

(11)

製麺工場排水からの水素生成に及ぼす pH の影響

Effect of pH on Hydrogen Production from Noodle Manufacturing Wastewater

水野修***・新谷真史*・鈴木清彦*・矢口淳一***・野池達也***

Osamu MIZUNO***, Masafumi SHINYA*, Kiyohiko SUZUKI*, Junichi YAGUCHI*** and Tatsuya NOIKE***

ABSTRACT: The effect of pH on the hydrogen production from the noodle manufacturing wastewater by anaerobic microflora was investigated using batch experiments with pH control at 35°C. Soluble carbohydrate was the main organic substance in the noodle manufacturing wastewater. The pH was changed from 4.0 to 8.5. The hydrogen yield was significantly influenced by pH. At pH of 5.2, the maximum hydrogen yield was 1.47 mol H₂/mol hexose (0.12 gCOD H₂/g COD hexose) and 12% of COD was converted into hydrogen gas. At pH of 4.5, the hydrogen yield drastically decreased. At pH of 4.0, no hydrogen production was observed and lactate was predominantly produced, suggesting that hydrogenase was inhibited by the low pH. On the other hand, the hydrogen yield gradually decreased with increasing pH from 6.0 to 8.5. The concentrations of acetate and butyrate were changed by pH. In particular, the hydrogen production was accompanied with the butyrate production between pH 4.5 and 8.5. The results indicate that pH is a key factor affecting hydrogen gas recovery from the noodle manufacturing wastewater.

KEY WORDS; anaerobic microflora, hydrogen production, hydrogen yield, noodle manufacturing wastewater, pH

1. 結 論

水素ガス(以後水素と略す)は、燃焼に際して大気汚染物質を発生しないという利点を持っているため、次世代を担うエネルギー源として注目されている¹⁾。水素は無尽蔵であり化石燃料のように枯渇する心配がなく、経済面でも優れている。水素は未来における化石燃料の代替物質のひとつとして有望であると言えるが、現状では生産費用の低い水素を安定して供給するシステムは十分に確立されていない。

一般に水素は天然ガスの改質または水の電気分解によって生産されるが、微生物の代謝過程から回収することも可能である²⁾。この方法では、水素生産に大きなエネルギーを必要としないため、経済的な方法のひとつとして研究が進められており、嫌気性消化プロセスの最終産物であるメタンガスを改質して水素を回収する方法が、一部で既に実用化されている。一方で、嫌気性消化プロセスから直接水素を回収する研究も進められている。代謝過程において水素を生成する微生物は、藻類、糸状菌、嫌気性光合成細菌および嫌気性非光合成細菌である³⁾。特に、嫌気性非光合成細菌は増殖に光を必要としないため、水素の連続生産が行えるという利点を持っている。しかし、Benemann⁴⁾は、生物学的水素生成の効率は10-20%程度であり、経済的に成り立たせるためには60-80%は必要であることを報告している。嫌気性非光合成細菌では理論的に最

*東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 (Department of Civil Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University), **CREST, JST (Japan Science and Technology)

*** 西原環境衛生研究所 (Research and Development Division, Nishihara Environmental Sanitation Research Co., Ltd.)

大でも 33% の収率であるため、紅色非硫黄細菌などの嫌気性光合成細菌を用いて水素収率を向上させる必要がある。

微生物を用いた水素生成に関する研究は、純粋培養細菌およびグルコースなどの純物質を用いた研究が進められてきたが、最近では実用化を考慮して実廃水および有機性廃棄物からの水素回収が報告されるようになってきた。嫌気性非光合成細菌を用いた研究では、稲藁および厨芥⁵⁾、酵素処理した新聞紙⁶⁾、砂糖工場廃水⁷⁾、食品加工廃棄物⁸⁾からの水素回収が報告されている。嫌気性光合成細菌による水素回収では、ヨーグルト廃液⁹⁾を用いた研究などがある。微生物による水素生成に関する最近の知見は、Nandi と Sengupta¹⁰⁾によってまとめられている。

有機物質から水素を回収する場合には、いくつかの重要な環境因子が知られている。水素の生成量は基質濃度、pH、滞留時間、溶存水素濃度などに影響されることが明らかになっており、溶存水素濃度を制御して水素収率を向上させる研究なども報告されている^{11,12)}。しかし、環境因子の影響を検討した研究の多くは純粋基質（グルコース、セルロースなど）および純粋培養細菌を用いており、実廃水から水素を回収する場合、それら環境因子がどのような影響を及ぼすのかは十分に解明されていないのが現状である。

本研究では、製麺工場排水からの水素生成に及ぼす pH の影響を、pH を制御した回分式反応槽を用いて検討した。従来の水素生成の回分実験では、初期 pH のみを考慮し、培養期間中の pH 変化はあまり重要視されてこなかった。しかし、水素生成細菌の代謝経路は pH の変化に伴い刻々と変化することが明らかになっている。水素生成量、水素生成速度および代謝産物組成は培養中の pH 変化に大きく依存しているため、pH を制御する必要があると言える。また、炭酸ナトリウムなど二酸化炭素を発生させる緩衝剤を基質に添加すると、生成ガス量の測定に影響を及ぼすと考えられるため、本研究では水酸化ナトリウム溶液によって pH を制御して実験を行った。

Table 1 Composition of glucose minimal medium.

