

## 農畜產 廢棄物 處理를 爲한 低溫耐性 메탄 生成菌의 特性에 關한 研究

### II. 低溫耐性 Clostridia 의 分離

鄭光溶\* · 金才正\*\* · Lacy Daniels\*\*\*

## Study on Low Temperature Tolerant Methane - Producing Bacteria for the Treatment of Agricultural and Livestock Wastes

### II. Isolation of Low Temperature Tolerant Clostridia

Kwang-Yong Jung\*, Jai-Joung Kim\*\*, Lacy Daniels\*\*\*

### Abstract

This study was conducted to investigate the biochemical properties of isolated bacteria, low temperature tolerant methane-producing clostridia which were selected for using them as inoculum to anaerobic fermentation of agricultural and livestock wastes at low temperature. The results were;

1. Low temperature tolerant methane-producing clostridia were isolated from the samples which showed the high methanogenesis rate by enrichment culture at low temperature in cellulose medium. These clostridia, *Clostridium botulinum* SRC-64, *Clostridium scatologens* SRC-91 and *Clostridium tyrobutyricum* SRC-100, were isolated from swampy sediment at latitude 56.9°N, lake sediment IV at latitude 55.0°N, and tidal land soil II at latitude 37.0°N, respectively. The optimum growth temperature for these isolates was 37°C and the minimum, around 10°C. They all had detectable amount of F<sub>420</sub>, specific coenzyme of methanogens.

2. As anaerobic fermentation products of glucose SRC-64 produced H<sub>2</sub>, acetic, isovaleric and caproic acid, SRC-91 produced H<sub>2</sub>, propionic, butyric, valeric, and caproic acid, and SRC-100 produced only acetic and propionic acid. The isolates were produced CH<sub>4</sub> ranged from 2.6 to 8.68 n moles/ml for 2 days at 13°C.

\* 農村振興廳 農業技術研究所(Agricultural Sciences Institute, RDA, Suwon 441-707, Korea.)

\*\* 忠北大學校 農科大學(College of Agriculture, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea.)

\*\*\* Department of Microbiology, University of Iowa, Iowa City, IA 52242, USA.

## 緒 言

有機物이 嫌氣狀態에서  $CH_4$ 와  $CO_2$ 로 最終 分解 되기 위해서는 반드시 酸生成(acidogenic)과 메탄生成(methanogenic) 過程을 거치며 메탄醱酵에 關與하는 메탄 生成菌들은 酸醱酵에 關與하는 菌과 比較하여 그 成長速度가 매우 늦다<sup>1)</sup>. Whitmen<sup>2)</sup>, Zeikus<sup>3)</sup>는 메탄 生成菌이 이용하는 基質은 극히 制限된 範圍 즉 formate, acetate, methanol, methylamine 그리고  $CO_2 + H_2$  가스 뿐이라고 하였으며 그 이외의 有機物은 이용할 수 없으므로 嫌氣條件에서 메탄 醱酵가 進行되기 위해서는 반드시 多糖類 또는 리그닌과 같은 물질을 分解시켜 메탄 生成菌에 基質을 提供하는 다른 細菌들과 共生이 必要하다고 하였다.

Wolfe<sup>4)</sup>도 有機物의 嫌氣分解는 polymers가 monomers로 되고 다시 脂肪酸, alcohol 및  $CO_2$ 와  $H_2$  등의 嫌氣分解 中間 生成物이 되며 그후 메탄 生成菌에 의해  $CO_2$ 와  $CH_4$ 로 最終 分解된다고 하였다. Latman 등<sup>5)</sup>, Laube 등<sup>6)</sup>은 메탄 生成菌을 纖維素 分解菌이나 酸 生成菌과 混合培養하여 위와같은 사실들을 證明 하였다.

Boone 등<sup>7,8)</sup>, Bryant<sup>9)</sup>는 嫌氣醱酵過程에서 生成되는  $CH_4$ 의 약 70%는 acetate 의 methyl 基에서 由來된다고 하였으며 이때의 가스造成은  $CH_4 : CO_2$ 의 百分비가 60 : 40 程度라고 하였다. Hungate<sup>10)</sup>, Mackie 등<sup>11)</sup>은 일반적으로 acetate는  $H_2$ 를 生成하는 酸生成菌에 의해 propionate나 다른 脂肪酸이 分解될때 生成된다고 하였다. 酸生成菌은 絶對 水素 生成菌들로서 Bauchop 등<sup>12)</sup>, Bryant 등<sup>13)</sup>, Scheifinger 등<sup>14)</sup>은  $H_2$ 를 生成하는 酸 醱酵過程은  $H_2$ 의 分壓이 낮을때만 活性을 나타낼 수 있으므로 메탄 生成菌에 의해  $H_2 + CO_2$ 가  $CH_4$ 로 轉換될때  $H_2$ 의 分壓을 낮게 유지시킬 수 있어서 酸 生成菌의 生育이 可能하다고 하여 有機物의 嫌氣分解 과정에서 微生物의 混合培養의 重要性을 강조 하였다.

