

Keratin-tartalmú hulladékok üzemi méretű biológiai előkezelése

Mézes Lili¹ – Bíró Tibor¹ – Petis Mihály² –
Tamás János¹

¹Debreceni Egyetem Agrár- és Műszaki Tudományok Centruma,
Mezőgazdaságtudományi Kar,

Víz- és Környezetgazdálkodási Tanszék, Debrecen

²Bátortrade Kft., Nyírbátor

mezes@gissserver1.date.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A kutatás célja az üzemi méretű biológiai tollbontás technológiájának kidolgozása volt. A vizsgálatok során a kritikus környezeti és technológiai határfeltételek paraméterezését végeztük el. A keratin-tartalom miatt nehezen feltárható (és komposztálható) toll a kidolgozott módszer segítségével nagy tömegben és gyorsan hasznosítható az energetikai célú biogáz-termelésben, valamint a biomasszák optimális elemarványainak a beállításában. Az üzemi kísérletek egy 6 m³-es, fűthető, belső keverőegységgel és levegőztető-berendezéssel ellátott duplafalú tartályban folytak. A baromfi toll bomlásának folyamatát extinkcióméréssel követtük nyomon.

Az elvégzett kísérletek alapján megállapítható, hogy a 70 °C-on előkezelt, 1% baktérium kultúrával beoltott, 1:3-as toll:víz aránnyal beállított kezelés bizonyult a legkedvezőbbnek a bomlás hatékonysága és a tartózkodási idő tekintetében.

Kulcsszavak: *Bacillus licheniformis*, baromfi toll, keratin

SUMMARY

The aim of the research was a development of a feather-degradation technology in industrial circumstances. During the experiments we determined the parameters of the critical environmental and technological limitation factors. Because of the high keratin-content the degradation (and composting) of the feather is difficult. With the developed technology huge mass of feather can be used fast and easily in biogas production and in the adjustment of the optimal element ratio of biomass. The industrial experiments were implemented in a 6m³ heatable double-walled tank with stirring-shovels and aeration-system. The degradation process was followed with extinction measurements.

According to the experiments that were done the best results were given at the case which was heat-treated at 70°C, was injected with 1% bacteria concentration, and where 1:3 feather:water ratio was set if we consider the effectiveness of degradation and the hydraulic retention time.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, poultry feather, keratin

BEVEZETÉS

Az egyre növekvő mennyiségben keletkező baromfitoll elhelyezése és hasznosítása jelenleg nem megoldott. A hatályos állategészségügyi szabályozás következtében takarmányként való felhasználása már nem lehetséges. A baromfitoll magas fehérje-tartalma miatt kitűnő biogáz receptura-alapanyag, ugyanakkor nem adagolható közvetlenül, előkezelés nélkül a biomassza-keverékekhez. A tollnak olyan feltáráson

(pl. hővel történő és/vagy mikrobiális) kell keresztül mennie, melynek eredménye a keratin lebomlása (Perei és mtsai, 2004).

A toll szaruból áll, mely tömegének közel 90%-a a keratin (Harrap és Woods, 1964; Cherry et al., 1975). A keratin nevű rostos fehérje előfordul a szőrzetben, a szarvakban, a körmökben és a tollzatban egyaránt (Nárai-Szabó, 2006). A tollkeratin molekulatömege hozzávetőleg 10,500, a cisztein/cisztein-tartalom az aminosav szekvencia 7%-a (Arai et al., 1983). Az aminosav összetétel alapján a keratin közel 40%-a hidrofil, 60%-a hidrofób tulajdonságú. A fehérje molekulák α-hélix-szel, β-redővel, vagy rendezetlen spirállal alakíthatják ki a harmadlagos szerkezetet (Schmidt és Line, 1996). A toll keratin rostjai 41% α-hélicet, 38% β-redőt és 21% rendezetlen spirális szerkezetet tartalmaznak (Schmidt és Jayasundera, 2003).