2. 実験材料および方法	Constituent	Concentration (mg/l)
	NH ₄ Cl	2,600
2.1 水素生成細菌の連続培養	K ₂ HPO ₄	250
	MgCl ₂ •6H ₂ O	125
	FeSO ₄ •7H ₂ O	5.0
	CoCl ₂ •6H ₂ O	2.5
	MnCl ₂ •4H ₂ O	2.5
	KI	2.5
	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0.5
	H ₃ BO ₄	0.5
	NiCl ₂ •6H ₂ O	0.5
	ZnCl ₂	0.5
	glucose	10,000

実験に用いた水素生成汚泥は、大豆塊貯蔵サイロ¹³⁾から採取してグルコース (10g/L) と無機塩で嫌気的に培養したものである。Table 1 に培養に用いた培地の組成を示す。連続培養には Fig. 1 に示したような有効容積 4.4L のアクリルプラスチック製のケモスタット型反応槽を用い、HRT は 8 時間、培養温度は 35℃ に設定した。pH は、pH コントローラを用いて水酸化ナトリウム溶液 (6N) を注入することで 6.0 ± 0.1 に設定した。反応槽の内壁面における細菌の増殖を防ぐために、外壁に磁石を当て、反

応槽内の攪拌子を利用して壁に付着した微生物膜を除去した。Table 2に連続培養の特性を示す。回分実験時の水素生成汚泥のバイオマス濃度は1,090mg/L、生成ガス中の水素および二酸化炭素の割合は、それぞれ59%、41%であった。グルコースは検出されず100%分解されていた。また、生成ガス中にメタンは検出されなかった。液相部における代謝産物は酢酸（1,220mg/l）、プロピオン酸（380mg/l）、酪酸（2,470mg/l）、エタノール（58mg/l）および乳酸（470mg/l）であり、アセトン、プロパノールおよびブタノールは検出されなかった。

2.2 製麺工場排水の性状

Table 3 に製麺工場排水の性状を示す。pHは4.8と低く、主成分は炭水化物であった。採取後の製麺工場排水は冷蔵庫に保存し、回分実験時に35℃に加温して使用した。

2.3 pHを制御した回分式反応槽

Fig. 2 に回分実験に用いたアクリルプラスチック製の反応槽を示す。製麺工場排水 200ml およびFig. 1 に示したケモスタット型反応槽から採取した水素生成細菌培養液100mlを嫌氣的に反応槽に注入し、酸素を除去した窒素で気相部を置換した。特に還元剤は添加しなかった。液相部はマグネチックスターラーで攪拌した。pHはpHコントローラに接続したマイクロチューブポンプを用いて、水酸化ナトリウム溶液(0.6N)を注入することで制御した。pHは4.0-8.5で10段階に変化させた。ガス生成量はガラスシリンジにより定量¹⁴⁾して0℃、1atmに換算した。培養開

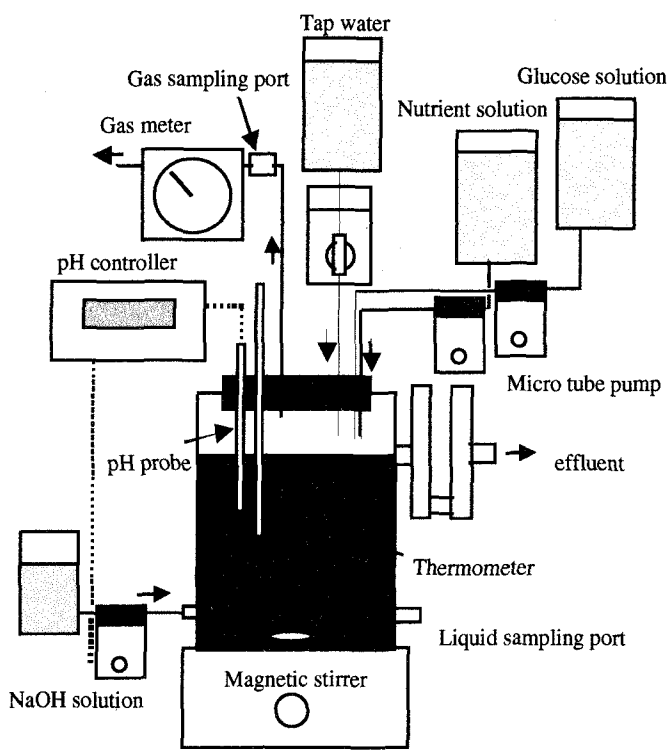


Fig. 1 Experimental setup of a chemostat reactor for maintaining hydrogen-producing bacteria

Table 2 Characteristics of anaerobic microflora culture broth.

