



Hochschule Neubrandenburg  
University of Applied Sciences

Fachbereich Agrarwirtschaft und Lebensmittelwissenschaften  
Masterstudiengang Lebensmittel- und Bioprodukttechnologie  
WS 2020/21 – SS 2021

## **Masterthesis**

# **Anwendung von Pulsed-Electric-Fields (PEF) zum Aufschluss von Zuckerrübenpressschnitzeln**

URN: urn:nbn:de:gbv:519-thesis2021-0024-1

Verfasser: Aljosha Hedler B. Sc.

Betreuer: Prof. Dr.-Ing. Heralt Schöne

Ralf Reuters M. Sc.

Neubrandenburg, den 11.08.2021

## **Danksagung**

Ich bedanke mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr.-Ing Heralt Schöne sowohl für die Bereitstellung dieses interessanten Themas als auch für die ausgezeichnete fachliche Betreuung.

Zusätzlich möchte ich mich bei Herrn Ralf Reuters für die uneingeschränkte Unterstützung während der Planung, der Konstruktion und der praktischen Durchführung der Versuche bedanken.

Gleichermaßen danke ich Frau Monika Wessel, für ihre Unterstützung und die vielen fachlichen Diskussionen und Zielfindungen.

Darüber hinaus möchte ich Frau Gabriele Kulik, Frau Andrea Winkler, Herrn Wolfgang Dörnbrack, Herrn Franz Hopp und Herrn Paul Sander für die Unterstützung und die Hilfe bei der Versuchsdurchführung und die anregenden Diskussionen danken.

Des Weiteren gilt ein besonderer Dank meiner Freundin Sarah Gruber zum einen für das Korrekturlesen der Masterarbeit und die konstruktive Kritik als auch die mentale Unterstützung im Rahmen der Arbeit und des gesamten Studiums.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	5
Symbol- und Formelzeichenverzeichnis .....	6
Abstract .....	8
1. Einleitung .....	9
2. Stand des Wissens .....	11
2.1 Grundlagen der Pulsed-Electric-Fields .....	11
2.1.1 Wirkmechanismus des Zellaufschlusses .....	12
2.2 Elektrotechnische Grundlagen von Elektroporationsanlagen .....	14
2.2.1 Spezifischer Energieeintrag .....	14
2.2.2 Feldstärke und Pulslänge .....	15
2.2.3 Pulsabstand .....	16
2.2.4 Temperaturabhängigkeit .....	17
2.2.5 Hauptkomponenten der Elektroporationsanlage .....	17
2.2.5.1 Spannungsquelle .....	18
2.2.5.2 Elektroden .....	18
2.2.5.3 Kondensator .....	19
2.2.5.4 Pulsgeber .....	20
2.2.5.5 Elektrischer Widerstand .....	21
2.2.5.6 Zellaufschlussreaktor .....	21
2.3 Technische Anwendungen von Pulsed-Electric-Fields .....	22
2.4 Grundlagen biologischer Zellen .....	22
2.4.1 Mikroalgen .....	22
2.4.2 Hefen .....	23
2.4.3 Bakterien .....	24
2.4.4 Pflanzenzellen .....	24
3. Pulsed-Electric-Fields Anlage im Labormaßstab .....	25

3.1	Schaltplan der Anlage im Labormaßstab.....	25
3.2	Bauelemente der PEF-Anlage im Labormaßstab .....	25
3.2.1	Spannungsquelle .....	26
3.2.2	Zellaufschlussreaktor .....	27
3.2.3	Elektroden .....	29
3.2.4	Kondensatoren .....	30
3.2.5	Elektrische Widerstände .....	30
3.2.6	Pulsgeber.....	32
3.2.7	Kabelverbindung.....	32
3.3	Konstruktion des Labormaßstab-PEF.....	33
4.	Zellaufschluss unter Anwendung der PEF-Anlage .....	38
4.1	Material und Methoden der Zellkultivierung .....	40
4.1.1	Geräte und Materialien der Zellkultivierung .....	40
4.1.2	Methoden der Zellkultivierung .....	43
4.2	Material und Methoden des Zellaufschlusses.....	45
4.2.1	Geräte und Material des Zellaufschlusses.....	45
4.2.2	Methoden des Zellaufschlusses.....	46
4.3	Mikroskopische Untersuchung .....	54
4.4	Inhibitionskontrolle.....	55
5.	Ergebnisse.....	56
6.	Diskussion .....	67
7.	Zusammenfassung .....	69
8.	Literaturverzeichnis .....	70
9.	Abbildungsverzeichnis .....	73
10.	Tabellenverzeichnis .....	75
11.	Gleichungsverzeichnis.....	76
	Selbstständigkeitserklärung.....	78

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Gl.	Gleichung
KBE	Koloniebildende Einheit
MO	Mikroorganismen
N.A.	Nicht auswertbar
PEF	Pulsed-Electric-Fields (Gepulste elektrische Felder)
rpm	Rounds per Minute (Umdrehungen pro Minute)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>sp.</i>	Spezies
Tab.	Tabelle
TSA	Trypton Soja Agar
ZAR	Zellaufschlussreaktor

## Symbol- und Formelzeichenverzeichnis

$b_{ZR}$	Breite des Zellaufschlussreaktors	[m]
$C$	Elektrische Kapazität	[F]
$\vec{E}$	Elektrische Feldstärke	[V/m]
$E_{elektr.}$	Elektrische Energie	[J]
$E_{spez.}$	Spezifische Zellaufschlussenergie	[kJ/kg]
$f_P$	Pulsfrequenz	[Hz]
$F$	Farad	[C/V]
$h_{ZR}$	Höhe des Zellaufschlussreaktors	[m]
$I$	Stromstärke	[A]
$l_{ZR}$	Länge des Zellaufschlussreaktors	[m]
$m_{probe}$	Masse des Probeguts	[kg]
$n_P$	Anzahl der Pulse der PEF-Anwendung	[-]
$P_{el}$	Elektrische Leistung	[W]
$Q$	Elektrische Ladung	[C]
$R$	Widerstand	[ $\Omega$ ]
$r$	Radius	[m]
$s$	Abstand	[m]
$t_{C(E)}$	Entladezeit eines Kondensators	[s]
$t_{C(L)}$	Ladezeit eines Kondensators	[s]
$t_{Puls}$	Pulslänge eines Einzelpulses	[s]
$t_{Ges.(Puls)}$	Gesamtdauer der kumulierten Einzelpulse	[s]
$U$	Spannung	[V]
$V_{ZR}$	Volumen des Zellaufschlussreaktors	[m <sup>3</sup> ]

$W_{el}$	Elektrische Arbeit	[J]
$\tau$	Zeitkonstante	[s]
$\pi$	Kreiszahl	[-]

## **Abstract**

The application of pulsed-electric-fields (PEF) in the food industry represents an innovative process. PEF is a non-thermal process for increasing shelf life or optimizing extraction in which a matrix (food) between two electrodes is exposed to a pulsating high-voltage field. This process reduces the proportion of microorganisms by destroying their cell membrane without resulting in undesirable changes in the sensory perceptions of the food.

This work deals with the principle of action of this technology, the technical basics as well as the most important advantages. The influence of critical parameters is stated, and their limitations and challenges are discussed. In addition, part of this work is the design, construction, and commissioning of a transportable PEF plant on a very small scale. The plant should make it possible to break down plant cells and microorganisms, such as yeasts or bacteria, and thus inactivate them or increase the extraction yield through cell destruction. Plant cells, bacteria, yeasts and microalgae were used as sample organisms. The validation of the cell digestion was carried out by microscopy and growth-inhibition-control.

The results show that in none of the test executions carried out by means of the validation methods selected in this work a cell digestion by application of PEF can be detected. Neither microscopically nor by reduced cell growth could be shown beyond doubt that cells were damaged to a sufficient extent. It can be said that it was possible to plan and construct a pulsed electric fields system. Even if in the end no cell digestion could be detected, it can be stated that it was possible to achieve a specific energy input with appropriate adaptations and restrictions, from which a cell digestion can theoretically result.

Further studies need to be carried out in order to revise the design and parameters of the plant, but a basis for PEF plants on a very small scale has been created. Some considerations and efforts are still needed to increase the electric field strength.



## 1. Einleitung

Nicht-thermische Verfahren zur Behandlung von Lebensmitteln stellen ein innovatives und zukunftssträchtiges Feld zur Verlängerung der Haltbarkeit und optimierter Prozessierung dar. Die steigende Verbrauchernachfrage nach Lebensmitteln mit hohem Nährwert und „frischem“ Geschmack resultierte in der Entwicklung neuer, schonender Verfahren und Alternativen, um konventionelle Techniken wie die Wärmebehandlung zur Konservierung von Lebensmitteln zu verbessern oder zu ersetzen. Dies war unumgänglich, da die thermische Prozessierung von Lebensmitteln meist mit Einschränkungen in der Frische sowie sensorischen Änderungen in Geschmack und Farbe einhergeht (Martin-Belloso and Soliva-Fortuny, 2011, Toepfl et al., 2014).

Von allen möglichen Reaktionen, die ein Lebensmittel negativ beeinflussen können (chemisch, enzymatisch, physikalisch oder biologisch) ist der mikrobiologische Verderb der mit dem höchsten Einfluss. Die Möglichkeiten zur Bekämpfung der negativen Folgen von Mikroorganismen bestehen in der Verhinderung einer Kontamination, der Abtötung der Organismen oder darin ihr Wachstum zu verlangsamen. Folglich werden zunehmend Konservierungsprozesse in die Lebensmittelproduktionskette integriert (Notermans, 2007).

Unter allen nicht-thermischen Methoden ist die Technologie der Pulsed-Electric-Fields (PEF) eine der vielversprechendsten und zur Inaktivierung von Mikroorganismen und Enzymen und hat sich als Alternative zur Pasteurisierung erwiesen. So lässt sich mittels Anwendung von PEF die Frische der Produkte beibehalten und gleichzeitig deren Sicherheit und Funktionalität gewährleisten (Kumar et al., 2019).

Vom Jahr 1990 an bis heute an, hat die Anzahl an Forschungsgruppen, die die Wirksamkeit von Pulsed-Electric-Fields bei verschiedenen Lebensmitteln untersuchen, kontinuierlich zugenommen. Im Fokus liegen meistens die Pasteurisierung flüssiger Lebensmittel, die Enzyminaktivierung sowie die Elektropermeabilisierung von Pflanzenzellen (Toepfl et al., 2005).

Pulsed-Electric-Fields wird, neben dem Einsatz zur Haltbarkeitsverlängerung, in der Nahrungsmittelverarbeitenden Industrie als innovatives und energiesparendes Verfahren zum schonenden Zellaufschluss von pflanzlichen Zellen eingesetzt (Sack, 2016).

Es zeigt sich, dass die nicht-thermische Prozessierung mittels PEF in der Lebensmittelindustrie zusehends an Relevanz gewinnt. Nichtsdestotrotz ergibt sich auf diesem Feld eine Vielzahl an Forschungs- und Optimierungsmöglichkeiten für ein breites Einsatzgebiet (Sack, 2016).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Wirkprinzip dieser Technologie, den technischen Grundlagen sowie den wichtigsten Vorteilen. Es wird auf den Einfluss der kritischen Parameter eingegangen sowie ihre Einschränkungen und Herausforderungen diskutiert. Darüber hinaus ist Teil dieser Arbeit der Entwurf, die Konstruktion und Inbetriebnahme einer transportablen PEF-Anlage im Kleinmaßstab, wie sie im Labor eingesetzt werden könnte, welche in dieser Form in der Literatur noch nicht zu finden ist. Die Anlage soll es ermöglichen Pflanzenzellen und Mikroorganismen, wie Hefen oder Bakterien, aufzuschließen und so zu inaktivieren beziehungsweise die Extraktionsausbeute durch Zellzerstörung zu erhöhen. So können aus den Zellen der Rückstände der Zuckerproduktion, den sogenannten Zuckerrübenpressschnitzeln, noch wertgebende Inhaltsstoffe wie Pektin gewonnen werden

## 2. Stand des Wissens

Dieses Kapitel gibt einen allgemeinen Überblick über den gegenwärtigen wissenschaftlichen Kenntnisstand, der für das Verständnis der weiteren Arbeit notwendig ist. Dabei wird auf die technischen und elektrotechnischen Grundlagen der Pulsed-Electric-Fields eingegangen und deren Wirkmechanismus erläutert. Darüber hinaus wird auf die wichtigsten Bauteile eingegangen und deren Auslegung diskutiert. Zudem wird kurz auf einige biologische Zellen eingegangen, die der Zellaufschlussvalidierung dienen.

### 2.1 Grundlagen der Pulsed-Electric-Fields

Pulsed-Electric-Fields (PEF) ist ein nicht-thermisches Verfahren zur Erhöhung der Haltbarkeit bei der eine Matrix (Lebensmittel) zwischen zwei Elektroden einem pulsierenden Hochspannungsfeld ausgesetzt wird. Dieser Prozess reduziert den Anteil an Mikroorganismen durch Zerstörung ihrer Zellmembran, ohne unerwünschte Veränderungen in der Sensorik des Lebensmittels zur Folge zu haben. In den vergangenen Jahren hat sich die Elektroporation in der nahrungsmittelverarbeitenden Industrie, als ein innovatives und schonendes Verfahren etabliert. Die Elektroporation eignet sich zum Aufschluss pflanzlicher Zellen und somit zu einer Extraktionsoptimierung sowie zur Inaktivierung von Mikroorganismen und einer damit verbundenen Verlängerung der Haltbarkeit. (Sack, 2016, Leadly and Williams, 2006).

In Industrieanlagen wird das Probematerial kontinuierlich durch ein Elektrodensystem gefördert, in dem dann die Applikation des elektrischen Feldes erfolgt, das gepulst wird. Grob zusammengefasst besteht diese Anlage aus einem Zellaufschlussreaktor mit Elektroden, einer Spannungsversorgung, der Prozessgutförderung sowie der Steuerungs-, Prozess- und Regelungstechnik. Bei Technikumsanlagen hingegen wird das Probematerial diskontinuierlich, sprich im Batchverfahren behandelt (Sack, 2016).

PEF induziert strukturelle Veränderungen und einen schnellen Abbau der Zellmembran in biologischen Zellen. Dieses Phänomen ist auch als Elektroporation bekannt. Wenn die induzierte elektrische Feldstärke und die Behandlungsintensität, durch Erhöhung der Anzahl an Impulsen, zunimmt und einen kritischen Wert überschreiten, entstehen irreversible Poren in der Zellmembran bis hin zum Zelltod (Amiali et al., 2006, Ortega-Rivas, 2012).

Makroskopisch kann der Effekt der Elektroporation durch die Extraktion von Inhaltsstoffen aus dem Gewebe belegt werden. Aufgrund des inneren Zelldrucks strömt Zellsaft elektroporierten

Gewebes aus der aufgeschlossenen Membran in das umliegende Gewebe aus. Dieser Effekt wird in Abbildung 1 dargestellt. Dabei wird eine rohe Zuckerrübenhälfte mit einer PEF-Behandelten verglichen. Deutlich ersichtlich ist der Austritt an Zellsaft an der Schnittoberfläche der behandelten Zuckerrübenhälfte aufgrund der irreversiblen Membran-Permeabilisierung (Sack, 2016).

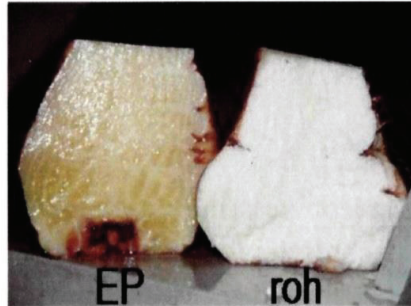


Abbildung 1: Vergleich einer rohen Zuckerrübenhälfte zu einer elektroporierten (EP) (Schultheiss et al., 2002).

### 2.1.1 Wirkmechanismus des Zellaufschlusses

In der Literatur werden diverse Erklärungsmodelle für den Zellaufschluss biologischer Zellen, und damit verbunden, auch der Inaktivierungsmechanismus für Bakterien und Mikroorganismen, beschrieben. Die beiden gängigsten Theorien über den Wirkmechanismus der Zelledestruktion sind nach aktuellem Stand der Wissenschaft der elektrische Zusammenbruch und die Elektroporation (Castro et al., 1993).

#### Elektrischer Zusammenbruch

Die Theorie des elektrischen Zusammenbruchs betrachtet die biologische Zelle vereinfacht gesehen als Kondensator, der mit dielektrischem Material gefüllt ist (siehe Abb. 2). Durch die unterschiedlichen Ionen im Inneren und Äußeren der Zelle liegt eine leichte Potentialdifferenz (ca. 10 mV) über der Membran. Das extrinsische angelegte elektrische Feld erhöht dieses Membranpotential, wodurch es zu einer Verringerung der Membrandicke kommt. Sobald das kritische Membranpotential von ungefähr 1 V erreicht ist, kommt es zu Porenbildung in der Membran. Es kommt zu einer schlagartigen Entladung an den gebildeten Poren aufgrund der starken Porenverschiebung und zu einer permanenten Membranschädigung. Um eine Porenbildung in einer typischen MO- oder Bakterienzelle (Radius  $r = 0,5 \mu\text{m}$ ) zu erreichen, muss

die elektrische Feldstärke  $\vec{E}$  mindestens 13 kV/cm betragen (Jeyamkondan et al., 1999, Leadly and Williams, 2006, Barbosa-Canovas et al., 2011).

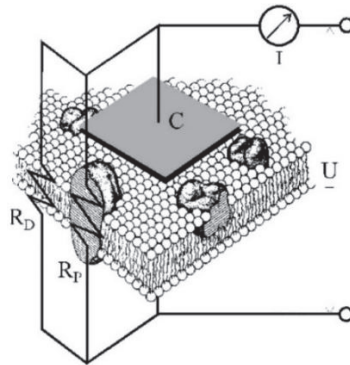


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Zelle als Kondensator (Leadly and Williams, 2006)

### Elektroporation

Die Theorie der Elektroporation besagt, dass es bei Mikroorganismen zu einer temporalen Destabilisierung der Membranen und deren Proteine kommt, sobald sie einem Hochspannungsfeld ausgesetzt werden. Daraus resultierende Konformitätsänderungen der Lipidmoleküle vergrößern bereits existierende Poren in der Membran. Diese vergrößerten Poren können nun Strom leiten. Dies führt zu einer lokalen Temperaturzunahme und einem Aufschmelzen der teilkristallinen Membranstruktur. Sobald die semipermeable Struktur der Membran beeinträchtigt ist, kann die Zelle anfangen anzuschwellen und zu platzen. Abbildung 3 zeigt die Zelle eines *B. cereus* Bakteriums, das infolge einer PEF-Behandlung beschädigt und inaktiviert wurde (Leadly and Williams, 2006).

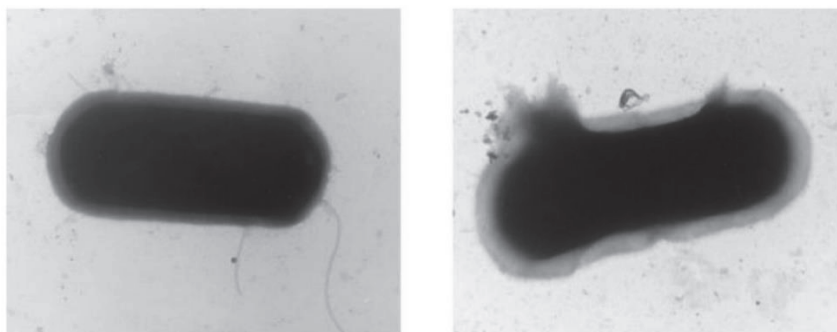


Abbildung 3: PEF-Behandlung einer *Bacillus cereus* Zelle (Leadly and Williams, 2006).

Nach derzeitigem Stand der Wissenschaft ist nicht abschließend geklärt welche der beiden besagten Theorien den Zellaufschluss der Zelle bewirkt. Hier bedarf es weiterer Forschung, um eine finale Aussage treffen zu können (Sack, 2016).

Der Terminus der Elektroporation wird in dieser Arbeit indes beibehalten.

## 2.2 Elektrotechnische Grundlagen von Elektroporationsanlagen

Folgendes Kapitel behandelt die elektrotechnischen Grundlagen, die den Anwendungen von Pulsed-Electric-Fields zugrunde liegen und deren Auslegung für entsprechende Anwendungsbereiche.

### 2.2.1 Spezifischer Energieeintrag

Der Energieeintrag, der benötigt wird, um einen Zellaufschluss in entsprechendem Probegewebe zu erwirken wird durch die spezifische Energie  $E_{spez}$  repräsentiert und in kJ/kg angegeben.

Für eine irreversible Membranschädigung und damit verbunden einen erfolgreichen Zellaufschluss muss ein produktspezifischer Schwellenwert überschritten werden. In der Literatur wird dieser Schwellenwert bei Pflanzenzellen mit 1-2 kJ/kg angegeben (Zimmermann, 1986). Dies wird bestätigt, da gemäß Literaturangabe der Schwellenwert von Zuckerrüben bei 2-3 kJ/kg liegt (Schultheiss et al., 2004).

Der spezifische Energieeintrag  $E_{spez}$  errechnet sich wie folgt:

$$E_{spez} = \frac{E_{elektr.}}{m_{Probe}} \quad (1)$$

Die im Zähler stehende elektrische Energie  $E_{elektr.}$  wird in Joule angegeben und hierbei definiert als:

$$E_{elektr.} = \frac{1}{2} C * U^2 \quad (2)$$

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen Pulsanzahl und der spezifischen Energie, die für einen vollständigen Gewebeaufschluss nötig ist, besteht. Am Beispiel von Kartoffelgewebe wurde dargelegt, dass der spezifische Energieeintrag zum vollständigen

Zellaufschluss von 10 kJ/kg auf circa 2 kJ/kg reduziert werden konnte, wenn statt einem Puls 10 Pulse zum Einsatz kamen (Knorr and Angersbach, 1998).

