

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**SCUOLA DI SCIENZE**

Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale

in

**CHIMICA INDUSTRIALE**

Classe LM-71: Scienza e Tecnologie della Chimica Industriale

# Metodologie sostenibili per la produzione di idrolizzati cheratinici da scarti industriali

(Tesi sperimentale in collaborazione con Kerline S.r.l.)

CANDIDATO

Paolo Peduto

RELATORE

Prof.ssa Elisabetta Salatelli

CORRELATORI

Dott. Alberto Del Rio

Dott.ssa Alessandra Stefan

Sessione II

Anno Accademico 2017/2018



## **Riassunto**

La produzione di piume avicole come scarto o sottoprodotto industriale non trova ancora una collocazione ad elevato valore aggiunto.

Le industrie di pollame cercano avidamente una via di rivalorizzazione delle piume per poterle rivendere sul mercato.

In questa tesi, come prima cosa, sono stati analizzati i limiti imposti dalla normativa Europea per il trattamento delle piume avicole. Quindi sono stati considerati gli idrolizzati cheratinici come una possibile materia prima del mercato cosmetico.

La metodologia idrolitica enzimatica è stata considerata la migliore per il rispetto dei principi della Green Chemistry.

Le idrolisi acide o alcaline sono state considerate troppo drastiche e producono troppi sali di neutralizzazione, oltre a modificare la composizione amminoacidica della cheratina.

Contemporaneamente allo studio di reazione, è stato sviluppata un'analisi per lo studio dei pesi molecolari di idrolizzati cheratinici, basata sulla tecnica Tricina-SDS-PAGE.

La concentrazione di polipeptidi durante le reazioni è stata monitorata per gravimetria.

## **Abstract**

The production of poultry feathers as industrial waste or by-product still finds no appropriate revalorization in the market.

Poultry industries are strongly seeking solutions for the revalorization of feathers which could give them enough added value for the target markets.

In this thesis, we first checked the European normative limits regarding poultry feather treatment. We then found keratin hydrolysate as a valuable cosmetic ingredient.

Feathers are water insoluble but could be solubilized by hydrolysis.

Enzymatic hydrolysis was considered as the method of first choice based on Green Chemistry's principles.

Acid or Alkali hydrolysis methods were found to be too drastic and build up too much neutralization salt. In addition, they also modify keratin amino acid composition.

Simultaneously to the reaction studies, a protocol for keratin hydrolysates molecular weight analysis was developed, based on Tricine-SDS-PAGE technique.

The polypeptide concentration during the reaction was monitored with a gravimetric analysis.



# Indice

Introduzione	1
Scopo del lavoro	15
Discussione e analisi dei risultati	17
1. Contesto	17
2. Controlli di processo	18
2.1 Analisi dei pesi molecolari	20
2.1.1 Premesse teoriche	20
2.1.2 Sviluppo della metodica	24
3. Estrazioni idrolitiche	31
3.1 Idrolisi enzimatica	31
3.1.1. Quantificazioni gravimetriche	34
3.1.2. Verifica dei pesi molecolari	36
3.2 Idrolisi alcalina e idrolisi acida	38
Conclusioni e sviluppi futuri	40
Parte sperimentale	42
4. Analisi dei pesi molecolari	42
4.1 Kit standard	42
4.2 Preparazione dei gel e prove di risoluzione	42
4.2.1 Procedura generale	43
4.2.2 Gel 1	43
4.2.3 Gel 2	44
4.2.4 Gel 3	45
4.2.5 Gel 4	46
4.2.6 Gel 5 (Silver Staining)	46
5. Estrazioni idrolitiche enzimatiche	48
5.1 Purificazione enzima	48
5.2 Procedura di reazione	48
Appendice	49
Riferimenti bibliografici	51
Ringraziamenti	55



## Introduzione

L'incremento della popolazione globale e dei comfort ha portato ad un elevato quantitativo di rifiuti che ora si deve imparare a gestire.

Il consumo di carne di pollo, tacchino, anatra e, più in generale, di origine avicola è in costante crescita. Per il mercato europeo, la principale voce di settore è l'AVEC (Association of Poultry Processors and Poultry Trade in the EU countries), il cui report più recente mette a disposizione importanti tabelle (Fig. 1) per capire il trend del mercato negli ultimi anni <sup>1</sup>.

<b>Gross domestic production of poultry meat in the EU ('000 tons carcass weight)</b>						
	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>
Austria (17)*	128	125	121	122	122	120
Belgium / Luxembourg (11)	239	250	250	250	250	250
Denmark (13)	180	180	168	173	147	156
Finland (16)	101	108	111	113	116	121
France (2)	1.864	1.849	1.872	1.826	1.828	1.828
Germany (3)	1.681	1.695	1.714	1.775	1.807	1.776
Greece (18)	114	118	119	117	118	119
Ireland (15)	118	124	129	129	125	131
Italy (6)	1.232	1.261	1.259	1.261	1.321	1.387
Netherlands (7)	806	838	848	941	1.057	1.115
Portugal (10)	331	324	324	327	336	342
Spain (5)	1.278	1.251	1.299	1.390	1.453	1.525
Sweden (14)	90	116	128	137	147	155
United Kingdom (4)	1.558	1.607	1.606	1.587	1.663	1.666
Bulgaria (19)	110	100	97	100	102	102
Cyprus (25)	27	25	24	24	23	24
Czech Republic (12)	212	181	171	175	175	175
Estonia (26)	15	15	17	18	18	16
Hungary (8)	466	488	515	543	577	616
Croatia (21)	75	74	68	68	83	81
Latvia (24)	23	24	26	27	27	27
Lithuania (20)	75	80	87	89	92	94
Malta (27)	4	4	4	4	4	4
Poland (1)	1.544	1.712	1.798	2.022	2.173	2.486
Romania (9)	365	335	360	382	353	362
Slovakia (22)	74	75	76	77	78	78
Slovenia (23)	48	50	48	50	51	51
<b>EU-28</b>	<b>12.789</b>	<b>13.018</b>	<b>13.210</b>	<b>13.727</b>	<b>14.246</b>	<b>14.808</b>

**Fig. 1** - Produzione interna EU di carne avicola secondo il report annuale 2017 dell'AVEC.

Conseguenza inevitabile della produzione industriale di carne avicola sono gli scarti, definiti *sottoprodotti di origine animale* (Soa), che consistono in piumaggio, zampe, teste, ossa,

viscere e liquami. I Soa possono derivare dalla macellazione di animali destinati al consumo umano, dalla produzione di alimenti, come quelli lattiero-caseari, di origine animale, dallo smaltimento di cadaveri di animali provenienti da allevamenti da reddito o abbattuti al fine di eradicare una grave patologia infettiva del bestiame. Qualunque sia la loro origine, i Soa possono rappresentare sia un rischio per la salute dell'uomo e dell'animale, sia un problema per l'ambiente. Per questo motivo i processi di trasformazione, stoccaggio, trasporto e smaltimento a cui i Soa possono essere sottoposti, sono disciplinati a livello europeo e nazionale. Il Regolamento a cui sottostare per i sottoprodotti di origine animale è il n.1069/2009<sup>2</sup>. Come Oggetto (art.1) “stabilisce norme sanitarie e di polizia sanitaria relative ai sottoprodotti di origine animale e ai prodotti derivati, al fine di evitare o ridurre al minimo i rischi per la salute pubblica e degli animali derivanti da tali prodotti, nonché, in particolare, di tutelare la sicurezza della catena alimentare e dei mangimi.” La legislazione definisce (art.3) come “sottoprodotto di origine animale: corpi interi o parti di animali, prodotti di origine animale o altri prodotti ottenuti da animali, non destinati al consumo umano” e divide i sottoprodotti in 3 categorie, a seconda del livello di rischio per la salute a questi associato. Lo scopo di questa suddivisione è gestire lo smaltimento in modo da ridurre quanto più possibile il rischio sanitario.

Nella categoria 1, ad esempio, ricadono tutti gli animali che sono solo sospettati di essere affetti da malattie trasmissibili all'uomo o ad altri animali. Pertanto, tutto ciò che è classificato categoria 1 può essere solamente incenerito o sotterrato in discarica previa opportuna sterilizzazione sotto pressione (art.12). Ciò che ricade in categoria 2, oltre ai trattamenti della categoria superiore, può anche essere compostato o trasformato in biogas, ma previa sterilizzazione sotto pressione (art.13). Solo alla categoria 3 viene concessa la trasformazione in mangimi (art. 14 e 35), in prodotti cosmetici e dispositivi medici (art. 14 e 33).

L'attenzione scientifica e tecnologica è da sempre stata rivolta ai sottoprodotti di categoria 3: teste di pollame, piume, pelli e setole di suini e bovini (art.10), in quanto questa categoria è l'unica a cui l'autorità concede la trasformazione in un prodotto che può avere un valore aggiunto. Infatti mentre per le categorie 1 e 2 le industrie possono solo pagare lo smaltimento (i.e. avere solo costi in uscita), per la categoria 3, le industrie possono sviluppare delle metodiche di trattamento in grado di valorizzare questi Soa trasformandoli in capitali in ingresso.

La seconda normativa a cui bisogna sottostare è il Regolamento CE n. 142/2011<sup>3</sup> che reca le disposizioni di applicazione del Reg. CE n. 1069/2009.

A tutt'oggi, in adempienza alle normative CE sopra citate, uno dei processi di trasformazione più usati per i sottoprodotti di categoria 3 è il *rendering*, che consiste nel tritare il materiale e sottoporlo a temperature di almeno 133 °C a 3 bar, per 20 min in enormi autoclavi<sup>4</sup>, per svolgere la sterilizzazione sotto pressione richiesta dal Reg. 142/2011 (allegato II, *Metodi di trasformazione standard*) e contemporaneamente separare la parte grassa da quella proteica. Viene riportato in Fig. 2 uno schema delle operazioni unitarie del *rendering*. La parte grassa è utilizzata in vari settori (e.g. saponerie) o per produrre energia per combustione, mentre la parte proteica, ridotta a farina e chiamata MBM (Meat and Bone Meal), è usata come mangime animale. Intrinsecamente il processo ha alti costi operativi e inoltre, in uscita dall'impianto, si hanno emissioni molto odorose causate da H<sub>2</sub>S, NH<sub>3</sub>, acidi grassi, aldeidi e chetoni che devono essere abbattuti e che richiedono grandi impianti di biofiltrazione, cioè di ossidazione da parte di microrganismi aerobici<sup>5</sup>. Un'altra corrente in uscita riguarda gli effluenti, anche questi da trattare prima dell'immissione nei corsi d'acqua.

Il vero grosso problema è però il “morbo della mucca pazza” che, tra gli anni 1990 e 2000, ha posto il dubbio sulla capacità del *rendering* di distruggere gli agenti patogeni e ciò è stato sufficiente a far crollare il valore economico del mangime MBM<sup>6</sup>. Questo morbo, ufficialmente BSE (Encefalopatia Spongiforme Bovina), appartiene alla più ampia famiglia delle TSE (Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili) ed è causato da un prione, una proteina anomala infettiva<sup>7</sup>. Si conoscono protocolli per disattivare i prioni della BSE con il *rendering*<sup>8</sup> ma i parametri di processo vanno controllati estremamente bene e risulta poi impossibile fare analisi di controllo in linea, ovvero per verificare se il prione è stato disattivato o meno. Nella pratica si ricorre all'utilizzo di cavie (topi) che vengono alimentati con MBM per constatare se sviluppano TSE; infatti, non esiste altra tecnica analitica efficace perché il prione è una proteina all'interno di un mangime proteico, pertanto risulta indistinguibile. Una minima contaminazione è sufficiente per invalidare un intero lotto produttivo, con enormi danni economici e d'immagine per le aziende.

Dagli anni '90 le industrie sono state quindi costrette a fare trattamenti aggressivi per scongiurare problematiche infettive, ma questo implica la produzione di MBM di qualità inferiore dovute alle elevate pressioni esercitate che riducono la digeribilità di tutti gli amminoacidi<sup>9</sup>.

Per riassumere, il *rendering* è passato da un ruolo primario nello smaltimento di sottoprodotti animali ad un ruolo funzionale al mero smaltimento della biomassa, a causa del costo del

processo e dell'impiantistica, dello scarso valore aggiunto del MBM e della poca sicurezza nei confronti delle TSE.

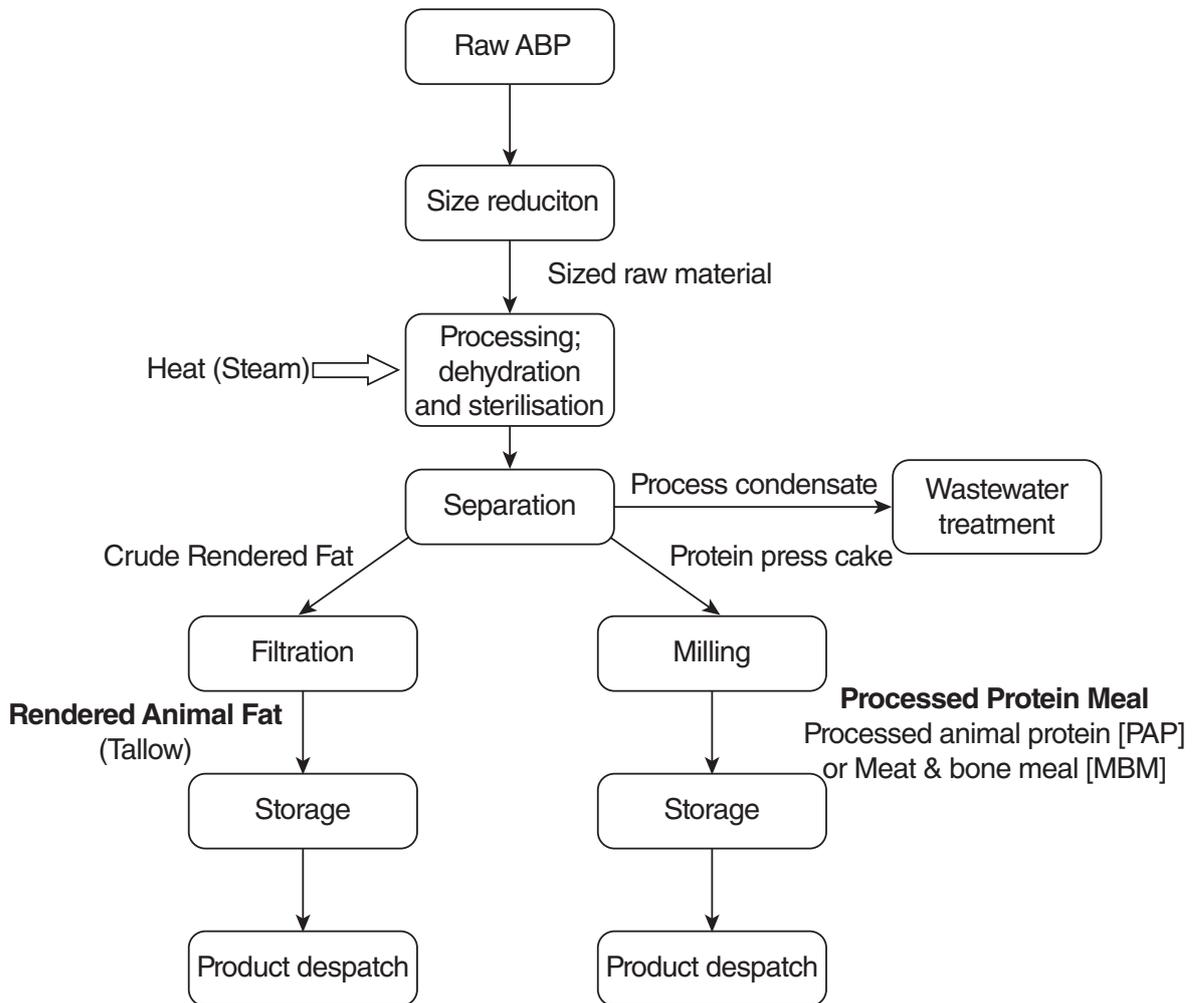


Fig. 2 - Schema rendering <sup>10</sup>.

I termovalorizzatori per la categoria 3 sono poco utilizzati per la particolare composizione di questi materiali che conferisce loro ignifugicità, rendendo inefficienti gli impianti.

Sulla base di tali premesse legislative e tecnologiche, questo lavoro di tesi parte dalla richiesta di numerose aziende italiane di trovare strade alternative nella lavorazione di sottoprodotti animali.

La prima azione è stata quella di delimitare il campo di interesse ai sottoprodotti di “categoria 3” e di individuare la tipologia di prodotti nella quale collocare i materiali eventualmente ottenuti dalla lavorazione di questa categoria. La scelta è caduta sui cosmetici, motivata dall’elevato margine operativo lordo che si può raggiungere nel settore tricologico e/o

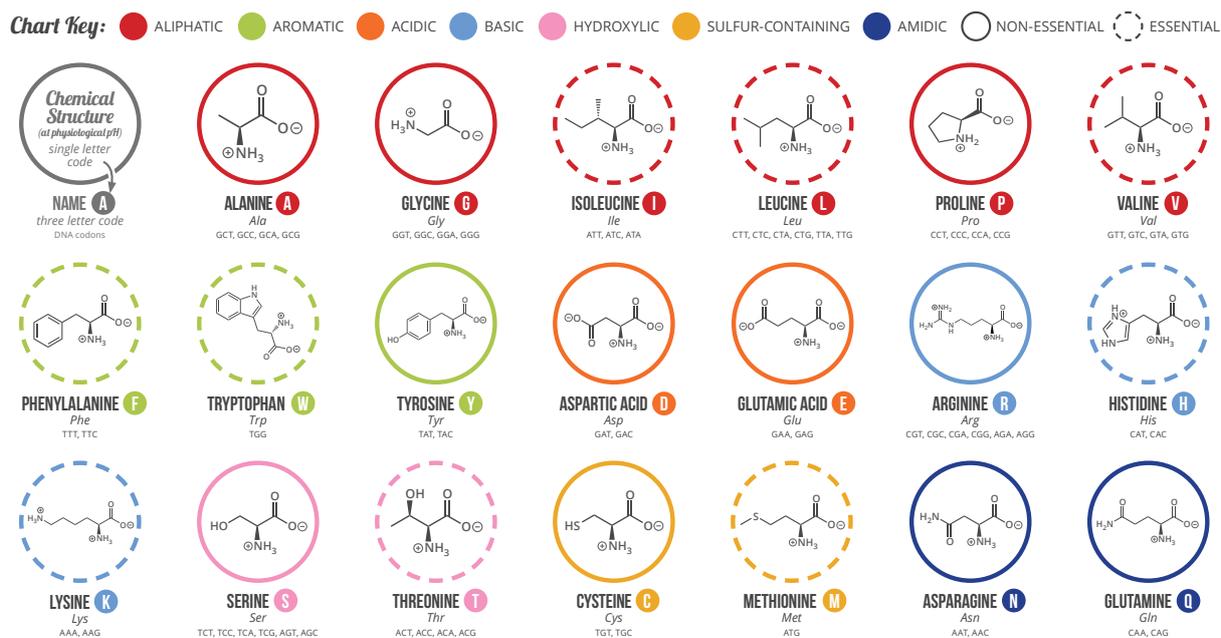
dermatologico relativamente a prodotti con alto posizionamento. Un altro fattore decisionale è la necessità di dovere rivalorizzare elevate quantità di materiale all'anno (centinaia di tonnellate) che richiede settori di mercato la cui domanda sia capace di assorbire l'offerta.