H ₂ in produced gas	59 %
Biomass	1,090 mg/l
acetate	1,220 mg/l
propionate	380 mg/l
butyrate	2,470 mg/l
ethanol	58 mg/l
lactate	470 mg/l
glucose	not detectable

始直後からガスは生成が始まり、ガス生成が停止した時点で代謝産物および炭水化物濃度を測定した。培養時間は7-15時間であった。また、ガス生成が停止した後も4時間程度培養を続け以後のガス生成がないことを確認した。液体試料はプラスチックシリンジで引き抜き、試料中の非溶解性物質は遠心分離(14,000 rpm, 3 min)により除去し、上澄を成分分析に用いた。

2.4 分析方法

pH の測定にはガラス電極 pH 計を用いた。グルコース濃度の定量には、グルコース測定キット（グルコーステスト B ワコー, 和光純薬）を用いた。COD_{Cr}, SS, VSS およびバイオマス濃度は、Standard Methods¹⁵⁾に従って測定した。全有機炭素濃度は、全有機炭素計（Shimadzu, TOC-5000A）で測定した。炭水化物濃度はグルコースを標準物質として、フェノール-硫酸法¹⁶⁾で定量した。蛋白質濃度はアルブミンを標準物質として Lowry 法¹⁷⁾で定量した。揮発性脂肪酸濃度は、FID- ガスクロマトグラフ（Shimadzu GC-8A, φ 3.2 × 2.0 m ガラスカラム, Unisole F-200 充填, 試料導入部温度190℃, カラム温度150℃, ヘリウムキャリアガス 1.4kgf/cm²）で測定した。エタノール濃度は、FID- ガスクロマトグラフ（Shimadzu GC-8A, φ 3.2 × 2.0 m ガラスカラム, Gaskuropack 54 充填, 試料導入部温度210℃, カラム温度180℃, ヘリウムキャリアガス 1.4kgf/cm²）で測定した。乳酸濃度は、乳酸測定キット（Diagnostic kit, Sigma）で測定した。生成ガス中の水素の割合は、TCD- ガスクロマトグラフ（Shimadzu GC-8A, 2.0 m ステンレスカラム, Porapak Q 充填, 試料導入部温度100℃, カラム温度70℃, 窒素キャリアガス 1.4kgf/cm²）で測定した。

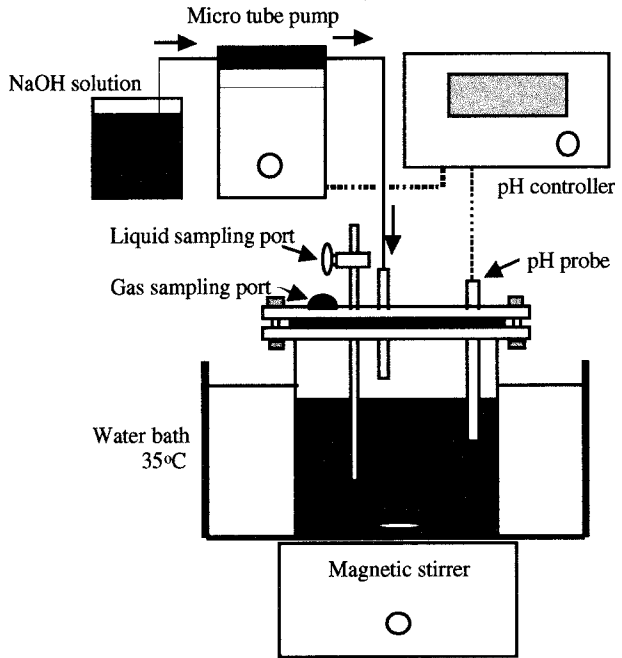


Fig. 2 Experimental setup of batch reactor.

