

Vágóhídi hulladék toll biodegradációjának vizsgálata Bradford-módszerrel

Mézes Lili – Molnár Szabolcs

Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar,
Víz- és Környezetgazdálkodási Intézet, Debrecen
mezes@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A baromfi feldolgozóipar egyik legnagyobb mennyiségben keletkező mellékterméke a nedves, mintegy 50–70% víztartalmú toll, mely konfekcionált termék előállítására, illetve díszítési célokra nem alkalmas. Ez több millió tonnát jelent évente világszerte (Williams et al., 1991; Hegedűs et al., 1998). A tollban található keratin fehérje nehezen feltárható, így további hasznosítása előtt fizikai, kémiai és/vagy biológiai előkezelést szükséges alkalmazni, melynek a hasznosítás módjához kell igazodnia. A toll mikrobiális illetve enzimátikus úton való lebontása oldható fehérjékre és aminosavakra nagyon kedvező és viszonylag olcsó lehetőséget kínál értékes termékek előállítására a keletkező tollból. Kutatásunk célja az volt, hogy meghatározzuk azt a költségkímélő és egyszerű módszert, mellyel a vágóhídról származó baromfi toll mikrobiológiai bontásának hatékonyságát nyomon követhetjük.

Kulcsszavak: baromfi toll, biológiai bontás, keratin, keratináz

SUMMARY

The 15–20% of the by-products of meat- and poultry industry – that unsuitable for human consumption – contains keratin. The slaughter technology of poultry produces large amount of poultry feather with 50–70% moisture content. This means more million tons annually worldwide (Williams et al., 1991; Hegedűs et al., 1998). The keratin content of feather can be difficultly digested, so physical, chemical and/or biological pre-treatment is needed in practice, which has to be set according to the utilization method. The microbiological and enzymatic degradation of feather to soluble protein and amino acids is a very favourable and relatively cheap opportunity to produce valuable products of the resulting feather. Our applied treatments were based on the determination of the most effective method, which is able to follow the biodegradation of waste poultry feather.

Keywords: poultry feather, biodegradation, keratin, keratinase

BEVEZETÉS

A brojlércsirke vágási termékei közül az emberi fogyasztásra alkalmas hányad 60–70%. A baromfi feldolgozóipar egyik legnagyobb mennyiségben keletkező mellékterméke a nedves, mintegy 50–70% víztartalmú toll, mely konfekcionált termék előállítására, illetve díszítési célokra nem alkalmas. Több millió tonnát tesz ki évente világszerte (Williams et al., 1991; Hegedűs et al., 1998). A toll fehérje, az úgynevezett keratin oldhatatlan, magas szerkezeti stabilitással rendelkezik és nagy a fehérjebontó mikrobákkal szembeni ellenálló-képessége a diszulfid-, a hidrogén-, a kristály- és más keresztkötések miatt (Kunert, 1973; Kaluzewska et al., 1991). Nehezen feltárható az olyan enzimek számára, mint a tripszin, pepszin és papain (Letourneau et al., 1998). Degradációjához speciális fehérjebontó (keratinbontó) mikroorganizmusokra van szükség (Elődi, 1980; Cohlberg, 1993; Steinert, 1993; Onifade et al., 1998). Ez az oka annak, hogy a tollhulladékok kezelése és ártalmatlanítása nehézségekbe ütközik. Fizikai, kémiai és/vagy biológiai feltárásuk szükséges, melyek során felbomlanak a keratin feltárhatóságát akadályozó cisztein-kötések (Hegedűs et al., 1998; Perei et al., 2004; Bíró et al., 2008). Magyarországon régen toll-lisztet gyártottak belőle, melyet takarmányozási célra használtak fel. A módosított egészségügyi jogszabályok (1576/2007/EK rendeletre módosított 1774/2002/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet) ezt már nem teszik lehetővé, lerakása hulladéklerakó telepen nem engedélyezett, tehát szükség

van olyan innovatív fejlesztésekre, módszerek kidolgozására, melyek lehetővé teszik alternatív hasznosítását (biogáz előállítás, komposztálás, talajjavító anyag).