Il campo di studio è stato ulteriormente ristretto decidendo di occuparsi solamente delle piume di origine avicola (art. 10), questo perché non sono riportate TSE associate alla classe degli *Aves*.

Lo studio tecnologico è iniziato con l'osservazione della materia prima: le piume sono strutture complesse che servono principalmente per isolare l'animale dalla temperatura esterna e proteggerlo dall'acqua. Nella maggior parte degli *Aves*, le piume servono anche per volare e in questi casi hanno una leggera curvatura. Sono costituite circa dal 90% di proteina, 8% acqua, 1.5% grasso e cellule morte. La proteina che le costituisce è la cheratina, un polimero naturale composto da una selezione di 20 amminoacidi naturali.

Gli amminoacidi (Fig. 3) sono molecole composte da un gruppo amminico e un gruppo carbossilico, collegati da un carbonio stereogenico con configurazione (S) per tutti tranne per la glicina, achirale, e la cisteina (R) a causa dell'inversione della nomenclatura CIP, perché lo zolfo ha numero atomico maggiore dell'ossigeno carbossilico. A pH neutro, tutti gli amminoacidi si trovano nella forma zwitteronica, cioè con il gruppo amminico protonato e il gruppo carbossilico deprotonato. I vari monomeri sono uniti tra loro attraverso un legame ammidico, detto anche peptidico, secondo una certa sequenza. È la sequenza degli amminoacidi che stabilisce, attraverso le caratteristiche di reattività dei singoli, la struttura spaziale della proteina e le funzioni biologiche che meglio può assolvere.

Le forme geometriche regolari che si possono trovare all'interno della catena polipeptidica prendono il nome di struttura secondaria e sono possibili per interazioni via legame idrogeno. Le strutture più comuni sono l'alfa elica destrorsa e il foglietto beta, parallelo o anti parallelo. L'alfa elica è mantenuta via interazione idrogeno tra un l'ossigeno carbossilico e l'idrogeno amminico del quarto amminoacido successivo. Il foglietto beta invece vede la catena peptidica interamente estesa, con legami idrogeno che avvengono tra i residui adiacenti di una stessa catena proteica o di catene diverse (Fig. 4). A seconda che le catene proseguano entrambe verso lo stesso terminale (-N o -C) o verso terminali opposti, si dice foglietto beta parallelo o antiparallelo. Ad alternarsi agli impaccamenti secondari, ci sono zone di random coil che conferiscono flessibilità alla proteina.

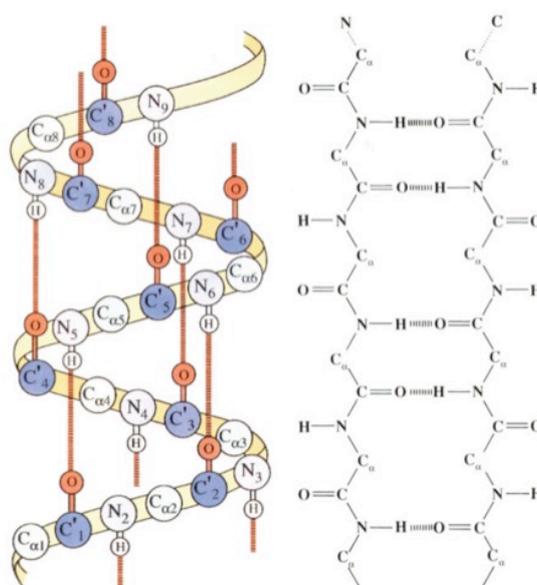


© COMPOUND INTEREST 2014 - WWW.COMPOUNDCHEM.COM | Twitter: @compoundchem | Facebook: www.facebook.com/compoundchem  
 Shared under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives licence.

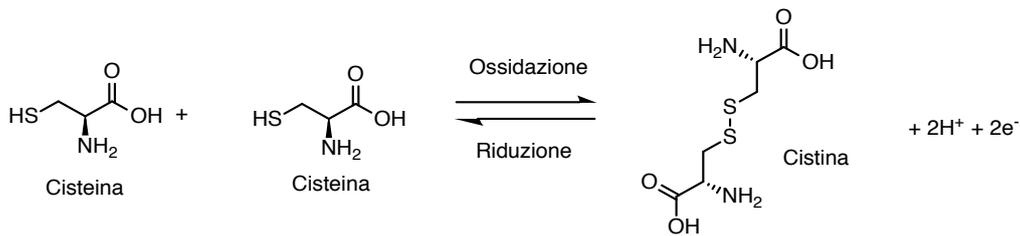


**Fig. 3 – Struttura dei 20 aminoacidi naturali <sup>11</sup>.**

A loro volta, le varie strutture secondarie possono arrangiarsi in modo da dare una particolare conformazione alla proteina. Questa conformazione è quella che viene chiamata struttura nativa o struttura terziaria. La driving force di questo folding è la necessità di isolare le zone idrofobiche della catena dal solvente acquoso, ma anche le interazioni tra i residui amminoacidici guidano lo stato nativo: in particolare la possibilità di formare legami covalenti tra cisteine (Fig. 5).



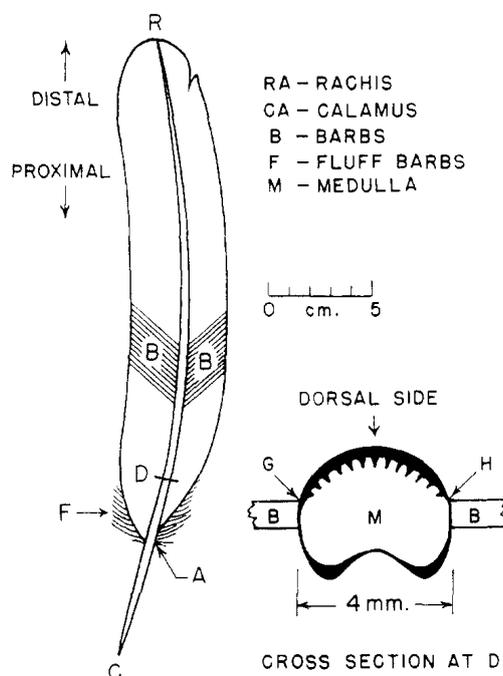
**Fig. 4 – Alfa elica destrorsa (sx) e foglietto beta (dx), <sup>12</sup>.**



**Fig. 5** – Redox coupling cisteina – cistina.

Le fonti principali su cui questo lavoro di tesi basa la composizione amminoacidica e la struttura proteica della cheratina sono un articolo del 1955 di Schroeder et al.<sup>13</sup> e i dati del 2007 sul database UniProt (<https://www.uniprot.org>). Queste due fonti, per quanto distanti negli anni, forniscono dati coerenti.

Il lavoro di Schroeder definisce una composizione amminoacidica ma manca l'indicazione della parte di piuma che si sta analizzando. Le diverse parti di una piuma e la rispettiva nomenclatura sono mostrate in Fig. 6.



**Fig. 6** – Anatomia di una piuma<sup>13</sup>.

Questa divisione è indipendente dal tipo di piuma che si sta considerando: in tutti gli *Aves* ce ne sono molti tipi, a seconda della zona del corpo in cui si trovano. Possiamo porre ai due estremi i “pennoni” e i “piumini” (Fig. 7). Le prime sono le comuni piume composte da un calamo molto duro, un rachide più o meno lungo e ordinate barbe (Fig. 7a). Le seconde invece, dette “piumini”, hanno un calamo cortissimo e un altrettanto corto rachide, per dare spazio a lunghe barbe (Fig. 7b).

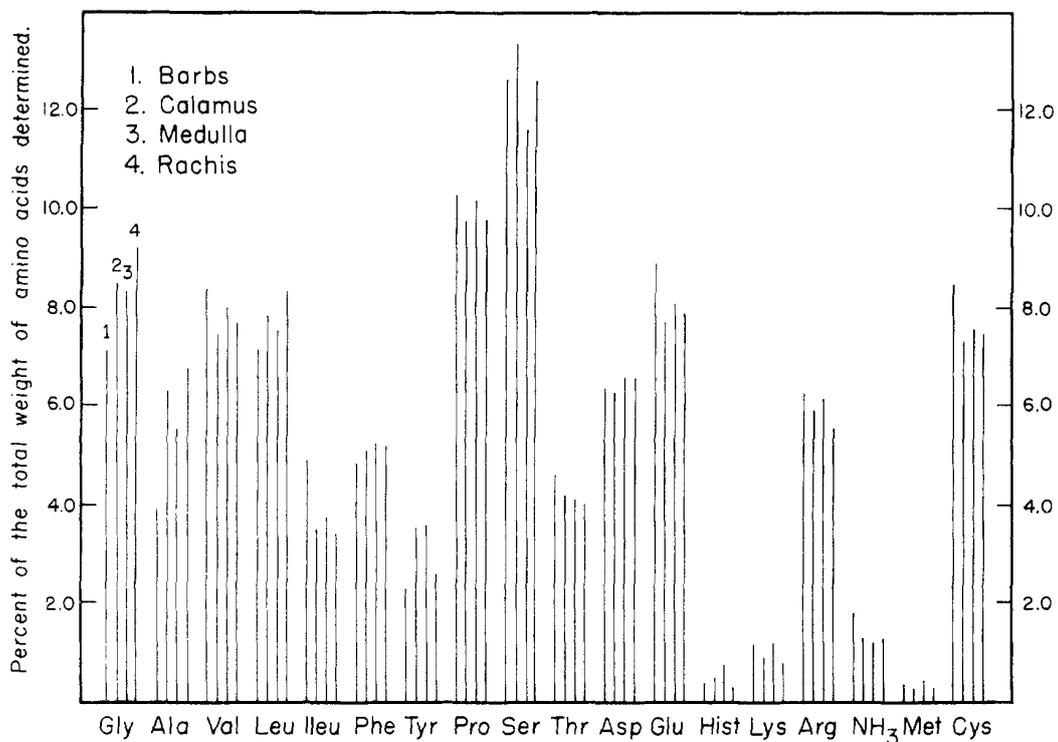


**Fig. 7a** – Pennone



**Fig. 7b** – Piumino

Le diverse parti di un pennone, nello specifico di tacchino, hanno le composizioni amminoacidiche riportate in Fig. 8.



**Fig. 8** – Composizione amminoacidica di una piuma di tacchino <sup>13</sup>.

Invece, per confrontare la stessa parte di piuma, ma in diverse specie animali, si rimanda alla Fig. 9, dove si confrontano le barbe di tacchino con le barbe di oca presenti sia nel pennone sia nel piumino.

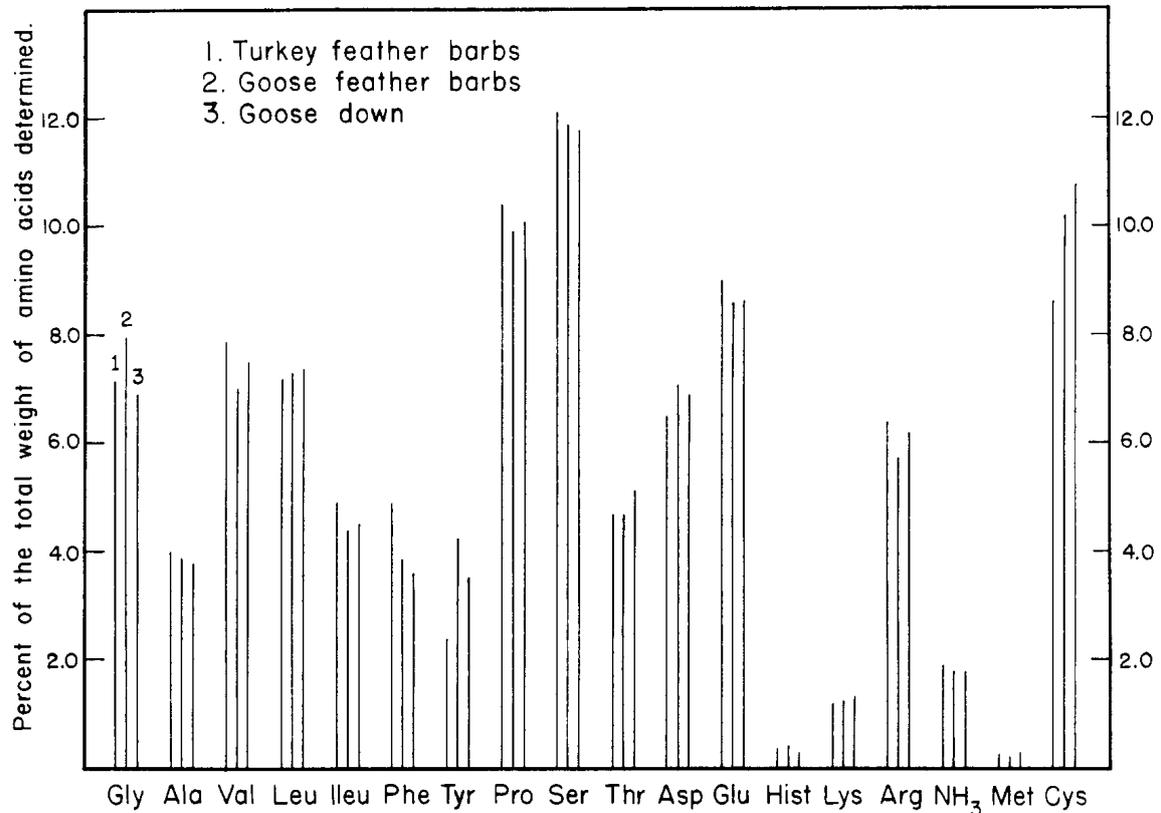


Fig. 9 – Composizione amminoacidica: confronto tra tacchino e oca<sup>13</sup>.

In Fig. 10 sono riportate due composizioni amminoacidiche tratte da UniProt (numeri di accesso: P02450 e P20307). Si può osservare che rispetto ai dati di Schroeder et al. non si ha precisa uguaglianza, ma i trend di abbondanza tra i relativi amminoacidi sono mantenuti. In particolare, va specificato che i dati del sito di proteomica sono inerenti a piume di pollo, non di tacchino né di oca, e non viene specificato quale parte della piuma è stata analizzata. Le conclusioni che si possono trarre da questi dati sono che gli amminoacidi più abbondanti sono serina, glicina e prolina: i primi due al 15% e la prolina al 10%. Alanina, valina, leucina e cisteina rappresentano l'8%, mentre isoleucina il 4%. Acido aspartico e acido glutammico insieme sono pari al 12% e sono responsabili del valore di NH<sub>3</sub> presente nelle composizioni riportate in Fig. 8 e 9, perché le condizioni di idrolisi acida usate per l'analisi amminoacidica rilasciano NH<sub>3</sub>.

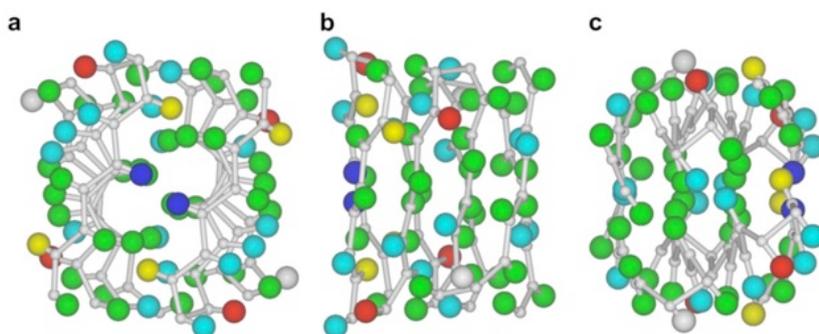
Amino acid composition:			Amino acid composition:		
Ala (A)	5	5.2%	Ala (A)	4	4.1%
Arg (R)	6	6.2%	Arg (R)	6	6.2%
Asn (N)	3	3.1%	Asn (N)	3	3.1%
Asp (D)	2	2.1%	Asp (D)	2	2.1%
Cys (C)	8	8.2%	Cys (C)	8	8.2%
Gln (Q)	4	4.1%	Gln (Q)	4	4.1%
Glu (E)	3	3.1%	Glu (E)	3	3.1%
Gly (G)	11	11.3%	Gly (G)	11	11.3%
His (H)	0	0.0%	His (H)	0	0.0%
Ile (I)	5	5.2%	Ile (I)	5	5.2%
Leu (L)	7	7.2%	Leu (L)	8	8.2%
Lys (K)	0	0.0%	Lys (K)	0	0.0%
Met (M)	0	0.0%	Met (M)	0	0.0%
Phe (F)	4	4.1%	Phe (F)	4	4.1%
Pro (P)	11	11.3%	Pro (P)	10	10.3%
Ser (S)	16	16.5%	Ser (S)	16	16.5%
Thr (T)	4	4.1%	Thr (T)	4	4.1%
Trp (W)	0	0.0%	Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	0	0.0%	Tyr (Y)	0	0.0%
Val (V)	8	8.2%	Val (V)	9	9.3%
Pyl (O)	0	0.0%	Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%	Sec (U)	0	0.0%

**Fig. 10** – Composizione amminoacidica da UniProt: a sinistra numero d'accesso P02450 mentre a destra numero d'accesso P20307.

Schroeder et al. fanno notare anche che i complicati spettri di diffrazione dei raggi X per la cheratina del rachide non sono riducibili a semplici strutture alfa elica o foglietti beta. Questa motivazione è data dall'elevata presenza di prolina, che distorce la struttura per l'assenza dell'idrogeno ammidico in catena principale con cui si costruisce il network di ponti idrogeno<sup>14</sup>. Studi recenti mostrano un match dei dati sperimentali con il modello del twisted beta sheet (Fig. 11).

Da notare l'assenza di triptofano e la quasi assenza di lisina, amminoacidi da tenere in considerazione nelle quantificazioni proteiche per via spettrofotometrica.

Da Uniprot si ricavano anche i valori del punto isoelettrico teorico, ossia quel valore di pH al quale la proteina è presente in forma di zwitterione (pI ca. 7.5), e il peso molecolare della proteina, in assenza di legami covalenti tra catene singole (ca. 9,800 Da). Queste dati danno informazioni molto importanti: il punto isoelettrico serve per evitare la precipitazione della proteina in soluzione, mentre il peso molecolare serve per studi analitici, ad esempio elettroforesi e quantificazioni proteiche.



**Fig. 11** – Modello strutturale per la cheratina avicola (Twisted Beta Sheet) lungo l’asse x (a), l’asse y (b) e l’asse z (c); <sup>15</sup>.

Da studi di letteratura si è visto che la cheratina, per la sua particolare sequenza amminoacidica, ha molte proprietà interessanti per il settore cosmetico. In particolare, gli idrolizzati di cheratina hanno buone proprietà umettanti/idratanti che ne possono consentire l’impiego sia nel settore dermatologico sia in quello tricologico. Recenti studi hanno dimostrato che gli idrolizzati di cheratina impiegati al 2% in peso in una formulazione dermatologica, aumentano l’idratazione dello strato corneo fino al 23% <sup>16</sup>; nel settore tricologico, oltre alle proprietà idratanti che si hanno al 10%, gli idrolizzati di cheratina sono usati soprattutto grazie all’azione filmogena in grado di chiudere le cuticole del capello, conferendo lucentezza e morbidezza <sup>17</sup>. Per di più, test *in vitro* rivelano proprietà antiossidanti<sup>18</sup>, d’inibizione dell’enzima convertitore dell’angiotensina e d’inibizione della dipeptidil-peptidasi IV <sup>19</sup>.

