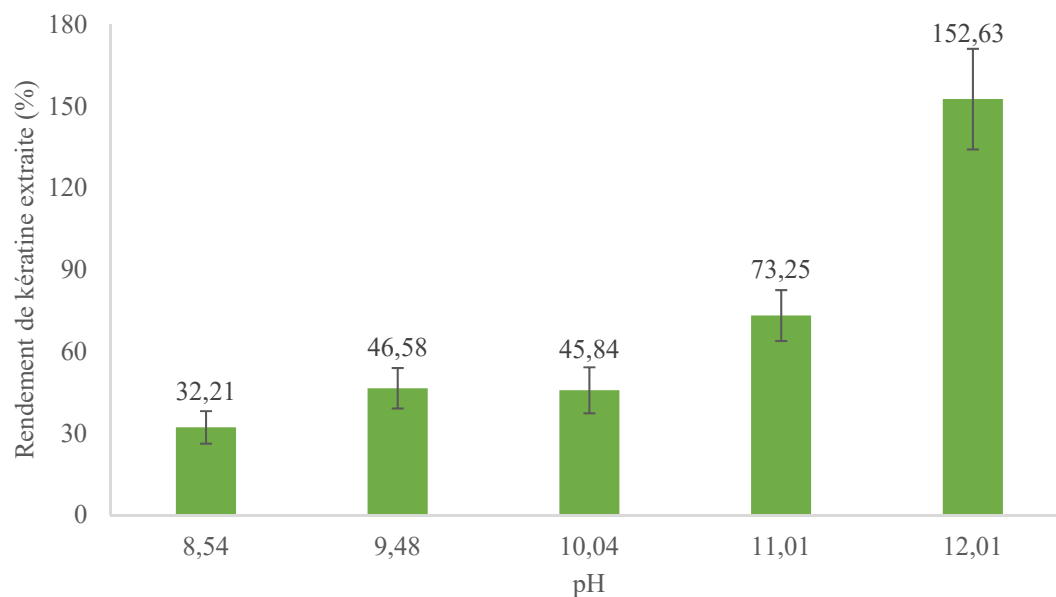


Figure 3.4 Rendement de kératine extraite à partir de la laine de mouton en fonction du pH, à une concentration d'urée de 8 M et une température de 80 °C (n = 2 à 4).

À partir des rendements obtenus présents dans la figure 3.4, un pH de 11 sera jugé comme étant optimal pour l'extraction de la kératine provenant de la laine de mouton. Un pH de solution supérieur à 11 résultait en l'obtention d'un rendement nettement supérieur à 100 %, ce qui n'est pas souhaitable puisque cela indique que l'extraction n'est pas optimale. Plusieurs explications sont plausibles pour le rendement de 152,63 % obtenu : la formation d'un composé intermédiaire dans ces conditions, l'élimination insuffisante de solvant ou encore une mauvaise séparation des réactifs (urée et L-cystéine) de la solution de solubilisation et de la kératine. Autrement dit, dans ces conditions, il est possible que les réactifs utilisés restent « emprisonnés » dans la protéine et qu'ils précipitent avec celle-ci. L'analyse visuelle du précipité obtenu a également permis d'en venir à ces hypothèses. Effectivement, il n'avait pas une couleur brunâtre ni une texture solide « transparente », il était plutôt blanchâtre et poudreux (voir la figure 3.5).



Figure 3.5 Extraits de kératine provenant de la laine. Produits obtenus avec un rendement de 73,25 % (gauche) et 152,63 % (droite).

Le second paramètre optimisé est la concentration de l'agent dénaturant, soit l'urée. De même que pour le pH, les autres paramètres de réaction sont demeurés constants lors des différents tests. Les rendements d'extraction selon la concentration d'urée utilisée sont présentés dans la figure 3.6.

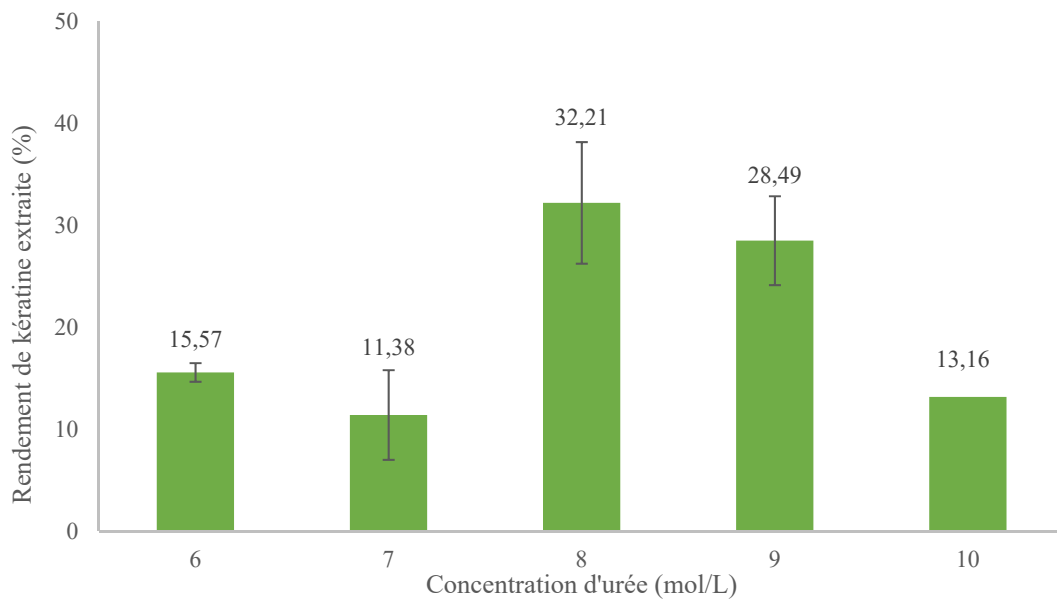


Figure 3.6 Rendement de kératine extraite à partir de la laine de mouton en fonction de la concentration d'urée, à une température de 80 °C et un pH de 8 (n = 2 à 4).

À partir des résultats obtenus et présentés dans la figure 3.6, la concentration d'urée à 8 mol/L est jugée optimale pour l'extraction de la kératine à partir de la laine de mouton. En effet, le rendement d'extraction diminue lorsqu'une quantité inférieure et supérieure à 8 mol/L est utilisée. Un rendement inférieur pour une concentration d'urée plus faible utilisée est logique puisqu'il s'agit de l'agent dénaturant de la protéine. Donc, si la quantité d'urée utilisée est insuffisante, la protéine n'est pas suffisamment dénaturée et l'agent réducteur (L-cystéine) ne peut pas cliver autant de ponts disulfures. La diminution du rendement d'extraction avec l'augmentation de la concentration de l'agent dénaturant (urée) peut être expliquée par le fait que l'urée limite la précipitation de la protéine [21]. Ainsi, plus la concentration est élevée, plus elle interfère dans la précipitation et une plus petite quantité de protéine est récupérée suite à l'ajout du filtrat dans l'éthanol glacial. Aussi, il devient difficile de séparer l'urée de la protéine avec l'éthanol glacial lorsqu'elle est très concentrée. Effectivement, cela a été observé pour une concentration d'urée de 10 mol/L et c'est pourquoi il n'y a qu'un seul réplica pour cette valeur. La réaction n'a pas pu être complétée pour les trois autres réplicas puisqu'aucune séparation n'est survenue suite à l'ajout du filtrat à l'éthanol.

Le troisième paramètre optimisé est la température de la réaction. De même que pour les deux autres paramètres évalués, les autres paramètres sont demeurés constants lors des différents essais de température. Les rendements d'extraction obtenus en fonction des différentes températures de réaction utilisées sont présentés dans la figure 3.7.

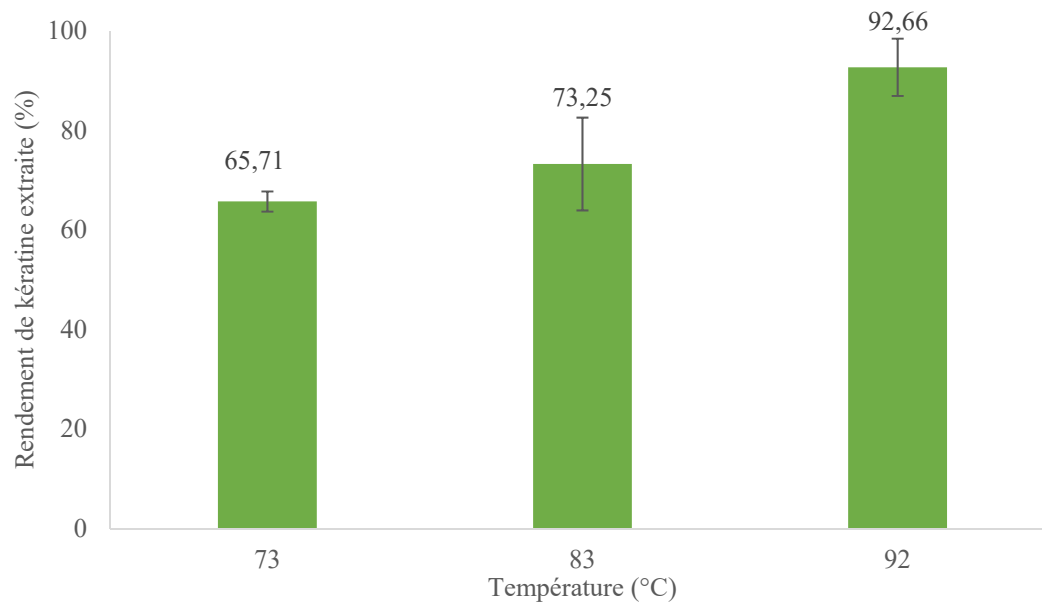


Figure 3.7 Rendement de kératine extraite à partir de la laine de mouton en fonction de la température à une concentration d'urée de 8 mol/L et un pH de 11 ($n \geq 4$).

Comme observé pour la matière première des cheveux humains, la température a un impact assez important sur le rendement d'extraction de la kératine. Selon les résultats obtenus et affichés dans la figure 3.7, la température optimale pour l'extraction de la kératine provenant de la laine de mouton est de 90-95 °C. Une température supérieure n'a pas été testée puisqu'une température supérieure à 100 °C dénaturerait la protéine et affecterait la structure de la kératine obtenue [41].

Ainsi, les paramètres optimaux d'extraction de la kératine à partir de la laine de mouton sont résumés dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2

Paramètres optimaux d'extraction de la kératine à partir de la laine de mouton

Paramètres	Laine
Température	90 – 95 ± 1 °C
pH	11,0 ± 0,1
Concentration d'urée	8,00 ± 0.01 mol/L

CHAPITRE IV

CARACTÉRISATION DE LA KÉRATINE EXTRAITE

Dans ce chapitre, les résultats obtenus de la caractérisation du produit obtenu par électrophorèse sur gel ainsi que par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier sont présentés.

4.1 Électrophorèse sur gel (SDS-PAGE)

Le dithiothréitol (DTT) doit être utilisé pour l'analyse des poids moléculaires des extraits de kératine par électrophorèse sur gel, sans quoi la protéine n'est pas suffisamment dénaturée et elle n'est pas retenue par le gel. Effectivement, des essais ont été réalisés sans dithiothréitol et une très faible détection des poids moléculaires de la kératine extraite des cheveux humains est obtenue et aucune détection n'est obtenue pour celle provenant de la laine de mouton.

La figure 4.1 illustre l'électrophorèse sur gel effectuée suite à la solubilisation de la kératine dans la solution d'urée et de L-cystéine avec les conditions optimales d'extraction pour chaque matière première sans ajout de DTT aux échantillons.

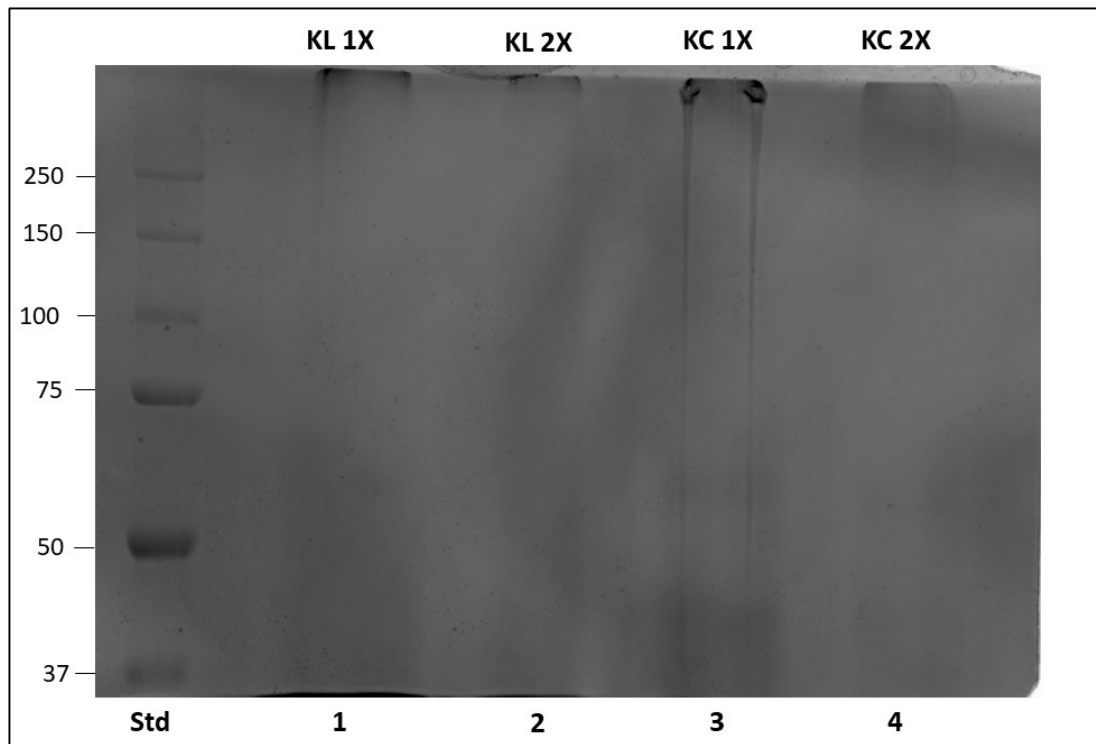


Figure 4.1 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12 %) de la kératine extraite à partir de la laine de mouton et des cheveux humains (Rangée 1 : KL 1X, Rangée 2 : KL 2X, Rangée 3 : KC 1X, Rangée 4 : KC 2X).

Dans la figure 4.1, il est possible d'observer une bande foncée dans le haut du gel au niveau des puits des rangées 1 à 4. Ces bandes sont plus prononcées pour les échantillons de kératine de la laine que pour les cheveux humains. Ceci indique principalement que les protéines dans les échantillons ne sont pas suffisamment dénaturées et qu'elles n'ont pratiquement pas migré dans le gel puisqu'elles sont de trop grande taille. Quant à l'échantillon déposé dans la rangée 3, une faible bande puis une traînée sont observées dans le bas du gel sous les 75 et les 50 kDa. Ceci indique que les poids moléculaires de cette protéine se trouvent dans ces tailles, mais ils ne sont pas suffisamment retenus par le gel.

Le dithiothréitol a pour but de rompre les liens disulfures qui n'ont pas été clivés par la L-cystéine dans la solution d'extraction ni par le mercaptoéthanol (MEC) dans le

tampon « 4X ». Le dithiothréitol est un agent réducteur plus agressif que la L-cystéine et que le mercaptoéthanol. Effectivement, le dithiothréitol possède un potentiel de réduction de -0.33V à pH 7, ce qui est inférieur à celui du mercaptoéthanol et de la cystéine qui sont respectivement de -0.26V et -0.22V [43-45]. De plus, lors de l'essai sans DTT, il a été observé que la concentration du gel de polyacrylamide était trop faible pour les poids moléculaires attendus. En effet, les poids moléculaires se situant entre 10 et 25 kDa n'ont pas été retenus par le gel lors de la migration. C'est pourquoi sa concentration a été augmentée à 15 % dans les tests suivants.

4.1.1 Poids moléculaires de la kératine extraite à partir de cheveux humains

Les poids moléculaires de la kératine extraite à partir de cheveux humains ont été déterminés par électrophorèse sur gel. Le gel de migration est présenté dans la figure 4.2.

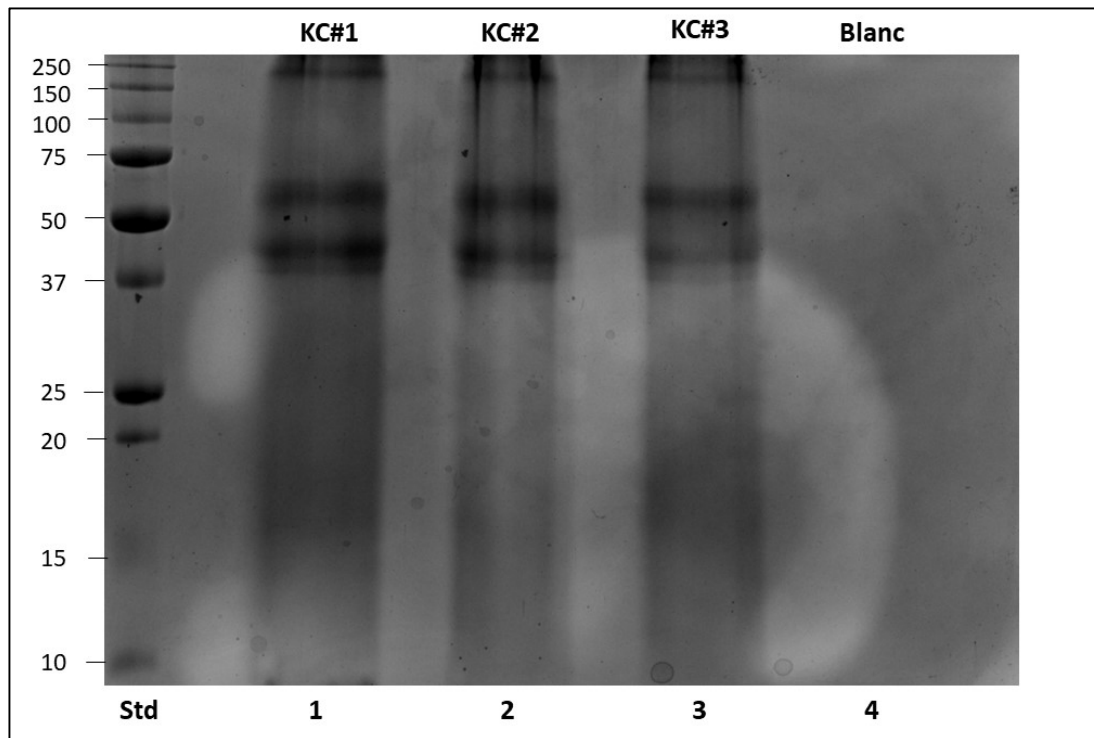


Figure 4.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (15 %) de la kératine extraite à partir de cheveux humains (Rangée 1 : KC#1, Rangée 2 : KC#2, Rangée 3 : KC#3, Rangée 4 : Blanc).

Il est possible d’observer une reproductibilité de la migration de l’échantillon de kératine extraite à partir des cheveux humains dans les rangées 1 à 3. En fait, il s’agit du même échantillon ayant été préparé selon différents ratios d’agent dénaturant (DTT 50 mM) afin d’évaluer les conditions optimales de la révélation sur le gel. Un blanc (urée et L-cystéine), préparé dans les mêmes conditions que les échantillons, a été déposé sur le puit de la rangée 4 afin de vérifier si la solution de solubilisation avait un impact quelconque sur la révélation ou la migration de la protéine. À partir des résultats obtenus, il est possible de valider que les fractions obtenues appartiennent bel et bien à l’échantillon, soit l’extrait de kératine à partir des cheveux humains. Les différentes proportions de réactifs utilisés pour la préparation des échantillons de kératine extraite des cheveux humains pour l’électrophorèse sur gel sont détaillées à l’Annexe A.

Les poids moléculaires ont été déterminés à l'aide de l'équation obtenue, représentée à la figure 4.3, suite à l'analyse des distances relatives (R_f) de chaque poids moléculaire de l'échelle [46].

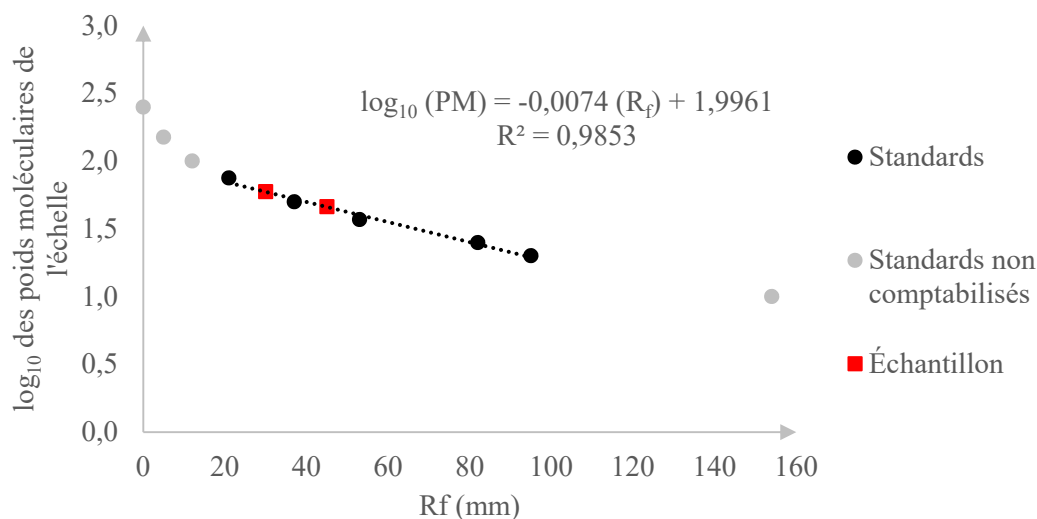


Figure 4.3 Détermination des poids moléculaires des extraits de kératine obtenus à partir de cheveux humains.

