

Baromfi toll hőkezelése és mikrobiális előkezelése biogáz célú hasznosításhoz

Mézes Lili¹ – Bíró Tibor¹ – Tamás János¹ –
Petis Mihály²

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

Víz- és Környezetgazdálkodási Tanszék, Debrecen

²Bátortrade Kft., Nyírbátor

mezes@gissserver1.date.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

A kutatás az elsősorban vágóhidakon nagy mennyiségben keletkező baromfitoll mikroorganizmussal végzett biológiai feltárását elősegítő hőkezelés és az abból történő biogáznyerés technológiai paramétereinek kidolgozását célozta. A tollat 70, 100, 140 °C-on hőkezeltük, majd *Bacillus licheniformis* (KK1) nevű keratinbontó baktérium segítségével tártuk fel. Vizsgálataink a baromfi toll biodegradációját befolyásoló paraméterek optimalizálására irányultak. A kísérletekben az optimális pH, hőmérséklet, tollméret és bacillus:toll arány értékek meghatározását végeztük el, valamint a vizsgált paraméterek közötti összefüggéseket vizsgáltuk. A különböző kísérleti beállítások során a degradálódó anyag hígításának extinkcióját határoztuk meg, mellyel nyomon követhető volt a biodegradáció dinamikája. A kísérletek eredményeképp megállapítható, hogy a kezelés nélküli elegyben a hidrolízis mértéke jóval kisebb volt, mint a baktériummal kezeltékben. A 70, 100 és 140 °C-on előkezelt tollak közül a 70 °C-on hőkezelt toll feltáródása volt a legintenzívebb. A legjobb feltáródás 1:3-as toll:víz arány esetén következett be. A legsikeresebb tollbontási intenzitás az 1%-os mikrobaarányánál volt megfigyelhető.

Kulcsszavak: baromfi toll, keratin, hőkezelés, *Bacillus licheniformis*

SUMMARY

The aim of this research was the elaboration of the technological parameters of heat pre-treatment and microbial digestion of poultry feathers for biogas production. Feathers were treated at 70, 100, 140 °C, and subsequently digested by *Bacillus licheniformis*, or keratin disintegrator bacteria. Investigations focused on the optimization of parameters influencing poultry feather biodegradation. The optimal range of pH, temperature, feather size and bacillus:feather ratio were determined in the experiments, as well as the analysis of relationship between the examined parameters. In order to be able to track the dynamics of the biodegradation, we determined the extinction level of the liquid phase of the biodegraded material in the different experimental treatments. The results showed that the rate of hydrolysis was significantly higher in the treatments with bacteria than in the treatments without it. Regarding the pretreatments at 70, 100 and 140 °C, the digestion of feather was the most intensive at 70 °C. The most extensive digestion was observed in case of 1:3 feather:water ratio. The highest intensity of feather digestion was detected in the treatment with 1% microbe ratio.

Keywords: poultry feather, keratin, heat-treatment, *Bacillus licheniformis*

BEVEZETÉS

A keratinfehérjék gyakorlatilag teljesen oldhatatlanok, szerkezetük fonalas, viszonylag sok cisztein oldalláncot tartalmaznak, amelyek a polipeptidláncokat diszulfid-kötésekkel kapcsolják össze. A nagyszámú diszulfid-híd miatt a keratin oldhatatlan és nehezen feltárható az olyan enzimek számára, mint a tripszin, pepszin és papain, így degradációjához speciális fehérjebontó (keratinbontó) mikroorganizmusokra van szükség (Cohlberg, 1993; Steinert, 1993; Onifade et al., 1998; Elődi, 1980). Ez az oka annak, hogy a tollhulladékok kezelése és ártalmatlanítása nehézségekbe ütközik.