### 2.2.2 Feldstärke und Pulslänge

Die elektrische Feldstärke  $\vec{E}$  dient der Beschreibung der Richtung und Stärke der elektrischen Spannung über den Weg, also der Fähigkeit jenes Feldes, Kraft auf Ladung auszuüben. Sie wird durch einen Vektor, der in die Richtung der größten Änderung zeigt, dargestellt. Für die in Volt pro Centimeter angegebene elektrische Feldstärke  $\vec{E}$  gilt: (Kories and Schmidt-Walter, 2008).

$$\vec{E} = \frac{U}{s} \quad (3)$$

Die für einen erfolgreichen Zellaufschluss benötigte Feldstärke  $\vec{E}$  ist je nach Zelltypus spezifisch. Je größer eine Zelle ist, desto weniger Feldstärke ist nötig, um die Zelle zu elektroporieren. Bei einer Pflanzenzelle ( $\sim 100 \mu\text{m}$ ) bedarf es 1-2 kV/cm, Hefen mit einer Zellgröße von etwa  $10 \mu\text{m}$  benötigen ein elektrisches Feld von 2-4 kV/cm. Bakterien mit einer durchschnittlichen Zellgröße von  $1 \mu\text{m}$  wiederum bedürfen einer elektrischen Feldstärke von mehr als 10 kV/cm um aufgeschlossen zu werden (Rajuva et al., 2019, Martin-Belloso and Soliva-Fortuny, 2011)

Die Pulslänge definiert die Zeitspanne, in der das angelegte elektrische Feld auf die Probe wirkt. Dabei errechnet sich diese Zeit aus der Entladezeit des Kondensators  $t_{C(E)}$  und ist damit definiert als:

$$t_{Puls} = t_{C(E)} = 5 * \tau \quad (4)$$

mit der Zeitkonstante  $\tau$  gleich:

$$\tau = R * C \quad (5)$$

Die Gesamtpulsdauer  $t_{Ges.(Puls)}$  ergibt sich somit aus der Summe aller Einzelpulse  $t_{Puls}$  der PEF-Anwendung:

$$t_{Ges.(Puls)} = \sum t_{Puls} \quad (6)$$

Um eine ausreichende Aufladung der Transmembranspannung der Zellmembran zu erreichen, die zu einem Zellaufschluss führt, müssen Pulslänge und angelegte Feldstärke aufeinander abgestimmt werden. Bei höheren angelegten Feldstärken bedarf es kürzerer Pulslängen. Allerdings ist diese Wechselwirkung limitiert. So gibt es bei einer definierten angelegten Feldstärke einen Punkt, ab dem eine weitere Erhöhung der Pulslänge keine Zunahme des Zellaufschlusses mit sich bringt. Längere Pulse sind technisch zu präferieren, da sie wesentlich leichter umsetzbar sind als sehr kurze, wobei die Größenordnung der Pulslängen im Milli- bis Mikrosekundenbereich liegt. Folglich erfordert eine begrenzte Pulslänge eine Mindestfeldstärke, die in Abhängigkeit zur Zellgröße steht. Bezüglich der Zellgröße besteht eine umgekehrte Proportionalität, je kleiner die Zelle, desto höher ist die Mindestfeldstärke, die für eine Zellpermeabilisierung nötig ist (Sack, 2016).

Es lässt sich festhalten, dass die zur vollständigen Gewebsöffnung aufzuwendende Energie ein Minimum aufweist, welches abhängig von der externen Feldstärke und der kumulierten Pulsdauer ist. Dabei ist die Gesamtpulsdauer definiert als die Summe aller applizierten Pulse (Ammar et al., 2011, Lebovka et al., 2002)

### 2.2.3 Pulsabstand

Die Frequenz, in der die elektrischen Pulse auf das Probegut einwirken, wird als Pulsfrequenz  $f_P$  bezeichnet. Damit verbunden wird so auch die Zeitdauer zwischen einem Puls und dessen Folgepuls definiert.

Dieser Zeitabstand zwischen den einzelnen Pulsen hat gleichermaßen zur Pulslänge einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Effektivität der Elektroporation. So führt ein kurzer Pulsabstand zu einem schnellen Gewebeaufschluss, allerdings wird bei Einsatz längerer Pulsabstände ein vergleichbarer Aufschlussgrad nach einer geringeren Gesamtanzahl an Pulsen und damit verbunden, einem geringeren Energieeintrag erreicht (Sack, 2016).

Bezüglich des Pulsabstandes wurden Versuche zum Zellaufschluss von Zwiebelgewebe durchgeführt. Hierbei wurden Pulsrepetitionsraten im Spektrum von 0,01 Hz bis 5 kHz untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass der Zellaufschluss bei kleinen Pulsrepetitionsraten kleiner 1 Hz effizienter ist als bei höheren Frequenzen, ergo kürzeren Pulsabständen (Asavasanti et al., 2010).

Es gilt Pulslänge und Pulsabstand so zu wählen, dass jeder Einzelpuls hinsichtlich seiner Länge in der Lage ist, eine Membranaufladung mit daraus resultierender Membranöffnung zu bewirken und dabei den Pulsabstand so groß zu gestalten, dass die Zellmembran nach der erfolgten Aufladung



durch den Erstimpuls und der darauffolgenden Permeabilisierung wieder vollkommen entladen wird. So können die Folgepulse eine Aufladung ausgehend von einem gänzlich ungeladenen Zustand in noch intakten Membranbereichen bewirken (Sack, 2016).

#### 2.2.4 Temperaturabhängigkeit

Analog zu den meisten Extraktionsverfahren ist auch der Zellaufschluss mittels PEF abhängig von der Temperatur während der Anwendung.

Bei Anwendungen von PEF als nicht-thermisches Verfahren sind höhere Temperaturen unerwünscht, da sie mit Produktveränderungen einhergehen. Nichtsdestotrotz kann gezeigt werden, dass bei der Durchführung der PEF-Behandlung eine Temperatur von 30 bis 40° C dem Zellaufschluss zuträglich ist. So ist bei höheren Prozesstemperaturen weniger applizierte Pulsenergie für den Zellaufschluss nötig (Lebovka et al., 2005, Martin-Belloso and Soliva-Fortuny, 2011).

#### 2.2.5 Hauptkomponenten der Elektroporationsanlage

Elektroporationsanlagen setzen sich im Wesentlichen aus mehreren Bauteilen zusammen. Die Kernelemente werden in nachstehendem Absatz vorgestellt. Abbildung 4 zeigt den grundlegenden elektrotechnischen Schaltplan, der einer Pulsed-Electric-Fields Anlage zu Grunde liegt.

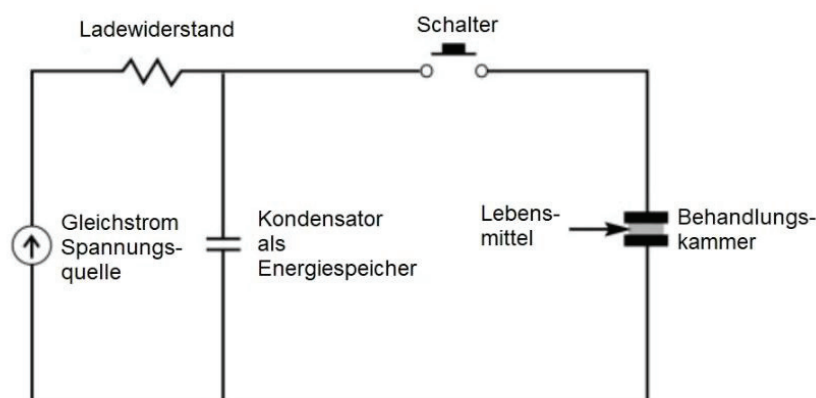


Abbildung 4: Grundlegender Aufbau einer Elektroporationsanlage nach (Leadly and Williams, 2006)

### 2.2.5.1 Spannungsquelle

In der Elektrotechnik bezeichnet die Spannungsquelle eine Quelle der elektrischen Energie, die aber nicht die Stromquelle darstellt. Die von der Spannungsquelle bereitgestellte Spannung  $U$  wird in Volt angegeben. Bei Spannungsquellen wird des Weiteren zwischen Gleichspannungs- und Wechselspannungsquellen unterschieden. Gleichspannungsquellen liefern einen zeitlich konstanten Spannungswert wohingegen Wechselspannungsquellen periodisch variierende Spannung darbietet. Unabhängig von Wechselspannung oder Gleichspannung lässt sich bei geregelte Spannungsquellen, wie es beispielsweise Labornetzteile sind, die Ausgangsspannung auf einen einstellbaren Sollwert einstellen. Die Spannung  $U$  errechnet sich aus dem Widerstand  $R$  und der Stromstärke  $I$  wie folgt (Betz et al., 1980, Kuchling, 2011):

$$U = R * I \quad (7)$$

Die elektrische Leistung  $P_{el}$ , angegeben in Watt, ergibt sich aus dem Produkt von Spannung  $U$  und Stromstärke  $I$ :

$$P_{el} = U * I \quad (8)$$

### 2.2.5.2 Elektroden

Elektroden sind elektronenleitende Bauteile. Folglich bestehen sie aus leitfähigen Materialien, vornehmlich aus Metall. Es wird hier zwischen Anode und Kathode differenziert. Die Anode emittiert Elektroden, die Kathode hingegen fungiert als Elektrodenakzeptor. Es entsteht ein elektrisches Feld  $\vec{E}$  zwischen Anode und Kathode, das abhängig vom Abstand von Anode und Kathode in Metern und der anliegenden Spannung  $U$  ist (siehe Gleichung (3)).

Das resultierende elektrische Feld ist abhängig von der Elektrodengeometrie. So liefern verschiedene Elektrodenanordnungen eine unterschiedliche Feldverteilung. Parallel angeordnete Plattenelektroden werden häufig bei Batch-Anwendungen von PEF eingesetzt, da sie ein sehr gleichmäßiges Feld in einem großen Arbeitsbereich liefern. Allerdings ergeben sich an den Randflächen der Reaktionskammer Regionen mit reduzierter Behandlungsintensität, weshalb sich geringe Volumina empfehlen. Abbildung 5 zeigt das elektrische Feld zweier parallel angeordneter Plattenelektroden (Singh et al., 2019).

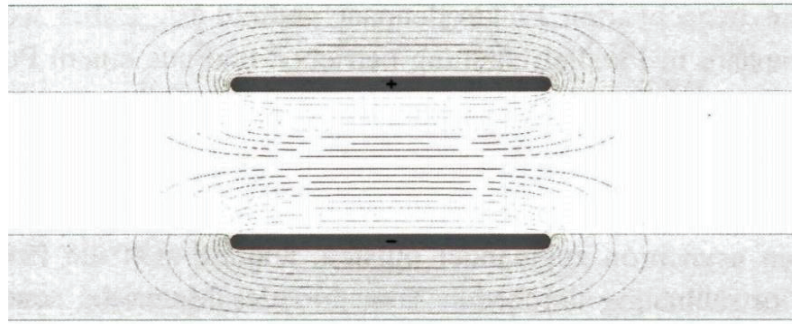


Abbildung 5: Das elektrische Feld parallel angeordneter Plattenelektroden (Sack, 2016)

Die Verwendung von Elektroden aus Edelstahl hat es sich als äußerst praktikabel erwiesen, da diese beständig und inert gegenüber dem Probegut sind und den geltenden Hygienevorschriften für Lebensmittel genügen. (Singh et al., 2019).

### 2.2.5.3 Kondensator

Kondensatoren werden als passive elektronische Bauteile bezeichnet. Sie können vorübergehend Energie speichern, sind aber nicht in der Lage Energie kontinuierlich zuzufügen. Grundlegend ist ein Kondensator aus zwei Leitern, oder auch Elektroden, aufgebaut, die durch ein dielektrisches Material mit gleichbleibender Stärke voneinander getrennt sind. Das Dielektrikum muss eine schlechte Leitfähigkeit besitzen, sprich ein Isolator sein. Die Kapazität eines Kondensators ist direkt proportional zur Oberfläche der Kondensatorplatten. (Kaiser, 1993)

Die elektrische Kapazität  $C$  eines Kondensators, angegeben in Farad  $F$ , berechnet sich aus der elektrischen Ladung  $Q$  und der Spannung  $U$  wie folgt:

$$C = \frac{Q}{U} \quad (9)$$

Die Lade-, beziehungsweise Entladezeit eines Kondensators errechnet sich aus der elektrischen Kapazität  $C$  und dem vorgeschalteten Widerstand  $R$  gemäß Gleichung (5) und Gleichung (6):

$$t_{C(L)/C(E)} = \tau = R * C \quad (10)$$

Da in der Realität die Lade-, bzw. Entladezeit nicht schlagartig erfolgt, sondern eine Verzögerung erfährt, ist die tatsächliche Lade-/Entladezeit eines Kondensators definiert als:

$$t_{C(L)/C(E)} = 5\tau = 5 * R * C \quad (11)$$

Häufig werden mehrere Kondensatoren in Parallelschaltung eingesetzt, um die Gesamtkapazität zu erhöhen. Kondensatoren in Parallelschaltung verhalten sich wie folgt:

$$C_{ges} = C_1 + C_2 + \dots C_n \quad (12)$$

Eine gängige Kondensatorbauform ist der Elektrolytkondensator. Hierbei bildet der Elektrolyt die zweite Elektrode. Abbildung 6 zeigt den schematischen Aufbau eines Elektrolytkondensators.

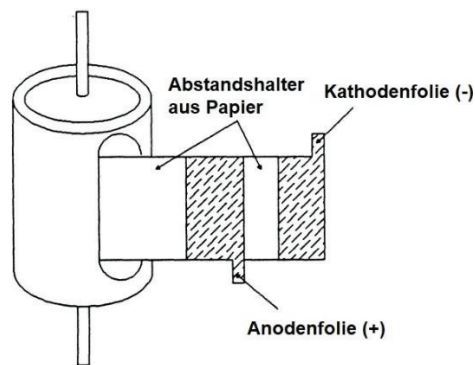


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Elektrolytkondensators nach (Kaiser, 1993)

#### 2.2.5.4 Pulsgeber

Der Pulsgeber beschreibt ein elektrotechnisches Bauteil, das sobald ein Triggersignal kommt, den Stromkreis frei gibt und, wie in diesem Fall, die in der Kondensatorkaskade gespeicherte Ladung das Probegut durchsetzen kann. Hierfür wird meist ein Schalter verwendet. Schalter lassen sich unterteilen in Schließschalter und Öffnungsschalter. Schließschalter aktivieren den Stromkreis, können ihn aber nicht abschalten. Öffnungsschalter hingegen unterbrechen den Stromkreis, können ihn aber nicht einschalten. Es existieren darüber hinaus Schalter, die die Eigenschaften eines Öffnungs- und eines Schließschalters vereinen und somit den Stromkreis aktivieren sowie deaktivieren können (Sack, 2016, Martin-Belloso and Soliva-Fortuny, 2011).

### 2.2.5.5 Elektrischer Widerstand

In einem Leitungsdraht ist ein ungehindertes Strömen der Elektroden durch die Metallatomen nicht möglich. Der Werkstoff des Leiters setzt den Elektronen einen Widerstand entgegen, der die Stromstärke limitiert. Unter diesem Widerstand  $R$ , auch elektrischen Widerstand oder ohmscher Widerstand genannt, versteht man das Verhältnis der Spannung zwischen den Enden eines Leiters zur Stärke des Stroms in diesem Leiter. Der Widerstand  $R$  wird in Ohm ( $\Omega$ ) angegeben und steht im Verhältnis zu Spannung  $U$  und Stromstärke  $I$  wie folgt (Betz et al., 1980, Kuchling, 2011):

$$R = \frac{U}{I} \quad (13)$$

### 2.2.5.6 Zellaufschlussreaktor

Der Zellaufschlussreaktor dient der Applizierung des elektrischen Feldes an das Zellgewebe, wobei die Auslegung stets auf eine homogene Behandlung des Prozessguts abzielt. Er fungiert als Bindeglied zwischen der Pulsspannungsversorgung und dem zu behandelnden Gut. Für Durchsatzmengen im Labormaßstab geht die Elektroporation in abgeschlossenen Gefäßen, wie zum Beispiel kleinen Küvetten vonstatten (Sack, 2016).

An die Behandlungskammer der PEF-Anwendung sind bestimmte Voraussetzungen gesetzt. So soll der Zellaufschlussreaktor abwaschbar und chemisch inert gegenüber dem Probegut sein. Der Zellaufschlussreaktor kann kontinuierlich oder statisch (im Batchverfahren) genutzt werden. Batchverfahren findet hierbei vordergründig im Labormaßstab Anwendung (Singh et al., 2019).

Das Volumen der Zellaufschlussreaktors  $V_{ZR}$  ergibt sich für Quader aus:

$$V_{ZR} = l_{ZR} * h_{ZR} * b_{ZR} \quad (14)$$

Für zylindrische Bauformen errechnet sich das Volumen der Zellaufschlussreaktors  $V_{ZR}$  aus:

$$V_{ZR} = r^2_{ZR} * \pi * h_{ZR} \quad (15)$$

## 2.3 Technische Anwendungen von Pulsed-Electric-Fields

In der Lebensmittelindustrie wird Pulsed-Electric-Fields bereits für eine Vielzahl von Anwendungen eingesetzt. Der Zellaufschluss von Pflanzenzellen mittels PEF-Anwendung wird sich unter anderem zur Extraktionssteigerung bei der Zuckerherstellung aus der Zuckerrübe, der Behandlung von Beerenmaische bei der Weinherstellung oder der Extraktion von acrylamid- oder melanoidin-bildenden Substanzen aus der Kartoffel in der Kartoffelchipsproduktion zu Nutze gemacht (Sack, 2016).

Neben der Anwendung zur Extraktionsoptimierung finden PEF-Anlagen auch Anwendung als Strategie zur Verlängerung der Haltbarkeit in der Saffherstellung oder in der Molkereitechnologie, durch die Inaktivierung von Mikroorganismen oder Enzymen (Kumar et al., 2019, Leadly and Williams, 2006).

## 2.4 Grundlagen biologischer Zellen

Grundlegend sind alle Lebewesen aus Zellen aufgebaut. Die Zelle ist die einfachste lebensfähige Ansammlung von Materie in der Hierarchie der biologischen Organisation. Die meisten Zellen sind in der Größenordnung von einem bis 100  $\mu\text{m}$  im Durchmesser. Es existieren eine Vielzahl an Lebewesen, die lediglich aus einer Zelle bestehen, sogenannte Einzeller. Dazu zählen unter anderem Bakterien und diverse Eukaryoten wie Pilze, wozu auch Hefen zählen, oder Pflanzeneinzeller (Campbell, 1996).

### 2.4.1 Mikroalgen

Mikroalgen kommen in unterschiedlichen Lebensformen vor, von mikroskopisch kleinen Einzellern bis hin zu makroskopischen mehrzelligen losen oder hauchdünnen Konglomerationen. Der Begriff Algen bezieht sich sowohl auf Makroalgen als auch auf eine stark diversifizierte Gruppe von Mikroorganismen, die als Mikroalgen bekannt sind. Die Anzahl der Algenarten wurde auf ein bis zwei Millionen geschätzt, und die meisten von ihnen sind Mikroalgen. Seit den späten 1940er Jahren liegt der wissenschaftliche Fokus hinsichtlich Massenkultivierung auf den Mikroalgen. Mikroalgen aus Aquakulturen finden breite Nutzung in der Humanernährung, als Nahrungsergänzungsmittel oder Farbstoff, als Tierfuttermittel, in der Abwasserreinigung oder im Bereich der Biokunststoffe (Barsanti and Gualtieri, 2006, Oh-Hama and Miyachi, 1988, Borowitzka et al., 1988).

***Chlorella sp.***

Die Spezies *Chlorella* war eine der ersten Algen, die je als Reinkultur isoliert wurde. Die einzellige Mikroalge gehört zur Gattung der Grünalgen und ist kugelförmig, unbeweglich und hat einen Durchmesser von 5-10  $\mu\text{m}$  (Oh-Hama and Miyachi, 1988).

***Scenedesmus sp.***

Die Mikroalge *Scenedesmus* gehört zu den Grünalgen. Charakteristisch ist das Zusammenlagern der Einzelzellen zu zweidimensionalen Clustern aus zwei, vier, acht oder in seltenen Fällen sogar 16 Zellen. Für eine Massenkultivierung wird vorrangig die Subgattung *Acutodesmus* eingesetzt. Die Einzelzellen sind elliptisch geformt mit spitzen Enden, unbeweglich und im Durchmesser 4-8  $\mu\text{m}$  groß (Soeder and Hegewald, 1988).

**2.4.2 Hefen**

Campbell (1996) beschreibt Hefen als „einzellige Pilze, die aquatische oder feuchte Habitate besiedeln.“ Die Reproduktion erfolgt hauptsächlich ungeschlechtlich durch einfache Zellteilung. Hefen werden bereits seit Jahrtausenden für die Brotherstellung oder die Bereitung alkoholischer Getränke vom Menschen genutzt. In Abhängigkeit des Nährstoffangebots liegen die Zellen einzeln oder als filamentöser Zellverbund vor (Campbell, 1996).

***Saccharomyces cerevisiae***

Der Hefepilz *S. cerevisiae* hat eine Vielzahl unterschiedlicher Stämme und gehört zu den bedeutendsten vom Menschen genutzten Pilzen, der als Wein-, Back- oder Brauhefe genutzt wird. Hierbei wird sich ihre Eigenschaft zu Nutze gemacht, unter anaeroben Bedingungen Glucose zu Ethanol und Kohlenstoffdioxid umzuwandeln. Die Einzelzellen der *S. cerevisiae* sind oval geformt und durchschnittlich 4-8  $\mu\text{m}$  im Durchmesser (Campbell, 1996, Nethe-Jaenchen, 2001, Antranikian and Grote, 2006)

### 2.4.3 Bakterien

Bakterien, auch als Prokaryoten (ohne echten Zellkern) bezeichnet, sind einzellige Mikroorganismen. Sie zeigen eine immense Vielfalt von Lebensweisen, wodurch sie nahezu jede ökologische Nische besiedeln. Eine einzelne Bakterienzelle ist ein selbstständiger Organismus, der sich durch einfache Zellteilung reproduziert. Aufgrund ihres unterschiedlichen Zellwandaufbaus werden sie in grampositive und gramnegative Gruppen unterteilt (Campbell, 1996, Nethe-Jaenchen, 2001).

#### *Escherichia coli*

Die Enterobakterien der Gattung *Escherichia. coli* sind gramnegative, fakultativ anaerobe Stäbchen mit einer Länge von etwa 3  $\mu\text{m}$ . Viele *E. coli* sind Normalbestandteil der humanen und tierischen Darmflora, es gibt aber auch pathogene Vertreter dieser Spezies. Lange Zeit galt *Escherichia coli* als der am besten untersuchte Organismus und ist ein gerne genutzter Labor-Mikroorganismus an dem grundlegende Analysen durchgeführt werden. Darüber hinaus dient er als Marker-Bakterium, um beispielsweise Verunreinigungen in Wasser nachzuweisen (Nethe-Jaenchen, 2001, Antranikian and Grote, 2006).