Les poids moléculaires obtenus pour la kératine extraite à partir de cheveux humains sont de 46.0 et 59.4 kDa. Ces poids correspondent à ceux trouvés dans la littérature pour les deux types de kératine présents dans les cheveux humains, soit le type I et le type II. Les intervalles de poids moléculaires attendus pour ces deux types sont respectivement de 40 à 56.5 kDa et de 52 à 67 kDa [47]. Comme représenté par la figure 4.2, deux fractions, soit une se trouvant dans chacun des intervalles attendus, ont été détectées sur le gel. Cela permet de confirmer que la protéine extraite à partir de cheveux humains par la méthode utilisée est bien la kératine. Afin d'optimiser la révélation des différentes fractions, les échantillons doivent être préparés dans un ratio 4 :1 (kératine soluble/DTT 50 mM, % v/v). La fraction aux alentours de 60 kDa est tout de même visible lorsque les échantillons sont déposés dans les puits sans ajout de DTT, mais celle plus basse n'est pas suffisamment dénaturée pour être retenue par

le gel. Effectivement, tel que mentionné précédemment, le mercaptoéthanol permet de réduire certains des ponts disulfures, mais le DTT est un agent réducteur plus fort et permet une meilleure dénaturation de la protéine. Bref, selon les poids moléculaires obtenus, il est possible de confirmer que les fractions obtenues correspondent effectivement à l'échantillon de kératine extraite à partir de cheveux humains.

4.1.2 Poids moléculaires de la kératine extraite à partir de la laine de mouton

Les poids moléculaires de la kératine extraite à partir de la laine de mouton ont été déterminés par électrophorèse sur gel. Le gel de migration est présenté dans la figure 4.4.

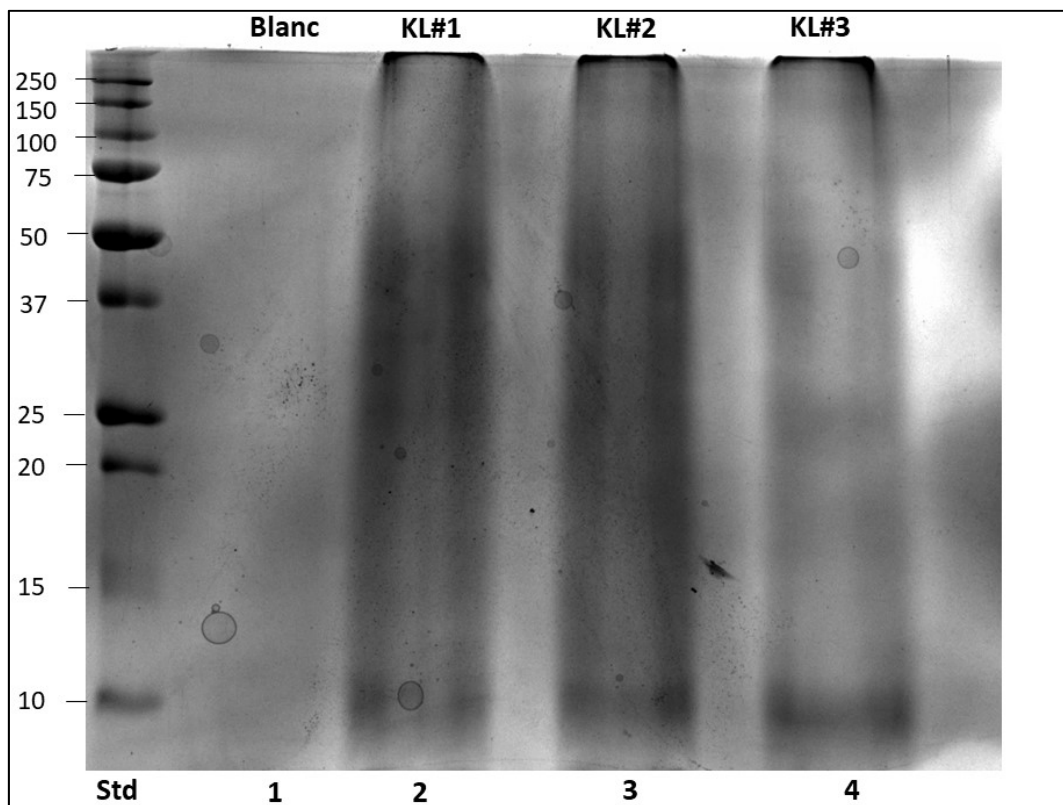


Figure 4.4 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (15 %) de la kératine extraite à partir de la laine de mouton (Rangée 1 : Blanc, Rangée 2 : KL#1, Rangée 3 : KL#2, Rangée 4 : KL#3).

Il est possible d'observer sur le gel de migration, représenté par la figure 4.4, quatre bandes de poids moléculaires différents pour la kératine extraite à partir de la laine de mouton. Elles sont davantage définies lorsque la concentration de DTT utilisée est plus élevée. Effectivement, les échantillons doivent être préparés dans un ratio 4 : 1 (kératine soluble/DTT 200 mM, % v/v) afin de permettre la migration adéquate de la protéine. Une concentration inférieure à 200 mM de DTT ne permet pas une révélation bien définie de chaque poids moléculaire.

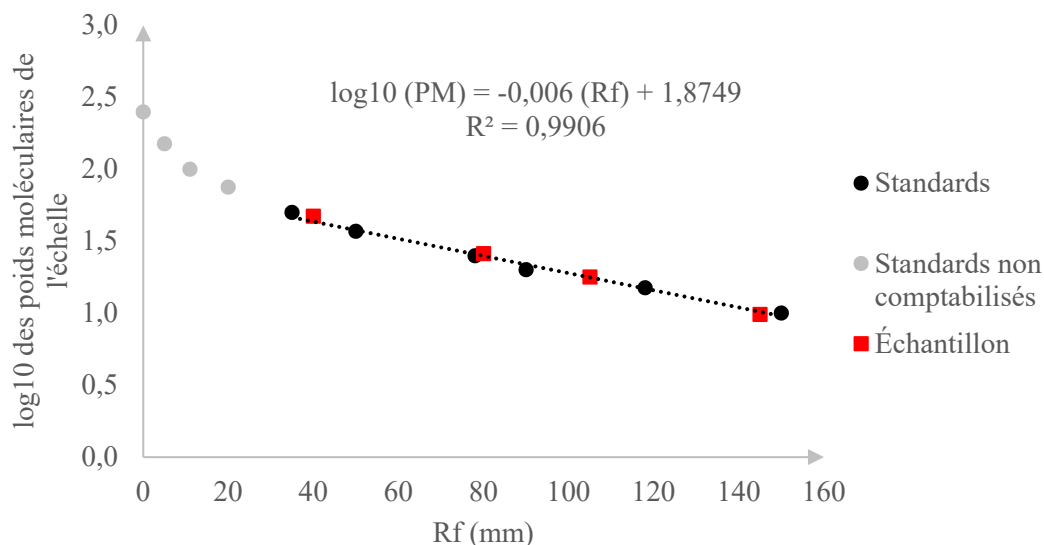


Figure 4.5 Détermination des poids moléculaires des extraits de kératine obtenus à partir de la laine de mouton.

Les poids moléculaires obtenus pour la kératine extraite à partir de la laine de mouton sont 9.8, 17.8, 25.9 et 47.1 kDa. Ces valeurs ont été déterminées à l'aide de l'équation obtenue, représentée à la figure 4.5, suite à l'analyse des distances relatives (R_f) de chaque poids moléculaire de l'échelle. La fraction obtenue aux alentours de 47 kDa correspond à la kératine de faible teneur en soufre provenant des filaments intermédiaires, tels que les liaisons disulfures effectuées par la méthionine, soit un acide aminé soufré présent en faible quantité [48]. Les fractions de 9.8, 17.8 et 25.9 kDa obtenues, quant à elles, représentent la « portion » de kératine de haute teneur en soufre

[48-50]. Il est possible d'observer une bande plus foncée aux alentours de 10 kDa. Ceci indique que la protéine possède une grande quantité de ces fractions, qui sont de haute teneur en soufre. C'est entre autres pourquoi la concentration de DTT utilisée pour permettre la migration de l'échantillon dans le gel a été supérieure à celle utilisée pour l'extrait de kératine provenant des cheveux humains. Des concentrations plus faibles en DTT ont été testées dans les rangées 2 et 3, mais la dénaturation est incomplète. Les différentes proportions de réactifs utilisés pour la préparation des échantillons de kératine extraite de la laine pour l'électrophorèse sur gel sont détaillées à l'Annexe A. Un échantillon de blanc, préparé dans les mêmes conditions que les échantillons, a été déposé sur le puit de la rangée 1 afin de vérifier si la solution de solubilisation avait un impact quelconque sur la révélation ou la migration de la protéine. Selon les poids moléculaires obtenus, il est possible de confirmer que les fractions obtenues correspondent effectivement à l'échantillon de kératine extraite à partir de la laine de mouton.

4.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

4.2.1 Groupes fonctionnels et liaisons moléculaires de la kératine extraite à partir des cheveux humains

L'extrait obtenu à partir des cheveux humains a été analysé par FTIR afin de valider qu'il s'agissait bien de la kératine.

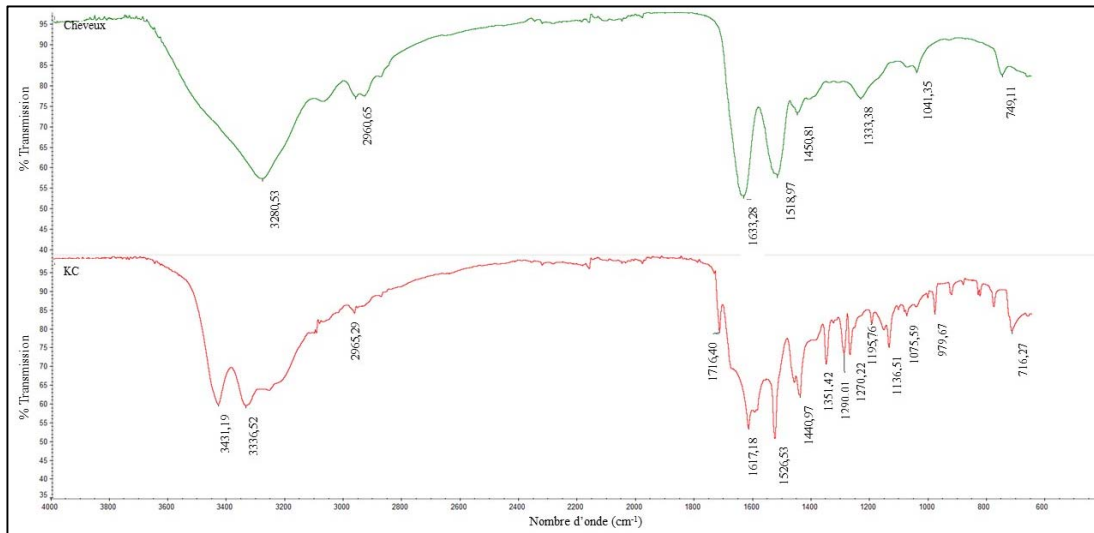


Figure 4.6 Spectres FTIR (600-4000 cm^{-1}) d'un échantillon de cheveux (haut) et d'un échantillon de kératine extraite à partir des cheveux humains (bas).

Les bandes d'absorption caractéristiques de la kératine dans les cheveux humains sont dues au lien peptidique de la protéine. Plus précisément, ces bandes d'absorption sont associées à trois amides (I-III) caractéristiques de la kératine, qui sont généralement présentes entre 1700-1590 cm^{-1} (Amide I), 1580-1500 cm^{-1} (Amide II) et 1320-1210 cm^{-1} (Amide III) [51]. Quant à l'Amide I, la bande d'absorption à 1617 cm^{-1} correspond à 80 % à l'étirement de la liaison C=O. La bande à 1527 cm^{-1} représente l'Amide II et correspond à l'étirement de la liaison C-N [38]. Dans le spectre FTIR obtenu, représenté à la figure 4.6, les bandes caractéristiques des trois amides sont observées pour l'échantillon de la matière première, mais seulement les bandes des amides I et II sont observées pour l'échantillon de kératine extraite. Plusieurs bandes sont visibles entre 1320 et 1210 cm^{-1} , mais ils n'ont pas la même allure que celle présente sur le spectre de l'échantillon de cheveux humains. Il est également possible d'observer que l'ensemble des bandes sont moins définies dans le spectre de l'extrait de kératine. Ceci peut être dû à la qualité de l'extrait obtenu. Certaines bandes sont associées à l'oxydation de l'acide aminé cystéine et elles sont généralement entre 1200-1000 cm^{-1} [51]. Des bandes ont été observées à 1075 et

1040 cm^{-1} , qui correspondent respectivement à l'étirement de la liaison S=O du monoxyde de cystine et des liaisons symétriques S-O de l'acide cystéique (SO_3^-) [38, 51]. D'autres bandes ont été identifiées dans les spectres obtenus et l'ensemble des bandes identifiées sont présentées au tableau 4.1.

Tableau 4.1

Nombre d'onde du spectre de l'extrait de kératine à partir des cheveux humains et assignation des différentes bandes caractéristiques

Nombre d'onde (cm^{-1})	Identification
1040	Sulfonate (étirement sym. S-O)
1075	Monoxyde cystine (R-SO-S-R)
1440	CH_2
1527	Amide II (étirement C-N)
1617	Amide I (étirement C=O)
2965	CH
3337	NH (amine primaire)
3431	OH (H_2O)

À la suite de l'analyse FTIR des échantillons de kératine extraite à partir des cheveux humains, il est possible d'affirmer que l'extrait obtenu est bel et bien la kératine. Les spectres FTIR montrent que les liaisons caractéristiques de la kératine sont préservées dans l'extrait de kératine à la suite de son extraction.

4.2.2 Groupes fonctionnels et liaisons moléculaires de la kératine extraite à partir de la laine de mouton

L'extrait obtenu à partir de la laine de mouton a été analysé par FTIR afin de valider qu'il s'agissait bien de la kératine.

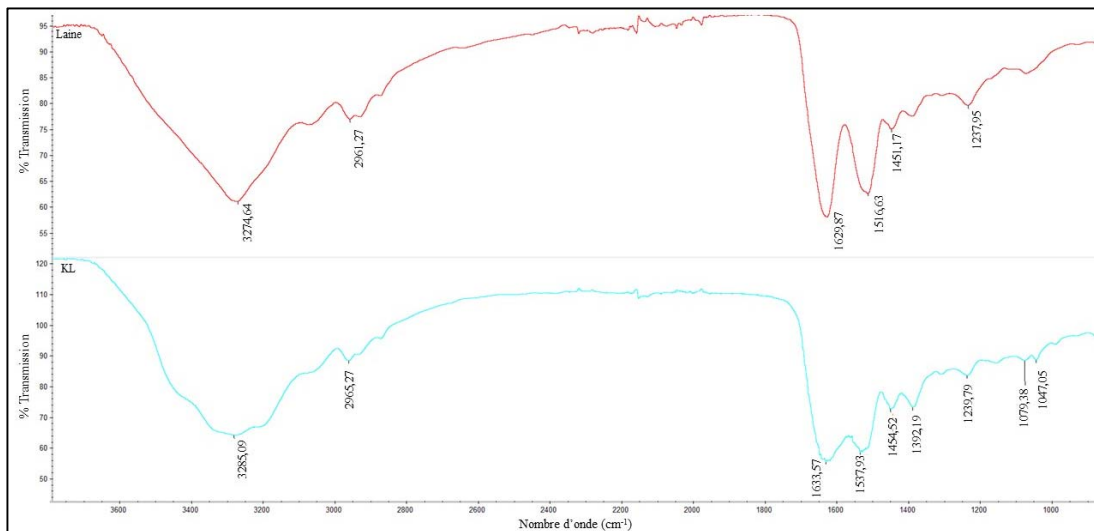


Figure 4.7 Spectres FTIR ($600\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) d'un échantillon de laine de mouton (haut) et d'un échantillon de kératine extraite à partir de la laine de mouton (bas).

Les bandes d'absorption caractéristiques observées sur les spectres infrarouges de la figure 4.7 sont entre autres dues aux liens peptidiques ($-\text{CONH}-$) qu'on retrouve généralement dans les protéines. Les atomes dans le lien peptidique oscillent et forment des bandes d'absorption qui sont associées à une Amide A et des amides I-III [18, 52]. Plus précisément, la bande à 3280 cm^{-1} correspond à l'Amide A et est due à l'étirement vibrationnel du lien N-H du lien peptidique ($-\text{CONH}-$) [53]. La bande se trouvant entre les nombres d'onde $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ est associée à l'étirement des liens C-H [54]. L'Amide I est associé à la bande entre 1600 et 1650 cm^{-1} , qui correspond à la vibration du groupement C=O [55]. Quant à celle associée à l'Amide II, elle est retrouvée entre 1500 et 1550 cm^{-1} et elle est due à l'étirement de la liaison C-H ainsi qu'à la déformation N-H [56]. La bande correspondant à l'Amide III apparaît à environ 1230 cm^{-1} et il est dû à la vibration des liaisons C-N et C-H ainsi qu'aux vibrations des liaisons N-H et C=O [48, 56]. La position ainsi que l'intensité des bandes sont liées à la conformation de la kératine [55, 57]. Les bandes d'absorption observées à 1047 et 1079 cm^{-1} correspondent aux étirements des liens asymétriques et symétriques S-O qui sont formés suite au bris des liaisons disulfures de la cystéine lors du processus

d'extraction de la kératine [34, 49, 54]. Toutes les bandes identifiées sont présentées dans le tableau 4.2.

Tableau 4.2

Nombres d'onde du spectre de l'extrait de kératine à partir de la laine de mouton et assignation des différentes bandes caractéristiques

Nombres d'onde (cm⁻¹)	Identification
1047 et 1079	Sulfonate (étirements S-O)
1239	Amide III (étirement C-N, C-C, N-H, C-O)
1537	Amide II (étirement C-H et N-H)
1633	Amide I (étirement C=O)
2965	C-H
3285	Amide A (vibration liens N-H)

À la suite de l'analyse FTIR des échantillons de kératine extraite à partir de la laine de mouton, il est possible d'affirmer que l'extrait obtenu est bel et bien la kératine. Les spectres FTIR montrent que les liaisons caractéristiques de la kératine sont préservées dans l'extrait de kératine à la suite de son extraction.

CHAPITRE V

QUANTIFICATION DE LA KÉRATINE EXTRAITE

Dans ce chapitre, les résultats de quantification ainsi que les limitations des deux méthodes utilisées sont présentés. Le chapitre se termine par une présentation des limitations générales du projet.

5.1 Quantification protéique – Bradford

Les courbes d'étalonnage ont été obtenues à partir d'une protéine générique, soit l'albumine bovine, étant donné qu'il n'était pas possible de se procurer un échantillon standard de kératine de chacune des deux matières premières. L'albumine bovine est très couramment utilisée dans le dosage des protéines et les auteurs ayant fait ce test sur leur extrait de kératine ont également utilisé cette protéine pour l'étalonnage. Ainsi, il est possible d'estimer la teneur en protéines des extraits de kératine, mais il n'est pas possible de vérifier l'exactitude du résultat obtenu puisqu'il peut y avoir une variation de réponse entre différentes protéines [40]. Autrement dit, il est possible que la valeur obtenue soit inférieure ou supérieure à la teneur réelle en protéines de l'extrait de kératine. Toutes les courbes d'étalonnages (#1 à 3) effectuées pour évaluer la teneur en protéine dans les extraits de kératine se trouvent à l'Annexe B.

5.1.1 Quantification protéique de l'extrait de kératine à partir des cheveux humains

Lors de la préparation des échantillons pour évaluer la teneur en protéines, l'extrait de kératine obtenu à partir des cheveux humains n'était pas entièrement soluble. Donc, le résultat obtenu ne représente pas la concentration totale en protéines de l'échantillon, mais seulement la portion soluble de l'extrait de kératine. Il est possible d'observer dans la figure 5.1 une comparaison de la solubilité de l'extrait de kératine provenant des cheveux humains et celui provenant de la laine de mouton.

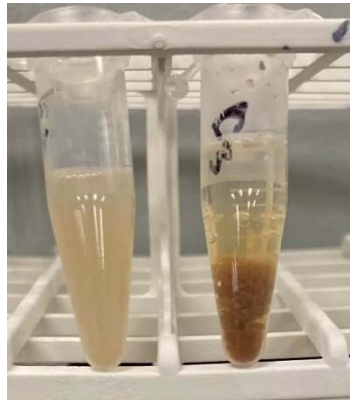


Figure 5.1 Échantillons en solution (DTT 60 mM). Extrait de kératine provenant de la laine (gauche) et extrait provenant des cheveux humains (droite).