Questi studi di efficacia spingono la ricerca tecnologica verso l’estrazione della cheratina dalla piuma, che rappresenta l’8% del peso dell’animale.

Come accennato precedentemente, qualsiasi innovazione industriale delle piume che rientrano nella categoria 3 dei Soa (Reg. CE 1069/2009), prevede innanzitutto un pretrattamento di sterilizzazione senza il quale il sottoprodotto non può neanche essere trasportato. Il Regolamento n. 142/2011 include diversi possibili trattamenti di trasformazione. Cinque di questi trattamenti sono termici e riportano le dimensioni che deve avere il materiale, la temperatura, la pressione e il tempo da impiegare (Sezione 4, Capo II, Reg. CE n. 142/2011). Il metodo 1 è quello più aggressivo e richiede temperatura di 133 °C, 3 bar, per 20 min ininterrottamente. Nel metodo 5, il più blando, è necessario portare la temperatura al centro della massa a più di 80 °C per almeno 120 minuti e a più di 100 °C per almeno 60 minuti. Il problema delle metodiche termiche indicate dalla legislazione è che, in ogni caso, sono troppo

aggressive e vanno a danneggiare la piuma irrimediabilmente, soprattutto le barbe, abbassando le rese di estrazione. È possibile fare leva sulla metodica 7 in cui si lascia piena libertà all'operatore sul trattamento da effettuare, salvo che si dimostri alle Autorità competenti l'efficacia della procedura, registrando e conservando i dati di campionamento che certificano gli standard microbiologici richiesti.

Per questo lavoro di tesi sono state adoperate piume da due diversi fornitori, di cui solo uno ha dichiarato di effettuare la metodica 7, collaborando con veterinari, effettuando analisi regolari con AUSL e consentendo anche di controllare le specifiche della metodica nel proprio impianto. Per la qualità della piuma al termine del trattamento, questo fornitore è stato preso come riferimento primario. Il secondo fornitore, invece, ha dichiarato in modo approssimativo di usare biossido di cloro per sterilizzare, usufruendo della metodica 7 ma non specificando i parametri di temperatura, tempo e pressione. Le piume in uscita risultano di pessima qualità ai fini di una trasformazione in prodotti innovativi in quanto le barbe sono praticamente decomposte e il restante materiale decisamente ingiallito.

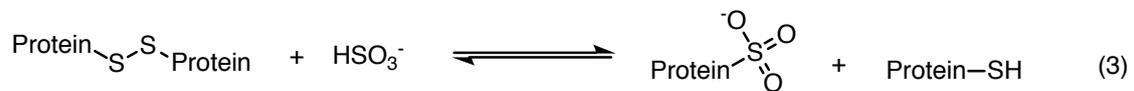
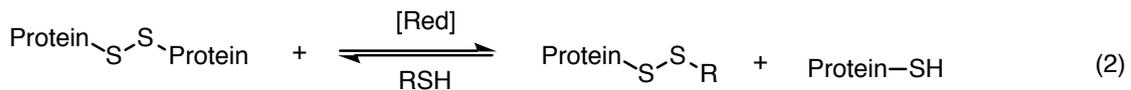
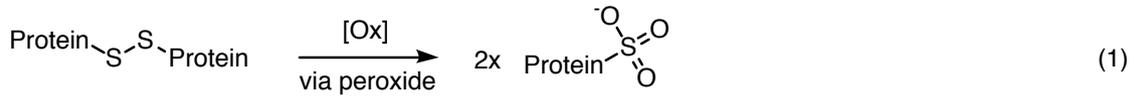
Una volta assicurata una materia prima a norma di legge, si possono valutare le varie opzioni di estrazione della cheratina. Esistono diverse tecniche, ma la macro divisione può essere effettuata tra estrazione idrolitica ed estrazione conservativa. Quest'ultima verrà chiamata "full" o "full length" perché preserva la catena proteica principale di ca. 9,800 Da.

Le estrazioni idrolitiche possono essere effettuate con acidi, basi o enzimi. Quelle con acidi o basi sono procedure molto drastiche, in cui il grado di idrolisi, cioè quanti legami peptidici si rompono, è incontrollato e si ottengono direttamente amminoacidi o al massimo di-, tri-peptidi. Per di più, a seconda delle condizioni e del reagente, si ha sempre, ma in misura variabile, una modificazione della composizione amminoacidica: alcuni amminoacidi sono ad esempio distrutti, altri modificati. I trattamenti enzimatici invece sono blandi, non superano temperature di 70 °C, sono più lenti, e il grado di idrolisi è controllabile<sup>20</sup>.

Dal lato opposto, le estrazioni "full length", devono agire selettivamente sui ponti disolfuro intermolecolari e lasciare intatta la catena primaria proteica. Esistono tre tipi di reazioni possibili a carico del legame zolfo-zolfo e sono riportate in Fig. 12. Le reazioni di ossidazione (1) utilizzano peracidi, come l'acido performico, e sono irreversibili; quelle di riduzione (2) usano tioli, come cisteina<sup>21</sup>, 2-mercaptoetanolo o ditiotreitolo, e sono reversibili perché uno dei prodotti torna ad essere un tiolo. Oltre alla reversibilità, le reazioni di riduzione della cheratina, hanno problemi di gelificazione per formazione di nuovi ponti disolfuro tra due

tioli. Per finire si può effettuare una solfitolisi (3), con varie forme di solfiti (sodio solfito, sodio bisolfito, sodio metabisolfito), reazione anche questa reversibile e con problemi di gelificazione.

Inoltre, qualsiasi procedura “full length” scelta, deve essere accompagnata da abbondante utilizzo di agenti denaturanti quali urea o cloruro di guanidinio <sup>22</sup>.



**Fig. 12** – Schema reazioni possibili per estrazione cheratina full length.

Indipendentemente dal tipo di estrazione che si effettua, risulta necessario accompagnare il prodotto con studi di efficacia al fine di conferirne proprietà cosmetiche.

Uno dei primi parametri che viene analizzato al termine del processo di estrazione della proteina è il suo peso molecolare. In questo lavoro di tesi si è quindi ritenuta necessaria la definizione di un metodo analitico per l’analisi dei pesi molecolari dei prodotti ottenuti. Le tecniche analitiche disponibili in biochimica sono l’elettroforesi e la SEC, Size Exclusion Chromatography. Mentre la SEC analizza solo proteine allo stato nativo, l’elettroforesi può esaminare proteine sia native che denaturate.

La problematica che si è posta durante questo lavoro è stata la scelta di una tecnica analitica capace di analizzare, a basso costo e rapidamente, tutti i possibili prodotti, sia di idrolisi sia full length. Per quanto riguarda la velocità di analisi, la SEC impiega ca. 45 min ad analisi, tempo richiesto non tanto per la corsa del campione, quanto per i lavaggi che si devono effettuare alla colonna per evitare contaminazione con il campione successivo ed evitare la crescita batterica nelle fasi di non utilizzo. L’elettroforesi invece, considerando tutta la fase preparativa dei gel, dei tamponi, del campione, il fissaggio, la colorazione e la decolorazione, richiede all’incirca 8h. Tuttavia, questa tecnica consente l’analisi di nove campioni alla volta e dato che analizzare lo stesso numero di campioni con SEC richiede ca. 7 h, le due tecniche sono considerate ugualmente rapide. Non è così invece dal punto di vista economico: la SEC

ha un investimento iniziale elevatissimo per il costo della colonna (almeno 1,600 Euro), escluso il costo degli standard, e ha un continuo consumo di solventi. L'elettroforesi, invece, richiede principalmente capitali iniziali per tutti i reagenti necessari, compresi gli standard, e si mantiene al di sotto dei 700 euro. La SEC risulta quindi vantaggiosa quando le analisi vengono effettuate in continuo. Pertanto, in questo lavoro di tesi ci si è concentrati sull'elettroforesi.

La scelta tra analisi elettroforetica nativa o denaturante (SDS-PAGE) è stata agevole: non è possibile avere in stato nativo un confronto affidabile dei prodotti idrolizzati con gli standard. Questo perché l'idrolisi avviene in modo casuale sulla catena principale, generando sequenze amminoacidiche caratterizzate da un *folding* completamente casuale e possibilmente diverso, anche se i pesi molecolari sono esattamente gli stessi.

Si è optato pertanto per un'analisi denaturante SDS-PAGE che richiede la risoluzione di un problema rilevante: tutti i comuni protocolli hanno limiti di rilevabilità che partono da 200,000 Da fino a 10,000 Da. Nel caso presente, la massima lunghezza che può avere la catena proteica è di ca. 9,800 Da quando intera, mentre può arrivare a peptidi ed amminoacidi in caso di trattamento idrolitico. L'unico modo per rilevare amminoacidi è l'HPLC in fase inversa, ma questa tecnica è stata scartata per le stesse considerazioni fatte in precedenza per la SEC.

Dopo un lungo lavoro di messa a punto, è stato possibile analizzare pesi molecolari di proteine denaturate in un range tra 26,000 Da e 1,400 Da mediante Tricina-SDS-PAGE. Questa variante della classica Glicina-SDS-PAGE è poco conosciuta e sono disponibili pochissimi protocolli in letteratura, tuttavia si è rivelata estremamente utile, soprattutto perché la risoluzione rimane pressoché costante per tutti i pesi molecolari e non diminuisce alle estremità dei range di analisi.

Maggiori approfondimenti sulla parte estrattiva e sulla parte analitica verranno esposti negli opportuni paragrafi della discussione del presente lavoro di tesi.

## Scopo del lavoro

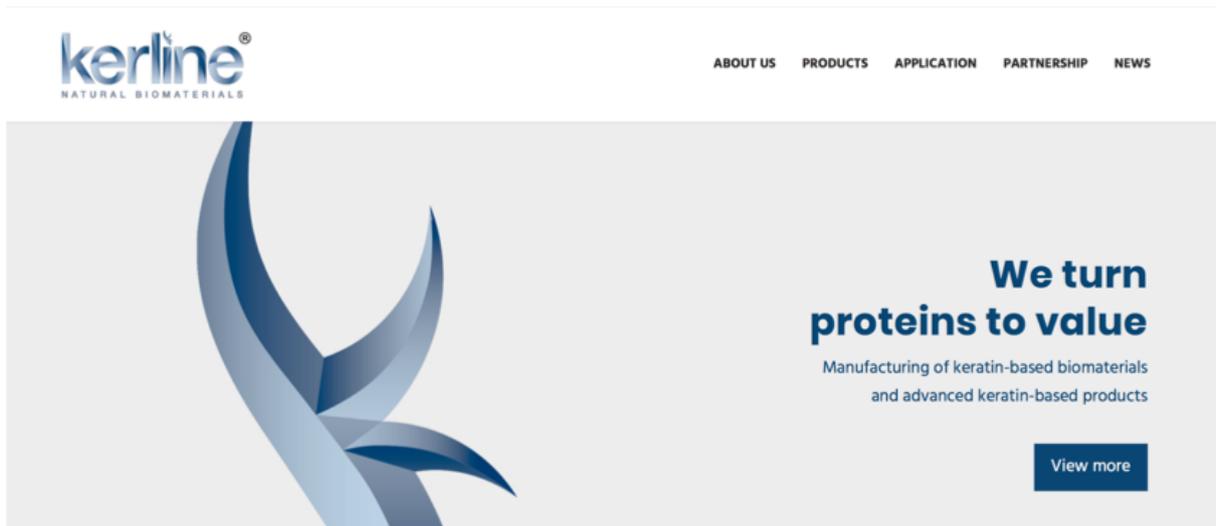


Fig. 13 – Homepage di Kerline S.r.l.

Il presente lavoro di tesi è stato svolto presso l'azienda Kerline S.r.l. con sede a Bologna. Lo scopo è stato l'indagine e lo sviluppo di metodiche industriali per l'estrazione di cheratina da piume di scarto dell'industria avicola. Il progetto di ricerca, già nella parte di studio della letteratura, ha valutato la fattibilità industriale dal punto di vista dei reagenti usati, dal loro costo al loro impatto ambientale, la tipologia di work up richiesto e gli scarti, i reflui e le emissioni che si sarebbero generati.

La linea guida è stata quella di ottenere un prodotto con il valore aggiunto necessario alla sua collocazione sul mercato ed ottenuto mediante un processo che rispettasse la legislazione attinente e l'ambiente. In particolare, il concetto di chimica verde e Responsible Care è stato anteposto alla forsennata ricerca di punti percentuali in più nella resa di reazione.

Fin da subito è stato sposato il concetto di economia circolare<sup>23</sup> a discapito dell'attuale corrente "take, make and dispose", ovvero economia lineare. L'economia circolare cerca la ricostruzione del capitale da ciò considerato ormai senza valore; in questo modo si assicura un continuo flusso di beni e servizi con il minimo impatto ambientale (Fig. 14).

Un processo industriale pensato nel contesto dell'economia circolare non prende meramente uno scarto industriale e lo trasforma in altro prodotto generando altri scarti, perché in questa modalità il cerchio economico non sarebbe chiuso e si ritornerebbe ad una economia lineare.

Il processo deve saper trasformare il prodotto in maniera economicamente vantaggiosa, ma generando sottoprodotti che, proprio perché non chiamati più scarti, possono essere usati ad altri scopi, invece di essere dismessi.

**OUTLINE OF A CIRCULAR ECONOMY**

**PRINCIPLE**

**1**

Preserve and enhance natural capital by controlling finite stocks and balancing renewable resource flows  
 ReSOLVE levers: regenerate, virtualise, exchange



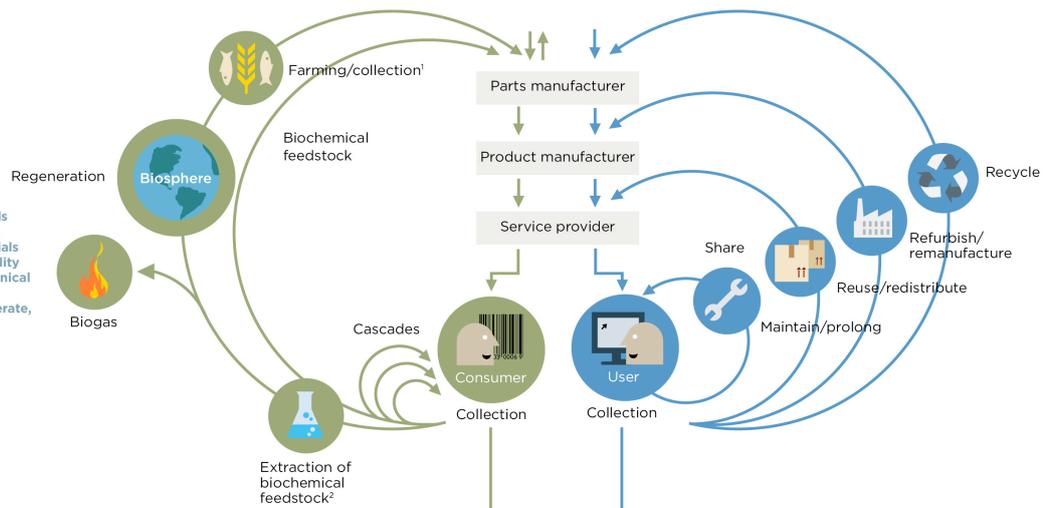
Renewables flow management

Stock management

**PRINCIPLE**

**2**

Optimise resource yields by circulating products, components and materials in use at the highest utility at all times in both technical and biological cycles  
 ReSOLVE levers: regenerate, share, optimise, loop



**PRINCIPLE**

**3**

Foster system effectiveness by revealing and designing out negative externalities  
 All ReSOLVE levers



1. Hunting and fishing  
 2. Can take both post-harvest and post-consumer waste as an input  
 Source: Ellen MacArthur Foundation, SUN, and McKinsey Center for Business and Environment; Drawing from Braungart & McDonough, Cradle to Cradle (C2C).

**Fig. 14** – Schema esplicativo del concetto di economia circolare (Ellen MacArthur Foundation).

## **Discussione e analisi dei risultati**

### **1. Contesto**

La produzione di idrolizzati proteici ha avuto un incremento elevatissimo nelle ultime decadi, sia come fonte di azoto nei fertilizzanti, sia come integratore alimentare per animali e uomo. L'utilizzo di scarti industriali per la produzione di questi idrolizzati è il vero motivo di questo incremento.

La vendita di peptidi per il settore nutrizionale, a maggior valore aggiunto rispetto ai fertilizzanti, è stata trainata da inattese funzioni biologiche, quali potere antiossidante, attività ipotensiva, anticoagulante, ipoglicemica e antitumorale; queste proprietà riguardano peptidi composti da 3 a 50 amminoacidi <sup>24</sup>.

Ogni processo industriale per la produzione di idrolizzati proteici inizia con la selezione e il controllo della materia prima, dalla quale dipende la qualità del prodotto finito. Poiché nella maggior parte dei processi si usano scarti industriali, è necessario un approfondito studio normativo che, in questo elaborato, è stato anticipato nella parte introduttiva.

Avendo chiara la legislatura d'interesse, quindi, si procede effettuando i trattamenti obbligatori o trovando un opportuno fornitore.

Dopo essere stata selezionata e controllata, la materia prima viene idrolizzata e il prodotto purificato. Mentre quest'ultimo passaggio consiste sempre in una filtrazione, per la rimozione del particolato solido, e un'ultrafiltrazione, per la rimozione dei sali, la reazione di idrolisi iniziale può avvenire in vari modi, affrontati più avanti nel testo.

Al termine della purificazione il processo è finito se il prodotto è venduto liquido, oppure si procede con l'essiccazione, generalmente tramite spray dry o liofilizzazione, nel caso della vendita allo stato solido.

I passaggi di produzione sono, quindi, pochi: materia prima - reazione - purificazione - (essiccazione), e le variabili si concentrano nella conduzione della reazione di idrolisi, il cui controllo è discusso nel paragrafo che segue.

## 2. Controllo di processo

Premesso che la reazione idrolitica deve essere robusta, cioè il prodotto non deve subire alterazioni di qualità a piccole variazioni casuali nei parametri di processo, le industrie di idrolizzati proteici sono solite controllare la reazione attraverso un parametro chiave chiamato: “Degree of hydrolysis (DH)”. Il DH, grado di idrolisi, è definito come la percentuale di legami peptidici rotti e può essere espresso dalla generica formula:

$$\% \text{ DH} = (h/h_{\text{tot}}) * 100$$

dove  $h$  è il numero di peptidi nel reattore in un dato istante di tempo e  $h_{\text{tot}}$  è il numero totale di legami peptidici introdotti come materia prima;  $h_{\text{tot}}$  dipende dalla composizione amminoacidica.

Ci sono vari modi per misurare il DH, il più recente cronologicamente ma anche il più usato è il saggio con l’o-ftalaldeide (OPA). Ogni considerazione che seguirà sulla determinazione del DH è indipendente dal saggio che si utilizza.

Il saggio OPA è una misura spettrofotometrica dell’assorbanza causata dalla formazione di un cromoforo tra l’OPA e tutte le ammine primarie presenti. Le ammine terminali della catena peptidica sono il vero oggetto di analisi per il DH (Fig. 15), tuttavia reagiscono anche i residui di lisina, non costituendo però un problema perché si riesce ad incorporarli nel bianco dell’analisi.

