



*Projekttitel:*

# Einsatz der Elektroporation im Hefemanagement der Brauerei

*Förderkennzeichen:*

49VF150042

*Name der Forschungsstelle(n):*

Forschungsinstitut für Bier- und Getränkeproduktion (FIBGP)

*Kontakt:*

Dr.-Ing. Roland Pahl, pahl@vlb-berlin.org

M. Sc. Florian Schrickel, f.schricket@vlb-berlin.org

*Bewilligungszeitraum:*

1.5.2016 – 30.4.2018

INNO-KOM

Gefördert durch:



Bundesministerium  
für Wirtschaft  
und Energie

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

# SCHLUSSBERICHT



WISSEN  
SCHAFFT  
QUALITÄT

## **Impressum**

### **Herausgeber:**

Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.  
Forschungskoordination - Gerhard Andreas Schreiber  
Seestraße 13, 13353 Berlin, Deutschland

Vereinsregister-Nr.: 24043 NZ, Amtsgericht Berlin-Charlottenburg

[www.vlb-berlin.org](http://www.vlb-berlin.org)

Gefördert durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages.

Alle Rechte vorbehalten, sofern nicht im Text nicht anders angegeben.

Kein Teil des Berichts darf ohne schriftliche Genehmigung des Herausgebers in irgendeiner Form reproduziert werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen in Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

All rights reserved (including those of translation into other languages).

No part of this book may be reproduced in any form.

Reg.-Nr.: 49VF150042

Kurtztitel: Einsatz der Elektroporation im Hefemanagement der Brauerei

Laufzeit: 01.02.2017 – 31.05.2019

**Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.**

Seestraße 13, 13353 Berlin

**Kurzfassung (Zielstellung, Ergebnisse)**

In diesem Forschungsprojekt sollte die Anwendung gepulster Elektrischer Felder (PEF) auf Propagations- und Fermentationsmedien bzw. die darin enthaltenen Hefepopulationen untersucht werden. Bisherige Forschung anderer Institutionen lieferte Indizien für hormetische Effekte von PEF-Behandlungen mit niedrigen Pulsspannungen auf Mikroorganismen. Das PEF stellt dabei einen leichten Stressor dar, auf den die Mikroorganismen mit einer Vitalitätssteigerung im Sinne eines gesteigerten Metabolismus reagieren. Des Weiteren sei es möglich, dass die PEF-Anwendung die reversible Ausbildung von Poren in der Zellmembran der Mikroorganismen bewirkt. Durch diese Poration könne der Stofftransport durch die Membran beschleunigt werden.

Ziel des Forschungsprojektes war die Untersuchung möglicher Effekte von PEF-Behandlungen unterschiedlicher Intensität auf Hefepopulationen während der Hefepropagation und Fermentation von Bierwürze, sowie die Untersuchung eines möglichen Einflusses auf die Bierqualität.

Dafür wurde in Kooperation mit der Firma KEA-TEC eine Hefevitalisierungsanlage für die Erzeugung gepulster, elektrischer Felder gebaut und in die bestehende Hefepropagationsanlage der VLB integriert.

Mit diesem wurden Hefepropagationen von *Saccharomyces Pastorianus ssp. Carlsbergensis*, Stamm W34/70, unter dem Einfluss von PEF-Behandlungen in unterschiedlicher Intensität vorgenommen und die Hefepopulationen auf ihre Viabilität und Vitalität untersucht.

Zudem wurden Erfahrungen mit dieser neuen Technologie bezüglich Ihrer Konformität mit den hygienischen Anforderungen der Lebensmittelproduktion gesammelt.

Zusammenfassend konnte eine Tendenz für einen positiven Effekt auf die Hefepopulationen aufgezeigt werden, da diese in Versuchen unter Einwirkung von Pulsen mit 100 V Ladespannung (respektive 1.260 V Pulsspannung) und einer Anwendungsfrequenz von 65 Hz insgesamt höhere Gesamt- und Lebendzellzahlen im Vergleich zu Nullproben ohne PEF-Behandlung erreichten. In Fermentationsexperimenten im Labormaßstab konnten ebenfalls positive Einflüsse auf die Lebendzellzahl festgestellt werden. Zudem wurden Hinweise auf hormetische Effekte gefunden.

Aus den gesammelten Erfahrungen konnten Verbesserungspotentiale herausgearbeitet und formuliert werden, um die Entwicklung der PEF-Technologie für die Anwendung im Lebensmittelbereich weiter voranzutreiben.

**Veröffentlichungen**

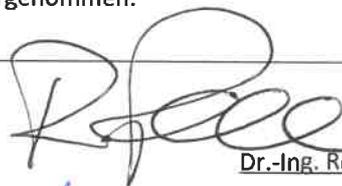
Es wurden noch keine Veröffentlichungen getätigt.

**Patentanmeldungen**

Im Rahmen dieses Projektes wurde keine Patentanmeldung vorgenommen.

29.11.2019

Datum



Dr.-Ing. Roland Pahl

Projektleiter



Rechtsverbindliche Unterschrift

## Sachbericht (Schlussbericht)

zum Verwendungsnachweis

zu FuE Vorhaben

<b>Reg.-Nr.:</b>	<b>49VF150042</b>
<b>FuE-Einrichtung:</b>	<b>Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.</b>
<b>Titel:</b>	<b>Einsatz der Elektroporation im Hefemanagement der Brauerei</b>
<b>Projektlaufzeit:</b>	<b>01.02.2017 – 31.05.2019</b>

Berlin, den 26.11.2019

Name und Telefonnummer des Projektleiters: Dr.-Ing. Roland Pahl (+49 30 450 80 238)



Firmenstempel

Versuchs- und Lehranstalt  
für Brauerei in Berlin (VLB) e.V.