### 2.4.4 Pflanzenzellen

Die meisten Pflanzenzellen sind etwas 100-200  $\mu\text{m}$  groß. Sie bilden in großen Zellverbunden die Zellstruktur der Pflanze (Campbell, 1996)

#### **Zuckerrübenpressschnitzel**

Zuckerrübenpressschnitzel sind das Abfallprodukt aus der Zuckerproduktion aus Zuckerrüben. Es gibt Bestrebungen, diese in der Wertschöpfungskette zu halten, indem aus ihnen wertgebende Inhaltsstoffe extrahiert werden.



### 3. Pulsed-Electric-Fields Anlage im Labormaßstab

Nachdem die elektrotechnischen Grundlagen und deren Kenngrößen definiert wurden, ist Folgeziel der Arbeit, eine Kleinstmaßstab-PEF-Anlage für den Laboreinsatz zu planen, auszulegen und zu konstruieren. Die Herangehensweise zur Umsetzung ist in folgendem Kapitel dargelegt.

#### 3.1 Schaltplan der Anlage im Labormaßstab

Als Basis zur Konstruktion wird ein elektrotechnischer Schaltplan entworfen, auf den sich die folgende Konstruktion beziehen wird. Der elektrotechnische Schaltplan (Abb. 7) beschreibt den Aufbau wie er für diese Arbeit vorgedacht ist. Entsprechend diesem werden die Bauteile und deren Größenauslegung gewählt und angepasst. Zu sehen sind die Kernelemente: Spannungsquelle, Widerstände zum Laden und Entladen der in Parallelschaltung verbauten Kondensatoren, ein Schutzwiderstand gegen Überschlag, der Pulsgeber (Schalter) und der Zellaufschlussreaktor.

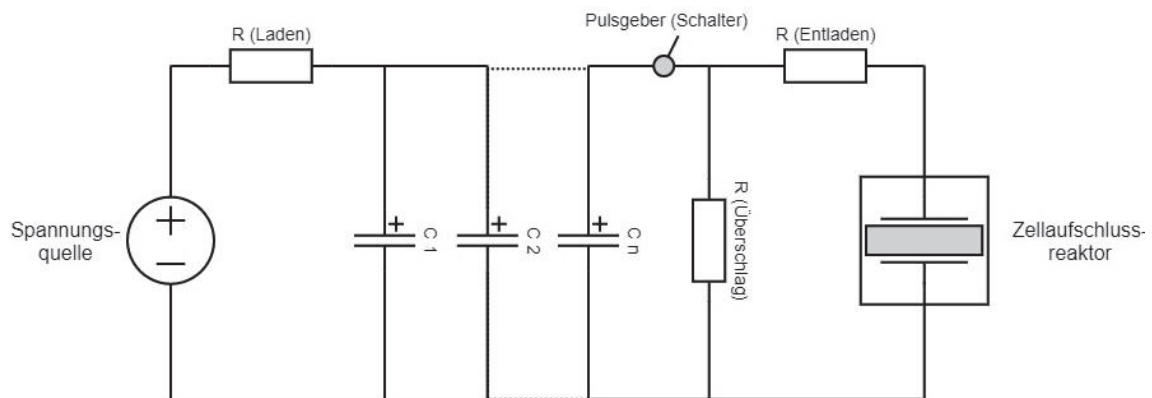


Abbildung 7: Schaltplan der Rohform der PEF-Anlage (eigene Abbildung)

Orientiert an diesem Bauplan wurden die Einzelkomponenten ausgewählt und für den Einbau vorbereitet.

#### 3.2 Bauelemente der PEF-Anlage im Labormaßstab

In Kapitel 2.2.2 sind die Kernelemente einer PEF-Anlage erläutert worden. Folgender Abschnitt nimmt auf die vorangegangenen Bauelemente einer Elektroporationsanlage Bezug und beschreibt deren Auslegung für die Anfertigung einer Anlage im Kleinstmaßstab, wie sie in dieser Arbeit als mobile Laboranlage angedacht ist.

### 3.2.1 Spannungsquelle

Als Spannungsquelle dient das portable Gleichstrom Labornetzgerät HM310 der Firma HANMATEK. Es wird an eine gewöhnliche Haushaltssteckdose angeschlossen, sprich mit 230 Volt betrieben. Die vom Netzgerät ausgegebene Spannung und Stromstärke lassen sich auf zwei Nachkommastellen in einer Stellbreite von 0 bis 30 Volt beziehungsweise 0-10 Ampere einstellen (siehe Abb. 8). Somit ergibt sich nach Gleichung (8) eine maximale elektrische Leistung von  $P_{el}$  von 300 Watt. Die Wahl eines Labornetzteils wurde dadurch beeinflusst, dass viele Labore bereits entsprechende Geräte zur Verfügung haben und es somit äußerst praktikabel ist in eine Labormaßstab-PEF-Anlage zu integrieren oder eben jenes für etwaige andere Anwendungen zu nutzen. Auch eine Neuanschaffung ist kostenüberschaubar umzusetzen. Limitierender Faktor bei der Wahl eines für die PEF-Anwendung im Labormaßstab geeigneten Geräts war auf einer Seite der Anschaffungspreis, auf der anderen Seite auch Arbeitssicherheitsbedenken. Es galt darauf zu achten, dass die ausgegebene Stromstärke und Spannung nicht in einem Arbeitsschutz relevanten Bereich liegen. Starkstromanwendungen als Spannungsquelle sind kostenintensiv und bedürfen einiger Arbeitsschutzvorkehrungen, was sie für diese Arbeit und deren Umsetzung unattraktiv macht. Das in dieser Arbeit verwendete Labornetzgerät ist leicht transportierbar, problemlos und überall ohne Zusatzvorkehrungen einsetzbar, verfügt über einen Überlastschutz und ist Kurzschlussfest, was dem Anwender zusätzlich Sicherheit bietet.



Abbildung 8: Spannungsquelle HANMATEK HM310 (eigene Aufnahme)

### 3.2.2 Zellaufschlussreaktor

Im Rahmen der Arbeit kommen drei unterschiedliche Zellaufschlussreaktoren (ZAR) mit differierenden Volumina zum Einsatz. Unterschiedliche Reaktoren werden verwendet, da deren Geometrien und Volumina den Abstand von Anode zu Kathode definieren und somit gemäß Gleichung (3) direkten Einfluss auf die elektrische Feldstärke und somit die Effektivität des Zellaufschlusses haben. So gilt es bei der Wahl des Volumens, einen Kompromiss zu finden zwischen einer für den Zellaufschluss ausreichenden elektrischen Feldstärke und einem Elektrodenabstand, der groß genug ist, um eine praktikable Arbeitsweise zuzulassen. Bei zu kleinen Volumina und Zellaufschlusskammern gestaltet sich das Befüllen und Entleeren des Probeguts sowie das Bereitstellen einer ausreichenden Menge an Probegut zur Analyse und Verifizierung des Zellaufschlusses umständlich. Daher fiel die Wahl auf eben jene drei Zellaufschlussgefäße, mit absteigenden Volumina, die es aber dennoch ermöglichen bei kleinem Elektrodenabstand noch eine Handhabbarkeit der Proben zu gewährleisten.

Die Zellaufschlussreaktoren sind aus Kunststoff beziehungsweise Glas gewählt, damit sie gegenüber der Probe inert und gut zu reinigen sind. Das Volumen der einzelnen Reaktoren  $V_{ZR}$  errechnet sich in Abhängigkeit ihrer Geometrie gemäß den Gleichungen (14) und (15). Abbildung 9 zeigt die drei Zellaufschlussgefäße.

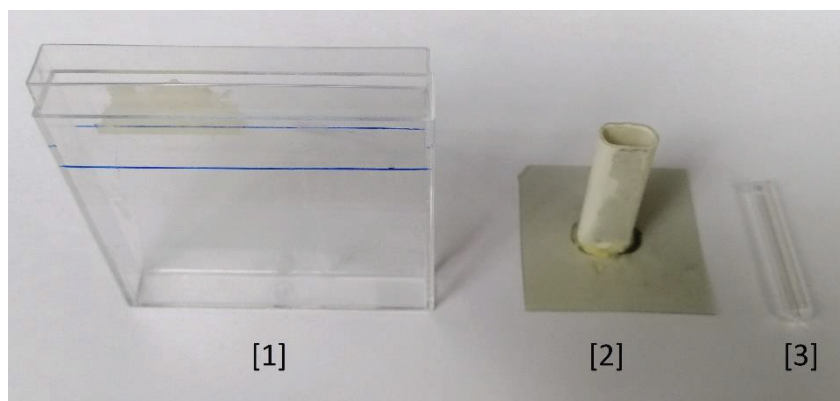


Abbildung 9: In der Arbeit verwendete Reaktionsgefäße

Zellaufschlussreaktor 1 ist eine längliche, hohe, rechteckige Plastikschale. Zellaufschlussreaktor 2 ist ein rechteckig ausgeformtes Plastikröhrchen mit leicht abgerundeten Kanten. Die Abrundung ist so geringfügig ausgeprägt, dass diese bei der Berechnung des Volumens vernachlässigt wird. Bei Zellaufschlussreaktor 3 handelt es sich um ein Durham Röhrchen der Firma Marienfeld Superior. Die Glasröhrchen sind zylindrisch geformte Miniatur-Reagenzgläser. Das abgerundete untere Ende der Reagenzröhrchen wird in der Berechnung ihres Volumens aufgrund

ihres geringen Einflusses vernachlässigt. Die Kerndaten der Zellaufschlussgeräte werden in nachfolgender Tabelle 1 dargelegt.

Tabelle 1: Kerndaten der verwendeten Zellaufschlussreaktoren (ZAR)

	<b>ZAR 1</b>	<b>ZAR 2</b>	<b>ZAR 3</b>
Material	Kunststoff	Kunststoff	Glas
Geometrie	rechteckig	rechteckig	zylindrisch
Länge außen [mm]	65	30	--
Breite außen [mm]	10	7	--
Höhe außen [mm]	50	11	30
Durchmesser außen [mm]	--	--	6
Volumen (außen) nach Gl. (14) bzw. (15) [m <sup>3</sup> ]	$32,5 \cdot 10^{-5}$	$2,3 \cdot 10^{-5}$	$0,8 \cdot 10^{-5}$
Wandstärke [mm]	1	1	0,7
Volumen (innen) [m <sup>3</sup> ]	$25,2 \cdot 10^{-5}$	$1,7 \cdot 10^{-5}$	$0,5 \cdot 10^{-5}$
Abstand der Elektroden [mm]	10	7	6
Füllmenge Probe [ml]	~25	~1,7	~0,5
Elektrische Feldstärke nach Gl. (3) [V/cm]	30	43	50

Um bei Reaktionsgefäß 1 einen sicheren Stand zu gewährleisten und darüber hinaus eine Halterung zu haben, in der sich auch die Elektroden einfassen lassen und dann direkt am Reaktionsgefäß anliegen, wurde extra für diesen Zweck eine Halterung entworfen, modelliert und mittels 3D-Drucker umgesetzt. Der Entwurf der Halterung sowie das fertige Exemplar sind in Abbildung 10 ersichtlich.

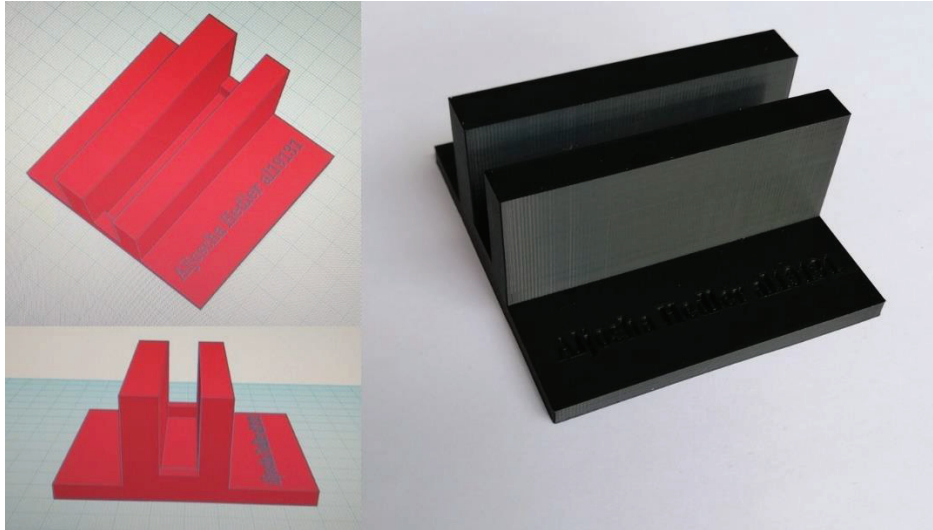


Abbildung 10: Halterung des Zellaufschlussreaktors, links das 3D-Modell und rechts die ausgefertigte Version (eigene Aufnahme)

### 3.2.3 Elektroden

Zur Bildung der Plattenelektroden wurde ein 0,7 Millimeter starkes Edelstahlblech gewählt. Hierbei wurde für jedes der drei Zellaufschlussgefäße individualisiert. Je nach Form und Größe des Zellaufschlussreaktors wurden die zueinander symmetrischen Plattenelektroden angepasst, um möglichst flächendeckend zum jeweiligen Zellaufschlussgefäß zu sein und so Verluste in der durch die Elektroden induzierten elektrische Feldstärke zu minimieren. Die auf die Reaktionsgefäße angepassten Plattenelektroden sind in Abbildung 11 dargestellt.

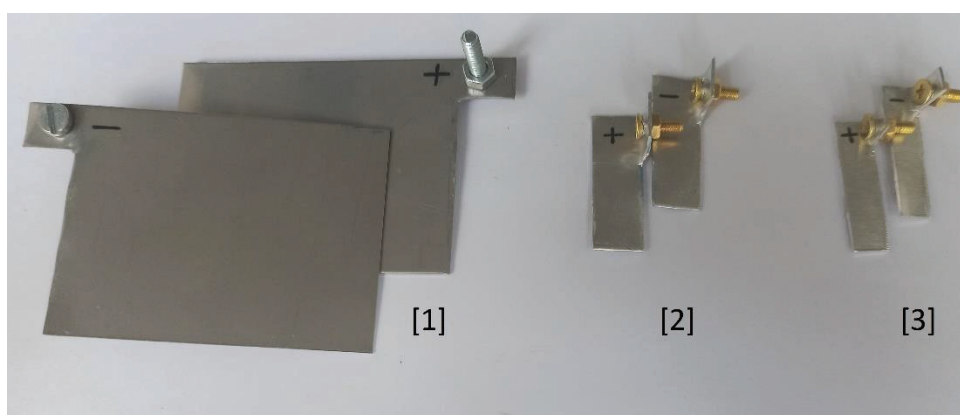


Abbildung 11: Plattenelektroden, [1] für Reaktionsgefäß 1, [2] für Reaktionsgefäß 2 und [3] für Reaktionsgefäß 3 (eigene Aufnahme)

### 3.2.4 Kondensatoren

Die Kondensatoren bilden einen Kernaspekt der PEF-Anlage. Auch hier sind im Rahmen der Erstellung einer Abschlussarbeit monetäre Grenzen gesetzt. Kondensatoren, die hohe Energiemengen speichern können und ihren Arbeitsbereich in höheren Spannungsbereichen von 200 Volt aufwärts haben, sind im Rahmen einer solchen Arbeit nicht realisierbar. Daher lag der Fokus auf Kondensatoren im Arbeitsbereich des verwendeten Labornetzteils von größer 30 Volt. Um hierbei die Sicherheit im Prozess gewährleisten zu können sind Kondensatoren gewählt worden, die für eine Spannung von 50 beziehungsweise 63 Volt ausgelegt sind. Die elektrische Kapazität  $C$  der verwendeten Kondensatoren der Firma FTCAP betragen  $2200 \mu\text{F}$  beziehungsweise der Firma Würth Electronic  $4700 \mu\text{F}$  (siehe Abb. 12). Parallelgeschaltet kommen zwei Kondensatoren mit  $2200 \mu\text{F}$  und ein Kondensator mit  $4700 \mu\text{F}$  zum Einsatz, womit sich nach Gleichung 12 eine Gesamtkapazität  $C$  von  $9100 \mu\text{F}$  oder auch  $9,1 \text{ mF}$  ergibt.



Abbildung 12: Elektrolytkondensatoren, Beispielbild (Conrad, 2021)

### 3.2.5 Elektrische Widerstände

Elektrische Widerstände erfüllen innerhalb einer Elektroporationsanlage verschiedene Aufgaben. Zum einen dient ein vor sowie nach den Kondensatoren geschalteter Widerstand der Aufladung beziehungsweise Entladung der Kondensatoren und definiert, je nach elektrischem Widerstand  $R$  des verwendeten Widerstands, die hierfür benötigte Zeit gemäß Gleichung (10). Es lässt sich bereits an der Gleichung erkennen, dass sich die Be- oder Entladezeit direkt proportional zum Widerstand verhält. Das bedeutet, je kleiner der Widerstand desto kleiner die Be- oder Entladezeit. Des Weiteren finden Widerstände Einsatz in der PEF-Anlage, um einen Überschlag zu verhindern. Hierfür wird ein Widerstand entsprechend so groß ausgelegt, dass er den Stromfluss begrenzt und so einem Überschlag entgegenwirkt. Tabelle 2 zeigt die Kerndaten der für diese Arbeit verwendeten Widerstände.

Tabelle 2: Kerndaten der verwendeten Widerstände

	<b>Widerstand A</b>	<b>Widerstand B</b>
Typ	Hochlast-Widerstand	Hochlast-Widerstand
Widerstand $R$ [ $\Omega$ ]	1	10.000
Bedrahtung	axial	axial
Belastbarkeit [W]	100	100
Abmessung LxBxH [mm]	65,5x27x26	65,5x27x26
Anwendung	Widerstand zur Ladung/ Entladung der Kondensatoren	Widerstand zum Schutz vor Überschlag
Lade-/Entladezeit nach Gl. (10) [s]	0,045	--

Um im Aufbau der Labormaßstab-PEF-Anlage eine adäquate Lade- und Entladezeit zu generieren, werden hierfür je zum Laden und Entladen zwei Widerstände  $R(A)$  mit einem Widerstandswert von einem Ohm eingesetzt. Damit ergibt sich aus der Gesamtkapazität von  $9,1 \text{ mF}$  und einem Ohm entsprechend Gleichung (10) eine Lade-/ Entladezeit von  $0,045$  Sekunden oder  $45,5$  Millisekunden. Diese Zeit genügt den Ansprüchen, die in Kapitel 2.2.1.2 definiert wurden. Die Entladezeit  $t_{C(E)}$  der Kondensatoren in Parallelschaltung entspricht in der Anwendung somit der Zeit eines Einzelpulses  $t_{puls}$ .

Der hochohmige Widerstand  $R(B)$  hat einen Widerstandswert von  $10 \text{ k}\Omega$ . So wird der Strom begrenzt, sollte es bei der Probe zu einem Überschlag kommen. Die beiden Typen der verwendeten elektrischen Widerstände zeigt Abbildung 13.

Abbildung 13: Hochlastwiderstände, links mit  $1 \Omega$ , rechts mit  $10.000 \Omega$  (eigene Aufnahme)



### 3.2.6 Pulsgeber

Der Pulsgeber definiert die Frequenz der Pulse  $f_p$ , angegeben in Hertz. In dieser Arbeit wird ein Drucktaster aus Edelstahl (siehe Abb. 14) verwendet, der per Knopfdruck und für die Dauer des Kontakts den Stromkreislauf hin zur Zellaufschlusskammer frei gibt und somit die Kondensatoren über den Widerstand entlädt. Folglich ist der Drucktaster ein Schalter mit Schließfunktion, der nach Ende der Betätigung selbstständig öffnet. Er ist für eine Maximalbelastung von 250 V ausgelegt und damit mit einem Sicherheitspuffer zur Spannung, die im Versuchsaufbau verwendet wird, versehen. Die Pulsfrequenz  $f_p$  sowie die kumulierte Gesamtdauer der applizierten Pulse  $t_{Ges.(Puls)}$  ergeben sich aus der Anzahl, wie oft der Taster betätigt wird und den Abständen zwischen den einzelnen Betätigungen.



Abbildung 14: Drucktaster, ausgelegt als Schließer (eigene Aufnahme)

### 3.2.7 Kabelverbindung

Zur Verbindung der einzelnen Bauteile gemäß dem entworfenen Schaltplan ist eine Aderleitung verwendet worden. Der Querschnitt ist so zu wählen, dass seine Strombelastbarkeit nicht kleiner ist als der maximale Dauerstrom, der unter Normalbedingungen durch den Leiter fließt. So hat jeder genormte Leitungsquerschnitt eine spezifische maximale Strombelastung. In dieser Arbeit ist eine einadrige Kupferlitze in einer flexiblen Kunststoffisolierung mit einem Querschnitt von  $2,5 \text{ mm}^2$  gewählt worden, dargestellt in Abbildung 15. Sie ist für eine maximale Belastbarkeit von 32 Ampere ausgelegt. Da die maximale Ausgabestromstärke der Spannungsquelle bei 10 Ampere liegt ist somit mit ausreichender Sicherheitsspanne zur Maximallast auf die Anforderungen zum Schutz gegen gefährliche Körperströme, Überslag oder Kurzschlüsse eingegangen worden (DIN/VDE-0298-4, 2013).





Abbildung 15: Flexible Aderleitung mit Kunststoffummantelung (eigene Aufnahme)

### 3.3 Konstruktion des Labormaßstab-PEF

Folgendes Kapitel behandelt die Zusammenführung der im vorangegangenen Kapitel 3.2 beschriebenen und für die Konstruktion der Pulsed-Electric-Fields-Anlage ausgewählten Bauelementen. Die PEF-Anlage mit den gewählten, oben aufgeführten Komponenten ist entsprechend dem nachfolgenden Schaltplan (Abb. 16) konstruiert worden, angelehnt an den in Kapitel 3.1 Abb. 7. erörterten Schaltungsaufbau. Zwei baugleiche Widerstände  $R(A)$  mit einem elektrischen Widerstand von  $1\ \Omega$  sind zum Laden und Entladen der Kondensatoren gewählt worden, sowie ein hochohmiger Widerstand  $R(B)$  mit  $10\ k\Omega$  zum Schutz vor Überschlag.

