

Überwachung des Redoxpotenzials zur verbesserten anaeroben Fermentation mit Hilfe der BioFlo® 120 Bioprozess-Steuerungseinheit

YING YANG UND MA SHA, EPPENDORF INC., ENFIELD, CT, USA

Zusammenfassung

Bei der Fermentation stellt das Redoxpotenzial einen wichtigen physiochemischen Faktor dar, welcher die Tendenz des Kulturmediums, Elektronen aufzunehmen, misst. Es ist in der Lage, die Effizienz eines Bioprozesses direkt zu beeinflussen. Ein Beispiel ist die anaerobe Fermentation von *Clostridium* zur Produktion von industriellen Lösungsmitteln. Lösungsmittelproduktion durch *Clostridium* Spezies erfolgt in zwei aufeinanderfolgenden Stoffwechselschritten. In der frühen Phase der Kultur produziert die Acidogenese hauptsächlich Essig- und Buttersäure. In der späten exponentiellen Wachstumsphase wechselt der Stoffwechsel dann zur Solventogenese – der Bildung von größtenteils organischen Lösungsmitteln, einschließlich Butanol [1].

Um den Elektronenfluss in die Richtung der Butanolproduktion zu lenken, ist die Regeneration des NAD(P)⁺ Vorrats innerhalb der *Clostridium* Spezies essenziell [1]. Das intrazelluläre Verhältnis von NAD(P)H zu NAD(P)⁺ ist stark vom Redoxpotenzial abhängig; daher kann das Redoxpotenzial dahingehend genutzt werden, sowohl die Anreicherung von Biomasse als auch die Lösungsmittelproduktion zu modifizieren [2].

Wir kultivierten *C. beijerinckii* unter anaeroben Bedingungen mit Hilfe einer BioFlo 120 Bioprozess-Steuerungseinheit, ausgestattet mit BioBLU® 3f Single-Use Vessels. Durch das Beibehalten eines Redoxpotenzials von etwa -500 mV

Parameter	Gerät/Sollwert
Inokulationsdichte	1:100 (v/v)
Arbeitsvolumen	3 L
Sparger	Macrosparger
Begasungskontrolle	100 % konstanter Stickstofffluss von 0,1 vvm (0,3 sL/h), während der ersten 4 Stunden durch submerse Begasung, nach 4 Stunden durch Begasung in den Kopfraum
Agitation	Magnetantrieb; 50 rpm
Temperatur	37°C; durch Heizmanschette und Kühlschikanen kontrolliert

Tabelle 1: Überblick über Prozessparameter und Sollwerte

erhöhten sich sowohl das bakterielle Wachstum als auch die Butanolproduktion drastisch im Vergleich zu einem Prozess ohne Steuerung des Redoxpotenzials. Diese Studie zeigt die Vorteile einer Überwachung des Redoxpotenzials während der Fermentation von *C. beijerinckii* klar auf.

Material und Methoden

Wir führten Batch-Fermentationen unter anaeroben Bedingungen durch. Die Vorbereitung des Inokulums sowie die Medienzusammensetzung wurden bereits eingehend beschrieben [3].

Anaerobe Bedingungen wurden durch stetes Begasen mit 0,1 vvm (Vessel Volumen pro Minute) Stickstoff erzielt. Wir führten zwei Batch-Fermentationsläufe durch. Im ersten Lauf kontrollierten wir das Redoxpotenzial nicht. Im zweiten Lauf hingegen wurde das Redoxpotenzial auf einen niedrigen, stabilen Wert von -500 mV eingestellt. Die Prozessparameter sowie die Einstellungen, welche für beide Läufe galten, sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

In 24 h-Intervallen entnahmen wir 1 mL Probenvolumen und quantifizierten die Konzentrationen von sowohl Glucose als auch Butanol [3]. Ebenso wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) gemessen, um das bakterielle Wachstum zu verfolgen.

Überwachung und Anpassung des Redoxpotenzials

Wir verfolgten den pH-Wert und das Redoxpotenzial online mit Hilfe von zwei ISM® pH/Redox Sensoren (Mettler Toledo®, Schweiz). Der gleiche Sensortyp kann eingesetzt werden, um entweder den pH-Wert oder das Redoxpotenzial zu messen, und die Wahl kann inner-

halb des Konfigurations-Bereiches der Steuerungssoftware getroffen werden. Wir kalibrierten die pH- und die Redoxsensoren außerhalb des Gefäßes mit Hilfe von 2-Punkt Kalibrierungsmethoden [3].

Das Redoxpotential des Fermentationsmediums stellten wir mit 35 g/L Natriumsulfid Nonahydrat (Sigma-Aldrich®, USA) ein. Um die Einführung von Sauerstoff zu verhindern, wurde die Lösung für 15 min mit Stickstoff begast, bevor sie in das Gefäß gepumpt wurde. Der pH-Wert der Lösung betrug 12,84. Um das Redoxpotenzial bei etwa -500 mV zu halten, schalteten wir 24 h, 32 h, 48 h und 120 h nach dem Animpfen die vorkalibrierte Pumpe ein, um dem Medium 2–3 mL Natriumsulfidlösung hinzuzusetzen.

