

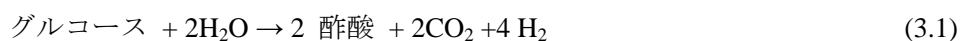
第3章 異なる微生物群集下での乳酸発酵および水素発酵

3-1 概説

本章では、人工生ごみを基質として、同じ水理学的滞留時間（HRT）および有機物負荷率（OLR）の条件下で、固形物滞留時間（SRT）を変化させた連続酸発酵運転を行い、生成物および微生物群集を解析しながらその関係を分析し、また重要な微生物群集に関して定量技術の適用を試みた。

3-2 文献考察

有機性廃棄物の嫌気性消化は、酸発酵およびメタン発酵の二段階に大別出来る。一相式のシステムでは、二段階の反応が同時に単一の反応器内で進行し、その簡単な構成からよく用いられている。対して、二相式のシステムでは、酸発酵およびメタン発酵を別々の反応器で行い、一相式システムよりも利点があるとの報告がある (Lee et al, 2009a; 2009b; Park et al, 2008)。前段の酸発酵では、様々な有機酸、例えば乳酸、酪酸、プロピオン酸、酢酸などに加えて水素が生成する。有機性廃棄物からの水素発酵も広く研究されており、pH、温度、基質や生成物濃度、水理学的滞留時間（HRT）、固形物滞留時間（SRT）などについて最適な条件が提案されつつある(Wang and Wan, 2009)。近年、高温条件下（55℃程度）での水素発酵が、熱力学的に有利なことから注目されつつある(Hallenbeck, 2005)。Akutsu et al. (2008)は、異なる種汚泥を用いた pH 4.9–5.4 でのデンプンの高温水素発酵を報告しており、優占種は *Thermoanaerobacterium* であったこと、ただし一種類の種汚泥についてのみ理由は不明ながら水素生成効率が悪かったことなどを報告している。Shin et al. (2004)は、pH 5.5 における食品廃棄物の高温水素発酵での微生物群集として *Thermoanaerobacterium* および *Desulfotomaculum* を報告しており、*Bacillus coagulans* は検出していない。Ueno et al. (2001)は、OLRが高い条件下でのグルコースからの高温水素発酵で *Bacillus* spp. を検出している。Ueno et al. (2006) は有機性廃棄物の高温水素発酵で、pH が 5–8 の条件下で乳酸はそれほど生成されておらず、pH 6 の条件下で *B. coagulans* を検出しているもののその割合は *Clostridium* spp. および *Thermoanaerobacterium* spp. よりも低いことを報告している。一方で、*B. coagulans* を用いた非滅菌下での簡単な高温 L-乳酸発酵技術が開発されている (Akao et al., 2007a; 2007b; Michelson et al., 2006; Rosenberg et al, 2005; Sakai and Ezaki, 2006)。Akao et al. (2007b)は pH 5.5 および 55℃が生ごみに含まれる *B. coagulans* による L-乳酸発酵に最適であり、他の微生物群集はこの条件下では優占しないことを報告している。グルコースからの水素発酵の反応式は、以下の通りである。





Clostridia による酪酸型の水素発酵での水素収率は、酢酸型に比べて低い。水素発酵の失敗も多数報告されており、典型的な原因は以下に示す乳酸生成である。



水素発酵も有機酸発酵の一種であり、水素発酵および乳酸発酵に対して提案されている最適条件は似ている場合がある。しかしながら、反応に関わる微生物群集や生成物の変化を決定づけるパラメータについては明確にされていない。

酸発酵に関わる微生物群集濃度の測定は、古典的に浮遊物質濃度 (SS)、COD、濁度、タンパク質、全 DNA 濃度などにより行われてきた。しかしながら、これらの測定方法は、生ごみのような複雑な有機性廃棄物を基質とした酸発酵において適切であるとは言い難い。近年は、分子生物学的手法による微生物群集の測定技術が急速に発展している (Cheon et al., 2008)。リアルタイム PCR 法を用いた定量技術も、特定の微生物群集をターゲットにしたプライマーを用いることで可能である。リアルタイム PCR 法の、メタン発酵への適用例が報告されている (Kobayashi et al., 2009; Yu et al, 2006)。Li et al. (2007) は、水素生成菌の測定を、TaqMan 遺伝子プローブを用いておこなっている。Wang et al. (2008a; 2008b) は、水素生成、増殖パラメータ、および分子生物学的手法による定量との関係を報告している。しかしながら、これらは 120 h の回分式実験によるものである。微生物群集と生成物質の関係を連続式の酸発酵反応器で理解することは重要であると考えられる。

そこで本章では、人工生ごみを用いた高温酸発酵の連続運転反応器において、微生物群集と生成物の関係を把握する。HRT および SRT を別々に変化させることで水素生成や酸発酵に与える影響を評価する。微生物群集については、ランダムクローニング法により測定し、反応器の状況を議論する上で重要と考えられた *B. coagulans* については、リアルタイム PCR 法にて定量を行った。

3-3 実験方法

連続実験は、4.5 L の完全混合反応器を用いて行った。運転条件は表 3.1 に示す通りである。ウォーターバスにより 55°C を維持し、10 N NaOH の自動添加制御により pH は 6 に維持した (Nisshinrika, NPH-660)。人工生ごみは、東京での調査結果 (谷川ら, 1997) に基づいて、14 種類の材料を混合して作成した。人工生ごみの組成は、キャベツ 10%、ジャガイモ 10%、大根 10%、白菜 10%、ニンジン 10%、リンゴ 2.5%、オレンジ(皮)7.5%、バナナ(皮)10%、ご飯 10%、パン 2.5%、麺類 7.5%、挽肉 5%、魚 2.5%、卵 2.5% である。人工生ごみの分析結果は表 3.2 に示す通りである。作成した人工生ごみは二倍に希釈して実験に用いた。そ