A toll mikrobiális illetve enzimátikus úton való lebontása oldható fehérjékre és aminosavakra nagyon kedvező és viszonylag olcsó lehetőséget kínál értékes termékek előállítására a keletkező tollból (Williams et al., 1990; Shih, 1993). Kutatási eredmények a közel-múltban bebizonyították, hogy a madarak tollán lévő baktériumok közül néhány képes a keratint feltárni, így a tollat gyorsan lebontani laboratóriumi körülmények között (Lucas et al., 2005). A tollbontó baktériumok képesek a béta-keratin lebontására (Onifade et al., 1998; Lucas et al., 2003; Gunderson et al., 2009). Kao és Lai (1995) a Gram-pozitív, pálcika formájú, endospóras *Bacillus spp.*-t a toll a talajban található leghatékonyabb keratinbontójaként azonosították. Fakhfakh et al. (2012) tanulmányukban a *Bacillus pumilis* A1 törzs által termelt toll fehérje hidrolizátumról írtak, melyet egy helyi vágóhíd által szennyezett vízben izoláltak. A legtöbb tanulmány a Bacillusok törzsére fókuszál, még specifikusabban a *Bacillus licheniformis*-ra, így többek között Williams et al. (1990) is, akik a tollbontó *Bacillus licheniformis* PWD-1-t izolálták baromfi vágóhídi hulladék aerob kivonatból. Wang és Shih (1999) vizsgálták keratináz-termelő képességét, míg más kutatók biotechnológiai módszerrel állították elő a beta-keratin bontásának fokozása érdekében (Lin et al., 1995). Magyarországon Kovács et al. (2002) és Perei et al. (2004) folytattak kísérleteket *Bacillus licheniformis*-sal, az általuk a természetből elkülönített baktéri-

um (*Bacillus licheniformis* KK1) extracelluláris proteázt termel, és enzimátikus képessége révén teljesen elbontja a szőrt és a tollat.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A baromfi toll főbb minőségi paramétereinek vizsgálata

A vágóhídról származó nedves baromfi toll előkezelésének első lépéseként a tollat Raypa típusú mikroprocesszor-vezérelt szárítós és elő-vákuumos sterilizáló autoklávban gőzzel (115 °C), túlnyomáson (1,5–2,5 atm) sterilizáltuk.

A felhasznált vágóhídi baromfi toll szén- és nitrogén-tartalmát elemeztük. A tollminta szárítása 80 °C-on 8 h időtartamig szárítószekrényben történt. A minták száraz- és szervesanyag-tartalmát az MSZ 318-3:1979 és MSZ 318-3:1979 alapján határoztuk meg. A toll szén- és nitrogén-tartalmát a Bátortrade Kft. központi laboratóriumában Elementar VARIO EL® univerzális analizátor segítségével határozták meg.

Alkalmazott baktériumtörzs jellemzése, fenntartása

Vizsgálataink során a *Bacillus licheniformis* KK1 baktérium törzset alkalmaztuk (Kovács et al., 2002; Perei et al., 2004). A *Bacillus licheniformis* Pesti (2001) szerint valódi baktériumok családjába tartozik (*Eubacteria*), ezen belül a Gram-pozitív baktériumok (*Firmicutes*) divíziójába, és a *Bacilli* osztályba sorolható. A keratinbontó *Bacillus licheniformis* KK1-es törzse aerob, endospórás, pálcika formájú baktérium, melynek pH-igénye semleges, hőmérséklet igénye 30–50 °C között, optimuma 42 °C-on van (Bálint et al., 2005; Bagi, 2006). Peptid antibiotikumot termel. Tárolhatósága +4 °C-on folyékony táptalajon 1–2 hét, táplemezen 0,5–1 év. A baktérium toleráns a környezeti, biogén feltételekkel szemben (Bagi, 2006).