Ergebnisse

Wir verglichen das bakterielle Wachstum sowie die Butanolproduktion zweier Prozesse. In einem Prozess hielten wir das Redoxpotenzial relativ konstant bei -500 mV. In dem anderen Prozess beeinflussten wir das Redoxpotenzial auf experimentelle Weise nicht.

Redox und pH-Trends

Zu Beginn der Fermentation betrug das Redoxpotenzial etwa 0 mV. Während der ersten 24 h, und bei exponentiellem Wachstum von *C. beijerinckii*, sank es drastisch ab, auf -500 mV. Wenn wir das Redoxpotenzial nicht auf experimentelle Weise änderten, schwankte es zwischen -600 und -300 mV, beginnend 24 h nach dem Animpfen (Abb. 2A).

Wenn wir der Kultur Natriumsulfid Nonahydrat zusetzten, konnte ein relativ stabiles Redoxpotenzial von -500 bis -400 mV beibehalten werden. Während der exponentiellen Wachstumsphase,

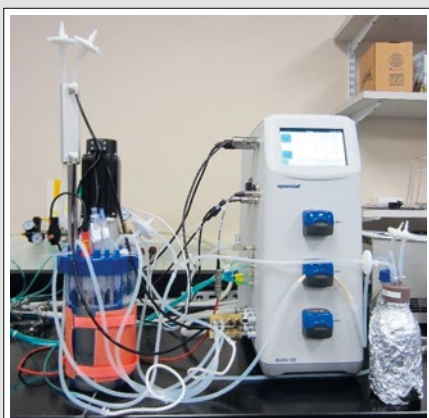


Abb. 1: Bioprozess-Equipment

Überwachung des Redoxpotenzials zur verbesserten anaeroben Fermentation mit Hilfe der BioFlo® 120 Bioprozess-Steuerungseinheit

innerhalb der ersten 24 h der Kultur, sank der pH-Wert in beiden Läufen von 6,5 auf 5,1. Es ist wahrscheinlich, dass Acidogenese stattgefunden hatte und dass sowohl Essigsäure als auch Buttersäure entstanden waren. In dem Lauf ohne Redoxsteuerung blieb der pH-Wert mit 5,0–5,1 relativ niedrig, ohne sich während des Laufes zu erholen, was wiederum auf ein Fehlen einer dominanten solventogenen Phase schließen ließ.

Im Gegensatz dazu begann sich der pH-Wert innerhalb der Redox-gesteuerten Fermentation nach 24 h zu erholen und erreichte nach 70 h einen Wert von 6,0. Dann fiel er langsam auf 5,5 ab – ein Wert, der bis zum Ende der Kultur erhalten blieb. Es ist wahrscheinlich, dass der kurvige pH-Verlauf durch eine Veränderung des mikrobiellen Stoffwechsels hervorgerufen worden ist. Die Butanolproduktion könnte Essigsäure verbraucht haben und es könnte zu einer Produktverschiebung von Buttersäure zu Butanol gekommen sein. Die Verringerung der Säurekonzentration verursachte mit großer Wahrscheinlichkeit den Anstieg des pH-Wertes.

Bakterielles Wachstum

Innerhalb der ersten 24 h beobachteten wir in beiden Kulturen vergleichbare exponentielle Wachstumskurven. In dem Lauf ohne Redoxsteuerung verlangsamte sich das Wachstum nach 24 h signifikant und erreichte nach 124 h einen Endwert von 0,788 OD₆₀₀-Einheiten. Im Gegensatz dazu wuchs *C. beijerinckii* robust weiter, wenn ein Redoxpotenzial von –500 mV beibehalten wurde. Die endgültige OD₆₀₀ nach 124 h betrug 1,565. Dieser Wert ist doppelt so hoch wie derjenige, der ohne Redoxsteuerung erzielt wurde (Abb. 2B).

Fazit

Wenn das Redoxpotenzial experimentell auf einem relativ stabilen Wert von –500 mV beibehalten wurde, wurde im Vergleich zu einem Lauf ohne Redoxsteuerung die doppelte Biomasse sowie eine dreifach erhöhte Ausbeute an Butanol erzielt (Abb. 2C). Dies dient als Beispiel einer Bioprozess-Optimierung durch Überwachung und Anpassung des Redoxpotenzials während der gesamten Dauer einer Kultur.