Table 3 Characteristics of noodle manufacturing wastewater.

pH	4.8
Suspended solids	2,090 mg/l
Volatile suspended solids	2,080 mg/l
Carbohydrate	
total	5,620 mg/l
soluble	4,800 mg/l
Protein	
total	320 mg/l
soluble	270 mg/l

3. 結 果

3.1 水素収率および水素生成速度に及ぼすpHの影響

Fig. 3 に水素収率に及ぼすpHの影響を示す。各pH条件において種汚泥のみによるブランク試験を行い、水素量を補正して水素収率を算出した。種汚泥中にはグルコースが検出されず、種汚泥のみからの水素生成は微量であった。また、培養後1時間程度で種汚泥からのガス生成は停止した。pHが4.0の場合、水素は検出されず、二酸化炭素のみが発生した。水素収率は、pHが上昇するに従って大きくなり、pH5.2で最大値になり1.47 mol H₂/mol hexose (0.12 g COD H₂/g COD hexose)であった。pH5.5より高くなると水素収率は低下し、pH6.0-8.5では1.0 mol H₂/mol hexose (0.08 gCOD H₂/g COD hexose)前後であった。Fig. 4 に水素生成速度に及ぼすpHの影響を示す。水素生成速度は、培養初期の累積水素生成曲線の傾きから求めた。水素生成速度はpH5.5で最大値176 ml/l/hになり、それ以上では低下し、pH8.5では19.0 ml/l/hまで低下した。

3.2 炭水化物の除去率に及ぼすpHの影響

Fig.5 に炭水化物の除去率に及ぼすpHの影響を示す。溶解性炭水化物の除去率は、pH4.0以外の条件では90%以上であった。一方、非溶解性炭水化物の除去率は、pH4.0および4.5では低く、それぞれ19%および45%であった。pH5.2および5.5では約60%であり、pH8.5になると41%まで低下した。製麺工場排水中の全炭水化物に占める非溶解性炭水化物の割合は15%程度だったが、分解率は低かった。全炭水化物の除去率は、pH4.0の場合を除けば約80%であった。

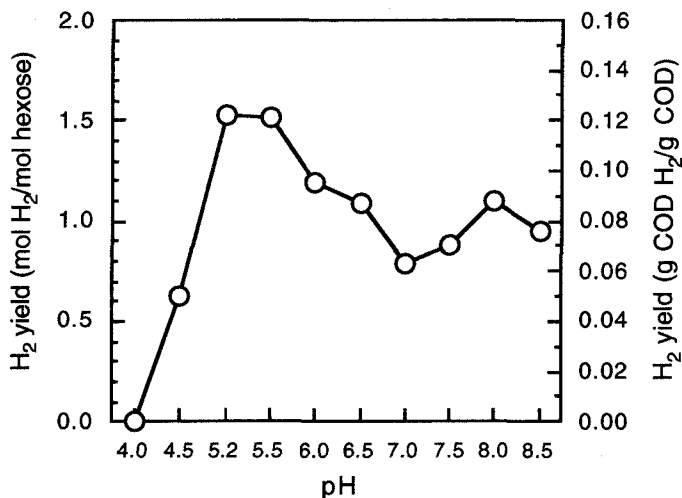


Fig. 3 The effect of pH on the hydrogen yield.

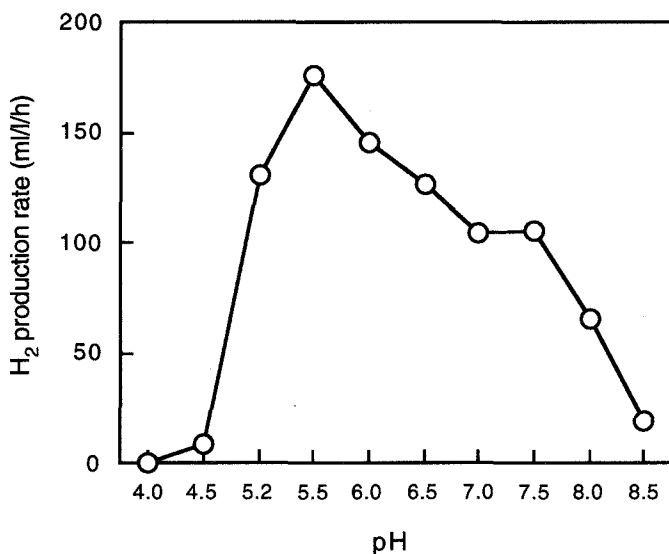


Fig. 4 The effect of pH on the hydrogen production rate.

3.3 代謝産物濃度の変化

Fig. 6 に培養終了時の代謝産物濃度を示す。図中の濃度は、接種汚泥中の代謝産物濃度は初期濃度として除いており、製麺工場排水に含まれる炭水化物の分解から生じた代謝産物を示している。代謝産物濃度にはpHの影響が強く現れており、特に酢酸、酪酸および乳酸濃度に著しい変化が見られた。水素収率が高く、水素生成速度が大きいpH5.2-6.0では、酪酸濃度がピークを示している反面、酢酸濃度は最大ではなかった。水素生成が活発に行われる場合には、酪酸生成を伴う傾向にあった。酢酸はpHが高くなるに従って増大するが、pH7.0より高い場合には低下した。同時に酪酸濃度も低下する傾向にあった。乳酸はpH4.0の場合に大量に生成されたが、pHが4.5より高くなると検出されなくなった。プロピオン酸およびエタノール濃度に大きな変化は見られず、400 mg COD/l以下であったが、pH7.0以上ではエタノール濃度は若干増大する傾向にあった。