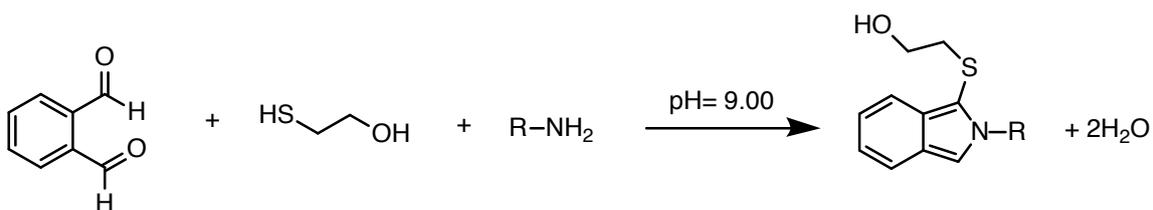


Fig. 15 – Meccanismo del saggio OPA.

Un esempio di procedura di misura del DH è descritto di seguito. Una proteina solubile in acqua (e.g. alfa-lactalbumina) viene inserita nel reattore e prima di iniziare l’idrolisi si fa una misura tramite OPA. Il risultato spettrofotometrico rappresenta la concentrazione iniziale. Dopo alcune ore si campiona e si misura la concentrazione, che risulta il doppio di quella iniziale. Ciò vuol dire che il saggio ha rilevato il doppio di ammine primarie rispetto all’inizio. Queste ammine sono state liberate dal processo idrolitico e quindi il grado di

idrolisi (DH) sarà del 50%. Da questo valore si può ipotizzare che il peso molecolare della proteina iniziale sia ora la metà.

Poiché il valore di concentrazione è ottenuto tramite un coefficiente di estinzione molare, che non cambia a seconda né del residuo amminoacido né della lunghezza di catena, la concentrazione che si misura serve solo per il DH <sup>25</sup>. Per chiarire: 1g di amminoacidi darebbero una concentrazione molto più alta di 1g di proteina.

Di conseguenza, nel caso in cui le proteine siano insolubili in acqua, e che la solubilizzazione avvenga per effetto e contemporaneamente all'idrolisi, il DH non è più un parametro affidabile. Questo è il caso dell'estrazione della cheratina avicola dalle piume. Sarebbe, infatti, impossibile discriminare tra l'attività idrolitica che interessa un peptide già in soluzione e quella che fa effettivamente aumentare la concentrazione peptidica per disgregazione del solido.

In altri termini, un DH del 50% come nel caso precedente potrebbe indicare un dimezzamento della proteina oppure la solubilizzazione di materiale dal substrato solido, in quanto entrambi i fenomeni avvengono contemporaneamente.

Pertanto, poiché il DH non è un parametro utilizzabile in un impianto per la produzione di idrolizzati di cheratina avicola, il problema è stato semplificato cercando, e sviluppando, due diverse metodiche: una per l'analisi dei pesi molecolari e l'altra per seguire la solubilizzazione delle piume.

L'analisi dei pesi molecolari è stata eseguita mediante Tricina-SDS-PAGE e sarà discussa più avanti. Questo tipo di analisi non serve solo per controllare il processo, ma anche per riuscire a correlare i risultati di eventuali studi di efficacia al tipo di prodotto ottenuto nell'impianto.

L'analisi di concentrazione risulta molto utile nel momento in cui il prodotto viene venduto solido, per potere avere una resa teorica su cui effettuare calcoli economici.

Le tecniche spettrofotometriche si adattano bene ad un processo produttivo perché rapide, economiche e sfruttano equipaggiamenti che si trovano nella maggior parte dei laboratori. Tuttavia questi saggi non sono assoluti, cioè ogni proteina risponde diversamente. In un processo idrolitico i peptidi prodotti hanno vari pesi molecolari e diverse sequenza amminoacidiche, a seconda di dove è avvenuta l'idrolisi, e questo non aiuta la variabilità di risposta dei saggi colorimetrici. Per questo motivo è stato implementato un metodo di quantificazione basato sulla gravimetria, adatto solo per l'idrolisi enzimatica.

## 2.1 Analisi pesi molecolari

La messa a punto della metodica Tricina-SDS-PAGE, per l'analisi dei pesi molecolari, è avvenuta fino a risoluzione delle molecole standard commerciali come mostrato sul bugiardino del fornitore BioRad (Fig. 16)

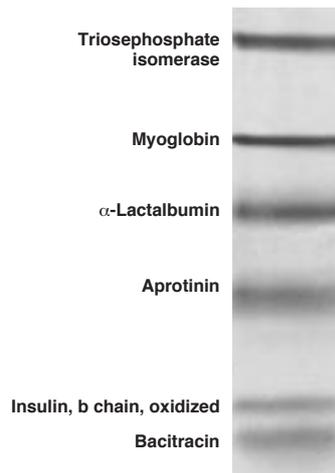


Fig. 16 – Risoluzione degli standard BioRad come riportato nel bugiardino.

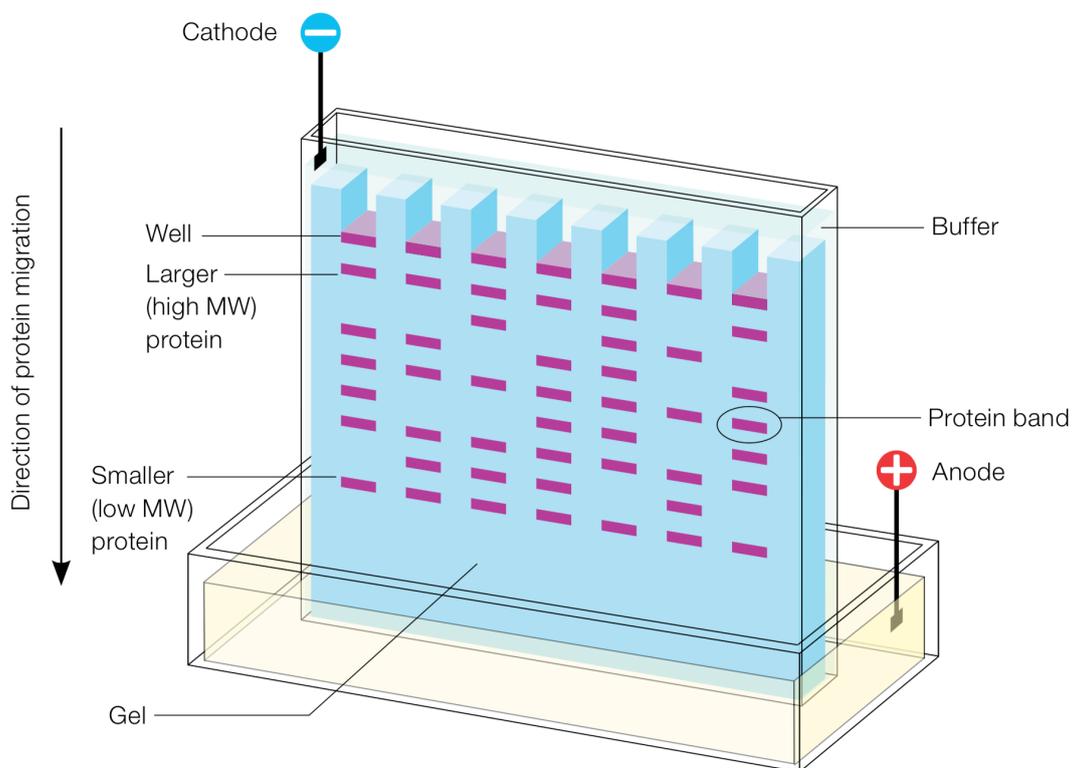
### 2.1.1 Premesse teoriche

Le seguenti premesse teoriche fungono da guida alla comprensione dell'operato.

La Tricina-SDS-PAGE è una tipologia di elettroforesi proteica. L'SDS-PAGE fu introdotta per la prima volta da Laemmli <sup>26</sup>, con lo scopo di riuscire a risolvere e analizzare una miscela complessa di proteine esclusivamente in base al loro peso molecolare. Ciò è possibile attraverso un opportuno tampone, detto Sample buffer, con il quale pretrattare il campione d'analisi. I reagenti che compongono il Sample buffer servono a rompere i legami disolfuro intermolecolari, a denaturare le proteine e a formare micelle con il tensioattivo anionico Sodio Dodecil Solfato (SDS).

La peculiarità dell'SDS è quella di formare micelle a densità di carica costante, pari a 1.4 g di tensioattivo per grammo di polipeptide, e carica complessiva negativa. In questo modo, un campo elettrico applicato attraverso un supporto (gel) in poliacrilammide, non solo porta tutte le proteine verso l'anodo, ma le fraziona anche in funzione del solo peso molecolare.

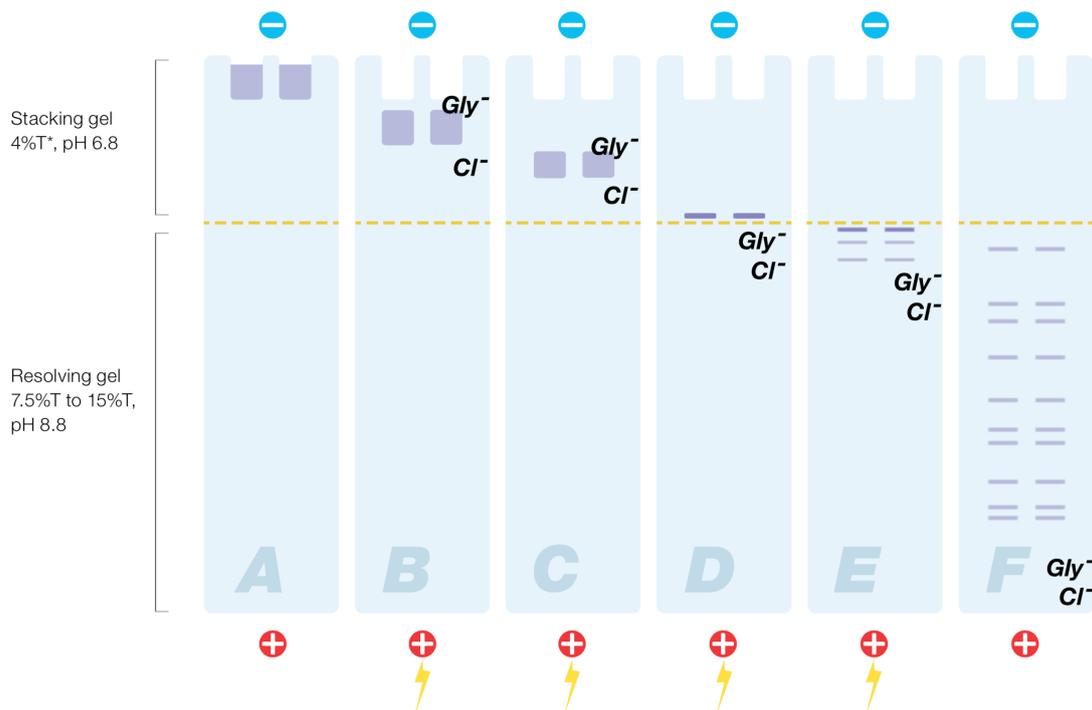
La poliacrilammide è un gel poroso che funge da setaccio molecolare e nei sistemi più utilizzati, quelli discontinui, è diviso in due parti contigue ma distinte, una chiamata “*stacking gel*” e l’altra “*separating gel*” (o running gel). Il gel è posizionato in verticale con l’anodo (+) nella parte inferiore e il catodo (-) nella parte superiore; gli elettrodi, messi ai due estremi, costringono il campo elettrico ad attraversare il supporto. Per come è costruito il sistema le micelle, cariche negativamente, sono inserite nei pozzetti dello *stacking gel*, prossime al catodo, e proseguono la corsa nel *separating gel*, che termina con l’anodo (Fig. 17).



**Fig. 17** – Schema Setup elettroforetico (BioRad).

Una volta avviato il campo elettrico le proteine inserite nei pozzetti non entrano contemporaneamente nella matrice, ma alcune arrivano prima delle altre, generando una banda diffusa di altezza ca. 4 mm. Al fine di evitare una tale perdita in risoluzione, in un sistema discontinuo lo *stacking gel* serve per compattare le proteine attraverso una porosità maggiore rispetto al *separating gel*. Nella prima parte di supporto le proteine hanno un’elevata mobilità, ridotta poi bruscamente nella seconda parte, ottenendo un effetto di impaccamento. La risoluzione è aumentata ancora ulteriormente usando tamponi contenenti glicina e ione

cloruro insieme a due pH differenti per le due parti di gel. Facendo così si ottiene quel che in gergo è detto “sandwich” delle proteine tra lo ione cloruro (leading ion), con mobilità più alta, e la glicina (trailing ion), con mobilità più bassa. Questo fenomeno porta ad ulteriore impaccamento per la presenza di una piccola zona ad elevato gradiente di potenziale elettrico. Tutto ciò è possibile solo nello stacking gel che, a pH 6.8, vede la glicina in forma zwitterionica. Nel separating gel, il pH 8.8, fa accelerare la glicina allontanandola dalle proteine, rallentate a loro volta da una diminuzione del grado di porosità (Fig. 18).



**Fig. 18** – Progressione della corsa elettroforetica con ruolo della Glicina, dello stacking gel e del separating gel. L’inizio della corsa è rappresentato nel gel A, la fine della corsa è rappresentata nel gel F (BioRad).

La fabbricazione del gel in poliacrilammide avviene mediante una copolimerizzazione radicalica dell’acrilammide e della N, N’-metilen-bisacrilammide (Fig. 19) tramite l’iniziatore Ammonio Persolfato (APS) e il catalizzatore Tetrametiletilendiammina (TEMED). Il meccanismo di accelerazione della decomposizione dell’APS da parte della TEMED è mostrato in Fig. 20: lo ione persolfato si decompone nel corrispondente radicale libero che a sua volta attacca il doppio legame dei monomeri iniziando la polimerizzazione.

Il grado di porosità di un gel è specificato mediante le percentuali “% T” e “% C”<sup>27</sup>, che indicano rispettivamente la percentuale in grammi di entrambi i monomeri per 100 mL e la percentuale in peso di bisacrilammide relativa al quantitativo peso totale di monomeri.

Dal lato pratico, la scelta delle concentrazioni del gel è fondamentale per una buona risoluzione; incrementando % T e % C aumenta la reticolazione e diminuisce la porosità. Nella versione classica Glicina-SDS-PAGE si fissa 2.6 % C e si passa da 5-20% T per una matrice uniforme a 3-30% T per una matrice a gradiente. Questi range di percentuale sono dettati puramente da fattori meccanici: valori %T più bassi danno gel poco viscosi, valori % T più alti incrementano notevolmente la viscosità.

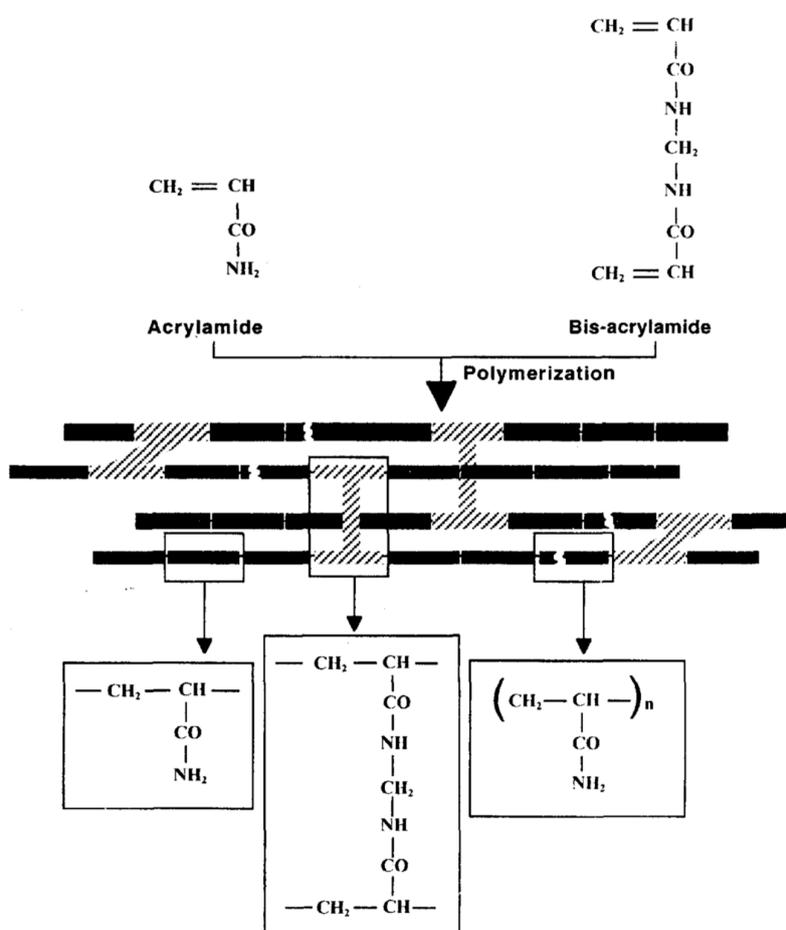
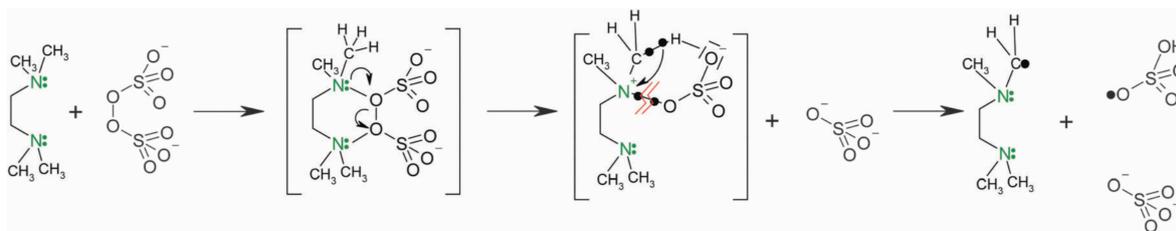


Fig. 19 – Copolimerizzazione tra acrilammide e bisacrilammide<sup>28</sup>.



**Fig. 20** – Meccanismo di decomposizione catalitica dell'APS accelerato dal TEMED <sup>29</sup>.

### 2.1.2 Sviluppo della metodica

La cheratina avicola, denaturata e senza legami disolfuro, ha un peso molecolare massimo di 9,800 Da. Per questo motivo è stato usato lo standard commerciale “Polypeptide SDS-PAGE MW Standard” della ditta BioRad, che copre dai 26,625 Da ai 1,423 Da. Per standard si intende una miscela proteica di proteine pure, in questo caso sei, a peso molecolare noto. Poiché questo riferimento è molto specifico per piccole proteine, i gel a gradiente sono stati scartati perché idonei a coprire campioni con dimensioni molto diverse tra loro.

La letteratura è concorde nel limitare l'uso dei gel Glicina-SDS (protocollo Laemmli) ad una risoluzione di proteine più grandi di 10,000-12,000 Da.