して一日一回、汚泥を引き抜き基質を添加した。種汚泥は、本研究室にて数年間同じ基質で培養してきたメタン発酵汚泥を用いた。

表 3.1 連続運転条件

		Run 1	Run 2	Run 3
期間	(d)	0–25	26–110	111–300
HRT	(d)	3.5	3.5	3.5
SRT	(d)	10.5	7	3.5
OLR	(gCODcr/(L-reactor·d))	43	43	43
pH	(–)	6	6	6

表 3.2 人工生ごみの分析結果

	全	溶解性
TS (g/L)	189	–
SS (g/L)	120	–
VS (g/L)	179	–
COD (g/L)	292	104
炭水化物 (g/L as glucose)	145	79
タンパク質 (g/L as albumin)	55	15
T-N (mgN/L)	4.8	1.7
pH (–)	4.8	–

有機酸は HPLC (有機酸分析システム, Shima-pack SCR-102H, 島津製作所) により分析した。炭水化物はフェノール硫酸法(Dubois ら, 1956)により測定した。発生ガスとして、二酸化炭素およびメタンは CGT-7000 (島津製作所)により測定した。タンパク質は Lowry 法 (Lowry et al, 1951)により分析した。TSS、SS、VS、T-COD、S-COD などの一般項目の分析は、APHA, AWWA, WEF Standard Method (1995)に従った。全窒素は、ペルオキシ二流酸カリウムの分解後 Auto Analyzer II (BRAN+LUEBBE, Norderstedt, Germany) にて分析した。ここで「T-」は全、「S-」は溶解性を表し、溶解性の試料は孔径 0.45 μ m のフィルターにてろ過した。

反応器内の微生物群集の解析を、Cheon et al. (2008)と同様のランダムクロニング法で試

みた。DNA 抽出は、DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) を利用し Lysis 法に基づいてサンプリング直後に行った。電気泳動により抽出 DNA を確認した後、それを鋳型 DNA として PCR を行った (PTC-200、MJ research)。PCR は、TaKaRa の premix taq 酵素、ならびに大半の真正細菌・真核細菌・古細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象とする Univ.519F-Univ.1406R プライマー (Lane, 1991) を用いた。PCR 条件は、94°C×4 分 + (94°C×1 分 + 60°C×1 分 + 72°C×1 分) ×30 サイクル + 72°C×10 分とし、900 bp の目的バンドを確認した。回収・精製後、TA-cloning を行い、シーケンス解析 (Univ.519F プライマー) を行った。シーケンス解析は、タカラバイオのジェノミクスセンターのシーケンシングサービスを利用した。得られたデータは、ほとんどシーケンス長 600~700bp 程度であり、相同性検索プログラム (BLAST ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) (Altschul et al., 1991)により解析した。相同性 98%以上で、操作的分類単位 (OTU) を分類した。

定量プライマーは、*B.coagulans* を特定しうるよう設計された BACO186F (gcatggaggaaaaggaa)および BACO447R (cccggcaacagagtttta) を使用した(Hidaka et al., 2010)。大半の真正細菌・真核細菌・古細菌の 16S rRNA 遺伝子を対象とする Univ.519F-Univ.1406R プライマー (Lane, 1991) による全菌の測定も行った。16S rRNA 遺伝子の定量は、蛍光色素 (SYBR Green I、Roche) によるリアルタイム PCR で行った (Light Cycler 1.2、Roche)。PCR 条件は、95°C×10 分 + (95°C×10 秒 + 60°C×10 秒 + 72°C×30 秒) ×30 サイクルとした。外部標準 DNA 溶液は混合液より抽出された DNA 溶液を用いて PCR によって DNA を増幅することで作成し、その DNA 濃度は吸光度の測定により決定した (ND-1000、NanoDrop)。これにより作成された検量線を用いて、サンプル中に含まれる DNA 濃度を決定した。

3-4 結果

3-4-1 酸発酵特性

連続運転結果を図 3.1 に示す。Other SCOD は、有機酸以外の SCOD 成分を表し、SCOD の測定結果から、分析した有機酸濃度を差し引くことで求めた。TCOD および SCOD はそれぞれ 140 および 90 gCOD/L 程度であった。固形性成分および全有機酸濃度は実験期間中おおむね一定であった。これは、固形性有機物の可溶化反応がほぼ一定であったことを意味する。他の SCOD 成分は Run 3 で 10 gCOD/L 程度に増加した。これは、可溶化自体は変化しなかったものの、酸発酵反応の進行が遅れ、より分子量の大きな SCOD 成分が、低い SRT 条件下では残存したことを意味する。生成ガスの成分は主として二酸化炭素および水素であり、メタンは検出されなかった。酢酸、プロピオン酸および吉草酸濃度はおおむね 5 gCOD/L 以下であり、生成した有機酸は主として酪酸および乳酸であった。Skiadas et al.

(2000) は、グルコースがまず乳酸もしくは不明な中間物質にまず変換されるという数理モデルを提示しており、乳酸は特に高負荷条件下で重要な生成物であることを述べている。本研究では、HRT を 3.5 d に固定し、高負荷率の条件が維持された。そして、酸発酵はプロピオン酸や酢酸までは進行しなかった。Run 2 の初期には、生成物の組成が大幅に変化したものの、Run 2 の終盤および Run 3 の初期での状況は類似していた。これより、Run 1 の SRT 10.5 d は、Run 2 の SRT 7 d および Run 3 の SRT 3.5 d での生成物と異なる状況を決定づける限界値であったと考えられる。図 3.2 に、平均有機酸濃度および水素生成状況を示す。有機酸組成は、特に酪酸および乳酸が劇的に変化した。酪酸発酵は Run 1 の長い SRT 条件下で進行し、SRT を短くするに従い Run 3 では乳酸生成が増加し、酪酸および水素生成は低下した。Noike et al. (2002) は、乳酸生成菌と水素生成菌が競合しており、生成物の傾向は相反することを示している。この傾向は本研究の乳酸および水素生成の傾向に一致している。SRT は、有機酸および水素生成を決定づける重要な因子の一つと考えられる。