Poststraße 13 / 13353 Berlin

Unterschrift des Projektleiters

Rechtsverbindliche Unterschrift

## Inhalt

1. Technisch-technologische Zielstellung des Vorhabens .....	4
2. Darstellung der erzielten Vorhabensergebnisse .....	5
3. Bewertung der erzielten Ergebnisse in Gegenüberstellung mit den Zielsetzungen des Antrages, Bezugnahme auf die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit .....	25
4. Darstellung der Innovationspotenziale und Applikationsmöglichkeiten .....	27
5. Angaben zu erworbenen bzw. angemeldeten Schutzrechten für Vorhabensergebnisse .....	27
6. Zusammenstellung aller erfolgten bzw. geplanten Veröffentlichungen .....	28
7. Literaturverzeichnis .....	29
8. Anhang .....	30

## 1. Technisch-technologische Zielstellung des Vorhabens

Das Hefemanagement in der Brauereiindustrie umfasst im Allgemeinen jegliche Schritte, welche die Hefe im Betriebsablauf betreffen<sup>1</sup>. In diesem Forschungsprojekt sollten mögliche positive Einflüsse auf die Anzucht (Propagation) der Hefe, die Fermentation der Bierwürze und Reifung des Jungbieres, sowie die Behandlung der geernteten Hefe vor dem erneuten Anstellen näher betrachtet werden. Ein gutes Hefemanagement stellt die Versorgung von Brauereihefe in ausreichender Quantität und Qualität sicher. Letztere zeichnet sich unter anderem durch einen niedrigen Totanteil und einer hohen Lebendzellzahl, sowie einem kräftigen Stoffwechsel aus. Dabei ist die Reinheit der Hefepopulation, also die Abwesenheit von nicht erwünschten Hefestämmen oder Bierschädlingen, Grundvoraussetzung. Eine hohe Hefequalität trägt zur vollständigen und raschen Gärung und Reifung des Bieres und so zu gesicherter Produktqualität und einer erhöhten Zeit- und Kosteneffizienz bei. Vor diesem Hintergrund sind alle Maßnahmen, die zu einer gesteigerten Hefeviabilität (Lebend-/Tot-Anteil) und -vitalität (Stoffwechselaktivität) beitragen, für die Brauereiindustrie als sehr vorteilhaft anzusehen, da negative Einflüsse auf die Produktqualität minimiert und die Effizienz der Produktion gesteigert wird. Eine effizientere Gärung und Reifung des Bieres kann sich folglich in geringeren Produktionskosten oder in der Steigerung der Produktionskapazitäten allgemein ausdrücken. In beiden Fällen bedeutet dies vor dem Hintergrund des Wettbewerbes und den Herausforderungen des Marktes einen Vorteil für die Brauerei.

In diesem Forschungsprojekt sollte die Anwendung gepulster Elektrischer Felder (Pulsed Electric Field - PEF) auf Propagations- und Fermentationsmedien, bzw. die darin enthaltenen Hefepopulationen untersucht werden. Bisherige Forschung anderer Institutionen lieferte Indizien für hormetische Effekte von PEF-Behandlungen mit niedrigen Pulsspannungen auf Mikroorganismen<sup>2 3 4</sup>. Das PEF stellt dabei einen leichten Stressor dar, auf den die Mikroorganismen mit einer Vitalitätssteigerung im Sinne eines gesteigerten Metabolismus reagieren. Des Weiteren wird die reversible Ausbildung von Poren in der Zellmembran der Mikroorganismen als Effekt genannt. Durch diese Poration sei ein beschleunigter Stofftransport durch die Membran möglich, was einen schnelleren Umsatz von Substrat oder einen allgemein beschleunigten Stoffwechsel bewirken könne.

Ziel des Forschungsprojektes war die Untersuchung möglicher Effekte von PEF-Behandlungen unterschiedlicher Intensität auf Hefepopulationen während der Hefepropagation und Fermentation von Bierwürze, sowie die Untersuchung eines möglichen Einflusses auf die Bierqualität. Versuche von HERTEL, DILLENBURGER & KERN lieferten erste Hinweise, dass eine Behandlung mit PEF einen positiven, vitalitätssteigernden Effekt auf die Hefepopulation haben kann<sup>3</sup>. Sie sind auch die Grundlage für das Patent und die Kooperation mit der Firma KEA-TEC, welche die KEA-Hefevitalisierungsanlage für dieses Forschungsprojekt konstruierte. Aufbauend darauf war es Ziel des Projektes, die Viabilität und Vitalität von Hefepopulationen unter dem Einfluss von PEF mittels verschiedener Methoden zu erfassen und auszuwerten, um zu überprüfen, ob sich positive oder negative Effekte aus der Behandlung mit PEF ergeben. Dabei sollte die Behandlung in verschiedenen Bereichen des Hefemanagements appliziert und überprüft werden. Daraus leiteten sich die verschiedenen Arbeitspakete ab, welche die Hefepropagation, die Fermentation von Voll- und High-Gravity-Würze, sowie die Revitalisierung von Erntehefe separat betrachten sollten.