La solubilisation de l'extrait a été tentée par l'utilisation de plusieurs réactifs (NaOH, HCl, urée et L-cystéine), mais seul le dithiothréitol permet un début de solubilisation sans causer d'interférence avec la méthode de dosage. Différents essais ont été réalisés en modifiant les paramètres de la préparation des échantillons afin de potentiellement augmenter la solubilisation de l'échantillon.

Lors du premier essai, chaque extrait a été solubilisé dans une solution de 40 mM de DTT suivant une immersion de 30 minutes dans un bain de sonication et un chauffage de 30 minutes à 95 °C. Malgré ces prétraitements, les extraits de kératine provenant des cheveux humains n'étaient pas totalement solubilisés, comme illustrés à la figure 5.1.

Tableau 5.1

Rendements (%) de la quantité de protéines dans les extraits de kératine à partir des cheveux humains obtenus à partir de la courbe d'étalonnage #1 (voir Annexe B)

Échantillons	Rendement (%)
1.1	9,00
1.2	8,40
1.3	10,99
2.1	11,29
2.2	10,20
2.3	11,83
Moyenne ± écart-type	10 ± 1

Considérant l'ensemble des sources d'erreurs possibles de la méthode, l'extrait a été préparé en duplicata, dont chaque réplica a été dilué en triplicata afin de s'assurer de l'exactitude du résultat obtenu. Selon les résultats obtenus et inscrits dans le tableau 5.1, il est possible de confirmer que le résultat est reproductible. Une concentration moyenne de (10 ± 1) % en protéines a été obtenue pour la portion de l'extrait soluble de kératine provenant des cheveux humains. Un test statistique, soit le test Q, a été effectué afin de valider qu'aucune donnée prise en compte dans le calcul de la moyenne ne soit aberrante. Étant donné la faible solubilisation des échantillons lors du premier essai, un second essai a été réalisé en augmentant la concentration de DTT à 60 mM ainsi que la période de sonication et de chauffage à 95 °C. Lors de cette analyse, l'extrait de kératine a également été préparé en deux répliques dont chacun a été dilué en triplicata. Les rendements obtenus se trouvent dans le tableau 5.2.

Tableau 5.2

Rendements (%) de la quantité de protéines dans les extraits de kératine à partir des cheveux humains obtenus à partir de la courbe d'étalonnage #2 (voir Annexe B)

Échantillons	Rendement (%)
3.1	9,1
3.2	10,7
3.3	11,5
4.1	9,0
4.2	9,6
4.3	9,4
Moyenne ± écart-type	10 ± 1

Lors du second essai, le rendement moyen obtenu pour la portion soluble en protéine de l'extrait est de $(10 \pm 1) \%$, ce qui valide le résultat obtenu avec la courbe d'étalonnage #1. Un test statistique, soit le test Q, a été effectué afin de valider qu'aucune donnée prise en compte dans le calcul de la moyenne ne soit aberrante.

La reproductibilité des résultats permet également de confirmer la reproductibilité de la méthode d'extraction. Effectivement, l'extrait insoluble obtenu suite à l'extraction de la kératine à partir des cheveux humains présente un taux de solubilisation similaire d'un extrait à l'autre. Autrement dit, il y a peu de variations au niveau des propriétés de solubilisation de la kératine extraite à partir des cheveux humains. Malgré les conditions agressives utilisées afin d'augmenter la solubilisation, soit par le traitement de l'échantillon dans un bain ultrason suivi d'un chauffage à $95 \text{ }^\circ\text{C}$, l'extrait de kératine demeure majoritairement insoluble même à une concentration plus élevée de dithiothréitol, qui est considéré comme un fort agent réducteur.

La méthode de dosage protéique Bradford n'a pas été concluante pour les extraits de kératine à partir des cheveux humains. Étant donné que la solubilisation des

échantillons n'est pas possible sans causer d'interférence avec la méthode de quantification, la quantification de la kératine extraite à partir des cheveux humains sera effectuée par une autre méthode, soit en effectuant l'analyse des acides aminés par chromatographie liquide couplée à un détecteur UV à barrette de diodes.

5.1.2 Quantification protéique de l'extrait de kératine à partir de la laine de mouton

Plusieurs analyses ont été réalisées pour la quantification de la kératine extraite à partir de la laine de mouton. Chaque extrait a été solubilisé dans une solution de 60 mM de DTT suivant une immersion dans un bain de sonication pour une durée de 30 minutes suivie d'un chauffage à 95 °C pendant 30 minutes. Après ces traitements, l'échantillon était entièrement solubilisé, tel que représenté à la figure 5.1. Chaque extrait a été dilué en triplicata et les résultats se trouvent dans les tableaux 5.3 et 5.4.

Tableau 5.3

Rendements (%) de la quantité de protéines dans les extraits de kératine à partir de la laine de mouton obtenus à partir de la courbe d'étalonnage #2 (voir Annexe B)

Échantillons	Rendement (%)
1.1	47,0
1.2	47,5
1.3	48,0
2.1	40,4
2.2	39,7
2.3	39,8
Moyenne ± écart-type	44 ± 4

Pour cet essai, le rendement moyen de protéines dans les extraits de kératine à partir de la laine de mouton est de (44 ± 4) %. Un test statistique, soit le test Q, a été effectué afin de valider qu'aucune donnée prise en compte dans le calcul de la moyenne ne soit

aberrante. Considérant l'ensemble des incertitudes liées à la méthode ainsi qu'aux différentes étapes de préparation des échantillons, les six répliques ont été considérées dans le calcul de la moyenne puisqu'aucune justification au niveau des manipulations ne permet d'exclure une série de données en particulier pour cet essai. Il est possible qu'un échantillon ne se soit pas solubilisé complètement, mais il n'est pas possible de valider cette hypothèse à partir des résultats obtenus. C'est pourquoi un troisième essai a été réalisé afin de confirmer les résultats obtenus lors du second essai étant donné qu'ils avaient un écart significatif de 8 % entre les moyennes de ces deux échantillons.

Tableau 5.4

Rendements (%) de la quantité de protéines dans les extraits de kératine à partir de la laine de mouton obtenus à partir de la courbe d'étalonnage #3 (voir Annexe B)

Échantillons	Rendement (%)
3.1	43,5
3.2	42,5
4.1	41,6
4.2	41,8
Moyenne ± écart-type	42,3 ± 0,9

Pour cet essai, le rendement moyen de protéines dans les extraits de kératine à partir de la laine de mouton est de $(42,3 \pm 0,9)$ %. Un test statistique, soit le test Q, a été effectué afin de valider qu'aucune donnée prise en compte dans le calcul de la moyenne ne soit aberrante. Un test statistique, soit le test T, a été effectué afin d'évaluer la différence entre les moyennes des deux groupes. Étant donné que le $t_{\text{calculé}}$ (1,83) est inférieur au t de Student ($t_{95\%} = 2,78$), les deux moyennes peuvent être considérées comme étant identiques. Ainsi, la concentration moyenne en protéines des extraits de kératine à partir de la laine de mouton obtenue avec la méthode de dosage Bradford est de (43 ± 3) %. La concentration en protéine de la kératine de la laine est significativement

inférieure aux résultats attendus. Cela peut être dû à plusieurs facteurs, dont la préparation des échantillons et la méthode de dosage. Les résultats obtenus par la méthode de dosage Bradford seront contre-vérifiés par l'analyse de la composition en acides aminés par chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-PDA).

À noter qu'aucun standard de kératine n'a pu être analysé lors des tests, donc les valeurs obtenues peuvent diverger de la teneur exacte en protéines dans chacun des extraits. Il est également difficile d'affirmer avec certitude que les conditions de solubilisation utilisées pour la quantification sont optimales. Effectivement, des réactifs plus agressifs et différentes conditions de solubilisation de la kératine pourraient fournir des résultats plus représentatifs de la teneur réelle en protéines. Cependant, sans standard, il est difficile, voire impossible, de déterminer les conditions optimales de solubilisation.

5.1.3 Limitations de la méthode d'analyse

La limitation principale de cette méthode est l'interférence des réactifs utilisés avec la méthode de dosage. Plusieurs méthodes de solubilisation ont été testées (acides forts, bases fortes, solution d'urée et de L-cystéine, bain ultrason et chauffage), mais elles ne sont pas suffisamment efficaces ou elles interfèrent avec l'agent de coloration, soit le bleu de Coomassie. L'utilisation de dithiothréitol a permis de solubiliser l'échantillon provenant de la laine, mais cela n'a tout de même pas été suffisant pour celui provenant des cheveux humains. Il n'a pas été possible de compléter l'analyse pour cet extrait. En effet, la kératine provenant des cheveux humains présente une insolubilité plus élevée que celle provenant de la laine. Ainsi, des conditions nettement plus agressives seraient requises pour la solubiliser. Afin de vérifier le caractère hydrophobe de l'extrait de kératine des cheveux humains, une analyse de l'angle de contact de l'eau a été effectuée.

5.1.3.1 Mesure de l'angle de contact de l'eau de l'extrait de kératine à partir des cheveux humains

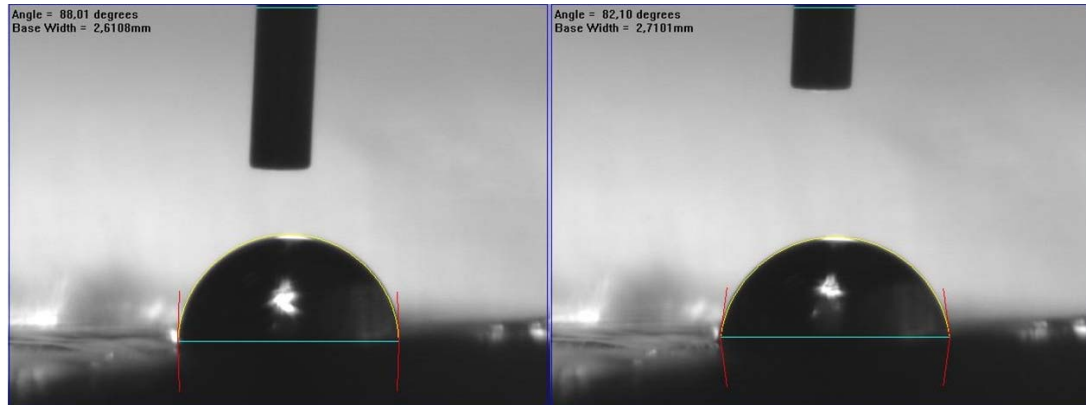


Figure 5.2 Angle de contact de l'eau sur l'extrait de kératine à partir des cheveux humains.

Dans la figure 5.2, il est possible d'observer que l'angle de contact de l'eau ne diminue pas significativement à la suite du dépôt de la goutte d'eau. Une variation de 6° est considérée suffisamment faible pour conclure que la kératine extraite à partir des cheveux humains présente peu d'affinité avec l'eau. Cette analyse permet de confirmer que cet extrait ne se solubilise pas facilement dans l'eau et que des conditions plus agressives sont nécessaires pour sa solubilisation.

5.1.3.2 Mesure de l'angle de contact de l'eau de l'extrait de kératine à partir de la laine de mouton

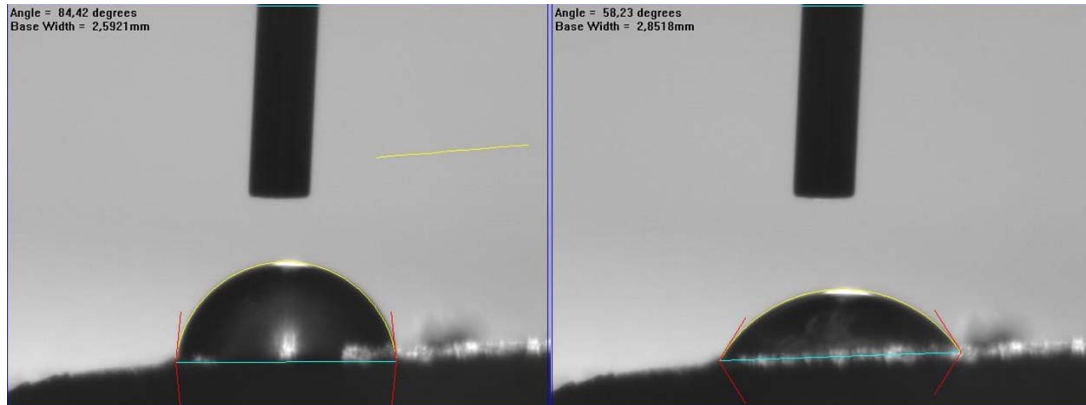


Figure 5.3 Angle de contact de l'eau sur l'extrait de kératine à partir de la laine de mouton.

Une analyse de l'angle de contact de l'eau a également été réalisée pour l'extrait obtenu à partir de la laine de mouton. Comme représenté à la figure 5.3, une variation d'environ 30° est observée 25 secondes après le dépôt de la goutte d'eau sur l'extrait. Il a été rapporté que la kératine de la laine contient environ 40 % d'acides aminés hydrophiles et 60 % hydrophobes dans sa séquence. Il est donc attendu d'avoir une fraction du matériel soluble dans l'eau [18]. L'analyse de l'angle de contact de l'eau a permis de valider que la kératine extraite à partir de la laine possède de l'affinité pour l'eau et qu'elle se solubilise bien dans ce solvant.

5.2 Analyse de la composition en acides aminés par chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrette de diodes (HPLC-PDA)

La qualité et la quantité de la kératine extraites ont été évaluées par l'analyse de sa composition en acides aminés. Les échantillons de matières premières qui ont été utilisés dans ce projet, soit les cheveux humains et la laine de mouton, ont été analysés afin d'évaluer la différence entre l'échantillon brut et le produit extrait. Ainsi, il sera possible de comparer les résultats obtenus expérimentalement afin d'évaluer si la

kératine extraite conserve sa composition originale en acides aminés ou si une quelconque perte survient au cours de l'extraction. La sommation des différents acides aminés permettra également de quantifier la kératine extraite. La quantité de protéines dans les échantillons peut toutefois varier selon plusieurs facteurs, tels que la génétique, la nutrition ainsi que l'état psychologique de l'individu ou de l'animal [58]. Dans ce projet, ces facteurs n'ont pas été contrôlés puisque ces informations n'étaient pas disponibles. Il est donc possible que les teneurs en protéines et la composition en acides aminés soient distinctes de celles dans la littérature.

Afin de quantifier les différents acides aminés présents, les extraits de kératine sont hydrolysés puis dérivés pour ensuite être analysés par chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrette de diodes. La séparation chromatographique des différents acides aminés est représentée par la figure 5.4. En tenant compte du nombre d'analytes présents dans la solution, il est possible d'affirmer que la séparation est suffisante. Effectivement, il y a quelques chevauchements de pics, mais leur séparation est acceptable puisqu'il est tout de même possible d'identifier la majorité des acides aminés.

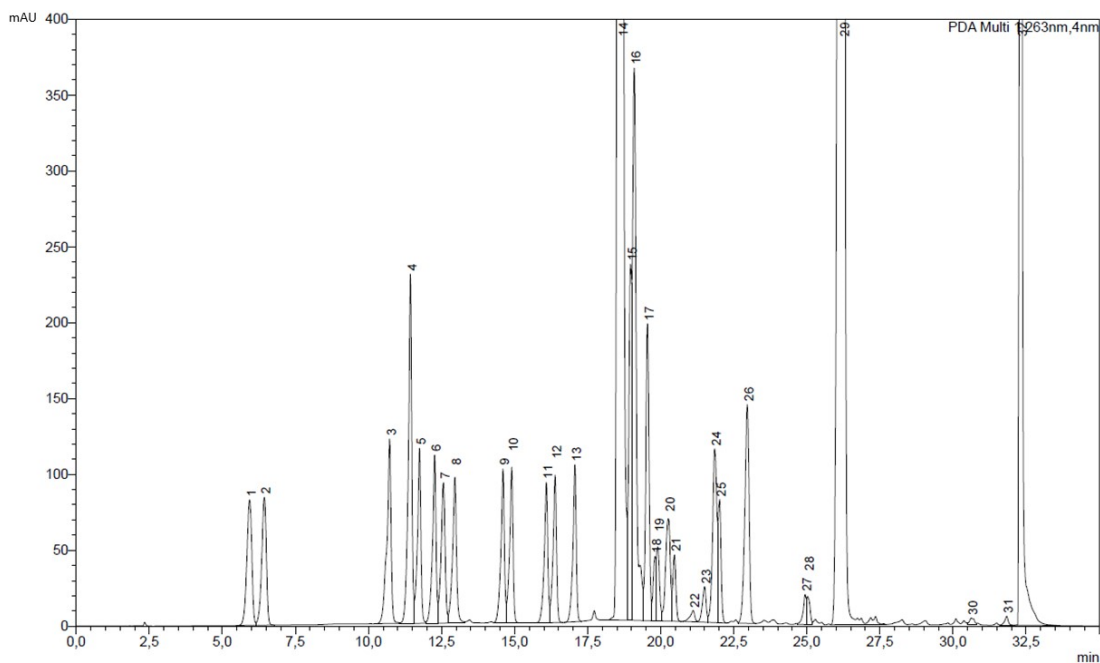


Figure 5.4 Chromatogramme de la solution contenant 16 standards d'acides aminés (1-Asp, 2-Glu, 3-Ser, 4-Gly, 5-Thr, 6-Ala, 7-Pro, 8-Arg, 9-Val, 10-Met, 11-Ile, 12-Leu, 13-Phe, 14-FMOC-OH, 15-Orn, 16-Lys, 17-Cys, 18 à 28-Résidus FMOC & pics non identifiés, 29-FMOC-ADAM).

Les acides aminés histidine et tyrosine n'ont pas été détectés lors de l'analyse de la solution contenant 16 standards d'acides aminés. L'histidine a toutefois été injecté individuellement et son temps de rétention est de 10,59 minutes. Il est donc possible que l'histidine co-élue avec l'acide aminé serine qui possède un temps de rétention de 10,73 minutes. Étant donné que la teneur théorique en histidine pour les deux matières premières est relativement faible (< 2 %) [17, 59], cet acide aminé ne sera pas comptabilisé dans l'évaluation de la composition en acides aminés du produit extrait. Quant à l'acide aminé tyrosine, il a dû être analysé dans des conditions différentes des échantillons puisqu'il n'était pas soluble à un pH neutre. Il a été possible de l'analyser et de déterminer son temps de rétention dans des conditions acides (pH < 2). Cependant, cela affecte le temps de rétention de l'analyte, donc il ne sera pas possible d'identifier le pic correspondant à cet acide aminé lors de l'analyse des échantillons qui sont injectés à un pH neutre. Ainsi, il n'a pas été possible d'évaluer la composition des

acides aminés histidine ni tyrosine dans les échantillons de kératine pour les deux matières premières.

Le temps de rétention de chacun des analytes a été déterminé à la suite de leur analyse individuelle ainsi que par la comparaison des résultats obtenus et publiés dans l'article de Jám bor et Molnár-Perl (2009). Ils sont présentés dans le tableau 5.5.

Tableau 5.5
Temps de rétention des différents acides aminés

Acides aminés	Temps de rétention (min)¹
Acide aspartique (DL-Aspartic acid)	5,945
Acide glutamique (L-Glutamic acid)	6,450
Histidine (L-Histidine)	10,593
Serine (L-Serine)	10,733
Glycine	11,453
Threonine (L-Threonine)	11,759
Alanine (L-Alanine)	12,273
Proline (L-Proline)	12,570
Tyrosine (L-Tyrosine)	12,840 et 19,885
Arginine (L-Arginine monohydrochloride)	12,961
Valine (L-Valine)	14,613
Methionine (L-Methionine)	14,908
Isoleucine (L-Isoleucine)	16,089
Leucine (L-Leucine)	16,392
Phenylalanine (L-Phenylalanine)	17,074
Ornithine monohydrochloride	18,978
Lysine (L-Lysine monohydrochloride)	19,105
Cystéine (L-Cysteine hydrochloride monohydrate)	19,559

¹ Les chromatogrammes de chaque acide aminé individuel sont disponibles à l'Annexe C.

Afin d'évaluer la linéarité de la méthode d'analyse, différentes concentrations de chacun des acides aminés ont été analysées. Les coefficients de corrélation ainsi que les équations de calibration obtenues se trouvent à l'Annexe C.

Bien que la linéarité soit satisfaisante pour chacun des acides aminés, la quantification des différents analytes a été effectuée par l'ajout d'un standard interne aux échantillons. En effet, les standards d'acides aminés ont été préparés dans les mêmes conditions, soit une solubilisation dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl) puis une neutralisation par l'hydroxyde de sodium (NaOH), mais la matrice de l'échantillon demeure différente de celle des standards. Ainsi, l'ajout d'une concentration connue de l'ornithine aux échantillons permettra d'évaluer plus précisément la quantité de chaque acide aminé tout en tenant compte de l'effet de matrice des échantillons. L'ornithine a été sélectionné comme standard interne puisqu'il possède une structure similaire aux autres acides aminés (voir figure 5.5), donc il devrait répondre de façon similaire et être détectable dans les mêmes conditions d'analyses des autres acides aminés. De plus, l'ornithine est l'un des métabolites intermédiaires du cycle de l'urée qui n'est pas intégré dans les protéines naturelles [60]. Il n'est donc pas présent dans la kératine de la laine de mouton ni celle des cheveux humains. L'ornithine aura également des affinités avec la phase stationnaire puisqu'il possède deux groupements amines primaires.