3-4-2 微生物群集

微生物群集の解析結果を表 3.3 にまとめて示す。ほとんどの OTU は、*Firmicutes* に属しており、*Actinobacteria*、*Bacteroidetes*、*Proteobacteria* および *Thermotogae* に属する OTU も検出された。Run 1 では 78% の OTU が *Clostridium spp.* に近縁で、平均相同性は 97% であった。Run 2 では、約半分の OTU が *Bacillus spp.* に近縁であったものの、*B. coagulans* には近縁でなく、残り半分の OTU は、*Clostridium spp.* に近縁であった。Run 3 では、ほとんどの OTU が、*B. coagulans* に近縁で、平均相同性は 99% であった。*Lactobacillus spp.* に近縁で平均相同性 99% の OTU も *Firmicutes* の中で検出されたものの、その割合は低かった。Run 1 から Run 3 にかけて、微生物群集は *Clostridium spp.* から *Bacillus spp.*、特に *B. coagulans* に変化した。本研究では、他の食品廃棄物を対象とした水素発酵の研究でよく報告されている *Thermoanaerobacterium* が、Run 3 の 1 サンプルでのみ検出されただけである。

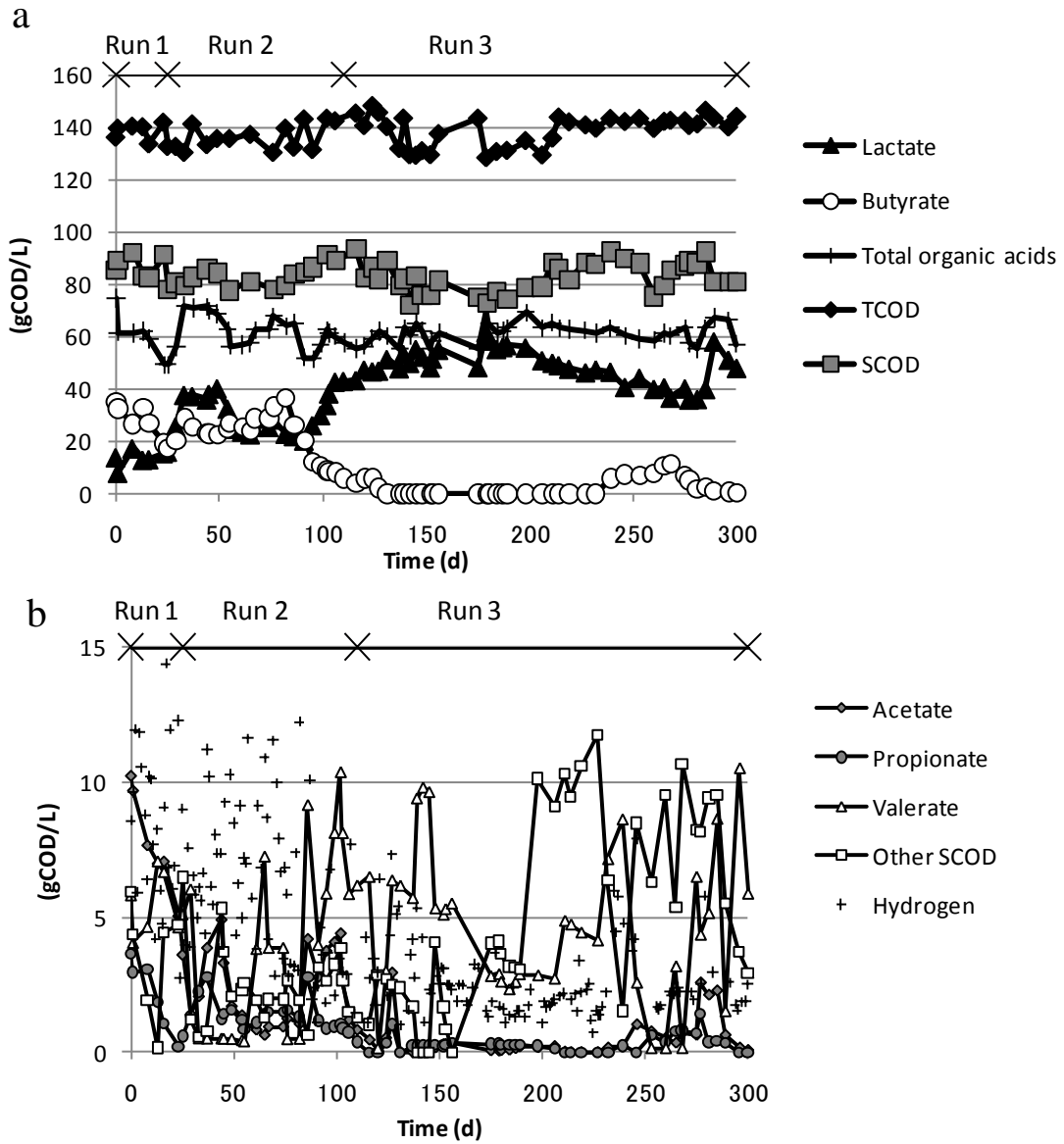


図 3.1 連続運転結果

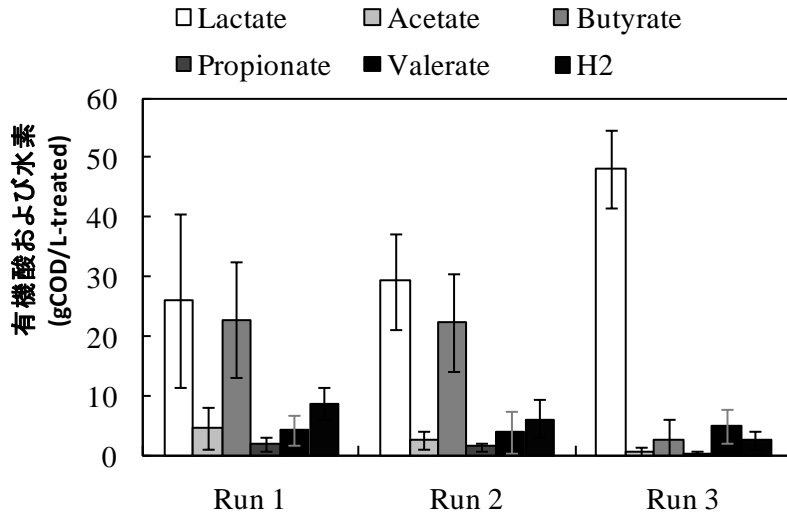


図 3.2 平均有機酸濃度および水素生成状況

表 3.3 微生物群集の解析結果

Phylum	Order	Genus	Average similarity	day									
				Run 1			Run 2			Run 3			
				25	45	67	82	103	124	153	180	219	
Number of clone analyzed				91	94	93	93	92	104	95	93	94	
<i>Actinobacteria</i>								1			1		
<i>Bacteroidetes</i>											1		
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	99%	3			1		93	89	88	69	