---

<sup>1</sup> Annemüller, Gerolf; Manger, Hans-J.; Lietz, Peter: Die Hefe in der Brauerei. Hefemanagement, Kulturhefe - Hefereinzucht, Hefepropagation im Bierherstellungsprozess. 2., überarb. Aufl., 2008, Berlin: VLB Berlin (VLB-Fachbücher); S 13.

<sup>2</sup> Mattar, J.; Turk, M.; Nonus, M.; Lebovka, N. I.; Zakhem, H. El; Vorobiev, E.: Electro-stimulation of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts by Pulsed Electric Field and its effect on fermentation performance. 2013; online verfügbar unter <https://arxiv.org/vc/arxiv/papers/1304/1304.5681v1.pdf>; zuletzt aufgerufen am 11.09.2019, 10:50 Uhr.

<sup>3</sup> Hertel, M.; Dillenburg, M, Kern, M.: Elektrische Poration: Ein neuer Ansatz zur Hefevitalisierung. In: Brauwelt (5-6), 2011, S. 154–157.

<sup>4</sup> Mahnič-Kalamiza, S.; Vorobiev, E.; Miklavcic, D.: Electroporation in Food Processing and Biorefinery. The Journal of Membrane Biology, Volume 247, Issue 12, 2014, S. 1279-1304.

Zudem sollten erste Erfahrungen mit der PEF-Technologie – auch vor dem Hintergrund neuartiger Bauteile in der Anlage – gesammelt werden, um Stärken und Schwächen der Technologie zu identifizieren und mögliche Lösungen zu formulieren.

## 2. Darstellung der erzielten Vorhabensergebnisse

### AP 1: Versuchsplanung

Die Pilotanlage wurde von der Firma KEA-TEC erfolgreich konstruiert. Die Konstruktion und Auslieferung verzögerte sich jedoch. Die Verzögerung in der Auslieferung war auf die mangelnde Verfügbarkeit wichtiger elektrischer Bauteile zurückzuführen. Die Implementierung der PEF-Anlage konnte deshalb erst verzögert beginnen.

### AP 2: Implementierung des Versuchsaufbaus in der Brauerei

Der Umzug der VLB in einen Neubau und Komplikationen bei der Inbetriebnahme des neuen Technikums behinderten wiederholt den routinemäßigen Betrieb der Anlage und die zeitplanmäßige Durchführung der Versuche. Die Pulsed-Electric-Field-Anlage (PEF-Anlage) musste zudem vom ersten bis zum dritten Quartal 2018 aufgrund während des Betriebes aufgetretener Schäden optimiert und teilweise vom Hersteller repariert werden. Ab Oktober 2018 stand die Anlage innerhalb der notwendigen Parameter dann wieder voll zur Verfügung. Es erfolgte eine weitere Überarbeitung im Februar 2019, bei der die Halterungen der Elektroden im Rahmen einer Instandhaltungsmaßnahme ausgetauscht und angepasst wurden, um diese robuster und verschleißfester auszuführen und so einem Ausfall der Anlage entgegenzuwirken. Der technische Aufbau ist in Abbildung 1 abgebildet.

Aufgrund der maschinentechnischen Entwicklungen wurde das AP 2 ab Oktober 2018 in vollem Umfang weiterbearbeitet. Das AP umfasste auch den Test verschiedener PEF-Einstellungen und ihre Evaluation, welche für die folgenden AP wesentlich waren. Bei der Implementierung ergaben sich verschiedene, für ein FuE-Vorhaben typische Probleme und Komplikationen, welche jedoch schließlich gelöst werden konnten.

### Allgemeine Anpassungen

In Folge zu starker Belüftung des Mediums sowie steigender Temperaturen im System trat eine starke Schaumbildung auf, welche zum Übersäumen führte. Dadurch resultierten ein Strömungsabriss der Umwälzpumpe und eine daraus resultierende Versuchsunterbrechung. Durch Verlängerung der Belüftungsintervalle, der Optimierung der Kühlung und dem Aufbau eines konstanten Innendrucks, konnte dieses Problem abgestellt werden.

Im Projektverlauf traten Kontaminationen auf, dessen Ursache in der anfangs zu geringen Reinigbarkeit der PEF-Anlage lag, wodurch Spülschatten verursacht wurden (siehe Abbildung 2). Durch eine Überarbeitung der Dichtungsgestaltung, Intensivierung der Reinigung, Optimierung der Armaturen, sowie der Anwendung einer Pasteurisation mittels Heißdampf anstelle von Heißwasser konnten diese Kontaminationsherde beseitigt werden.

Mit dem Ziel einer Verkürzung der Dauer für einen Propagationszyklus wurde die Verwendung von Trockenhefe als Anstellhefe erprobt. Es konnten so reproduzierbare und vergleichbare Ausgangszellzahlen von ca.  $15 \times 10^6$  Zellen / ml ( $\pm 2 \times 10^6$  Zellen / ml) für die Versuche realisiert werden.

Nach einigen Propagationsversuchen ohne PEF wurden der Umfang der Analytik, die Häufigkeit und der Zeitpunkt der Probenahme evaluiert. Es zeigte sich, dass der Eintritt der Hefepopulation in die exponentielle Phase während der Nacht erfolgte und ihr Verlauf nicht beobachtet werden konnte. Um die Aussagekraft der Messwerte zu erhöhen, wurden der Zeitpunkt des Versuchsbeginns sowie die Intervalle der Probenahmen angepasst und Letztere intensiviert.