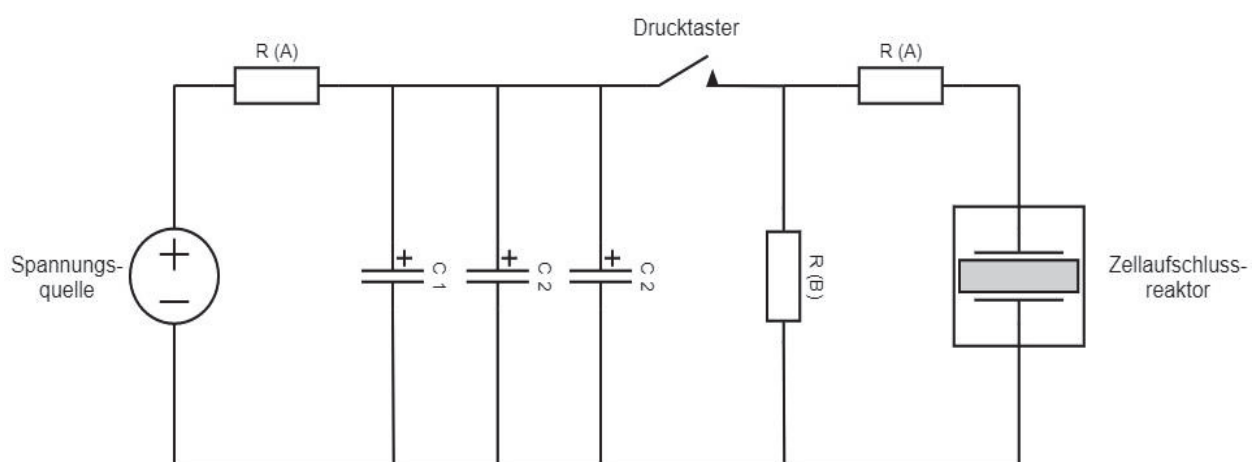


Abbildung 16: Schaltplan der PEF-Anlage (eigene Abbildung)

Der Konstruktion und dem Zusammenbau der Elektroporationsanlage lag das Bestreben zu Grunde, sämtliche Bauteile und Komponenten so zu wählen und zu verbauen, dass zu jedem Zeitpunkt die Sicherheit des Bedienenden gewährleistet ist. So sind alle Kontaktstellen, Lötverbindungen und eingebauten Teile mittels Multimeter auf Kurzschluss und Durchgang geprüft worden, um so die Funktionalität sicherzustellen. Darüber hinaus wurden alle Lötstellen und Kontaktstellen mit Schrumpfschlauch abgedeckt, um offene Stellen, die zu einem elektrischen Schlag führen können, zu verhindern. Um Reparaturen oder den Austausch einzelner Komponenten zu erleichtern und so die Anlage auch beliebig erweiterbar zu gestalten, wurden die Kernbaukomponenten mit Wago-Klemmen eingefügt. Darüber hinaus wurden Zulentlastungen in die Konstruktion integriert um Schäden an Bauteilen und Löt-, oder Verbindungsstellen zu verhindern.

Bei der Konstruktion der Laboranlage lässt sich der Aufbau in drei Teile unterteilen. Der erste Teil umfasst die Spannungsquelle, der zweite Teil umfasst die elektrischen Bauteile wie die elektrischen Widerstände, der Pulsgeber und Kondensatoren und den dritten Teil stellt der Zellaufschlussreaktor dar.

Die Spannungsquelle, das Labornetzgerät ist mit einem Plus- und einem Minuskabel versehen worden. Diese führen, gemäß dem obigen Schaltplan (siehe Abbildung 16), von der Spannungsquelle zu den elektrischen Bauteilen. Die Verbindung wurde mittels Wago-Klemmen umgesetzt, damit Teil eins und Teil zwei gesondert transportiert, ausgetauscht und adaptiert werden können.

Der zweite Teil, die Elektronik, wird in Abbildung 17 aufgezeigt. Die verwendeten Kondensatoren und elektrischen Widerstände sind auf einer verzinkten Montageplatte fixiert worden. Die Elektronik wurde zusätzlich in einen abschließbaren Sicherungskasten der Schutzklasse IP65 gesetzt, um Außenstehende daran zu hindern, im laufenden Betrieb in die Elektronik zu greifen und den Bedienenden zu schützen. IP65 (Ingress Protection 65) beschreibt hierbei den Eindringenschutz von Stäuben als komplett Staubsicher und von Wasser als sicher gegen Wasserstrahlen mit limitiertem Wassereintritt. Diese Schutzklasse wurde gewählt, um die Elektronik auch im gewöhnlichen Laborbetrieb zu schützen.

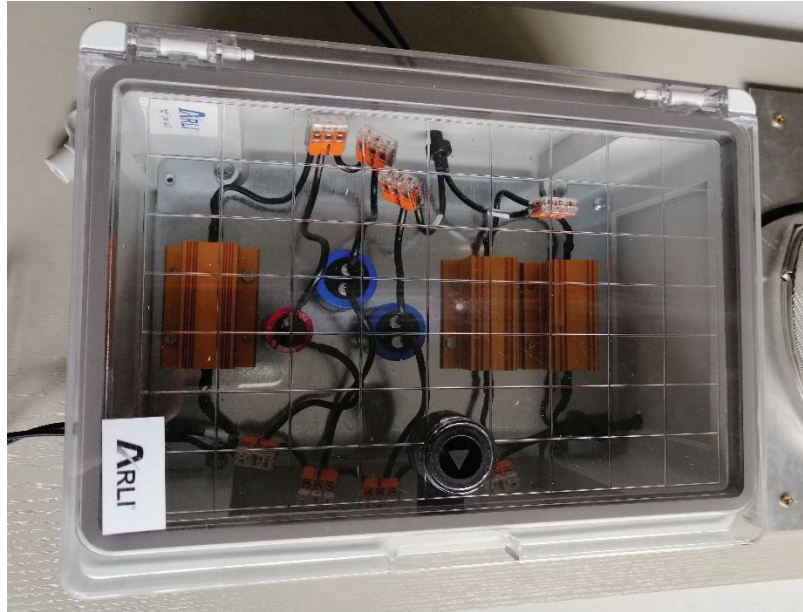


Abbildung 17: Teil zwei der PEF-Anlage, Elektronik in Sicherungskasten (eigene Aufnahme)

Der Drucktaster ist analog dazu nach außen gelegt worden, um bei geschlossenem und gesichertem Sicherungskasten eine Bedienung zuzulassen. Auch hier wurden alle Verbindungen nach außen mit Zugentlastung und Schrumpfschlauch isoliert und gesichert (siehe Abb. 18).

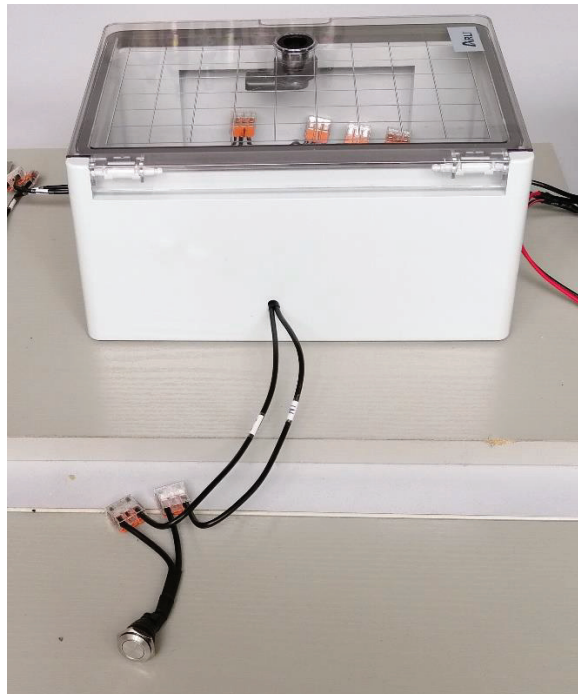


Abbildung 18: Drucktaster und Sicherungskasten (eigene Aufnahme)

Der dritte und letzte Part, der Zellaufschlussreaktor, ist ebenfalls außerhalb des Sicherungskastens angesiedelt und mittels Wago-Klemmen angeschlossen. Der Zellaufschlussreaktor besteht im Kern aus dem Reaktionsgefäß, den beiden Elektroden, Anode und Kathode, und einer Halterung. Die Elektroden wurden mit Maschinenschrauben und Mutter versehen, an der dann via Kabelschuh die Verkabelung montiert wurde. Um zu verhindern, dass es zu einer Gefährdung des Benutzers der Anlage durch die offenliegenden Elektroden kommt, wurde über den Zellaufschlussreaktor mit Elektroden und Halterung ein Faraday'scher Käfig, der geöffnet und geschlossen werden kann, gebaut. Der Faraday'sche Käfig sorgt für eine Abschirmung des elektrischen Feldes durch Influenz. Unter Influenz versteht man nach Kories and Schmidt-Walter (2008), „die Verschiebung der beweglichen Ladungen in einem Leiter, der in ein elektrisches Feld eingebracht wird.“ Der Faraday'sche Käfig macht sich dies insofern zu Nutze, als dass sich in einem elektrischen Hohlkörper die Ladung so auf dessen Oberfläche verschiebt, dass sich die Ladung in seinem Inneren aufhebt. Dies gilt für geschlossene Oberflächen sowie näherungsweise auch für Gitterstrukturen, wie sie auch in dieser Arbeit zum Einsatz kommen. Hierbei gilt, je feinmaschiger die Gitterstruktur, desto besser die Abschirmung (Kories and Schmidt-Walter, 2008, Betz et al., 1980).

Der dritte Teil, Zellaufschlussreaktor (hier beispielhaft Zellaufschlussgefäß 1), Halterung und Faraday'sche Käfig, ist in Abbildung 19 aufgezeigt.

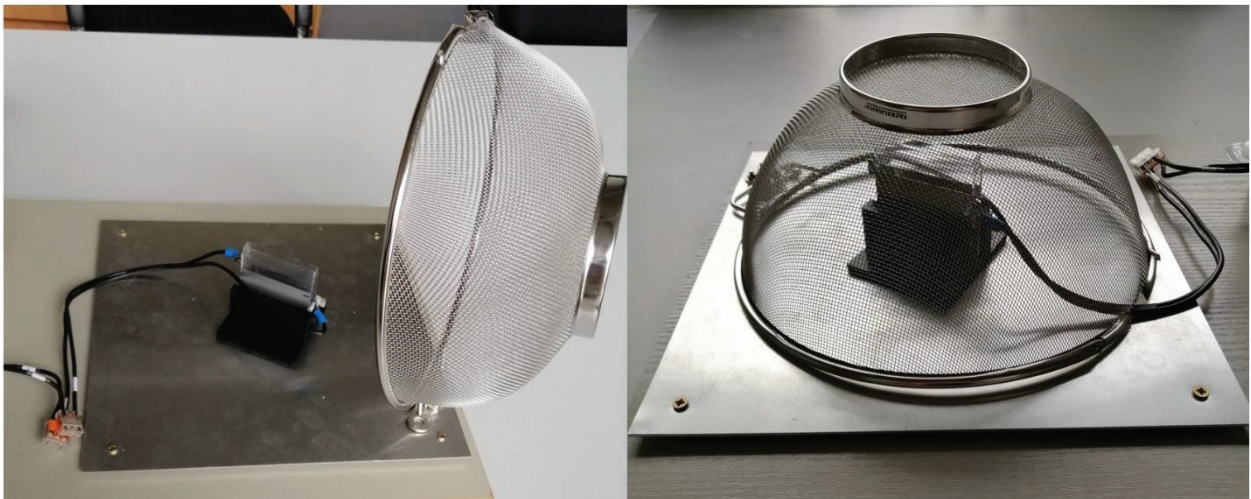


Abbildung 19: Teil 3 der PEF-Anlage mit geöffnetem (links) und geschlossenem (rechts) Faraday'schen Käfig (eigene Aufnahme)



Die gesamte PEF-Anlage, mit Ausnahme des Labornetzgeräts, wurde auf eine Holzplatte platziert und fixiert, um einen sicheren Stand zu gewährleisten und gleichermaßen den Transport zu erleichtern. Der Faraday'sche Käfig wurde mit einer 0,8 Millimeter starken Edelstahlplatte unterbaut, um eine geschlossene Umhüllung zu erreichen. Die Metallplatte wird mittels Distanzscheiben leicht erhöht, um das Stauen von Wasser oder flüssigem Probenmaterial zwischen Montageplatte und Metallplatte zu verhindern. Abbildung 20 zeigt die finale gesamte Labormaßstab Pulsed-Electric-Fields Anlage.

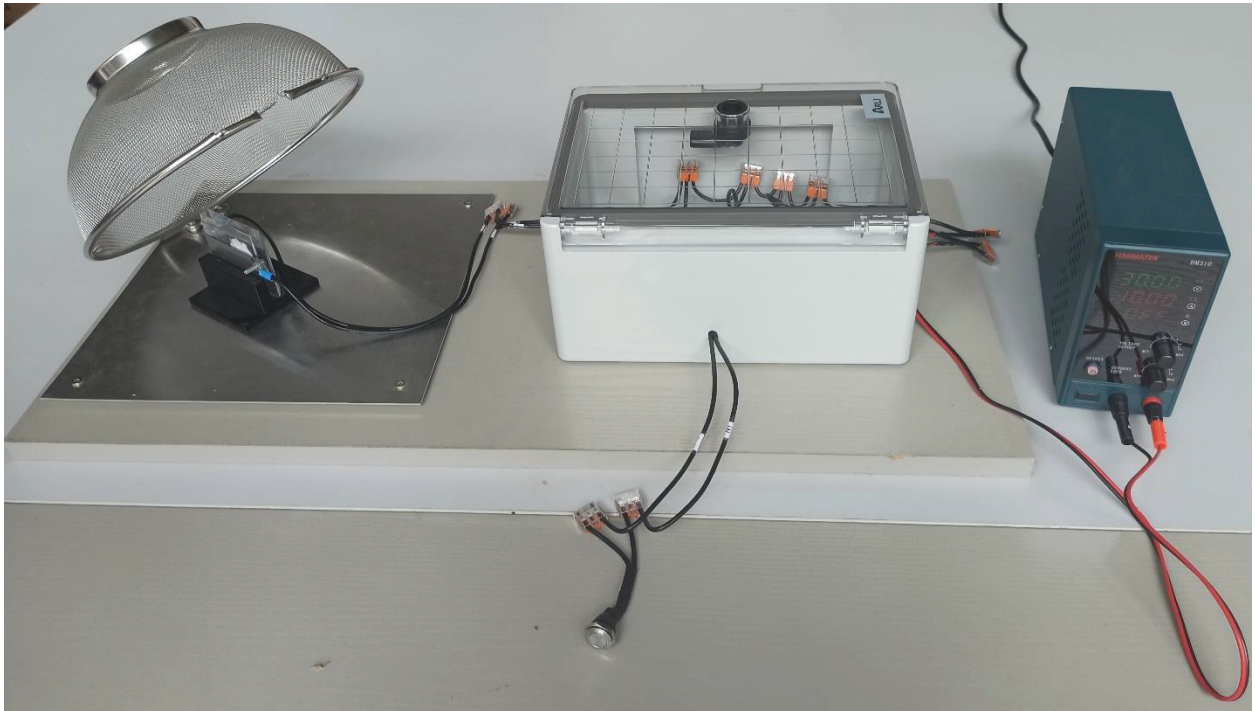


Abbildung 20: Die komplette selbstgebaute PEF-Anlage im Labormaßstab (eigene Aufnahme)

## 4. Zellaufschluss unter Anwendung der PEF-Anlage

Nach Inbetriebnahme der selbstkonstruierten Labormaßstab Elektroporationsanlage gilt es nun, deren Funktionsfähigkeit zu prüfen. Die elektronische Funktionalität wurde mittels Multimeter untersucht. Die verbaute Elektronik zeigte volle Funktionsfähigkeit und es lagen keine Kurzschlüsse oder unerwarteten elektronischen Verluste vor.

Folgend soll nun auf die Probe gestellt werden, ob die selbstkonstruierte Kleinmaßstab PEF-Anlage in der Lage ist Zellen zu elektroporieren und somit aufzuschließen.

Hierfür werden verschiedene Zellen mit PEF behandelt, um somit einen Zellaufschluss zu erreichen. Als Probematerial der PEF-Anwendung kommen diverse Zellen (Einzeller sowie Zellverbunde) und Mikroorganismen, zum Einsatz.

Der Zellaufschluss via Elektroporation ist bei den Kleinstmengen an Probematerial, die in dieser Arbeit zum Einsatz kommen, makroskopisch nicht zu validieren. Daher bedarf es einer Methode, die belegbar macht, ob der angestrebte Zellaufschluss erfolgreich war. Dies erfolgt einerseits mikroskopisch, um optisch zu analysieren, ob die Zellen Havarien aufweisen, oder gar geplatzt sind. Des Weiteren wird über eine Inhibitionskontrolle festgestellt, ob die elektroporierten Mikroorganismen inaktiviert wurden und es entsprechend nicht mehr zu einem Wachstum der Zellanzahl kommt. Hierfür wird dieselbe Probe einmal mit und einmal ohne PEF-Anwendung auf einem Nährboden ausgestrichen. Nach einer erfolgten Bebrütung bei Temperaturoptimum des jeweiligen Mikroorganismus werden anschließend die Zellkolonien ausgezählt und gegeneinander verglichen.

Wie bereits in Kapitel 2.2.1.2 dargelegt, ist hat die Zellgröße Einfluss auf die Effektivität der Elektroporation. So gilt grundlegend, je größer eine Zelle, desto effektiver ist die PEF-Anwendung in Hinblick auf den Zellaufschluss. Diese Annahme steht im Konflikt mit der Ausbildung der elektrischen Feldstärke, die größer wird, je geringer der Abstand der Elektroden zueinander ist. Es gilt hier einen Mittelweg zu finden aus einer Zellgröße, die der Elektroporation zuträglich ist und einem möglichst geringem Elektrodenabstand, folglich einem geringen Volumen an Probematerial. Aufgrund der geringen Volumina, mit denen die Zellaufschlussreaktoren befüllt werden, fiel die Wahl des Probematerials auf Einzeller mit Ausnahme des Zwiebelhäutchens als Zellverbund. Das Zwiebelhäutchen findet häufig in Praktika Verwendung, um das Mikroskopieren zu lernen. Es ist ein Zellverbund aus großen Zellen, der leicht zu bearbeiten und zuzuschneiden ist und aufgrund seiner geringen Dicke ein geringeres Volumen einnimmt als andere Pflanzenzellen. Größere Pflanzenteile bereiten, aufgrund der geringen Probemenge, mit der die Reaktionsgefäße

befüllt werden können, Probleme. Somit eignet es sich sehr gut für erste Versuche mit der Elektroporationsanlage. Bei den einzelligen Organismen war es Zielsetzung möglichst große Organismen zu wählen, um den Zellaufschluss zu erleichtern. Gerade Hefen, wie *S. cerevisiae* wurden hierbei des häufigeren in der Literatur genannt als Zellen, die anfällig gegenüber PEF-Anwendungen sind. *E. coli* bietet sich aufgrund seiner Gramnegativität, die die Elektroporation begünstigt als Probeorganismus an. Es sei allerdings erwähnt, dass *E. coli* aufgrund seiner geringen Größe dennoch eine Herausforderung darstellt. Die beiden Mikroalgen *Chlorella* und *Acutodesmus* sind im Größenbereich von Hefen angesiedelt und zum Teil sogar etwas größer. Daher stellen diese anlog zur Hefe Organismen dar, die disponiert gegenüber Pulsed-Electric-Fields sind.

Die Zellen und Mikroorganismen, die für eine Validierung des Zellaufschlusses verwendet werden, werden in Tabelle 3 aufgezeigt. Des Weiteren lässt sich der Tabelle entnehmen, ob es sich um Einzeller oder Zellverbunde handelt, ob die Organismen vorab einer Kultivierung bedürfen und bei welchen Zellen neben der mikroskopischen Untersuchung eine Wachstumsinhibitionskontrolle zur Zellaufschlussvalidierung zum Einsatz kommt.

Tabelle 3: Überblick der Zellen zur Zellaufschlussvalidierung

	<b>Zwiebelhäutchen</b>	<i>E. coli</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Acutodesmus</i>
Einzeller	--	Ja	Ja	Ja	Ja
Zellverbund	Ja	--	--	--	-
Zellkultivierung	--	Ja	Ja	*	*
Inhibitionskontrolle	--	Ja	Ja	--	--
Typ	Pflanzenzelle	Bakterium	Hefe	Mikroalge	Mikroalge
Zellgröße [ $\mu\text{m}$ ]	100-300	1-2	4-8	5-10	4-8

\* Grundsätzlich müssen auch die Mikroalgen *Chlorella* und *Acutodesmus* kultiviert werden und mit Nährstoffen und Licht versorgt werden. Dies entfällt aber in dieser Arbeit, da diese bereits in Photobioreaktoren kultiviert vorlagen und zur Probeentnahme zur Verfügung standen.

## 4.1 Material und Methoden der Zellkultivierung

Bevor der Zellaufschluss begonnen werden kann, müssen die Probeorganismen *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* aufgezogen und kultiviert werden, um entsprechende Mengen für eine Beprobung zu generieren. Dazu zählt auch das Ansetzen und Gießen eines für den jeweiligen MO spezifischen Nährbodens in Petrischalen, mittels derer die Wachstumsinhibitionskontrolle erfolgt. Dieses Kapitel liefert einen Überblick über das zu untersuchende Probenmaterial, verwendete Geräte und genutzte Materialien, die für eine Zellkultivierung genutzt werden. Die Zellkultivierung fand im mikrobiologischen Labor statt.

### 4.1.1 Geräte und Materialien der Zellkultivierung

Tabelle 4 listet allgemeine Utensilien, Tabelle 5 allgemeine Geräte und deren Hersteller, die in dieser Arbeit Verwendung fanden.