A keratinfehérjék gyakorlatilag teljesen oldhatatlanok, szerkezetük fonalas, viszonylag sok cisztein oldalláncot tartalmaznak, amelyek a polipeptid-láncokat diszulfid-kötésekkel kapcsolják össze (Elődi, 1980; Cohlberg, 1993; Steinert, 1993; Onifade et al., 1998; Ichida et al., 2001). A nagyszámú diszulfid-híd miatt a keratin nehezen feltárható az olyan enzimek számára, mint a tripszin, pepszin és papain, így degradációjához speciális fehérjebontó (keratinbontó) mikroorganizmusokra van szükség (Elődi, 1980; Cohlberg, 1993; Steinert, 1993; Kornilowicz-Kowalska, 1997; Onifade et al., 1998). Bizonyos baktériumok, gombák, speciális proteázok, a keratinázok segítségével képesek a keratin hidrolízisére. A *Thermoactinomyces keratinolyticum* baktérium keratinbontó hatásfokát csirke toll esetében Hussein és Swelim (1995), míg pulyka tollnál Kushwaha (1983) jegyezte le. A szaprofita gombák keratinbontó aktivitását Kornilowicz (1994) vizsgálta.

A tollbontó *Bacillus licheniformis*-t (PWD-1) baromfi eredetű hulladékok aerob kivonatából izolálták (Williams et al., 1990), majd biotechnológiai módszerrel állították elő a beta-keratin bontásának fokozása érdekében (Lin et al., 1995). Cheng et al. (1995) a *Bacillus licheniformis*-t szintén a tollbontás hatásfokának növelése kapcsán vizsgálták. Kao és Lai (1995) a gram pozitív, pálcika formájú, endospórás *Bacillus spp.*-t úgy azonosították, mint a tollnak a talajban található leghatékonyabb keratinbontóját. Magyarországon Perei és munkatársai (2004) folytattak kísérleteket *Bacillus licheniformis*-sal, az általuk a természetből

elkülönített baktérium extracelluláris proteázt termel, és enzimatisus képessége révén teljesen elbontja a szórt és a tollat.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Baromfi toll feltárhatóságának vizsgálatához a degradálódó anyag higfázisának extinkcióját határoztuk meg, mellyel nyomon követhető volt a biodegradáció dinamikája. Oltás előtt turbidimetriás módszerrel kalibrációs görbét készítettünk a baktériumkultúrából, majd oltás után a beállításokból vett mintákból is. Első lépésben hígítási sort készítettünk, melyből extinkciót, majd sejtszámot határoztunk meg. Ezek ismeretében elkészítettük a kalibrációs görbét. A kísérleti beállításoknál az oltáshoz adott, $1,6 \cdot 10^9$ db/cm³ sejtszámú baktérium (*Bacillus licheniformis*) tenyészetet használtunk. A keratinbontó *Bacillus licheniformis* KK1-es törzse (Perei és mtsai, 2004; Bálint et al., 2005) gram pozitív, aerob, endospóras, pálcika formájú baktérium, melynek pH-igénye semleges, hőmérsékleti optimuma 30-50 °C között van.

A hőmérsékletet, pH-t és extinkciót folyamatosan, meghatározott időközönként mértük. Az extinkciót Filterphotometer PF-10 típusú fotométerrel 605 nm-es tartományban (mérési pontosság: +/-10 nm), a hőmérsékletet VOLTCRAFT MS 4 multifunkcionális mérőműszerrel (mérési pontosság: +/- 0,3 °C), a pH-t SENTRON félvezető-szenzoros pH-mérővel (mérési pontosság: +/- 0,01 pH, +/-0,5 °C) mértük.

Az üzemi kísérletek elvégzésére egy speciális duplafalú tartályt (ún. Tycoon) alkalmaztunk a nyírbátori székhelyű BátorTrade Kft. nyíresi komposztáló telepén. A tartály egy 6 m³-es, palástfűtésű, belső keverőegységgel és levegőztető-berendezéssel ellátott berendezés. A hőmérsékletet beépített hőmérőszonda mérte. A nyomást, a hőmérsékletet, a levegő-áramoltatás időtartamát vezérlőrendszer szabályozta. A folyamatosan mért adatokat az erre a célra kifejlesztett számítógépes szoftverrel rögzítettük. A baromfi toll beadagolása a tartály tetején elhelyezett garaton keresztül, kiürítése hidraulikusan történt.