3.4 COD収支における水素の割合

Fig.7 に、COD収支に及ぼすpHの影響を示す。COD収支は、代謝産物の組成を明らかにするために消費された全炭水化物を100%として算出した。本実験に用いた水素生成細菌は蛋白質分解能が低く、また培養時間7-15時間程度では蛋白質の分解はほとんど進行しないため炭水化物のみでCOD収支を算出した。水素、揮発性脂肪酸、エタノールおよび乳酸による

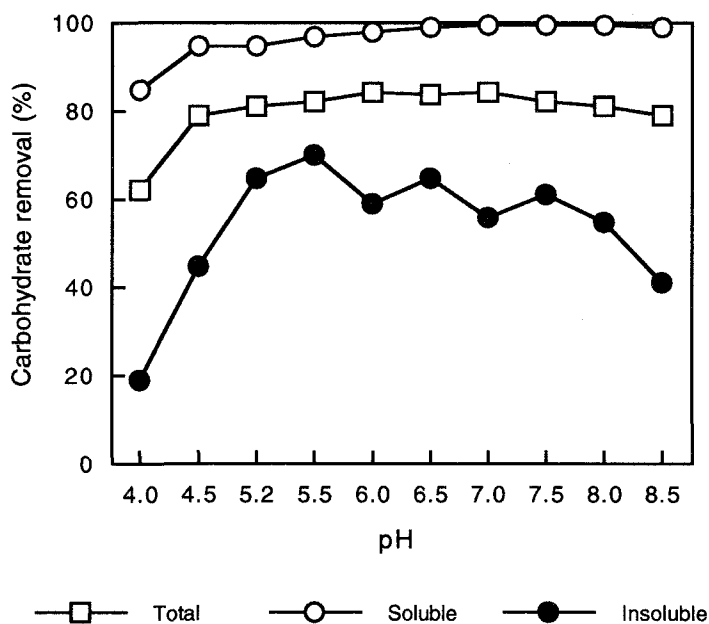


Fig. 5 The effect of pH on the carbohydrate removal efficiency.

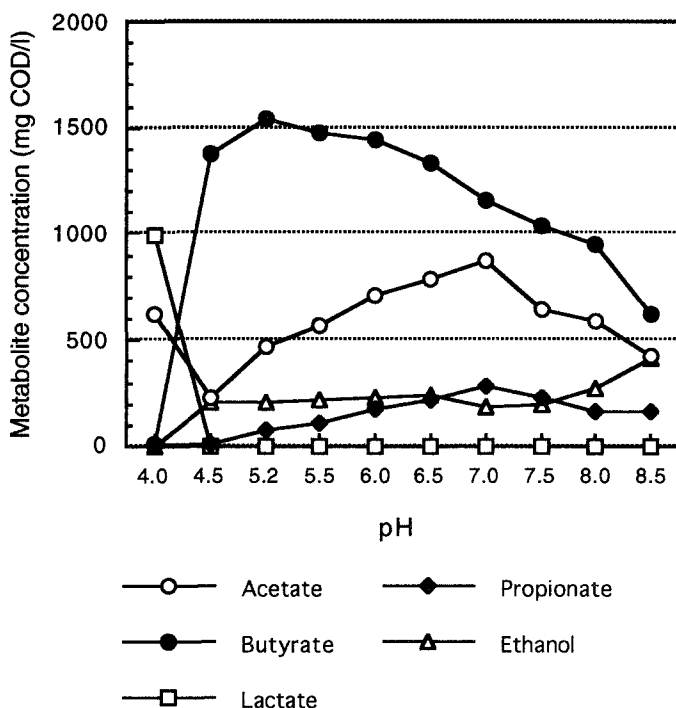


Fig. 6 The effect of pH on the metabolite concentration.

回収率は66-95%であった。本研究では菌体に変換されたCODを考慮していないため、全体的に回収率は低くなっている。また、pH4.0では炭水化物残っていたことが回収率低下の原因であると言える。

水素の占める割合は、pH5.2の場合に最大で12%であった。1molのヘキソースから酢酸 2 mol, 水素 4 mol, 二酸化炭素 2 mol が生成する理想状態（異化代謝のみ）では、水素のCODは33%であるため、本研究では理想状態の値の36%程度であった。

4. 考 察

嫌気性細菌による水素生成は様々な環境因子によって左右されるが、pHはそのひとつであり、水素回収を目的とした場合には重要な因子であると言える。水素を生成する*Clostridium*属などの細菌は、広い範囲のpHで増殖す