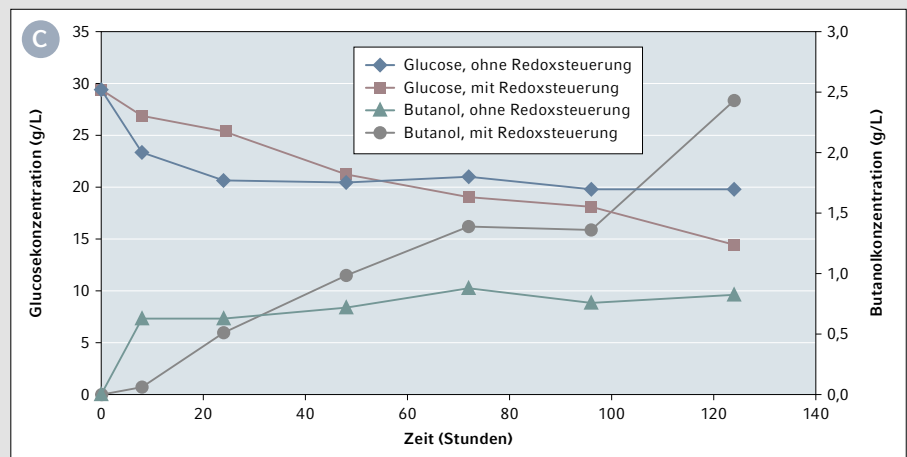
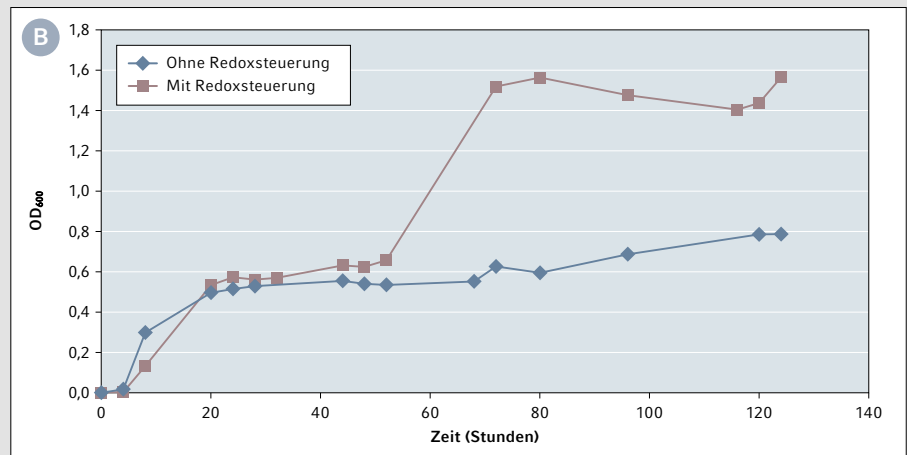
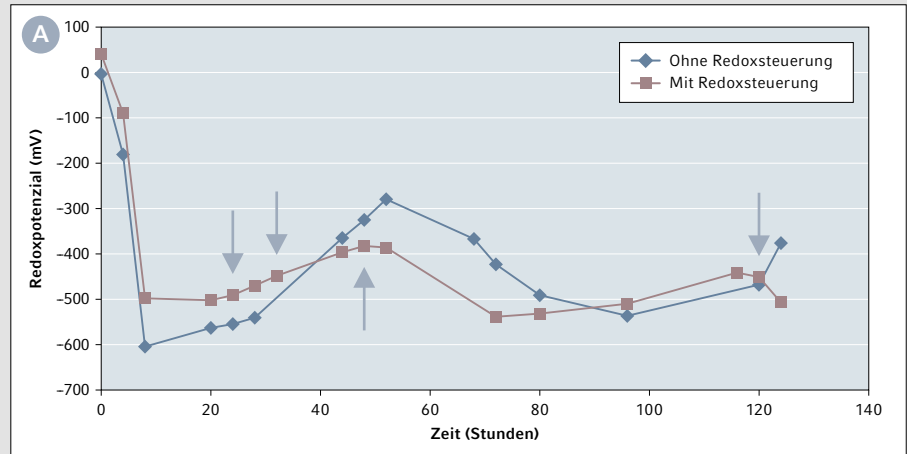


Abb. 2: A) Redoxpotenzial-Trends. In dem Lauf mit Redoxsteuerung wurde Natriumsulfid Nonahydrat 24 h, 32 h, 48 h und 120 h nach dem Animpfen hinzugefügt (Pfeile). B) *C. beijerinckii* Wachstumskurven. C) Glucose- und Butanolkonzentrationen

Literatur

- [1] Wang S, Zhu Y, Zhang Y, and Li Y. Controlling the oxidoreduction potential of the culture of *Clostridium acetobutylicum* leads to an earlier initiation of solventogenesis, thus increasing solvent productivity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93: 1021-1030. 2012
- [2] Sridhar J, and Eiteman M. Influence of redox potential on product distribution in *Clostridium*

thermosuccinogenes. *Appl Biochem Biotechnol.* 82: 91-101. 1999

[3] Yang Y, Sha M. Redox Potential Monitoring for Improved Anaerobic Fermentation Using the BioFlo® 120 Bioprocess Control Station and BioBLU® 3f Single-Use Vessels. *Eppendorf Application Note 358*. 2018; erhältlich unter www.eppendorf.com/appnote358