本 研究에서는 有機物의 嫌氣分解 過程中 酸醱酵

에 關與하는 低溫 耐性 酸生成菌을 分離 이용하기 위하여 亞寒帶 地域 試料에서 分離된 clostridia를 동정하고 몇가지 生化學의 特性을 究明 하였다.

## 材料 및 方法

低溫耐性 酸生成菌 分離을 위한 分離源은 試料自體가 低溫에서  $CH_4$  生成이 旺盛하였던 늪지 堆積物 (Canada, 56.9°N)과 호수 堆積物 IV(Canada, 55.0°N), 갯벌흙 II(Korea, 37.0°N)을 使用하였다.

低溫 耐性 酸生成菌株의 分離를 위해서는 cellulose 培地<sup>6)</sup>를 使用하였다. 菌 分離를 위한 系代 培養法은 分離試料 1ml를 전보<sup>15)</sup>와 같이 27ml 들이 試驗管에 넣고 별도로 準備한 嫌氣培地 10ml 씩을 넣어 1개월간씩 培養하여 가스 發生量과 酸 生成量을 測定한 후 1~3次, 系代하여 低溫(8°C, 13°C)에서 酸과 가스 發生量이 많고 微生物 生育이 양호한 系代 培養液으로부터 Hungate의 roll tube 法<sup>10)</sup>을 變形한 1.5% 한천 배지에서 菌을 순수 분리 하였다.

Roll tube 내에 나타난 colony로 부터 純粹 分離를 위해서는 cellulose 培地 (0.3%의 glucose 含有)에  $N_2 + CO_2$ (80 : 20, v/v)가스 하에서 단일 colony를 分離하여 接種하였다. 菌이 接種된 容器的 가스 壓力은 20 psi로 調節하였으며 生育이 確認 되면 다시 稀釋 roll tube 를 만들어 再分離 하는 方法으로 3回 再 分離하여 顯微鏡 또는 生化學 反應檢査를 통해 菌株의 純粹性을 확인한 후 가스 發生試驗 또는 生化學의 特性檢定 試驗을 遂行하였다. 이와같은 모든 操作은 전보<sup>15)</sup>와 같이 엄격한 嫌氣條件을 유지하면서 遂行하였다.

試驗中 다른 微生物에 의한 汚染을 防止하기 위하여 clostridia는 매 試驗때 마다 單一 colony 로 부터 再 分離하여 使用하였다. 비교시험에 사용된 *E. coli* HB101 은 農村振興廳 遺傳工學研究所, *Methanospirillum* (*Msp.*) *hungatei*와 *Methanosarcina* (*Ms.*) *barkeri* 227은 美國 Iowa 大學校 微生物學科

에서 分讓받아 사용하였다. *Msp. hungatei* 배지는 Ferry 등<sup>16)</sup>의 배지, *Ms. sarcina* 227은 Mah 등<sup>17)</sup>의 배지를 이용하였고 大腸菌은 Holdeman 등<sup>18)</sup>의 PYG 배지를 사용 하였다. 試驗중의 모든 培地는  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 를 還元劑로 最終濃도가 2 mM 이 되도록 添加 하였으며 酸化還元 指示藥으로는 resazurin 을 이용하였다.

菌株의 同定을 위한 形態의 및 生化學的 特性檢定은 Holdeman 등<sup>18)</sup>의 Anaerobic Laboratory Manual, API 20 A Anaerobic System(API Laboratory Products Ltd, Canada)의 方法에 準하여 遂行 하였다.

電子 顯微鏡 촬영은 PYG 固體培地<sup>18)</sup>에 roll tube 하여 20°C에 24 시간 培養한 후 1 % uranyl acetate 로 negative staining 하고 Hitachi-800 電子 顯微鏡으로 檢鏡하였다.

가스 分析은 Shimadzu GC 6-A 와 Shimadzu GC 9-A를 이용하여 전보<sup>15)</sup>와 같은 方法으로 수행 하였다.

醱酵液의 脂肪酸은 Shimadzu GC 6-A 를 이용하여 Salanitro 등<sup>19)</sup>의 分析方法에 準하였으며 분석조건은 다음과 같다. Column은 chromosob W(80 to 100 mesh)에 10 % dexil 300 GC를 입힌 충전체를 넣은 stainless column(3 mm × 1 m)을 사용 하였다. Detector 는 flame ionization detector를 사용하였고, detector 溫度는 270°C로 설정 하였으며 column 溫度는 初期 4 분간은 50°C에 고정시킨 다음 1 분에 10°C 씩 250°C 까지 增加시켰다. Hydrogen, air, nitrogen의 流速은 각각 84, 500, 50ml/min.으로 調節하였다.