Az üzemi alkalmazást laboratóriumi méretű modellkísérletek előzték meg. Ennek során vizsgáltuk a különböző hőkezelések (70, 100, 130 °C) hatékonyságát. A hígítási arányok beállítása után (1:1, 1:2 és 1:3) a speciális aerob keratinbontó baktérium bontási hatékonyságát elemeztük. A baktérium koncentrációkat (1, 3 és 5%) a toll tömegéhez és a víz térfogatához együttesen viszonyítottuk. A kísérletek eredményeképp megállapítható, hogy a kezelés nélküli elegyben a hidrolízis mértéke jóval kisebb volt, mint a baktériummal kezeltékben. A kísérleteket háromszori ismétléssel végeztük, minden esetben kontrollt is állítottunk be, melyeknél csak a hőkezelés és a

hígítási arányok hatását vizsgáltuk. A hőkezelésre vonatkozó eredmények azt mutatták, hogy nem szükséges 70 °C-nál nagyobb hőmérsékletű előkezelés. A hígítási arányok közül az 1:2-es arány volt a mechanikai keverhetősége alsó határa. A tollbontás intenzitása 1%-os oltási aránynál volt a legnagyobb (Bíró et al., 2008).

Az üzemi kísérletsorozatban több kezeléskombinációt vizsgáltunk (1. táblázat). Az 1:3 arányú toll-víz elegyet 70 és 130 °C-on 1 h időtartamig hőkezeltük. 70 °C-ot a 71/2003 (VI.27) FVM rendeletben megfogalmazott állati hulladékot is kezelő biogáz telepekre vonatkozó speciális, míg 130 °C-ot az állati hulladékok feldolgozására vonatkozó módszerekben meghatározott követelmények miatt használtunk. Mindkét esetben 1 és 3%-os baktérium koncentrációt alkalmaztunk. A baktérium felszaporítását laboratóriumban végeztük, az oltás az üzemi kísérlet helyszínén történt. A kísérleteket megelőzően a tartályt forró gőzzel sterilizáltuk. A bontási folyamat kezdetétől a hőmérsékletet gőzáram segítségével a baktériumok életfeltételeinek megfelelő 42 °C-on tartottuk, az oxigén-ellátást 3 óránként 10 perces levegőztetéssel biztosítottuk.

1. táblázat

Kísérleti beállítások

Hőkezelés, °C(1)	70 °C		130 °C	
Baktérium koncentráció, %(2)	1%	3%	1%	3%
Kísérletek jelölése(3)	A	B	C	D

Table 1: Start of experiment
pretreatment(1), microbe concentration(2), code of experiment(3)

A helyszínen hőmérsékletet és pH-t, a BátorTrade Kft. nyírbátori laboratóriumában extinkciót és baktérium sejtszámot vizsgáltunk. A kezdeti és végtermék esetében a C, N, S %-ot és a C/N arányt határoztuk meg.

EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A 70 °C-on hőkezelt, 1% baktériummal beoltott kezelés mérési eredményei (A)

A toll-víz keveréket 1 órán keresztül tartottuk 70 °C-on. 12 óra elteltével a rendszer hőmérséklete 42 °C-ra csökkent, amely optimális volt az alapanyag baktériummal történő oltásához. Az oltás időpontjától számított tartózkodási idő 5 nap volt. A speciális keratinbontó baktérium számára a semleges pH-érték az optimális. A bontás-aktivitás ellenőrzése miatt fontos volt az indikatív pH nyomon követése.

A 70 °C-on hőkezelt, 1:3-as toll:víz arányú 1% baktériummal beoltott kezelés pH változását mutatja be az 1. ábra.

1. ábra: 70 °C-on hőkezelt, 1%-os baktériumtenyésztéssel beoltott kezelés pH-változása