## Untersuchung von Korrosionserscheinungen

Des Weiteren zeigte sich nach den ersten Versuchen mit PEF eine ausgeprägte Korrosion an den Elektrodenoberflächen (Abbildung 3), welche detailliert untersucht wurden. Es wurden Versuche mit Wasser und Bierwürze durchgeführt, um einen Einfluss der Bierwürze und ihrer Inhaltsstoffe auszuschließen. Zudem wurde untersucht, ob es sich bei den Belägen um angebrannte oder karamellisierte Würzeinhaltsstoffe handelte, da durch die hohen Spannungen ein Auftreten hoher Temperaturen an den Elektrodenoberflächen nicht auszuschließen ist. Abbildung 4 zeigt den Belag an einer Elektrodenoberfläche, welcher sich während eines Versuches bei ca. 3 kV gebildet hatte und für eine Untersuchung isoliert wurde. Er unterscheidet sich in der Farbe und seiner Verteilung auf der Elektrode von jenem der gegenüberliegenden Elektrode (vgl. Abbildung 5).

Abbildung 6 zeigt eine Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme (REM) dieses Belages. Diese wurde mit einem REM der Fa. JEOL, Typ JSM-6610LV, aufgenommen, welches im Rahmen einer Fördermaßnahme für wissenschaftlich-technische Infrastruktur mit dem Projekttitel „REM/EDX-System (Reg.-Nr. 49IZ130010)“ angeschafft wurde. Der Belag scheint tendenziell eher eine kristalline Struktur aufzuweisen, was für anorganisches Material spricht. Für die Analyse wurde dieser Belag gewählt, da er sich vergleichsweise gut und für die Analyse in ausreichender Menge von der Elektrode separieren ließ. Zusätzlich wurde ein EDX-Element-Spektrum (Fa. Bruker; Typ Nano XFlash Detector 410-M) erstellt, welches in Abbildung 7 dargestellt ist. Die zugehörige Verteilung der detektierten, mengenmäßig relevantesten Elemente zeigt Tabelle 1. Das Spektrum zeigt unter anderem Peaks von Kohlenstoff, Sauerstoff, Phosphor, Chrom und Eisen. Unter Berücksichtigung der prozentualen Anteile der Verteilung der Elemente zeigt sich, dass die Hauptelemente Kohlenstoff und Sauerstoff sind, was tendenziell auf überwiegend organisches Material hindeutet. Dieses könnte von der in dem Versuch verwendeten Propagationswürze stammen. Es ist denkbar, dass sich die Elektrodenoberfläche durch den pulsierenden Stromfluss mit hoher Spannung punktuell stark erwärmt, was zu einer Denaturierung der Würzeinhaltsstoffe und somit einer Belagbildung führen kann. Das Aussehen des Belags in Hinsicht auf seine ungleichmäßige, punktuelle Verteilung auf der Oberfläche würde dafürsprechen. Die gräuliche Farbe hingegen kann als weniger typisch betrachtet werden, da hitzebedingte Ausfällungen von Bierwürze oder karamellisierte Zucker eher eine bräunliche Farbe aufweisen. Außerdem findet sich diese Art des Belags nicht auf der gegenüberliegenden Elektrode (vgl. Abbildung 4 & Abbildung 5). Obwohl Phosphor auch in organischem Material vorkommt, ist sein hoher Anteil auffällig. Da für die Herstellung der Propagationswürze Phosphorsäure zum Senken des pH-Wertes verwendet wird, ist es grundsätzlich möglich, dass die Phosphatanionen der Säure mit organischem Material reagieren, sich im Belag niederschlagen und hier detektiert werden. Die Elemente Chrom und Eisen scheinen prozentual zwar nur als Minor Komponente vorzukommen, ihre Anwesenheit in diesen Mengen deutet aber auf einen nicht geringfügig metallischen Anteil im Belag hin. Dieser könnte von den Elektroden stammen, da Eisen Hauptbestandteil von Stahl ist und Chrom in Legierungen von V4A-Stählen verwendet wird. Die Relation von Chrom zu Eisen ist jedoch auffällig, da Eisen als Hauptkomponente von Stahl dominieren sollte.

Des Weiteren wurden die Lade- und Pulsspannungen variiert, um zu überprüfen, ob die Korrosion erst ab einer gewissen Spannung auftritt. Es zeigte sich, dass diese bereits nach kürzester Zeit auftritt und sich mit steigender Pulsspannung intensiviert. In diesem Zusammenhang wurden auch verschiedene Elektroden-Werkstoffe getestet. Auch die Verwendung von sehr korrosionsbeständigen Werkstoffen wie V4A-Stahl zeigte keine nennenswerte Besserung. Ein erster Versuch mit Graphitelektroden verlief bereits vielversprechend. Jedoch müssen für die Implementierung dieser zusätzliche Elektrodenhalterungen vom Hersteller konstruiert werden, um ein Brechen des Graphits beim Ein- und Ausbau, sowie durch die Ausdehnung der Metallhalterung beim Dämpfen zu verhindern. Weitere, widerstandsfähige Legierungen

scheinen zu existieren und könnten ebenfalls Einsatz finden <sup>5</sup>.