메탄 生成菌의  $F_{420}$  螢光強度는 Hitachi(650-10 S) Fluorescence Spectrophotometer를 이용하여 測定 하였다. 培養된 微生物은 즉시 8,000 rpm 에서 10 분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 증류수로 菌體를 懸濁시켜 600 nm 에서 탁도가 0.3-0.5 이 되도록 희석된 용액의 螢光強度를 測定하였다.

## 結果 및 考察

Cellulose 培地를 이용하여 比較的 低溫에 耐性을 갖는 微生物 分離를 위한 系代培養을 실시 하였으나 8°C에서는  $\text{CH}_4$  生成과 微生物의 活性이 너무 낮아 2 次 系代 후 중지 하였으며, 13°C에서는 계속 微生物 活性이 認定되어 1 회에 30 일간 씩 6 개월간 系代한 후 微生物을 分離 하였다. Cellulose 培地에서  $\text{CH}_4$ 를 生成하는 clostridia의 分離는 1.5 % 한천을 첨가한 嫌氣 roll tube 로 하였다. 20 psi 의  $\text{N}_2 + \text{CO}_2(80 : 20, \text{v/v})$ 가스 하에서 13°C에 培養하여 1주일 내에 roll tube 에서 많은 數의 colony를 分離하였는데 이들 大部分이(gram positive, obligate anaerobes, capable of sporulation) 일반적인 clostridia의 特性을 갖고 있었다.

각 分離源중 低溫에서 生育이 빠른 1 菌株씩을 最終 選拔하여 形態의 生化學的 性質에 關하여 調査한 結果는 表 1과 같다. 試驗結果 分離菌株 SRC-64는 *Clostridium botulinum*, SRC-91은 *Clostridium scatologens*, SRC-100은 *Clostridium tyrobutyricum*으로 각각 同定 되었다. 비록 分離菌株들이 低溫地域인 캐나다의 亞寒帶 地域에 棲息하는 菌株들이고 13°C의 低溫에서 分離되었으나 生育 適溫은 3 菌株 다같이 37°C 이었다(그림 1). SRC-64 및 SRC-91은 8-37°C 그리고 SRC-100은 13-37°C에서 生育이 可能하여 低溫耐性을 나타내고 있다. 嫌氣狀態의 土壤 또는 堆積物에서 分離되는 低溫性 嫌氣 微生物은 주로 clostridia로 알려져 있으며<sup>20,21)</sup>, Morita<sup>22)</sup>, Gount 등<sup>23,24)</sup>이 分類한 psychrophilic과 psychrotrophic 微生物의 정의에 의하면 分離된 3種의 clostridia는 生育適溫이 37°C이나 低溫에서도 자라는 性質을 갖고 있으므로 psychrotrophic에 가깝다고 생각된다. Sinclair등<sup>21)</sup>이 土壤과 쓰레기등으로 부터 分離한 psychrotrophic clostridia나, Latman 등<sup>5)</sup>이 分離한 psychrophilic bacillus 보다는 本 試驗에서 分離된 菌의 生育溫度(最低, 最適)가 높은

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of clostridia isolates.

Characteristics	Strains		
	SRC 64	SRC 91	SRC 100
Gram stain reaction	+	+	+
Cell type	rod	rod	rod
Motility	+	+	+
Filaments	-	-	+
H <sub>2</sub> produced	+	+	+
Indole produced	+	-	-
Lecithinase produced	+	-	-
Lipase produced	+	-	-
Esculin hydrolyzed	+	-	+
Gelatin hydrolyzed	+	-	-
Urease produced	+	-	-
Catalase produced	-	-	-
Acid produced from			
Glucose	+	+	+
Manitol	+	+	+
Lactose	-	-	-
Sucrose	-	-	-
Maltose	+	+	-
Salicin	+	-	-
Xylose	-	+	+
Arabinose	-	-	-
Glycerol	+	-	-
Cellobiose	-	+	-
Mannose	+	-	+
Melazitose	-	-	-
Raffinose	-	-	+
Sorbitol	-	+	+
Rhamnose	-	-	+
Trehalose	-	-	-
Name proposed	<i>Clostridium botulinm</i> SRC-64		
	<i>Clostridium scatologens</i> SRC-91		
	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> SRC-100		

것으로 나타났으나, Bhadsavle 등<sup>20)</sup>이分離한 psychrophilic clostridia와는 8-13°C 範圍에서 類似한 生育量을 보여주고 있어 低溫耐性을 갖춘 clostridia로 간주할 수 있었다.