Bizonyos baktériumok, gombák speciális proteázok, a keratinázok segítségével képesek a keratin hidrolízisére. Ilyen tulajdonsággal rendelkeznek például a *Streptomyces* és *Bacillus* nemzetség bizonyos törzsei, fajai (Williams et al., 1990; Bressollier et al., 1999), illetve több szaprofita, parazita gomba (Dozie et al., 1994), *Actinomycetes* (Noval és Nickerson, 1959; Böckle et al., 1995), *Fervidobacterium pennavorans* (Friedrich és Antranikian, 1996). Néhány *Bacillus* faj (*B. polymyxa*, *B. licheniformis*, *B. brevis*, *B. subtilis*) antibiotikumot (polymyxin B, gramicidin, tyrocidin, edein, bacitracin) termel. Egyes fajaik ipari enzimtermelésben (lúgos proteáz a mosószeripar-nak, a-amiláz, stb.) jelentősek (Pesti, 2000). A *Bacillus licheniformis* (Williams et al., 1990) ipari fermentáláshoz használják, nagy mennyiségű exoenzimot állít elő, mint a proteinázt, amilázt, és antibiotikumot is termel (Kevei és Kucsera, 2002). Magyarországon Perei és munkatársai (2004) folytattak kísérleteket *Bacillus licheniformis*-sal, az általuk a természetből elkülönített baktérium extracelluláris proteázt termel, és enzimátikus képessége révén teljesen elbontja a szőrt és a tollat.

A toll nem adagolható közvetlenül, előkezelés nélkül a biomassza-keverékekhez. A baromfitollnak olyan hőkezelésen és mikrobiális feltáráson kell keresztül mennie, melynek eredménye a keratin lebomlása. A cisztinhidak hő vagy lúg hatására történő lebontódása a toll rugalmasságának elvesztését okozza. A fehérjemolekulák a tollban általában rendezett, kristályos szerkezetben, szá irányban, láncszerűen helyezkednek el. A fehérjemolekulák egy része kusza, rendezetlen, amorf, ezek közé tud beépülni és megkötődni a víz. E részek teszik a tollat nedvszívóvá (Ádám, 2001).

A baromfitoll mikrobiális feltárhatóságát *Bacillus licheniformis* baktérium felhasználásával vizsgáltuk biogáz célú hasznosításhoz. A baromfitoll magas fehérjetartalma miatt kitűnő biogáz receptúra-alapanyag. Fermentációs feltárása elősegíti a nagy mennyiségben keletkező és speciális feltárást igénylő toll környezetbarát hasznosítását. A toll a kidolgozandó módszer segítségével nagy tömegben és gyorsan hasznosítható az energetikai célú biogáztermelésben, valamint a biomasszák optimális elemarányainak a beállításában. A toll alapanyagot tartalmazó biomassza nedves eljárású erjesztése során a fermentációt gátló, esetenként toxikus anyagok keletkezhetnek.

A kutatás egyik célkitűzése annak a maximálisan bevihető előfeldolgozott toll mennyiségének és időbeli ütemezésének a meghatározása volt, mely nem eredményezi a fermentációra toxikus gázok keletkezését, valamint más környezeti paraméter, így a pH káros eltolódását. Másik feladata a hőmérsékleti előkezelés hőfokának minimalizálása és a tollbontó mikroorganizmusok koncentrációjának optimalizálása, felszaporíthatóságának vizsgálata. A vizsgálatok olyan biomassza receptúra kidolgozását célozták meg, mely optimális C:N arányt és legnagyobb hasznos fajlagos gázkinyerést eredményez.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A kísérletsorozat beállítási paramétere