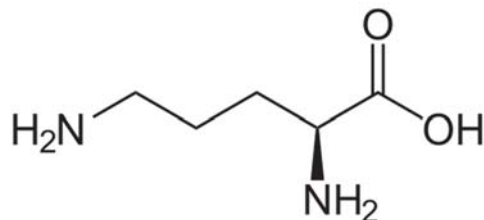


Figure 5.5 Structure chimique de l'ornithine.

Tous les échantillons ainsi que les standards ont été ajustés à un pH neutre de 7,2 ($\pm 0,1$) afin d'obtenir la plus grande reproductibilité possible dans les temps de rétention et d'être dans les mêmes conditions que la phase mobile. Il a été observé que le pH avait un impact sur les temps de rétention, qui sont plus courts lorsque les échantillons sont injectés dans des conditions acides.

Afin de détecter les acides aminés avec le détecteur à barrette de diodes (PDA), une dérivation chimique des échantillons a été nécessaire étant donné que les acides aminés n'absorbent pas dans leur état original. Le chlorure de fluorénylméthoxycarbone (FMOC.Cl) a été utilisé pour la dérivation et la réaction a été arrêtée avec le chlorhydrate d'adamantane (ADAM.HCl). La longueur d'onde d'absorption maximale a été évaluée à 263 nm et c'est à cette longueur d'onde que les acides aminés ont été identifiés et quantifiés par le détecteur à barrette de diodes.

5.2.1 Limitations de la méthode d'analyse

Au niveau de cette analyse caractéristique et quantitative du produit obtenu, certaines limitations pratiques sont survenues. Plus précisément, le standard de l'acide aminé tyrosine (Tyr) n'a pas pu être analysé dans les mêmes conditions que les autres standards d'acides aminés puisqu'il n'était pas soluble à pH neutre. Des conditions acides ont dû être utilisées, ce qui a permis de le détecter lors de son analyse individuelle. Cependant, il n'a pas été possible de l'identifier sur le chromatogramme des échantillons contenant tous les différents acides aminés. Des conditions différentes d'analyses devraient être utilisées pour y parvenir.

5.2.2 Analyse de la composition en acide aminé dans l'extrait de kératine provenant des cheveux humains

La composition en acides aminés pour les extraits de kératine à partir des cheveux humains a été déterminée et les résultats sont présentés dans la figure 5.6.

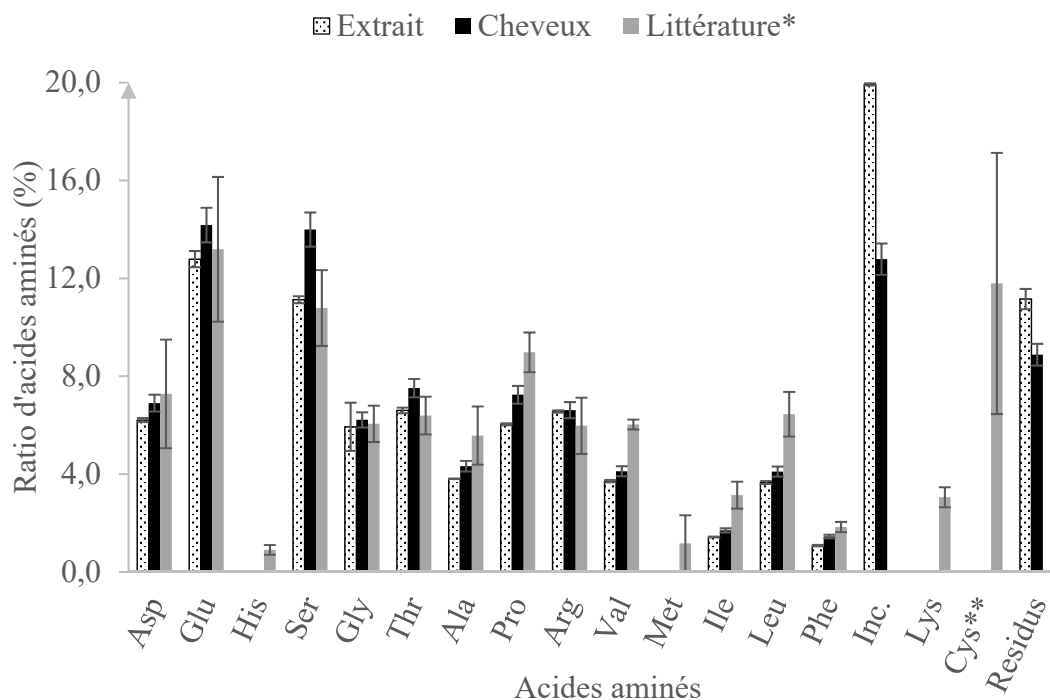


Figure 5.6 Proportion des différents acides aminés des échantillons de cheveux humains et de la kératine extraite. * Ratio d'acides aminés selon la littérature [17, 61, 62]. ** Analysé en tant que ½ cystine.

Des cheveux humains ont été hydrolysés de la même façon que les extraits de kératine afin de comparer la composition de la matière première utilisée et le produit obtenu suite à l'extraction de la kératine. La matière première a principalement été analysée parce qu'une différence a été observée dans la littérature entre les différents auteurs ayant effectué l'analyse de la composition en acides aminés dans les cheveux humains. Toutefois, cette variation est normale puisque la quantité de kératine ainsi que les proportions des divers acides aminés peuvent varier entre les individus et également selon leur origine [38, 51]. La quantité des divers acides aminés analysés est légèrement inférieure dans les extraits de kératine que dans les cheveux humains, mais les ratios sont tout de même similaires. Une similarité est également observée entre les proportions d'acides aminés des échantillons analysés dans ce projet et les valeurs obtenues dans la littérature. Une augmentation de la quantité d'inconnu ainsi que de

résidus est observée dans les échantillons comparativement à la matière première brute. Quant au pic identifié « Inconnu », un doublet de pics non identifié se trouve sur les chromatogrammes de la kératine extraite ainsi que de la matière première (voir Annexe C). Il s'agit fort probablement d'un acide aminé ou d'un dérivé composé d'au moins un groupement amine puisqu'il a été longtemps retenu par la colonne chromatographique ($t_R \approx 17,7$ minutes). Celle-ci est composée d'une phase stationnaire C18 avec des chaînes latérales di-isobutyle et elle possède des affinités avec les peptides. Il n'est pas possible d'identifier le composé éluant à 17,7 minutes à partir des analyses effectuées. Par contre, le pic est présent sur le chromatogramme des cheveux humains et de la kératine extraite, mais absent du chromatogramme de blanc, donc il s'agit d'un composé présent dans les deux échantillons. Ainsi, il se peut qu'un des acides aminés non détectés, par exemple la cystéine, ait été dégradé lors de l'hydrolyse et qu'il élué à ce temps de rétention. Il se peut également que la dissociation des acides aminés n'ait pas été complétée lors de l'hydrolyse. Quant aux résidus qui ont élué à 19,3 minutes, ils ont été comptabilisés puisque lors de l'analyse individuelle des standards, un pic a été observé à ce temps de rétention pour deux acides aminés : alanine et thréonine. Il se peut que ce soit des composés secondaires de certains acides aminés ayant été formés lors de l'hydrolyse. Comme ce pic à 19,3 minutes est présent dans les chromatogrammes de standards individuels, de la matière première et dans les extraits de kératine, il a été comptabilisé dans la quantification des acides aminés.

Il est possible d'observer dans la figure 5.6 que les acides aminés histidine, méthionine, lysine, cystéine et tyrosine n'ont pas été quantifiés pour la matière première ni pour l'extrait de kératine. Quant à l'acide aminé histidine, une concentration nettement plus élevée a été nécessaire afin de le détecter lors de l'analyse des standards individuels (voir Annexe C). Il est donc possible que la matrice des échantillons ainsi que la faible concentration d'histidine présente dans ceux-ci aient limité sa détection. Effectivement, la quantité d'histidine attendue dans les cheveux humains varie entre 0,7 et 0,9 % [17, 28, 38].

Quant à l'acide aminé méthionine, il a bel et bien été détecté lors de l'analyse des standards, mais il est présent en très faible quantité dans les cheveux humains, soit 0,4 à 0,6 % [17, 28, 38]. Il se peut donc que la sensibilité de l'instrument ne soit pas suffisante pour détecter cette concentration et que la matrice de l'échantillon inhibe son signal.

Il n'a pas été possible d'identifier le pic associé à l'acide aminé lysine sur les chromatogrammes des échantillons. Un temps de rétention de 19,11 minutes avait été obtenu lors de l'analyse du standard individuel et de la solution standard contenant tous les acides aminés. Toutefois, aucun pic associé à ce temps de rétention n'a été observé lors de l'analyse des échantillons. Son temps de rétention est très près de celui de l'ornithine ($t_R = 18,98$ minutes), donc il se peut que les deux acides aminés aient co-élué. L'ornithine a été utilisée comme standard interne et une concentration nettement supérieure à celle de chacun des acides aminés individuels a été ajoutée au mélange. Donc, si la lysine a co-élué avec l'ornithine, il n'est pas possible d'identifier son pic sur les chromatogrammes. De plus, une grande concentration d'ornithine devait être ajoutée aux échantillons puisque son temps de rétention était près d'un des temps de rétention de l'agent dérivant et une trop faible concentration ne permettait pas sa détection. Il s'agit d'une des limitations de cette méthode d'analyse.

Concernant l'acide aminé cystéine, il n'a pas été détecté suite à l'hydrolyse avec l'acide chlorhydrique 6 M puisqu'il a fort probablement été détruit lors de cette réaction. Certains chercheurs ont réalisé des essais afin de limiter sa dégradation lors de l'hydrolyse des protéines, mais seulement une faible quantité est détectée. La dégradation de la cystéine lors de l'hydrolyse est fréquente et elle est généralement causée par la température élevée de la réaction ($T > 100$ °C) [63, 64]. Elle peut également être influencée par la présence d'autres composés chimiques, tels que l'acide pyruvique ou d'autres acides aminés [10, 65, 66]. Dans certains cas, elle est analysée sous forme de « $\frac{1}{2}$ cystine », qui est un composé formé de deux monomères de cystéine

[65]. Dans ce projet, il n'a pas été possible d'identifier cet analyte suite à l'hydrolyse des échantillons. Davantage de tests seraient nécessaires afin de limiter la dégradation de la L-cystéine durant l'hydrolyse. Cela n'indique pas pour autant qu'il n'y a pas de L-cystéine dans la kératine extraite et dans la matière première.

Un rendement de protéine peut être déterminé suite à la sommation de la quantité de l'ensemble des acides aminés détectés sur le chromatogramme. Effectivement, une protéine est une chaîne peptidique composée d'acides aminés, donc en quantifiant les acides aminés produits par l'hydrolyse, il est possible d'estimer la quantité de protéine dans les extraits. La matière première utilisée, soit les cheveux humains, a également été hydrolysée afin de vérifier sa teneur en protéine et de la comparer à ce qui est attendu, soit environ 80 % de kératine pour les cheveux [3, 4].

Tableau 5.6

Résultats obtenus à la suite de l'analyse des acides aminés des échantillons de cheveux humains

Concentration de cheveux (ppm) (n = 3)	Concentration d'acides aminés (ppm)	Rendement acides aminés/cheveux (%)
1803	1424 ± 9	79,0 ± 0,5

Selon les résultats obtenus, 79 % de protéine se trouve dans les échantillons de cheveux humains qui ont été utilisés pour l'extraction de la kératine, ce qui concorde avec la valeur attendue de 80 %.

Tableau 5.7

Résultats obtenus à la suite de l'analyse des acides aminés des échantillons de kératine extraite (à partir des cheveux humains)

Concentration d'échantillon (ppm) (n = 3)	Concentration d'acides aminés (ppm)	Rendement acides aminés/éch. (%)
1972	1278 ± 29	65 ± 2
2540	1640 ± 83	65 ± 3
3460	2308 ± 26	667 ± 1
Moyenne		66 ± 2

À la suite de l'analyse des extraits de kératine des cheveux humains, il est possible d'affirmer qu'ils sont composés à (66 ± 2) % de protéines. Ainsi, la méthode d'extraction avec une solution d'urée et de L-cystéine permet d'obtenir un rendement d'extraction de protéines de 66 % pour la matière première des cheveux humains. Ce résultat pourrait être amélioré en optimisant l'équipement nécessaire à la préparation des échantillons ainsi que leur solubilisation. Par exemple, une coupe plus fine des échantillons permettrait d'augmenter la surface de contact et ainsi augmenter l'efficacité de l'agent réducteur. En considérant que la méthode utilisée est écoresponsable, le rendement obtenu de 66 % est satisfaisant lorsqu'il est comparé aux autres méthodes d'extraction présentées au tableau 1.1 qui utilisent des réactifs plus nocifs pour l'environnement.

5.2.3 Analyse de la composition en acide aminé dans l'extrait de kératine provenant de la laine de mouton

La composition en acides aminés pour les extraits de kératine à partir de la laine de mouton a été déterminée et les résultats sont présentés dans la figure 5.7.

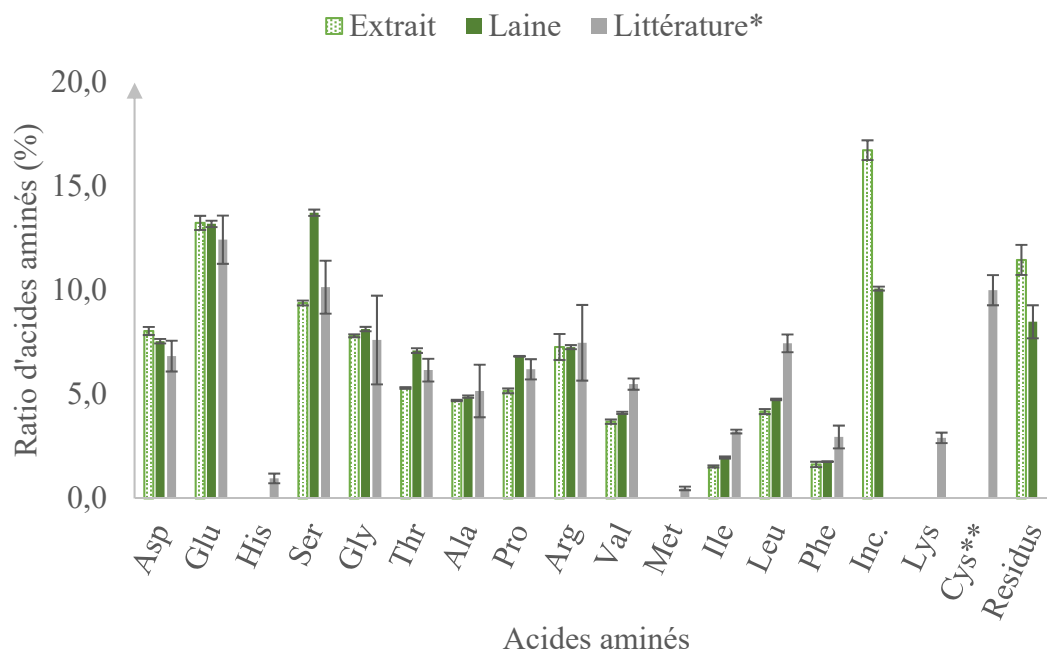


Figure 5.7 Proportion des différents acides aminés des échantillons de laine de mouton et de la kératine. * Ratio d'acides aminés selon la littérature [48, 49, 67, 68]. ** Analysé en tant que ½ cystine.

À la suite de l'analyse des échantillons de laine et de sa kératine extraite, les mêmes acides aminés qui n'avaient pas été détectés pour les échantillons de cheveux n'ont pas été détectés pour les échantillons de laine. Pour des raisons similaires à celles expliquées dans la section précédente, les acides aminés présents en trop faible concentration n'ont pas pu être détectés dû à la sensibilité insuffisante de l'appareil utilisé. La quantité d'histidine attendue dans la laine est de moins de 1 % et celle de la méthionine est inférieure à 0,5 % [67, 68].

Quant aux acides aminés cystéine et lysine, il n'a pas été possible d'identifier leur pic sur les chromatogrammes. Au niveau de la cystéine, tel que mentionné dans la section précédente, il est fort probable qu'elle ait été dégradée lors de la réaction d'hydrolyse. Il n'a donc pas été possible de la détecter avec la méthode instrumentale utilisée. Concernant la lysine, il est possible qu'elle ait co-élué avec l'ornithine puisqu'ils ont

des temps de rétention très rapprochés. De plus, comme expliqué pour les échantillons de cheveux humains, une grande concentration d'ornithine devait être ajoutée aux échantillons suite à l'hydrolyse afin de permettre la quantification. Ceci peut avoir eu un impact sur la détection de la lysine qui avait un signal plus faible comparé à celui de l'ornithine.

Tableau 5.8

Résultats obtenus à la suite de l'analyse des acides aminés des échantillons de laine de mouton

Concentration de laine de mouton (ppm) (n = 3)	Concentration d'acides aminés (ppm)	Rendement acides aminés/cheveux (%)
1500	1249 ± 16	83 ± 1

Les résultats présentés au tableau 5.8 permettent de définir qu'environ 83 % de kératine est présente dans la laine de mouton qui a été utilisée pour la réalisation des différents essais de ce projet de recherche. Dans la littérature, la quantité de kératine attendue dans cette matière première peut atteindre jusqu'à 95 % [3, 6, 54]. Il est possible d'observer une certaine différence entre la valeur obtenue expérimentale de 83 % et la valeur attendue de 95 %. Ceci est possible puisque la quantité de kératine varie selon les individus et leur origine. Plus précisément, il y a plusieurs sources de variations au niveau des caractéristiques de la laine de mouton et elles sont observées entre les races, entre les troupeaux, entre les toisons (dans les troupeaux), entre les positions dans les toisons, entre les agrafes dans les positions, entre les fibres à l'intérieur des agrafes et le long des fibres [69]. Aussi, la nutrition des moutons influence la composition en acides aminés de la laine [70]. Donc, en considérant l'ensemble de ces sources de variations, il est fort probable que la teneur en protéines de chaque mouton ne soit pas identique. Dans ce projet, il n'a pas été possible de contrôler les facteurs tels que l'alimentation, l'échantillonnage, l'état physiologique et plusieurs autres paramètres

qui auraient pu affecter la qualité de la laine. Il est également possible que le prétraitement effectué sur les échantillons n'ait pas retiré la totalité des impuretés présentes sur la laine. En effet, la laine peut contenir une grande quantité d'impuretés, soit de 25 à 70 % de sa masse [71]. Il peut s'agir de graisses, de suint, de saleté et de matières végétales, telles que des bavures et des graines. Malgré le nettoyage et le retrait des lipides, il se peut qu'une certaine quantité de ces impuretés n'ait pas été retirée et cela pourrait expliquer le rendement inférieur obtenu. De plus, certains auteurs ont mentionné que la laine contient environ 82 % de protéines kératineuses [72, 73], ce qui confirme la possibilité que seulement 83 % de protéines soient présentes dans l'échantillon de laine utilisé au cours de ce projet de recherche.

Tableau 5.9

Résultats obtenus à la suite de l'analyse des acides aminés de kératine extraite (à partir de la laine de mouton)

Concentration d'échantillon de kératine (ppm) (n = 3)	Concentration d'acides aminés (ppm)	Rendement acides aminés/éch. (%)
1116	824 ± 25	74 ± 2
1423	979 ± 22	69 ± 2
Moyenne		71 ± 3

À la suite de l'analyse des extraits de kératine de la laine de mouton, il est possible d'affirmer qu'ils sont composés à 71 % de protéines. Ainsi, la méthode d'extraction avec une solution d'urée et de L-cystéine permet d'obtenir un rendement d'extraction de protéines de 71 % pour la matière première de la laine de mouton. En comparant ce résultat à la littérature, il est inférieur aux autres rendements obtenus par les autres méthodes d'extraction de kératine par réduction présentées au tableau 1.2, mais la méthode utilisée dans ce projet de recherche est plus écoresponsable.

5.3 Limitations du projet de recherche

Il est possible d'évaluer certaines limitations concernant les échantillons qui ont été utilisés au cours du projet de recherche. D'abord, au niveau de l'échantillonnage des cheveux humains, un lot de cheveux appartenant à plusieurs individus différents a été prélevé. Aucune information (sexe, âge, race, maladie, traitements capillaires, etc.) n'est connue par rapport aux individus auxquels appartiennent les cheveux. Cela apporte une certaine variabilité dans l'échantillon puisqu'il se peut qu'une personne ait une plus grande proportion de kératine dans ses cheveux ou bien que la kératine soit affectée par des traitements capillaires tels que la modification de la forme des cheveux [38, 74]. Il s'agit de facteurs qui pourraient affecter la quantité et la qualité de la kératine extraite et ils n'ont pas pu être contrôlés dans cette étude pour l'échantillon de cheveux humains. Quant à la laine de mouton, elle provient d'un seul et même animal, donc il y a peu de variabilité dans l'échantillon. Le fait d'avoir un échantillon d'une seule et même origine permet d'évaluer directement l'impact de la modification des différents paramètres d'extraction sur la quantité et la qualité de la kératine extraite.

Une seconde limitation survenue est au niveau de la préparation des échantillons. N'ayant pas de moulin à coupe permettant le broyage des échantillons à une longueur de quelques millimètres, les échantillons ont été coupés manuellement. Il est donc fort probable qu'une variabilité dans la coupe soit survenue. Ayant tout de même obtenu des résultats reproductibles dans les différentes extractions, l'impact de cette préparation est davantage sur le rendement d'extraction. Effectivement, une plus grande quantité de protéines pourrait être extraite si la surface de contact des échantillons était plus grande. Dans l'éventualité où la méthode est utilisée dans un projet à grande échelle, l'utilisation d'un moulin à coupe pour obtenir une fine poudre des échantillons est fortement recommandée. Ceci permettrait d'augmenter le rendement d'extraction et potentiellement réduire les conditions agressives utilisées

lors de la solubilisation, soit par une diminution du pH, de la concentration d'urée ou de la température.