그림 2와 같이 分離菌株들의 適正 pH는 菌株間에

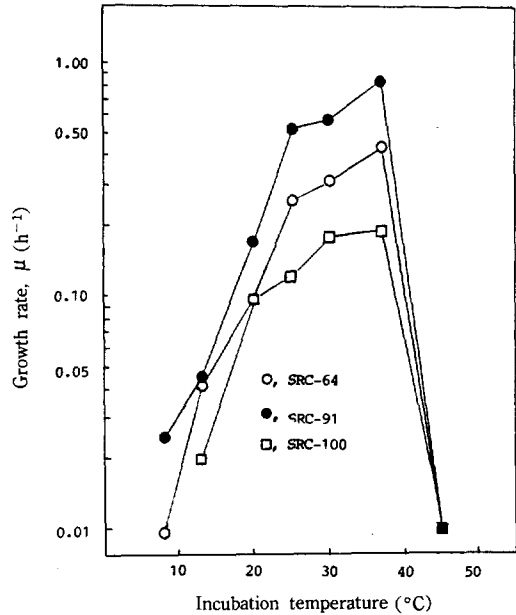


Fig. 1. Effect of temperature on the growth rate of clostridia isolates. Generation time was determined when the most rapid culture reached the stationary phase.

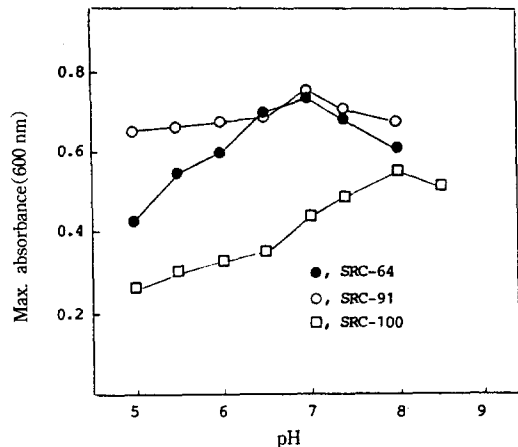


Fig. 2. Effect of pH on growth of clostridia isolates. Max. absorbance at 600nm was determined when the most rapid culture reached the stationary phase.

相異하여 SRC-64, SRC-91 菌株는 7.0 그리고 SRC-100은 8.0으로 높았으며 SRC-64는 pH 5.0 부근에서도 生育이 良好하여 酸性에, SRC-100은 pH 8.5에서도 잘 生育하고 있어 알칼리에 대한 抵抗性을 나타냈는데 이는 本 菌株들이 自然棲息地의 環境因子인 pH에 馴化된 것으로서 Boone<sup>25)</sup>, Svensson 등<sup>26)</sup>의 주장과 잘 一致하고 있으며 실제 SRC-64가 分離된 늪지 堆積物(Canada, 56.9°N)의 pH는 6.8이었고, SRC-100의 分離源은 갯벌흙(Korea, 37.0°N)으로서 7.7로 높았다.

SRC-64는 포도당을 分解하여 表 2와 같이 H<sub>2</sub>, acetic, isovaleric, caproic acid를 分解產物로 生成하였으며, SRC-91은 acetic acid는 生成하지 않는 반면 propionic, butyric, valeric, caproic acid 를 多量 生成 하였다. 3 菌株 다같이 CH<sub>4</sub>를 生成하고 있으며 그량은 SRC-100이 8.68 n moles/ml로 가장 높았고, SRC-64는 7.48 n moles/ml 이었으며, SRC-91은 2.

Table 2. Products from glucose fermentation of clostridium.

Products	Strains		
	SRC 64	SRC 91	SRC 100
H <sub>2</sub> (μ moles/ml)	15.31	8.38	nd
CH <sub>4</sub> (n moles/ml)	7.48	2.60	8.68
Acetic acid (μ moles/ml)	9.09	nd	5.35
Propionic acid ∷	2.24	9.04	5.21
Isobutyric acid ∷	1.22	3.88	tr
Butyric acid ∷	1.83	5.20	tr
Isovaleric acid ∷	5.27	3.20	0.20
Valeric acid ∷	1.32	2.30	tr
Caproic acid ∷	8.96	10.10	tr

\* Incubation temperature was 13°C, 2 day-culture.

60 n moles/ml로 낮았다.

土壤과 堆積物에서 分離한 clostridia에 의한 低溫에서의 CH<sub>4</sub> 生成作用은 本 研究를 통해 確認된 사

Table 3. Effect of some chemicals and methanogenic substrates on growth and methanogenesis of clostridia. (CH<sub>4</sub> n moles/ml)

Treatment	Strains					
	SRC 64		SRC 91		SRC 100	
	A <sup>1</sup>	CH <sub>4</sub>	A	CH <sub>4</sub>	A	CH <sub>4</sub>
N <sub>2</sub> Gas	0.75	2.12	0.84	4.18	0.35	2.68
N <sub>2</sub> ∷ + Br-CoM <sup>2</sup>	0.66	2.00	0.78	3.28	0.35	2.92
N <sub>2</sub> ∷ + Antibiotics <sup>3</sup>	no growth		no growth		no growth	
H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> (80 : 20, v/v)	0.65	3.36	0.56	2.64	0.44	8.68
N <sub>2</sub> + Formate <sup>4</sup>	0.76	2.12	0.95	3.70	0.33	3.58
N <sub>2</sub> + Acetate <sup>4</sup>	0.83	2.60	1.05	4.24	0.36	3.54
N <sub>2</sub> + Methanol <sup>4</sup>	0.74	2.36	0.91	3.40	0.33	2.76

<sup>1</sup> Absorbance at 600nm

<sup>2</sup> Br-CoM was injected by micro-syringe upto the concentration 25mM of total volume of media before autoclaving.