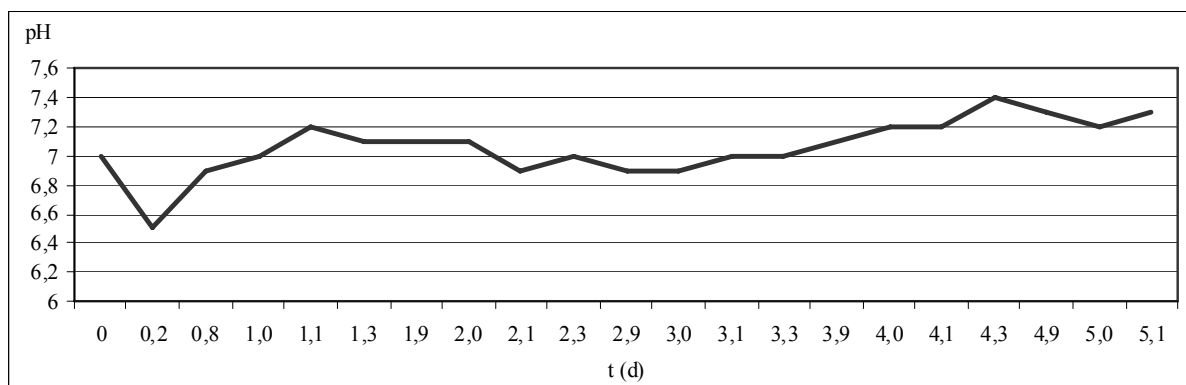


Figure 1: Changes of pH during the experiment with 70 °C preheating and 1% initial microbe concentration

A toll:víz arány beállítását követően a rendszer kémhatása 6,5 volt. A semleges kémhatású baktériumkultúrával történő oltás következtében a pH érték kis mértékű növekedést mutatott, de nem érte el az optimális 6,9-7,2-es tartományt, ezért a rendszerhez mésztejet adagoltunk. Ennek hatására semleges kémhatást értünk el, amely a folyamat

végéig fennállt. A fermentáció végstádiumában a csökkenő aktivitás következtében, a pH érték kis mértékben növekedett.

Az „A” kísérleti beállítás extinkció értékeinek változását figyelhetjük meg a 2. ábrán. Az oltóanyag extinkció értéke 0,8 volt.

2. ábra: 70 °C-on hőkezelt, 1% baktériummal beállított kísérlet extinkció változása

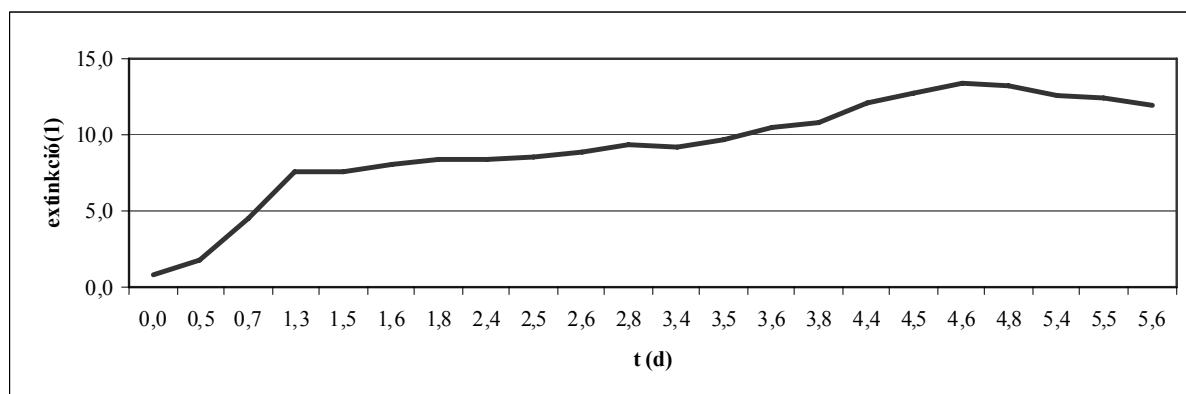


Figure 2: Changes of extincio during the experiment with 70 °C preheating and 1% initial microbe concentration
extincio(l)

A baktériummal még nem kezelt, toll-víz keverék extinkciója 3,5-ös értéket vett fel. Az oltást követően a fermentáció kezdeti szakaszában a fénytörési mutató intenzíven növekedett (3,5-7,8). A folyamat előrehaladtával az extinkció-növekedés mértéke mérséklődött az aktivitás-csökkenés következtében. A maximális 13,4-es extinkció értéket a 4. napon érte el. Az extinkció-növekedés alapján megállapítható, hogy a baktériumok keratinbontó tevékenysége a kísérlet teljes időtartama alatt intenzív volt.

A 70 °C hőkezelt, 3% baktériummal beállított kísérlet (B) ehhez hasonlóan alakult. A baktérium mennyiségének növelése nem eredményezte a bontás hatékonyságának a többlet mennyiséggel arányos

fokozódását, ezért nem javasoljuk üzemi körülmények közötti alkalmazását.