LB táptalajt használtunk fel a baktérium fenntartására, melynek összetétele (g/L): pepton, 10; élesztő kivonat, 5; és NaCl, 5 (Miller, 1972). A folyékony LB táptalaj kémhatásának beállítása pH 7,5-re Tris-HCl-dal történt. A pH beállításához HANNA HI2550 típusú multifunkcionális pH/ORP/hőmérséklet/EC/TDS/NaCl mérőműszert (mérésáhtár: 0–14 pH ± 0,01; -20 ± 120 °C ± 0,4) használtunk. Az autoklávozást követően valósult meg az inkubáció 42 °C-on 200 rpm rázatással Heidolph Unimax 1010 típusú inkubátoros rázógépbén. A sejtszámlálás Bürker kamrában történt Alpha BIO-3CCD fénymikroszkóp alatt. A baktériumok sejtszámra 91×10^6 sejt/ml volt. A vizsgálatokhoz szükséges $4\text{--}5 \times 10^6$ sejt/ml sejtszámú oltóanyagot hígítással (steril desztillált víz) állítottuk elő ($4,55 \times 10^6$ sejt/ml).

Keratin aktivitás mérése folyékony táptalajon

A folyékony táptalajokban a toll: víz elegy oltása után a hidrolízis hatékonyságának meghatározása volt a cél, mely az oldott fehérje-tartalom változás monitorozása alapján valósult meg Bradford-módszerrel (1976). Az alkalmazott folyékony táptalajok összetétele az 1. táblázatban látható.

1. táblázat

Alkalmazott folyékony táptalajok összetétele

A – Fakfakh et al. (2012) (1 l)	(g/l)
KH ₂ PO ₄	0,5
K ₂ HPO ₄	0,5
NaCl	2,0
KCl	0,1
MgSO ₄ (7 H ₂ O)	0,1
B – Okoroma et al. (2012) (1 l)	(g/l)
KH ₂ PO ₄	0,7
K ₂ HPO ₄	1,4
NaCl	0,5
MgSO ₄ (7 H ₂ O)	0,1

Table 1: Composition of applied liquid medium

A táptalaj feltöltése 1 literre steril desztillált vízzel, a pH beállítása Tris-HCl pufferrel történt (pH 7,5). A folyékony táptalajokból 200 ml 500 ml-es lombikba öntése után 2 g egész baromfi toll került elhelyezésre, majd $4,55 \times 10^6$ sejt/ml sejtszámú *Bacillus licheniformis* KK1 törzssel történt az oltás. Az inkubáció 42 °C-on 200 rpm rázatással Heidolph Unimax 1010 típusú inkubátoros rázógépbén valósult meg. A tápoldat optikai denzitását (OD) Secomam gyártmányú Athelie Junior típusú spektrofotométerrel, 595 nm-en vizsgáltuk.

Fehérje-koncentráció meghatározása Bradford-módszerrel folyékony táptalajból

Az eljárás a Coomassie Brilliant Blue G250 festék azon tulajdonságán alapszik, hogy savas közegben kötődik (elektrosztatikus és van der Waals kölcsönhatással) a fehérjékhez (a fehérje arginin- és lizin-részeihez kötődik), ebből következik, hogy a különböző fehérjék meghatározása során a válaszok eltérőek lehetnek. Ezért a referenciaanyagként használt fehérjének azonosnak kell lennie a vizsgálandó fehérjével. Ekkor elnyelési maximuma 465-ről 595 nm-re tolódik el.

A kalibrációs görbe elkészítéséhez egy hígítási sort készítettünk az összehasonlító oldatból, melyhez Bovine serum albumin oldatot használtunk (10 µl, 20 µl, 40 µl, 60 µl, 80 µl, 100 µl,) (Walker et al., 2002). A vakminta 100 µl desztillált víz volt. Wathman no1. szűrőpapír segítségével megszürtük a mintákat. A felülúszóból történt szűrés után fotométerrel a fehérje-tartalom meghatározása (kontroll, hígítási sor és a Bovine serum albumin mérése). A vizsgált oldatokhoz szintén 5 ml Coomassie Brilliant Blue reagenst adtunk, összerázás után 2 perc, illetve ismételt összerázás után 1 óra múlva 595 nm-n megmértük az oldatok abszorbanciáját. A kapott értékeket a kalibrációs görbéhez viszonyítva megállapítható volt a minták fehérje koncentrációja. A fehérje-koncentráció mérése 5 napon keresztül naponta történt a folyékony táptalajokból.