Durch die häufige Öffnung des Reaktors und dem Ausbau der Elektroden zur Dokumentation der Korrosion sowie der Reinigung der Elektroden brachen die Elektrodenhalterungen, welche sodann zügig ausgetauscht werden mussten. Es wird vermutet, dass die Korrosion auch zum Verschleiß dieser Kleinbauteile beiträgt. Eine Schwermetallanalyse mittels ICP-MS (nach DIN EN ISO 17294-2 (E 29) 2005-02) von Wasser vor und nach einer 62-stündigen Behandlung mit PEF zeigte eine Verzehnfachung der Chrom- und Nickelkonzentrationen, sowie eine Vervierfachung der Eisenkonzentrationen (siehe Tabelle 2).

Die Belagbildung – welche wahrscheinlich auf Korrosion zurückzuführen ist – und die damit verbundene Migration von Schwermetallen in das Medium stellt für die Anwendung im Lebensmittelbereich grundsätzlich ein Problem dar, welches für die Anwendung in der Praxis näher betrachtet und bewertet werden muss. Zudem besteht die Vermutung, dass sich eine Korrosion der Oberflächen auf den Gesamtwiderstand und somit auf die elektrische Feldstärke auswirken könnte. Inwiefern dies für die Versuche relevant ist, konnte nicht abschließend beurteilt werden.

Grundsätzlich wird auch in der Literatur von elektrochemischen Reaktionen an den Elektrodenoberflächen sowie von der Migration von Metallionen berichtet <sup>6 7 8</sup>. Dabei scheinen auch die Form sowie die Weite der Pulse einen Einfluss darauf zu haben <sup>9</sup>. Für ein potentiell **Folgeprojekt** kann das Ziel formuliert werden, weitere Werkstoffe zu testen und zu bewerten, um die Korrosion und somit die Wartungszyklen sowie einen Schwermetalleintrag in das Medium zu minimieren.

### **Leckagen, Wartungsaufwand und Reinigung**

Nach Aus- und Einbau der Reaktorteile kam es wiederholt zu Leckagen. Dabei stellen sich Form und Dicke der ursprünglichen Dichtungen als suboptimal heraus, sodass schon ein leicht unpassender Sitz oder eine zu leichte Verschraubung eine Undichtigkeit hervorrief. In Kooperation mit dem Hersteller wurden die Dichtungen angepasst, was die Häufigkeit der Leckagen verringerte, sie jedoch nicht komplett verhinderte (siehe Abbildung 8). Da austretendes Produkt ein Nährboden für Mikroorganismen darstellt, müssen Leckagen verhindert werden. Hierfür würde sich beispielsweise die Gestaltung des Übergangs von Reaktorhülle zu Rohrleitungen als Flanschverbindung anbieten, da es für Flansche einheitliche Dichtungen gibt und sie sich durch eine hohe Dichtigkeit und Beständigkeit auszeichnet.

Ein häufiges Öffnen zwecks Kontrolle und Reinigung der Elektroden kann insgesamt als kritisch bewertet werden, da es das Risiko für die Entstehung von Leckagen erhöht. Die Erhöhung der Robustheit der Konstruktion bezüglich Dichtigkeit und Geschlossenheit des Systems lässt sich folglich als weiteres Ziel für ein potentiell **Folgeprojekt** formulieren. Ein hohes Niveau an Reinigbarkeit und Hygiene sowie ein geringer Wartungsaufwand wären Voraussetzungen für die Marktreife der Technologie für den Einsatz in der Lebensmittelproduktion.

Nach einigen Anpassungen konnte die Qualität der Reinigung und Desinfektion (R&D) der Anlage auf ein Maximum erhöht werden. Trotz Bemühungen, den Arbeitsaufwand für diese Vor- und Nachbereitungen

---

<sup>5</sup> Góngora-Nieto, M. M.; Sepúlveda, D. R.; Pedrow, P.; Barbosa-Cánovas, G. V.; Swanson, B. G.: Food Processing by Pulsed Electric Fields: Treatment Delivery, Inactivation Level, and Regulatory Aspects. In: LWT - Food Science and Technology, Volume 35, Issue 5, 2002, Seiten: 375-388

<sup>6</sup> Gad, A.; Jayaram, S.: Electrode Material Migration During Pulsed Electric Field (PEF) Treatment. Proc. ESA Annual Meeting on Electrostatics, 2011, online verfügbar unter: [https://www.researchgate.net/profile/S\\_Jayaram/publication/267219343\\_Electrode\\_Material\\_Migration\\_During\\_Pulsed\\_Electric\\_Field\\_PEF\\_Treatment/links/571b82d508ae408367bd6f9f.pdf](https://www.researchgate.net/profile/S_Jayaram/publication/267219343_Electrode_Material_Migration_During_Pulsed_Electric_Field_PEF_Treatment/links/571b82d508ae408367bd6f9f.pdf); zuletzt aufgerufen am 23.10.2019

<sup>7</sup> Pataro, G.; Donsi, G.; Ferrari, G.: Modeling of Electrochemical Reactions During Pulsed Electric Field Treatment. In: Miklavcic (Hg.): Handbook of Electroporation, Springer International Publishing, Cham, 2018, S. 1059 – 1089

<sup>8</sup> Roodenburg, B.; Morren, J.; Berg, H.; De Haan, S.: Metal release in a stainless steel Pulsed Electric Field (PEF) system Part I. Effect of different pulse shapes; theory and experimental method. In: Innovative Food Science & Emerging Technologies, Volume 6, Issue 3, 2005, S. 327-336

<sup>9</sup> Morren, J.; Roodenburg, B.; De Haan, S.: Electrochemical reactions and electrode corrosion in pulsed electric field (PEF) treatment chambers. In: Innovative Food Science & Emerging Technologies, Volume 4, Issue 3, 2003, S. 285–295.

der Versuche zu verringern, blieb der Aufwand hoch, da der Umbau der Anlage sowie die einzelnen Reinigungsschritte selbst nicht automatisiert werden konnten.