130 °C-on hőkezelt, 1% baktériummal beoltott kezelés mérési eredményei (C)

A rendszer hőmérséklete a 130 °C-os hőkezelést követően 1 nap elteltével 50 °C alá csökkent, amely megfelelt az alapanyag baktériummal történő oltásához. Az oltástól számított tartózkodási idő 6 nap volt. A 3. ábrán 130 °C-on hőkezelt, 1% baktériummal beoltott kezelés pH változása figyelhető meg.

3. ábra: 130 °C-on hőkezelt, 1% baktérium beállított kísérlet pH változása

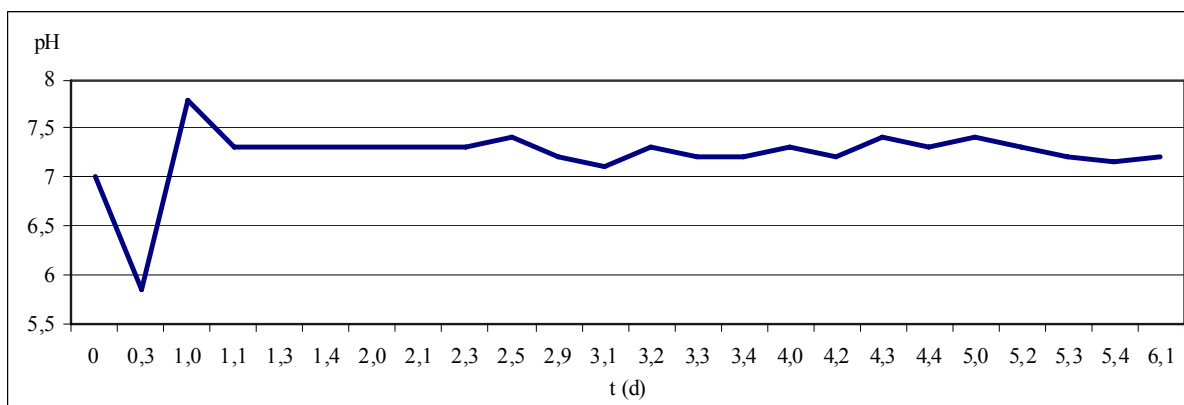


Figure 3: Changes of pH during the experiment with 130 °C preheating and 1% initial microbe concentration

A baktérium tenyészet pH-ja 7, míg a hőkezelt toll:víz keverék pH-ja 6,5 volt a beállítás előtt. Az oltást követő 0,5 nap múlva az elegyben ez az érték 5,84-re csökkent. A drasztikus változás a bontási hatékonyságot jelentősen visszavetheti, ezért puffert adagoltunk a rendszerhez (2,4 kg mésztejet), melynek következtében 7,8-ra emelkedett a pH.

A túlzottan lúgos pH szintén lassíthatja a folyamatot, de a levegőztetési hatások növelésével 7,3-re sikerült csökkenteni az értéket, mely kisebb ingadozásokkal stabilizálódott.

A degradálódó anyag hígfázisában mért extinkció értékéből következtettünk a bomlás hatékonyságára (4. ábra).

4. ábra: 130 °C-on hőkezelt, 1% baktériummal beállított kísérlet extinkció változása

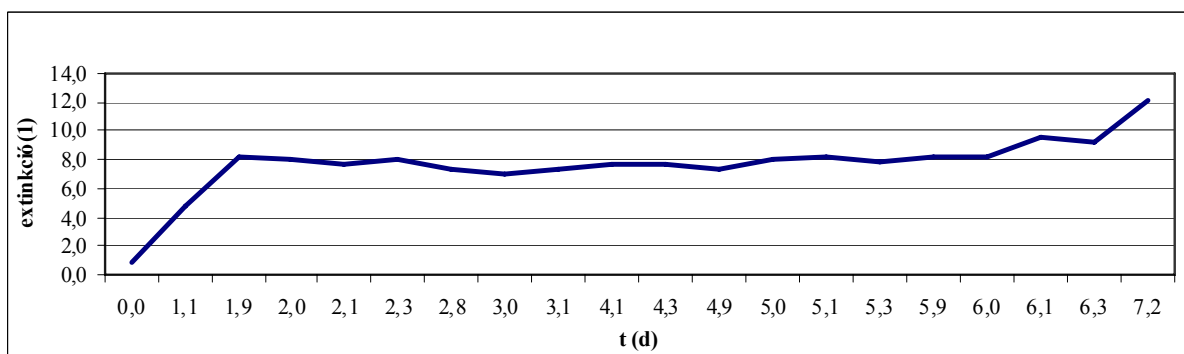


Figure 4: Changes of extinction during the experiment with 130 °C preheating and 1% initial microbe concentration