EREDMÉNYEK

A kísérlet beállítása előtt a baromfi toll mintákban megmértük a száraz- és szervesanyag-tartalmat. A vágóhídról a toll átlagosan 67%-os nedvesség-tartalommal került ki. A toll szervesanyag-tartalmának átlaga szárazanyag-tartalomra vonatkoztatva 66% volt. A felhasznált

vágóhídi baromfi toll minták szén- és nitrogén-tartalmának vizsgálati eredményeit a 2. táblázat szemlélteti.

2. táblázat

A baromfi toll minőségi paraméterei

Minták száma(1)	Szén-tartalom (%) (2)	Nitrogén-tartalom (%) (3)
1.	50,59	14,31
2.	53,66	14,605
3.	50,58	14,81
4.	-	12,63
Átlag(4)	51,61	14,09
Szórás(5)	±1,78	±0,995

Table 1: Quality parameters in the poultry feather
Number of samples(1), Carbon-content (%) (2), Total-N-content (%) (3), Mean(4), Deviation(5)

A keratin elsősorban szénből (50–55%), oxigénből (25–30%), hidrogénből (15–18%), nitrogénből (7–8%), kénből (0,5–2%) áll, de nyomokban tartalmaz bórt, klórt, vasat is (Ádám, 2001). Összehasonlítva a vizsgálati eredményekkel, a toll minta szén-tartalma megegyezett (51,6%), nitrogén-tartalma viszont magasabbnak (14,1%) bizonyult. A vizsgált toll minta fehérje-tartalma (nitrogén-tartalom*6,25) átlagosan 88,1±6,22% volt. Ez az érték megegyezett Papadopoulos (1985) vizsgálati eredményeivel, mely szerint a száraz toll 85–99% nyersfehérjét tartalmaz. A keratin feltáródásával tehát jól nyomon követhető a toll degradációjának mértéke.

Az alkalmazott A és B típusú táptalaj (1. táblázat) esetén is napi 4–4 minta fehérje-koncentrációjának elemzése valósult meg. Emellett naponta megtörtént a baktériumok sejszámolása Bürker kamra segítségével. A Bradford-módszer alapján történő fehérje koncentráció méréséhez szükséges kalibrációs görbét az ismert

abszorbanciájú fehérje (Bovine serum albumin oldat 1 mg/ml fehérje-tartalom) alkalmazásával készítettük el, melynek eredménye az 1. ábrán figyelhető meg.

1. ábra: Fehérje koncentráció meghatározása kalibrációs görbe alapján

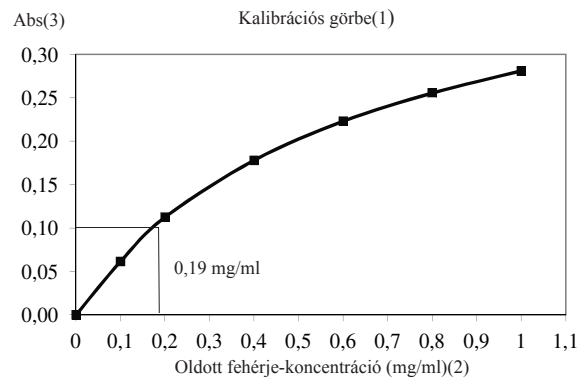


Figure 1: Determination of protein concentration based on calibration curve

Calibration curve(1), Soluble protein concentration (mg ml⁻¹)(2), Absorbance(3)

