

OPTIMALIZACJA WARUNKÓW ROZKŁADU ODPADÓW PIERZA W HODOWLACH GRZYBÓW

T. Kornilłowicz-Kowalska

Akademia Rolnicza, Katedra Mikrobiologii Rolniczej, Pracownia Mikologiczna
ul. Leszczyńskiego 7, 20- 069 Lublin

Streszczenie. Prowadzone badania miały na celu przyśpieszenie tempa rozkładu surowych odpadów pierza przez wybrane grzyby keratynolityczne, glebowego pochodzenia. Doświadczenia prowadzono w warunkach laboratoryjnych, na ogół w 3 tygodniowych hodowlach grzybów, na podłożu mineralno – keratynowym (rozdrobnione pióra). Pióra stosowano jako jedyne źródło C, N i energii. W doborze optymalnych parametrów grzybowej keratynolizy uwzględniono: różne dawki surowych piór, soli mineralnych (fosforany, sole magnezu, wapnia, żelaza, cynku), pH, temperaturę, rodzaj inokulum. Oceny aktywności keratynolitycznej grzybów dokonywano na podstawie: procentowego ubytku masy substratu, uwalniania substancji peptydowych oraz dodatkowo uwalniania N-aminowego i N-amonowego. Optymalizowany skład podłoża zawierał ($\text{g}\cdot\text{dcm}^{-3}$): K_2HPO_4 – 1,5; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; $\text{CaCl}_2\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,015; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,005; pióra kurcząt 10,0; pH 6,5 – 6,8. Optymalną temperaturę inkubacji ustalono w zakresie 20 – 25°C. Najlepszym materiałem inokulacyjnym była zawiesina spor ($10^6\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{g}^{-10}$ piór). Optymalny czas hodowli grzybów wynosił 21 dni.

Zastosowanie optymalnych parametrów rozkładu surowych odpadów piór przez grzyby pozwoliło na około 20 – 30% przyśpieszenie tego procesu. Odpowiadało to ok. 80% - ubytkowi masy substratu w 3 tygodniowych hodowlach grzyba. Do czynników najbardziej przyśpieszających ten proces należały fosforany i jony magnezu (odpowiednio 3 i 10 – krotny wzrost stężenia) przy zastosowaniu 1% koncentracji substratu.

Słowa kluczowe: pióra kurcząt, rozkład, grzyby, optymalizacja.

WSTĘP

W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie pozyskiwaniem aktywnych keratynolitycznie drobnoustrojów dla celów zagospodarowywania bogatych w azot odpadów keratynowych. Efektem tych poszukiwań jest m. in. zastosowanie keraty-

nolitycznej bakterii *Bacillus licheniformis* do przetwarzania piór odpadowych i pozyskiwania preparatów żywieniowych dla kur oraz do utylizacji padłych kur na fermach [2,12,19]. Do silnie keratynolitycznych drobnoustrojów należą także niektóre grzyby glebowe zwane keratynofilnymi [6]. Proces rozkładu odpadów keratynowych przez grzyby jest jednak wielokrotnie wolniejszy niż przez bakterie. Z badań własnych [6] wynika, że całkowita solubilizacja natywnej keratyny piór przez najbardziej aktywne szczepy grzybów wymaga ok. dwóch miesięcy. Tymczasem keratynolityczne bakterie hydrolizują pióra w ciągu kilku dni [2,9].

W niniejszej pracy podjęto próbę skrócenia czasu keratynolizy surowych odpadów pierza brojlerów w stacjonarnych hodowlach wybranych szczepów grzybów keratynolitycznych poprzez dobór optymalnych parametrów keratynolizy.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto 3 szczepy grzybów glebowych z własnej kolekcji szczepów: *Arthroderma quadrifidum* Dawson et Gentles (szczep nr 1), *Arthroderma curreyi* Berk (szczep nr 2), *Chrysosporium pruinosum* (Gilman et Abbott) Carm (szczep nr 3).

Pióra brojlerów przygotowywano zgodnie z metodyką podaną w pracy wcześniejszej [5]: rozdrobnione na ok. 0,5 cm odcinki pióra odtłuszczano w eterze, płukano wodą destylowaną, suszono w strumieniu chłodnego powietrza i sterylizowano metodą gazowania. Podstawowy skład chemiczny piór był następujący (%): C org. – 49,09; N og. – 14,7; S. og. – 3,67; białko – 87,94.