A baktériumkultúra extinkciója 0,9 volt, míg a hőkezelt toll:víz elegy 4,4. Az oltás utáni első napon ez az érték 4,8-ra, a 2. napon 8,2-re nőtt. Ezt követően ez az érték stagnált, illetve minimális mértékben csökkent, amit a pH jelentős ingadozása okozhatott. A 5. napig lassú, a 6. naptól gyors ütemű növekedés volt megfigyelhető az extinkció érték tekintetében, a maximumát a 7. napon érte el (12,2).

A 130 °C-on hőkezelt, 3% oltóanyaggal beoltott kezelés (D) extinkció-növekedése a C jelű kísérlettől eltérően töretlen volt, amit a pH (6,2-7,5) és a hőmérséklet (38-50 °C) kisebb mértékű ingadozása indokol. Az extinkció a kezdeti 4,2-ről a 7. napra 12,2-re emelkedett. A tollbontás intenzitásában tehát nincs jelentős eltérés a D jelű kísérlethez képest. A minimális hatékonyság-növekedés nem indokolja a nagyobb mennyiségű oltóanyag használatát.

Az eredeti és a kezelt toll beltartalmi értékei

Az 5. ábrán láthatóak a 70 °C-on hőkezelt toll C, N, S %-ai és C/N arányai, melyek a DE ATC MTK Élelmiszertudományi, Minőségbiztosítási és Mikrobiológiai Intézet akkreditált laboratóriumában lettek bevizsgáltatva. A kutatás során csak a sikeresebb, 70 °C-os hőkezelés esetében határoztattuk meg ezen tulajdonságokat. A vágóhídról kikerült baromfi toll és a hővel, majd mikrobiológiai úton kezelt toll paraméterei között jelentős elérést figyelhetünk meg. A toll N-tartalma 54,5, a C-tartalma 38,7, a S-tartalma 31,28%-ára csökkent a kezelések hatására.

5. ábra: Az eredeti és a kezelt toll beltartalmi értékei 70 °C-os hőkezelés esetén

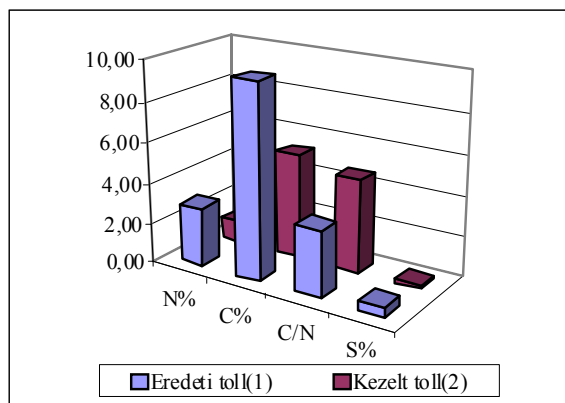


Figure 5: Comparison of the normal and treated feather at the case of 70 °C heat-treatment
normal feather(1), treated feather(2)

KÖVETKEZTETÉS

Az elvégzett üzemi kísérleteket ismétlés nélkül végeztük, tekintettel arra, hogy ekkora (6 m³) méreteknél végzett kísérletek ismétlésére korlátozott lehetőségeink voltak. A tollbontás 4 nap oltástól

számított tartózkodási idő és 10 fölötti extinkciós érték mellett volt eredményes. A kísérletekből megállapítható, hogy a 70 °C-on előkezelt, 1%-os baktérium kultúrával beoltott, 1:3-as toll:víz arányú kezelés tekinthető a legkedvezőbbnek a bomlás hatékonysága, a tartózkodási idő szempontjából.

