

Słowa kluczowe: keratyna piór, keratynazy, bakterie keratynolityczne

Justyna SOBOLCZYK\*, Anna RODZIEWICZ\*, Wojciech ŁABA\*,  
Katarzyna BARANOWSKA\*

## **BIOUTYLIZACJA ODPADÓW KERATYNOWYCH Z PRZETWÓRSTWA DROBIOWEGO PRZEZ MEZO- I TERMOFILNE BAKTERIE**

W pracy oceniano przebieg keratynolizy piór kurzych w monokulturach czterech szczepów bakterii, w tym dwóch mezofilnych *Bacillus cereus* B5esz i *B. subtilis* P22 oraz dwóch termofilnych *Bacillus sp.* T14 i *Bacillus sp.* T16. Dynamikę biodegradacji keratyny określano na podstawie: uwalniania rozpuszczalnych białek, grup aminowych aminokwasów, grup tiolowych, a także poziomu biosyntezy enzymów keratynolitycznych i proteolitycznych. Końcowy stopień degradacji keratyny piór wyrażano wagowym ubytkiem suchej masy substratu po zakończeniu hodowli bakterii.

Przeprowadzone badania wykazały, że bakterie mogą całkowicie upłynnić pierze w czasie sześciu do ośmiu dób trwania hodowli. Przyrost stężenia rozpuszczalnych białek osiągał poziom do 2,43 mg/ml, grup tiolowych 1,36 mM, wolnych aminokwasów 2,28 mM. Keratynolityczne proteazy wydzielane były do środowiska w różnym czasie przez poszczególne szczepy bakterii, a ich aktywność była znacznie wyższa w przypadku bakterii mezofilnych. Osiągały one poziom 13,1 JK (keratynazy) oraz 390 JP (proteazy). Ubytek masy piór w hodowli bakterii mezo- i termofilnych był porównywalny i wynosił odpowiednio 56–78 % oraz 45–82%. Uzyskane wyniki badań sugerują wysoką przydatność bakterii z rodzaju *Bacillus*, zarówno mezo- jak i termofilnych w bioutylizacji keratynowych odpadów z przetwórstwa drobiowego

### 1. WSTĘP

Przemysł drobiarski generuje rocznie kilka milionów ton białkowych odpadów w postaci pierza, które dotychczas nie jest racjonalnie zagospodarowywane. Powolne tempo jego biodegradacji wynika ze zwartej struktury głównego składnika budulcowego, jakim jest keratyna. Przyspieszenie jej utylizacji możliwe jest z udziałem specyficznych keratynolitycznych drobnoustrojów. Zdolności takie wykazują mezo- i termofilne bakterie, zaliczane do laseczek, pałeczek oraz ziarniaków, a szczególnie wiele gatunków z rodzaju *Bacillus*.

---

\* Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,  
ul. Norwida 25/27, 50-375 Wrocław, jsobolczyk@poczta.onet.pl,

Pióra zbudowane są w 95% z białka włókienkowego keratyny, mogą więc być tanim źródłem aminokwasów i peptydów. Taka możliwość wykorzystania pierza ma pewne ograniczenia ze względu na jego niską podatność na działanie większości zwierzęcych enzymów proteolitycznych. Keratyna jest białkiem nierozpuszczalnym, hydrofobowym, o zwartej strukturze utrzymywanej przez liczne mostki disiarczkowe cystyny, wiązania wodorowe i oddziaływania hydrofobowe. Jest to przyczyna jej wysokiej oporności na działanie czynników fizycznych, chemicznych oraz enzymów proteolitycznych. Ponadto keratynowe wyrostki skóry charakteryzuje wielopoziomowa struktura nadająca im wysoką wytrzymałość mechaniczną. Obejmuje ona helisy alfa prawoskrętne uformowane w lewoskrętne superhelisy (protofibryle) które formują mikro- i makrofibryle zanurzone w bezpostaciowej wysokosiarkowej macierzy białek niekeratynowych. Proces keratynolizy białek keratynowych nie jest całkowicie wyjaśniony. Sugeruje się różne jego mechanizmy u organizmów pro- i eukariotycznych. U bakterii przebiega w trzech głównych etapach. W pierwszym następuje redukcja siarki z mostków S-S cystyny za pomocą reduktaz, w kolejnym przebiega proteoliza, a w końcowym etapie zachodzi deaminacja peptydów i utlenienie grup SH [6]. Nieenzymatyczna degradacja keratyn poprzez alkalizację, czy w warunkach wysokiego ciśnienia i temperatury obarczona jest znacznie wyższymi kosztami. Uzasadnione jest zatem szukanie tanich ekologicznych oraz skutecznych metod biodegradacji odpadów keratynowych. Taką alternatywą mogą być keratynolityczne mikroorganizmy. Enzymy proteolityczne pochodzenia mikrobiologicznego powodują zarówno zmiany w strukturze keratyny, czyniąc ją tym samym bardziej podatną na enzymy trawienne zwierząt, jak i wzrost wartości odżywczej przetwarzanych piór, poprzez zwiększenie zawartości białka o te pochodzące z biomasy (w komórkach *Bacillus subtilis* białko stanowi 63% suchej masy) oraz uzupełnienie deficytowych aminokwasów. Ponadto produkty enzymatycznego rozkładu odpadów keratynowych mogą być wykorzystane w przemyśle kosmetycznym, farmaceutycznym, papierniczym, tekstylnym oraz do nawożenia gleby. Przemysł garbarski stosuje proteolityczne keratynazy do odwłaszania skór. Znaczącymi producentami keratynaz oraz proteaz są bakterie z rodzaju *Bacillus* zarówno mezofilne jak i termofilne [1,4].