Une troisième limitation est à considérer dans ce projet, soit dans les méthodes d'analyses du produit extrait. Au niveau des méthodes de dosage utilisées pour la quantification protéique des extraits de kératine, les résultats pourraient être plus exacts quant à la teneur réelle en protéine en optimisant les méthodes de détection employées. Les extraits ont été analysés par la méthode de dosage Bradford dont la détection est réalisée par UV-visible. La seconde méthode de quantification utilisée a été effectuée par chromatographie liquide couplée à un détecteur à barrette de diodes, qui est également un mode de détection dans l'UV-visible. Bien que les résultats obtenus soient reproductibles, d'autres méthodes quantitatives avec des modes de détection plus spécifiques permettraient d'accroître l'exactitude du résultat obtenu. Par exemple, une détection par spectrométrie de masse permettrait d'augmenter la spécificité de l'analyse et permettrait potentiellement d'identifier les composés inconnus présents dans l'extrait de kératine. En effet, il se peut que les inconnus captés par le PDA soient des acides aminés qui ont subi une modification au niveau de leur structure chimique lors de l'hydrolyse. Toutefois, il n'est pas possible de les identifier avec certitude en se basant uniquement sur leur temps de rétention. Une détection par spectrométrie de masse en tandem permettrait d'identifier l'ensemble des composés présents dans les extraits de kératine.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail portait sur le développement de méthodes écoresponsables d'extraction de la kératine à partir des cheveux humains et de la laine de mouton. Ce projet s'est concentré sur deux objectifs principaux; 1) l'optimisation de la méthode d'extraction au niveau du pH, de la concentration d'urée et de la température ainsi que 2) l'évaluation qualitative et quantitative de l'extrait obtenu. Le premier objectif a été atteint. En effet, il a été possible d'évaluer les trois paramètres (pH, concentration d'urée et température) optimaux d'extraction de la kératine pour chacune des deux matières premières. Le deuxième objectif du projet a également été atteint. Il a été possible de confirmer que l'extrait obtenu était bel et bien la kératine à la suite de l'analyse des vibrations interatomiques par FTIR et des poids moléculaires par SDS-PAGE. La quantité de kératine extraite a été évaluée par la méthode de dosage Bradford et par l'analyse des acides aminés par HPLC-PDA. Dans les conditions optimales d'extraction, il est possible d'extraire 65 % de kératine à partir des cheveux humains et 71 % à partir de la laine de mouton. Cette recherche a permis de démontrer la possibilité d'extraire la kératine avec une méthode écoresponsable tout en obtenant des rendements comparables aux autres méthodes qui emploient des réactifs plus néfastes pour l'environnement. Bien que les objectifs principaux du projet aient été atteints, certaines améliorations de la préparation à l'analyse des échantillons permettraient d'améliorer davantage les résultats obtenus. D'abord, l'utilisation d'un moulin à coupe permettrait d'augmenter la surface de contact des échantillons de matières premières et ainsi augmenter le rendement d'extraction de la kératine. Quant à la qualité du produit extrait, il serait intéressant de développer une méthode de purification des extraits obtenus afin d'éliminer les impuretés résiduelles ou dans le but d'isoler les différents poids moléculaires de la kératine extraite. Cela pourrait se réaliser par la séparation des extraits de kératine par chromatographie d'exclusion.

ANNEXE A

CONDITIONS DE PRÉPARATION DÉTAILLÉES POUR L'ANALYSE DES POIDS MOLÉCULAIRES PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL (SDS-PAGE)

Tableau A.1

Préparation des échantillons pour la migration dans le gel de séparation (SDS-PAGE)
de la kératine soluble des deux matières premières
(laine de mouton et cheveux humains)

Échantillons	Volume selon les échantillons (µL)			
	KL ¹ 1X	KL 2X	KC ² 1X	KC 2X
Échantillon de kératine soluble (dans urée 8 M et 0.165 M L-cystéine)	15	7.5	15	7.5
Eau distillée	0	7.5	0	7.5
Tampon 4X (SDS 2 %, Mercaptoéthanol 5 %, Glycérol 20 %, Tris-HCl 0.025 M pH8 et 10 % de bleu de bromophénol à 0,2 % (m/v))	5			
Total (µL)	20			

¹ KL : kératine extraite à partir de la laine de mouton

² KC : kératine extraite à partir des cheveux humains

Tableau A.2

Proportions des divers réactifs utilisés pour la migration dans le gel de séparation (SDS-PAGE) de la kératine soluble extraite à partir des cheveux humains

Échantillons	Volume selon les échantillons (µL)			
	KC#1	KC#2	KC#3	Blanc
Dithiothréitol (DTT) 50 mM	10	12	20	10
Échantillon de kératine soluble (dans urée 8 M et 0.165 M L-cystéine)	50	48	40	50*
Tampon 4X (SDS 2 %, Mercaptoéthanol 5 %, Glycérol 20 %, Tris-HCl 0.025 M pH8 et 10 % de bleu de bromophénol à 0,2 % (m/v))	20			
Total (µL)	80			

* Pour l'échantillon de blanc, 50 µL d'urée 8 M et de L-cystéine 0.165 M à pH 8 ont été utilisés alors qu'il n'y avait pas de kératine dans la solution.

Tableau A.3

Proportions des divers réactifs utilisés pour la migration dans le gel de séparation (SDS-PAGE) de la kératine soluble extraite à partir de la laine de mouton

Échantillons	Volume selon les échantillons (µL)			
	Blanc	KL#1	KL#2	KL#3
Dithiothréitol (DTT) 100-200 mM	12 (150mM)	12 (100mM)	12 (150mM)	12 (200mM)
Échantillon de kératine soluble (dans urée 8 M et 0.165 M L-cystéine)	48*			
Tampon 4X (SDS 2 %, Mercaptoéthanol 5 %, Glycérol 20 %, Tris-HCl 0.025 M pH8 et 10 % de bleu de bromophénol à 0,2 % (m/v)	20			
Total (µL)	80			

* Pour l'échantillon de blanc, 48 µL d'urée 8M et de L-cystéine 0.165M à pH 11 ont été utilisés alors qu'il n'y avait pas de kératine dans la solution.

ANNEXE B

COURBES D'ÉTALONNAGE DE LA MÉTHODE DE DOSAGE BRADFORD

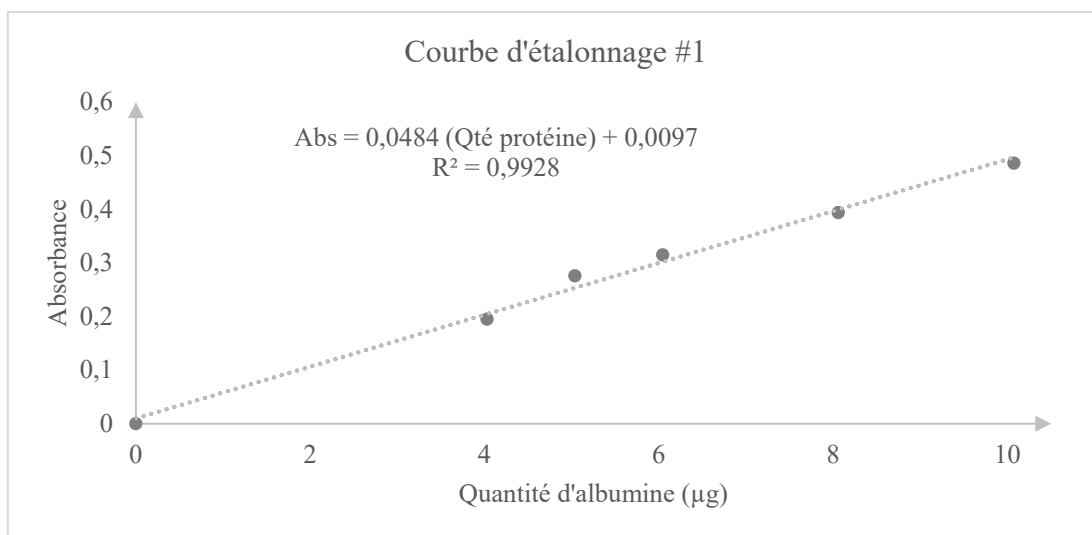


Figure B.1 Courbe d'étalonnage #1 de la quantité de protéine en fonction de l'absorbance.

Un contrôle qualité a été réalisé afin de vérifier l'exactitude de la courbe d'étalonnage #1 et l'écart relatif obtenu est de 5,2 %.

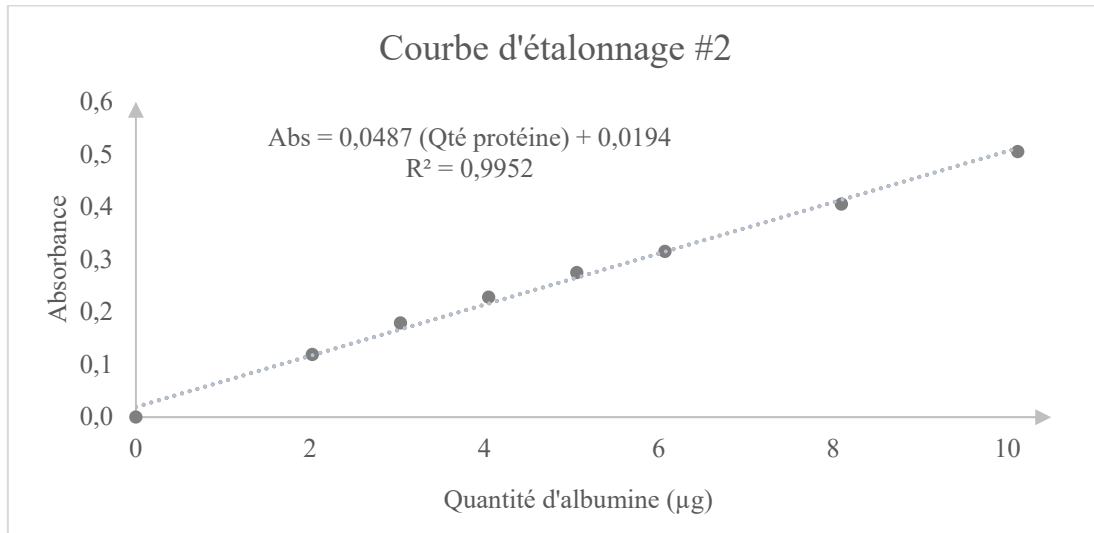


Figure B.2 Courbe d'étalonnage #2 de la quantité de protéine en fonction de l'absorbance.

Deux contrôles de la qualité ont été effectués, soit un à une quantité en protéines de 7 µg et un second de 9 µg. Les écarts relatifs obtenus sont respectivement 6,42 % et 2,16 %. Ces valeurs permettent de valider l'exactitude de la courbe d'étalonnage #2.

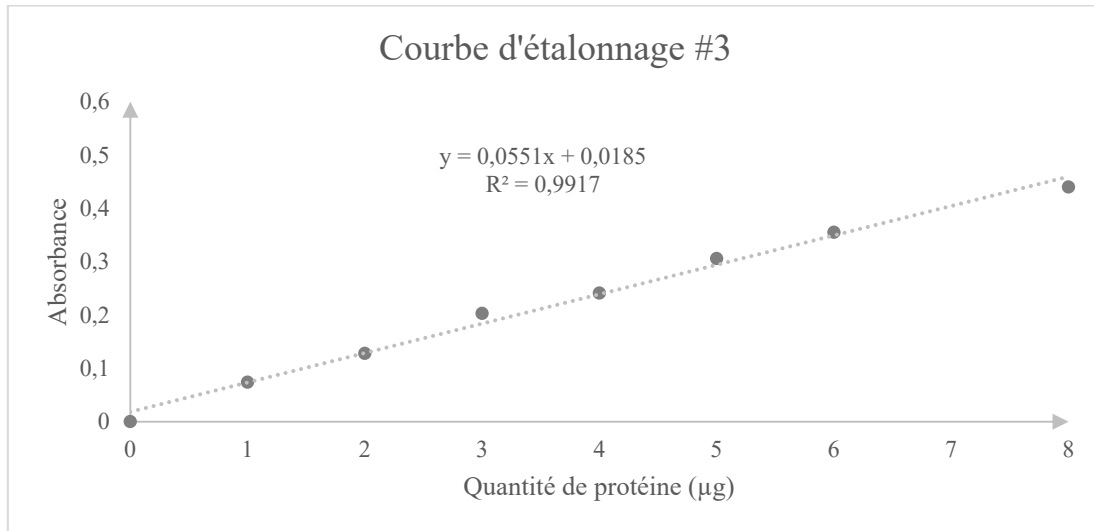


Figure B.3 Courbe d'étalonnage #3 de la quantité de protéine en fonction de l'absorbance.

Pour cette courbe d'étalonnage #3, trois contrôles de la qualité ont été effectués à différentes quantités de protéines, soit 3 µg, 6 µg et 7 µg, afin de valider l'exactitude de la droite. Les écarts relatifs pour ces contrôles sont respectivement 1,21 %, 2,54 % et 3,75 %.

ANNEXE C

CHROMATOGRAMMES INDIVIDUELS DES 18 ACIDES AMINÉS POUR L'IDENTIFICATION DES TEMPS DE RÉTENTION ET DES ÉCHANTILLONS

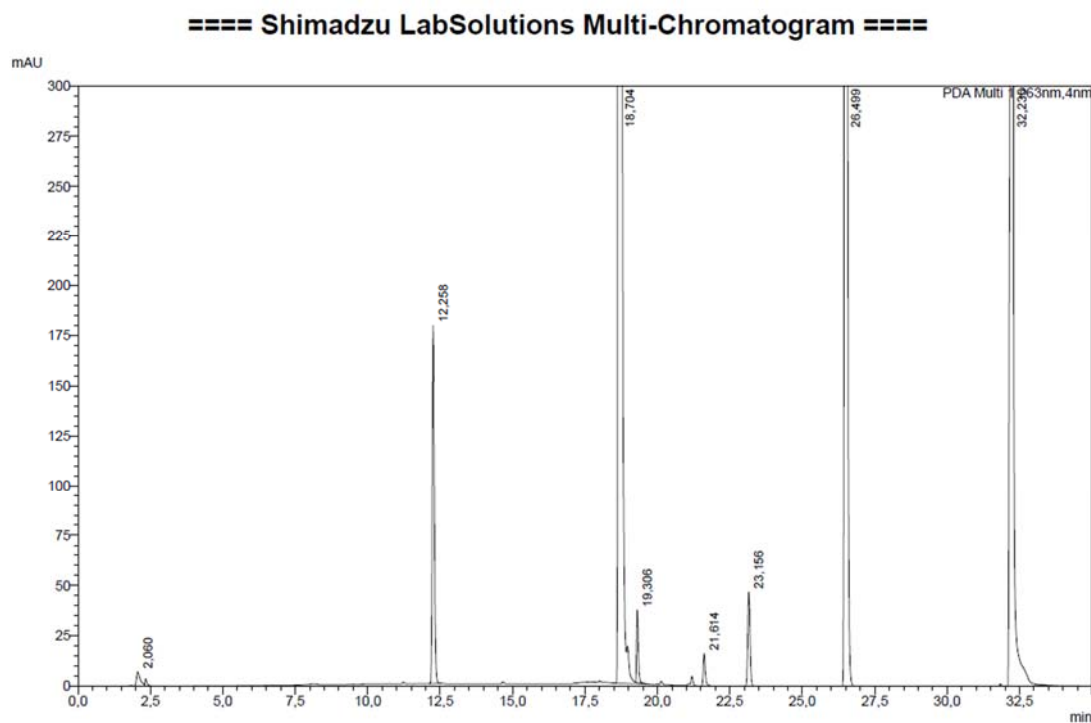


Figure C.1 Chromatogramme de l'acide aminé Alanine (300 µM).

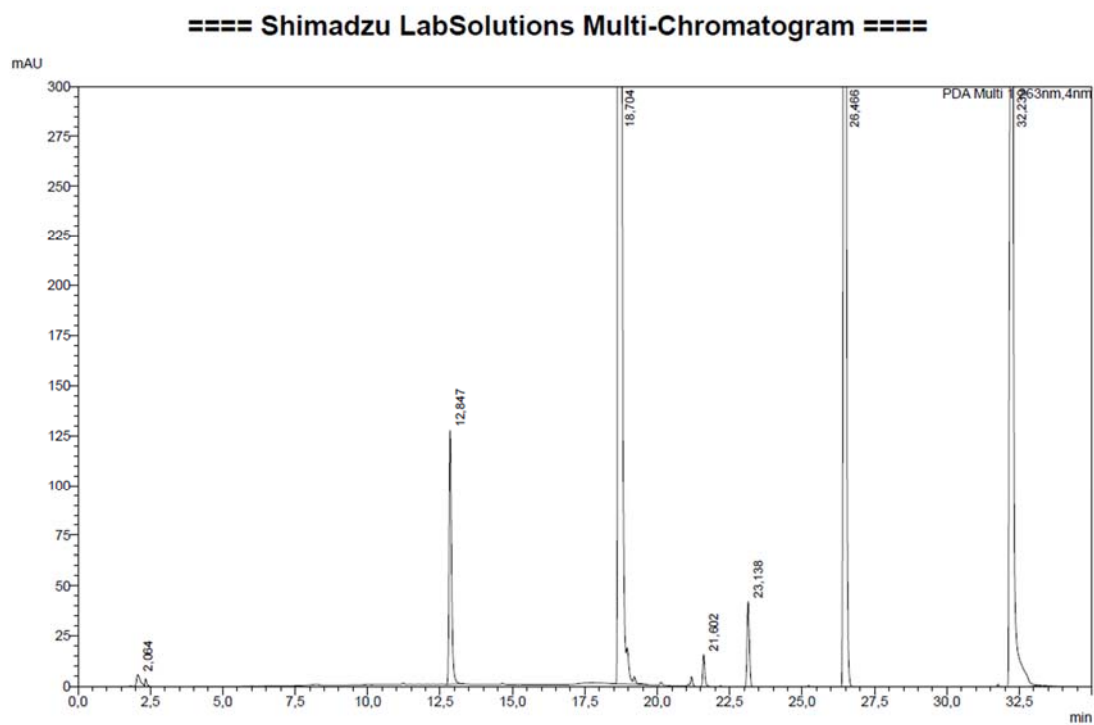


Figure C.2 Chromatogramme de l'acide aminé Arginine (300 μ M).

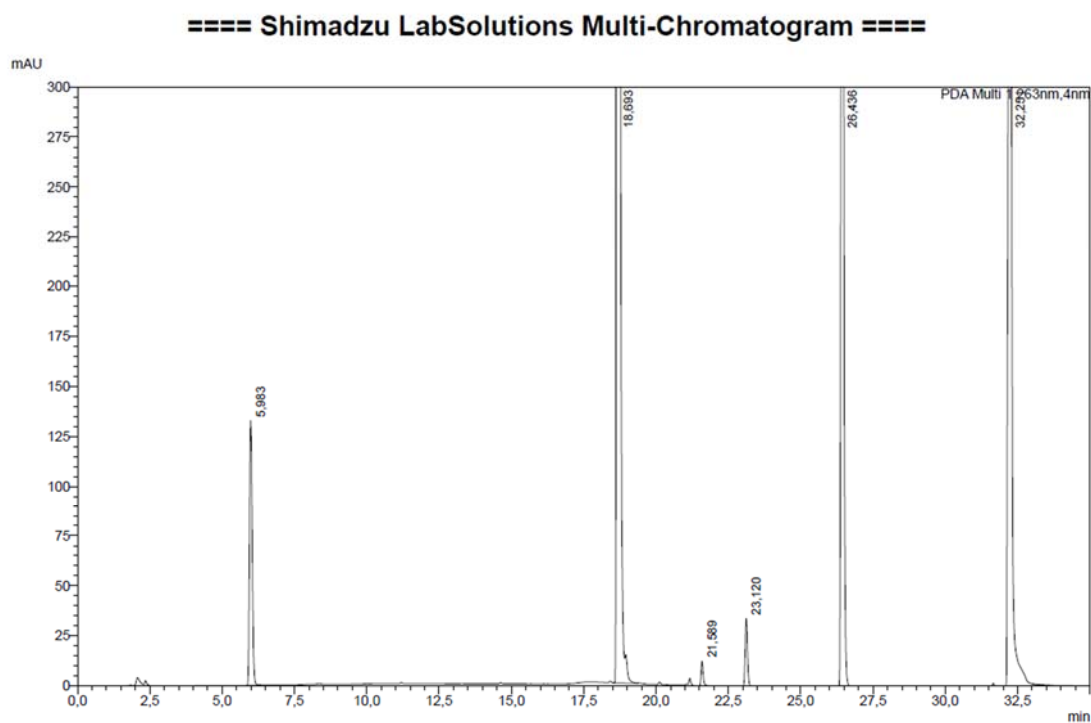


Figure C.3 Chromatogramme de l'acide aminé Acide aspartique (300 μM).