La verifica sperimentale di questo limite fu dimostrata per la prima volta da Schägger & Von Jagger, i quali, colorando i soli stacking gel e precipitando l'SDS con BaCl<sub>2</sub>, dimostrarono che le micelle di SDS con piccole proteine non si separavano dalle micelle di solo SDS. La minima differenza in dimensione e carica era la motivazione teorica. In conclusione, Schägger asserì che la risoluzione sarebbe stata possibile solo quando, già nello stacking gel, i polipeptidi più corti fossero totalmente esclusi dalla zona di solo SDS. Vennero così eseguiti una serie di esperimenti attraverso i quali si scoprì che il centro del problema era la mobilità relativa tra proteine e glicina (trailing ion).

Nel 2006 è stato pubblicato il protocollo di Schägger sulla rivista “Nature” che consente di analizzare proteine da 100,000 a 1,000 Da. In questa metodica la risoluzione fino a 1,000 Da avviene rallentando le proteine con un separating gel costituito da 16% T, 6% C e 6.0 M Urea, sovrapposto ad uno “spacer gel” da 10% T, 3% C e uno stacking gel da 4%T, 3%C. Contemporaneamente si accelera la corsa del trailing ion sostituendo la glicina (pKa<sub>2</sub> 9.6) con la tricina (pKa<sub>2</sub> 8.15) e lavorando con un unico pH in tutto il gel (pari a 8.45). La tricina

risulta necessaria perché, per la sua  $pK_{a2}$  e per il pH del gel, la sua mobilità è di molto superiore a quella della glicina.

In questo protocollo, inoltre, la separazione del trailing ion dalle proteine non avviene più per cambio di pH, come descritto da Laemmli, ma per rallentamento proteico dato dal 16% T, 6% C e 6 M Urea del separating gel. Un gel così complesso è obbligatorio perché la tricina ha un limite superiore di stacking di 30,000 Da<sup>30</sup>.

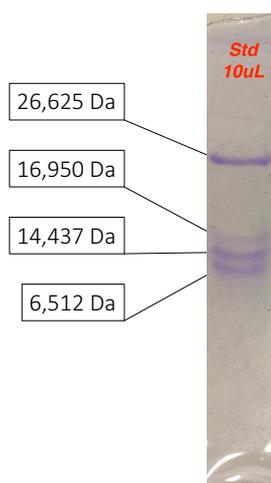
Le problematiche di questa tecnica sono la difficoltà di preparare un gel suddiviso in tre parti, i tempi di corsa superiori a 6 h, i voltaggi elevati fino a 300 V, la presenza di Urea 6.0 M per ridurre maggiormente i pori<sup>28</sup>, la scarsa riproducibilità dei gel, e la grande quantità di reagenti richiesti.

Nonostante tutto, questo protocollo è quello considerato “ufficiale” per la prestigiosa rivista su cui è stato pubblicato<sup>31</sup>.

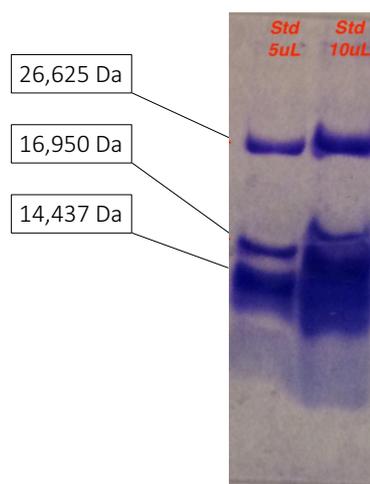
Nei primi tentativi di risoluzione analitica dello standard commerciale è stato utilizzato un gel Tricina-SDS semplificato (Fig. 21 e Fig. 22). Le soluzioni tampone di corsa e sample buffer, infatti, sono le stesse del protocollo Schägger mentre per il gel è stata seguita la procedura Laemmli ma con un separating gel al 15% T e 3.3% C.

Dopo l'esecuzione della prova col Gel n.1 non è stato possibile attribuire la causa della scarsa risoluzione dello standard ad una precisa specifica del protocollo usato. Questo perché la corsa elettroforetica non è stata seguita fino a termine a causa della poca quantità di colorante contenuto nel sample buffer, il Blu di Bromofenolo, normalmente usato per seguire la corsa (Fig. 23).

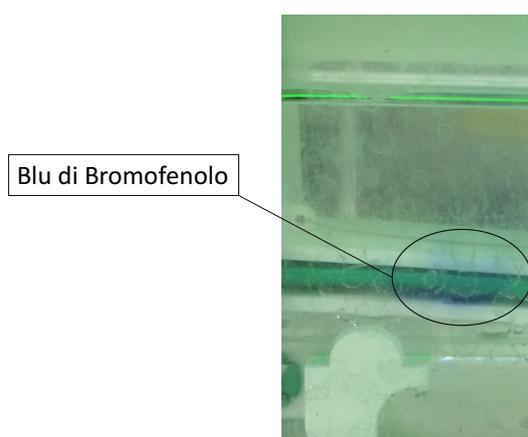
Nel Gel n. 2 è stato, quindi, migliorato il sample buffer (Fig. 24). La corsa elettroforetica è stata seguita fino all'uscita del colorante dal fondo del gel, non portando ugualmente alla risoluzione degli standard BioRad.



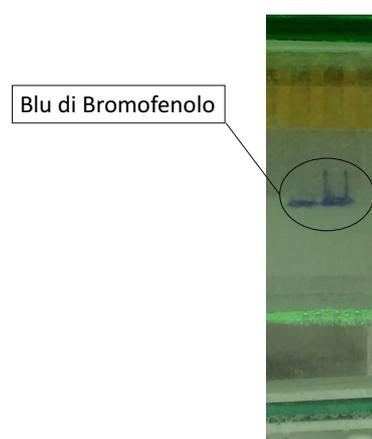
**Fig. 21** – Gel 1



**Fig. 22** – Gel 2



**Fig. 23** – Corsa Gel 1



**Fig. 24** – Corsa Gel 2

Questi due primi tentativi non hanno avuto successo ma, anziché ripiegare sulla procedura presente su “Nature”, fin troppo laboriosa, un’approfondita ricerca bibliografica ha portato al protocollo di Haider.

Nel 2010 Haider modificò la metodica Schägger cambiando solo il pH del gel da 8.45 a 8.8 e ciò gli ha consentito di lavorare con un sistema discontinuo semplice, cioè composto da uno stacking Gel al 4% T, 3.3% C e un separating gel al 3.3% C e 9% T. Inoltre, ha dimostrato la fattibilità dell’analisi con un’unica soluzione tampone agli elettrodi, per di più a concentrazione di reagenti 1/4 inferiore in molarità<sup>32</sup>.

Il protocollo Haider è stato provato in laboratorio e il risultato è il Gel n. 3 (Fig.25), con un drastico miglioramento nella risoluzione degli standard rispetto ai due gel precedenti.

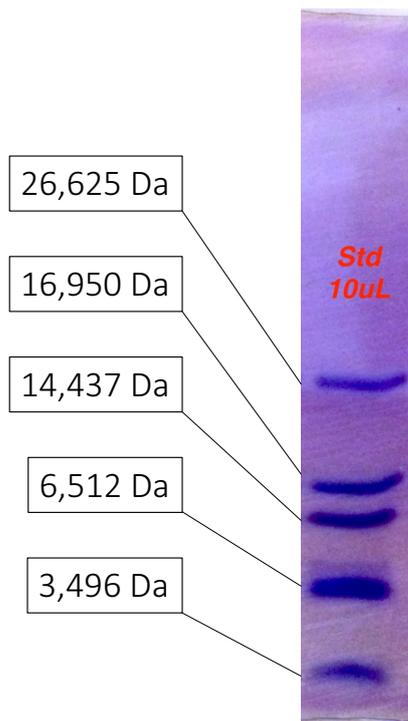


Fig. 25 – Gel 3

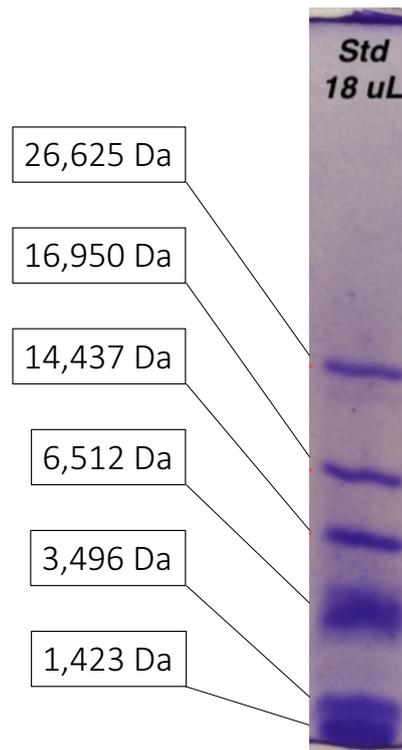
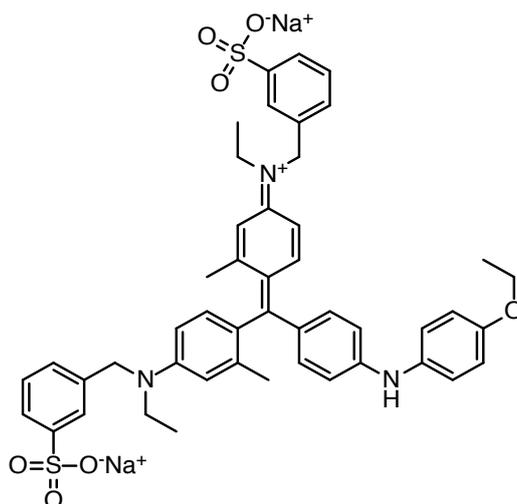


Fig. 26 – Gel 4

Delle sei proteine del kit standard, nel Gel n. 3 manca la bacitracina di 1,423 Da. Le cause del problema possono essere due: un'uscita dal gel durante la corsa oppure un dilavamento durante il fissaggio pre-colorazione. La prima opzione è stata scartata perché nel fondo del Gel n. 3 si vede ancora la banda di CBB G250, indicatore che la bacitracina non è uscita dal gel.

Per valutare la seconda opzione, nel Gel n. 4 (Fig. 26) il fissaggio, anziché essere effettuato con antisolvente alcolico, è stato svolto tramite crosslinking proteico con una soluzione di glutaraldeide al 5% wt in H<sub>2</sub>O. Questa accortezza, insieme all'incremento al 12%T per aumentare risoluzione, ha portato alla visualizzazione della bacitracina.

Una piccola ma importante differenza, rispetto alle prime prove, è l'utilizzo del Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB), al posto del Blu di Bromofenolo, come indicatore di corsa nel Sample Buffer.



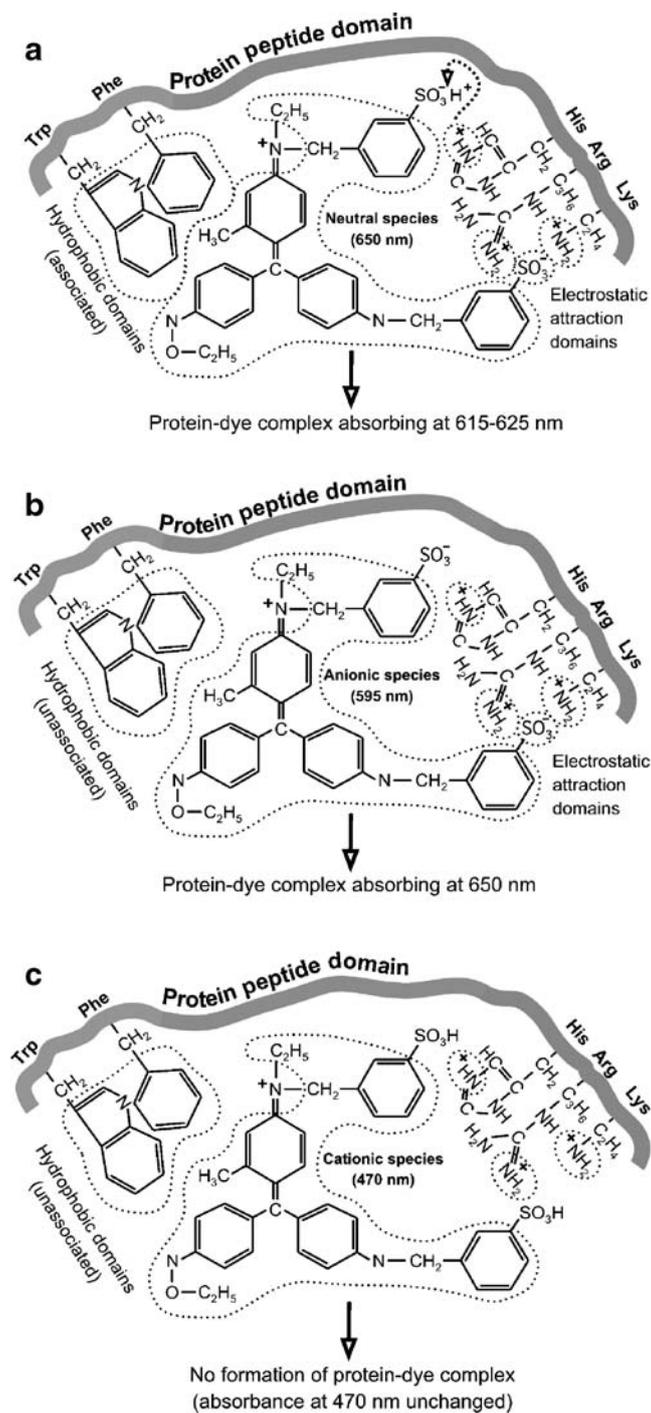
**Fig. 27** – Specie anionica del CBB G 250.

Il CBB si può presentare in tre specie a seconda del pH: la specie cationica, con entrambi i gruppi solfato protonati, a  $\text{pH} < 0.39$ , la specie anionica, con un entrambi i gruppi solfato deprotonati, a  $\text{pH} > 1.3$ , la specie neutra, con un solo gruppo solfato protonato, nel range di pH intermedio. In Fig. 27 è rappresentata la specie anionica.

La reattività del Coomassie Brilliant Blue è dovuta alla formazione di un complesso proteico che si forma solo con la specie anionica e neutra. La colorazione, per quanto riguarda la specie anionica, avviene tramite sole interazioni elettrostatiche tra i solfonati e i residui amminoacidici basici, in particolare arginina, lisina e istidina. Mentre, per quanto riguarda la specie neutra, intervengono anche interazioni idrofobiche con residui aromatici quali triptofano e fenilalanina <sup>33</sup>. In Fig. 28 sono rappresentati i meccanismi d'interazione nel complesso CBB-proteina; il limite di sensibilità della colorazione è generalmente pari a 100 ng.

Da questa parentesi teorica è evidente che l'efficacia del Coomassie Brilliant Blue dipende dalla sequenza amminoacidica proteica <sup>34</sup>.

La cheratina avicola contiene 97 amminoacidi, dei quali solo il 6.2% di arginina e il 4.1% di fenilalanina; lisina, istidina e triptofano sono assenti.



**Fig. 28** – Interazione proteina e CBB neutro (a); e CBB anionico (b); e CBB cationico (c). L'immagine riporta gli amminoacidi coinvolti <sup>33</sup>.

È noto dalla letteratura che una tecnica di colorazione dei gel alternativa al Coomassie Brilliant Blue è la colorazione argentica (metodica Silver Staining), con limite di sensibilità nei decimi di nanogrammo. Per non correre il rischio di avere, sul campione reale, una scarsa colorazione, il Gel n. 5 è la verifica di un protocollo disponibile gratuitamente in rete <sup>35</sup> che spiega come fare da sé la colorazione “Silver Staining”. Questa prova di laboratorio è stata programmata non solo per avere una metodica di colorazione alternativa, ma economica (costo dei kit commerciali per Silver Staining: 155 Euro per Thermofisher cat. n. 24612 oppure 194 Euro per Sigma Aldrich cat. n. GE17-1150-01).

La colorazione sfrutta il principio del saggio di Tollens, ovvero la riduzione di ioni di argento con riducenti organici. Nel particolare, commentando la procedura del Gel n. 5, dopo un fixing con etanolo, si impregna il gel di Sodio Tiosolfato (sensitizer) che ha lo scopo di rendere solubili gli alogenuri di argento che si potrebbero formare con gli ioni cloruro già presenti dal buffer elettroforetico Tris-HCl. Infine la Staining Solution introduce  $\text{Ag}^+$  come  $\text{AgNO}_3$  e la formaldeide come riducente.

La colorazione selettiva delle proteine è possibile per una coordinazione di  $\text{Ag}^+$  da parte dei residui amminoacidici con atomi che possono fungere da leganti. Gli amminoacidi più coinvolti sono istidina, arginina, lisina e prolina mentre gli aromatici sono esclusi <sup>36</sup>. La coordinazione è possibile solo in ambiente basico, per questo motivo si aggiunge la Developing Solution che contiene Sodio Carbonato.

La formaldeide si ossida ad acido formico e riduce  $\text{Ag}^+$  ad argento metallico che nuclea e accresce nella zona proteica.

Varie procedure di Silver Staining generano diverse colorazione e ciò è attribuito principalmente alla dimensione del grano di argento <sup>37</sup>.

Il meccanismo di questa procedura è ancora incerto: la letteratura è concorde sul fatto che la coordinazione proteica guidi la zona dove andrà a nucleare l'argento ma non c'è unità nel tipo di complessi di coordinazione che si formano.

I dati sperimentali di letteratura mostrano comunque una sensibilità della tecnica 100 volte superiore rispetto al CBB, probabilmente perché, pur dipendente dalla sequenza amminoacidica, il Silver Staining coinvolge molti più residui.

Il Gel n. 5 (Fig. 29) mostra che la procedura di “Alphalyse” funziona ma, nel caso di analisi di idrolizzati proteici, può essere necessario sostituire il fixing in soluzione alcolica con un fixing a base di gluteraldeide per non eluire i polipeptidi più piccoli.



**Fig. 29** – Gel 5 (Silver Staining)

### 3. Estrazioni idrolitiche

Le piume sono usate dagli uccelli, oltre che per volare, anche per proteggersi dall'ambiente atmosferico, sia dalle diverse temperature sia dall'acqua: non deve sorprendere se la cheratina, la proteina che maggiormente le costituisce, sia insolubile in acqua.

Uno dei metodi per estrarre la cheratina in fase acquosa è idrolizzandola, quindi rompendo la sua macrostruttura.