Tabelle 4: Allgemeine verwendete Utensilien des mikrobiologischen Labors

#### Utensilien

Erlenmeyerkolben 100 ml
Spatel
Destilliertes Wasser
Rührfisch
Messzylinder 50 ml
Messzylinder 500 ml
Laborgewindeflasche 1000 ml
Reagenzgläser
Eppendorf Pipette 100 µl
Eppendorf Pipette 1000 µl
Petrischalen Kunststoff steril
Drigalski Spatel



Tabelle 5: Allgemein verwendete Laborgeräte des mikrobiologischen Labors

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav „Laboklav“	SHP Steriltechnik AG
Brutschrank „Function line“	Heraeus Instruments GmbH
Bunsenbrenner	
Dispenser „Dispensette1-10 m“l	Brand GmbH
Inkubationshaube „TH 30“	Edmund Bühler GmbH
Waage „ENTRIS 62021-1S“	Sartorius Lab Instruments GmbH
Rühr Tisch MR 3001 K	Heidolph Instruments GmbH
Vortex „REAX Control“	Heidolph Instruments GmbH
Wasserbad „GFL 1083“	LAUDA Dr. R. Wobser GmbH

Bevor mit den Versuchen zum Zellaufschluss begonnen werden konnte, mussten Nährmedien zur Aufzucht der zu untersuchenden Mikroorganismen hergestellt werden. Für die Kultivierung der Hefekultur und des Bakteriums wurde eine CASO-Bouillon hergestellt. Die hierfür benötigten Materialien und werden in Tabelle 6 aufgezeigt.

Tabelle 6: Verwendete Materialien zur Herstellung einer CASO-Bouillon

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Zusammensetzung</b>
CASO-Bouillon	Carl Roth GmbH	Pankreashydrolysat 57%
		Papainhydrolysat 10%
		Di-Kaliumhydrogenphosphat 8%
		Natriumchlorid 17%
		Glucose-Monohydrat 8%
Destilliertes Wasser	-	-

Um eine Inhibitionskontrolle via Auszählung der koloniebildenden Einheiten (KBE) nach Bebrütung durchführen zu können muss ein Nährboden (Agar) angesetzt werden. Dieser ist je nach Mikroorganismus spezifisch und liefert entsprechend der Bedürfnisse der MOs entsprechende Nährstoffe für ein optimales Wachstum. Die für die Herstellung der Nährmedien je für *Saccharomyces cerevisiae* (Tab. 7) und *Escherichia coli* (Tab. 8) verwendeten Materialien werden nachfolgend dargestellt.

Tabelle 7: Verwendete Materialien zur Herstellung eines Sabouraud Agars für Hefen

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
Sabouraud Agar	Carl Roth GmbH	Fleisch- und Caseinpepton	21%
		Glucose	42%
		Agar	36%
Destilliertes Wasser	-	-	

Tabelle 8: Verwendete Materialien zur Herstellung eines Trypton Soja Agars für *E. coli*

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
Trypton Soja Agar	Carl Roth GmbH	Agar	33%
		Puffer	6%
		Glucose	6%
		Natriumchlorid	11%
		Papainhydrolysat	7
		Trypton	37%
Destilliertes Wasser	-	-	

Um die Auswertung der Wachstumsinhibitionskontrolle auf den Agarplatten zu erleichtern, wird eine Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Mikroorganismensuspension erstellt. Es werden verschiedene Zellkonzentrationen einer Probe auf die Nährböden aufgetragen und jene Zellkonzentrationen zum Auswerten der KBE gewählt, die nicht komplett bewachsen sind und eine Auswertung erschweren. Die Verdünnung der MO-Suspension erfolgt in einer 0,85-prozentigen Natriumchloridlösung. Die für deren Herstellung verwendeten Materialien zeigt Tabelle 9.

Tabelle 9: Verwendete Materialien zur Herstellung der Natriumchloridlösung

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
Natriumchlorid	AppliChem GmbH	Natriumchlorid	Reinheit min. 99,9%
Destilliertes Wasser	-	-	

#### 4.1.2 Methoden der Zellkultivierung

Dieser Abschnitt thematisiert die Methoden zur Zellkultivierung von *S. cerevisia* und *E. coli*. Der *Escherichia coli* Stamm liegt als Zellreservoir in einem Kühlaggregat des mikrobiologischen Labors vor. Der Hefestamm liegen als Trockenhefe konserviert vor. Bei beiden Stämmen gilt es sie zu kultivieren und so eine ausreichende Zellanzahl für mehrere Versuchsreihen zu generieren. Dies erfolgt über Lösen einer kleinen Menge der Stämme in einer CASO-Bouillon.

##### CASO-Bouillon

Zur Herstellung der CASO-Bouillons werden die Ingredienzien aus Tabelle 6 benötigt. Hier lautet die Herstellerangabe zur Herstellung 30 g des Trockenpulvers auf einen Liter Medium anzusetzen. Die Bouillon wird in 100 ml Erlenmeyerkolben angesetzt, wobei je Kolben 1,5 g Trockenbouillon eingewogen wird und anschließend 50 ml mittels Messzylinder abgemessenes destilliertes Wasser zugegeben werden. Auf einem beheizbarem Rühr Tisch wird der Bouillon bei 50°C etwa 2 Minuten gerührt, bis sich die Trockensubstanz im Wasser gelöst hat. Anschließend wird der Erlenmeyerkolben mittels Autoklav sterilisiert und ist nach dem Abkühlen einsatzbereit. Nicht sofort verwendete Bouillon kann im Kühlraum bei 7° Celsius bis zu 4 Wochen bedenkenfrei gelagert werden.

##### Sabouraud Agar

Sabouraud Agar ist speziell auf den Nährstoffbedarf von Hefe angepasst und dient ihrer Aufzucht in Petrischalen. Die für die Herstellung des Sabouraud Agar benötigten Ingredienzien und deren Zusammensetzung sind Tabelle 7 zu entnehmen. Der Ansatz des Agars erfolgt in Laborgewindeflaschen mit einem maximalen Fassungsvermögen von einem Liter. Gemäß Herstellerangabe sind 47 Gramm Trockenpulver auf einen Liter anzusetzen. Es wurden je Laborgewindeflasche 23,5 g Trockenphase eingewogen und anschließend 500 ml destilliertes Wasser zugegeben. Um das Lösen des Pulvers zu beschleunigen, erfolgte eine zweiminütige Rührphase auf einem beheizbarem Rühr Tisch mit Rührfisch bei 50°C. Anschließend wurden die Laborgewindeflaschen mit Deckel verschlossen und mittels Autoklavs autoklaviert.

Anschließend erfolgte das Gießen des Agars in Petrischalen. Der Agar wurde nach dem Autoklavieren nicht abgekühlt, sondern im Wasserbad bei circa 70 °C warmgehalten, damit er seine Fließfähigkeit beibehält. Die Petrischalen sind bereits steril abgepackt im Handel erwerbbar. Pro Petrischale wurden dann vorsichtig etwa 20 ml des heißen Agars eingegossen und sofort der

Deckel der Petrischale aufgelegt. Nachdem der Agar in den Petrischalen abgekühlt ist und fest wird, werden die Petrischalen auf den Kopf gedreht, um zu verhindern, dass Kondenswasser vom Deckel auf den Nährboden tropft. Anschließend können die Petrischalen im Kühlraum bei 7°C bis zu 8 Wochen gelagert werden, bis sie zum Einsatz kommen.

### **Trypton Soja Agar (TSA)**

Der Trypton Soja Agar ist ein speziell für *Escherichia coli* angepasster Nährboden. Die Ingredienzien für seine Herstellung sind in Tabelle 8 aufgeführt. Der Hersteller gibt eine Konzentration des Trockensubstrats von 40 Gramm auf einen Liter vor. Es erfolgt die Einwaage von 20 g Trockensubstanz in Laborgewindeflaschen mit einem Fassungsvermögen von 1000 ml. Danach werden 500 ml entionisiertes Wasser zugegeben. Um die Trockensubstanz effektiver im Wasser zu lösen, wird die Laborgewindeflasche mit einem Rührfisch versetzt und auf einer temperierbaren Rührplatte bei 50 Grad Celsius etwa 2 Minuten vermengt. Anschließend wird die Flasche verschlossen und autoklaviert.

Das Gießen des TSA in Petrischalen und dessen Lagerung erfolgt analog zu dem des Sabouraud Agars.

Nachdem die Nährmedien zur Kultivierung vorlagen, konnte nun begonnen werden die Probeorganismen *E. coli* und *S. cerevisiae* zu kultivieren und so eine ausreichende Menge an Zellmaterial für die Versuche zu generieren.

Die Kultivierung der Hefe erfolgt über Einwaage von 0,1 Gramm Trockenhefe in ein kleines Becherglas (25ml). Anschließend wurde mit destilliertem Wasser auf ein Gramm aufgefüllt und die Trockenhefe unter Rühren gelöst. Die Hefesuspension wurde anschließend in einen Erlenmeyerkolben mit CASO-Bouillon überführt und für mindestens 24 Stunden in der Inkubationshaube bei 30° Celsius und 125 Umdrehungen pro Minute inkubiert.

Für die Kultivierung von *Escherichia coli* wurde aus dem Zellreservoir der Hochschule eine mit *E. coli* bewachsene Agarplatte entnommen. Diese *E. coli* Kultur stammt aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Mit einer zuvor über dem Bunsenbrenner abgeflamten Impföse wurden eine KBE von der Platte entnommen und in einen

Erlenmeyerkolben mit CASO-Bouillon gerührt. Anschließend erfolgte eine Inkubation in der Inkubationshaube bei 37° C und 125 rpm für mindestens 24 Stunden.

### **Natriumchloridlösung für die Verdünnungsreihe**

Für die zur Wachstumsinhibitionskontrolle (Kapitel 4.4) benötigte Verdünnungsreihe wird als Verdünnungslösung eine 0,85-prozentige Natriumchloridlösung verwendet. Die hierfür verwendeten Materialien werden in Tabelle 9 gezeigt. Zur Herstellung der Verdünnungslösung wird pro 1-Liter Laborgewindeflasche 4,25 g Natriumchlorid mit einer Reinheit von mindestens 99,9% eingewogen und anschließend mit 500ml destilliertem Wasser versetzt. Sobald sich das Salz vollständig im Wasser gelöst hat, wird die Laborgewindeflasche mit einem Dispenser versehen, der auf 9ml eingestellt wird. Dann werden mittels Dispenser je 9ml Natriumchloridlösung in ein Reagenzglas gefüllt und mit einem Stopfen versehen. Anschließend werden die Reagenzgläser autoklaviert und nach dem Abkühlen bis zu ihrem Einsatz im Kühlraum bei 7°C gelagert.

## **4.2 Material und Methoden des Zellaufschlusses**

Es soll nun mittels diverser Versuchsdurchführungen getestet werden, ob die selbstgebaute PEF-Anlage über ihr appliziertes, gepulstes elektrisches Feld in der Lage ist die Zellmembran von Zellen zu permeabilisieren und somit einen Zellaufschluss zu erwirken. Sämtliche Versuche fanden auf Grund der unter anderem verwendeten Mikroorganismen *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli* im mikrobiologischen Labor statt.

### **4.2.1 Geräte und Material des Zellaufschlusses**

Für die Durchführung des Zellaufschluss mittels Pulsed-Electric-Fields wird die in Kapitel 3.3 konstruierte Elektroporationsanlage eingesetzt. Als Material zur Zellaufschlussvalidierung dienen die in Kapitel 4 Tabelle 3 gelisteten Organismen, die gemäß Abschnitt 4.1.2 kultiviert wurden.

#### 4.2.2 Methoden des Zellaufschlusses

Folgender Abschnitt legt die Durchführung der Zellaufschlussversuche und die hierfür eingesetzten Parameter dar. Differierende Parameter waren hierbei die unterschiedlichen Zellaufschlussreaktoren (und damit verbunden die unterschiedliche Elektrodenabstände und Probevolumina), die Probeorganismen und die Gesamtanzahl der Einzelpulse. Um eine gute Vergleichbarkeit zu schaffen, lief der Versuchsablauf stets nach demselben Schema ab. Zudem wurde bei der Durchführung darauf geachtet, die Parameter so genau wie möglich einzuhalten. So wurde während der Versuchsdurchführung die Pulsfrequenz  $f_P$  mittels digitaler Stoppuhr überwacht und gesteuert. Das Probematerial wurde in den Zellaufschlussreaktor gegeben, dieser wurde gegebenenfalls in die Halterung gesetzt. Anschließend wurde der Zellaufschlussreaktor mit der restlichen Anlage verkabelt und der Faraday'sche Käfig geschlossen. Nach Einschalten der Spannungsquelle wurde die Stoppuhr gestartet und die Bepulsung der Probe entsprechend den vorgegebenen Parametern für den jeweiligen Versuchsaufbau durchgeführt.

Die Wahl der Pulsfrequenz wurde an Kapitel 2.2.1.3 orientiert, wonach eine Frequenz kleiner 1 Hz dem Zellaufschluss zuträglich ist. Folglich wurde für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche eine Frequenz von einem Puls alle 5 Sekunden, sprich 0,2 Hertz festgelegt, da dies die Vorgaben erfüllt und mittels Drucktaster gut realisierbar ist.

Bei der Versuchsdurchführung aller Versuche waren die Faktoren Pulslänge  $t_{Puls}$ , Spannung  $U$  und Stromstärke  $I$ , Kapazität  $C$  und die resultierende elektrische Energie  $E_{elektr.}$  konstant, da diese von der selbstkonstruierten PEF-Anlage durch dessen verbaute Komponenten vorgegeben wurden. Der Elektrodenabstand und damit verbunden die elektrische Feldstärke  $\vec{E}$  wird definiert durch den entsprechend verwendeten Zellaufschlussreaktor (siehe Tab. 1). Diese unveränderlichen Zahlenwerte werden in Tabelle 10 exponiert.

Tabelle 10: Unveränderliche Einflussfaktoren des Zellaufschlusses

Pulslänge $t_{Puls}$ nach Gl. (4) [s]	0,045
Pulsfrequenz $f_{Puls}$ [Hz]	0,2
Spannung $U$ [V]	30
Stromstärke $I$ [A]	10
Kapazität $C$ nach Gl. (11) [F]	$9,1 * 10^{-3}$
Elektrische Energie $E_{elektr.}$ nach Gl. (2) [J]	4,1

Für die Berechnung des spezifischen Energieeintrags  $E_{spez}$  wird angenommen, dass die Probemenge in ml mit ausreichender Genauigkeit der Masse der Probe in g entspricht.

Alle Probeorganismen liegen in Suspension vor und werden entsprechend in die Zellaufschlussgefäße überführt. Für die Behandlung des Zwiebelhäutchen wird dieses in das Zellaufschlussgefäß gegeben und mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Den Beginn der Versuche stellte die PEF-Behandlung eines Zwiebelhäutchens in Zellaufschlussreaktor 1 dar. Für die erste Behandlung wurden 50 Einzelpulse veranschlagt, da wie in Kapitel 2.2.1.1 belegt, eine Erhöhung der Einzelpulse dazu führt, dass der für einen Zellaufschluss benötigte Energieeintrag sinkt. Die gesamten Spezifika des ersten Laborversuchs werden in Tabelle 11 aufgezeigt.

Tabelle 11: Parameter des Zellaufschlussversuchs V1 – ZAR 1 mit Zwiebelhäutchen

<b>Zellaufschluss V1</b>	
Probematerial	Zwiebelhäutchen
Zellaufschlussreaktor	ZAR 1
Probemenge [ml]	25
Elektrische Feldstärke [V/cm]	30
Pulsanzahl $n$ [-]	50
Puls Gesamtdauer $t_{Ges.(Puls)}$ nach Gl. (6) [s]	2,25
Spezifischer Energieeintrag $E_{spez}$ nach Gl. (1) [kJ/kg]	0,164

Die 50 applizierten Einzelpulse führten zu einer Puls Gesamtdauer von 2,25 Sekunden unter Einwirkung eines elektrischen Feldes mit einer Feldstärke von 30 Volt pro Zentimeter. Es erfolgte ein Energieeintrag von 0,164 Kilojoule pro Kilogramm Probe.

Im zweiten Versuch wurde abermals ein Zwiebelhäutchen mit PEF behandelt, diesmal allerdings unter Verwendung des Zellaufschlussreaktors 2, um die elektrische Feldstärke durch den geringeren Elektrodenabstand zu erhöhen. Es kamen 50 Einzelpulse zum Einsatz. Die Parameter des zweiten Versuchs werden folgend gelistet (Tab. 12).

Tabelle 12: Parameter des Zellaufschlussversuchs V2 – ZAR 2 mit Zwiebelhäutchen

<b>Zellaufschluss V2</b>	
Probematerial	Zwiebelhäutchen
Zellaufschlussreaktor	ZAR 2
Probemenge [ml]	1,7
Elektrische Feldstärke [V/cm]	43
Pulsanzahl $n$ [-]	50
Pulsgesamtdauer $t_{Ges.(Puls)}$ nach Gl. (6) [s]	2,25
Spezifischer Energieeintrag $E_{spez}$ nach Gl. (1) [kJ/kg]	2,41

Wiederum wurden 50 Einzelpulse mit einer Pulsgesamtzeit von 2,25 s angewendet. Die elektrische Feldstärke betrug  $30 \text{ Vcm}^{-1}$ . Der spezifische Energieeintrag umfasste 2,41 kJ pro kg Probematerial.

Bei Versuch 3 waren die Versuchsbedingungen gleichbleibend zu V2, lediglich die Pulsanzahl wurde auf 100 erhöht.

Tabelle 13: Parameter des Zellaufschlussversuchs V3 – ZAR 2 mit Zwiebelhäutchen

<b>Zellaufschluss V3</b>	
Probematerial	Zwiebelhäutchen
Zellaufschlussreaktor	ZAR 2
Probemenge [ml]	1,7
Elektrische Feldstärke [V/cm]	43
Pulsanzahl $n$ [-]	100
Pulsgesamtdauer $t_{Ges.(Puls)}$ nach Gl. (6) [s]	4,5
Spezifischer Energieeintrag $E_{spez}$ nach Gl. (1) [kJ/kg]	2,41

Durch die Steigerung der Pulsanzahl ergibt sich eine Pulsgesamtdauer von 4,5 Sekunden. Elektrische Feldstärke und spezifischer Energieeintrag sind identisch zu Versuch V2.



In Versuch 4 fand die Bepulsung mit elektrischen Feldern von je einer Suspension mit *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Chlorella* und *Acutodesmus* bei identischen Bedingungen (siehe Tab 14) in Zellaufschlussreaktor 2 statt. Dabei wurden 50 Einzelpulse appliziert.

Tabelle 14: Parameter des Zellaufschlussversuchs V4 – ZAR 2 mit *E. coli*, *S. cerevisiae*, *Chlorella* und *Acutodesmus*

<b>Zellaufschluss V4</b>	
Probematerial	<i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Acutodesmus</i>
Zellaufschlussreaktor	ZAR 2
Probemenge [ml]	1,7
Elektrische Feldstärke [V/cm]	43
Pulsanzahl $n$ [-]	50
Pulsgesamtdauer $t_{Ges.(Puls)}$ nach Gl. (6) [s]	2,25
Spezifischer Energieeintrag $E_{spez}$ nach Gl. (1) [kJ/kg]	2,41

Die Probeorganismen wurden mit einer Gesamtpulsdauer von 2,25 s und einer elektrischen Feldstärke von 43 Volt pro Zentimeter behandelt. Der spezifische Energieeintrag pro Probe belief sich auf 2,41 kJ pro kg.

Der darauffolgende Zellaufschlussversuch V5 wurde unter identischen Bedingungen durchgeführt. Es wurde allerdings bei den Probeorganismen auf die *Escherichia coli* Suspension verzichtet, da dieser durch seine geringe Zellgröße im Vergleich zu den übrigen Probezellen am resistantesten gegenüber PEF-Anwendung ist. Dazu fand eine Erhöhung der Anzahl der Einzelpulse von 50 auf 100 statt. Die detaillierten Versuchsbedingungen sind Tabelle 15 zu entnehmen.

Tabelle 15: Parameter des Zellaufschlussversuchs V5 – ZAR 2 mit *S. cerevisiae*, *Chlorella* und *Acutodesmus*

<b>Zellaufschluss V5</b>	
Probematerial	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Acutodesmus</i>
Zellaufschlussreaktor	ZAR 2
Probemenge [ml]	1,7
Elektrische Feldstärke [V/cm]	43
Pulsanzahl $n$ [-]	100
Puls Gesamtdauer $t_{Ges.(Puls)}$ nach Gl. (6) [s]	4,5
Spezifischer Energieeintrag $E_{spez}$ nach Gl. (1) [kJ/kg]	2,41

Analog zu Versuch 4 erfuhren die Probeorganismen eine elektrische Feldstärke von 43 Volt pro Zentimeter und einen spezifischen Energieeintrag von 2,41 kJ pro kg. Die Gesamtdauer der applizierten Einzelpulse betrug 4,5 Sekunden.

Um die elektrische Feldstärke erneut zu erhöhen und parallel dazu auch den spezifischen Energieeintrag zu steigern, kam in Versuchsdurchführung V6 der Zellaufschlussreaktor ZAR 3 für die PEF-Anwendung bei *Saccharomyces cerevisiae*, *Chlorella* und *Acutodesmus* (je als Zellsuspension vorliegend) unter gleichen Bedingungen zum Einsatz. Es wurden 50 Einzelpulse angewendet und es kamen je 0,5 Milliliter der genannten Probeorganismen zum Einsatz. Die Bedingungen sind in Tabelle 16 aufgezeigt.

Tabelle 16: Parameter des Zellaufschlussversuchs V6 – ZAR 3 mit *S. cerevisiae*, *Chlorella* und *Acutodesmus*

<b>Zellaufschluss V6</b>	
Probematerial	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Acutodesmus</i>
Zellaufschlussreaktor	ZAR 3
Probemenge [ml]	0,5
Elektrische Feldstärke [V/cm]	50
Pulsanzahl $n$ [-]	50
Puls Gesamtdauer $t_{Ges.(Puls)}$ nach Gl. (6) [s]	2,25
Spezifischer Energieeintrag $E_{spez}$ nach Gl. (1) [kJ/kg]	8,19

Die elektrische Feldstärke der Zellaufschlussversuche V 6 betrug 50 V pro cm, der elektrische Energieeintrag 8,19 Kilojoule pro Kg Probematerial. Die 50 Einzelpulse summieren sich zu einer Puls Gesamtdauer von 2,25 Sekunden.

In Versuch 7 wurde die Anzahl applizierter Einzelpulse auf 100 erhöht. Die weiteren Parameter blieben identisch zu der Versuchsdurchführung V6. Die detaillierte Auflistung der Versuchsparameter von Zellaufschlussversuch V7 kann Tabelle 17 entnommen werden.