		<i>Bacillus</i> spp.	99%	10	50		34	82		1	3	9	
		[others]					3					1	
	<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium</i> spp.	97%	78	37	91	42	12				1	19
		<i>Thermoanaerobacterium</i> spp.	100%									1	
		[others]		1	4	2	13	2					
	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	99%	4	4	4			1	7			1
[others]					1	2			2	2	1		
<i>Proteobacteria</i>					1		2	3	1		2		
<i>Thermotogae</i>									4				
Uncertain				3	3	1	2		1				

乳酸および酪酸、ならびにランダムクローニング法による *B. coagulans* および *Clostridium* spp. の割合の経時変化を図 3.3 にまとめて示す。酪酸から乳酸への生成物の変化および *Clostridium* spp. から *B. coagulans* への菌相変化が同時に見られる。ランダムクローニング法による *B. coagulans* の割合および有機酸濃度の関係を図 3.4 に示す。*B. coagulans* の割合と乳酸濃度の関係は $R^2=0.7$ である。Akao et al. (2007a) は半連続式の生ごみの乳酸発酵を、SRT=HRT、pH 6 および 55°C の条件下で行い、微生物群集結果を 2 件報告している。*B. coagulans* の割合はいずれも 80% 程度、乳酸濃度はいずれも 40 gCOD/L であり、これらの関係は本研究に一致している。乳酸濃度が増加すると酪酸濃度が低下し、酢酸やプロピオン酸など他の有機酸濃度はそれほど変化していない。ランダムクローニング法による

Clostridium spp. の割合と有機酸濃度の関係を図 3.5 に示す。*Clostridium* spp. の割合と乳酸の関係は *B. coagulans* の場合と逆であり、 $R^2=0.7$ であった。