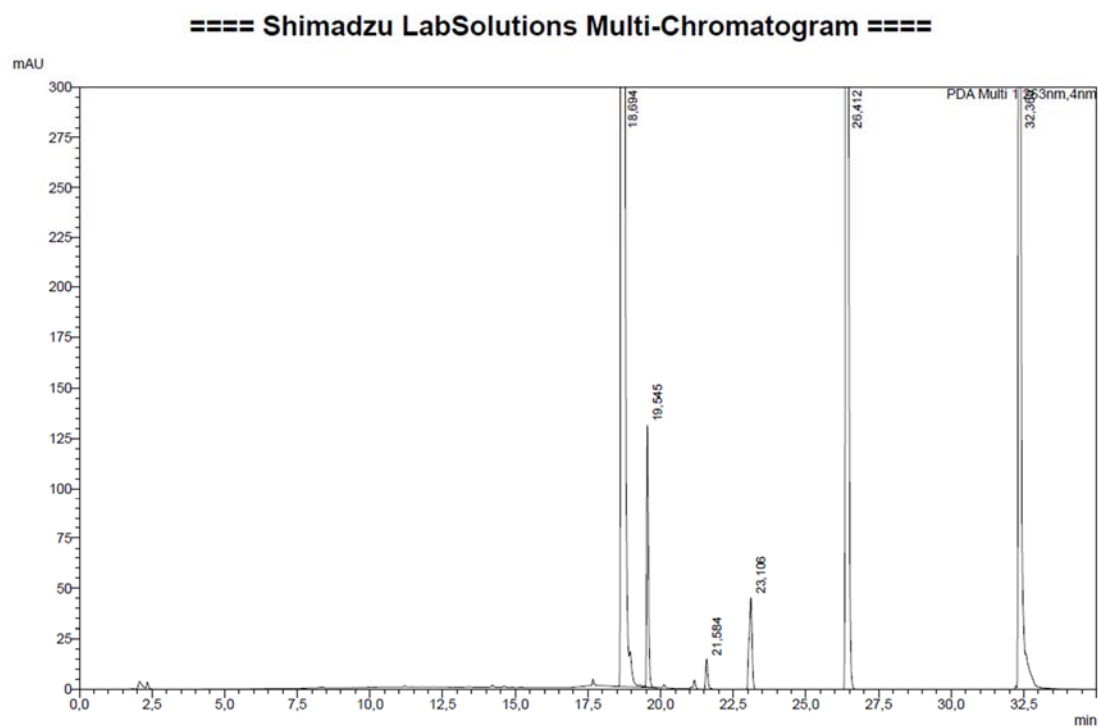


Figure C.4 Chromatogramme de l'acide aminé Cystéine (300 μM).

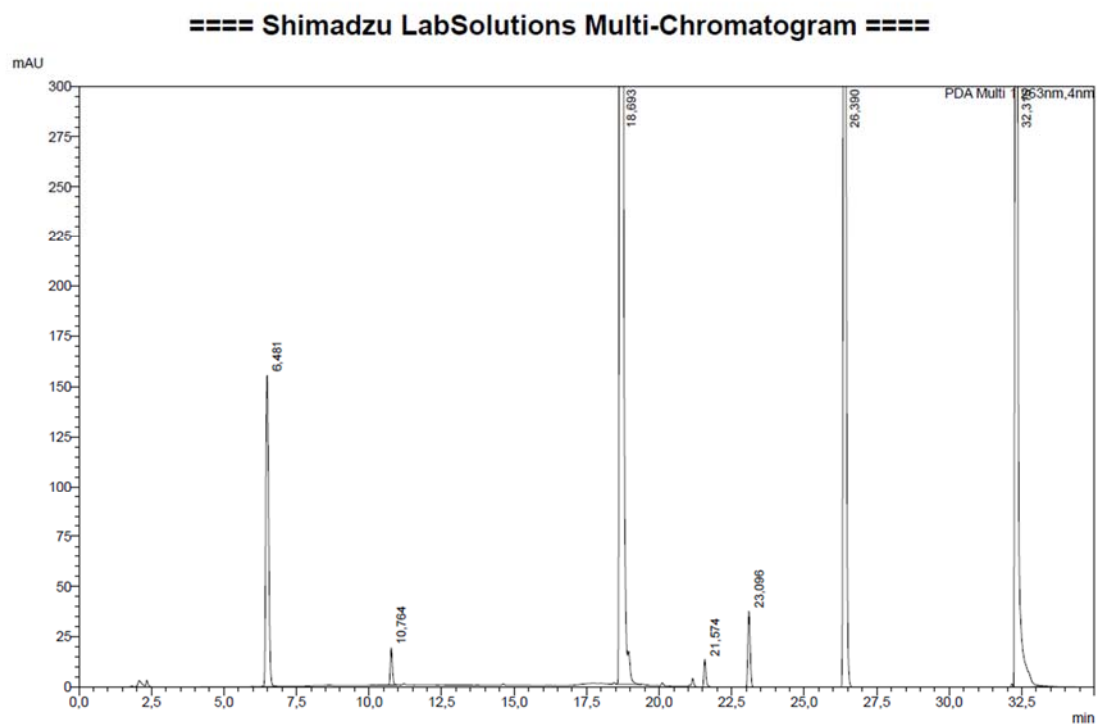


Figure C.5 Chromatogramme de l'acide aminé Acide glutamique (300 μ M).

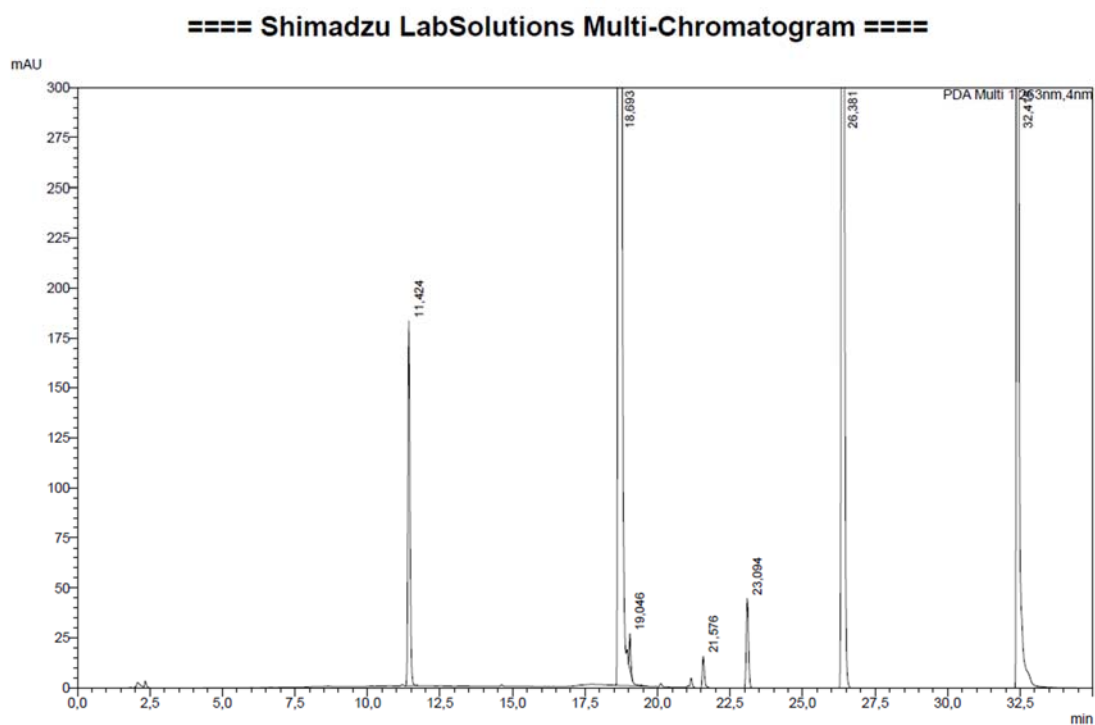


Figure C.6 Chromatogramme de l'acide aminé Glycine (300 μ M).

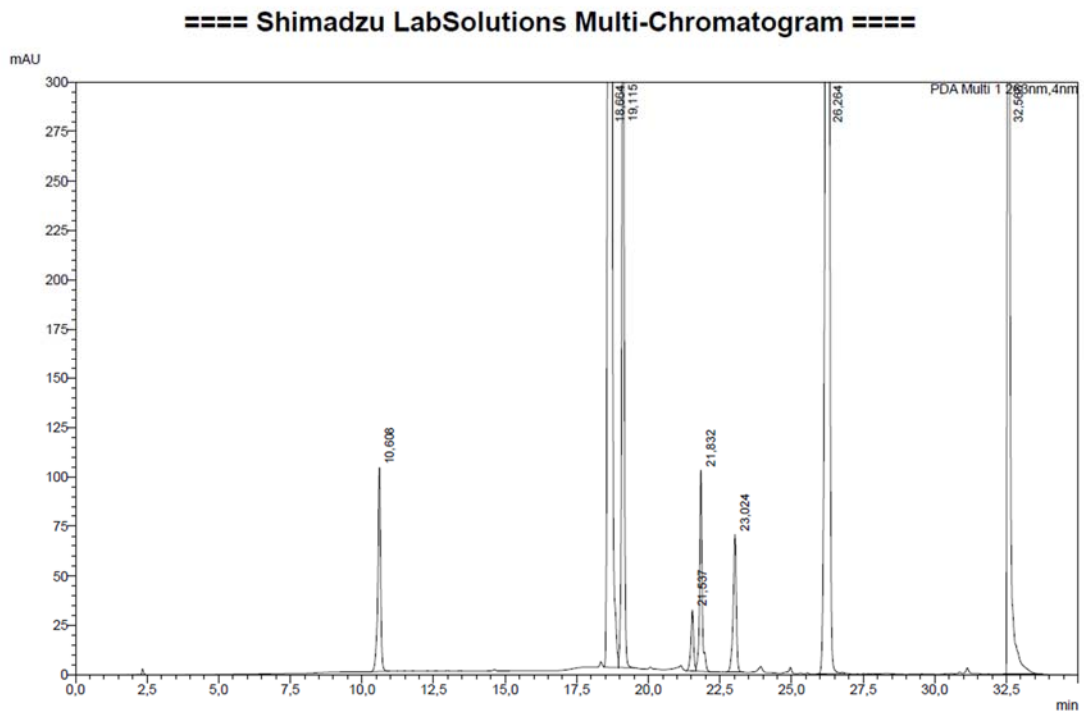


Figure C.7 Chromatogramme de l'acide aminé Histidine (650 mM).

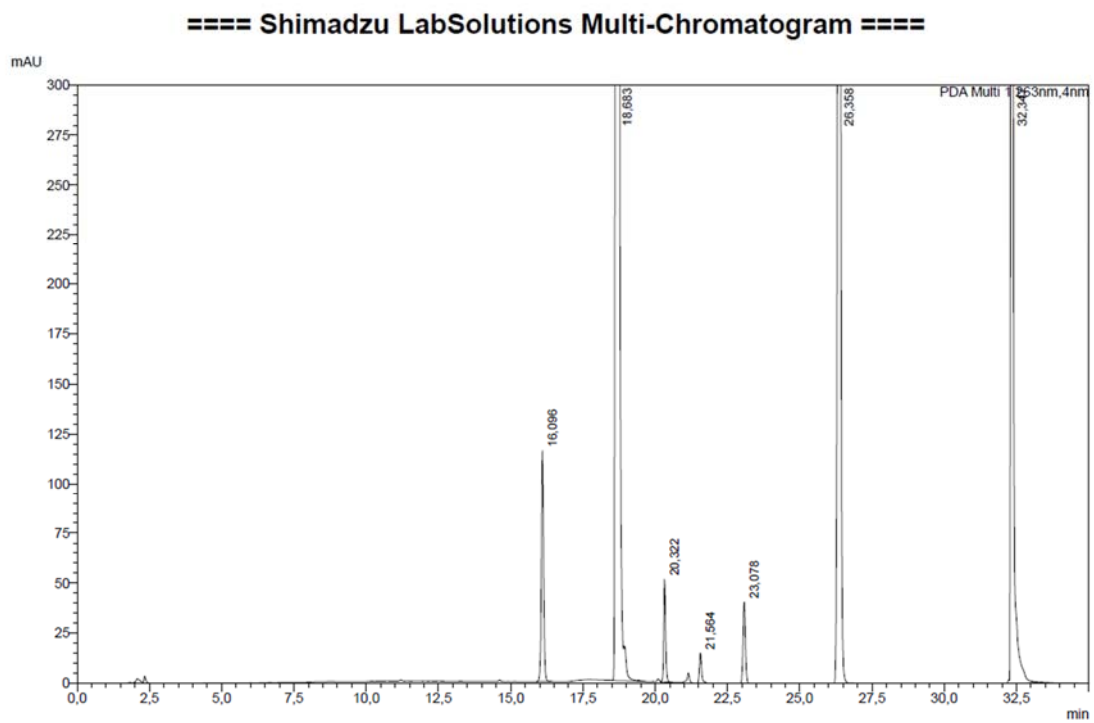


Figure C.8 Chromatogramme de l'acide aminé Isoleucine (300 μM).

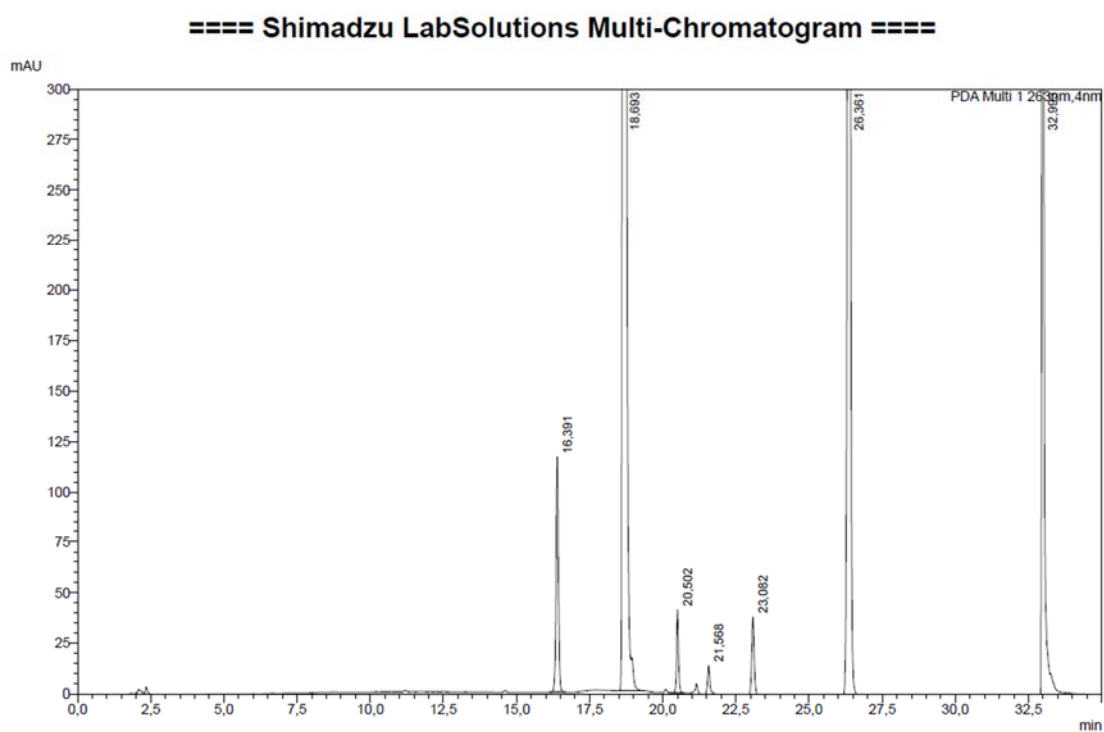


Figure C.9 Chromatogramme de l'acide aminé Leucine (300 µM).

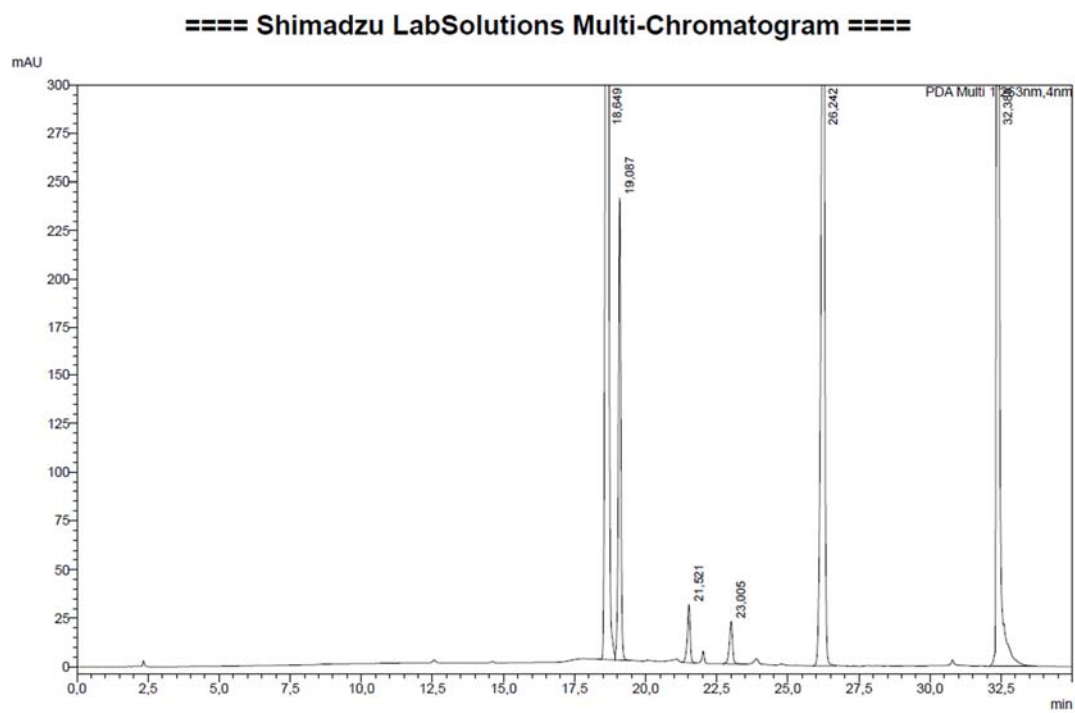


Figure C.10 Chromatogramme de l'acide aminé Lysine (220 μM).

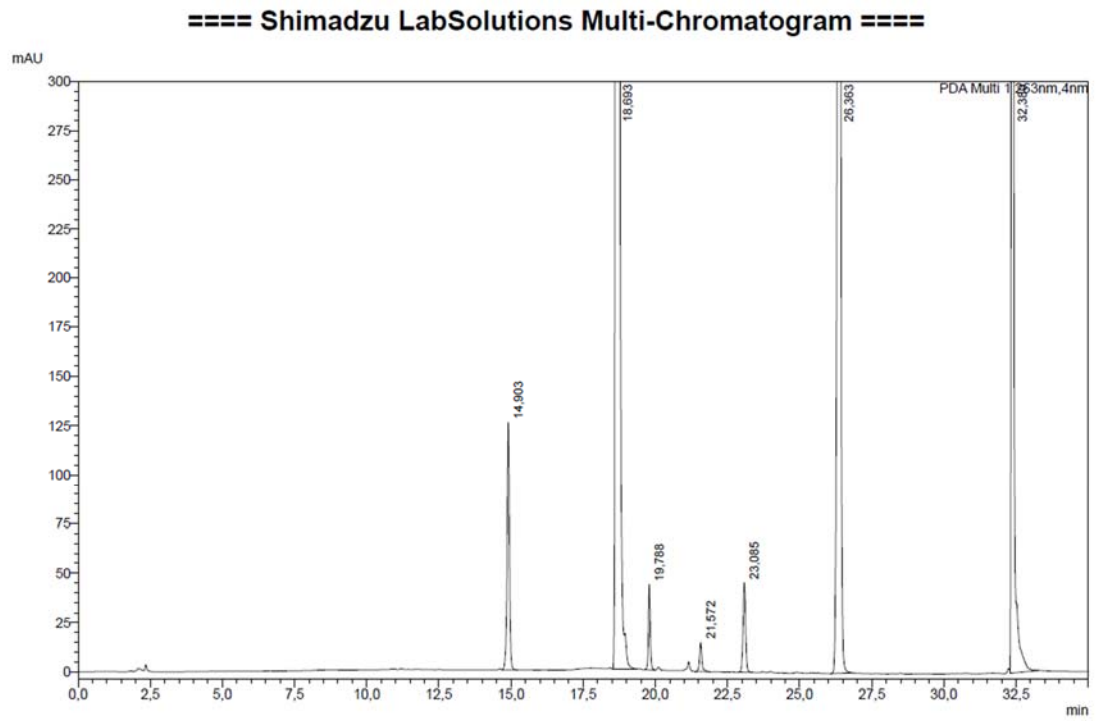


Figure C.11 Chromatogramme de l'acide aminé Methionine (300 μ M).