Wszystkie hodowle grzybów prowadzono w podłożach płynnych zawierających roztwór soli mineralnych (100 cm^3) oraz pióra jako jedyne źródło węgla, azotu i energii. Pióra dodawano po sterylizacji roztworu soli mineralnych. Wyjściowy skład podłoża (kontrola) był następujący ($\text{g}\cdot\text{dcm}^{-3}$): K_2HPO_4 - 0,5; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,025; $\text{CaCl}_2\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,025; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,015; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,005; pióra kurcząt - 5,0; pH 6,5. Każdorazowe modyfikacje składu podłoża obejmowały zmianę stężenia 1 składnika. Zastosowano następujące stężenia soli mineralnych ($\text{g}\cdot\text{dcm}^{-3}$): K_2HPO_4 -1,0; 1,5; 2,0; 3,0; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i $\text{CaCl}_2\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,25; 0,5; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,15; 0,3; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; 0,1 i piór-10,0; 20,0 i 30,0. Wpływ pH podłoża analizowano w zakresie 6,5-9,0. Zastosowano 2 formy inokulum: zawiesina zarodników o stężeniu $10^6\cdot\text{cm}^{-3}$ (liczonych w hemocytometrze), oraz homogenat grzybni wegetatywnej o gęstości $10^6\text{ j.t.k}\cdot\text{cm}^3$.

Inkubację hodowli prowadzono w temperaturze: 20°C ; 25°C ; 37°C przez okres 21 dni, a w niektórych przypadkach 42 i 70 dni.

Oceny aktywności keratynolitycznej grzybów dokonywano w oparciu o następujące dodatkowo skorelowane wskaźniki [6]: ubytek (%) masy piór oznaczany metodą Chestersa i Mathinsona [3] w modyfikacji własnej oraz uwalnianie substancji peptydowych metodą Lowryego i in. [13] stosując albuminę wołową jako standard. Ponadto w niektórych kombinacjach doświadczalnych w przesączach pochodzących z analizowano poziom grup aminowych wg Baileysa [1] posługując się krzywą wzorcową sporządzoną dla leucyny oraz zawartość N- amonowego metodą Nesslerera.

WYNIKI BADAŃ

Wykazano, że rozkład natywnej keratyny piór przez badane grzyby przebiegał najszybciej w podłożu zawierającym 1% piór odpadowych. Dalszy wzrost koncentracji tego substratu wywoływał hamowanie tempa keratynolizy, co objawiało się zmniejszeniem stopnia rozkładu piór (Tab.1).

Tabela 1. Wpływ koncentracji substratu keratynowego na tempo keratynolizy w hodowlach grzybów
Table 1. Influence of keratin substrate concentration on the rate of keratinolysis in fungi cultures

| Grzyby | Czas hodowli (dni) | Ilość piór (%) | | | | | | | |
|----------------------|--------------------|----------------|---------|-----|---------|-----|---------|-----|---------|
| | | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | | | | |
| <i>A. quadridum</i> | 21 | 28* | 450,3** | 50* | 468,0** | 37* | 581,0** | 10* | 737,1** |
| | 42 | 47 | 441,2 | 62 | 445,5 | 41 | 482,3 | 27 | 568,1 |
| | 70 | 48 | - | 69 | - | 51 | - | 33 | - |
| <i>A. curreyi</i> | 21 | 30 | - | 52 | - | 34 | - | 19 | - |
| | 42 | 52 | - | 55 | - | 41 | - | 23 | - |
| | 70 | 58 | - | 64 | - | 43 | - | 30 | - |
| <i>Ch. pruinosum</i> | 21 | 44 | - | 66 | - | 54 | - | 43 | - |
| | 42 | 77 | - | 75 | - | 58 | - | 47 | - |
| | 70 | 86 | - | 90 | - | 65 | - | 56 | - |

Objaśnienia: * – ubytek masy piór w %; ** – uwalnianie N-NH₄⁺ w µg·cm⁻³ podłoża; „-” – nie badano.

Tempo rozkładu substratu keratynowego było zależne od wieku hodowli. W podłożu zawierającym 1% piór najszybciej przebiegało w hodowlach 21-dniowych (50-66% ubytek masy odpadu). Uzyskanie tego efektu w podłożu zawierającym 0,5% piór (kontrola) wymagało dwukrotnie dłuższego czasu hodowli (Tab. 1). Z powyższych względów w dalszych doświadczeniach stosowano 1% piór oraz na ogół krótszy czas inkubacji.