## 2. MATERIAŁY I METODY

Celem badań w prezentowanej pracy była ocena uzdolnień keratynolitycznych czterech szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus* oraz porównanie możliwości szczepów bakterii mezo- i termofilnych.

**Materiał badawczy** stanowiły cztery izolaty bakterii pochodzących ze składowiska odpadów keratynowych, w tym dwa szczepy bakterii mezofilnych *Bacillus cereus* B5esz i *B. subtilis* P22 oraz dwa termofilnych *Bacillus sp.* T14 i *Bacillus sp.* T16.

Szczepy te znajdują się w kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Utylizowanym odpadem keratynowym były pióra kurze koloru białego, pochodzące z ubojni drobiu.

**Hodowle bakterii.** Prowadzono sześciodobowe hodowle wstrząsane (168 obr./min.), w temperaturze 28°C dla bakterii mezofilnych i ośmiodobowe w temp. 55 °C dla bakterii termofilnych, w kolbach o pojemności 250 cm<sup>3</sup> zawierających po 50 ml podłoża mineralnego o składzie (%): MgSO<sub>4</sub> 0,1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01; CaCl<sub>2</sub> 0,01; FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O 0,001 wzbogaconego YE w ilości 0,05 %. Źródłem węgla i azotu były odtłuszczone pióra kurze w ilości 1%.

**Aktywność enzymatyczna.** Badano pozakomórkowe proteazy i keratynazy zawarte w płynie pohodowlanym pozbawionym biomasy bakteryjnej. **Aktywność keratynolityczną** oznaczono wobec keratyny rozpuszczalnej [9], w pH 7,5, w czasie 20 min, w temperaturze 40°C. Jednostka aktywności (JK) wyraża wzrost absorbancji o 0,01 przy długości fali  $\lambda = 280$  nm w przeliczeniu na cm<sup>3</sup> płynu pohodowlanego na 1 minutę [3]. **Aktywność proteolityczną** oznaczono wobec 1% kazeiny BDH w pH 7,5, w czasie 20 minut, w temperaturze 30° C. Jednostka aktywności (JP) oznacza wzrost absorbancji A<sub>280</sub> o 0,01 w przeliczeniu na cm<sup>3</sup> w czasie 1 minuty.

Obecność **grup sulfhydrylowych** oznaczono kolorymetrycznie według metody Ellmann'a przy pomocy kwasu DNTB [5]. Uwalnianie aminokwasów określano poprzez oznaczanie stężenia **grup aminowych** z użyciem kwasu TNBS [8], natomiast białek metodą Lowry'ego [2].