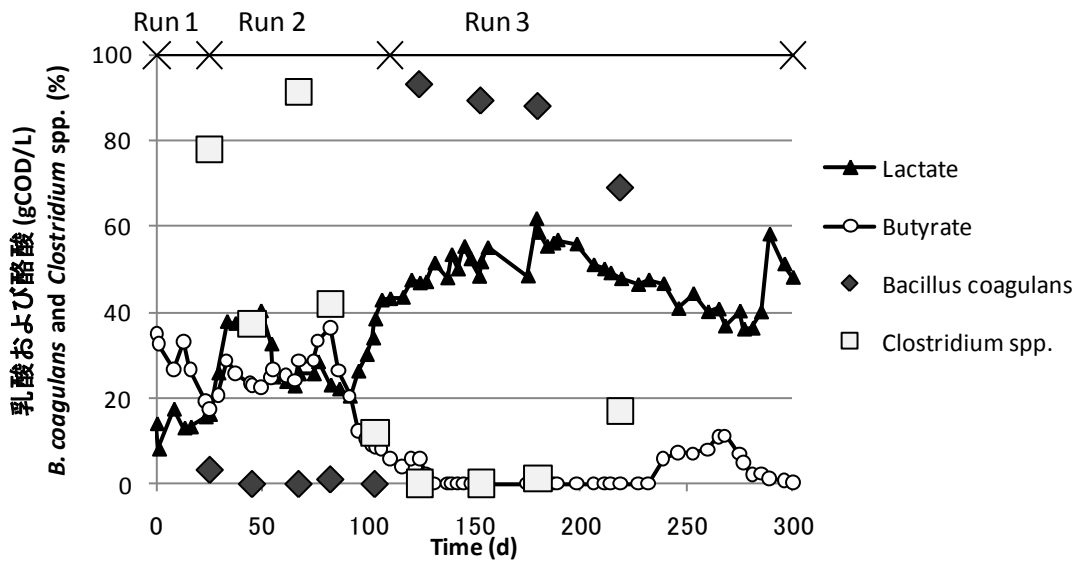


図 3.3 乳酸および酪酸、ならびにランダムクローニング法による *B. coagulans* および *Clostridium* spp.の割合の経時変化を

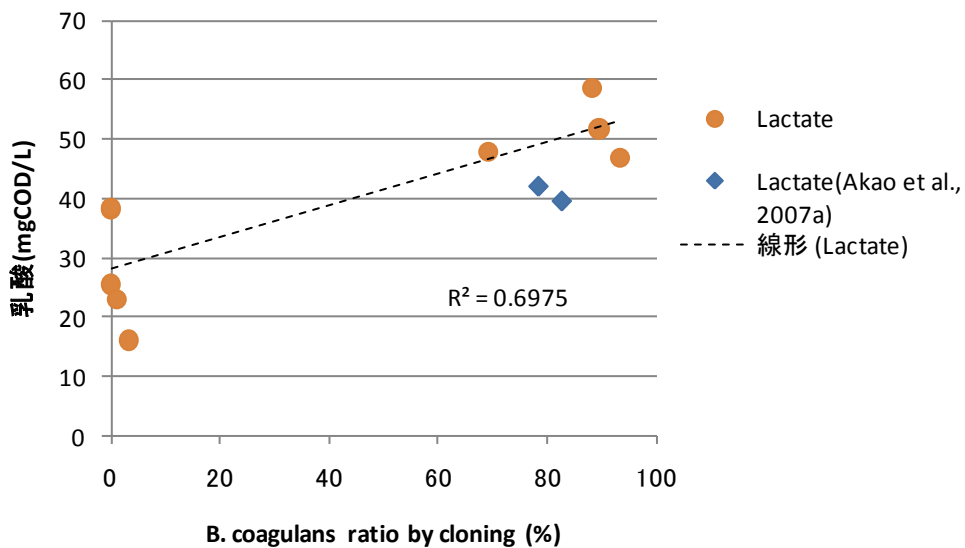


図 3.4 ランダムクローニング法による *B. coagulans* の割合および有機酸濃度の関係

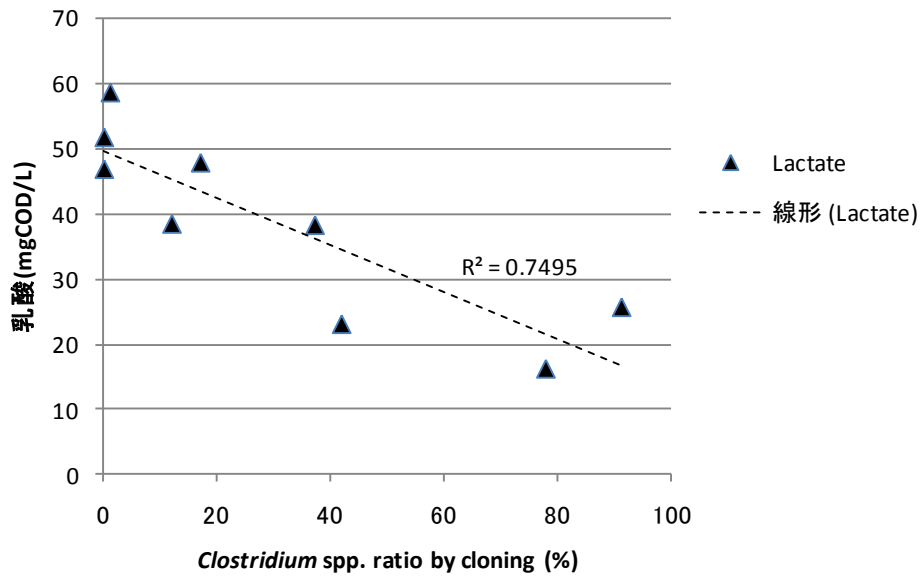


図 3.5 ランダムクローニング法による *Clostridium* spp. の割合と有機酸濃度の関係

2.4.3 リアルタイム PCR 法による *B. coagulans* の定量

全菌および *B. coagulans* の 16S rRNA 遺伝子のリアルタイム PCR 法による測定結果を図 3.6 に示す。全菌については、おおむね 10^{12} copies/L 程度で一定しており、*B. coagulans* については、 10^8 – 10^{11} copies/L の範囲で変動していた。Hidaka et al. (2010) は、グルコースを主たる基質とした回分式実験にて *B. coagulans* の 16S rRNA 遺伝子とバイオマスの割合を平均で 6.47×10^{10} copies/gCOD-biomass と報告している。この関係を用いると、Run 3 では、*B. coagulans* が 3.2 gCOD-biomass /L 程度であったことになり、 $C_5H_7O_2N$ と考えた場合に 2.3 gVS-biomass /L に相当する。

ランダムクローニング法およびリアルタイム PCR 法により測定した *B. coagulans* の割合の関係を図 3.7 に示す。両者の値自体は 9 倍程度の開きがあるものの、明確な関係が示されており、 $R^2=0.9$ であった。遺伝子の抽出操作は同じでも、その後の工程での効率などが異なり検出率の違いにつながっている可能性がある。ただし、この関係によりいずれの方法でも *B. coagulans* の優占を把握できることが示されている。ランダムクローニング法による *Bacillus* spp. の割合と、リアルタイム PCR 法による *B. coagulans* の割合の関係もあわせて示している。こちらは $R^2=0.5$ で先ほどよりも低く明確な関係は得られておらず、このプライマーが *B. coagulans* を特異的に検出できることを示している。リアルタイム PCR 法による *B. coagulans* の割合と乳酸濃度の関係を図 3.8 に示す。明確な関係が示されており $R^2=0.5$ であった。リアルタイム PCR 法の測定結果は指数的に変動しており、 R^2 の値自体は低めだが、関係性は示されており、リアルタイム PCR 法は複雑な有機性廃棄物を対象とした酸発酵槽