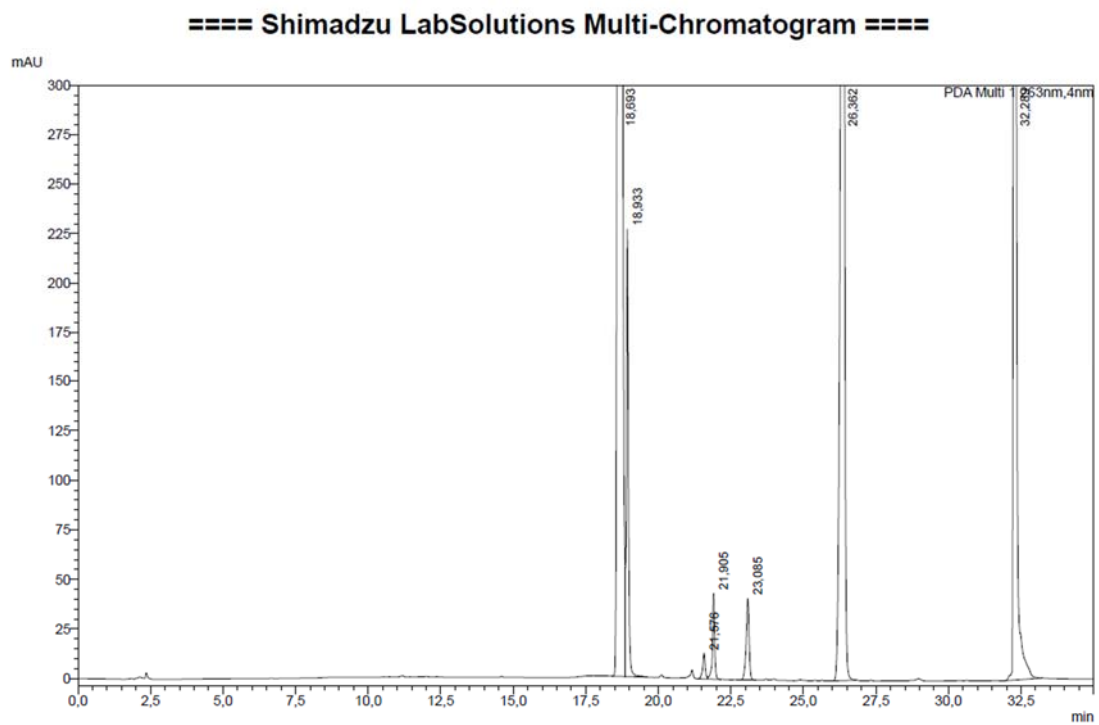


Figure C.12 Chromatogramme de l'acide aminé Ornithine (300 μM).

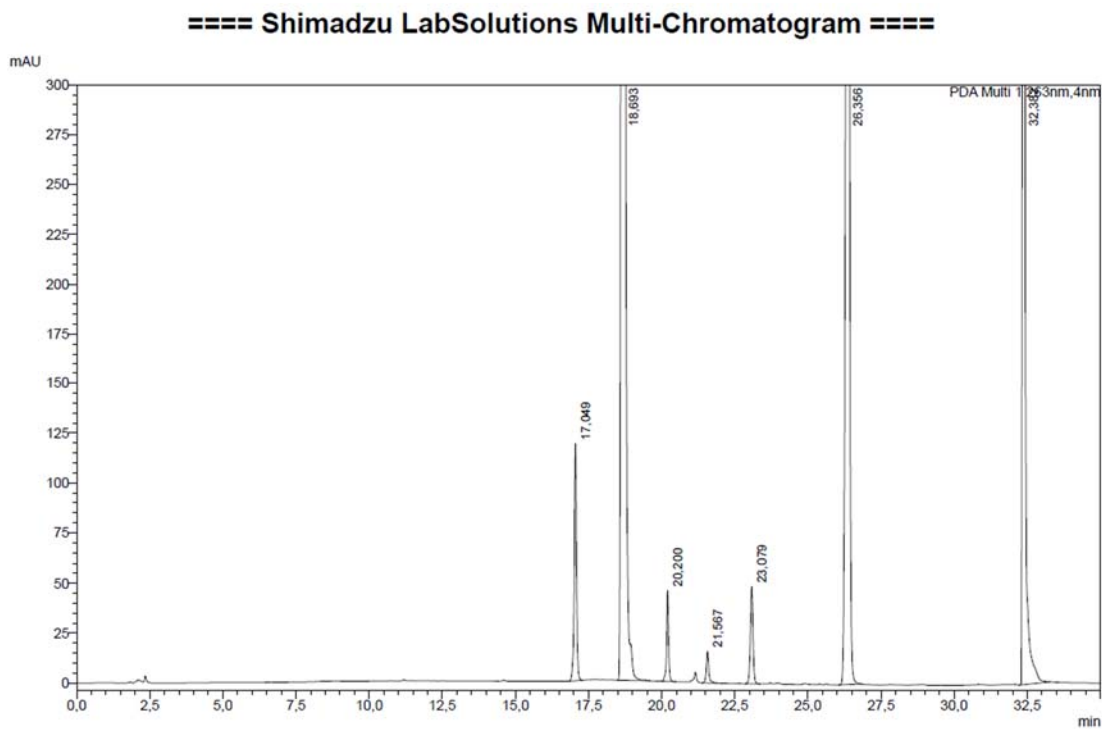


Figure C.13 Chromatogramme de l'acide aminé Phenylalanine (300 μ M).

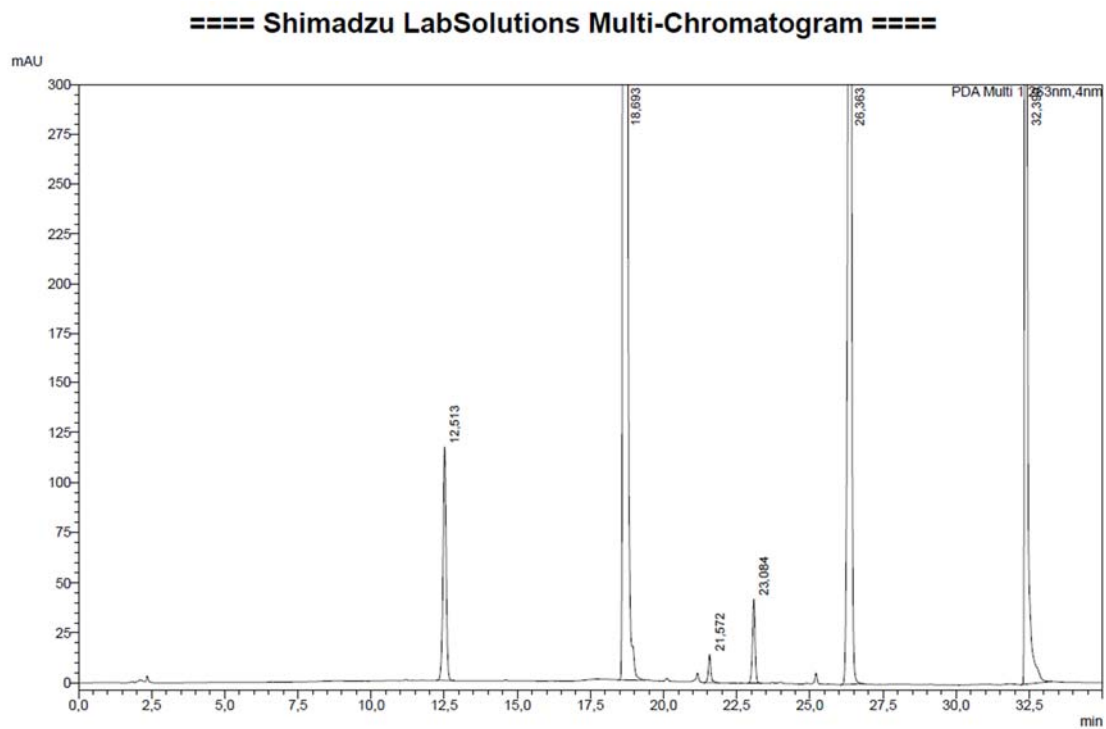


Figure C.14 Chromatogramme de l'acide aminé Proline (300 μ M).

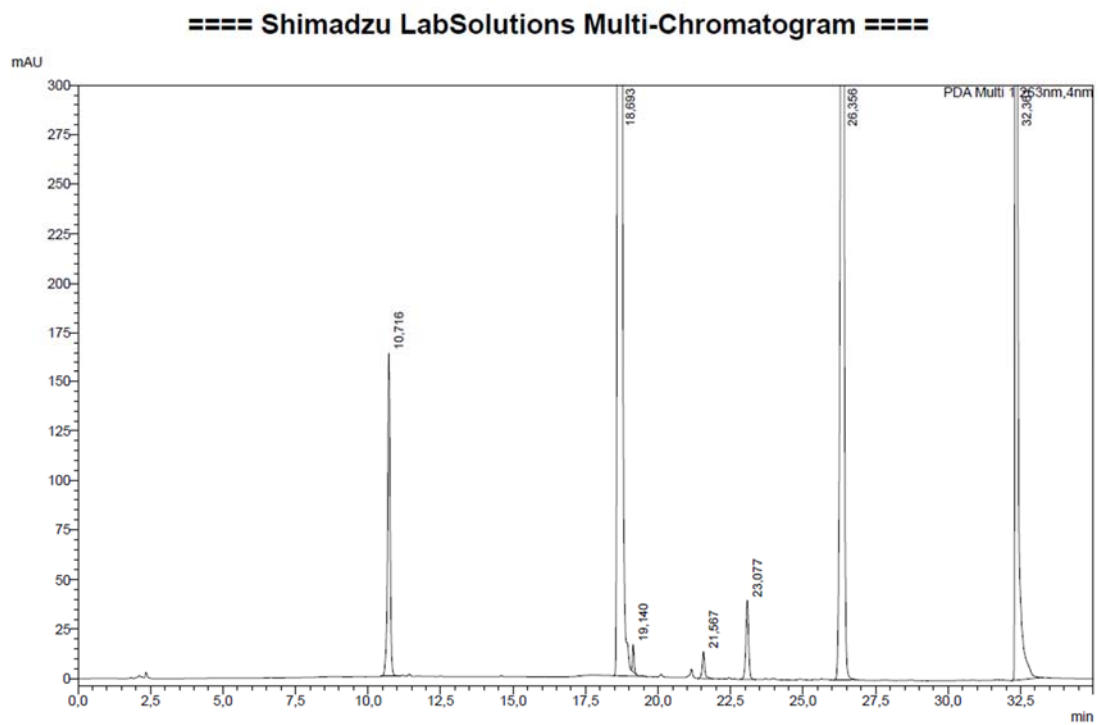


Figure C.15 Chromatogramme de l'acide aminé Serine (300 μ M).

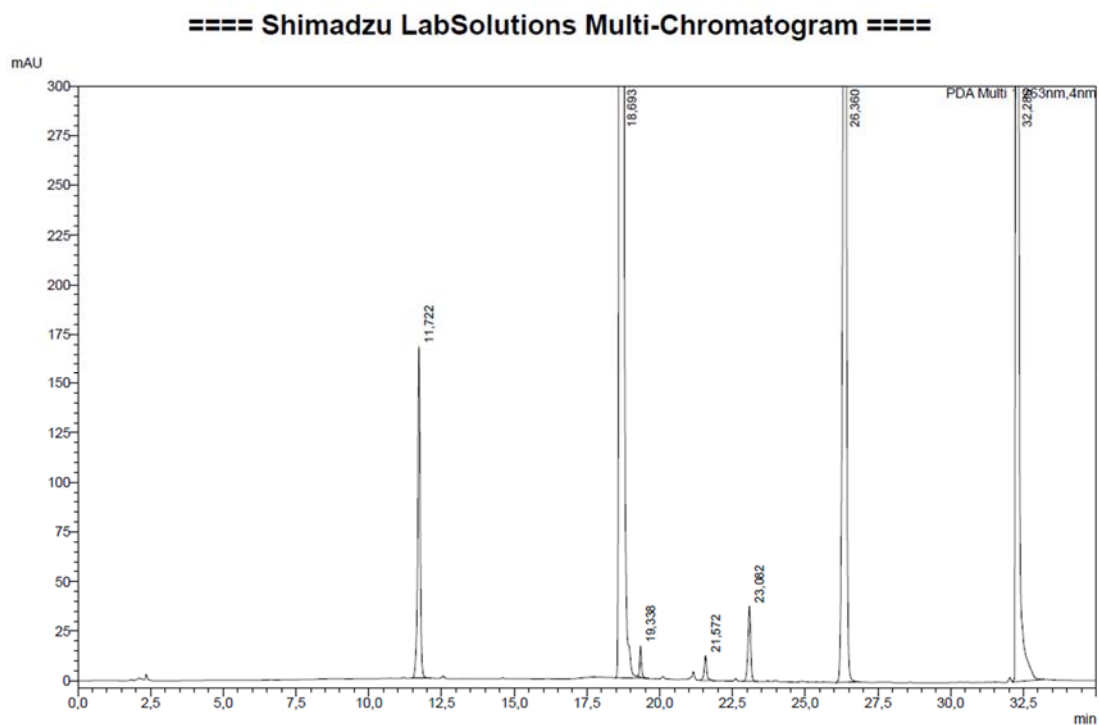


Figure C.16 Chromatogramme de l'acide aminé Threonine (300 μ M).

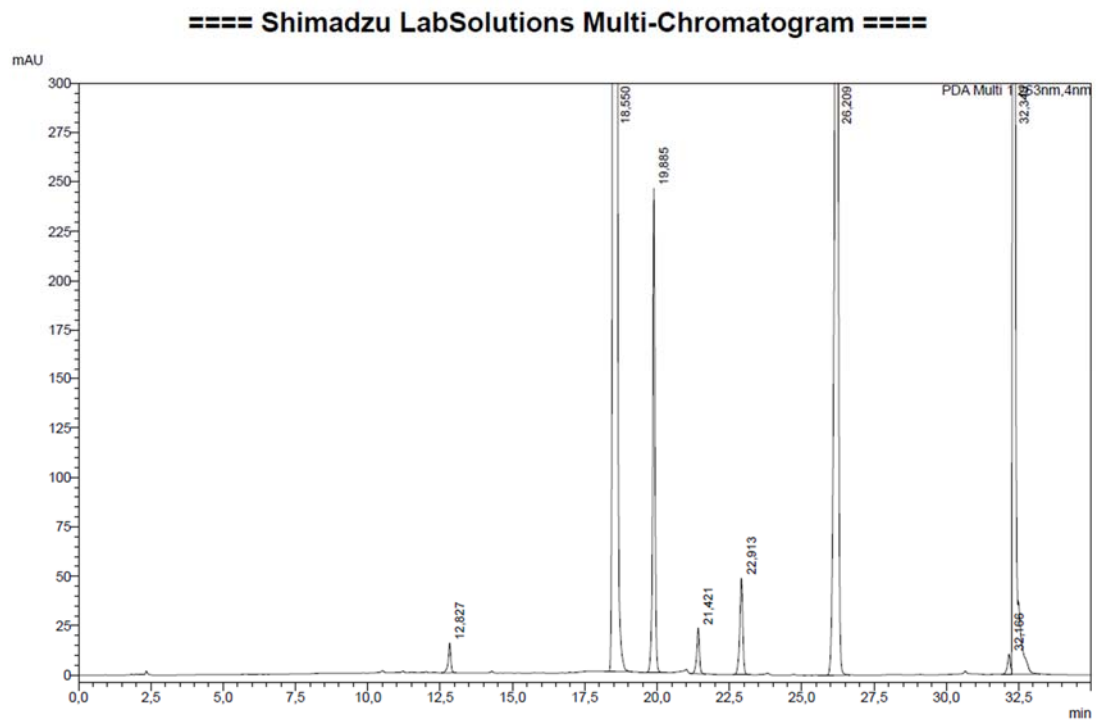


Figure C.17 Chromatogramme de l'acide aminé Tyrosine (275 μ M).

==== Shimadzu LabSolutions Multi-Chromatogram ====

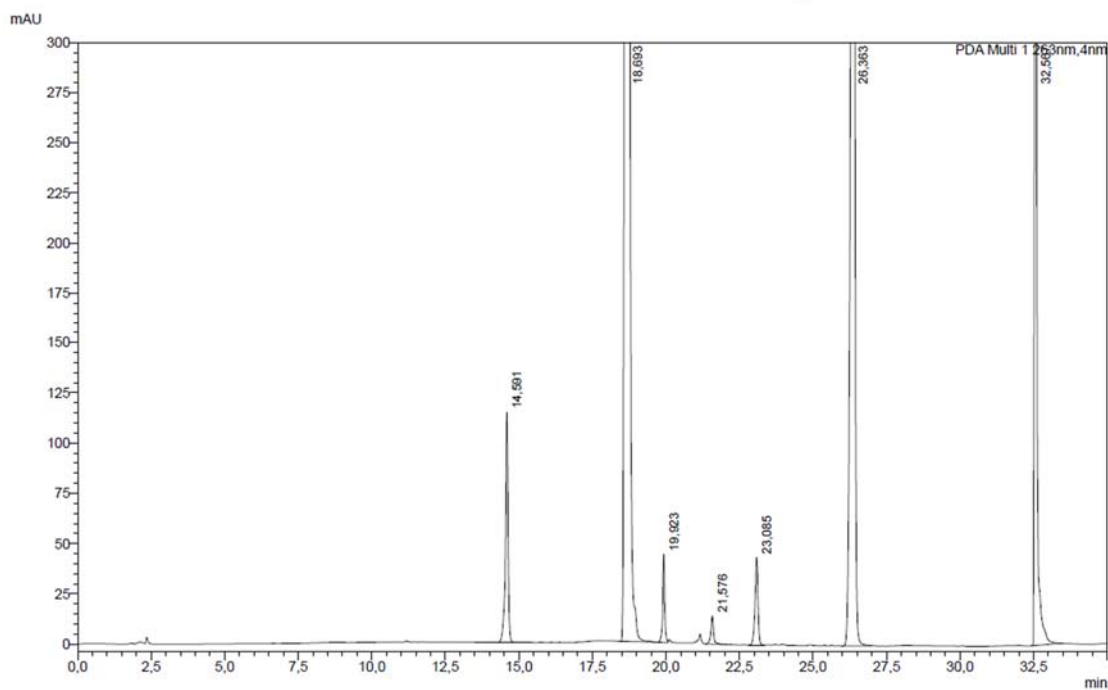


Figure C.18 Chromatogramme de l'acide aminé Valine (300 µM).

Tableau C.1

Courbe d'étalonnage obtenue pour chaque acide aminé ainsi que leur coefficient de corrélation associé

Acides aminés	Équation de la courbe de calibration	Coefficient de corrélation (R ²)
Acide aspartique (DL-Aspartic acid)	$y = 3329326,3 x - 7162,7$	0,9999
Acide glutamique (L-Glutamic acid)	$y = 3065605,6 x - 3077,1$	0,9998
Histidine (L-Histidine)	$y = 1040717,3 x - 23564,6$	0,9977
Serine (L-Serine)	$y = 4043795,4 x - 33374,8$	0,9988
Glycine	$y = 3221645,3 x - 23564,6$	0,9999
Threonine (L-Threonine)	$y = 3062005,0 x - 2401,4$	0,9999
Alanine (L-Alanine)	$y = 3079800,8 x - 1647,3$	0,9997
Proline (L-Proline)	$y = 2952169,7 x + 313,5$	0,9997
Tyrosine (L-Tyrosine)	$y = 4565448,8 - 557,4$	0,9995
Arginine (L-Arginine monohydrochloride)	$y = 2956648,2 x - 5011,4$	0,9998
Valine (L-Valine)	$y = 2749982,9 x - 2996,7$	0,9989
Methionine (L-Methionine)	$y = 2694356,6 x + 797,0$	0,9992
Isoleucine (L-Isoleucine)	$y = 2547009,3 x + 4283,0$	0,9984
Leucine (L-Leucine)	$y = 2565896,7 x + 3635,0$	0,9987
Phenylalanine (L-Phenylalanine)	$y = 2699239,2 x - 866,7$	0,9991
Ornithine (L-Ornithine monohydrochloride)	$y = 6137317,8 x + 28280,2$	0,9999
Lysine (L-Lysine monohydrochloride)	$y = 6016945,4 x + 24688,2$	0,9999
Cystéine (L-Cysteine hydrochloride monohydrate)	$y = 5134304,9 x - 2909,6$	0,9996

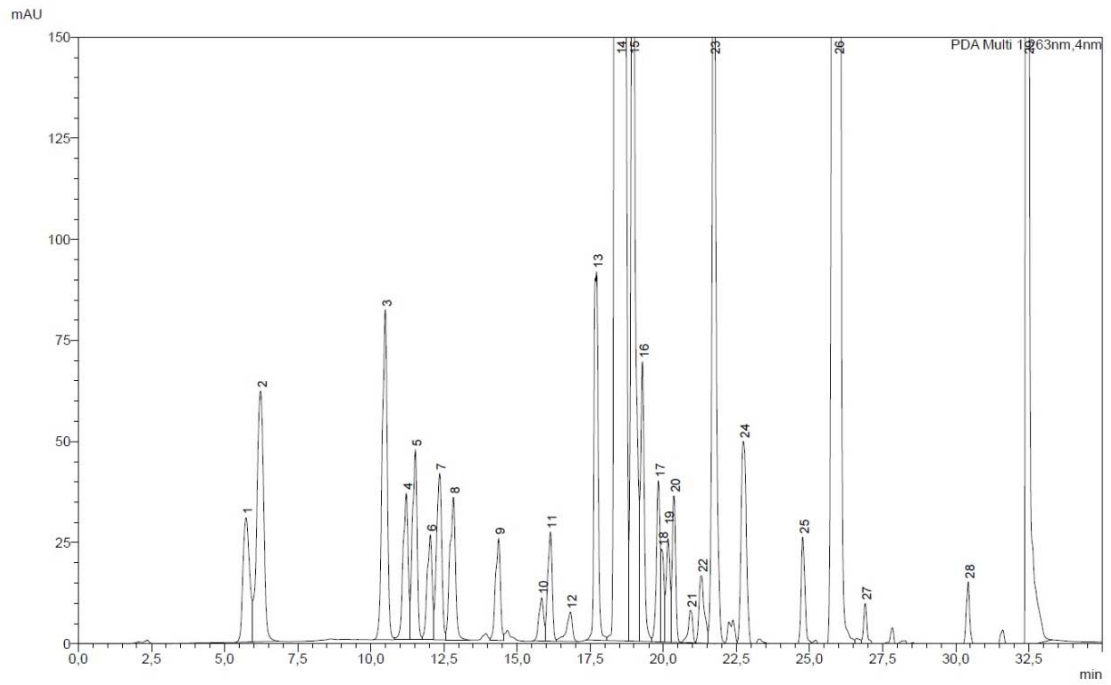


Figure C.19 Chromatogramme de l'hydrolysate de cheveux humains.