**Ubytek masy** piór w podłożu oceniano po sześciu dobach hodowli, metodą wagową w temperaturze 105°C .

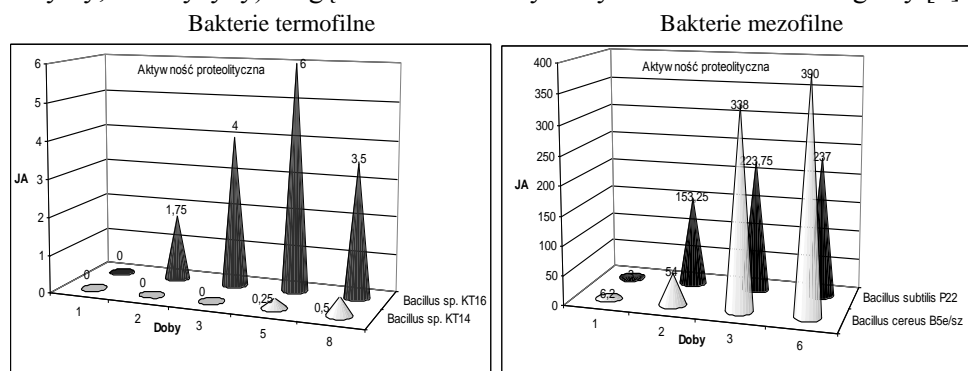
### 3. WYNIKI

Bakterie z rodzaju *Bacillus* zaliczane są do grupy najważniejszych producentów keratynolitycznych proteaz. Najczęściej izolowanymi gatunkami są: *B.licheniformis*, *B.pumilus*, *B.halodurans*. Syntetyzowane przez nie pozakomórkowe proteazy w większości należą do alkalicznych proteaz serynowych, ale równie często są to proteazy cysternowe, czy metaloproteazy [6]. W badaniach wcześniejszych wykazano, że zdolność do keratynolizy wykazują głównie szczepy o wysokich uzdolnieniach proteolitycznych [3]. Białka keratynowe obecne w środowisku mogą być dla bakterii podstawowym źródłem węgla i azotu, dzięki indukcji biosyntezy enzymów uczestniczących w biodegradacji tych biopolimerów.

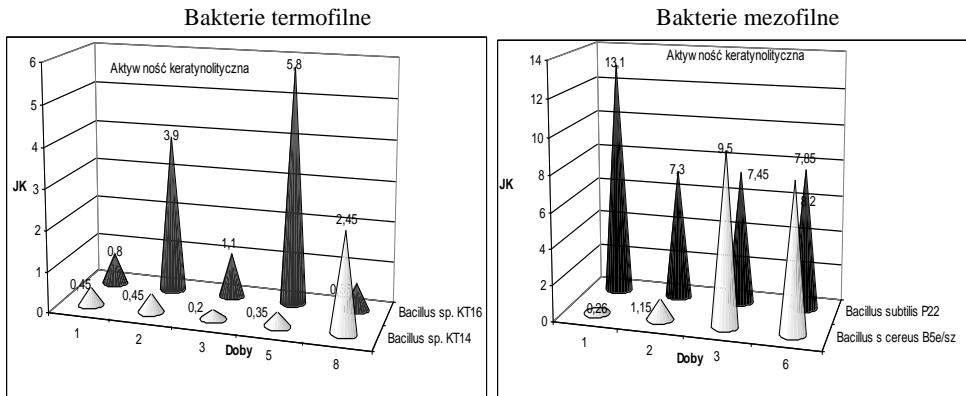
Badane w pracy cztery szczepy bakterii z rodzaju *Bacillus* zarówno mezofile jak i termofile utylizowały keratynę piór kurzych, chociaż w zróżnicowanym zakresie. Jednak największe różnice dotyczyły poziomu aktywności proteaz. Szczepy bakterii mezofilnych *B. cereus* B5e/sz i *B. subtilis* P22 syntezowały enzymy na znacznie wyższym poziomie wynoszącym odpowiednio 390 jednostek i 338 jednostek niż bakterie termofilne *Bacillus sp.* KT14 i KT16, odpowiednio 0,5 i 6 jednostek (rys. 1). Ogólnie aktywność proteolityczna zwiększała się wraz z czasem trwania hodowli

bakterii. Mniejsze rozbieżności wykazano względem aktywności keratynolitycznych, które były na poziomie 7,3–13,1 JK w hodowli *B.subtilis* P22, oraz 0,8–5,8 JK w hodowli termofili *B. species* KT 16 (rys. 2.). Wyznaczniki keratynolizy piór w postaci uwalniania białek rozpuszczalnych, grup aminowych i tiolowych zwiększały się proporcjonalnie wraz ze wzrostem czasu trwania procesu oraz aktywności enzymów. Spośród bakterii termofilnych bardziej aktywny w tym zakresie był szczep *Bacillus sp.* KT16, który uwalniał 2,43 mg/ml białek, 0,035 mM grup aminowych aminokwasów oraz 0,08 mM grup sulfhydrylowych (rys. 3). Na uwagę zasługuje wysoki poziom białka rozpuszczalnego, co może być skutkiem działania wyższej temperatury (55°C), w której prowadzono hodowlę bakterii termofilnych. Skuteczność rozkładu keratyny w wysokim stopniu obrazuje przyrost grup SH, pochodzących ze zrywanych mostków cystyny, z wytworzeniem Cys i Cys-SH (tiocysteiny). Mezofilny szczep *B. cereus* B5e/sz nagromadzał w środowisku 1,36 mM grup SH, 2,75 mM grup NH<sub>2</sub> a także 125 mg/ml białka (rys. 4).