<sup>3</sup> Antibiotics stock solution was prepared into sterilized anaerobic tube by membrane filter(0.22 μm) and injection in medium tube anaerobically 50μg/ml of streptomycin and vancomycin after autoclaving.

<sup>4</sup> The final concentration of formate, acetate, and methanol was 20mM.

The headspace was pressurized to 20psi.

The growth rate and methanogenesis were measured from 2 day-culture at 13°C.

실로서 타 菌株의 汚染與否와 菌株의 純粹性を 立證하기 위하여 3회에 걸쳐 再分離한 후 表 3과 같이 메탄 生成菌 生育 阻害劑인 Br-CoM 과 일반 細菌의 阻害劑인 抗生劑를 사용하여 培養하였다. 3 菌株 다같이 50  $\mu\text{g/ml}$ 의 抗生劑 처리에 의해 生育이 완전히 抑制 되었고 25 mM의 Br-CoM 처리로는 影響을 받지 않음이 確認되었다. 또한 메탄菌이 이용하는 基質인  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ (80 : 20, v/v) 가스와 formate, acetate, methanol을 20 mM 로 添加한 후 菌株의 生育과  $\text{CH}_4$  生成 量을 調査한 결과는 表 3과 같다. SRC-64는  $\text{N}_2$  가스를 사용한 對照區의  $\text{CH}_4$  生成量 2.12 n moles/ml에 비해  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$  가스 添加로 3.36 n moles/ml, acetate 添加에 의해서는 2.60 n moles/ml로 對照區보다 增加 되었다. SRC-91은 acetate 添加에 의하여  $\text{CH}_4$ 가 對照區보다 약간 增加 되었으나  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$  가스, formate, methanol 添加로는 오히려  $\text{CH}_4$  生成이 減少되었다. 그러나 SRC-100은 메탄 醱酵基質들 添加에 의해 모두  $\text{CH}_4$  生成이 增加 되었으며 특히  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$  가스 添加에 의해 8.68 n moles/ml의  $\text{CH}_4$ 가 生成되어 對照區보다 3.24배 높았다. 3 菌株의 最大  $\text{CH}_4$  生成量은 3.36-8.68 n moles/ml로 Belay 등<sup>27)</sup>이 報告한 純粹 메탄 生成菌株의  $\text{CH}_4$  發生效 5.0-7.0  $\mu$  moles/ml 보다 약 600-800배 낮았다. 그러나 메탄菌에 의한  $\text{CH}_4$  生成量은 菌株 最適 生育溫度에서의 측정치이며 本 試驗의 clostridia 는 13°C 培養溫度의 측정치로서 같은 低溫 條件에서는 그 비교치가 달라 지리라 생각 된다. SRC-64와 SRC-100 菌株에서  $\text{H}_2 + \text{CO}_2$  가스 添加에 의해  $\text{CH}_4$  生成이 증가되는 점으로 볼때 clostridia의  $\text{CH}_4$  生成機作도 메탄菌의 機作과 類似하리라 생각되나 이점은 앞으로 究明되어야 할 과제로 생각된다.

分離菌株 SRC-91의 溫度別  $\text{CH}_4$  生成 樣相을 調査하기 위하여 美國 Iowa 大學校에서 分讓받은 *Methanosarcina(Ms.) barkeri* 227과 比較試驗한 결과는 그림 3, 4와 같다.  $\text{CH}_4$  生成量은 37°C, 항온 5일