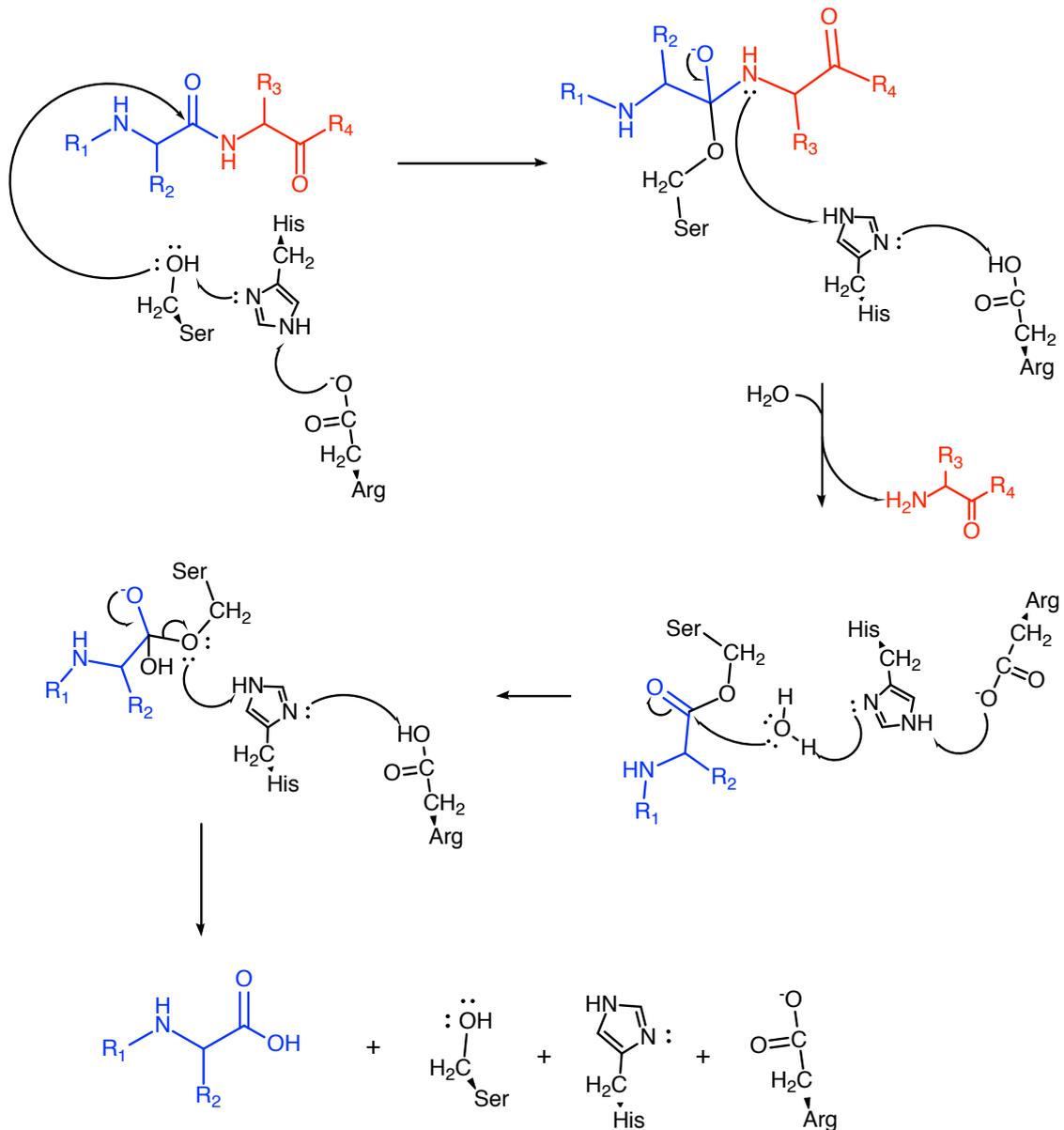
#### 3.1 Idrolisi Enzimatica

Come spiegato nell'introduzione, l'idrolisi enzimatica avviene a temperature inferiori di 70°C in fase acquosa e il grado d'idrolisi è facilmente controllabile.

L'enzima maggiormente utilizzato è la subtilisina, commercializzata con molteplici nomi ma individuata senza ambiguità dal numero EC 3.4.21.62 e dal CAS 9014-01-1.

La subtilisina appartiene alla famiglia delle "proteasi" cioè enzimi che idrolizzano i legami peptidici e come proteasi sono delle "Serin-proteasi" perché contengono una serina, essenziale ai fini idrolitici, nel sito catalitico. Il comune meccanismo di reazione assegna i ruoli di nucleofilo al residuo della serina, di elettrofilo all'aspartato e di base all'istidina ed è rappresentato in Fig. 30 (triade catalitica). Lungo la catena proteica serina, acido aspartico e istidina sono distanti tra loro, ma l'enzima assume una struttura tridimensionale tale da farli

trovare in prossimità. Si nota che la subtilisina agisce selettivamente solo sul legame ammidico e il taglio è casuale, cioè non è localizzato in brevi e specifiche sequenze amminoacidiche che a volte direzionano l'azione enzimatica.



**Fig. 30** – Schema di reazione delle Serin proteasi. Sono messi in evidenza solo gli amminoacidi coinvolti nel processo catalitico

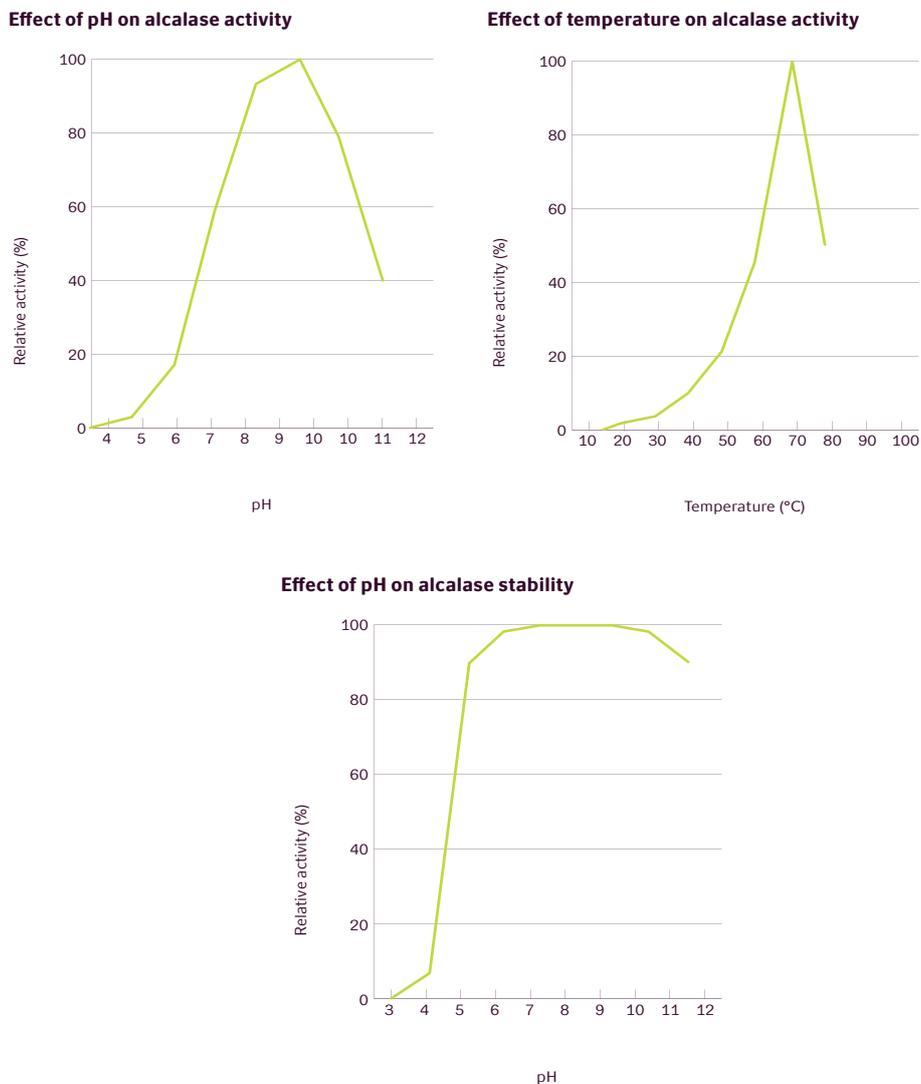
Le Subtilisine hanno pesi molecolari che variano dai 20,000 ai 40,000 Da, a seconda del tipo di batterio da cui provengono; informazioni più specifiche possono essere ottenute inserendo

il numero EC 3.4.21.62 nel database “UniProt”. Nel caso di questo lavoro, il fornitore non ha specificato se l’enzima provenisse da *Bacillus Subtilis*, *Bacillus Licheniformis* o altro.

Le condizioni operative per le Subtilisine sono riportate nei grafici in Fig. 31, tratti dalla scheda tecnica della ditta olandese Novozymes, la stessa che, tramite distributore Brenntag, ha fornito il lotto di enzima.

Basandosi su questi grafici, sono state scelte le condizioni operative dell’idrolisi, eccetto per la temperatura di 37°C che era la più elevata possibile per l’incubatore a disposizione.

La solubilizzazione del substrato solido avviene per disaggregazione idrolitica della macrostruttura molecolare.



**Fig. 31** – Condizioni operative dell’enzima subtilisina<sup>38</sup>.

### 3.1.1 Quantificazione gravimetrica

Per effettuare un'analisi gravimetrica il campione da pesare deve essere un solido libero da impurezze. Pertanto, prima della reazione di idrolisi sono stati eseguiti una serie di passaggi volti allo scopo. Innanzitutto, l'enzima è stato purificato per rimuovere ogni altro soluto non dichiarato in scheda tecnica, come eventuali antimicrobici. La purificazione è avvenuta per filtrazione utilizzando i concentratori centrifughi Centricon (Millipore) con MWCO di 10,000 Da. Poiché l'enzima è grande almeno 2x MWCO (20,000-40,000 Da) ci si è assicurati, in questo modo, la sua ritenzione e contemporaneamente la permeazione di tutti i soluti a peso molecolare maggiore di 10,000 Da.

Per mantenere la stessa concentrazione enzimatica del fornitore, la modalità di filtrazione è stata la diafiltrazione, che prevede il mantenimento del volume iniziale tramite immissione di H<sub>2</sub>O milliQ. Dopo il campionamento è stato rimosso tutto il residuo solido attraverso due passaggi: centrifugazione e filtrazione con filtri Millex Millipore da 0.45 µm.

A questo punto il campione conteneva i prodotti peptidici e i sali del tampone di estrazione. Qualsiasi tecnica di purificazione successiva rischiava di far perdere le frazioni peptidiche più piccole, sia con tecniche come le dialisi o le ultrafiltrazioni, sia con le tecniche cromatografiche.

Per questo motivo non è stata effettuata alcuna purificazione ma si è deciso di usare, un unico soluto per il tampone di estrazione, l'ammonio carbonato come tampone di pH, volatile nella fase di essiccazione per liofilizzazione.

Un'altra accortezza per minimizzare gli errori nella pesata è stata quella di deumidificare in essiccatore tutti i contenitori vuoti prima di tararli. Questo è stato necessario perché la fase di liofilizzazione deumidifica anche i contenitori usati nella procedura; in tal modo è stato possibile sottrarre dalla tara il peso dell'H<sub>2</sub>O adsorbita, per evitare di commettere errori di pesata.

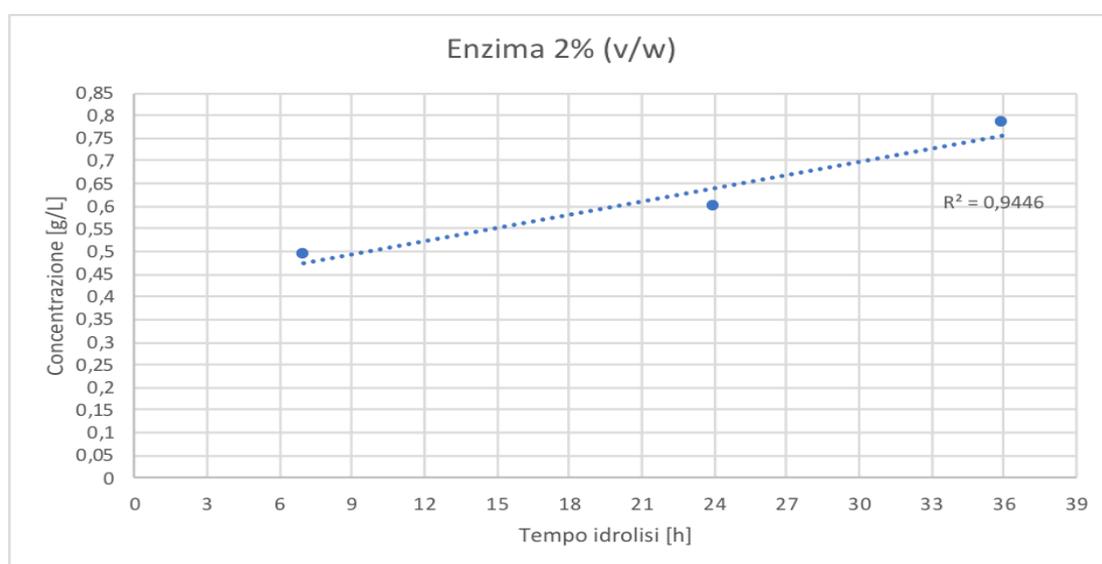
I risultati ottenuti sono mostrati nelle seguenti Tab. 1 con Fig. 32 e Tab. 2 con Fig. 33 e devono essere letti contemporaneamente all'analisi dei pesi molecolari che, come la stessa concentrazione, cambiano in funzione del tempo di reazione.

Le concentrazioni non sono elevate, ma in base al peso molecolare del prodotto, si può pensare di concentrare i prodotti con un ultrafiltro industriale, regolando il MW cut off di membrana.

Prova Enzima 2% (v/w)	
Tempo (h)	Conc. (g/L)
3	0,86
7	0,49
24	0,6
36	0,78

**Tab. 1** – Quantificazione proteica gravimetrica della reazione con enzima al 2% (v/w).

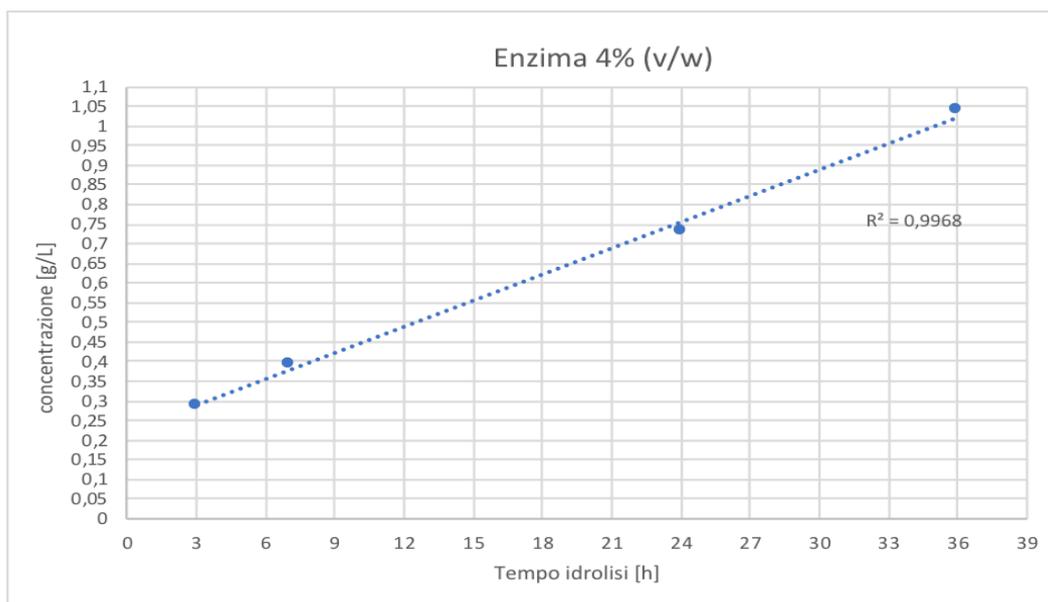
Il valore di concentrazione a 3 h di reazione è stato considerato spurio, quindi omesso nel grafico seguente (Fig. 32).



**Fig. 32** – Rappresentazione grafica della quantificazione gravimetrica della reazione con enzima al 2% (v/w).

Prova Enzima 4% (v/w)	
Tempo (h)	Conc. (g/L)
3	0,29
7	0,39
24	0,73
36	1,04

**Tab. 2** - Quantificazione gravimetrica della reazione con enzima al 4% (v/w).



**Fig. 33** - Rappresentazione grafica della quantificazione gravimetrica della reazione con enzima al 4% (v/w).

### 3.1.2 Verifica dei pesi molecolari

I gel qui discussi (Fig. 34 e 35) sono stati i primi ad essere effettuati per analizzare un campione reale. Le specifiche dei gel sono le medesime del Gel 4 (p. 46).

Conoscendo la composizione amminoacidica generale della cheratina avicola e il meccanismo di colorazione del Coomassie Brilliant Blue, è stato deciso di caricare nei pozzetti un minimo di 50 µg di proteina, contro i 20-30 µg normalmente sufficienti. Nonostante ciò l'intensità delle bande è bassa, con un rumore di fondo elevato.

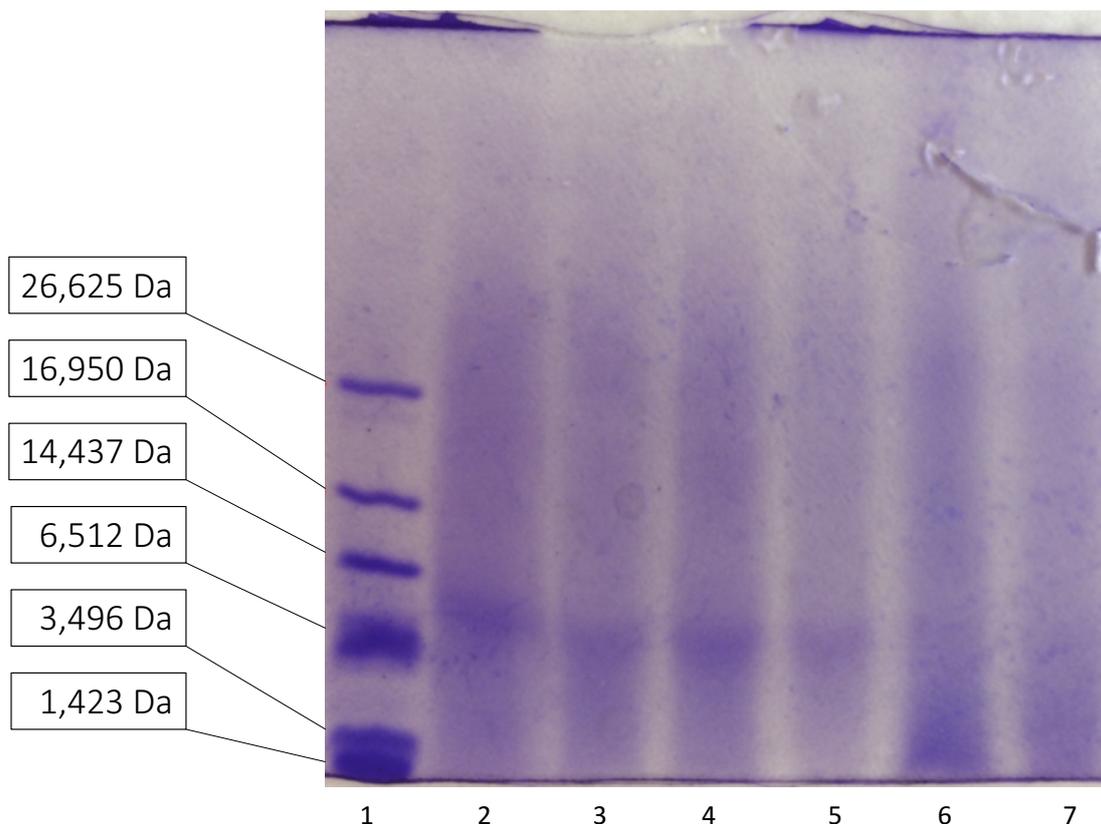
Si è ipotizzata un'erronea tempistica di colorazione e decolorazione come causa del rumore di fondo. Tuttavia aumentare il tempo di decolorazione non rimuoverebbe il CBB dalla sola matrice ma anche dalle bande proteiche.