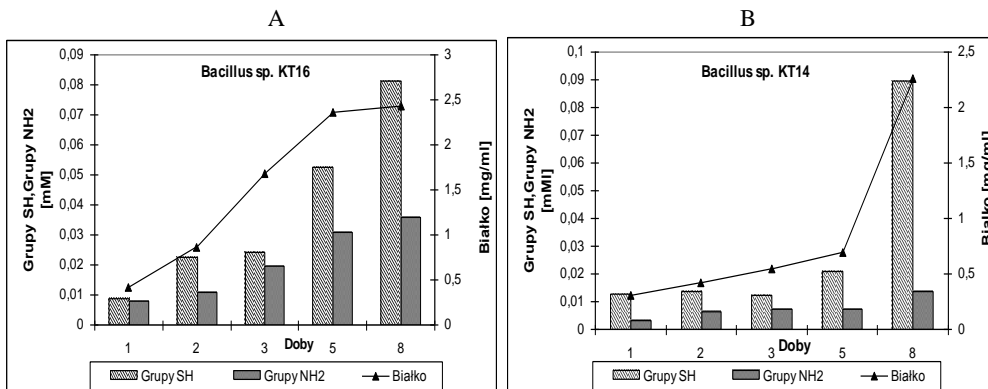
Najbardziej spektakularnym przejawem keratynolizy jest wizualne upłynnienie piór oraz wagowy ubytek masy tego substratu. Końcowy ubytek masy po sześciu dobach trwania procesu mieścił się w zakresie 45–82% (Rys 5). W największym stopniu zdegradował keratynę piór termofilny szczep bakterii *Bacillus sp.* KT16 (82%), oraz mezofilny szczep *B. subtilis* P22 (75%). Pozostałe dwa szczepy degradowały ją w nieco mniejszym stopniu, a mianowicie *B. cereus* B5e/sz w 55%, oraz *Bacillus sp.* KT14 w 45% (rys. 5). Przeprowadzone badania wskazują że proces keratynolizy nie jest dokładnie poznany, gdyż brak korelacji między przebiegiem biodegradacji i jej efektem końcowym sugeruje udział innych czynników, które nie zostały uwzględnione w badaniach. Wysoki stopień biodegradacji keratyny piór przez badane bakterie daje możliwość ich wykorzystania jako szczepionki do kompostowania odpadów keratynowych. Ich szerokie możliwości biosyntetyczne (antybiotyki, enzymy, insektycydy) mogą także znaleźć wykorzystanie w biokontroli gleby [7].



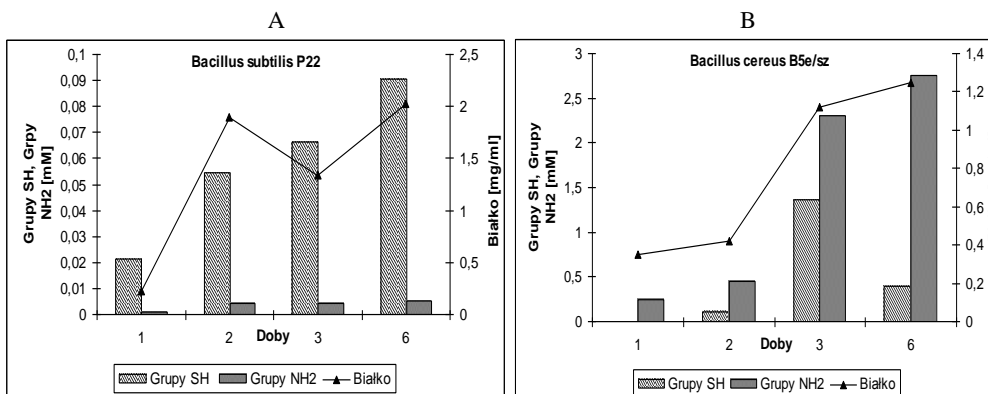
Rys. 1. Biosynteza proteaz przez badane szczepy bakterii