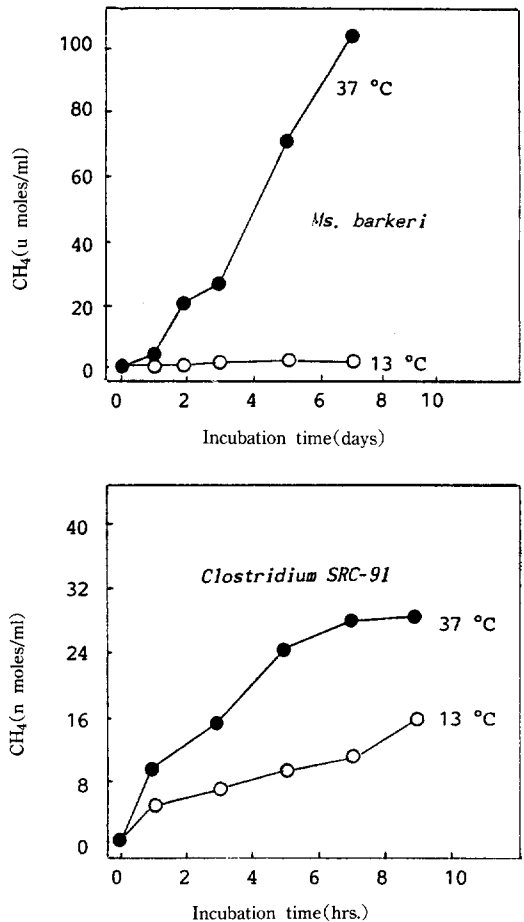


Fig. 3. Methanogenesis by *Clostridium* sp. SRC-91 and *Methanosarcina(Ms.) barkeri* 227 at different temperature, 13 and 37°C.

후에 *Ms. barkeri* 227이 103.8 mmoles/ml 이었고, SRC-91은 37°C, 9시간 培養으로 28.35 n moles/ml의  $\text{CH}_4$ 가 生成되어 2,600 배 낮았으나 13°C, 5일 후의 *Ms. barkeri*는 2.36  $\mu$  moles/ml 그리고 같은 溫度에서 SRC-91은 9시간 培養으로 14.95 n moles/ml로서 158 배 낮았다. 그러나 13°C, 1 일차의 *Ms. barkeri*의 0.25  $\mu$  moles/ml와 비교하면 단지 16.7 배의 차이에 불과 하며 두菌株간의 生長速度를

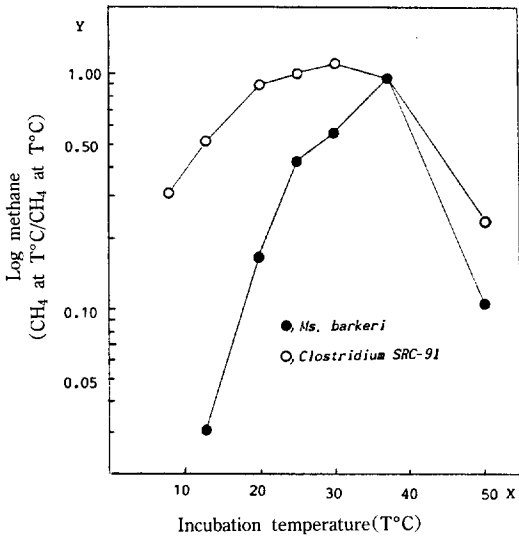


Fig. 4. Relative activity of *Methanosarcina (Ms.) barkeri* 227 and *Clostridium SRC-91* at different temperature to produce methane. The values on the Y axis are a ratio calculate from amount of methane produced at a given temperature divided by the amount of methane produced at 37°C. *Ms. barkeri* was cultured for 7 days and *Clostridium* sp. SRC-91 for 10hrs.

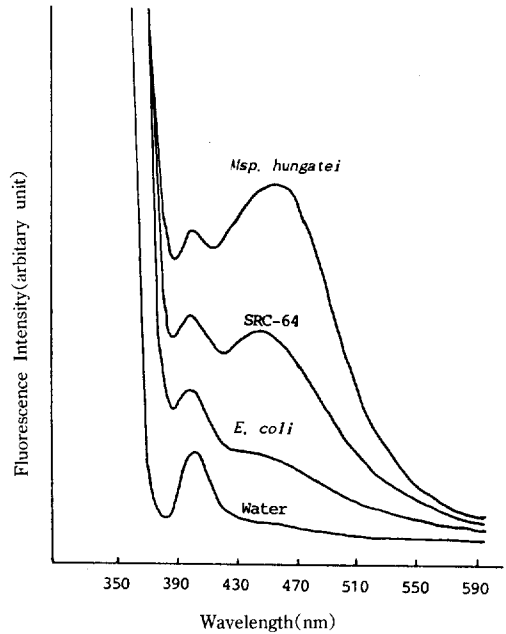


Fig. 5. Fluorescence emission spectra of methanogen and clostridia isolates, comparing with those of *Methanospirillum (Msp.) hungatei* and *Escherichia (E.) coli* HB101.

감안해 볼때 自然界에서 메탄菌이 아닌 一般細菌에 의한 低溫 조건에서 CH<sub>4</sub> 生成作用이 미치는 役割이 크리라 생각된다. 또한 *Ms. barkeri*는 13°C에서는 정상적인 生育이 不可能하므로 이때 生成된 CH<sub>4</sub>는 菌株 接種時에 添加된 10%의 母菌 自體에 의한 CH<sub>4</sub> 生成으로 생각된다. 溫度別 두 菌株간의 CH<sub>4</sub>의 生成은 그림 4와 같이 特徵적인 樣相을 나타내며 *Ms. barkeri*는 37°C 보다 培養溫度가 낮아짐에 따라 CH<sub>4</sub> 生成이 급격히 減少되나 SRC-91은 生育適溫보다 낮은 25, 30°C에서 CH<sub>4</sub> 生成이 높을 뿐만 아니라 8°C 또는 13°C 에서도 *Ms. barkeri* 보다 相對活性이 높았다.