### **Ermittlung der Pulsspannung in Versuchsmedium**

Eine zusätzliche Aufgabe bestand in der experimentellen Herleitung der durch die PEF-Anlage in Bierwürze erzeugten Pulsspannung. Gemäß den physikalischen Gesetzen der Elektrotechnik gilt Formel 1:

$$U = R * I$$

Formel 1: Zusammenhang zwischen den Größen Spannung (U), Widerstand (R) und Stromstärke (I)

In der Pilotanlage kann lediglich die Ladespannung des Kondensators eingestellt werden, welche im Folgenden auf einen Pulstrafo übertragen, in Hochspannung umgewandelt und in das Versuchsmedium geleitet wird. Dabei ist die tatsächliche Höhe der (Hoch-)Spannung vom Widerstand des gesamten Systems abhängig. Die einzige variable Komponente für den Widerstand ist hier das Versuchsmedium selbst, da es, je nach Zusammensetzung, eine unterschiedliche elektrische Leitfähigkeit aufweisen kann, welche wiederum den Widerstand beeinflusst. Aus der Gleichung ist ersichtlich, dass sich mit verändertem Widerstand auch die Spannung ändert. Auf den Versuchsaufbau übertragen bedeutet dies beispielsweise, dass Vollbierwürze aufgrund ihrer gelösten Stoffe im Vergleich zu Wasser eine höhere Leitfähigkeit und somit einen geringeren Widerstand aufweist. Daraus resultiert wiederum ein höherer Stromfluss (Stromstärke I), aber eine geringere Spannung (U).

Die Pulsspannung  $U$  und die damit verbundene elektrische Feldstärke  $E$  ist jedoch eine wesentliche Größe des PEF. Letztere ergibt sich aus Formel 2 <sup>10</sup>:

$$E = \frac{U}{d}$$

Formel 2: Berechnung der elektrischen Feldstärke  $E$  anhand der Pulsspannung  $U$  und dem Elektrodenabstand  $d$

Aufgrund dieser Abhängigkeit wurde initiativ überprüft, welche Pulsspannungen sich aus den eingestellten Ladespannungen in dem verwendeten Versuchsmedium ergeben. Dabei wurden Ladespannungen zwischen 50 V und 350 V eingestellt und die Pulsspannung mittels eines externen Oszillometers (Fa. Pico Technologies, Typ: PicoScope 2000) gemessen. Abbildung 9 zeigt die Gegenüberstellung von eingestellter Lade- und erzielter Pulsspannung in Bierwürze mit 11,5 ° P und ca.  $15 \times 10^6$  Hefezellen. Die gemessenen Pulsspannungen liegen zwischen 660 V und 4.360 V. Daraus ergeben sich elektrische Feldstärken zwischen 220 V und 1.453 V (siehe Abbildung 10). Höhere Pulsspannungen wären mit der Einstellung höherer Ladespannungen möglich. Die linear ansteigende Pulsspannung ist typisch und plausibel. Kleinere Abweichungen von einer idealen, linearen Linie sind in kleineren Ungenauigkeiten beim Ablesen des Oszillogramms begründet.

## **AP 3: Propagation und Fermentation in Vollwürze ohne PEF**

### **Material und Methoden**

#### **Propagationsanlage**

Die Hefepropagation wurde in einem Propagator der Fa. Esau & Hueber durchgeführt. Dieser wurde mit der PEF-Anlage verbunden (nachfolgend als Propagationsanlage bezeichnet). Die Verrohrung erfolgte mit einem Durchmesser von DN 25 und für die Übergänge wurden die brauereitypischen Milchrohrverschraubungen gewählt. Eine Pumpe (Fa. Hilge, Typ Hygiana S-1/2) wurde zwischen Propagatorauslauf und PEF-Anlagen-Einlauf installiert. Die Pumpe wurde mit einem Frequenzumwandler (Fa. Grundfoss) gesteuert.

<sup>10</sup> Raso, J.; Frey, W.; Ferrari, G.; Pataro, G.; Knorr, D.; Teissie, J.; Miklavčič, D.: Recommendations guidelines on the key information to be reported in studies of application of PEF technology in food and biotechnological processes. Innovative Food Science & Emerging Technologies, Volume 37, 2016, S. 312–321

Die Pumpeneinstellung wurde so gewählt, dass die Fließgeschwindigkeit des Mediums 0,98 m/s betrug (entspricht einem Volumenstrom von ca. 0,31 l/s).

Hinter dem Auslauf der PEF-Anlage wurde eine Sinterkerze zur Würzebelüftung integriert. Die Luftversorgung erfolgte über ein Sterilluftpaneel, welches mit kulinarischer Luft (ölfrei) des Hausanschlusses versorgt wurde. Die Luft wurde nochmals über einen Sterilluftfilter (Fa. Donaldson, Typ Ultrafilter P/SRFN 03/10) gefiltert und der Belüftungskerze zugeführt. Die Belüftungsintervalle wurden über ein zeitgeschaltetes Ventil und der Volumenstrom mittels eines Regelventils gesteuert. Nach der Belüftungsstrecke wurde die Würze wieder dem Propagator zugeführt.