Maksimum wykorzystania natywnej keratyny piór przez grzyby stwierdzono w hodowlach zawierających 0,15% KH_2PO_4 ($1,5 \text{ g}\cdot\text{dcm}^{-3}$). Odpowiadało to 68-75% ubytkowi masy odpadu użytego w dawce 1% (Tab. 2). Wpływ fosforanów na uwalnianie substancji peptydowych był słabszy. Dalszy wzrost stężenia fosforanów powodował spadek tempa keratynolizy (Tab. 2). Spośród badanych kationów dwuwartościowych największy wpływ na rozkład piór przez grzyby wywierał poziom jonów magnezu (Tab. 3). Optymalne dla procesu keratynolizy piór stężenie $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ wynosiło 0,025% ($0,25 \text{ g}\cdot\text{dcm}^{-3}$). W obecności wyżej wymienionej koncentracji obserwowano również wytrącanie kryształów soli - najprawdopodobniej fosforanu magnezowo-amonowego (MgNH_4PO_4). W porównaniu z tempem keratynolizy w podłożu wyjściowym (zawierającym 10 – krotnie mniejsze stężenie siarczanu magnezu), szybkość solubilizacji piór wzrastała o około 10 – 20%. Odpowiadało to 70% wyczerpaniu tego substratu w hodowlach 21 – dniowych. Średnio o 50% zwiększało się także uwalnianie peptydów, o 80% uwalnianie N- NH_2 . Najślabiej, bo jedynie o 20% zwiększało się uwalnianie N- NH_4^+ (Tab. 3). Dalszy wzrost stężenia siarczanu magnezu wywoływał spowolnienie keratynolizy piór. Uwidoczniło się to zarówno w procentowym ubytku masy substratu jak i uwalnianiu produktów rozkładu (Tab. 3). W przeciwieństwie do jonów magnezu, 10 – krotny wzrost stężenia jonów wapnia wywoływał nieznaczne przyśpieszenie ubytku masy piór (Tab. 3). W obecności 0,025% $\text{CaCl}_2\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ obserwowano ponadto mętnienie podłoża, co najprawdopodobniej było związane z wytrącaniem nierozpuszczalnego w wodzie fosforanu trójwapniowego. Nieco silniejszy wpływ, wyżej wymieniona koncentracja wywierała na uwalnianie produktów rozkładu natywnej keratyny piór: substancji peptydowych, N-aminowego i N-amonowego. Dalszy wzrost stężenia jonów wapnia podobnie jak jonów magnezu przyczyniał się do hamowania keratynolizy (Tab. 3).

Wzrost stężenia jonów żelaza wywoływał spadek aktywności keratynolitycznej badanych szczepów grzybów (Tab. 3). Natomiast zwiększenie stężenia jonów cynku wywierało niewielkie działanie stymulujące w odniesieniu do ubytku masy piór i uwalniania substancji peptydowych oraz hamowanie procesu amonifikacji (Tab. 3).

Tabela 2. Wpływ różnych koncentracji fosforanów na proces keratynolizy w hodowlach grzybów (hodowle 21 - dniowe)

Table 2. Influence of various phosphates concentration levels on the keratinolytic process in fungi cultures (21 – day old cultures)

| Grzyby | Wskaźniki aktywności keratynolizy – tycznej | g·dcm ⁻³ K ₂ HPO ₄ | | | | |
|-----------------------|---|---|-----|-------|-----|------|
| | | 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | 3,0 |
| <i>A. quadrifidum</i> | a | 49 | 53 | 73 | 69 | 59 |
| | b | 210 | 225 | 269 | 185 | 180 |
| | c | - | - | 10,8 | - | - |
| | d | - | - | 456,9 | - | - |
| <i>A. curreyi</i> | a | 56 | 58 | 68 | 53 | 53 |
| | b | 230 | 238 | 238 | 200 | 215 |
| | c | - | - | 7,6 | - | 3,95 |
| | d | - | - | 468,4 | - | - |
| <i>Ch. pruinosum</i> | a | 60 | 67 | 71 | 56 | 50 |
| | b | 195 | 215 | 237 | 192 | 162 |
| | c | - | - | 10,0 | - | - |
| | d | - | - | 566,7 | - | - |

Objaśnienia: a - ubytek substratu w % , b - uwalnianie substancji peptydowych w $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, c - $\text{N} - \text{NH}_2$ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, d - $\text{N} - \text{NH}_4^+$ w $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$.