A kalibrációs görbe segítségével meghatározhatjuk a minták oldott fehérje-koncentrációját a következő módon. A mérési adatok közül válasszunk ki egy abszorbancia értéket. Ezt az értéket felvesszük a kalibrációs görbe Y tengelyén, majd ebből a pontból merőlegesen elmetsszük a görbét, az így kapott metszéspontból merőlegest állítunk az X tengelyre, az így kapott metszéspont értékének leolvasásával megkapjuk a minták oldott fehérje-koncentrációját, ami jelen esetben 0,19 mg/ml. Az összes oldott fehérje-koncentráció értékeinek kiszámítása után összevethetjük a két táptalaj hatékonyságát (3. táblázat).

3. táblázat

Fehérje-koncentráció változásának folyamata különböző táptalajok esetén

Táptalaj típusa(1)	Oldott fehérje-koncentráció (mg/ml)(2)			
	1. nap(3)	2. nap(3)	3. nap(3)	5. nap(3)
A	0,090±0,014	0,19±0,000	0,49 ±0,028	0,65±0,000
B	0,012±0,014	0,24±0,014	0,57 ±0,014	0,76±0,078

Table 3: Process of protein concentration changes in different media
Type of medium(1), Soluble protein concentration (mg ml⁻¹)(2), Day(3)

Megállapítható, hogy a B típusú folyékony táptalaj összetétele kedvezőbb volt a *Bacillus licheniformis* KK1 baktérium számára. A B típusú táptalajon az utolsó mérés eredményei között jelentős volt a szórás értéke (0,078 mg/ml), mely 15%-os eltérésnek felel meg. Az eltérés a tollak eltérő szerkezeti felépítésével magya-

rázható, mely az azonos tömeggel (2 g) és egész tollakkal beállított kísérlet ellenére is fennállt. Homogénebb baromfi toll minta állítható elő, ha az egész tollakat ledaráljuk. A keratin fehérje degradációjának mértékét különböző táptalajok esetében a 4. táblázat szemlélteti.

4. táblázat

Keratin degradáció mértéke különböző táptalajok esetén

Táptalaj típusa(1)	Keratin degradáció mértéke (%) (2)			
	1. nap(3)	2. nap(3)	3. nap(3)	5. nap(3)
A	1,02	2,16	5,56	7,37
B	0,14	2,72	6,47	8,62

Table 4: Keratin degradation rate in different media
Type of medium(1), Keratin degradation rate (mg ml⁻¹)(2), Day(3)

A keratin feltáródásának mértékét elemezve a B típusú táptalaj bizonyult eredményesebbnek (+1,25%) azonos toll mennyiségek esetén.

A folyékony táptalajos vizsgálatok másik tárgya a baktérium sejtszám növekedésének figyelemmel kísérése volt. A fehérje koncentráció mérése mellett min-

den mérés alkalmával Bürker kamra segítségével megszámláltuk a baktériumok sejtszámát (5. táblázat).

Ha összevetjük a kapott eredményeket az oldott fehérje-koncentrációkkal, egyenes arányosság mutatható ki az oldott fehérje-tartalom és a baktériumszám között.

5. táblázat

Baktérium sejtszám változása az alkalmazott táptalajokban

Táptalaj típusa(1)	Baktérium sejtszám ($\times 10^6$ sejt/ml)(2)				
	0. nap(3)	1. nap(3)	2. nap(3)	3. nap(3)	5. nap(3)
A	4,55 \pm 0,00	9,0 \pm 0,28	16,7 \pm 0,42	45,3 \pm 1,56	57,6 \pm 1,13
B	4,55 \pm 0,00	10,2 \pm 0,56	21,8 \pm 1,13	51,2 \pm 1,13	69,6 \pm 4,53

Table 5: Keratin degradation rate in different media

Type of medium(1), Bacterial cell number ($\times 10^6$ cell ml⁻¹)(2), Day(3)