Zur Temperaturmessung wurde ein Temperaturmessfühler an der Außenwandung des Bodens des Propagators angebracht und zur Umgebungsluft mit Isoliermaterial verkleidet. Der Messfühler wurde mit einem Kühlaggregat (Fa. Seibert GmbH Heidelberg, Typ Polaris Mini) verbunden, welches das Kühlwasser der Kühlflächen der Propagator-Ummantelung kühlte. Die Temperatur des Mediums wurde auf 20 °C festgelegt und konnte mit Abweichungen von  $\pm 0,5$  °C konstant gehalten werden. Des Weiteren verfügt die PEF-Anlage über einen Temperaturmessfühler, welcher hinter dem Auslauf der PEF-Einheit integriert ist, um eine etwaige Temperaturerhöhung des Mediums durch die PEF-Behandlung zu detektieren. Der Gesamtaufbau ist auf Abbildung 1 dargestellt.

### **Propagationsmedium**

Als Propagationsmedium wurde Bierwürze genutzt. Diese wurde mit Pilsener Malz bei einer Schüttung von 80 kg/hl ( $\cong 11,5$  % Stammwürze) und einer Hopfengabe entsprechend 28 mg Iso-Humulon/l in fertiger Würze im Technikums-Sudhaus der VLB hergestellt. Diese lagerte bis zum Einsatz kalt bei 0 °C in 50-Liter-fassenden KEG-Fässern.

### **Propagationshefe**

Als Propagationshefe wurde Trockenhefe der Fa. Fermentis genutzt. Es wurde *Saccharomyces Pastorianus ssp. Carlsbergensis*, Stamm W34/70 (Produktname „Saflager“) verwendet. Die Trockenhefe wurde vor der Zugabe zum Propagationsmedium entsprechend der Herstellerangaben mit verdünnter, steriler Bierwürze im Verhältnis 1:20 für eine Stunde rehydratisiert. Die Rehydratisierung erfolgte in einer Laborflasche, welche mit einem Aufsatz für Zuluft und einer Silikon-Schlauchverbindung für den Anschluss an eine DN 25 Milchrohrverschraubung versehen war. Diese wurde zuvor in einem Autoklav sterilisiert. Die Rehydratisierung erfolgte ohne zusätzliche Belüftung.

### **Vorbereitung und Durchführung der Versuchsreihen**

Vor jeder Versuchsreihe wurde die Propagationsanlage mit saurem Desinfektionsmittel behandelt, mit VE-Wasser gespült und mit Dampf sterilisiert. Das Sterilluftpaneel und die Luftschläuche wurden ebenfalls mit Dampf sterilisiert. Anschließend wurde die Propagationswürze mittels Sterilluft über eine zuvor pasteurisierte Schlauchverbindung samt Zapfkopf vom KEG-Fass in den Propagator überführt. Für die Versuchsreihen wurde stets der Inhalt eines ganzen Fasses (50 Liter Würze) verwendet, um eine ausreichende Füllhöhe für den Einsatz der Mantelkühlung zu erreichen. Die noch kalte Würze wurde für fünf Minuten umgepumpt, um die Propagationsanlage abzukühlen und die Würze auf Zieltemperatur von 20 °C zu erwärmen. Anschließend wurde die rehydratisierte Hefesuspension mittels Sterilluft aus der Labor-Flasche in den Propagator überführt und für fünf Minuten mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,24 m/s zwecks Homogenisierung umgepumpt. Währenddessen wurde das Medium initiativ mit einem Luftvolumenstrom von 300 Normliter/min belüftet. Anschließend wurde die Pumpenleistung auf eine Fließgeschwindigkeit von 1 m/s reduziert, die Nullprobe entnommen und die PEF-Behandlung gestartet. Die Belüftung erfolgte daraufhin alle 30 min für einen Zeitraum von 5 min. Diese Einstellung wurde über die Experimente

hinweg nicht verändert. Der Luftvolumenstrom von 300 Normlitern/min wurde ebenfalls nicht verändert.

### **Vorbereitung und Durchführung der Versuche mit Fermentern im Labormaßstab**

In Anlehnung an die Versuche von HERTEL, DILLENBURGER UND KERN<sup>11</sup>, sowie MATTAR, TURK, ET AL<sup>12</sup> wurde ein kleiner Teil der Propagationsflüssigkeit in kleine Fermenter überführt und eine Fermentation durchgeführt. Autoklavierte Miniaturfermenter, bestehend aus Laborflaschen mit integriertem Schlauch für Probenahme, Abluft-Verbindung und Rührfisch, wurden ca. 1,25 h nach Starten der Propagation (drei PEF-Behandlungen) mit ca. 1.800 ml Propagationsmedium befüllt und bei 20 °C (klimatisiertes Labor) und 14 °C (klimatisierte Kammer) gelagert. Um einen Einfluss unterschiedlichen Absetzverhaltens der Hefe bei verschiedenen Temperaturen zu minimieren, wurden die Fermenter auf Magnetrührern platziert und bei 100 U/min gerührt. Analog zu den Zeitpunkten der Probenahme bei den Propagationsversuchen wurden Proben mittels steriler Einwegspritze aus den Fermentern entnommen. Dafür wurde die Spritze über eine LUER-Lock-Verbindung an ein selbstschließendes Septum am Schlauchende geschraubt und die Verbindung mit ca. 50 ml Probe vorgespült. Vor und nach Probenahme wurde das Septum mit Spiritus gereinigt und desinfiziert.