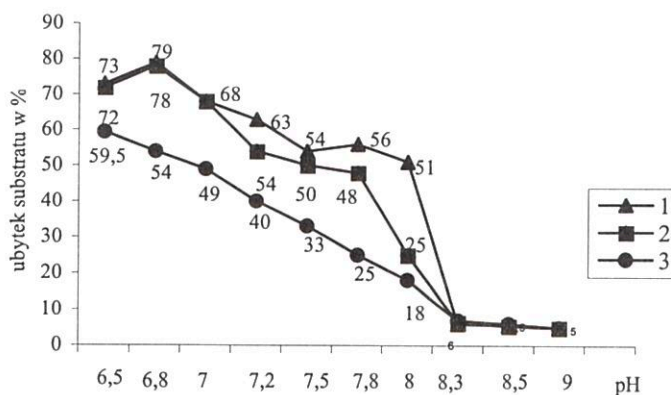
Wykazano (Rys. 1), że rozkład surowych odpadów piór najintensywniej przebiega w podłożu o pH 6,5-6,8. W hodowlach grzybów rosnących w podłożu o zoptymalizowanym składzie oraz pH 6,5-6,8 ubytek masy piór wynosił 60-80%. Wyższymi wartościami pH podłoża towarzyszyło stopniowe hamowanie rozkładu piór aż do całkowitego zahamowania w środowisku alkalicznym (pH \geq 8,0).

Z danych zamieszczonych na Rys. 2 wynika, że rozkład surowych odpadów pierza przez saprofityczne mikrogrzyby glebowe (podłoże po optymalizacji składu) najintensywniej przebiega w temp. 25-30° C. Wzrost temperatury inkubacji do 37°C wywoływał zahamowanie keratynolizy piór w hodowlach wszystkich 3 testowanych szczepów grzybów.

Tabela 3. Wpływ kationów dwuwartościowych na proces keratynolizy i mineralizacji piór odpadowych w hodowlach grzybów
 Table 3. Influence of bivalent cations on the processes of keratinolysis and mineralisation of waste feathers in fungi cultures

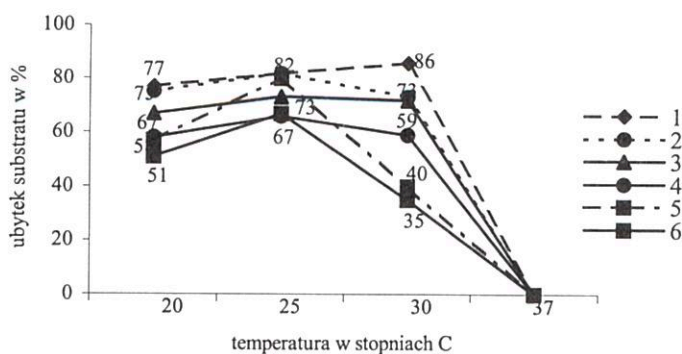
| Grzyby | g·dcm ⁻³ | | | | | | | | | | | | |
|---|--------------------------------------|-----|--------------------------------------|-----|--------------------------------------|-----|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | CaCl ₂ ·7H ₂ O | | MgSO ₄ ·7H ₂ O | | FeSO ₄ ·7H ₂ O | | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | | | | | | |
| Wskaźniki aktywności keratyno-litycznej | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | | | | | |
| | 25 | 5 | 25 | 5 | 15 | 5 | 0,5 | 5 | | | | | |
| <i>A. quadricifidum</i> | a | 49 | 54 | 48 | 49 | 73 | 71 | 49 | 45 | 42 | 49 | 54 | 47 |
| | b | 187 | 269 | 172 | 186 | 302 | 300 | 187 | 208 | 160 | 186 | 204 | 200 |
| | c | 3,3 | 4,9 | 2,7 | 3,3 | 5,6 | 5,3 | 3,0 | 3,7 | 2,8 | 3,2 | 2,8 | 2,3 |
| | d | 466 | 495 | 460 | 464 | 540 | 552 | 466 | 450 | 376 | 464 | 422 | 300 |
| <i>A. curreyi</i> | a | 56 | 59 | 52 | 56 | 71 | 60 | 56 | 68 | 49 | 56 | 60 | 34 |
| | b | 206 | 238 | 178 | 206 | 296 | 248 | 204 | 190 | 159 | 206 | 238 | 206 |
| | c | 3,5 | 5,0 | 2,8 | 3,5 | 4,8 | 3,8 | 3,4 | 4,7 | 4,3 | 3,4 | 3,3 | 2,6 |
| | d | 448 | 495 | 380 | 448 | 08 | 400 | 448 | 405 | 400 | 444 | 413 | 309 |
| <i>Ch. pruinatum</i> | a | 60 | 66 | 45 | 60 | 71 | 57 | 60 | 63 | 46 | 60 | 62 | 34 |
| | b | 187 | 237 | 195 | 184 | 265 | 300 | 187 | 210 | 200 | 186 | 183 | 175 |
| | c | 3,2 | 6,1 | 3,2 | 3,2 | 7,3 | 6,5 | 3,2 | 4,8 | 4,5 | 3,2 | 3,9 | 2,7 |
| | d | 416 | 428 | 402 | 416 | 540 | 500 | 416 | 474 | 388 | 414 | 385 | 321 |

Objaśnienia: a - ubytek substratu w %; b - uwalnianie substancji peptydowych w µg·cm⁻³; c - uwalnianie N - NH₂ w µg·cm⁻³; d - uwalnianie N - NH₄⁺ w µg·cm⁻³.