Tabelle 17: Parameter des Zellaufschlussversuchs V7 – ZAR 3 mit *S. cerevisiae*, *Chlorella* und *Acutodesmus*

<b>Zellaufschluss V7</b>	
Probematerial	<i>S. cerevisiae</i> , <i>Chlorella</i> , <i>Acutodesmus</i>
Zellaufschlussreaktor	ZAR 3
Probemenge [ml]	0,5
Elektrische Feldstärke [V/cm]	50
Pulsanzahl $n$ [-]	100
Puls Gesamtdauer $t_{Ges.(Puls)}$ nach Gl. (6) [s]	4,5
Spezifischer Energieeintrag $E_{spez}$ nach Gl. (1) [kJ/kg]	8,19

Durch die Erhöhung der Anzahl an Einzelpulsen ergibt sich eine angewendete Pulsgesamtdauer von viereinhalb Sekunden. Die Probeorganismen erfuhren je ein elektrisches Feld der Feldstärke 50 Volt pro Meter. Der je Probe erfolgte spezifische Energieeintrag umfasste bei der PEF-Anwendung 8,19 Kilojoule pro Kilogramm Probematerial.

### Kurbelinduktor

Abschließend erfolgte noch ein gesondert zu betrachtender Versuch. Um die elektrische Feldstärke zu erhöhen, wurde bisher das Volumen der Zellaufschlussreaktoren verringert. Dies erfolgte bis hin zu einem Volumen von 0,5 ml. Eine weitere Erniedrigung war ab hier nicht mehr möglich, da ansonsten nicht mehr ausreichend Probematerial für die Validierung zur Verfügung stände und auch die Handhabung der Probe Probleme bereiten würde. Folglich sollte die elektrische Feldstärke erhöht werden, indem die eingesetzte Spannung  $U$  erhöht wird. Hierfür kam ein Isolationsmessgerät, auch Kurbelinduktor genannt, zum Einsatz. Dieser mit einer Handkurbel versehene Generator erzeugt eine Spannung von 1000 Volt. Der Hersteller war auf Grund des Alters des Geräts nicht mehr auszumachen, lediglich die Modellbezeichnung M4100/4. Es wurde mittels Wagoklemme ein Drucktaster in die Plusleitung des Kurbelinduktors zwischengeschaltet und der Zellaufschlussreaktor mittels Krokodilklemmen mit dem Kurbelinduktor versehen. Das Betätigen des Drucktasters während des Kurbelns gibt folgend die aufgebaute Spannung frei. Der Schaltplan des Versuchsstands mit Kurbelinduktor wird in Abb. 21 gezeigt. Der Kurbelinduktor wird in Abbildung 22 gezeigt.

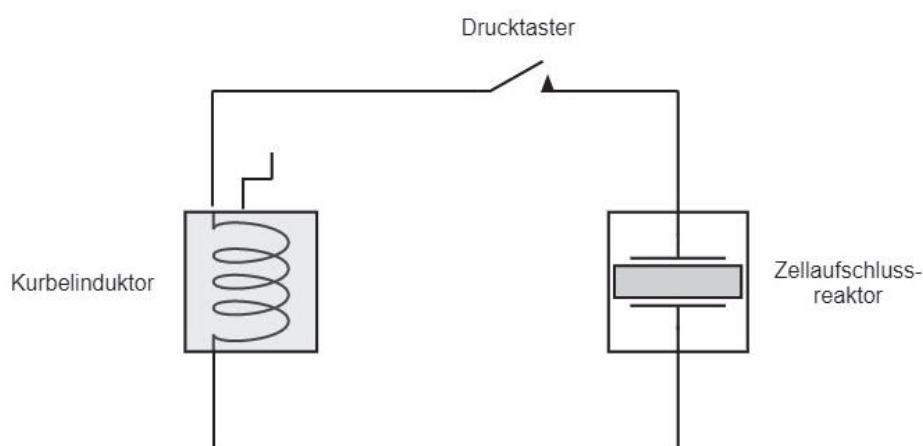


Abbildung 21: Schaltplan des Versuchsstands mit Kurbelinduktor (eigene Abbildung)



Abbildung 22: Kurbelinduktor mit Drucktaster (eigene Aufnahme)

Für die Versuchsdurchführung mit Kurbelinduktor wurde das Zellaufschlussgefäß ZAR 3 gewählt. Untersucht wurden die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Auch hier wurde als Frequenz der Einzelpulse 0,2 Hz gewählt. Die Anzahl am Einzelpulsen betrug 100. Die Parameter des Kurbelinduktor-Versuchs werden in Tabelle 18 gezeigt.

Tabelle 18: Parameter des Zellaufschlussversuchs V8 – ZAR 3 mit *S. cerevisiae*

<b>Zellaufschluss V8</b>	
Probematerial	<i>S. cerevisiae</i>
Zellaufschlussreaktor	ZAR 3
Probemenge [ml]	0,5
Elektrische Feldstärke [V/cm]	1667
Pulsanzahl $n$ [-]	100
Puls Gesamtdauer $t_{Ges.(Puls)}$ nach Gl. (6) [s]	4,5
Spezifischer Energieeintrag $E_{spez}$ nach Gl. (1) [kJ/kg]	--

Durch Zuhilfenahme des Kurbelinduktors konnte eine elektrische Feldstärke von 1667 Volt pro cm generiert werden. Für den spezifischen Energieeintrag kann kein Wert angegeben werden, da im Versuchsaufbau kein Kondensator zum Einsatz kam, der gemäß Gleichung 1 miteingeht. Die Pulsanzahl belief sich auf 100 Pulsen, was einer Gesamtdauer von 4,5 Sekunden entspricht.

### 4.3 Mikroskopische Untersuchung

Nach erfolgter Anwendung der Probeorganismen mit Pulsed-Electric-Fields in der selbstgebauten Anlage galt es zu verifizieren, ob der angestrebte Zellaufschluss erfolgreich war. Auf Grund der geringen Größe der verwendeten Probeorganismen waren makroskopische Effekte eines erfolgreichen Zellaufschlusses nicht erkennbar. Daher erfolgte die optische Zellaufschlussvalidierung mittels des Lichtmikroskops Nikon Eclipse E400. Die Okulare gehen von 20facher bis hin zu 100facher Vergrößerung. Das Lichtmikroskop war zudem mit dem Adapter Nikon Digital Sight DS-2Mv versehen. Dieser ermöglicht es das Bild des Okulars live auf einem Computer auszugeben und am Monitor auszuwerten und zu speichern. Bei entsprechender, 100facher Vergrößerung sind die Einzelzellen in der Zellsuspension und deren Zellmembran als Hülle gut sichtbar und somit auf durch die PEF-Anwendung entstandene Verletzungen der Membran untersuchbar. Abbildung 23 stellt das für die Zellaufschlussvalidierung verwendete Lichtmikroskop dar.



Abbildung 23: Lichtmikroskop Nikon Eclipse E400

Für die mikroskopische Untersuchung wurden 100  $\mu$ l der zu untersuchenden Probe mittels Eppendorf-Pipette auf einen Objektträger pipettiert und mit Deckglas abgedeckt. Hierbei gilt es Lufteinschlüsse zwischen Deckglas und Objektträger zu vermeiden, da diese die optische Auswertung erschweren. Es wurde immer eine PEF-behandelte und eine unbehandelte Probe

desselben Probeorganismus auf Objektträger pipettiert und gegeneinander verglichen und auf PEF-induzierte Zellbeschädigungen untersucht.

#### 4.4 Inhibitionskontrolle

Neben der optischen Analyse, ob es zu einem Zellaufschluss per PEF-Anwendung kam, wurde bei den Probeorganismen *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* eine Inhibitionskontrolle durchgeführt. Hierbei wurde verifiziert, ob die Zellen, obwohl optisch via Mikroskop keine Beschädigungen der Zellmembran zu erkennen waren, zur Inaktivierung der Einzelzellen durch die Elektroporation kam. Falls es bei den Probeorganismen teilweise zu PEF-induzierten Schädigungen kam, sollten diese nach Ausstreichen auf einem entsprechenden Nährboden und anschließender Bebrütung im Brutschrank durch ein reduziertes Zellwachstum auf den Agarplatten aufgezeigt werden, da ihr Wachstum durch die beschädigten Zellen reduziert wird.

Es wurden zwei Verdünnungsreihen jeder zu untersuchenden Probesuspension erstellt. Eine Verdünnungsreihe für die PEF-behandelte und eine für die unbehandelte Probe. Mittels der in Kapitel 4.1.1 erstellten Verdünnungslösung wurden in 10er Schritten Verdünnungen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-7}$  erstellt. Hierfür werden in das erste, mit 9ml 0,85prozentiger Natriumchloridlösung befüllte, Reagenzglas mittels Eppendorf Pipette 1 ml Probe zupipettiert. Dieses Reagenzglas stellt die Verdünnung 1:10 beziehungsweise  $10^{-1}$  dar. Aus dieser Verdünnung werden wiederum erneut 1 ml in das nächste Reagenzglas mit Natriumchlorid überführt, es resultiert die Verdünnung 1:100 bzw.  $10^{-2}$ . So wird weiter verfahren, bis die Verdünnung  $10^{-7}$  erreicht ist. Dieses Prozedere erfolgte einmal für die elektroporierte und einmal für die gleiche, unbehandelte Probe.

Nun wurden je Verdünnungsstufe der behandelten und unbehandelten Probe 100 µl mittels Eppendorf Pipette auf eine Agarplatte, befüllt mit dem zum Probeorganismus gehörigen (Sabouraud-Agar für *S. cerevisiae* und TSA für *E. coli*) Nährboden, pipettiert und mittels Drigalsky Spatel unter Drehen der Petrischale in den Agar eingearbeitet. Anschließend wird der Deckel auf die Petrischale gesetzt und die Schale auf den Kopf gedreht. Für die nachfolgende Auszählung der KBE wurde der TSA mit *Escherichia coli* für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für die Auswertung von *S. cerevisiae* wurden die Agarplatten für 48 Stunden bei 30° C bebrütet. Um verlässlichere Ergebnisse zu erhalten, wurde die Inhibitionskontrolle immer in Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Wachstumsinhibitionskontrolle wurde bei den Versuchsdurchführungen V4, V6, V7 und V8 durchgeführt.

## 5. Ergebnisse

Folgendes Kapitel beschäftigt sich mit der Validierung des Zellaufschlusses der Versuchsdurchführungen. Diese erfolgt über zwei Analysen, die Mikroskopische, die bei allen Versuchen und Probeorganismen angewendet wurde und zum Teil über eine Wachstumsinhibitionskontrolle der Mikroorganismen *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli* in einem Teil der Versuche.

### Versuch V1

In Versuch V1 wurde ein Zwiebelhäutchen in ZAR 1 mit 50 Einzelpulsen bepulst. Anschließend wurde das Zwiebelhäutchen mikroskopiert. Abbildung 24 zeigt die Aufnahme des Mikroskops bei einer 100fachen Vergrößerung

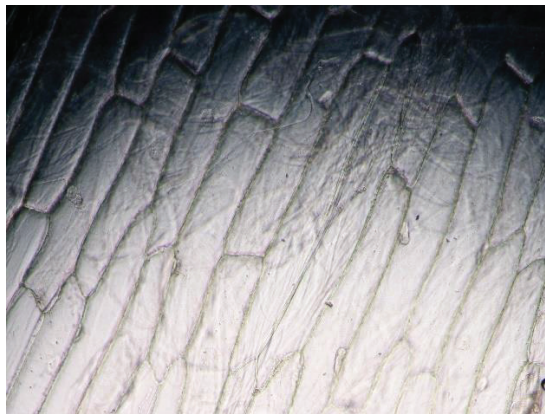


Abbildung 24: Ergebnis V1 - Mikroskopie des Zwiebelhäutchens mit PEF-Behandlung

Wie in Abbildung 24 gut ersichtlich hat die Pulsed-Electric-Fields-Behandlung unter den in Tabelle 11 ersichtlichen Parametern keinen sichtbaren Zellaufschluss zur Folge. Die Zellen des Zwiebelhäutchens sind vollständig intakt.

### Versuch V2 und V3

In der zweiten und dritten Versuchsdurchführung war wieder ein Zwiebelhäutchen der Versuchorganismus. Hierbei kam der Zellaufschlussreaktor ZAR 2 zum Einsatz um die Feldstärke sowie den spezifischen Energieeintrag zu erhöhen (Tab. 12 & 13). Nach erfolgter PEF-Anwendung in dem Zellaufschlussgefäß mit verringertem Volumen im Vergleich zu ZAR 1



gestaltete es sich allerdings unerwartet kompliziert, das Zwiebelhäutchen aus dem ZAR zu nehmen, um es für die Mikroskopie auf einen Objektträger zu positionieren. Es bedurfte mehrerer Anläufe, um das Zwiebelhäutchen aus dem schmalen ZAR mittels Pipette zu entnehmen. Dazu kam noch, dass sich das flächige Auflegen des Zwiebelhäutchens ohne Überlagerungen auf den Objektträger als schwierig erwies, da dieses durch das Schwimmen in Lösung aufgequollen und glitschig war. Für eine korrekte mikroskopische Untersuchung ist ein ideal aufliegendes Probematerial aber Grundvoraussetzung. In beiden Versuchen konnte nach längerer Bearbeitung des Zwiebelhäutchens nicht mehr garantiert werden, dass mögliche Verletzungen in der Zellmembran durch die PEF-Behandlung entstanden und nicht durch die Entnahme aus dem ZAR und das Aufbringen auf den Objektträger. Zudem war ein optimales Platzieren des Zwiebelhäutchens auf dem Objektträger nahezu unmöglich. Daher musste auf die Auswertung des Zellaufschlusses bei diesen Versuchsreihen verzichtet werden.

#### Versuch V4

Nachdem sich die Probeentnahme des Zwiebelhäutchens bei kleineren Zellaufschlussgefäßen als unpraktikabel erwiesen hat, wurde im Folgenden auf Zwiebelhäutchen zugunsten der durch die kleineren ZAR erhöhten elektrischen Feldstärke und des erhöhten spezifischen Energieeintrags verzichtet. Folglich wurden in Versuchsaufbau V4 die Probeorganismen *E. coli*, *S. cerevisiae*, *Chlorella* und *Acutodesmus* in Zellaufschlussreaktor ZAR 2 mit 50 Einzelpulsen elektroporiert. Die genauen Versuchsparameter sind Tabelle 14 zu entnehmen. Die Abbildungen 25 bis 28 zeigen die Proben je mit und ohne PEF-Prozedur.

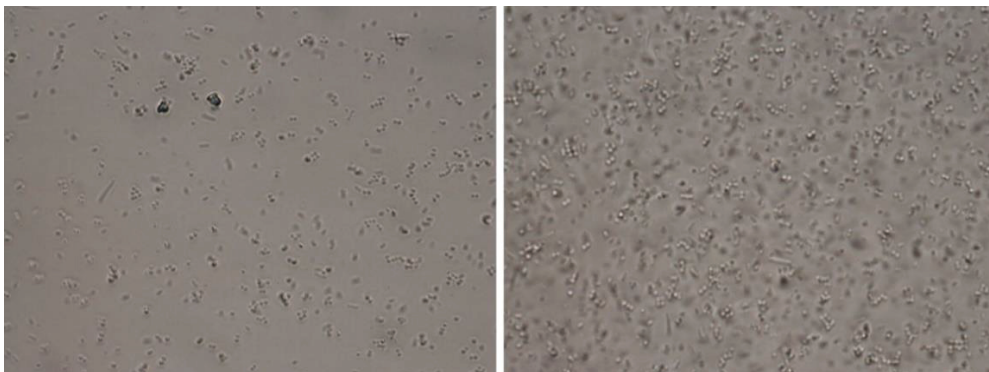


Abbildung 25: Versuch V4 - *E. coli*, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung

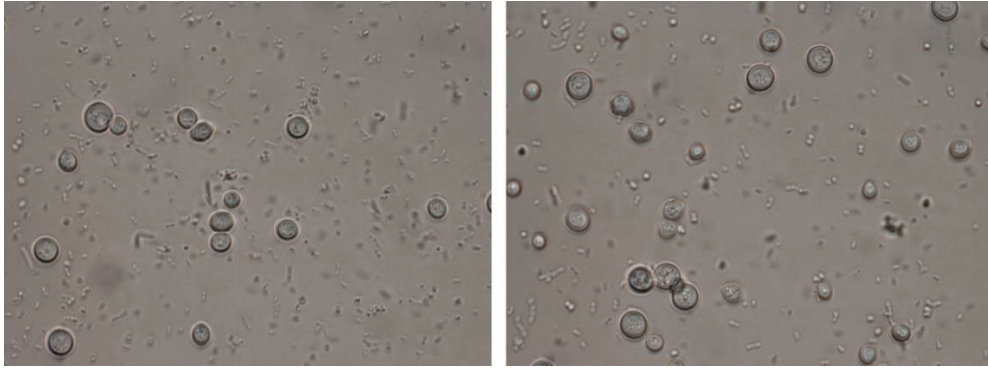


Abbildung 26: Versuch V4 – *S. cerevisiae*, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung

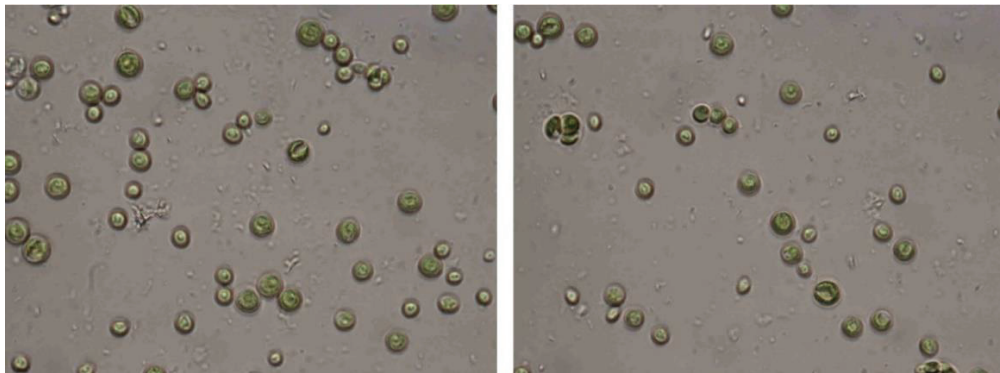


Abbildung 27: Versuch V4 – *Chlorella*, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung

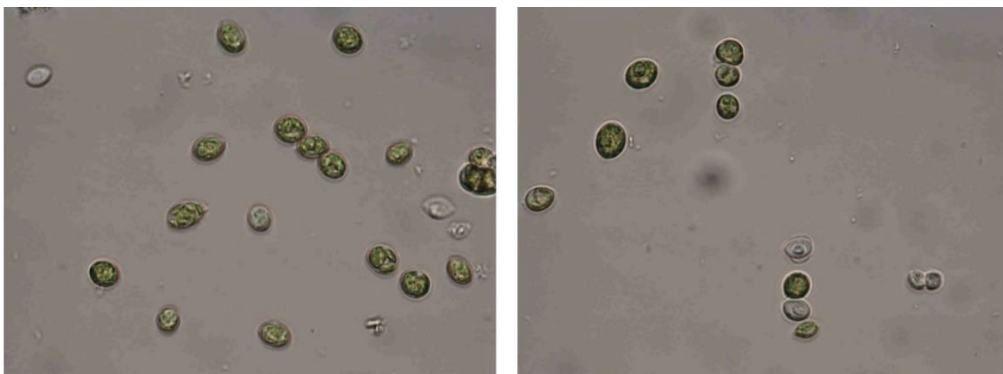


Abbildung 28: Versuch V4 – *Acutodesmus*, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung

Die Abbildungen (Abb. 25-28) der Versuchsdurchführung 4 zeigen unter dem Mikroskop keine eindeutigen Beschädigungen der Einzelzellen durch die PEF-Anwendung auf. Um zu verifizieren, ob eine Inaktivierung der Probeorganismen stattfand, die nicht optisch erkennbar ist, wurde eine

Inhibitionskontrolle von *E. coli* und *S. cerevisiae* aus V4 gemäß Kapitel 4.4 durchgeführt. Tabelle 19 zeigt die Auswertung der Inhibitionskontrolle nach Bebrütung der behandelten und unbehandelten Probeorganismen aus Versuch V4 mit Doppelbestimmung. N.A. für „Nicht auswertbar“ bezeichnet hierbei eine so stark bewachsene Agarplatte, dass eine korrekte Angabe der KBE nicht möglich ist.

Tabelle 19: V4 - Inhibitionskontrolle von *E. coli* und *S. cerevisiae*

	<i>E. coli</i>				<i>S. cerevisiae</i>			
	unbehandelt [KBE]		+PEF [KBE]		unbehandelt [KBE]		+PEF [KBE]	
Wiederholung	1	2	1	2	1	2	1	2
Verdünnungsreihe $10^{-1}$	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Verdünnungsreihe $10^{-2}$	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Verdünnungsreihe $10^{-3}$	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	>300	>300	>300	>300
Verdünnungsreihe $10^{-4}$	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	>200	>200	>200	>200
Verdünnungsreihe $10^{-5}$	>200	>200	>200	>200	91	120	191	157
Verdünnungsreihe $10^{-6}$	174	142	168	150	86	78	8	46
Verdünnungsreihe $10^{-7}$	109	92	97	104	3	9	--	14

Die Auswertung der Wachstumsinhibitionskontrolle aus Versuch V4 offenbart keinen eindeutigen Unterschied im Wachstumsverhalten der Mikroorganismen bepulst zu unbepulst. Es gibt zwar Schwankungen, diese sind aber nicht eindeutig genug, um nahezulegen, dass eine Zellinaktivierung durch die PEF-Behandlung stattgefunden hat.

## Versuch V5

Die Versuchsdurchführung des Versuchs V5 fand unter Berücksichtigung identischer Gegebenheiten zu der von V4 statt, einzig die Gesamtpulsanzahl wurde von 50 auf 100 erhöht und auf die PEF-Behandlung von *E. coli* wurde verzichtet. Die mikroskopische Untersuchung der PEF-Anwendung gemäß den Vorgaben von V5 bei *S. cerevisiae* (Abb. 29), *Chlorella* (Abb. 30) und *Acutodesmus* (Abb. 31) sind folgend abgebildet.