A kísérletsorozat során 8 kísérlet beállítása történt meg 2006.09.01.-10.15. között a Debreceni Egyetem Víz- és Környezetgazdálkodási Tanszékének laboratóriumában. Az első kísérlet esetében nyolc, a további kísérletek esetében hat napos kezelési időtartamokat alkalmaztunk. Első lépésben a tollat főzőberendezésben 1 h időtartamig 70, 100 és 140 °C-on hőkezeltük, majd a toll:víz arányt állítottuk be, mely során 1:1-es, 1:2-es és 1:3-as toll:víz arányokat vizsgáltunk. Az 1:1 toll:víz arányú kezeléseket (1 kg toll:1 liter víz) mechanikus keverésre alkalmatlannak bizonyultak, tehát üzemi körülmények között való alkalmazásuk nem javasolt. Az 1:2 aránynál 0,67 kg tollat 1,33 l vízzel, az 1:3 aránypárnál 0,5 kg tollat 1,5 l vízzel elegyítettünk (1. táblázat). Az optimálisnak bizonyuló 42 °C-os bontási hőmérsékletet termosztát segítségével, a 6,5-8 közötti pH-t 5-5 ml foszfát-puffer hozzáadásával biztosítottuk az oldatban. A toll:*Bacillus licheniformis* arányt (%) az adott aránypárban lévő toll tömegének 1, 3 és 5%-ával megegyező térfogatú *Bacillus licheniformis* (KK1) kultúrából (Perei és mtsai, 2001; Bálint et al., 2005) vett oltóanyaggal állítottuk be. Az első kísérlet során oltás előtt meghatároztuk a baktériumkultúra sejtszámát Bürker-kamrában, illetve az extinkciót fotométerrel 605 nm-es tartományban. A további kísérleteknél a kapott kalibrációs görbe alapján turbidimetriás módszerrel határoztuk meg az extinkciókhoz tartozó sejtszámokat. Az összes lehetséges kombináció kipróbálására került a kísérletsorozatban, egy kísérlet

alkalmával 4 kezelést és egy kontrollmintát állítottunk be. A kontrollmintában csak a toll:víz arány beállítására került sor. A legjobb extinkció értékeket (5-12 között) és homogenitást mutató kombinációkat megismételtük.

1. táblázat

Kísérleti beállítások

Toll:bacillus arány(2)	Hőkezelés (°C)(3)								
	70 °C			100 °C			140 °C		
Toll:víz arány(1)	1%	3%	5%	1%	3%	5%	1%	3%	5%
1:1					A	A			
1:2	E, G	E	F	D	B	B	C	C, F	G
1:3	D, E, G, H, I	D, E	F	D	A	A	C, F	C	G

Table 1: Start of experiment
feather:water ratio(1), feather:microbe ratio(2), pre-treatment(3)

Extinkció (fényáteresztő képesség) mérése

A fényáteresztő képesség mérése Filterphotometer PF-10-es típusú fotométerrel történt. A fényforrást egy wolfram pontlámpa biztosítja, a detektor pedig egy szilícium fotoelem. A fényáteresztő képességet 0,01 E/h-2,5 E/h tartományban képes mérni, 0,01 E/h alatt nem mérhető a zavarosság, 2,5 E/h felett pedig a vizsgálandó folyadék, oldat hígítása szükséges. A kísérleti beállításokat a mintavétel előtt homogenizáltuk, majd a folyadék fázisukból automata pipetta segítségével kivettünk 5-5 ml-t, amit a kísérleti beállítások számával jelölt küvettkébe helyeztünk, majd megmértük a folyadékok fényáteresztő képességét. Ha az extinkció meghaladta a 2,5 E/h-t, akkor a mintát kétszeresére, szükség esetén háromszorosára hígítottuk.

A pH mérése

A pH mérése Sentron ISFET, félvezető-szenzoros pH-mérővel történt.

EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Előkezelés szerinti elemzés