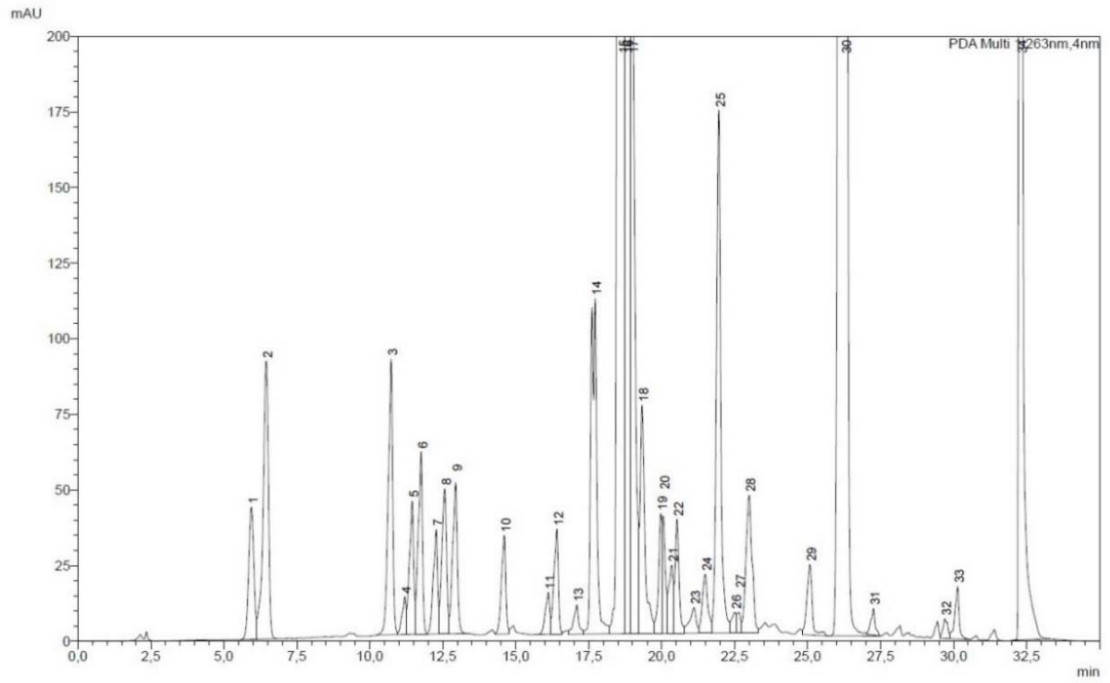


Figure C.20 Chromatogramme de l'hydrolysat de la kératine extraite à partir de cheveux humains.

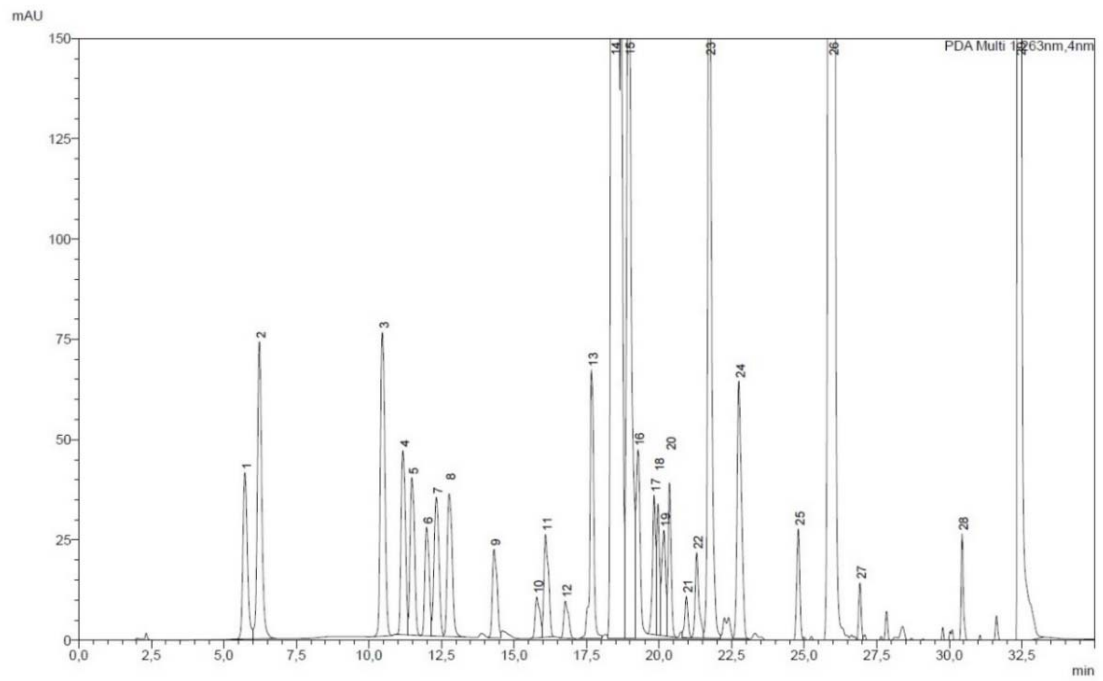


Figure C.21 Chromatogramme de l'hydrolysate de la laine de mouton.

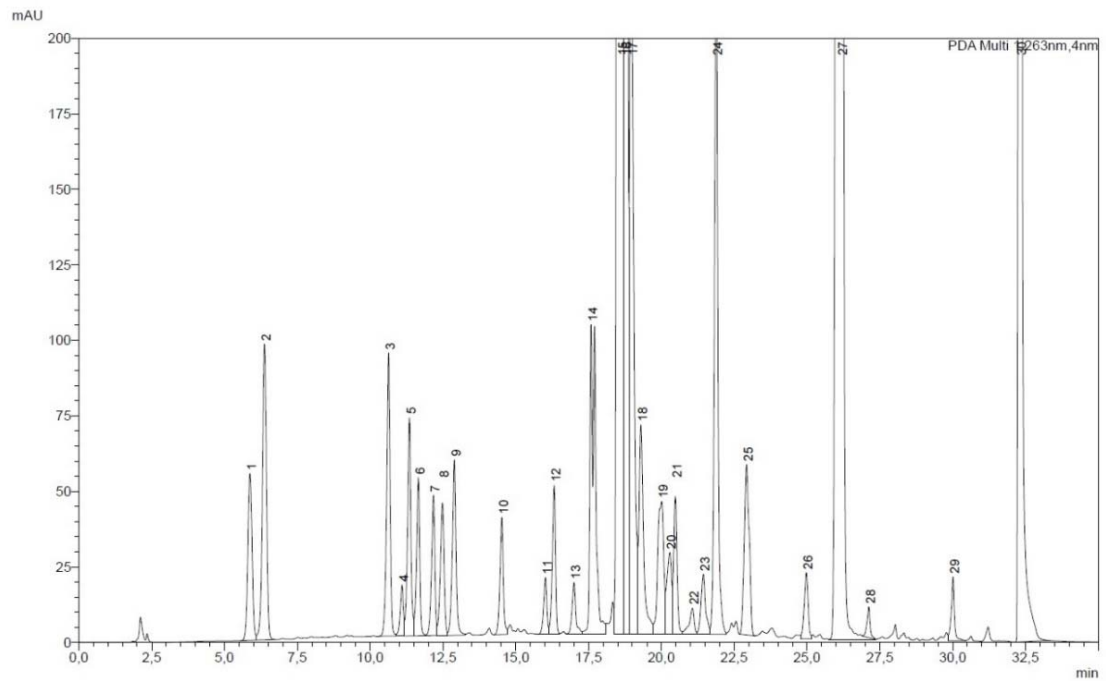


Figure C.22 Chromatogramme de l'hydrolysate de kératine extraite à partir de la laine de mouton.

RÉFÉRENCES

1. Reichl, S., *Films based on human hair keratin as substrates for cell culture and tissue engineering*. Biomaterials, 2009. **30**(36): p. 6854-6866.
2. Zhang, C., et al., *Utilization of waste wool fibers for fabrication of wool powders and keratin: a review*. Journal of Leather Science and Engineering, 2020. **2**: p. 1-15.
3. Holkar, C., et al., *Valorization of keratin based waste*. Process Safety and Environmental Protection, 2017. **115**: p. 85-98.
4. Sharma, S. and A. Gupta, *Sustainable Management of Keratin Waste Biomass: Applications and Future Perspectives*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2016. **59**: p. 1-14.
5. Singh, N. and K. Prasad, *Multi tasking hydrated ionic liquid as a sustainable media for the processing of waste human hair: A biorefinery approach*. Green Chemistry, 2019. **21**: p. 3328-3333.
6. Zheng, S., et al., *Highly Efficient Dissolution of Wool Keratin by Dimethylphosphate Ionic Liquids*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2015. **3**: p. 1-24.
7. Kar, P. and M. Misra, *Use of keratin fiber for separation of heavy metals from water*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2004. **79**(11): p. 1313-1319.
8. Misra, M., et al., *Keratin Protein Nano-fiber for Removal of Heavy Metals and Contaminants*. MRS Proceedings, 2002. **702**: p. 1-7.
9. Rouse, J.G. and M.E. Van Dyke, *A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications*. Materials, 2010. **3**(2): p. 999-1014.
10. Tonin, C., et al., *Study on the Conversion of Wool Keratin by Steam Explosion*. Biomacromolecules, 2006. **7**(12): p. 3499-3504.

11. Shavandi, A., et al., *Keratin: dissolution, extraction and biomedical application*. Biomaterials Science, 2017. **5**: p. 1699-1735.
12. Saha, S., et al., *Keratin as a Biopolymer*. 2019. p. 163-185.
13. Zhang, Z., et al., *Quantitative change of disulfide bond and microstructure variation of the regenerated wool keratin from various ionic liquids*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2017. **5**: p. 2614-2622.
14. Wang, B., et al., *Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration*. Progress in Materials Science, 2016. **76**: p. 229-318.
15. Chen, P.-Y., J. McKittrick, and M.A. Meyers, *Biological materials: Functional adaptations and bioinspired designs*. Progress in Materials Science, 2012. **57**(8): p. 1492-1704.
16. Idris, A., et al., *Distillable Protic Ionic Liquids for Keratin Dissolution and Recovery*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2014. **2**(7): p. 1888-1894.
17. Yu, J., et al., *Human hair keratins*. Journal of Investigative Dermatology, 1993. **101**(1, Supplement): p. S56-S59.
18. Idris, A., et al., *Dissolution and regeneration of wool keratin in ionic liquids*. Green Chemistry, 2014. **16**: p. 2857-2864.
19. Xu, H., Z. Ma, and Y. Yang, *Dissolution and regeneration of wool via controlled disintegration and disentanglement of highly crosslinked keratin*. Journal of Materials Science, 2014. **49**: p. 7513-7521.
20. Lee, H., et al., *Human hair keratin and its-based biomaterials for biomedical applications*. Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2014. **11**(4): p. 255-265.
21. Pourjavaheri, F., et al., *Extraction of keratin from waste chicken feathers using sodium sulfide and l-cysteine*. Process Biochemistry, 2019. **82**: p. 205-214.
22. Venkatesh.T, A.A., Subramanian.O.S, *Lab-Scale Extraction, Confirmation and Applications of Protein from Humain hairs*. International Journal of Technology and Engineering Science [IJTES], 2015. **3**(8): p. 4008-4011.

23. Nakamura, A., et al., *A Rapid Extraction Procedure of Human Hair Proteins and Identification of Phosphorylated Species*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2002. **25**(5): p. 569-572.
24. de Guzman, R.C., et al., *Mechanical and biological properties of keratose biomaterials*. Biomaterials, 2011. **32**(32): p. 8205-17.
25. Shui-qing, J., et al., *Study on effective extraction of keratin from human hair wastes*. Integrated Ferroelectrics, 2017. **180**(1): p. 102-107.
26. O'donnell, I. and E. Thompson, *Studies on Reduced Wool*. Australian Journal of Biological Sciences, 1964. **17**(4): p. 973-978.
27. Gillespie, J.M. and P.H. Springell, *The distribution of readily reducible disulphide bonds in wool*. Biochemical Journal, 1961. **79**(2): p. 280-286.
28. Rajabi, M., et al., *Keratinous materials: Structures and functions in biomedical applications*. Materials Science and Engineering: C, 2020. **110**: p. 110612.
29. Patrucco, A., et al., *Wool cortical cell-based porous films*. Textile Research Journal, 2012. **83**(15): p. 1563-1573.
30. Berechet, M., et al., *Alkaline-Enzymatic Hydrolysis of Wool Waste for Different Applications*. Revista de Chimie, 2018. **69**: p. 1649-1654.
31. Zeng, C.-h. and L. Qi, *Study on the recovery of waste wool by combining reduction and metallic salt methods*. Advanced Materials Research, 2014. **881-883**: p. 551-555.
32. Ghosh, A., et al., *Thermal effects of ionic liquid dissolution on the structures and properties of regenerated wool keratin*. Polymer Degradation and Stability, 2014. **108**: p. 108-115.
33. Ji, Y., et al., *Extraction of keratin with ionic liquids from poultry feather*. Separation and Purification Technology, 2014. **132**: p. 577-583.
34. Shavandi, A., et al., *Evaluation of keratin extraction from wool by chemical methods for bio-polymer application*. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 2016. **32**: p. 163-177.
35. Wada, M. and H. Takagi, *Metabolic pathways and biotechnological production of L-cysteine*. Applied microbiology and biotechnology, 2006. **73**: p. 48-54.

36. Laemmli, U.K., *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-685.
37. Holtzhauer, M., *Electrophoresis*, in *Basic Methods for the Biochemical Lab*, M. Holtzhauer, Editor. 2006, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 23-82.
38. Dankers, L.M., *Physical analysis of human hair*. 2007, University of Missouri-Rolla. p. 11-37.
39. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Analytical Biochemistry*, 1976. **72**(1): p. 248-254.
40. Kruger, N.J., *The Bradford Method For Protein Quantitation*, in *The Protein Protocols Handbook*, J.M. Walker, Editor. 2009, Humana Press: Totowa, NJ. p. 17-24.
41. Wortmann, F.J., et al., *Thermal denaturation and structural changes of α -helical proteins in keratins*. *Journal of Structural Biology*, 2012. **177**(2): p. 553-560.
42. Kamarudin, N., et al., *Statistical investigation of extraction parameters of keratin from chicken feather using Design-Expert*. *3Biotech*, 2017. **7**(2): p. 127-135.
43. Konigsberg, W., *Reduction of Disulfide Bonds in Proteins with Dithiothreitol*, in *Methods in Enzymology*. 1972, Academic Press. p. 185-188.
44. Fruton, J.S. and H.T. Clarke, *Chemical Reactivity of Cystine and its Derivatives*. *Journal of Biological Chemistry*, 1934. **106**(2): p. 667-691.
45. Aitken, C.E., R.A. Marshall, and J.D. Puglisi, *An oxygen scavenging system for improvement of dye stability in single-molecule fluorescence experiments*. *Biophysical journal*, 2008. **94**(5): p. 1826-1835.
46. Hames, B.D., ed. *Gel Electrophoresis of Proteins*. Third Edition ed., ed. B.D. Hames. 1998. 1-346.
47. Bragulla, H. and D. Homberger, *Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia*. *Journal of anatomy*, 2009. **214**: p. 516-59.

48. Zoccola, M., A. Aluigi, and C. Tonin, *Characterisation of keratin biomass from butchery and wool industry wastes*. Journal of Molecular Structure, 2009. **938**(1): p. 35-40.
49. Aluigi, A., et al., *Study on the structure and properties of wool keratin regenerated from formic acid*. International Journal of Biological Macromolecules, 2007. **41**(3): p. 266-273.
50. Rajabinejad, H., et al., *Physicochemical properties of keratin extracted from wool by various methods*. Textile Research Journal, 2018. **88**(21): p. 2415-2424.
51. Barton, P.M.J., *A Forensic Investigation of Single Human Hair Fibres using FTIR-ATR Spectroscopy and Chemometrics*. 2011, Queensland University of Technology. p. 1-365.
52. Wang, K., et al., *Extracting keratin from wool by using L-cysteine*. Green Chem., 2015. **18**: p. 1-6.
53. Shavandi, A., et al., *An improved method for solubilisation of wool keratin using peracetic acid*. Journal of environmental chemical engineering, 2017. **5**: p. 1977-1984.
54. Eslahi, N., F. Dadashian, and N.H. Nejad, *An Investigation On Keratin Extraction From Wool And Feather Waste By Enzymatic Hydrolysis*. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2013. **43**(7): p. 624-648.
55. Wojciechowska, E., A. Włochowicz, and A. Wesełucha-Birczyńska, *Application of Fourier-transform infrared and Raman spectroscopy to study degradation of the wool fiber keratin*. Journal of Molecular Structure, 1999. **511-512**: p. 307-318.
56. Vasconcelos, A., G. Freddi, and A. Cavaco-Paulo, *Biodegradable materials based on silk fibroin and keratin*. Biomacromolecules, 2008. **9**(4): p. 1299-305.
57. Church, J.S., G.L. Corino, and A.L. Woodhead, *The effects of stretching on wool fibres as monitored by FT-Raman spectroscopy*. Journal of Molecular Structure, 1998. **440**(1): p. 15-23.
58. Marshall, R.C. and J.M. Gillespie. *The Biology of Wool and Hair*. 1988. Chapman and Hall.
59. Corfield, M.C. and A. Robson, *The amino acid composition of wool*. Biochemical Journal, 1955. **59**(1): p. 62-68.

60. Ficicioglu, C. and M. Yudkoff, *Urea Cycle: Disease Aspects*, in *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition)*, W.J. Lennarz and M.D. Lane, Editors. 2013, Academic Press: Waltham. p. 494-501.
61. Nishikawa, N., et al., *pH Dependence of the Coiled-Coil Structure of Keratin Intermediate Filament in Human Hair by ¹³C NMR Spectroscopy and the Mechanism of Its Disruption*. *Polymer Journal*, 1998. **30**(2): p. 125-132.
62. Hill, P., H. Brantley, and M. Van Dyke, *Some properties of keratin biomaterials: Kerateines*. *Biomaterials*, 2010. **31**(4): p. 585-593.
63. Mustatea, G., E. Ungureanu, and E. Iorga, *Protein Acidic Hydrolysis for Amino Acids Analysis in Food - Progress over time : A Short Review*. 2019. **26**: p. 81-88.
64. Darragh, A.J., et al., *Correction for Amino Acid Loss during Acid Hydrolysis of a Purified Protein*. *Analytical Biochemistry*, 1996. **236**(2): p. 199-207.
65. Inglis, A. and T.-Y. Liu, *The Stability of Cysteine and Cystine during Acid Hydrolysis of Proteins and Peptides*. *The Journal of biological chemistry*, 1970. **245**: p. 112-116.
66. Olcott, H.S. and H. Fraenkel-Conrat, *Formation and Loss of Cysteine During Acid Hydrolysis of proteins*. *Journal of Biological Chemistry*, 1947. **171**(2): p. 583-594.
67. Murugesh Babu, K., *3 - Structural aspects of silk*, in *Silk*, K. Murugesh Babu, Editor. 2013, Woodhead Publishing. p. 56-83.
68. Bradbury, J. and D. Peters, *The Chemical Composition of Wool*. *Textile Research Journal*, 1972. **42**: p. 471-474.
69. Scobie, D., et al., *A review of wool fibre variation across the body of sheep and the effects on wool processing*. *Small Ruminant Research*, 2015. **133**: p. 43-53.
70. Khan, M.J., et al., *Factors affecting wool quality and quantity in sheep*. *African Journal of Biotechnology*, 2012. **11**: p. 13761-13766.
71. Rippon, J.A., *The Structure of Wool*, in *The Coloration of Wool and other Keratin Fibres*, D.M. Lewis and J.A. Rippon, Editors. 2013. p. 1-42.
72. Patrucco, A., et al., *Chapter 12 - Keratin-based matrices from wool fibers and human hair*, in *Materials for Biomedical Engineering*, V. Grumezescu and A.M. Grumezescu, Editors. 2019, Elsevier. p. 375-403.

73. Shah, A., et al., *Keratin Production and Its Applications: Current and Future Perspective*, in *Keratin as a Protein Biopolymer: Extraction from Waste Biomass and Applications*, S. Sharma and A. Kumar, Editors. 2019, Springer International Publishing: Cham. p. 19-34.
74. Cruz, C.F., et al., *Human Hair and the Impact of Cosmetic Procedures: A Review on Cleansing and Shape-Modulating Cosmetics*. *Cosmetics*, 2016. **3**(26): p. 1-22.