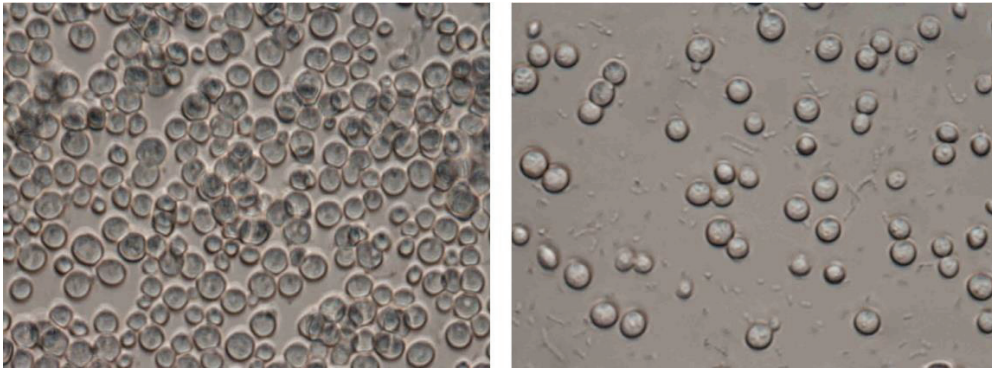


Abbildung 29: Versuch V5 – *S. cerevisiae*, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung

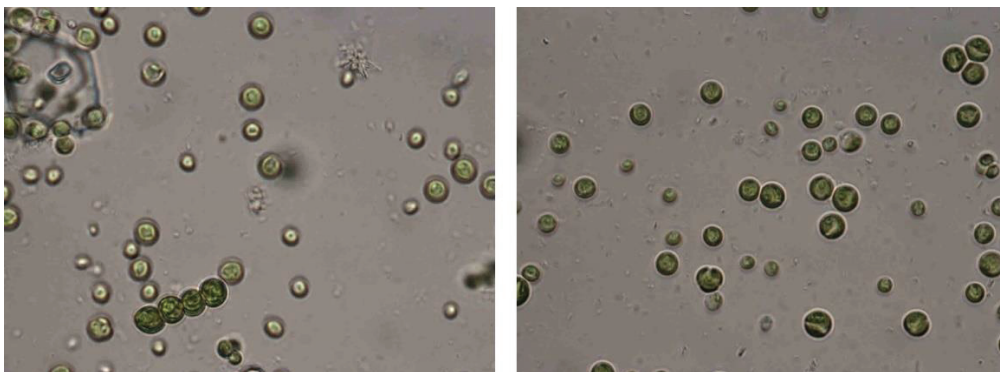


Abbildung 30: Versuch V5 – *Chlorella*, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung

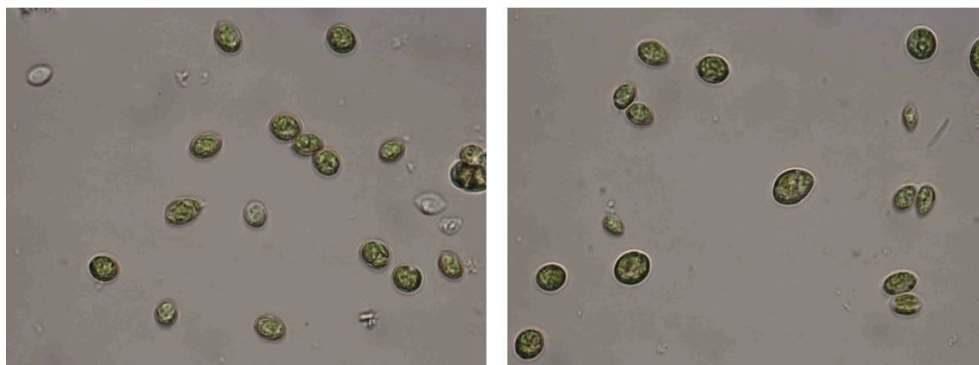


Abbildung 31: Versuch V5 – *Acutodesmus*, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung



Die Abbildungen 29,30 und 31 zu Versuch 5 legen nahe, dass es zu keinem Zellaufschluss kam. Die Einzelzellen der behandelten Zellen weisen bei mikroskopischer Betrachtung weder Havarien oder Verletzungen auf, noch tritt, im Falle der Mikroalgen, eine grüne Verfärbung der umliegenden Flüssigkeit durch das aus Zellmembranverletzungen strömende Chlorophyll auf.

Aufgrund des nicht erkennbaren Einflusses der eingesetzten Pulsed-Electric-Fields auf das Probematerial in V5 wurde auf eine Wachstumsinhibitionskontrolle verzichtet. Es wurde präferiert zunächst durch Verwendung eines Zellaufschlussgefäßes mit noch geringerem Volumen die Energieeinwirkung auf die Probeorganismen zu erhöhen und dann die Inhibitionskontrolle durchzuführen.

### Versuch V6

Unter Verwendung des Zellaufschlussreaktors ZAR 3 mit dem geringsten Volumen und Elektrodenabstand wurden in Versuch V6 *Saccharomyces cerevisiae* (Abb. 32), *Chlorella* (Abb. 33) und *Acutodesmus* (Abb. 34) mit der Elektroporationsanlage penetriert. Deren mikroskopische Analyse wird in Abbildung 32-34 aufgezeigt.

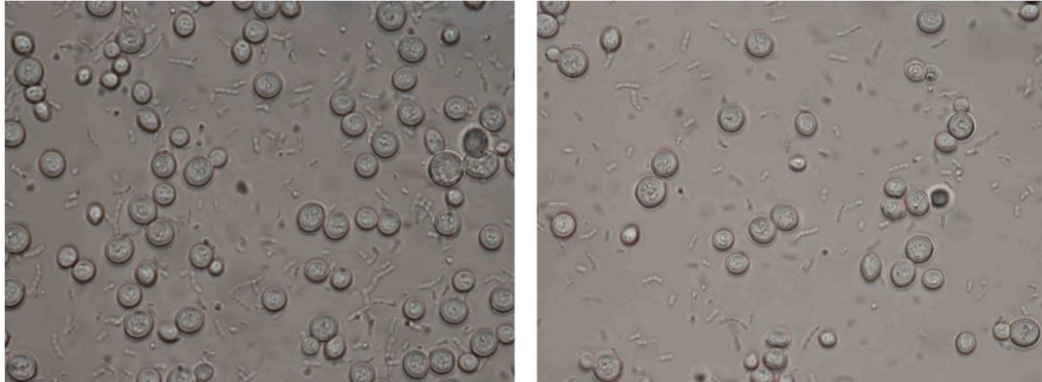


Abbildung 32: Versuch V6 – *S. cerevisiae*, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung

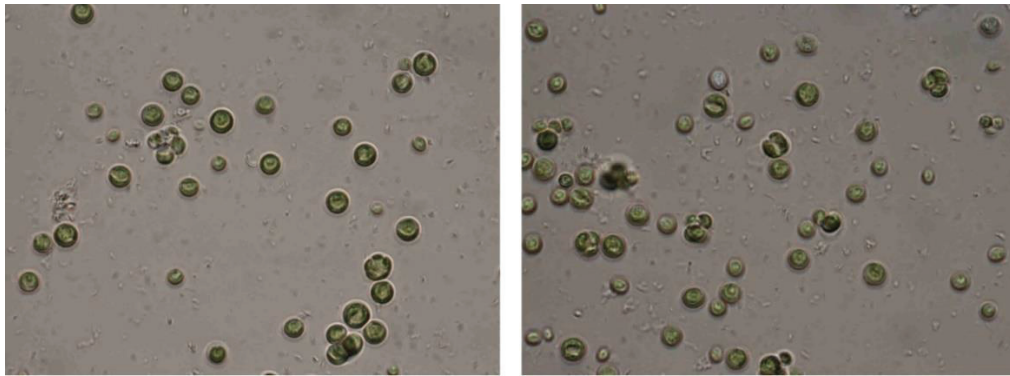


Abbildung 33: Versuch V6 – *Chlorella*, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung

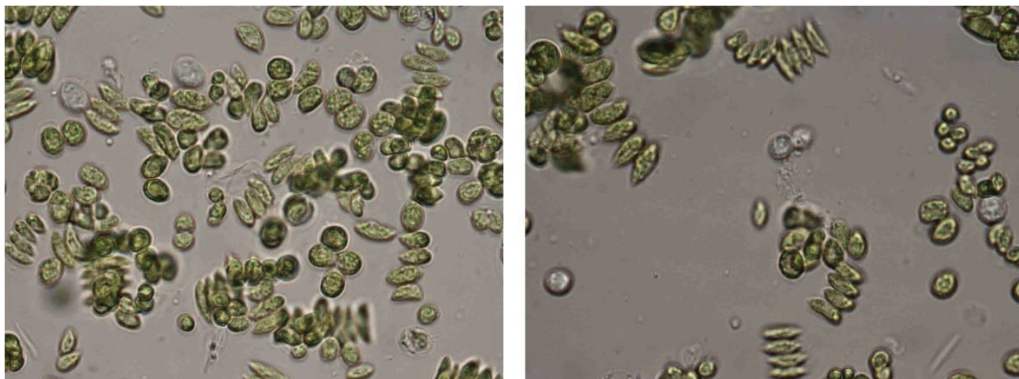


Abbildung 34: Versuch V6 – *Acutodesmus*, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung

Die Einzelzellen der Probeorganismen von Versuch 6 sind unter dem Mikroskop gut sichtbar. Es lassen sich auf den Bildern bei keinem der Proben Unterschiede in der Zellbeschaffenheit zwischen unbehandelter und behandelter Zelle ausmachen, folglich deutet nichts auf einen erfolgte Zellpermeabilisierung hin, die einen Zelltod zur Folge hätte.

Zusätzlich zur mikroskopischen Untersuchung erfolgte eine Inhibitionskontrolle zur Zellaufschlussvalidierung. Die Auswertung der Inhibitionskontrolle von *S. cerevisiae* aus Versuch 6 wird in Tabelle 19 dargestellt.

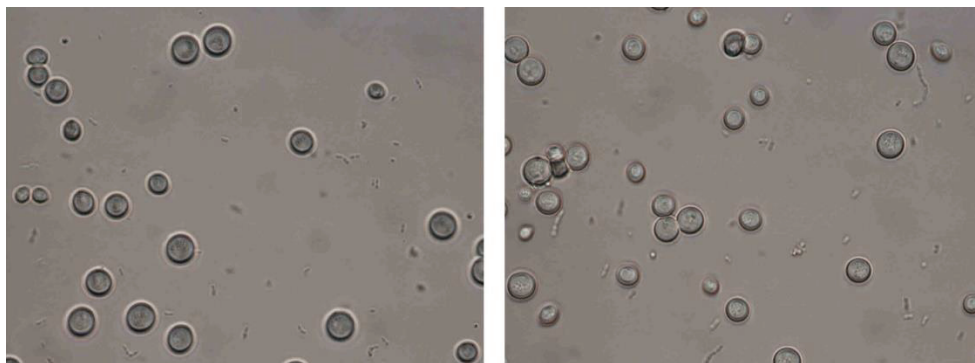
Tabelle 20: V6 - Inhibitionskontrolle von *S. cerevisiae*

	<i>S. cerevisiae</i>			
	Unbehandelt [KBE]		+PEF [KBE]	
	1	2	1	2
Wiederholung				
Verdünnungsreihe 10 <sup>-1</sup>	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Verdünnungsreihe 10 <sup>-2</sup>	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Verdünnungsreihe 10 <sup>-3</sup>	>300	>300.	>200	>300
Verdünnungsreihe 10 <sup>-4</sup>	144	115	110	118
Verdünnungsreihe 10 <sup>-5</sup>	35	16	29	36
Verdünnungsreihe 10 <sup>-6</sup>	--	--	--	--
Verdünnungsreihe 10 <sup>-7</sup>	--	--	--	--

Insgesamt zeigte die Wachstumskontrolle der Hefe auf V6 weniger Wachstum im Vergleich zu V4. Dieses geringere Wachstum ist aber gleichermaßen bei behandelter und unbehandelter Hefe zu erkennen, woraus sich eine schwächere Zellkonzentration der Zellkultur in V6 ableiten lässt. Allerdings zeigt die Auswertung der koloniebildenden Einheiten keine Unterschiede im Wachstum, die bei einer erfolgten Zellinaktivierung zu erwarten wären.

### Versuch 7

In Versuchsaufbau 7 kamen die analogen Versuchsparameter zum Einsatz wie in vorausgegangenem Versuch V6, einzig die Summe der Einzelpulse wurde auf 100 erhöht. Die mikroskopische Auswertung der bepulsten Organismen *S. cerevisiae* (Abbildung 35), *Chlorella* (Abbildung 36) und *Acutodesmus* (Abbildung 37) ist nachfolgend ersichtlich.

Abbildung 35: Versuch V7 – *S. cerevisiae*, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung

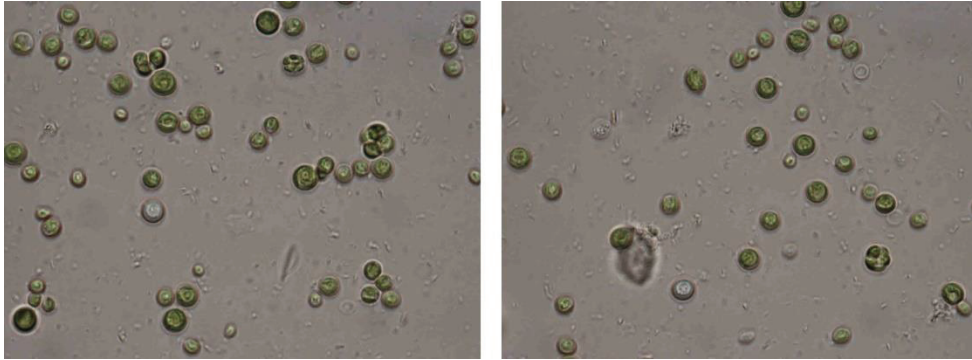


Abbildung 36: Versuch V7 – *Chlorella*, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung

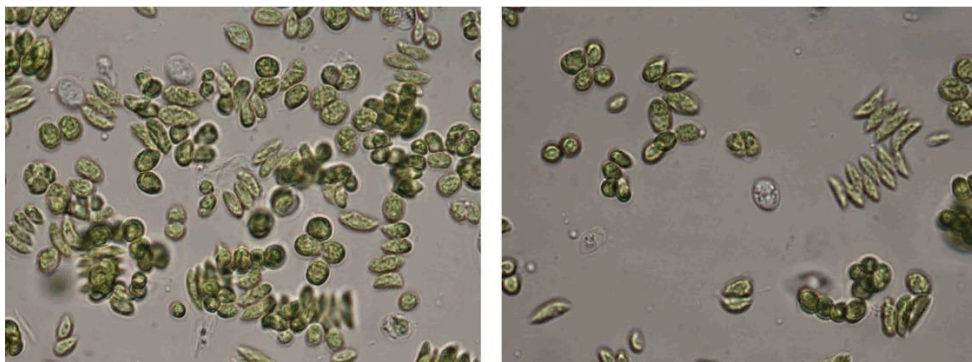


Abbildung 37: Versuch V7 – *Acutodesmus*, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung

Die mikroskopische Untersuchung des Versuchs V7 weist keine Faktoren auf, die einen erfolgreichen Zellaufschluss bestätigen würden. Zwar sind bei den Mikroalgen immer wieder „leere“ Zellhüllen ohne Chlorophyll zu sehen, doch diese lassen sich auch bei den unbehandelten Proben in ähnlicher Häufigkeit auffinden.

Versuch 7 wurde zudem mittels Wachstumsinhibitionskontrolle untersucht. Die Auswertung der KBE ist in Tabelle 21 ersichtlich.



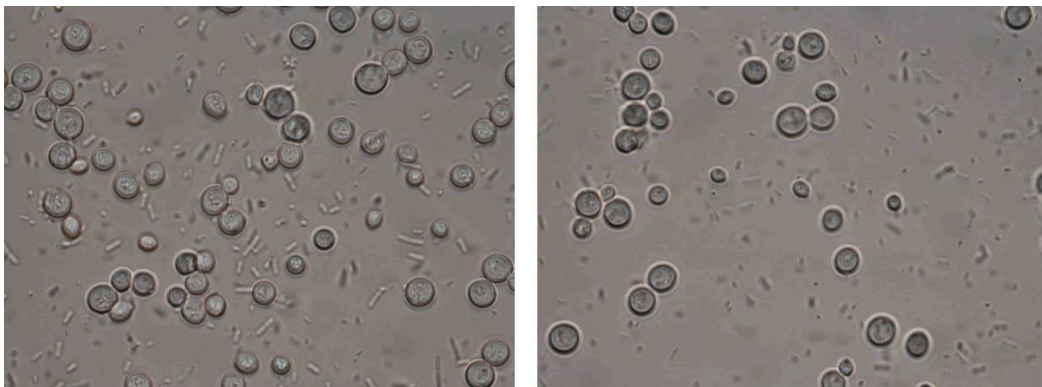
Tabelle 21: V7 - Inhibitionskontrolle von *S. cerevisiae*

	<i>S. cerevisiae</i>			
	Unbehandelt [KBE]		+PEF [KBE]	
	1	2	1	2
Wiederholung				
Verdünnungsreihe 10 <sup>-1</sup>	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Verdünnungsreihe 10 <sup>-2</sup>	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Verdünnungsreihe 10 <sup>-3</sup>	>300	>300.	N.A.	>300
Verdünnungsreihe 10 <sup>-4</sup>	>200	>200	>200	190
Verdünnungsreihe 10 <sup>-5</sup>	156	184	150	133
Verdünnungsreihe 10 <sup>-6</sup>	46	68	20	60
Verdünnungsreihe 10 <sup>-7</sup>	--	--	10	--

Die Inhibitionskontrolle der nach Versuchsaufbau V7 PEF-behandelten Hefe zeigt keine signifikanten Unterschiede in ihrem Wachstum im Vergleich zur unbehandelten. Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten sind unter Berücksichtigung der als normal anzusehenden Abweichungen zwischen den Proben nicht abweichend.

### Versuch 8

In Versuchsaufbau wurde statt der konstruierten PEF-Anlage ein Kurbelinduktor eingesetzt. Die mikroskopische Betrachtung der mittels Kurbelinduktors behandelten *S. cerevisiae* Hefesuspension wird in Abbildung 38 illustriert.

Abbildung 38: Versuch V8 – *S. cerevisiae*, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung

Auch der Einsatz des Kurbelinduktors brachte nicht den gewünschten Effekt. Mikroskopisch lassen sich an den Hefezellen keine Verletzungen oder gar Beschädigungen der Zellhülle feststellen.

Neben der Analyse per Mikroskop wurde noch eine Inhibitionskontrolle getätigt. Tabelle 22 zeigt deren Auswertung.

Tabelle 22: V8 - Inhibitionskontrolle von *S. cerevisiae*

	<i>S. cerevisiae</i>			
	Unbehandelt [KBE]		+PEF [KBE]	
Wiederholung	1	2	1	2
Verdünnungsreihe $10^{-1}$	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Verdünnungsreihe $10^{-2}$	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Verdünnungsreihe $10^{-3}$	>300	>300.	>300	>300
Verdünnungsreihe $10^{-4}$	>200	>200	>200	>200
Verdünnungsreihe $10^{-5}$	87	98	63	58
Verdünnungsreihe $10^{-6}$	45	36	39	23
Verdünnungsreihe $10^{-7}$	6	--	--	--

Die Analyse der Koloniebildenden Einheiten von Versuch V8 kann die Annahme einer erfolgten Inaktivierung der Hefezellen durch das Einwirken eines elektrischen Feldes nicht belegen. Es lassen sich aus den KBE keine eindeutige Schwächung der Hefe in ihrem Wachstum zeigen.

Es lässt sich festhalten, dass sich in keiner der erfolgten Versuchsdurchführungen mittels der in dieser Arbeit gewählten Validierungsmethoden ein Zellaufschluss durch Anwendung von PEF nachweisen lässt. Weder mikroskopisch noch über ein reduziertes Zellwachstum konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass Zellen in ausreichendem Maße beschädigt wurden. Da im Laufe der Arbeit immer kleiner werdende Zellaufschlussgefäße zum Einsatz kamen, um das elektrische Feld zu erhöhen, waren zusehends so kleine Volumina an Probenmaterial gefordert, dass diese bedauerlicherweise nicht mit dem Einsatz und der Beprobung von Zuckerrübenpressschnitzeln vereinbar waren.

## 6. Diskussion

Es wurde im Rahmen der Arbeit eine elektrisch betrachtet funktionsfähige Pulsed-Electric-Fields-Anlage konstruiert. Ziel war es hierbei, eine transportable Kleinanlage zu haben die den Zellaufschluss von kleinen Probemengen im Labor erlaubt. Um zu prüfen, ob die gebaute Anlage in der Lage ist, mit ihren gepulsten elektrischen Feldern Zellen bis hin zum Zellaufschluss und somit deren Inaktivierung zu bringen wurden verschiedene Probematerialien untersucht. Diese bestanden aus einem Zwiebelhäutchen, der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, den Mikroalgen *Chlorella* und *Acutodesmus* sowie dem Bakterium *Escherichia coli*. Eine Anfälligkeit für die Elektroporation bildet die Gramnegativität von *E. coli*, da gramnegative Bakterien eine dünnere Zellmembran besitzen als grampositive. Des Weiteren galt es zu berücksichtigen, dass die Zellgröße großen Einfluss auf das Ergebnis des Zellaufschlusses hat. So gilt, je größer eine Zelle, desto anfälliger ist sie für PEF. Hier stellte sich eine Diskrepanz aus der Verwendung möglichst kleiner Volumina und damit einhergehend einem geringen Elektrodenabstand und der Verwendung möglichst großer Zellen, als positiven Einflussfaktor auf den Zellaufschluss, dar. So wurde darauf geachtet in der Welt der Einzeller möglichst große Vertreter zu wählen, um so den Zellaufschluss zu begünstigen. Das Zwiebelhäutchen als Pflanzenzelle, die gut in geringe Volumina gebracht werden kann stellte sich leider als unpraktikabel in der Handhabung heraus. Es gelang leider im Rahmen dieser Arbeit nicht einen der aufgeführten Probeorganismen mittels der selbstgebauten PEF-Anlage aufzuschließen und diesen Aufschluss nachzuweisen. Der Umstand der benötigten geringen Volumina war hierbei leider auch mit der Beprobung der Zuckerrübenpressschnitzel nicht vereinbar.