Rys. 1. Wpływ pH na rozkład natywnych piór przez grzyby: 1-*A. quadrifidum* szcz. nr 2; 2-*A. curreyi* szcz. nr 2; 3-*Ch. pruinusum* szcz. nr 1.

Rys. 1. pH influence on decomposition of native feathers by fungi: 1-*A. quadrifidum* strain nr 2; 2-*A. curreyi* strain nr 2; 3-*Ch. pruinusum* strain nr 1.



Rys. 2. Wpływ temperatury na rozkład natywnych piór przez grzyby: 1-*A. quadrifidum* szcz. nr 2; 2-*A. curreyi* szcz. nr 2; 3-*Ch. pruinusum* szcz. nr 1.

3, 4, 6 – 21 dni (days); 1, 2, 5 – 42 dni (days)

Fig. 2. Temperature influence on decomposition of native feathers by fungi; 1-*A. quadrifidum* strain nr 2; 2-*A. curreyi* strain nr 2; 3-*Ch. pruinusum* strain nr 1.

Tabela 4. Wpływ formy inokulum na rozkład piór odpadowych w hodowlach grzybów*
Table 4. Influence of the inoculum form on the decomposition of waste feathers in fungi cultures*

| Inokulum | Wskaźnik aktywności keratynolitycznej | Czas hodowli (dni) | |
|--|--|--------------------|------|
| | | 21 | 42 |
| 10 ⁶ .spor·cm ⁻³ | a | 78 | 83 |
| | b | 232 | 247 |
| | c | 7,5 | 10,8 |
| | d | 450 | 341 |
| 10 ⁶ .jtk·cm ⁻³ (homogenat grzybni) | a | 70 | 80 |
| | b | 471 | 643 |
| | c | 9,0 | 25,5 |
| | d | 737 | 568 |

*- *A. quadrifidum* szczep nr 2; a – ubytek masy substratu w %; b – uwalnianie peptydów w $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$
 c – uwalnianie N-NH₂ w $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$; d – uwalnianie N-NH₄⁺ w $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$.

Tabela 5. Rozkład piór odpadowych w warunkach nie – optymalizowanych (I) i optymalizowanych (II)
 (hodowle 21 – dniowe)*

Table 5. Decomposition of feather waste in non-optimised (I) and optimised (II) conditions (21 – day old cultures)*

| grzyby | Wskaźniki aktywności keratynolitycznej | I | II |
|-----------------------|---|-----|------|
| <i>A. quadrifidum</i> | a | 49 | 78 |
| | b | 269 | 232 |
| | c | 4,9 | 7,5 |
| | d | 495 | 500 |
| <i>A. curreyi</i> | a | 56 | 76 |
| | b | 236 | 220 |
| | c | 4,9 | 7,3 |
| | d | 495 | 520 |
| <i>Ch. pruinosum</i> | a | 60 | 78 |
| | b | 237 | 360 |
| | c | 6,1 | 14,9 |
| | d | 416 | 434 |

Objaśnienia: a – ubytek substratu w %; b – uwalnianie peptydów w $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$; c – uwalnianie N-NH₂ w $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$; d – uwalnianie N-NH₄⁺ w $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$; *- średnia z 2 doświadczeń.

Przyjmując tempo rozkładu masy piór jako podstawowe kryterium oceny aktywności keratynolitycznej grzybów stwierdzono, że proces ten szybciej przebiegał w hodowlach szczepionych zarodnikami niż grzybnią wegetatywną (Tab. 4). Maksymalny efekt otrzymano po zaszczepieniu hodowli 10^6 spor. Natomiast ilość uwolnionych produktów proteolizy i amonifikacji białek piór była wyższa w hodowlach szczepionych grzybnią w ilości 10^6 j.t.k. (Tab. 4).