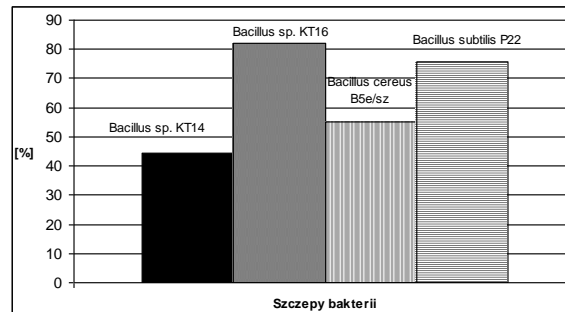
Rys. 2. Biosynteza keratynaz przez badane szczepy bakterii



Rys. 3. Uwalnianie białka, grup aminowych i grup sulfhydrylowych przez bakterie termofilne *Bacillus sp.* (A) KT14 oraz (B)KT16



Rys. 4. Uwalnianie białka, grup aminowych i grup sulfhydrylowych przez bakterie mezofile *Bacillus subtilis* P22 *B.cereus* B5e/sz.



Rys. 5. Końcowy ubytek masy keratyny piór w hodowlach czterech szczepów bakterii z rodzaju *Bacillus*

#### LITERATURA

- [1] Cheng-gang CAI, Bing-gan LOU, Xiao-dong ZHENG, 2007. *Keratinase production and keratyn degradation by a mutant strain of Bacillus subtilis*, J. of Zhejiang University, 9(1):60–67.
- [2] Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. *Protein measurement with the folin phenol reagent*. J. Biol. Chem., 193, 265–275.
- [3] Łaba W. i Rodziewicz A. 2004. *Biodegradacja odpadów keratynowych z przemysłu drobiowego przy udziale bakterii z rodzajów Bacillus i Sarcina*. Acta Sci. Pol.: Biotechnologia, 3 (1–2), 109–120.
- [4] Onifade A.A., Al-Sane N.A., Al-Musallam A.A., Al-Zarban 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*, Bioresource Technology 66 (1998) 1–11.
- [5] Riener C.R., Kada G., Gruber H.J. 2002. *Quick measurement of protein sulphhydryl with Ellman's reagent and with 4,4' – dithiodipyridine*. Anal. Bioanal. Chem., 373, 266–276.
- [6] Rodziewicz A., Łaba W. 2006. *Keratyny i ich biodegradacja*, Biotechnologia, 2 (73), 130–147.
- [7] Rodziewicz A., Łaba W. 2008. *Biodegradation of frater bkeratin by Bacillus cereus in pure culture and compost*, EJPAU, 11(2).
- [8] Snyder S.L., Sobociński P.Z. 1975. *An improved 2,4,6- trinitrobenzenesulfonic acid method for deermination amines.*, Anal. Biochem. 64, 284–288.
- [9] Wawrzkiwicz K. Łobaszewski J., Wolski T., 1987. *Intercellular keratinase of Trichophyton gallinae*, J. Med. Vet. Mycol., 25, 261–268.

#### BIOUTILIZATION KERATIN WASTES FROM POULTRY INDUSTRY BY MESO- AND THERMOPHILIC BACTERIA STRAINS

In this research the keratinolysis of chicken feather was estimated in monoculture of four bacteria strains. Two strains were mesophilic *Bacillus cereus B5esz* and *B. subtilis P22* and two were thermophilic *Bacillus sp. T14* and *Bacillus sp. T16*. Dynamic of keratin degradation was evaluated by estimation of solute protein, amino acid group and keratinolytic and proteolytic enzyme level. Degree of keratin feather degradation was shown as weight loss of dry matter of substratum after ending of cultivation.

Bacteria could liquefied feathers in 6 or 8 days of cultivation. The level of soluble proteins reached 2,43 mg/ml, free amino acid group 2,28 mM, sulphuric 1,36 mM. Keratinolytic proteases were release to environment in different time by tested strains and it activity was much more higher for mesophilic bacteria. It reached level 13,1 U (keratinases) and 390 U (proteases). Weight loss of feather in cultivation of mesophilic and thermophilic bacteria was comparable and it was estimated 56–78% and 45–82%, respectively. Research suggested high usefulness of bacteria from *Bacillus* genus to bioutilization keratin wastes from poultry industry.