Prima di abbandonare la metodica tradizionale del Coomassie Brilliant Blue per quella del Silver Staining, si ritiene opportuno provare con la metodica colloidale del CBB. Questa tecnica usa il colorante in forma di colloide, di dimensioni troppo elevate per entrare nel gel, e permette quindi di abbassare drasticamente il rumore di fondo, riuscendo ugualmente a colorare le proteine.

Questi gel hanno evidenziato una possibile gestione in impianto dei pesi molecolari solo per la reazione con enzima al 2% (v/w) (Fig. 34). L'analisi di questo gel, infatti, mostra come i

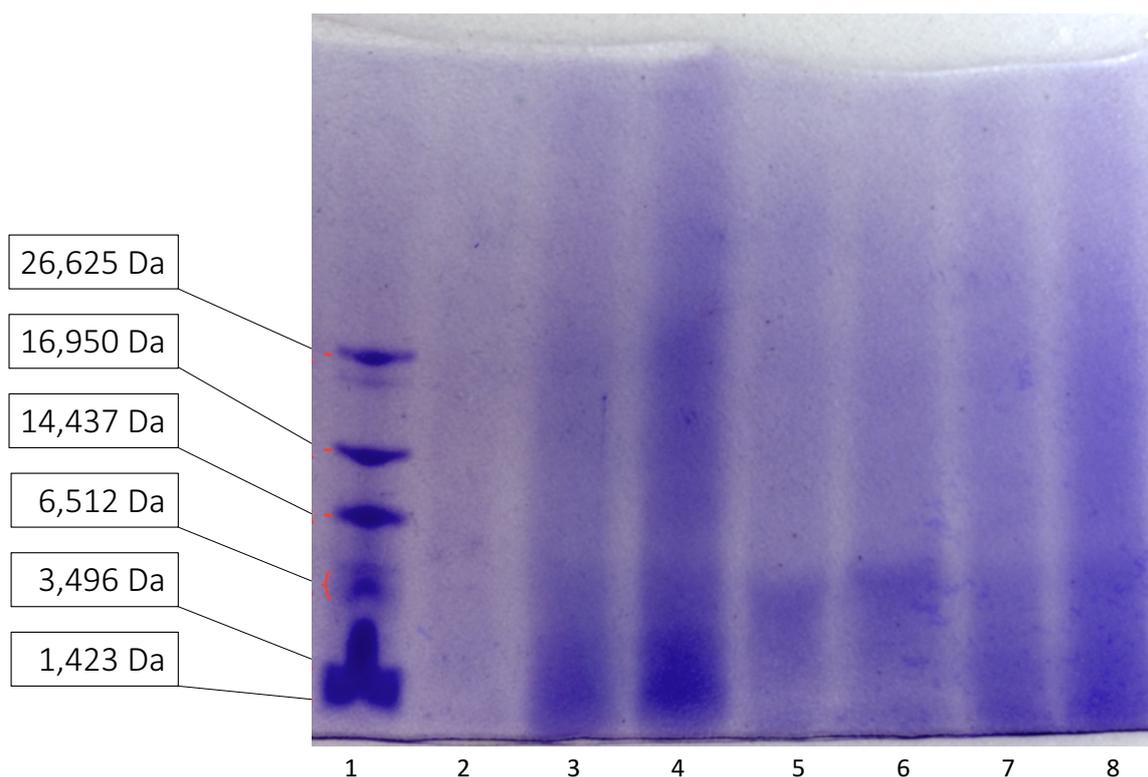
pesi molecolari siano pari a ca. 6,500 Da fino alle 24 h di reazione, per poi abbassarsi sotto ai 3,500 Da dopo 36 h di reazione.

Quando l'enzima è stato usato al 4% (v/w) invece, l'attività idrolitica è stata eccessiva (Fig. 35). Come visibile in gel, dopo solo 7h di reazione si ottengono MW inferiori ai 6,500 Da e pari a ca 3,500 Da. Questo gel tuttavia non è di facile e chiara interpretazione. Per conclusioni definitive verrà ripetuta la prova colorando il gel con CBB colloidale.



**Fig. 34** – Gel 12% di Tricina-SDS-PAGE per reazione con enzima al 2% (v/w).

Corsia 1: 18 µL standard BioRad; corsie 2, 4, 6: 50 µg campione dopo 7 h, 24 h e 36 h di reazione; corsie 3, 5, 7: 80 µg campione dopo 7 h, 24 h e 36 h di reazione.



**Fig. 35** – Gel 12% di Tricina-SDS-PAGE per reazione con enzima al 4% (v/w).

Corsia 1: 5 µL standard BioRad; corsia 2: vuota; corsie 3, 5, 7: 50 µg campione dopo 7 h, 24 h e 36 h di reazione; corsie 4, 6, 8: 80 µg campione dopo 7 h, 24 h e 36 h di reazione.

### 3.2 Idrolisi alcalina e idrolisi acida

L'idrolisi alcalina è stata la prima procedura provata in laboratorio per questo lavoro di tesi, scegliendo come metodologia una concentrazione di Sodio Idrossido pari a 0.25 M e una temperatura di 60°C per 2h.

Il risultato della reazione è stata un'elevata solubilizzazione del materiale dovuta ad un'intensa azione idrolitica che ha lasciato intatta solo la parte più resistente della piuma: il calamo e il rachide. Di conseguenza, si è cercato di ottimizzare il processo per ottenere più prodotto possibile.

Ci si è scontrati così con la grande problematica delle idrolisi alcaline o acide: l'elevato quantitativo di sali di neutralizzazione. Infatti, qualsiasi tipo di idrolisi si scelga, tra acida o alcalina, nel sito produttivo si dovrà comunque avere il corrispettivo reagente per neutralizzare e verranno prodotti molti sali. Di conseguenza il processo non si prospetta ecologicamente accettabile.

Molti degli impianti che svolgevano questo tipo di idrolisi hanno chiuso a favore dei processi enzimatici.

Al di là dell'aspetto ecologico, il vero motivo per cui tali siti produttivi hanno chiuso è economico. Come prima cosa, il contenuto di sali di neutralizzazione nel prodotto deve essere abbattuto. Poiché i metodi alcalini e acidi sono drastici, il prodotto è composto di di-, tri-peptidi e difficilmente frammenti maggiori. Questo significa pesi molecolari piccoli e confrontabili con quelli dei sali. In questo modo le purificazioni più economiche, le filtrazioni come l'ultrafiltrazione e la nanofiltrazione, devono essere scartate perché non capaci di discriminare le molecole nella miscela di reazione. Le tecniche cromatografiche possono essere più efficienti ma, applicate su larga scala aumentano il costo del processo portando il prodotto fuori mercato.

Un'altra problematica importante delle idrolisi acide o alcaline, che si riflette sempre sull'aspetto economico, è la bassa qualità del prodotto.

Entrambe le reazioni idrolitiche modificano la composizione amminoacidica originaria. L'idrolisi alcalina degrada la cistina, la serina e la treonina,<sup>39,40</sup>. La degradazione della cistina porta alla formazione di lantionina<sup>41</sup>.

L'idrolisi acida distrugge il triptofano, la metionina, la cistina e la cisteina. Inoltre la glutamina e l'asparagina sono convertiti nei rispettivi acidi<sup>42</sup>.

Queste modificazioni hanno un impatto negativo molto importante nel settore nutraceutico perché modificano in peggio il sapore del preparato peptidico.

Nel settore cosmetico invece, alterazioni random della composizione amminoacidica rendono difficile la definizione del prodotto, che non risulta più prettamente un idrolizzato cheratinico. In questo modo infatti, eventuali funzioni biologiche specifiche non sono più attribuibili agli amminoacidi della cheratina.

## Conclusioni e sviluppi futuri

Questo lavoro di tesi è partito dalla richiesta delle aziende di pollame di trovare un metodo di valorizzazione delle piume avicole.

Le ragioni delle richieste aziendali sono state analizzate studiando i limiti dei vecchi processi di lavorazione delle piume avicole, come il *rendering*.

Tutti gli aspetti regolatori sono stati valutati per definire i confini operativi.

Uno studio bibliografico è stato svolto al fine di identificare la composizione chimica delle piume avicole e della cheratina, che ne è la componente principale.

L'attuale ricerca scientifica guarda all'applicazione della cheratina in diversi ambiti: biomedicale, farmaceutico, cosmetico e tessile.

In questo lavoro sono stati identificati come prodotto di interesse gli idrolizzati proteici cheratinici da utilizzare nel settore cosmetico/dermocosmetico e tricologico.

La cheratina è una proteina insolubile in acqua e una delle metodiche estrattive in fase acquosa è proprio quella idrolitica. Le reazioni di idrolisi possono essere acide, alcaline o enzimatiche.

Uno studio della letteratura, unitamente al confronto con i principi della Green Chemistry (si veda Appendice), ci ha portato a scartare l'idrolisi acida e alcalina, anche in seguito a test di laboratorio.

L'estrazione idrolitica enzimatica è stata studiata nell'ottica di un processo industriale. Per questo motivo lo studio è stato diviso in due parti sviluppate ed eseguite contemporaneamente.

Il ramo analitico ha condotto all'individuazione di due parametri chiave: il peso molecolare dell'idrolizzato e la concentrazione peptidica durante la reazione. A tale scopo è stata sviluppata la metodica elettroforetica Tricina-SDS-PAGE, variante poco conosciuta e usata della classica Glicina-SDS-PAGE. Per quanto riguarda la concentrazione peptidica, una messa a punto del tampone di reazione ha consentito l'uso di una semplice analisi gravimetria, in sostituzione ai meno affidabili saggi colorimetrici solitamente impiegati.

Lo studio della reazione idrolitica ha definito le condizioni generali per condurre l'estrazione attraverso l'enzima a disposizione: la subtilisina. Sono state, quindi, eseguite due prove di reazione, portate a termine monitorando la variazione dei pesi molecolari e di concentrazione peptidica in funzione del tempo di idrolisi. Si ritiene che usare l'enzima al 2% v/w dia i

risultati migliori. Questo perché con un'unica reazione, gestendo il tempo di conduzione, si può ottenere un prodotto a peso molecolare differente.

Gli sviluppi futuri seguiranno questi studi intrapresi, al fine di trovare le condizioni ottimali di reazione attraverso le metodiche analitiche appositamente messe a punto.

Saranno programmati anche studi di efficacia del prodotto (idrolizzato di cheratina ottenuto per via enzimatica) al fine di valutarne una funzionalità biologica specifica per il settore cosmetico, dermocosmetico e tricologico.

## **Parte sperimentale**

### **4. Analisi dei pesi molecolari**

In riferimento al capitolo 2.1 della parte di Discussione.

#### **4.1 Kit Standard**

Fornitore: BioRad

Nome: "Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards".

Cat. n.: 161-0326

Il kit contiene le seguenti sei proteine, di cui è riportato il peso molecolare:

1. Triosephosphate isomerase: 26,625 Da
2. Myoglobin: 16,950 Da
3.  $\alpha$ -Lactalbumin: 14,437 Da
4. Aprotinin: 6,512 Da
5. Insulin b chain, oxidized: 3,496 Da
6. Bacitracin: 1,423 Da

Ogni proteina ha una concentrazione di circa 900  $\mu\text{g}$  e il tampone di conservazione contiene 40% glicerolo, 100 mM Tris-HCl, 4 mM EDTA, 3 mM  $\text{NaN}_3$  a pH 8.5. Volume finale della soluzione 200  $\mu\text{L}$ . Condizioni di stoccaggio: -20 °C.

Protocollo preparativo standard:

diluire gli standard 1:20 con il Sample Buffer, bollire a 95 °C per 5 min. Quando la soluzione è fredda, caricare a concentrazione di 5  $\mu\text{L}$ /pozzetto per i mini gel.

#### **4.2 Preparazione dei gel e prove di risoluzione**

Reagenti:

- Acrilammide/Bis-Acrilammide soluzione 30%, 29:1, 3.3% C (Serva Electrophoresis)
- Persolfato di ammonio (APS)

- Tetrametiletilendiammina (TEMED)
- Sodio Dodecil Solfato (SDS)
- 2-mercaptoetanololo
- Blu di Bromofenolo
- Glicerolo
- Etanolo
- Acido Acetico
- Coomassie Brilliant Blue G250
- Tricina
- Gluteraldeide 5% (v/v)
- Tris base
- HCl 37%

#### **4.2.1 Procedura generale:**

1. Preparare la soluzione di Ammonio Persolfato.
2. Polimerizzare il Separating Gel con la % T desiderata.
3. Polimerizzare lo Stacking Gel alla % T desiderata.
4. Aggiungere ai campioni e allo standard il Sample Buffer.
5. Inserire i gel nella cella di corsa.
6. Inserire il running buffer e verificare che non ci siano perdite.
7. Caricare i campioni e gli standard nei pozzetti.
8. Chiudere la cella e far partire la corsa a potenziale desiderato.
9. Al termine della corsa, spegnere l'alimentatore, e separare i gel dai supporti in vetro.
10. Procedere con il fixing, staining e destaining dei gel.

#### **4.2.2 Gel 1**

Specifiche:

- Separating gel buffer: 4x, 100 mL, pH 8.8. Si solubilizzano 18.2 g di Tris base in 70 mL H<sub>2</sub>O. Si arriva pH 8.8 con HCl 37% e infine si porta a 100 mL con H<sub>2</sub>O.
- Stacking gel buffer: 4x, 100 mL, pH 6.8. Si solubilizzano 6.1 g di Tris base in 70 mL H<sub>2</sub>O. Si arriva pH 6.8 con HCl 37% e infine si porta a 100 mL con H<sub>2</sub>O.
- APS Solution: 10% (w/v), solubilizzare 100 mg Ammonio Persolfato in 1 ml H<sub>2</sub>O.

- Separating Gel: 15% T, 3.3% C; 10 mL. In apparecchiatura BioRad mini gel casting si fanno polimerizzare i seguenti reagenti: 2.46 mL H<sub>2</sub>O, 2.50 mL separating gel buffer 4x, 0.1 mL SDS 10% (w/v), 5.00 mL soluzione Acrilammide/Bis-acrilammide, 0.015 mL TEMED, 0.03 mL APS 10% (w/v). Tempo polimerizzazione ca. 30 min.
- Stacking Gel: 5% T, 3.3%C, 10 mL. Sopra il Separating Gel si fanno polimerizzare i seguenti reagenti: 5.79 mL H<sub>2</sub>O, 2.50 mL Stacking gel buffer 4x, 0.10 mL SDS 10% (w/v), 1.67 mL soluzione Acrilammide/Bis-acrilammide, 0.015 mL TEMED, 0.03 mL APS 10% (w/v). Tempo di polimerizzazione ca. 40 min.
- Sample Buffer: 2x, pH 6.8, 10 mL. In falcon 15 mL si aggiungono nell'ordine: 2.5 mL stacking gel buffer 4x, 0.5 mL β-mercaptoetanolo, 1.0 mg blu di bromofenolo, 0.7 mL H<sub>2</sub>O, 2.89 g glicerolo e 4.0 mL SDS 10% (v/w). Si mescola la soluzione capovolgendo numerose volte la falcon, si aliquota in quantitativi di 1.5 mL in Eppendorf 2 mL e si conserva a -20 °C. Prima dell'uso si aspetta che la soluzione torni a temperatura ambiente e la si agita capovolgendola per uniformare in glicerolo.
- Cathode Running Buffer: 1x, 500 mL. Si solubilizzano in 400 mL H<sub>2</sub>O, 6.06 g Tris base, 8.96 g Tricina, 0.5 g SDS. Si arriva a 500 mL con la mancante H<sub>2</sub>O. Il pH della soluzione non deve essere aggiustato e dovrebbe risultare pH 8.25.
- Anode Running Buffer: 1x, 500 mL. Si solubilizzano 12.1 g di Tris base in 400 mL di H<sub>2</sub>O, si arriva a pH 8.9 con HCl 37% e si porta a volume H<sub>2</sub>O.
- Condizioni di corsa: 30 min a 80 V poi 1 ora a 120 V.
- Fixing e Staining Solution: il fissaggio e la colorazione sono avvenute con un'unica soluzione contenente 40% Etanolo, 10% Acido Acetico, 0,1% Coomassie Brilliant Blue G250 e rimanente H<sub>2</sub>O. Tempo di trattamento: 2 h.
- Destaining Solution: 40% Etanolo, 10% Acido acetico e rimanente H<sub>2</sub>O. Tempo di trattamento: 1 h. Successivo destaining per rimozione del background è avvenuto mettendo il gel in 100% H<sub>2</sub>O over night temperatura ambiente.

### 4.2.3 Gel 2

#### Specifiche:

- Sono state usate le stesse condizioni del Gel n. 1 eccezion fatta per il Sample Buffer.
- Sample Buffer: 5x; pH 6.8, 10 mL. In falcon 15 mL si aggiungono nell'ordine: 5 mL stacking gel buffer 4x, 0.350 mL β-mercaptoetanolo, 10.0 mg blu di bromofenolo, 5.86 g glicerolo e 1 g SDS. Si mescola la soluzione capovolgendo numerose volte la

falcon, si aliquota in quantitativi di 1.5 mL in Eppendorf 2 mL e si conserva a -20 °C. Prima dell'uso si aspetta che la soluzione torni a temperatura ambiente e la si agita capovolgendola per uniformare in glicerolo.

#### 4.2.4 Gel 3

Specifiche:

- Gel Buffer (unico sia per separating gel sia per stacking gel): 1x, 100 mL, 2.5 M Tris-HCl, pH 8.8. Solubilizzare 30.285 g Tris base in 60 mL H<sub>2</sub>O, portare a pH 8.8 con HCl 37% e arrivare a 100 mL H<sub>2</sub>O.
- APS solution: dissolvere 30 mg Ammonio Persolfato in 1 mL H<sub>2</sub>O. Soluzione da preparare fresca ogni volta.
- Separating Gel: 10% T; 3.3% C, 10 mL. In apparecchiatura BioRad mini gel casting si fanno polimerizzare i seguenti reagenti: 0.90 mL H<sub>2</sub>O, 5.6 mL separating gel buffer 4x, 3.33 mL soluzione Acrilammide/Bis-acrilammide, 6.0 µL TEMED, 150 µL APS solution. Tempo polimerizzazione ca. 30 min
- Stacking Gel: 4% T, 3.3% C, 5 mL. Sopra il Separating Gel si fanno polimerizzare i seguenti reagenti: 3.42 mL H<sub>2</sub>O, 760 µL Stacking gel buffer 4x, 660 µL soluzione Acrilammide/Bis-acrilammide, 5.0 µL TEMED, 150 µL APS Solution. Tempo di polimerizzazione ca. 40 min.
- Sample Buffer: 4x, pH 6.8. Composto da 200 mM Tris-HCl, 2% (w/v) SDS, 8% (v/v) 2-mercaptoetanolo, 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 (CCB) e 48% (w/v) glicerolo. Se si vogliono preparare 10 mL, in una Falcon da 15 mL si mettono: 4.8 g glicerolo, 0.2 g SDS, 0.8 g 2-mercaptoetanolo e 0.01 g di CCB. Poi in un beaker a parte si solubilizzano 6.057 g Tris base in 25 mL H<sub>2</sub>O e si arriva a pH 6.8 con HCl 37%, quindi si portano a 50 mL con H<sub>2</sub>O. Questa soluzione risulta ora 1 M Tris-HCl pH 6.8. Se ne prendono 2 mL e si mettono in Falcon 15 mL con gli altri componenti. Si mescola capovolgendo la Falcon più volte in modo da omogeneizzare il glicerolo e fare meno schiuma possibile con SDS, quindi si arriva a 10 mL con H<sub>2</sub>O. La preparazione è terminata e il sample buffer deve essere aliquotato e conservato a -20 °C.
- Running buffer (uguale per catodo e anodo): 1x, 1L. Composto da 25 mM Tris base, 25 mM Tricina e 0.05 % (w/v) SDS. Preparare solubilizzando 3.03 g di Tris base, 4.5

g di Tricina e 0.5 g SDS in 1 L di H<sub>2</sub>O. Non è necessario aggiustare il pH. Conservare in frigorifero tra 4 °- 8 °C.