Łączne zastosowanie optymalnych parametrów składu podłoża i warunków keratynolizy spowodowało 10-20% przyspieszenie tempa rozkładu piór przez badane grzyby mierzone ubytkiem masy substratu, uwalnianiem substancji peptydowych i $N-NH_4^+$. Natomiast uwalnianie N-aminowego w hodowlach optymalizowanych w porównaniu z wariantem podstawowym było aż o 50-150% wyższe (Tab. 5).

DYSKUSJA

Przeprowadzone badania wykazały, że czynnikiem najbardziej aktywizującym rozkład piór przez grzyby keratynolityczne są fosforany oraz jony magnezu. Wysokie zapotrzebowanie na te składniki należy wiązać z silnie endoergicznym charakterem procesu keratynolizy. Fosforany nieorganiczne są niezbędne do wytworzenia odpowiedniej puli ATP warunkującej wytworzenie enzymów keratynolitycznych oraz struktur morfologicznych uczestniczących w destrukcji natywnej keratyny [6,8]. Page i Stock [18] wykazali, że w hodowlach grzybów keratynolitycznych nieorganiczny fosforan uczestniczy ponadto w przekształceniu niekeratynolitycznej proteazy kiełkowania w keratynolityczną proteazę. Z kolei magnez jest aktywatorem układów enzymatycznych, w szczególności aktywuje mitochondrialną ATP-azę uwalniającą energię w komórkach grzybów [4]. Zbyt niska zawartość tego składnika ogranicza tempo procesów wymagających dostarczenia ATP, a w konsekwencji wzrost i rozwój grzybów. Kunert [10] podaje, że przy niskim poziomie magnezu grzyby keratynolityczne wytwarzają bardzo niewiele grzybni.

W niniejszej pracy odnotowano, że 10-krotna zwyżka stężenia magnezu przyczyniała się do wytrącania w podłożu fosforanu magnezowo-amonowego. Zmniejszało to stężenie $N-NH_4^+$ w podłożu, co przyczyniało się do ograniczenia ulatniania gazowego amoniaku, o czym donoszono w pracy wcześniejszej [7].

Do prawidłowego wzrostu i aktywności keratynolitycznej grzybów niezbędny jest również optymalny zakres stężeń jonów wapniowych. Wykazano, że 10-krotny wzrost stężenia $CaCl_2 \cdot 7H_2O$ wywoływał słabszy efekt niż 10-krotny wzrost $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Wskazuje to na mniejsze zapotrzebowanie grzybów keratynolitycznych na wapń niż na magnez. Kunert [10] podaje, że w metabolizmie grzybów

keratynofilnych wapń uczestniczy w aktywacji i stabilizacji keratynolitycznych proteaz. Enzymy te reprezentują metaloproteazy [14] lub proteazy serynowe [8]. Wyniki wcześniejszych badań własnych [8], wskazują jednak na słaby wpływ jonów wapnia na aktywność keratynolityczną proteaz szczepów *Arthroderma quadrifidum* i *Chrysosporium pruinatum* użytych również w niniejszej pracy.

Z przeprowadzonych badań wynika ponadto, że wzrost stężenia jonów wapnia przyczyniał się do wytrącania nierozpuszczalnego w wodzie $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, a tym samym unieruchamiania fosforu. Z powyższych względów bardziej racjonalnym wydaje się utrzymanie stężenia jonów wapnia na wyjściowym poziomie. Do podobnego wniosku prowadzi także analiza wpływu badanych mikroelementów: żelaza i cynku.

W niniejszej pracy wykazano, że optymalna dla tempa rozkładu piór dawka substratu wynosiła 1%. Podobny efekt w hodowlach bakterii rosnących na piórach odnotowali Martin i So [15]. Zgodnie z zacytowanymi autorami można przypuszczać, że szybsza solubilizacja piór w podłożu zawierającym więcej tego substratu (w porównaniu z kontrolą), spowodowana była lepszym wzrostem grzybów keratynolitycznych. Efekt ten byłby uwarunkowany większą ilością łatwiej dostępnych źródeł C i N przyczyniającą się do wytworzenia większej masy grzybni wegetatywnej, która jak wiadomo bezpośrednio uczestniczy w destrukcji natywnej keratyny.

Spowolnienie, a następnie zahamowanie rozkładu piór przez grzyby przy wzroście dawki substratu do 3% mogło być wywołane zbyt szybkim uwalnianiem N-NH_4^+ powodującym jego akumulację. Wysokie stężenie amoniaku jest inhibitorem syntezy keratynolitycznych proteaz grzybów [16].