本 試驗에서 分離된 clostridia와 메탄 生成菌 및 大腸菌의 F<sub>420</sub> 螢光強度 測定 結果는 그림 5와 같다.

과장 420이 아닌 440 nm 에서 emission 스펙트럼을 나타내 純粹 精製된 F<sub>420</sub>과 차이를 보이고 있는데<sup>28, 29, 30</sup>이 差異는 本 試驗에서는 精製하지 않은 菌體를 試驗 對象으로 하였기 때문으로 생각된다. F<sub>420</sub>은 모든 메탄 生成菌에 존재하는 특이적 組酵素로서 메탄菌이 아닌 타 細菌에는 존재하지 않는 것으로 밝혀져 있었다<sup>30</sup>. 그러나 Stetter 등<sup>29</sup>에 의해 메탄 生成菌이 아닌 高溫性 황산염 自酸化菌에서 F<sub>420</sub>의 存在가 처음 확인되었으며, 本 試驗에서는 clostridia에서 F<sub>420</sub>의 존재가 확인되어 一般細菌 중에도 메탄 生成菌이 갖고 있는 酵素體系를 一部 所有하고 CH<sub>4</sub>를 副產物로 生成할 수 있음이 究明되었다.

以上の 結果를 綜合하여 볼때 本 試驗에서 分離된 clostridia는 低溫性菌은 아니지만 低溫에 耐性을 갖

고 있는 酸生成菌으로서 메탄 醱酵의 기질인 有機酸과 수소 生成能이 低溫에서도 우수하여 嫌氣醱酵 接種源으로 活用이 가능할 것으로 判斷 되었다. 또한 既存 메탄 生成菌이 활동할 수 없는 低溫에서도 分離된 clostridia는 生育이 可能할 뿐만 아니라 量은 적으나 메탄을 副產物로 生成하는 機能을 소유하고 있었다. 이와같은 특성은 低溫狀態의 嫌氣醱酵 效率 向上을 위해 有用한 材料가 될 수 있을 것으로 생각된다.

### 摘 要

農畜產 廢棄物의 嫌氣的 處理工程에 적용하기 위하여 亞寒帶 地域으로 부터 分離한 clostridia의 生化學的 特性을 調査한 結果는 다음과 같았다.

1. Cellulose 배지로 低溫에 집적培養한 결과 CH<sub>4</sub> 생성이 旺盛 하였던 늪지 堆積物(Canada, 56.9°N), 호수堆積物 IV(Canada, 55.0°N) 그리고 갯벌흙 II (Korea, 37.0°N)에서 酸生成能이 우수하고 동시에 메탄을 生成하는 Clostridia, 즉 *Clostridium botulinum* SRC-64, *Clostridium scatologens* SRC-91 및 *Clostridium tyrobutyricum* SRC-100 을 각각 分離하였다. 分離된 clostridia 3 菌株의 最適 生育溫度는 37°C 이었고 最低 生育溫度는 10°C 정도 이었으며, 그리고 이들 菌株는 특이적 메탄 生成菌의 組酵素인 F<sub>420</sub>을 함유 하였다.

2. 포도당의 嫌氣分解 生成物로서 SRC-64 는 H<sub>2</sub>, acetic, isovaleric, caproic acid 를 生成하였으며, SRC-91 은 H<sub>2</sub>, propionic, butyric, valeric, caproic acid 를, SRC-100 은 acetic 과 propionic acid 를 주로 生成 하였다. 또한 3 菌株 모두 13°C, 2 日 培養條件에서 2.6-8.68 n moles/ml 範圍의 CH<sub>4</sub> 生成能力을 나타냈다.

### 參考文獻

1. 西尾尚道. (1986). 메탄生成菌의 增殖特性とそ

の機能の利用. 醱酵工學. **64**(3) : 181-196.

2. Whitman, W. B. (1985). Methanogenic bacteria. in "The Bacteria", Volume VIII, Academic Press, Inc., New York, 3-85.

3. Zeikus, J. G. (1977). The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriol. Reviews.* **41** : 514-541.

4. Wolfe, R. S. (1983). Fermentation and anaerobic respiration in anaerobic digestion. in "Third international symposium on anaerobic digestion" Evans and Faultner, Massachusetts, USA., 425-427.

5. Latman, M. J., and Wolin, M. J. (1977). Fermentation of cellulose by *Ruminococcus flavefaciens* in the presence and absence of *Methanobacterium ruminantium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**(3) : 297-301.