ることが可能であることはアセトン・ブタノール発酵の研究¹⁸⁾において良く知られている。純粋培養の細菌に関しては、その代謝経路を詳細に検討した研究が多数見られるが、実廃水に混合培養細菌を接種した場合、水素収率がpHによってどのように変化するかはあまり知られていなかった。本研究のデータは、水素の生成はpHに大きく影響されることを示しており、最大水素収率はpH5.2のときに1.47 mol H₂/mol hexoseであるが、pH4.5では水素収率が急激に低下し、pH4.0では乳酸が大量に生成して水素生成は停止した。pH4.0における乳酸生成は、水素生成の酵素であるヒドロゲナーゼが低いpHによって阻害されたことが原因であると推察される。水素生成量を左右するヒドロゲナーゼの働きはpHにより影響を受けるが、特に低いpH条件では阻害を受けるとされる。Andershr²⁰⁾は、ヒドロゲナーゼの最適pHは8.5であり、6.0より低い場合は活性が低下すると報告している。また、GeorgeとChen²¹⁾は、*Clostridium beijerinckii*を用いた研究で、酸生成状態のヒドロゲナーゼ活性は溶媒生成状態の約2倍であると述べている。一方で、KimとZeikus²²⁾は、水素生成量が低下する原因は、活性の低下ではなくヒドロゲナーゼの生成量が少なくなるためであると報告している。実規模発酵プロセスでは、初期pHを6.2付近に設定し、培養開始後のpHは5.2付近まで低下し、発酵終了時にpHは5.8まで上昇する。Holtら²³⁾は、*C. acetobutylicum*を用いたpHを制御しない回分実験では、初期pH7.0で培養を始めると、5.25で増殖速度の低下に伴い酸生成が停止し、次に酢酸および酪酸を消費しながらアセトンおよびブタノールの生成が始まると述べている。本研究では、pH5.2で水素収率が最大になったが、アセトンまたはブタノールの生成は起こらなかった。これはガス生成が終了した時点で代謝産物濃度を測定したことが原因であると思われる。一般に水素生成には酸生成が伴うため、pHを制御しない場合、水素生成の最適初期pHは7.0-8.0であると考えられる。しかし、pHを制御した本研究では、水素生

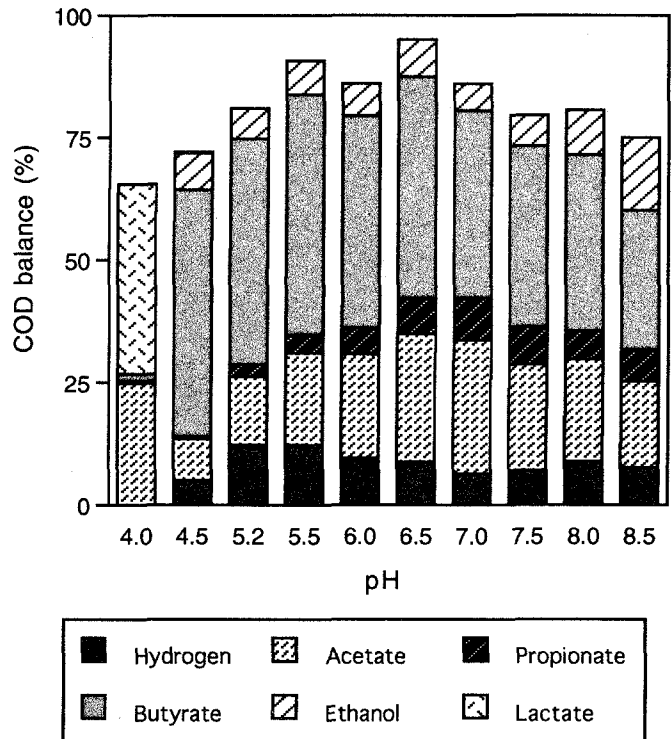


Fig. 7 The effect of pH on the COD balance.

成の最適pHはpH5.2付近であることがわかった。このことから、pH5.2という条件は、水素生成、酸生成および溶媒生成の重要な転換点であると考えられる。製麺工場排水のように夾雑物が混入している場合でも、pHの影響は純粹基質および純粹培養細菌を用いた結果とよく似ていることが明らかにになった。

pHが低い条件では、細菌の代謝経路が酸生成から溶媒生成に変化するという報告が多いが、本研究では酢酸、酪酸および乳酸生成が顕著であった。pH8.5の場合には、酢酸および酪酸の生成量が低下し、エタ

ノール生成量が増大している。pHが高い条件では、酸生成量が低下してエタノール生成量が増大したため、従来のアセトン・ブタノール発酵における代謝経路の変化とは異なっていた。Zoetemeyerら¹⁹⁾は、pH4.5-7.9におけるグルコースからの酸生成実験で、代謝産物の変化を検討し、pHの上昇に伴い酪酸が低下し、酢酸およびエタノールが増大することを見出している。代謝産物生成の傾向は本研究と似ているが、pH6.5、7.0で乳酸生成が起こっている点は異なっている。