Uwalnianie amoniaku, w procesie amonifikacji białek keratynowych piór przez grzyby, przyczynia się do alkalizacji podłoża [6]. Mimo to optymalny zakres pH dla rozkładu natywnych piór przez dermatofity i keratynolityczne grzyby z rodzaju *Chrysosporium* umieścił się w przedziale 6,5 - 6,7. Podobne obserwacje poczynił również wcześniej Kunert [10], który podaje, że optimum pH dla wzrostu dermatofitów wynosi 6,5-7,0. Zdaniem cytowanego autora zbliżony do obojętnego optymalny zakres pH dla wzrostu grzybów keratynolitycznych, przy jednoczesnej możliwości ich wzrostu w słabo alkalicznym środowisku wskazuje na alkalotolerancyjność tych drobnoustrojów.

Optymalny zakres temperatury dla rozkładu piór przez badane grzyby glebowe mieścił się w przedziale 20 - 25°C. Na podkreślenie zasługuje brak wzrostu tych mikroorganizmów w temperaturze 37°C, notowanego w przypadku chorobotwórczych gatunków grzybów keratynolitycznych [17].

Z przeprowadzonych badań wynika, że rozkład natywnych piór przez saprofityczne grzyby przebiegał szybciej, gdy jako inokulum użyto zarodniki zamiast

grzybni wegetatywnej. Efekt ten, jest prawdopodobnie związany ze sposobem zasiedlania przez grzyby keratynolityczne skeratynizowanych substratów. W warunkach naturalnego występowania np. w glebie, grzyby te przeżywają głównie w formie zarodników. Zarodniki są również czynnikiem inwazyjności tych drobnoustrojów, kiełkując na skeratynizowanych substratach w strzępkę rostkową tworzącą grzybnię wegetatywną oraz kompleks tzw. żłobiącego mycelium, penetrujący strukturę natywnej keratyny i uwalniający enzymy keratynolityczne [11,18].

Przeprowadzony w niniejszej pracy dobór optymalnych parametrów składu podłoża oraz warunków hodowli grzybów keratynolitycznych pozwolił na przyspieszenie solubilizacji surowych odpadów keratynowych przez te drobnoustroje średnio o 25%. Ubytek masy substratu po 3 tygodniach hodowli grzybów keratynolitycznych wynosił 76 - 78%.

Z biotechnologicznego punktu widzenia skrócenie czasu trwania keratynolizy piór do 3 tygodni jest niewystarczające. Z powyższych względów bardziej racjonalnym wykorzystaniem grzybów keratynolitycznych jest ich zastosowanie w kompostowaniu odpadów keratynowych. Przemawia za tym również uwalnianie przez te drobnoustroje dużych ilości mineralnych form azotu i siarczanów [6].

WNIOSKI

1. Do czynników najsilniej intensyfikujących rozkład piór brojlerów przez grzyby keratynolityczne należą fosforany i magnez.
2. Optymalne dla procesu keratynolizy stężenie jonów magnezu przyczyniło się w obecności fosforanów do wiązania uwalnianego z piór $N-NH_4^+$ i wytrącania fosforanu magnezowo-amonowego $MgNH_4PO_4$.
3. Tempo keratynolizy osiągało maksimum w obecności 1% piór odpadowych.
4. Lepszy efekt dawało zastosowanie zarodników niż homogenatu grzybni jako inokulum.
5. Glebowe grzyby keratynolityczne najaktywniej hydrolizowały natywną keratynę w środowisku o odczynie zbliżonym do obojętnego (pH 6,5 - 6,8) oraz w temperaturze 20 - 25°C.
6. Optymalizacja warunków grzybowej keratynolizy pozwoliła na ok. 20 - 30% przyspieszenie tempa rozkładu surowych odpadów piór w 3 tygodniowych hodowlach grzyba (ok. 80% ubytek masy substratu).