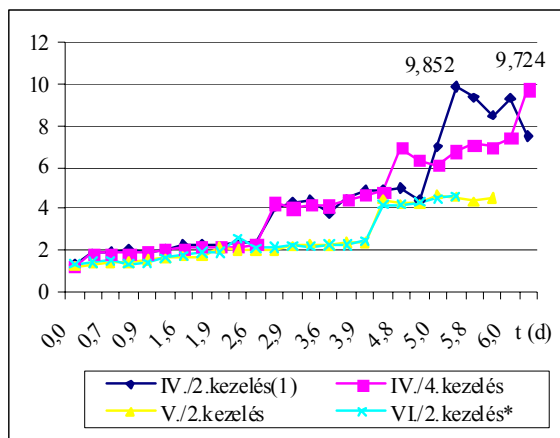
1. 70°C-on hőkezelt baromfitoll

A 70 °C-os előkezelést négy különböző kísérlet során alkalmaztuk. Vizsgáltuk az 1:2 (1. ábra) és az 1:3 toll:víz arány (2. ábra) tollbontásra és kezelhetőségre gyakorolt hatását. Mindkét toll:víz arány esetében 1, 3 és 5%-os bacillus:toll arányt állítottunk be, mellyel a tollbontás elindításához, ill. a kísérlet biztonságos lefuttatásához minimálisan szükséges baktérium-mennyiség meghatározása volt a célunk.

A 70 °C-on hőkezelt 1:3-as toll:víz arányú 1%-os toll:bacillus arányú kezeléseket közül a III./1-es kezelés 6,93-as extinkciót mutatott, ezért megismételtük

(IV./1.). Az ismételt kezelés eredményeként az extinkció nagy mértékben növekedett (11,97), a második ismétlés (VI./1.) kevésbé tekinthető sikeresnek, ugyanis csak 4,58 értéket vett fel.

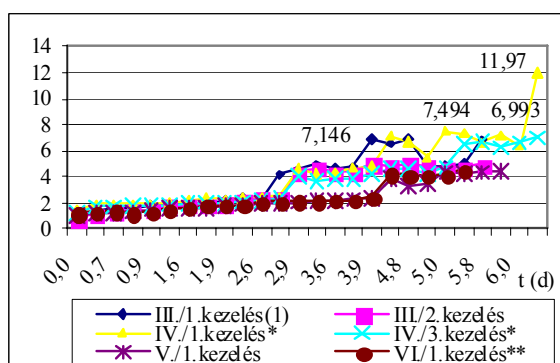
1. ábra: A 70 °C-os előkezelés, 1:2-es toll:víz arány hatása az extinkció értékekre



*=1×-i ismétlés(2)

Figure 1: The effect of heat pre-treatment at 70 °C and 1:2 feather:water ratio on extinction rate cell number(1), repeats(2)

2. ábra: A 70 °C-os előkezelés, 1:3-as toll:víz arány hatása az extinkció értékekre



*=1×-i ismétlés, **=2×-i ismétlés(2)

Figure 2: The effect of heat pre-treatment at 70 °C and 1:3 feather:water ratio on extinction rate cell number(1), repeats(2)

A 70 °C-on hőkezelt 1:2-as toll:víz arányú 1%-os toll:bacillus arányú kezelések közül a VI./1-es kezelés 9,85-ös extinkciót mutatott, ezért megismételtük (VI./2.). Az ismételt kezelés eredményeként az extinkció közel hasonló mértékben növekedett (9,72), viszont ezt az értéket egy nappal később érte el. A kezelhetőségi (mechanikus keverhetőség) és gazdaságossági (minimális 70 °C hőkezelés, baktérium-szükséglet) szempontok figyelembevételével azonban elmondható, hogy az ideálisnak tekinthető minimális hőkezelést és baktériumszámot igénylő kombináció javasolható üzemi körülmények közötti alkalmazásra.