Fig. 8に水素収率と酢酸/酪酸比(モル比)の関係を示す。水素生成は酸生成に伴って進行するため、酢酸および酪酸濃度に深く関係していることが知られている。*Clostridium pasteurianum*のグルコース代謝経路の場合、NADH、フェレドキシン、ヒドロゲナーゼを介する水素生成と、ピルビン酸の酸化から生じた還元型フェレドキシン、ヒドロゲナーゼを介する水素生成のふたつの経路がある。水素、酢酸、酪酸の生成は競合しており、培養条件によってそれぞれの生成量に変化するとされる²⁴⁾。van Anđelら²⁵⁾は、*C. butyricum*の培養において水素、酪酸および酢酸の関係を、酢酸/酪酸比で説明している。水素生成はNADH、フェレドキシン、ヒドロゲナーゼを介した反応で進行するが、液相部の水素は飽和状態になり、その結果水素生成反応は抑制され、還元力は酪酸生成に利用される。一方、水素生成が起こらない場合、中間代謝産物であるピルビン酸は酢酸に変換され、ATPの生産により菌体増殖が起こると述べている。従って、液相の溶存水素濃度が増大することにより、水素生成に利用可能な還元力が酪酸生成に流れてしまうと考えられる。窒素曝気をすると水素収率が向上することからも、水素生成に溶存水素濃度が影響していると言える¹³⁾。本研究に用いた水素生成細菌は混合培養系であるため、何種類かの代謝パターンが重なり合っていると考えられるが、水素生成、酢酸生成および酪酸生成の関係は、純粹培養細菌を用いた van Anđel らの結果に似ていた。

回分培養における酢酸/酪酸比は0.66付近であるとされる¹⁸⁾。本研究では、水素収率が高いpH5.2および5.5では、酢酸/酪酸比はそれぞれ0.76、0.97であり、水素収率が低下するpH6.0以上では1.23-1.86となっていた。高い水素収率が得られるのは、酢酸/酪酸比が1.0未満の条件であると推察される。pH4.0の場合、ヒドロゲナーゼが阻害されて大量の乳酸が生成していると考えられるため、還元力は水素および酪酸ではなく乳酸に利用されていると言える。酢酸/酪酸比は極端に高い値で水素生成に有利であるが、他のpH条件

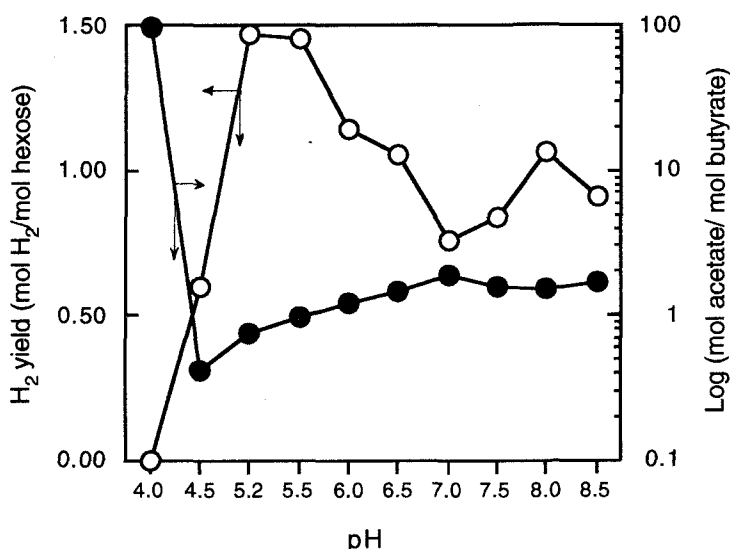


Fig. 8 The relationship between hydrogen yield and acetate/butyrate ratio.

と代謝パターンが全く異なっているため比較は難しい。

本研究で用いた製麺工場排水のpHは4.8であり、水素生成の最適pHに近いため、pH調整に必要なアルカリ剤の消費が少なく済むという利点がある。しかし、本研究の効率は12%であるため、依然としてBenemann⁴⁾が指摘している10-20%の範囲内である。このため、水素収率を向上させるためには、溶存水素濃度など他の因子の制御も行う必要がある。