PIŚMIENNICTWO

1. **Bailey I. L.:** Techniques in Protein Chemistry. Amsterdam, 272, 1962.
2. **Burt E. h. Jr., Ishida J. M.:** Occurrence of feather – degrading bacilli in the plumage of birds. *The Auk*, 116, 364-372, 1996.
3. **Chesters C. G. C., Mathison G. E.:** The decomposition of wool keratin by *Keratinomyces ajelloi*. *Saboraudia*, 2, 225-237, 1963.
4. **Jenkins W. T.:** Yeast mitochondrial F1 – AT Pase – effects of metal ions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 15 (313), 89-95, 1994.
5. **Kornilłowicz T.:** Methods for determining keratinolytic activity of saprophytic fungi. *Acta Mycol.*, 29, 169-178, 1994.
6. **Kornilłowicz-Kowalska T.:** Studies on the decomposition of keratin wastes by saprophytic microfungi. I. Criteria for evaluating keratinolytic activity. *Acta Mycol.*, 32, 51-79, 1997.
7. **Kornilłowicz-Kowalska T.:** Studies on the decomposition of keratin wastes by saprotrophic microfungi. II. Sulphur and nitrogen balance. *Acta Mycol.*, 32, 81 – 93, 1997.
8. **Kornilłowicz-Kowalska T.:** Studies on the decomposition of keratin waste by saprotrophic microfungi. III. Activity and properties of keratinolytic enzymes. *Acta Mycol.*, 34, 65-78, 1999.
9. **Kunert J.:** Biochemical mechanism of keratin degradation by the actinomycetes *Streptomyces fradiae* and the fungus *Microsporium gypseum*: A comparison. *J. Basic Microbiol.*, 29, 597-604, 1989.
10. **Kunert J.:** Physiology of keratinophilic fungi. {In} R. K. S. **Kushwaha, Guarro J.** (Eds), *Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. Revista Iberoamericana de Micología (Supplement) Bilbao*, 77-84, 2000.
11. **Kunert J., Krajci D.:** An elektron microscopy study of keratin degradation by the fungus *Microsporium gypseum* in vitro. *Mycosen*, 24, 485-496, 1981.
12. **Le Fevre A., Ichida J. M., Burt E. H. Jr.:** Effects of *Bacillus licheniformis* on composting of dead chickens. *Clark Ornithology Symp. Life among feathers. Ohio Wesleyan Univ. USA*, 1996.
13. **Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 198, 263-275, 1951.
14. **Łobarzewski J., Grzywnowicz G., Wawrzkiwicz K., Staszczak M., Wolski T.:** Feather keratin as a ligand in an affinity chromatographic technique for isolation of protease from *Trichophyton verrucosum*. *J. Chromatography*, 520, 223-235, 1990.
15. **Martin S. M., So V.:** Solubilization of autoclaved feathers and wood by myxobacteria. *Can. J. Microbiol.*, 15, 1393-1397, 1979.
16. **Meevootison V., Niederpruem D. J.:** Control of exocellular proteases in dermatophytes and especially *Trichophyton rubrum*. *Saboraudia*, 17, 91-106, 1979.
17. **Otcěnasěk M., Dvorak J.:** Ecological classification of dermatophytes. *Mycosen.*, 18, 425 – 434, 1975.
18. **Page W. J., Stock J. J.:** Phosphate mediated alteration of the *Microsporium gypseum* germination protease specificity for substrate enhanced keratinase activity. *J. Bacteriol.*, 117, 422- 431, 1974.
19. **Shih J. C. H.:** Recent development in poultry waste digestion and feather utilization – A review. *Poultry Science*, 72, 1617-1620, 1993.

OPTIMALISATION IN THE CONDITIONS
OF FEATHER DECOMPOSITION IN FUNGI CULTURES*T. Kornilłowicz-Kowalska*Department of Agricultural Microbiology, Mycological Laboratory, Academy of Agriculture
ul. Leszczyńskiego 7, 20-069 Lublin

Summary. The aim of the present study was to increase the decomposition rate of raw feather waste by choosing keratinolytic fungi of soil origin. The experiment was carried out in laboratory conditions on mineral-keratin medium (ground feathers) in three-weeks' old fungi cultures. Feathers were used as the only source of C, N and energy. The following parameters were taken into account while selecting the optimum conditions for fungi keratinolysis: various quantities of raw feathers, mineral salts (phosphates, magnesium, calcium, iron and zinc salts), pH, temperature, type of inoculum. Keratinolytic fungi activity was evaluated on the basis of: percentage decrease of substrate mass, release of peptide substances, additional N-aminic and N-ammonic release. The optimised substrate medium of (in $\text{g}\cdot\text{dcm}^{-3}$): $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 0.5$; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.025$; $\text{CaCl}_2\cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.025$; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.015$; $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0.005$; chicken feathers - 10,0; pH 6.5-6.8. The optimum incubation temperature was established within the range 20 to 25° C. The best inoculation material was a suspension of spores ($10^6\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{g}^{-10}$ of feathers). The optimum fungi breeding time was 21 days.

Application of the optimum decomposition parameters of raw feather waste by fungi, shortened the process by 20-30%. It represented about an 80% loss of substrate mass in three weeks of fungi breeding. Phosphates and magnesium ions belonged to those parameters which hastened the above process most when 1% of substrate was applied. - (3 and 10 times the increase in concentration, respectively).

Key words: chicken feathers, decomposition, fungi, optimalisation.