2. 100 °C-on hőkezelt baromfitoll

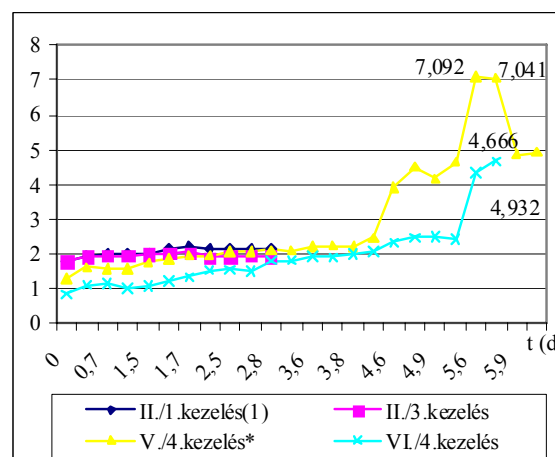
A 100 °C-os előkezelést két különböző kísérlet során alkalmaztuk. Vizsgáltuk az 1:2-es és az 1:3-as toll:víz arányt, és mindkét toll:víz arány esetében 1, 3 és 5%-os bacillus:toll arányokat. A 100 °C-os hőkezelések közül az első kísérletben beállított kezelések 3 napig, míg a harmadik kísérlet 8 napig tartottak. Az első kísérletekben látható törés a levegőztetés alkalmazása miatti extinkció-csökkenéssel magyarázható. Az 1:2-es toll:víz arányú kezeléseknél az I./1-es kezelés 4,85-ös, az I./2-es 4,2-es, míg a III./4-es kezelés 4,68-as extinkciót mutatott. A kezeléseket az alacsony extinkció értékek miatt nem ismételtük meg.

Az 1:3-as toll:víz arányú kezeléseknél az első kísérlet nem hozott megfelelő eredményeket (2,7). A III./3 kezelés a 6. napon vette fel a legnagyobb extinkció értéket (5), tehát a 100 °C-on hőkezelt kezelések közül a III./3-as kezelés, melynél 1%-os bacillus:toll arányt állítottunk be, alkalmazható lenne a biogáz üzemben, de mégsem javasoljuk, mert a 70 °C-os előkezelés gazdaságossága és jobb extinkció eredményei miatt hatékonyabban használható.

3. 140 °C-on hőkezelt baromfitoll

A 140 °C-os előkezelést 3 kísérlet során (2., 5. és 6.) alkalmaztunk. A 2. kísérlet 5 napig, az 5. kísérlet 7 napig, a 6. kísérlet 8 napig tartott. A második kísérlet 1:2 toll:víz arányú kezelése (3. ábra) nem voltak eredményesek (2,2), míg az 1:3 arányú kezelések közül a második kísérlet (II./4.) esetében 4,38-as extinkció értéket kaptunk. Az 1:2 toll:víz és 5%-os bacillus:toll arányú VI./4-es kezelés közepes (4,66) eredményt mutatott. A 3%-os bacillus:toll arányú V./4-es kezelés bizonyult a legeredményesebbnek (7,09).

3. ábra: A 140 °C-os előkezelés, 1:2-es toll:víz arány hatása az extinkció értékekre

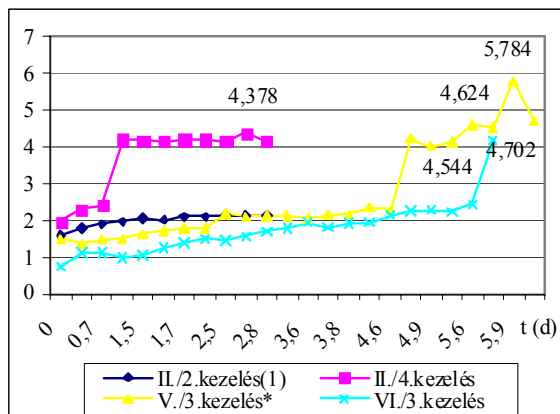


*=1×-i ismétlés(2)

Figure 3: The effect of heat pre-treatment at 140 °C and 1:2 feather:water ratio on extinction rate cell number(1), repeats(2)

Az 1:3-as toll:víz arányú beállítások (4. ábra) közül az V./3-as 1%-os, és a VI./3-as 5%-os bacilus:toll arányú kezelések közepes extinkció értékeket (5,78; 4,54) vettek fel.