5. 結 論

以上のようなことから、次のような結論が得られた。

- 1) 製麺工場排水を用いた回分実験において、水素収率はpHの変化により影響を受けた。水素収率はpH5.2で最大値1.47 mol H₂/mol hexose (0.12 g COD H₂/g COD hexose)であり、pH5.2前後では低くなる傾向にあった。pH4.0では、炭水化物は分解されるが水素生成は完全に停止して乳酸が生成したため、ヒドロゲナーゼが阻害を受けていると推察された。水素生成が可能であるpH範囲は4.5-8.5であり、特に5.2付近に最適pHが存在することがわかった。
- 2) 炭水化物分解から生ずる代謝産物の組成はpHによって大幅に変化した。特に酢酸および酪酸の濃度変化が著しく、pHが低い場合には酪酸が、pHが高い場合には酢酸の生成が起こった。プロピオン酸およびエタノール濃度には大きな変化は見られなかった。
- 3) 製麺工場排水から回収される水素の割合は、COD収支で最大12% (pH5.2) であった。このことから製麺工場排水からの水素回収が可能であることが明らかになった。

参考文献

- 1) Bockris, J.O'M.: Hydrogen economy, *Science*, **176**, 1323, 1972.
- 2) Gregory D P: The hydrogen economy. *Scientific American*, **228**, 13-21, 1973.
- 3) Gray, C.T. and Gest, H.: Biological formation of molecular hydrogen, *Science*, **148**, 86-192, 1965.
- 4) Benemann J.: Hydrogen biotechnology: Progress and prospects, *Nature Biotechnology*, **14**, 1101-1103, 1996.
- 5) Oi S., Tamura S., Nakai K., Tanaka T. and Taniguchi M.: Hydrogen and methane fermentation of rice straw and kitchen leftovers. *Journal of Fermentation and Technology*, **60**, 509-515, 1982.
- 6) Roychowdhury, S., Cox, D. and Levandowsky, M.: Production of hydrogen by microbial fermentation, *International Journal of Hydrogen Energy*, **13**, 407-410, 1988.
- 7) Ueno, Y., Otauka, S. and Morimoto, M.: Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture, *Journal of Fermentation and Microbiology*, **82**, 194-197, 1996.
- 8) 水野修, 大原健史, 野池達也: 嫌気性細菌による食品加工廃棄物からの水素生成, 土木学会論文集, No.552/VII-1, 33-41, 1997.
- 9) Zurrer, H. and Bachofen, R.: Hydrogen production by the thermosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*, *Applied and Environmental Microbiology*, **37**, 789-793, 1979.
- 10) Nandi, R. and Sengupta, S.: Microbial production of hydrogen an overview, *Critical Reviews in Microbiology*, **24**, 61-84, 1998.
- 11) Lamed, R.J., Lobos, J.H. and Su, T.M.: Effects of stirring and hydrogen on fermentation products of *Clostridium thermocellum*, *Applied and Environmental Microbiology*, **54**, 1216-1221, 1988.

- 12) Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L. and Noike, T.: Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging, *Bioresource Technology*, **73**, 59-65, 2000.
- 13) ESPRIT Co.,Ltd: Research report of the explosion of soybean-meal in a silo, ESPRIT Co.,Ltd., 1989.
- 14) Owen, W. F., Stuckey, D. C., Healy, Jr., J. B., Young, L. Y. and McCarty, P. L.: Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity, *Water Research*, **13**, 485-492, 1979.
- 15) APHA: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th edn. American Public Health Association, Washington, D.C, 1992..
- 16) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, **28**, 350-356, 1956.
- 17) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.E. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275, 1965.
- 18) Datta, R. and Zeikus, J.G.: Modulation of acetone-butanol-ethanol fermentation by carbon monoxide and organic acids, *Applied and Environmental Microbiology*, **49**, 522-529, 1985.
- 19) Zoetemeyer, R.J., van den Heuvel, J.C. and Cohen, A.: pH influence on acidogenic dissimilation of glucose in an anaerobic digester, *Water Research*, **16**, 303-311, 1982.
- 20) Andersh, W., Bahl, H. and Gottschalk, G.: Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*, *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **18**, 327-332, 1983.
- 21) George, H.A. and Chen, J.-S.: Acidic conditions are not obligatory for onset of butanol formation by *Clostridium beijerinckii* (Synonym, *C. butylicum*), *Applied and Environmental Microbiology*, **46**, 321-327, 1983.
- 22) Kim, B.H. and Zeikus, J.G.: Importance of hydrogen metabolism in regulation of solventogenesis by *Clostridium acetobutylicum*, *Development of Industrial Microbiology*, **26**, 1-14, 1985.
- 23) Holt, R.A., Stephens, G.M. and Morris, J.G.: Production of solvents by *Clostridium acetobutylicum* cultures maintained at neutral pH, *Applied and Environmental Microbiology*, **48**, 1166-1170, 1984.
- 24) Adams, M.W.-W., Mortenson, L.E. and Chen, J.-S.: Hydrogenase, *Biochimica et Biophysica Acta*, **594**, 105-176, 1981.
- 25) van Andel, J.G., Zoutberg, G.R., Crabbendam, P.M. and Breure, A.M. : Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under a self generated gas atmosphere in chemostat culture, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **23**, 21-26, 1985.