KÖVETKEZTETÉSEK

Az összes oldott fehérje-koncentráció eredményei alapján megállapítható, hogy a B típusú folyékony táptalaj összetétele kedvezőbb volt a vizsgált baktérium számára. A keratin feltáródásának mértéke 1,25%-kal volt eredményesebb a B típusú táptalaj esetén. A folyékony táptalajon végzett kísérletek eredményei rámutattak arra, hogy a *Bacillus licheniformis* KK1 sejtszáma függ a táptalajok összetételétől, nemcsak a táptalajban lévő toll mennyiségétől. A baktérium sejtszámok alapján is a nagyobb kálium-foszfát és dikálium-foszfát-tartalmú, illetve alacsonyabb NaCl-tartalmú B táptalaj bizonyult hatékonyabbnak. A B táptalaj hozamfokozó hatásának pontos okát csak további célzott vizsgálatokkal (NaCl, K₂HPO₄) lehet pontosan lehatárolni. Egyenes arányosság volt kimutatható az oldott fehérje-koncentráció és a baktériumszám között, mely alapján tehát meghatározható a keratinaktivitás, így a keratin degradációjának mértékére is.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet szeretnénk mondani prof. dr. Kovács L. Kornélnak, dr. Bagi Zoltánnak (SzTE TTIK, Biotechnológiai Tanszék), Biró Györgyinek és Kincses Sándornénak (DE MÉK) szakmai támogatásukért és a kutatás során nyújtott segítségükért. A kutatás az Európai Unió és Magyarország támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program” című kiemelt projekt keretei között valósult meg. Az előzetes kutatások a Baross Gábor (2-2005-0047) és az Asbóth Oszkár Programok (OMFB 00873/2006) segítségével valósultak meg.

IRODALOM

- 1576/2007/EK rendeletre módosított 1774/2002/EK európai parlamenti és tanácsi rendelet: állati melléktermékek ártalmatlanítása és felhasználási tekintetében történő végrehajtásáról
- Ádám I. (2001): A toll. A baromfitoll és feldolgozása. Scriptor Bt. Budapest. 11–30., 98–114.
- Bagi Z. (2006): Személyes konzultáció. SZTE TTIK Biotechnológiai Tanszék. Szeged.
- Bálint, B.–Bagi, Z.–Tóth, A.–Rákhely, G.–Perei, K.–Kovács, K. L. (2005): Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen. *Applied Microbiology and Biotechnol.* 69. 4: 404–410.
- Bíró T.–Mézés L.–Petis M.–Kovács L. K.–Bagi Z.–Hunyadi G. (2008): A baromfi toll, mint biogáz alapanyag. [In: Kiss T.–Somogyvári M. (szerk.) *Via Futuri 2007. A biomassza alapú energiatermelés.*] BIONOM Kft. Pécs. 156–163.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72: 248–254.
- Cohlberg, J. A. (1993): The structure of L-keratin. *Trends Biochem. Sci.* 18: 360–362.
- Elődi P. (1980): *Biokémia.* Akadémia Kiadó. Budapest. 72–128., 543–621.
- Fakhfakh, N.–Garagouri, M.–Dahmenl, I.–Sellami-Kamoun, A.–El Feki, A.–Nasri, M. (2012): Improvement of antioxidant potential in rats consuming feathers protein hydrolysate obtained by fermentation of the keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1. *African Journal of Biotechnology.* 01. 11: 938–949.
- Hegedűs M.–Schmidt J.–Rafai P. (1998): Állati eredetű melléktermékek hasznosítása. *Mezőgazda Kiadó.* Budapest. 15–29., 65–93.
- Gunderson, A. R.–Forsyth, M. H.–Swaddle, J. P. (2009): Evidence that plumage bacteria influence feather coloration and body condition of eastern bluebirds, *Sialia sialis*. *Journal of Avian Biology.* 40: 440–447.
- Kaluzewska, M.–Wawrzekiewicz, K.–Lobarzewski, J. (1991): Microscopic examination of keratin substrates subjected to the action of the enzymes of *Streptomyces fradiae*. *Int. Biodeterior.* 27: 11–26.
- Kao, M. M.–Lai, H. Y. (1995): The study of the selection of feather-degrading microorganismus. *J. Chin. Inst. Environmental Eng.* 5: 37–43.