4. ábra: A 140 °C-os előkezelés, 1:3-as toll:víz arány hatása az extinkció értékekre



*=1×-i ismétlés(2)

Figure 4: The effect of heat pre-treatment at 140 °C and 1:3 feather:water ratio on extinction rate cell number(1), repeats(2)

Üzemi körülmények között a 140 °C-os kezelés alkalmazása nem gazdaságos, mert nagy energiaráfordítást igényel, és az alkalmazott kezeléskombinációk extinkció értékei alatta voltak a 70 °C-os kezeléseknél tapasztaltaknak.

KÖVETKEZTETÉSEK

Az ideális toll:víz arány megállapításánál keverhetőségi szempontokat és a toll feltáródásának mértékét vettük figyelembe. Az 1:1 toll:víz arányú kezelések mechanikus keverésre alkalmatlannak bizonyultak, tehát üzemi körülmények között való

alkalmazásuk nem javasolt. Az 1:2-es és 1:3-as toll:víz arányú kezelések keverhetősége megfelelő volt laboratóriumi körülmények között. Alkalmazhatóságukat a beállítások extinkció értékeivel meghatározott feltáródás mértékétől tettük függővé.

Az optimális bacilus:toll arány beállításánál annak a minimális átoltsági mennyiségnek a meghatározása volt a célunk, amely mellett még hatékony lesz a baktérium keratinbontása. A beállított 1, 3 és 5%-os bacilus:toll arányok közül az 1 és 3%-osak alkalmazhatónak bizonyultak. Az 5%-os bacilus:toll arány költségtakarékosság szempontjából, és a pH jelentős csökkenése miatt nem előnyös. Mivel az 1 és a 3%-os beállítások feltáródása között nem mutatkozott számottevő különbség a homogenizáltságban, üzemi körülmények között való alkalmazásra a költség- és anyagtakarékosság szempontjából kedvezőbb 1%-os bacilus:toll arányt javasoljuk.

Hőkezelés szempontjából a 70 °C-on előkezelt tollal beállított kezelések extinkció értékei, azaz homogenitása volt a legjobb. Megállapítható, hogy a kezelhetőségi (mechanikus keverhetőség) és gazdaságossági (minimális 70 °C-os előkezelés, baktérium-szükséglet, foszfát-puffer mennyiség) szempontok, illetve az extinkció nagyságából meghatározott bomlás mértékének a figyelembevételével a 70 °C-os előkezelés, 1:3-as toll:víz és 1%-os bacilus:toll arány javasolható leginkább üzemi körülmények közötti alkalmazásra.

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

- Ádám I. (2001): A toll. A baromfittoll és feldolgozása. Scriptor Bt., Budapest
- 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.
- Böckle, B.-Galunsky, B.-Muller, R. (1995): Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. Appl. Environ. Microbiol., 61:3705-3710.
- Bressollier, P.-Letourneau, F.-Urdaci, M.-Verneuil, B. (1999): Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. Appl. Environ. Microbiol., 65(6): 2570-2576.
- Cohlberg, J. A. (1993): The structure of L-keratin. Trends Biochem. Sci. 18, 360-362.
- Dozie, I. N. S.-Okeke, C. N.-Unaeye, N. C. (1994): A thermostabil alkaline active keratinolytic proteinase from *Cryosporium keratinophylum*. Word J. Microbiol. Biotechnol., 10: 563-567.
- Elődi P. (1980): Biokémia. Akadémia Kiadó, Budapest
- Friedrich, A. B.-Antranikian, G. (1996): Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order *Thermotogales*. Appl. Environ. Microbiol. 62, 2875-2882.
- Kevei F.-Kucsera J. (2002): Mikrobiológia I. JATE Press Kiadó, Szeged, 174-178.
- Noval, J. J.-Nickerson, W. J. (1959): Decomposition of native keratin by *Streptomyces fradiae*. J. Bacteriol., 77: 251-263.
- Onifade, A. A.-Al-Sane, N. A.-Al-Mussallam, A. A.-Al-Zarham, 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.

Pesti M. (szerk.) (2000): Általános mikrobiológia. Dialóg Campus Kiadó, Budapest-Pécs.
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, 1509-1515.