での *B. coagulans* の挙動を把握するのに有用であることが示された。

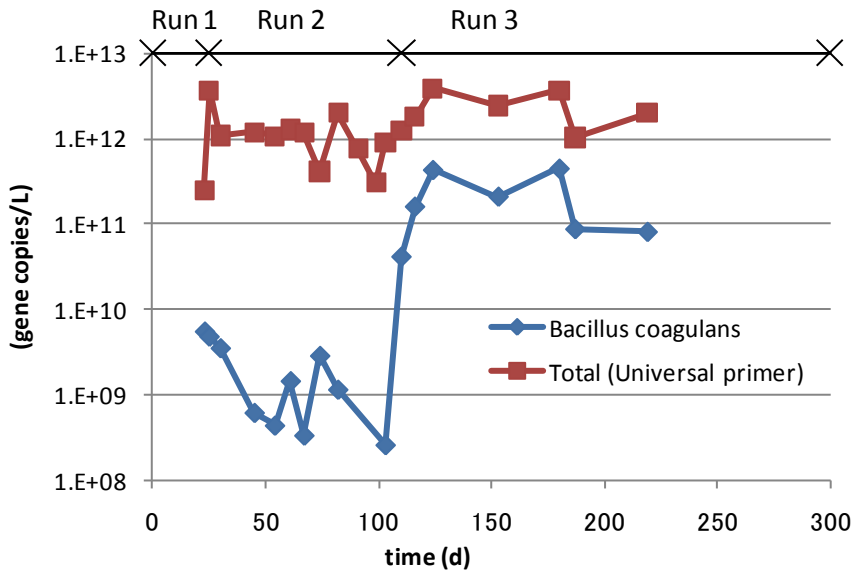


図 3.6 全菌および *B. coagulans* の 16S rRNA 遺伝子のリアルタイム PCR 法による測定結果

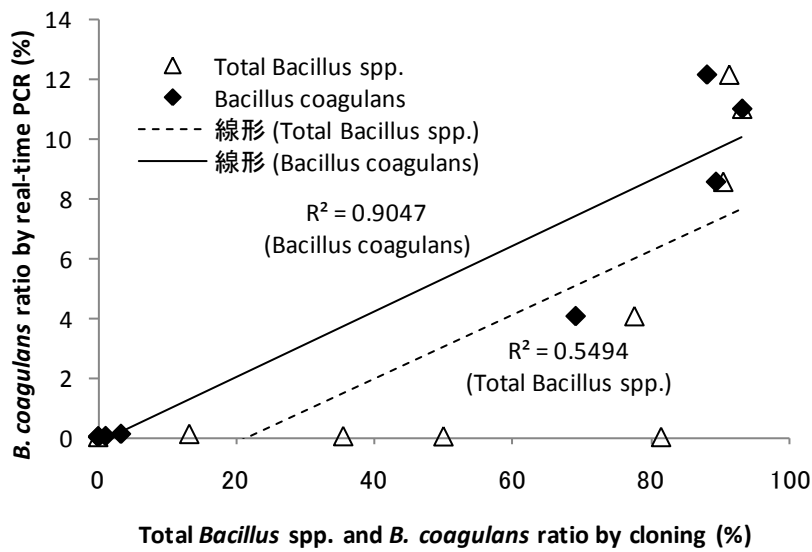


図 3.7 ランダムクローニング法およびリアルタイム PCR 法により測定した *B. coagulans* の割合の関係

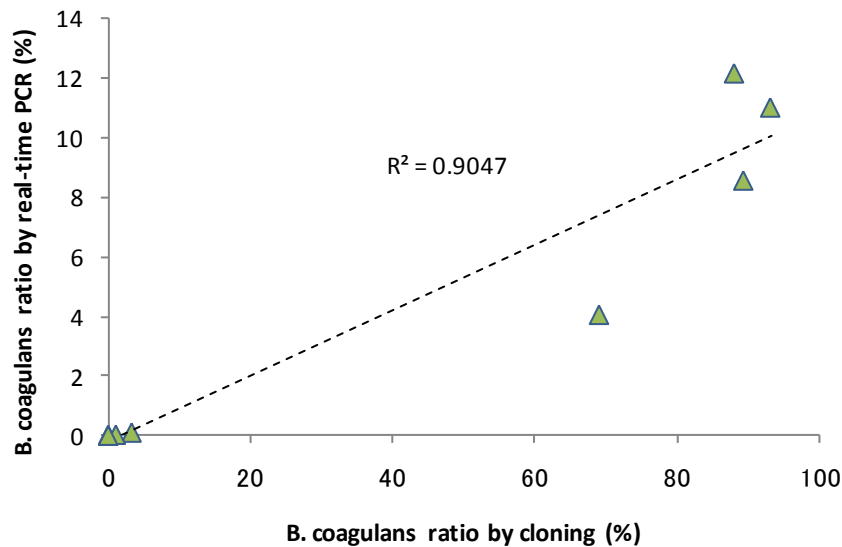


図 3.8 リアルタイム PCR 法による *B. coagulans* の割合と乳酸濃度の関係

3-5 考察

炭水化物からの高温水素発酵の研究は多数報告されている。生ごみやその他の炭水化物を多く含む有機性廃棄物からの高温水素発酵について、典型的な最適運転条件は、pH 5–6 程度(Akutsu et al., 2008; 2009; Luo et al., 2010; Shin et al., 2004; 2005; Ueno et al., 2006; 2007)である。乳酸生成による水素発酵の失敗も、高負荷条件下で報告されている (Akutsu et al., 2009; Liu et al., 2008; Temudo et al., 2007; Ueno et al., 2001)。本研究では実験期間中、基質、HRT、OLR、および固形性 COD 濃度は同じだったが SRT のみが異なっていた。Run 1 では、SRT が HRT の 3 倍であり、水素生成は最も盛んであった。この条件は、*Clostridium spp.*の維持および水素発酵に適していたと考えられる。

Akao et al. (2007a)は、pH 5–6 および 55°C の半連続運転での、*B. coagulans* による L-乳酸発酵を提唱している。*B. coagulans* は、生ごみの中に含まれており植種は不要である (Akao et al., 2007b)。Lee et al. (2008)は、野菜ゴミの高温発酵で生ごみコンポストを種汚泥に用いて、pH 5.5 では乳酸が生成し水素は生成しなかったこと、および pH 6 以上では水素が生成したことを報告している。実用化時の水素発酵では、廃棄物に含まれる *B. coagulans* による水素生成の失敗の危険性があることになる。Noike et al. (2002) は *Clostridium* による中温水素発酵で乳酸発酵菌である *Lactobacillus* が水素発酵を阻害し、それを防ぐために熱処理を提案している。熱、酸、アルカリなど他の前処理手法も、植種汚泥なしの食品廃棄物からの中温水素発酵で、水素発酵を阻害する菌を抑制するために提案されている (Kim et al., 2009)。しかし、ほとんどの *Clostridium spp.* も *B. coagulans* も芽胞を形成するので、高温水素発酵に