A baktérium koncentráció növelése nem eredményezte a bontás hatékonyságának a többlet mennyiséggel arányos fokozódását, ezért alkalmazása nem célszerű.

A nehezen feltáródó (és komposztálható) toll a kidolgozott módszer segítségével nagy tömegben hasznosítható az energetikai célú biogáz-termelésben, valamint a komposzt-receptúrákban. A technológia az állategészségügyi és levegőtisztaság-védelmi előírásoknak is megfelel. Ezzel az eljárással a továbbiakban takarmányként már nem hasznosítható baromfi toll elhelyezési problémái teljesen megoldhatók.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondunk Dr. Kovács Kornél professzor úrnak és Bagi Zoltánnak (SzTE TTIK, Biotechnológiai Tanszék) a kutatás során nyújtott segítségével. A kutatás a Baross Gábor projekt (BAROSS-2-2005-0047) támogatásával valósult meg.

IRODALOM

- Arai, K. M.-Takahashi, R.-Yokote, Y.-Akahane, K. (1983): Amino acid sequence of feather keratin from fowl. *Eur. J. Biochem.* 132: 501-507.
- 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.
- Biró T.-Mézses L.-Petis M.-Kovács K.-Bagi Z.-Hunyadi G. (2008): A baromfi toll, mint biogáz alapanyag. *Via Futuri – 2007 konferenciakötet.* In press.
- Cheng, S. W.-Hu, H. M.-Shen, S. W. (1995): Production and characterization of keratinase of a feather degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* 59: 2239-2243.
- Cherry, J. P.-Young, C. T.-Shewfelt, A. L. (1975): Characterization of protein isolates from keratinous material of poultry feathers. *J. Food Sci.* 40: 331-335.
- Cohlberg, J. A. (1993): The structure of L-keratin. *Trends Biochem. Sci.* 18: 360-362.
- Elődi P. (1980): *Biokémia.* Akadémia Kiadó. Budapest.
- Harrap, B. S.-Woods, E. F. (1964): Soluble derivatives of feather keratin. Isolation, fractionation and amino acid composition. *Biochem. J.* 92: 8-18.
- Hussein, A. M.-Swelim, M. A. (1995): Hydrolysis of chicken feather by *Thermoactinomyces keratinolyticus*. *Egyptian Journal of Botany.* 39. 2: 107-119.
- Ichida, J. M.-Krizova, L.-LeFevre, C. A.-Keener, H. M.-Elwell, D. L.-Burt, E. H. Jr. (2001): Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *Journal of Microbiological Methods.* 47: 199-208.
- Kao, M. M.-Lai, H. Y. (1995): The study of the selection of feather-degrading microorganism. *J. Chin. Inst. Environmental Eng.* 5: 37-43.
- Kornilowicz, T. (1994): Methods for determining keratinolytic activity of saprophytic fungi. *Acta Mycologica.* 29. 2: 169-178.
- Kornilowicz-Kowalska, T. (1997): Studies on the decomposition of keratin wastes by saprophytic microfungi: I. Criteria for evaluating keratinolytic activity. *Acta Mycol.* 32. 1: 51-79.
- Kushwaha, R. K. S. (1983): The in vitro degradation of peacock feathers by some fungi. *Mykosen.* 26: 324-326.
- 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.
- Nárai-Szabó G. (2006): *Kémia.* Akadémiai Kiadó. Budapest.
- 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 livestock feed resources. *Biores. Technol.* 66: 1-11.
- 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.
- Schmidt, W. F.-Line, M. J. (1996): Physical and chemical structures of poultry feather fiber fractions in fiber process development. In: *TAPPI Proceedings: 1996 Nonwovens Conference.* 135-140.

Schmidt, W. F.-Jayasundera, S. (2003): Microcrystalline keratin fiber. In: Wallenberger, F.-Weston, N. (eds.) *Natural Fibers, Plastics, and Composites-Recent Advances*. Kluwer Academic Publishers, MA. 51-66.

Steinert, P. M. (1993): Structure, function, and dynamics of keratin intermediate filaments. *J. Invest. Dermatol.* 100: 729-734.

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: 1509-15.

71/2003 (VI.27) FVM rendelet az állati hulladékok kezelésének és a hasznosításukkal készült termékek forgalomba hozatalának állat-egészségügyi szabályairól.