Die Versuchsaufbauten lieferten in der Spitze ein spezifischen Energieeintrag von 8,19 kJ pro kg Probe. Werte, die hierzu in der Literatur angegeben werden, sprechen von einem Energieeintrag von 1-2 kJ pro kg, die bei Pflanzenzellen zu einem Zellaufschluss reichen (Kapitel 2.2.1.1). So zeigt sich, dass es durchaus die begründete Annahme gab, dass mittels der konstruierten Anlage ein Zellaufschluss möglich sein könne. Zudem ist noch als Einflussfaktor zu nennen, dass in der Literatur bestätigt wurde, dass eine Erhöhung der Pulsanzahl bis zu einem gewissen Punkt mit einer Erniedrigung des benötigten Energieeintrags einher geht. Dieser Fakt wurde sich in dieser Arbeit zu Nutze gemacht, indem bis zu 100 Pulse appliziert wurden, umso den zum Zellaufschluss benötigten Energieeintrag auf das für das jeweilige Probenmaterial entsprechende Minimum zu senken (Kapitel 2.2.1.1). Dieser minimale Energieeintragswert in Abhängigkeit der Anzahl an Einzelpulsen ist nur experimentell zu ermitteln und liegt leider noch nicht tabellarisch in der Literatur vor.

Es sei erwähnt, dass neben dem spezifischen Energieeintrag in der Literatur die elektrische Feldstärke eine essenzielle Rolle bei der Umsetzung des Zellaufschlusses mittels Pulsed-Electric-Fields darstellt. Hier werden in der Literatur diverse Schwellenwerte für eine zum Zellaufschluss benötigte Feldstärke angegeben. Diese liegen beispielsweise bei Pflanzenzellen bei ein bis zwei Kilovolt pro Zentimeter und bei Hefen bei zwei bis vier Kilovolt pro Zentimeter. Diese Werte stehen in Kontrast zu den in dieser Arbeit im Maximum erreichten elektrischen Feldstärke von 50 V pro cm. Nichtsdestotrotz ließen die mit der selbstgebauten Anlage erreichten Energieeinträge einen erfolgreichen Zellaufschluss erwarten. Der Einbezug eines Kurbelinduktors lieferte hier zwar eine elektrische Feldstärke von bis zu 1,6 kV pro cm, allerdings mangelte es hier an anderer Stelle am elektrischen Energieeintrag in Form von der Stromstärke.

Hier stellt sich der Bedarf nach der Forschung und Entwicklung einer Formel dar, die den spezifischen Energieeintrag mit einem detaillierteren Miteinbezug der elektrischen Feldstärke unter Berücksichtigung des Elektrodenabstands erweitert. Diese würde künftige Auslegungen von Kleinanlagen im Technikums-, oder Labormaßstab erleichtern.

Es wurden im Laufe der Planung und Auslegung der PEF-Anlage Überlegungen angestellt, größere Kondensatoren zu verbauen, um so den Zellaufschluss zu realisieren. Allerdings ist bei Kondensatoren die Kapazitätshöhung um ein paar Potenzen mit einem erheblichen Kostenanstieg verbunden, der in dieser Form mit den seitens der Hochschule zur Verfügung gestellten finanziellen Mitteln für Abschlussarbeiten nicht zu vereinbaren war. Gleiches galt auch für Überlegungen zur Erhöhung der in die PEF-Anlage eingebrachten Spannung. Hierbei wäre eine Erhöhung der Spannung mit erheblichen Mehrkosten verbunden, da alle verwendeten Bauteile für den entsprechenden Spannungsbereich ausgelegt sein müssen.

Abschließend lässt sich festhalten, dass es möglich war eine Pulsed-Electric-Fields-Anlage zu planen und zu konstruieren. Auch wenn letzten Endes kein Zellaufschluss nachgewiesen werden konnte, lässt sich konstatieren, dass es möglich war mit entsprechenden Anpassungen und Einschränkungen einen spezifischen Energieeintrag zu erreichen, aus dem theoretisch ein Zellaufschluss resultieren kann. Hier bedarf es noch einiger Überlegungen und Anstrengungen, um die elektrische Feldstärke zu erhöhen. Darüber hinaus konnten Erkenntnisse im Hinblick auf die Konstruktion von Elektroporationsanlagen im Kleinstmaßstab, deren Auslegung und kritische Bauteile sowie Einflussfaktoren gewonnen werden.

## 7. Zusammenfassung

Die Anwendung von Pulsed-Electric-Fields in der Lebensmittelindustrie stellt ein innovatives Verfahren zur nicht-thermischen Behandlung von Lebensmitteln zum Zwecke der Haltbarkeitsverlängerung oder Extraktionsoptimierung dar, bei der ein Lebensmittel zwischen zwei Elektroden einem pulsierenden Hochspannungsfeld ausgesetzt wird. Nicht-thermische Verfahren gewinnen zunehmend an Bedeutung, da diese produktschonend sind und gleichzeitig mikrobielle Stabilität gewährleisten.

Ziel der Arbeit war die Anfertigung einer für Kleinstanwendungen im Labor vorgedachte Elektroporationsanlage. Die elektrotechnischen Grundlagen, sowie die essenziellen Bauteile einer PEF-Anlage und deren, entsprechend den Anforderungen, zu wählenden Dimensionierung, konnten in dieser Arbeit zusammengefasst werden.

Der resultierende Zellaufschluss ist vor allem von den Kernparametern elektrische Feldstärke und spezifischer Energieeintrag abhängig. Obgleich der Kernparameter des spezifischen Energieeintrags in der konstruierten Anlage gemäß Literaturangaben ausreichend große Energiebeträge lieferte, konnte leider kein erfolgreicher Zellaufschluss nachgewiesen werden. Die elektrische Feldstärke konnte als limitierender Faktor der Anlage ausgemacht werden. Alle Bestrebungen diese auf das, im Rahmen der konstruierten Anlage, mögliche Maximum zu bringen, brachten nicht den erhofften Erfolg. Den, zum Zweck der Erhöhung der elektrischen Feldstärke, kleiner werdenden Zellaufschlussreaktoren und analog dazu den kleiner werdenden Probevolumina fiel die Beprobung der Zuckerrübenpressschnitzel zum Opfer, wie es ursprünglich angestrebt war.

Die Nachweismethoden der Mikroskopischen Kontrolle und der Wachstumsinhibitionskontrolle wurden gewählt, da sie sich am besten dafür eigneten, die in dieser Arbeit beprobten Kleinstmengen an Probevolumen zu analysieren. Alternative Analysemethoden hätten deutlich mehr Probematerial vorausgesetzt.

Es bedarf weiterer Forschung, um eine Labor-PEF-Anlage zu konstruieren, aber es konnte eine Basis gelegt werden. Die limitierten zur Verfügung stehenden finanziellen Mittel erschwerten die Umsetzung der in der Literatur geforderten Parameter.

## 8. Literaturverzeichnis

- AMIALI, M., NGADI, M. O., RAGHAVAN, G. S. V. & SMITH, J. P. 2006. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteritidis* in liquid egg white using pulsed electric fields. *Journal of Food Science*, 71, 88-94.
- AMMAR, J. B., LANOISELLÉ, J.-L., LEBOVKA, N. I., HECKE, E. V. & VOROBIEV, E. 2011. Impact of a pulsed electric field on damage of plant tissues: effects of cell size and tissue electrical conductivity. *Journal of Food Science*, 76, 90-97.
- ANTRANIKIAN, G. & GROTE, R. 2006. Einführung in die Diversität, Systematik und Physiologie von Mikroorganismen. In: ANTRANIKIAN, G. (ed.) *Angewandte Mikrobiologie*. Springer.
- ASAVASANTI, S., RISTENPART, W., STROEVE, P. & BARRETT, D. M. 2010. Permeabilization of Plant Tissues by Monopolar Pulsed Electric Fields: Effect of Frequency. *Journal of Food Science*, 76, 98-111.
- BARBOSA-CANOVAS, G. V., PIERSON, M. D., ZHANG, Q. H. & SCHAFFNER, D. W. 2011. Pulsed Electric Fields. *Journal of Food Science*, 65-81.
- BARSANTI, L. & GUALTIERI, P. 2006. *Algae - Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*, Taylor & Francis.
- BETZ, F., BEUTH, K., LAUWAßER, J., SCHMIDT, W. & WUNDERLIN, A. 1980. *Grundkenntnisse Elektrotechnik*, Hamburg, Handwerk und Technik.
- BOROWITZKA, M. A., BECKER, E. W., DEPAUW, N., PERSOONE, G. & OSWALD, W. J. 1988. Products and uses of micro-algae. In: BOROWITZKA, M. A. & BOROWITZKA, L. J. (eds.) *Micro-Algal Biotchnology*. Cambridge University Press.
- CAMPBELL, N. A. 1996. *Biologie*, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- CASTRO, A. J., BARBOSA-CANOVAS, G. V. & SWANSON, B. G. 1993. Microbial inactivation of foods by pulsed electric fields. *Journal of Food Processing and Preservation*, 17, 47-73.
- CONRAD: Kondensator. 2021 [Zugriff am 14.07.2021]. Verfügbar unter <https://www.conrad.de/de/p/ftcap-lfb22204025036-elektrolyt-kondensator-radial-bdrahtet-2200-f-40-v-20-x-h-25-mm-x-36-mm-1-st-422657.html>
- DIN/VDE-0298-4 2013. Verwendung von Kabeln und isolierten Leitungen für Starkstromanlagen. *Teil 4: Empfohlene Werte für die Strombelastbarkeit von Kabeln und Leitungen für feste Verlegung in und an Gebäuden und von flexiblen Leitungen*. Berlin: DIN Deutsches Institut für Normung e.V. & VDE Verband der Elektrotechnik Elektronik Informationstechnik e.V.
- JEYAMKONDAN, S., JAYAS, D. S. & HOLLEY, R. A. 1999. Pulsed electric field processing of foods: a review. *Journal of Food Protection* 62, 1088-1096.



- KAISER, C. J. 1993. *The Capacitor Handbook*, Van Nostrand Reinhold.
- KNORR, D. & ANGERSBACH, A. 1998. Impact of high-intensity electric field pulses on plant membrane permeabilization. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 185-191.
- KORIES, R. & SCHMIDT-WALTER, H. 2008. *Taschenbuch der Elektrotechnik*, Frankfurt, Verlag Harri Deutsch.
- KUCHLING, H. 2011. *Taschenbuch der Physik*, Carl Hanser Verlag.
- KUMAR, R., VIJAYALAKSHMI, S., KATHIRAVAN, T. & NADANASABAPATHI, S. 2019. PEF Processing of Fruits, Vegetables and their products. In: CHAUHAN, O. P. (ed.) *Non-Thermal*. Taylor & Francis Group.
- LEADLY, C. E. & WILLIAMS, A. 2006. Pulsed Electric Field Processing, Power Ultrasound and Other Emerging Technologies. In: BRENNAN, J. G. (ed.) *Food Processing Handbook*. Weinheim: WILEY-VCH.
- LEBOVKA, N. I., BAZHAL, M. I. & VOROBIEV, E. 2002. Estimation of characteristic damage time of food materials in pulsed-electric fields. *Journal of Food Engineering* 54, 337-346.
- LEBOVKA, N. I., PRAPORSCIC, I., GHNIMI, S. & VOROBIEV, E. 2005. Temperature enhanced electroporation under the pulsed electric field treatment of food tissue. *Journal of Food Engineering*, 69, 177-184.
- MARTIN-BELLOSO, O. & SOLIVA-FORTUNY 2011. Pulsed Electric Fields Processing Basics. In: ZHANG, H. Q., BARBOSA-CÁNOVAS, G. V., BALASUBRAMALIAM, V. M., DUNNE, C. P., FARKAS, D. F. & YUAN, J. T. C. (eds.) *Nonthermal Processing Technologies for Food*. Wiley-Blackwell Ltd.
- NETHE-JAENCHEN, R. 2001. Die Welt der Mikroorganismen. In: MUNK, K. (ed.) *Grundstudium Biologie - Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- NOTERMANS, S. 2007. Preservation of food by pulsed electric fields: An introduction. In: LELIEVELD, H. L. M., NOTERMANS, S. & DEHAAN, S. W. H. (eds.) *Food preservation by pulsed electric fields*. Woodhead Publishing Limited.
- OH-HAMA, T. & MIYACHI, S. 1988. The Algae. In: BOROWITZKA, M. A. & BOROWITZKA, L. J. (eds.) *Micro-Algal Biotechnology*. Cambridge University Press.
- ORTEGA-RIVAS, E. 2012. High Voltage Pulsed Electric Fields. *Non-Thermal Food Engineering Operations* New York: Springer.
- RAJUVA, T. A. R., DIVYA, B. & JOY, P. P. 2019. Non-Thermal Processing of Foods: Pulsed Electric Fields, Pulsed Light, Ionizing Radiation and High Hydrostatic Pressure. *Non-Thermal Processing of Foods*.
- SACK, M. 2016. *Elektrotechnische Grundlagen von Elektroporationsanlagen*, Göttingen, Cuvillier Verlag.

- SCHULTHEISS, C., BLUHM, H.-J., MAYER, H.-G. & KERN, M. 2002. Processing of sugar beets with pulsed-electric fields. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 30, 1547-1551.
- SCHULTHEISS, C., BLUHM, H.-J., MAYER, H.-G., SACK, M. & KERN, M. 2004. Principle of electroporation and development of industrial devices. *Zuckerindustrie*, 129, 40-44.
- SINGH, R., KAUR, B. P. & THANGALAKSHMI, S. 2019. Pulsed Electric Field Processing - Principles and Engineering Aspects. In: CHAUHAN, O. P. (ed.) *Non-Thermal Processing of Food*. Taylor & Francis Group.
- SOEDER, C. J. & HEGEWALD, E. 1988. The Algae. In: BOROWITZKA, M. A. & BOROWITZKA, L. J. (eds.) *Micro-Algal Biotechnology*. Cambridge University Press.
- TOEPFEL, S., HEINZ, V. & KNORR, D. 2005. Overview of pulsed electric field processing for food. In: SUN, D.-W. (ed.) *Emerging Technologies for Food Processing*. London: Elsevier Academic Press.
- TOEPFL, S., SIEMER, C., SALDANA-NAVARRO, G. & HEINZ, V. 2014. *Emerging Technologies for Food Processing*, Elsevier Ltd.
- ZIMMERMANN, U. 1986. Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 105, 175-256.



## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vergleich einer rohen Zuckerrübenhälfte zu einer elektroporierten (EP) (Schultheiss et al., 2002).....	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Zelle als Kondensator (Leadly and Williams, 2006) .....	13
Abbildung 3: PEF-Behandlung einer <i>Bacillus cereus</i> Zelle (Leadly and Williams, 2006). .....	13
Abbildung 4: Grundlegender Aufbau einer Elektroporationsanlage nach (Leadly and Williams, 2006).....	17
Abbildung 5: Das elektrische Feld parallel angeordneter Plattenelektroden (Sack, 2016).....	19
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Elektrolytkondensators nach (Kaiser, 1993) .....	20
Abbildung 7: Schaltplan der Rohform der PEF-Anlage (eigene Abbildung) .....	25
Abbildung 8: Spannungsquelle HANMATEK HM310 (eigene Aufnahme).....	26
Abbildung 9: In der Arbeit verwendete Reaktionsgefäße .....	27
Abbildung 10: Halterung des Zellaufschlussreaktors, links das 3D-Modell und rechts die ausgefertigte Version (eigene Aufnahme).....	29
Abbildung 11: Plattenelektroden,[1] für Reaktionsgefäß1, [2] für Reaktionsgefäß 2 und [3] für Reaktionsgefäß 3 (eigene Aufnahme) .....	29
Abbildung 12: Elektrolytkondensatoren, Beispielbild (2021) .....	30
Abbildung 13: Hochlastwiderstände, links mit $1 \Omega$ , rechts mit $10.000 \Omega$ (eigene Aufnahme) ....	31
Abbildung 14: Drucktaster, ausgelegt als Schließer (eigene Aufnahme) .....	32
Abbildung 15: Flexible Aderleitung mit Kunststoffummantelung (eigene Aufnahme) .....	33
Abbildung 16: Schaltplan der PEF-Anlage (eigene Abbildung).....	33
Abbildung 17: Teil zwei der PEF-Anlage, Elektronik in Sicherungskasten (eigene Aufnahme). 35	
Abbildung 18: Drucktaster und Sicherungskasten (eigene Aufnahme).....	35
Abbildung 19: Teil 3 der PEF-Anlage mit geöffnetem (links) und geschlossenem (rechts) Faraday'schen Käfig (eigene Aufnahme) .....	36
Abbildung 20: Die komplette selbstgebaute PEF-Anlage im Labormaßstab (eigene Aufnahme) 37	
Abbildung 21: Schaltplan des Versuchsstands mit Kurbelinduktor (eigene Abbildung) .....	52
Abbildung 22: Kurbelinduktor mit Drucktaster (eigene Aufnahme).....	53
Abbildung 23: Lichtmikroskop Nikon Eclipse E400 .....	54

Abbildung 24: Ergebnis V1 - Mikroskopie des Zwiebelhäutchens mit PEF-Behandlung .....	56
Abbildung 25: Versuch V4 - E. coli, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung.....	57
Abbildung 26: Versuch V4 – S. cerevisiae, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung .....	58
Abbildung 27: Versuch V4 – Chlorella, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung.....	58
Abbildung 28: Versuch V4 – Acutodesmus, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung.....	58
Abbildung 29: Versuch V5 – S. cerevisiae, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung .....	60
Abbildung 30: Versuch V5 – Chlorella, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung.....	60
Abbildung 31: Versuch V5 – Acutodesmus, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung.....	60
Abbildung 32: Versuch V6 – S. cerevisiae, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung .....	61
Abbildung 33: Versuch V6 – Chlorella, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung.....	62
Abbildung 34: Versuch V6 – Acutodesmus, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung.....	62
Abbildung 35: Versuch V7 – S. cerevisiae, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung .....	63
Abbildung 36: Versuch V7 – Chlorella, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung.....	64
Abbildung 37: Versuch V7 – Acutodesmus, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung.....	64
Abbildung 38: Versuch V8 – S. cerevisiae, links ohne und rechts mit PEF-Behandlung .....	65

## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kerndaten der verwendeten Zellaufschlussreaktoren (ZAR).....	28
Tabelle 2: Kerndaten der verwendeten Widerstände .....	31
Tabelle 3: Überblick der Zellen zur Zellaufschlussvalidierung .....	39
Tabelle 4: Allgemeine verwendete Utensilien des mikrobiologischen Labors.....	40
Tabelle 5: Allgemein verwendete Laborgeräte des mikrobiologischen Labors.....	41
Tabelle 6: Verwendete Materialien zur Herstellung einer CASO-Bouillon .....	41
Tabelle 7: Verwendete Materialien zur Herstellung eines Sabouraud Agars für Hefen .....	42
Tabelle 8: Verwendete Materialien zur Herstellung eines Trypton Soja Agars für E. coli .....	42
Tabelle 9: Verwendete Materialien zur Herstellung der Natriumchloridlösung.....	42
Tabelle 10: Unveränderliche Einflussfaktoren des Zellaufschlusses .....	46
Tabelle 11: Parameter des Zellaufschlussversuchs V1 – ZAR 1 mit Zwiebelhäutchen .....	47
Tabelle 12: Parameter des Zellaufschlussversuchs V2 – ZAR 2 mit Zwiebelhäutchen .....	48
Tabelle 13: Parameter des Zellaufschlussversuchs V3 – ZAR 2 mit Zwiebelhäutchen .....	48
Tabelle 14: Parameter des Zellaufschlussversuchs V4 – ZAR 2 mit E. coli, S. cerevisiae, Chlorella und Acutodesmus .....	49
Tabelle 15: Parameter des Zellaufschlussversuchs V5 – ZAR 2 mit S. cerevisiae, Chlorella und Acutodesmus .....	50
Tabelle 16: Parameter des Zellaufschlussversuchs V6 – ZAR 3 mit S. cerevisiae, Chlorella und Acutodesmus .....	51
Tabelle 17: Parameter des Zellaufschlussversuchs V7 – ZAR 3 mit S. cerevisiae, Chlorella und Acutodesmus .....	51
Tabelle 18: Parameter des Zellaufschlussversuchs V8 – ZAR 3 mit S. cerevisiae.....	53
Tabelle 19: V4 - Inhibitionskontrolle von E. coli und S. cerevisiae .....	59
Tabelle 20: V6 - Inhibitionskontrolle von S. cerevisiae.....	63
Tabelle 21: V7 - Inhibitionskontrolle von S. cerevisiae.....	65
Tabelle 22: V8 - Inhibitionskontrolle von S. cerevisiae.....	66

## 11. Gleichungsverzeichnis

(1)	Spezifischer Energieeintrag zum Zellaufschluss	$E_{spez} = \frac{E_{elektr.}}{m_{Probe}}$ .....14
(2)	Elektrische Energie	$E_{elektr.} = \frac{1}{2} C * U^2$ .....14
(3)	Elektrische Feldstärke	$\vec{E} = \frac{U}{s}$ .....15
(4)	Pulslänge eines Einzelpulses	$t_{Puls} = t_{C(E)} = 5 * \tau$ .....15
(5)	Zeitkonstante	$\tau = R * C$ .....15
(6)	Gesamtdauer der kumulierten Einzelpulse	$t_{Ges.(Puls)} = \sum t_{Puls}$ .....15
(7)	Spannung	$U = R * I$ .....18
(8)	Elektrische Leistung	$P_{el} = U * I$ .....18
(9)	Elektrische Kapazität	$C = \frac{Q}{U}$ .....19
(10)	Lade-/Entladezeit eines Kondensators	$t_{C(L)/C(E)} = 5 * R * C$ .....19
(11)	Reale Kondensator(ent)ladung	$t_{C(L)/C(E)} = 5\tau = 5 * R * C$ .....20

- (12) Parallelschaltung von Kondensatoren  $C_{ges} = C_1 + C_2 + \dots C_n \dots\dots\dots 20$
- (13) Elektrischer Widerstand  $R = \frac{U}{I} \dots\dots\dots 21$
- (14) Volumen des Zellaufschlussreaktors Quader  $V_{ZR} = l_{ZR} * h_{ZR} * b_{ZR} \dots\dots\dots 21$
- (15) Volumen des Zellaufschlussreaktors Zylinder  $V_{ZR} = r^2_{ZR} * \pi * h_{ZR} \dots\dots\dots 21$

**Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist und ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Textstellen, die wörtlich oder annähernd wörtlich aus Veröffentlichungen entnommen wurden, sind durch Zitate als solche gekennzeichnet.

Ich erkläre weiterhin, dass die abgegebene digitale Version mit der eingereichten schriftlichen Arbeit übereinstimmt.

---

Ort, Datum

---

Eigenhändige Unterschrift