- Kovács, K. L.–Bagi, Z.–Perei, R. K.–Csanádi, Gy.–Fodor, B.–Kovács, Á. T.–Maróti, G.–Magony, M.–Bálint, B.–Valastyán, P.–Rákhely, G. (2002): Biohydrogen, biogas, bioremediation. [In: Proc. Power of Microbes in Industry and Environment Conf.] Opatija, Croatia. 7–9 June, 2002. 17.
- Kunert, J. (1973): Keratin decomposition by dermatophytes: evidence of sulphitolysis of the protein. *Experientia*. 33: 489–498.
- Letourneau, F.–Soussotte, V.–Bressollier, P.–Branland, P.–Verneuil, B. (1998): Keratinolytic activity of *Streptomyces sp.* S.K.1-02: a new isolated strain. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 77–80.
- Lin, X.–Delemen, D. W.–Miller, E. S.–Shih, J. C. (1995): DNA nucleotide sequence of keratinase gene of *Bacillus licheniformis*. *Appl. Environmental Microbiol.* 61. 4: 1469–1474.
- Lucas, F. S.–Broennimann, O.–Febbraro, I.–Heeb, P. (2003): High diversity among feather degrading bacteria from a dry meadow soil. *Microbial Ecology*. 45: 282–290.
- Lucas, F. S.–Moureau, B.–Jourdie, V.–Heeb, P. (2005): Brood size modifications affect plumage bacterial assemblages of European starlings. *Molecular Ecology*. 14: 639–646.
- Miller, J. H. (1972): Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. N. Y.
- MSZ 318-3:1979 szabvány: Szárazanyag-tartalom, izzítási maradék és izzítási veszteség meghatározására.
- Okoroma, E. A.–Garelick, H.–Abiola, O. O.–Purchase, D. (2012): Identification and characterisation of a *Bacillus licheniformis* strain with profound keratinase activity for degradation of melanised feather. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 74: 54–60.
- Onifade, A. A.–Al-Sane, N. A.–Al-Mussallam, A. A.–Al-Zarbam, S. (1998): A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as live-stock feed resources. *Biores. Technol.* 66: 1–11.
- Papadopoulos, M. C. (1985): Processed chicken feathers as feedstuff for poultry and swine. A review. *Agric. Wastes*. 14: 275–290.
- Perei K.–Bagi Z.–Bálint B.–Csanádi Gy.–Hofner P.–Horváth L.–Kardos Gy.–Magony M.–Rákhely G.–Román Gy.–Tóth A.–Zsíros Sz.–Kovács L. K. (2004): Mikrobák környezetvédelmi biotechnológiai hasznosításra. [In: Székács A. (szerk.) *Biokémia – A Magyar Biokémiai Egyesület tájékoztatója.*] 28. 3: 54–58.
- Pesti M. (2001): Általános mikrobiológia. Dialóg Campus Kiadó. Budapest–Pécs.
- Shih, J. C. H. (1993): Recent development in poultry waste digestion and feather utilization – a review. *Poultry Sci.* 72: 1617–1620.
- Steinert, P. M. (1993): Structure, function, and dynamics of keratin intermediate filaments. *J. Invest. Dermatol.* 100: 729–734.
- Walker, J. M. (2002): *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press Inc. Totowa, NJ. 1–16.
- Wang, J. J.–Shih, J. C. H. (1999): Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 22. 6: 608–616.
- Williams, C. M.–Richester, C. S.–Mackenzi, J. M.–Shih, J. C. H. (1990): Isolation, identification and characterization of a feather-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1509–1515.
- Williams, C. M.–Lee, C. G.–Garlich, J. D.–Shih, J. C. H. (1991): Evaluation of a bacterial feather fermentation product, feather-lysate as a feed protein. *Poultry Sci.* 70: 85–94.