6. Laube, U. M., Martin, S. M. (1981). Conversion of cellulose to methane and carbon dioxide by triculture of *Acetivibrio cellulolyticus*, *Desulfovibrio* sp. and *Methanosarcina barkeri* *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**(3) : 413-420.

7. Boone, D. R. (1982). Terminal reaction in the anaerobic digestion of animal waste. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**(1) : 57-64.

8. Boone, D. R. (1984). Mixed culture fermenter for simulating methanogenic digesters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**(1) : 122-126.

9. Bryant, M. P. (1979). Microbial methane production-Theoretical aspects. *J. Animal. Sci.*, **48** (1) : 193-201.

10. Hungate, R. E. (1950). The anaerobic mesophilic cellulosic bacteria. *Bacteriol. Review.* **41** : 1-49.

11. Mackie, R. I. and Bryant, M. P. (1981). Metabolic activity fatty acid-oxidizing bacteria and the contribution of acetate, propionate, buty-



- rate, and CO<sub>2</sub> to methanogenesis in cattle waste at 40°C and 60°C. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**(6) : 1363–1373.
12. Bauchop, T., and Mountfort, D. O. (1981). Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**(6) : 1103–1110.
  13. Bryant, M. P. (1963). Symposium on microbial digestion in ruminants : Identification of groups of anaerobic bacteria active in the rumen. *J. Animal Sci.*, **22** : 801–813.
  14. Scheifinger, C. C., Linehan, B. and Wolin, M. J. (1975). H<sub>2</sub> production by *Selenomonas ruminantium* in the absence and presence of methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **29**(4) : 480–483.
  15. 鄭光容, 金才正. (1993). 農畜產 廢棄物 處理를爲한 低溫 耐性 메탄 生成菌株의 特性에 關한 研究. 1. 低溫條件에서 試料別 메탄 生成 機作 研究. *한국환경농화학회지*. **12**(1) : 41–49.
  16. Ferry, J. G., Wolfe, R. S. (1977). Nutritional and biochemical characterization of *Methanospirillum hungatei*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**(4) : 371–376.
  17. Mah, R. A., Smith, M. R. and Baresi, L. (1978). Studies on acetate-fermenting strain of *Methanosarcina*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35** : 1174–1184.
  18. Holdeman, L. V., Cato, E. P. and Moore, W. E. C. (1977). *Anaerobic laboratory manual* 4th Edition. Virginia polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia 24061.
  19. Salanitro, J. P., and Muirhead, P. A. (1975). Quantitative method for the gas chromatographic analysis of short-chain monocarboxylic and dicarboxylic acids in fermentation media. *Appl. Microbiol.*, **29**(3) : 374–384.
  20. Bhadsavle, C. H., Shehata, T. E., and Collins, E. B. (1972). Isolation and identification of psychrophilic species of *Clostridium* from milk. *Appl. Microbiol.*, **24**(5) : 699–702.
  21. Sinclair, N. A., Stokes, J. L. (1964). Isolation of obligately psychrophilic bacteria. *J. Bacteriol.*, **87**(3) : 562–565.
  22. Morita, R. Y. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Review*. **39**(2) : 144–167.
  23. Gount, A. M. (1976). Effect of temperature on the growth of psychrophilic bacteria from glaciers. *Can. J. Microbiol.*, **22** : 839–846.
  24. Gount, A. M. (1986). Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Experientia*. **42** : 1192–1197.
  25. Boone, D. R., Worakit, S., Mathrani, I. M. and Mah, R. A. (1986). Alkaliphilic methanogens from high pH lake sediments. *System. Appl. Microbiol.*, **7** : 230–234.
  26. Svensson, B. H. (1984). Different temperature optima for methane formation when enrichment from acid peat are supplemented with acetate or hydrogen. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**(2) : 389–394.
  27. Belay, N., Sparling, R., Choi, B. S., Roberts, M., Roberts, J. E. and Daniels, L. (1988). Physiological and 15N-NMR analysis of molecular nitrogen fixation by *Methanococcus thermoautotrophicus*, *Methanobacterium brianii* and *Methanospirillum hungatei*. *Biochimica. Biophysica. Acta.*, **971** : 233–245.
  28. 田 梧, 上山 智麻, 稻富 健一. (1986). 메탄菌 電子傳達物質 F420 の 螢光特性을 用いた 메탄菌의 活性 計測法. *發酵工學*. **64**(3) : 197–223.
  29. Stetter, K. O., Lauerer, G. and Thomm, M.

(1987). Isolation of extremely thermophilic sulfate reducers : Evidence for a novel branch of archaeobacteria. *Science*. **236** : 822-824.

30. Eirich, S. D., Vogels, G. D. and Wolfe, R. S. (1979). Distribution of coenzyme F420 and properties of its hydrolytic fragments. *J. Bacteriol.*, **140**(1) : 20-27.