- Condizioni di cella: 125 V costante per 2.15 h.
- Fixing, Staining e Destaining Solution: come Gel n. 1

#### **4.2.5 Gel 4**

Specifiche:

- Gel Buffer: uguale Gel n. 3.
- APS solution: uguale Gel n.3.
- Separating Gel: 12% T; 3.3% C, 10 mL. In apparecchiatura BioRad mini gel casting si fanno polimerizzare i seguenti reagenti: 0.89 mL H<sub>2</sub>O, 5.0 mL Separating gel Buffer 4x, 4.00 mL Acrylamide/Bis Solution, 6.0 µL TEMED, 100 µL APS solution. Tempo polimerizzazione ca. 30 min
- Stacking Gel: uguale Gel n. 3.
- Sample Buffer: uguale Gel n. 3.
- Running buffer: uguale Gel n. 3.
- Condizioni di cella: 125 V costante per 2.05 h.
- Fixing solution: 50 mL soluzione acquosa glutaraldeide 5% (v/v). Tempo trattamento sotto agitazione: 25 min.
- Staining solution: 0.030 g CBB G250 in 100 mL soluzione acquosa con 10 % (v/v) Acido acetico. Colorazione sotto agitazione per 30 min.
- Destaining solution: 100 mL soluzione acquosa con 10% (v/v) Acido acetico. Decolorazione sotto agitazione per 50 min.

#### **4.2.6 Gel 5 (Silver Staining)**

Reagenti:

- Acido acetico
- Etanolo
- Formaldeide 35% wt in H<sub>2</sub>O
- Sodio Tiosolfato
- Argento Nitrato

- Sodio Carbonato

#### Specifiche:

- Fixing solution: 40% etanolo, 10% acido acetico e 50% H<sub>2</sub>O.
- Sensitizer: soluzione acquosa 0.02% Sodio Tiosolfato. Solubilizzare 0.04 g Sodio Tiosolfato in 200 mL H<sub>2</sub>O.
- Staining solution: soluzione acquosa 0.1% Argento Nitrato, 0.02% Formaldeide. Solubilizzare 0.2 g AgNO<sub>3</sub> in 200 mL H<sub>2</sub>O e aggiungerci, immediatamente prima dell'uso, 40 µL di formaldeide stock 35%.
- Developing solution: soluzione acquosa 3% sodio carbonato, 0.05% formaldeide. Solubilizzare 7.5 g di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 250 mL H<sub>2</sub>O e aggiungerci 125 µL di formaldeide stock 35%.
- Stop solution: soluzione acquosa 5% acido acetico.

#### Procedura:

1. Immergere il gel in Fixing solution per 1 h, in agitazione.
2. Lavare con H<sub>2</sub>O per almeno 30 min (maggiore è il tempo di lavaggio, minore sarà il rumore di fondo).
3. Immergere il gel nel Sensitizer per non più di 1 min.
4. Lavare con H<sub>2</sub>O 3x 20 sec.
5. Immergere il gel nella Staining solution per 20 min, in agitazione e al buio.
6. Ripetere punto 4.
7. Cambiare contenitore e lavare con H<sub>2</sub>O per 1 min.
8. Immergere il gel nella Developing solution, in agitazione e al buio. Ogni volta che la soluzione diventa gialla, cambiarla.
9. Ripetere punto 4.
10. Bloccare la colorazione immergendo il gel nella Stop solution per 5 min in agitazione.

## 5. Estrazioni idrolitiche enzimatiche

Reagenti:

- subtilisina
- Ammonio bicarbonato
- Ammonio idrossido
- Piume

### 5.1 Purificazione della subtilisina

In un filtro Centricon con MWCO di 10,000 Da in cellulosa rigenerata sono stati inseriti 0.5 mL di subtilisina prelevata direttamente dal lotto Brenntag. Dopo centrifugazione per 15 min a 14,000 rpm a temperatura ambiente si rimuove il permeato e si ripristina il volume iniziale con H<sub>2</sub>O milliQ. Questi passaggi vengono ripetuti per 3 volte.

Al primo giro in centrifuga il permeato è risultato pari a 0.3 mL, quindi il primo ripristino del volume a 0.5 mL abbatte più della metà gli eventuali soluti indesiderati. Al secondo e al terzo giro il permeato è risultato, entrambe le volte, 0.4 mL. In questo modo la concentrazione finale dei soluti, ma non di subtilisina, è minore di 1/62 di quella iniziale.

### 5.2 Procedura di reazione

Alcuni passaggi sono stati omessi per accordo di riservatezza con Kerline S.r.l.

In una falcon da 50 mL si pesa 1g di piuma in 45 mL di H<sub>2</sub>O milliQ. Il pH è tamponato a 9.25 usando ammonio carbonato 25 mM, ottenuto alzando il pH dell'ammonio bicarbonato con ammonio idrossido concentrato. Si aggiunge l'enzima al 2% (volume/ peso piuma), quindi 20 µL. Si avvia la reazione mediante incubazione a 37 °C sotto agitazione orizzontale di tutta la falcon tramite Shaker.

Si effettuano campionamenti di 1.5 mL ogni 3, 7, 24 e 36 ore. Ogni campione è centrifugato e filtrato in filtro da siringa Millex Millipore (membrana da 0,45 µm) per rimuovere il solido. Infine, 1 mL di campione viene posto in un contenitore tarato e posto per almeno 2 giorni in essiccatore e si congela. Si effettua la liofilizzazione e si pesa.

Il solido viene conservato a -20 °C per la successiva analisi elettroforetica.

Si ripete la stessa procedura ma aggiungendo il doppio di enzima: 4% (v/w).

## Appendice

### Green Chemistry

La “Chimica Verde” è fondata sul design.

Il design è un processo che non può essere fatto casualmente, ma richiede l'intenzione intellettuale.

In questo senso, la “Chimica Verde” è definita come l'operazione di design che porta a prodotti e processi chimici che diminuiscono o riducono l'uso e la generazione di sostanze pericolose.

Nel 1998, Paul Anastas e John Warner introdussero i dodici principi della Chimica Verde.

Questi principi fungono da cornice per ogni momento del design di un prodotto o un processo chimico: dalla scelta delle materie prime, passando per i reagenti usati, fino ad arrivare alla biodegradabilità del prodotto finito.

In Fig. 36 si riportano i dodici principi della Chimica Verde così come riportati da Paul Anastas in un suo recente articolo <sup>43</sup>.

- 
1. **Prevention.** It is better to prevent waste than to treat or clean up waste after it is formed.
  2. **Atom Economy.** Synthetic methods should be designed to maximize the incorporation of all materials used in the process into the final product.
  3. **Less Hazardous Chemical Synthesis.** Whenever practicable, synthetic methodologies should be designed to use and generate substances that pose little or no toxicity to human health and the environment.
  4. **Designing Safer Chemicals.** Chemical products should be designed to preserve efficacy of the function while reducing toxicity.
  5. **Safer Solvents and Auxiliaries.** The use of auxiliary substances (e.g. solvents, separation agents, etc.) should be made unnecessary whenever possible and, when used, innocuous.
  6. **Design for Energy Efficiency.** Energy requirements of chemical processes should be recognized for their environmental and economic impacts and should be minimized. If possible, synthetic methods should be conducted at ambient temperature and pressure.
  7. **Use of Renewable Feedstocks.** A raw material or feedstock should be renewable rather than depleting whenever technically and economically practicable.
  8. **Reduce Derivatives.** Unnecessary derivatization (use of blocking groups, protection/ deprotection, temporary modification of physical/chemical processes) should be minimized or avoided if possible, because such steps require additional reagents and can generate waste.
  9. **Catalysis.** Catalytic reagents (as selective as possible) are superior to stoichiometric reagents.
  10. **Design for Degradation.** Chemical products should be designed so that at the end of their function they break down into innocuous degradation products and do not persist in the environment.
  11. **Real-Time Analysis for Pollution Prevention.** Analytical methodologies need to be further developed to allow for real-time, in-process monitoring and control prior to the formation of hazardous substances.
  12. **Inherently Safer Chemistry for Accident Prevention.** Substances and the form of a substance used in a chemical process should be chosen to minimize the potential for chemical accidents, including releases, explosions, and fires.
- 

**Fig. 36** – I dodici principi della Chimica Verde <sup>43</sup>.

## Riferimenti Bibliografici

- (1) AVEC. Annual Report <http://www.avec-poultry.eu/wp-content/uploads/2018/04/AVEC-2017-BAT.pdf> (accessed Sep 10, 2018).
- (2) CE. *Regolamento (CE) n. 1069/2009 del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 21/10/2009, recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale e ai prodotti derivati non destinati al consumo umano e che abroga il regolamento (CE) n. 1774/2002 (regolamento sui sottoprodotti di origine animale)*; 2009.
- (3) CE. *Regolamento (UE) n. 142/2011 della Commissione, del 25 febbraio 2011, recante disposizioni di applicazione del regolamento (CE) n. 1069/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale e ai prodotti derivati non destinati al consumo umano, e della direttiva 97/78/CE del Consiglio per quanto riguarda taluni campioni e articoli non sottoposti a controlli veterinari alla frontiera*; 2011.
- (4) Salminen, E.; Rintala, J. Anaerobic Digestion of Organic Solid Poultry Slaughterhouse Waste – a Review. *Bioresour. Technol.* **2002**, *83* (1), 13–26.
- (5) Shareefdeen, Z.; Herner, B.; Webb, D.; Verhaeghe, L.; Wilson, S. An Odor Predictive Model for Rendering Applications. *Chem. Eng. J.* **2005**, *113* (2–3), 215–220.
- (6) Gwyther, C. L.; Williams, A. P.; Golyshin, P. N.; Edwards-Jones, G.; Jones, D. L. The Environmental and Biosecurity Characteristics of Livestock Carcass Disposal Methods: A Review. *Waste Manag.* **2011**, *31* (4), 767–778.
- (7) European Food Safety Authority. Encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE) <https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/transmissible-spongiform-encephalopathies-tses> (accessed Sep 10, 2018).
- (8) Woodgate, S. L. Rendering Systems and BSE Agent Deactivation. *Livest. Prod. Sci.* **1994**, *38* (1), 47–50.
- (9) Shirley, R. B.; Parsons, C. M. Effect of Pressure Processing on Amino Acid Digestibility of Meat and Bone Meal for Poultry. *Poult. Sci.* **2000**, *79* (12), 1775–1781.
- (10) Fink-Gremmels, J. *Animal Feed Contamination*; Woodhead Publishing Limited, 2012.
- (11) Compound Interest. Compound Interest Infographics <http://www.compoundchem.com> (accessed Jul 13, 2018).
- (12) Copeland, R. A. *Methods for Protein Analysis*; Springer US: Boston, MA, 1994.

- (13) Schroeder, W. A.; Kay, L. M.; Lewis, B.; Munger, N. The Amino Acid Composition of Certain Morphologically Distinct Parts of White Turkey Feathers, and of Goose Feather Barbs and Goose Down. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77* (14), 3901–3908.
- (14) MacArthur, M. W.; Thornton, J. M. Influence of Proline Residues on Protein Conformation. *J. Mol. Biol.* **1991**, *218* (2), 397–412.
- (15) Fraser, R. D. B.; Parry, D. A. D. Molecular Packing in the Feather Keratin Filament. *J. Struct. Biol.* **2008**, *162* (1), 1–13.
- (16) Mokrejs, P.; Hutta, M.; Pavlackova, J.; Egner, P.; Benicek, L. The Cosmetic and Dermatological Potential of Keratin Hydrolysate. *J. Cosmet. Dermatol.* **2017**, *16* (4), e21–e27.
- (17) Villa, A. L. V.; Aragão, M. R. S.; dos Santos, E. P.; Mazotto, A. M.; Zingali, R. B.; de Souza, E. P.; Vermelho, A. B. Feather Keratin Hydrolysates Obtained from Microbial Keratinases: Effect on Hair Fiber. *BMC Biotechnol.* **2013**, *13* (1), 15.
- (18) Fakhfakh, N.; Ktari, N.; Haddar, A.; Mnif, I. H.; Dahmen, I.; Nasri, M. Total Solubilisation of the Chicken Feathers by Fermentation with a Keratinolytic Bacterium, *Bacillus Pumilus* A1, and the Production of Protein Hydrolysate with High Antioxidative Activity. *Process Biochem.* **2011**, *46* (9), 1731–1737.
- (19) Fontoura, R.; Daroit, D. J.; Correa, A. P. F.; Meira, S. M. M.; Mosquera, M.; Brandelli, A. Production of Feather Hydrolysates with Antioxidant, Angiotensin-I Converting Enzyme- and Dipeptidyl Peptidase-IV-Inhibitory Activities. *New Biotechnol.* **2014**, *31* (5), 506–513.
- (20) Pasupuleti, V. K.; Braun, S. State of the Art Manufacturing of Protein Hydrolysates. In *Protein Hydrolysates in Biotechnology*; Pasupuleti, V. K., Demain, A. L., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2008; pp 11–32.
- (21) Kuzuhara, A.; Hori, T. Reduction Mechanism Of L-Cysteine on Keratin Fibers Using Microspectrophotometry and Raman Spectroscopy. *Biopolymers* **2005**, *79* (6), 324–334.
- (22) Ghosh, A. G.; Collie, S. C. Keratinous Materials as Novel Absorbent Systems for Toxic Pollutants. *Def. Sci. J.* **2014**, *64* (3), 209–221.
- (23) Ellen MacArthur Foundation. Ellen MacArthur Foundation website. <https://www.ellenmacarthurfoundation.org> (accessed Jul 17, 2018).
- (24) Nasri, M. Protein Hydrolysates and Biopeptides. In *Advances in Food and Nutrition Research*; Elsevier, 2017; Vol. 81, pp 109–159.

- (25) Church, F. C.; Swaisgood, H. E.; Porter, D. H.; Catignani, G. L. Spectrophotometric Assay Using O-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. *J. Dairy Sci.* **1983**, *66* (6), 1219–1227.
- (26) Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680.
- (27) Hjertén, S.; Mosbach, R. “Molecular-Sieve” Chromatography of Proteins on Column of Cross-Linked Polyacrylamide. *Anal. Biochem.* **1962**, *3*, 109–118.
- (28) Hames, B. D. *Gel Electrophoresis of Proteins. A Practical Approach.*, Third edition.; The practical approach series; Oxford University Press, 1998.
- (29) Strachota, B.; Matějka, L.; Zhigunov, A.; Konefał, R.; Spěváček, J.; Dybal, J.; Puffr, R. Poly(N-Isopropylacrylamide)–Clay Based Hydrogels Controlled by the Initiating Conditions: Evolution of Structure and Gel Formation. *Soft Matter* **2015**, *11* (48), 9291–9306.
- (30) Schägger, H.; von Jagow, G. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 KDa. *Anal. Biochem.* **1987**, *166* (2), 368–379.
- (31) Schägger, H. Tricine–SDS–PAGE. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (1), 16–22.
- (32) Haider, S. R.; Reid, H. J.; Sharp, B. L. Modification of Tricine–SDS–PAGE for Online and Offline Analysis of Phosphoproteins by ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397* (2), 655–664.
- (33) Georgiou, C. D.; Grintzalis, K.; Zervoudakis, G.; Papapostolou, I. Mechanism of Coomassie Brilliant Blue G-250 Binding to Proteins: A Hydrophobic Assay for Nanogram Quantities of Proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391* (1), 391–403.
- (34) Smejkal, G. B. The Coomassie Chronicles: Past, Present and Future Perspectives in Polyacrylamide Gel Staining. *Expert Rev. Proteomics* **2004**, *1* (4), 381–387.
- (35) Alphalyse. Protocol for Silver Staining of Gels <https://www.alphalyse.com/wp-content/uploads/2015/09/Silver-staining-protocol.pdf> (accessed Sep 10, 2018).
- (36) Heukeshoven, J.; Dernick, R. Simplified Method for Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels and the Mechanism of Silver Staining. *Electrophoresis* **1985**, *6* (3), 103–112.
- (37) Merrill, C. R.; Bisher, M. E.; Harrington, M.; Steven, A. C. Coloration of Silver-Stained Protein Bands in Polyacrylamide Gels Is Caused by Light Scattering from Silver Grains of Characteristic Sizes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, *85* (2), 453–457.
- (38) Novozymes. Proteases for Biocatalysis. No. 2014-12715-04. Novozymes June 2016.

- (39) Coward-Kelly, G.; Chang, V. S.; Agbogbo, F. K.; Holtzapple, M. T. Lime Treatment of Keratinous Materials for the Generation of Highly Digestible Animal Feed: 1. Chicken Feathers. *Bioresour. Technol.* **2006**, *97* (11), 1337–1343.
- (40) Nagai, Y.; Nishikawa, T. Alkali Solubilization of Chicken Feather Keratin. *Agric. Biol. Chem.* **1970**, *34* (1), 16–22.
- (41) Blackburn, S.; Lee, G. R. The Reaction of Wool Keratin with Alkali. *Biochim. Biophys. Acta* **1956**, *19*, 505–512.
- (42) *Protein Hydrolysates in Biotechnology*; Pasupuleti, V. K., Demain, A. L., Eds.; Springer: Dordrecht; New York, 2010.
- (43) Anastas, P.; Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem Soc Rev* **2010**, *39* (1), 301–312.

## **Ringraziamenti**

Il primo ringraziamento va alla Prof.ssa Elisabetta Salatelli, senza la quale non avrei mai incominciato questo lavoro.

Un sentito ringraziamento all'azienda Kerline S.r.l. per avermi consentito di svolgere questa tesi industriale e in particolar modo ai Dott. Alberto Del Rio, Greta Varchi, Giovanna Sotgiu, Annalisa Aluigi per avermi preso nel team e per la tenacia che hanno in questo progetto industriale.

Ringrazio la Dott.ssa Alessandra Stefan e il Prof. Alejandro Hochkoeppler per avermi ospitato nel loro laboratorio senza alcun interesse se non per spirito filantropico. Senza la loro conoscenza non mi sarebbe stato possibile sviluppare l'analisi elettroforetica.

Quindi ringrazio la Dott.ssa Anna Sagnella e il Dott. Gianpiero Landolfi per l'aiuto che mi hanno dato nella progettazione e nella pratica di molti esperimenti. Loro più di tutti hanno seguito da vicino gli alti e i bassi che ci sono stati in laboratorio.

Per finire ringrazio Elisabetta Mannoni, Cecilia Martini, Claudia Ferroni e Tamara Posati del CNR-ISOF di Bologna.