において前処理も効果的に働かない可能性がある。また乳酸発酵過程で生成される抗菌物質も水素発酵を阻害し、これが *B. coagulans* の優占につながっている可能性もある(Adami and Cavazzoni, 1999; Hyronimus et al., 1998)。 *B. coagulans* の増殖速度は、Run 1 の状況である乳酸濃度 25 gCOD/L の場合、0.26 (1/h)程度である (Hidaka et al., 2010)。 Collet et al. (2004)は、 *Clostridium thermolacticum* による高温水素発酵を、希釈率 0.0013–0.19 (1/h)の条件下で行っており、より希釈率を上げて維持できそうであることを報告している。 O-Thong et al. (2008)は、 *Clostridia* の *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2 の最大比増殖速度 0.31 (1/h)を、高温水素発酵で報告している。故に HRT 3.5 d の条件は、 *Clostridium* spp. や *Thermoanaerobacterium* spp. などの水素生成菌群を、特に pH、基質、生成物などによる阻害影響がなければ、十分に維持出来るはずである。これらより *Clostridium* spp.の割合が Run 3 で低かったのは、また、すべての Run で *Thermoanaerobacterium* spp. があまり検出されなかったのは、 *B. coagulans* による抗菌物質の影響が大きいことが推察される。 Chu et al. (2008) は、食品廃棄物の連続式高温水素発酵で、pH 5.5 として、後段の中温メタン発酵汚泥を返送している。 Lee et al. (2010)は、食品廃棄物の連続式高温水素発酵で、pH 5.0–5.7 とし、後段の高温メタン発酵汚泥を返送している。 Luo et al. (2010)は、キャッサバの高温水素発酵で種汚泥には実施設の中温 UASB 反応器からの汚泥を用いて、前処理は必要ないとしている。これらの研究では、基質に *B. coagulans* が含まれている可能性があるものの、連続的な水素生成が維持されている。 *B. coagulans* 以外の菌群を含む汚泥返送や植種汚泥が、 *B. coagulans* の増殖を防いでいる可能性が考えられる。 Run 1 では長めの SRT が、基質に含まれている *B. coagulans* よりも *Clostridium* spp.を維持するのに役立ったと考えられる。 HRT よりも長い SRT というのは、一種の汚泥返送であり、これが *Clostridium* spp.の維持に寄与していると考えられる。すなわち OLR、pH、温度、HRT、SRT および汚泥返送が、生成物に影響を与える微生物群集に影響をおよぼす因子であると判断される。

これらにより、水素発酵や酸発酵における微生物群集の重要性が示され、リアルタイム PCR 法の適用性も実証された。リアルタイム PCR 法は、ランダムクローニング法に比べて、費用や時間の面で有利である。 Wang et al. (2008b)は、回分式実験にて 16S rRNA 遺伝子は水素生成状況と明確な関係は示されず、機能遺伝子 (*hydA*)と水素生成状況に明確な関係が得られたことを報告している。しかし、本研究では、半連続式運転にて、16S rRNA 遺伝子が水素や酸発酵に関わる微生物群集の把握に有用であることを示した。回分式実験では、遅滞相、対数増殖相、死滅相などの増殖段階によって遺伝子の挙動が異なる可能性が示されている (Ha et al., 2009)。本研究のように連続的に運転されている反応器ではこうした影響が緩和され、リアルタイム PCR 法が適用できたものと考えられる。

3-6 まとめ

本章では、人工生ごみを基質として、同じ水理学的滞留時間（HRT）および有機物負荷率（OLR）の条件下で、固形物滞留時間（SRT）を変化させた連続酸発酵運転を行った。その結果、SRTを短くするにつれて、酪酸から乳酸への生成物の変化および *Clostridium* spp. から *B. coagulans* への菌相変化が同時に見られた。これより、水素発酵や酸発酵における微生物群集の重要性が示され、微生物群集の変化を把握する上で、ランダムクローニング法に比べて、費用や時間の面で有利であるリアルタイム PCR 法の適用性が実証された。

【第3章参考文献】

- Adami, A. and Cavazzoni, V. (1999) Occurrence of selected bacterial groups in the faeces of piglets fed with *Bacillus coagulans* as probiotic. *J. Basic Microbiol.* 39(1), 3-9.
- Akao, S., Tsuno, H., Cheon, J. (2007a) Semi-continuous L-lactate fermentation of garbage without sterile condition and analysis of the microbial structure. *Water Res.* 41(8), 1774-1780.
- Akao, S., Tsuno, H., Horie, T., Mori, S. (2007b) Effects of pH and temperature on products and bacterial community in L-lactate batch fermentation of garbage under unsterile condition. *Water Res.* 41(12), 2636-2642.
- Akutsu, Y., Li, Y., Harada, H., Yu, H. (2009) Effects of temperature and substrate concentration on biological hydrogen production from starch. *Int J Hydrogen Energy* 34(6), 2558-2566.
- Akutsu, Y., Li, Y., Tandukar, M., Kubota, K., Harada, H. (2008) Effects of seed sludge on fermentative characteristics and microbial community structures in thermophilic hydrogen fermentation of starch. *Int J Hydrogen Energy* 33(22), 6541-6548.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215(3), 403-410.
- Cheon, J., Hidaka, T., Mori, S., Koshikawa, H., Tsuno, H. (2008) Applicability of random cloning method to analyze microbial community in full-scale anaerobic digesters. *J. Biosci. Bioeng.* 106(2), 134-140.
- Chu, C., Li, Y., Xu, K., Ebie, Y., Inamori, Y., Kong, H. (2008) A pH- and temperature-phased two-stage process for hydrogen and methane production from food waste. *Int J Hydrogen Energy* 33(18), 4739-4746.
- Collet, C., Adler, N., Schwitzguébel, J., Péringer, P. (2004) Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *Int J Hydrogen Energy* 29(14),

1479-1485.

- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem. (Wash.)* 28(3), 350-356.
- Ha, J. H., Hidaka, T., Tsuno, H. (2009) Quantification of toxic microcystis and evaluation of its dominance ratio in blooms using real-time PCR. *Environmental Science and Technology* 43(3), 812-818.
- Hallenbeck, P. C. (2005) Fundamentals of the fermentative production of hydrogen. *Water Sci. Technol.* 52(1-2), 21-29.
- Hidaka, T., Horie, T., Akao, S., Tsuno, H. (2010) Kinetic model of thermophilic l-lactate fermentation by *Bacillus coagulans* combined with real-time PCR quantification. *Water Res.* 44(8), 2554-2562.
- Hyronimus, B., Le Marrec, C., Urdaci, M. C. (1998) Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4. *J. Appl. Microbiol.* 85(1), 42-50.
- Kim, D., Kim, S., Shin, H. (2009) Hydrogen fermentation of food waste without inoculum addition. *Enzyme Microb. Technol.* 45(3), 181-187.
- Kobayashi, T., Yasuda, D., Li, Y., Kubota, K., Harada, H., Yu, H. (2009) Characterization of start-up performance and archaeal community shifts during anaerobic self-degradation of waste-activated sludge. *Bioresour. Technol.* 100(21), 4981-4988.
- Lane, D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (ed.), Chichester, Wiley, 115-175.
- Lee, D., Ebie, Y., Xu, K., Li, Y., Inamori, Y. (2010) Continuous H₂ and CH₄ production from high-solid food waste in the two-stage thermophilic fermentation process with the recirculation of digester sludge. *Bioresour. Technol.* 101(1, Supplement 1), S42-S47.
- Lee, M., Hidaka, T., Hagiwara, W., Tsuno, H. (2009a) Comparative performance and microbial diversity of hyperthermophilic and thermophilic co-digestion of kitchen garbage and excess sludge. *Bioresour. Technol.* 100(2), 578-585.
- Lee, M., Hidaka, T., Tsuno, H. (2009b) Two-phased hyperthermophilic anaerobic co-digestion of waste activated sludge with kitchen garbage. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 108(5), 408-413.
- Lee, M., Hidaka, T., Tsuno, H. (2008) Effect of temperature on performance and microbial diversity in hyperthermophilic digester system fed with kitchen garbage. *Bioresour. Technol.* 99(15), 6852-6860.

- Li, C., Zhang, T., Fang, H. H. (2007) Use of TaqMan gene probe for real-time monitoring of acidophilic hydrogen-producing bacteria. *Biotechnol. Lett.* 29(11), 1753-1757.
- Liu, D., Zeng, R. J., Angelidaki, I. (2008) Effects of pH and hydraulic retention time on hydrogen production versus methanogenesis during anaerobic fermentation of organic household solid waste under extreme-thermophilic temperature (70 degrees C). *Biotechnol. Bioeng.* 100(6), 1108-1114.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1), 265-275.
- Luo, G., Xie, L., Zou, Z., Wang, W., Zhou, Q. (2010) Evaluation of pretreatment methods on mixed inoculum for both batch and continuous thermophilic biohydrogen production from cassava stillage. *Bioresour. Technol.* 101(3), 959-964.
- Michelson, T., Kask, K., Jõgi, E., Talpsep, E., Suitso, I., Nurk, A. (2006) l(+)-Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073. *Enzyme and Microbial Technology* 39(4), 861-867.
- Noike, T., Takabatake, H., Mizuno, O., Ohba, M. (2002) Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria. *Int J Hydrogen Energy* 27(11-12), 1367-1371.
- O-Thong, S., Prasertsan, P., Karakashev, D., Angelidaki, I. (2008) Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. *Int J Hydrogen Energy* 33(4), 1204-1214.
- Park, Y., Hong, F., Cheon, J., Hidaka, T., Tsuno, H. (2008) Comparison of thermophilic anaerobic digestion characteristics between single-phase and two-phase systems for kitchen garbage treatment. *J. Biosci. Bioeng.* 105(1), 48-54.
- Rosenberg, M., Rebros, M., Kristofikova, L., Malatova, K. (2005) High temperature lactic acid production by *Bacillus coagulans* immobilized in LentiKats. *Biotechnol. Lett.* 27(23-24), 1943-1947.
- Sakai, K. and Ezaki, Y. (2006) Open L-lactic acid fermentation of food refuse using thermophilic *Bacillus coagulans* and fluorescence in situ hybridization analysis of microflora. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(6), 457-463.
- Shin, H. S. and Youn, J. H. (2005) Conversion of food waste into hydrogen by thermophilic acidogenesis. *Biodegradation* 16(1), 33-44.
- Shin, H., Youn, J., Kim, S. (2004) Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis. *Int J Hydrogen Energy* 29(13), 1355-1363.
- Skiadas, I. V., Gavala, H. N., Lyberatos, G. (2000) Modelling of the periodic anaerobic baffled

- reactor (PABR) based on the retaining factor concept. *Water Res.* 34(15), 3725-3736.
- Temudo, M. F., Kleerebezem, R., van Loosdrecht, M. (2007) Influence of the pH on (open) mixed culture fermentation of glucose: A chemostat study. *Biotechnol. Bioeng.* 98(1), 69-79.
- Ueno, Y., Sasaki, D., Fukui, H., Haruta, S., Ishii, M., Igarashi, Y. (2006) Changes in bacterial community during fermentative hydrogen and acid production from organic waste by thermophilic anaerobic microflora. *J. Appl. Microbiol.* 101(2), 331-343.
- Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M., Igarashi, Y. (2001) Changes in product formation and bacterial community by dilution rate on carbohydrate fermentation by methanogenic microflora in continuous flow stirred tank reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57(1-2), 65-73.
- Ueno, Y., Fukui, H., Goto, M. (2007) Operation of a Two-Stage Fermentation Process Producing Hydrogen and Methane from Organic Waste. *Environ. Sci. Technol.* 41(4), 1413-1419.
- Wang, J. and Wan, W. (2009) Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *Int J Hydrogen Energy* 34(2), 799-811.
- Wang, M. Y., Olson, B. H., Chang, J. S. (2008a) Relationship among growth parameters for *Clostridium butyricum*, *hydA* gene expression, and biohydrogen production in a sucrose-supplemented batch reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78(3), 525-532.
- Wang, M., Tsai, Y., Olson, B. H., Chang, J. (2008b) Monitoring dark hydrogen fermentation performance of indigenous *Clostridium butyricum* by hydrogenase gene expression using RT-PCR and qPCR. *Int J Hydrogen Energy* 33(18), 4730-4738.
- Yu, Y., Kim, J., Hwang, S. (2006) Use of real-time PCR for group-specific quantification of acetoclastic methanogens in anaerobic processes: Population dynamics and community structures. *Biotechnol. Bioeng.* 93(3), 424-433.
- 谷川 昇, 武本敏男, 大木秀男, 川崎照夫 (1997). 生ごみの細組成, 都市清掃, **50**(217), 103-109.