### **Mikrobiologische und chemisch-technische Untersuchungen**

#### **Probenahme- und Analysenplan**

Den Probenahme- und Analysenplan zeigt Tabelle 3.

#### **Messung der Gesamtzellzahl**

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde mittels eines Coulter Counters (Fa. Beckmann, Typ Multisizer 3, Software: Beckmann Coulter Multisizer 3, Version 3.53) vorgenommen. Dafür wurden, in Abhängigkeit der zu erwartenden Zellkonzentration, 25 bzw. 50 µl Probe in 10 ml Isotonflüssigkeit des Herstellers verdünnt. Das gemessene Probenvolumen betrug 50 µl verdünnter Probe. Die Auswertung erfolgte manuell durch Integration der auftretenden Signale (Peaks), die in einem Größenbereich von ca. 2,4 bis maximal 15 µm Partikelgröße lagen.

Zusätzlich wurde die Gesamtzellzahl mittels flusscytometrischer Messung erhoben. Für diese wurde ein Durchflusscytometer (Flowcytometer, FACS) der Fa. Sysmex (Typ Cube 8, Software Cyflow Cube 8, Version 1.6.4.10) verwendet. Die Auswertung erfolgte auf Basis einer Konfiguration, welche bei Inbetriebnahme mit dem Hersteller festgelegt wurde. Diese umfasst, neben den für die Gesamtzellzahl relevanten Größenbereich der Partikel, auch die Parameter für die Auswertung der Fluoreszenzsignale. Die Proben wurden vor der Messung mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung im Verhältnis 1:100 verdünnt. Für die Gesamtzellzahl wurden 100.000 Partikel (Events), im für Hefezellen typischen Größenbereich, gemessen und das dafür benötigte Probenvolumen ausgewertet.

#### **Bestimmung der Viabilität und Vitalität**

Viabilität und Vitalität der Hefepopulationen wurden mittels kombinierter Färbung (Kit „Yeast Control™ - Viability“, Fa. Sysmex) und Messung im Durchflusscytometer (siehe Gesamtzellzahl) bestimmt. Dafür wurden die Proben nach einer 1:100-Verdünnung mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung zuerst für 10 Minuten mit einer Fluoreszein-Diacetat-Lösung (zur Prüfung auf Stoffwechselaktivität) gefärbt bzw. behandelt. Anschließend erfolgte eine Färbung mit einer Propidiumiodid-Lösung für die Lebend-Tot-Differenzierung, sowie die Messung der von den umgesetzten und interkalierten Farbstoffen emittierten Fluoreszenzsignale im Flowcytometer. Die Einstellungen für die Größenauswahl und die Auswertung der Fluoreszenzsignale basierte auf der bereits erwähnten Konfiguration, welche in-house mit dem Hersteller für die Nutzung des

---

<sup>11</sup> Hertel, M.; Dillenburger, M, Kern, M., 2011, S. 154–157.

<sup>12</sup> Mattar, J.; Turk, M. et al, 2013, o.S.

Farbstoff-Kits abgestimmt wurde. Auch hier wurden 100.000 Events im hinterlegten Größenbereich ausgewertet.

Es wurde zusätzlich die Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) bestimmt. Dafür wurden verschiedene Verdünnungen der Probe auf YED-Agar (5 % Glucose, 2 % Hefeextrakt, 1,5 % Agar, pH 5,5) ausplattiert, bei 30 °C für 48 h inkubiert und anschließend ausgezählt.

### **Chemisch technische Analysen**

Für die tägliche Kontrolle des Extraktabbaus wurde der scheinbare Extrakt mittels Handbiegeschwinger (Fa. Mettler Toledo, Typ: Densito 30 PX) bestimmt. Des Weiteren wurde der pH-Wert mittels pH-Meter (Fa. Mettler Toledo, Typ: FE 20) gemessen. Zuvor wurden ca. 200 ml Probe mittels Faltenfilter filtriert (qualitativ, Porengröße 5-8 µm; Fa. Th. Geyer)

Für die Analyse der vergärbaren Zucker wurden die Proben über Spritzenvorsatzfilter (Fa. Appli Chrom, 25 mm, Cellulose Mixed Ester (CME) mit GMF, Porengröße 0,22 µm) in HPLC Vials überführt und mittels HPLC aufgetrennt und quantifiziert (isokratische Elution, UV/RI-Detektion).

### **Ergebnisse**

Die Ergebnisse sollen zwecks Anschaulichkeit zusammen mit jenen des Arbeitspaketes 4 (PEF-Behandlung) zusammen betrachtet werden.

## **AP 4: Propagation und Fermentation in Vollwürze mit PEF**

### **Material und Methoden**

Versuchsaufbau, -durchführung sowie Messungen wurden wie bereits in AP 3 geschildert durchgeführt. Da in diesem Arbeitspaket die Pulsed-Electric-Field-Behandlung mit dem Ziel der Elektroporation und Hefevitalisierung vorgenommen wurde, soll diese nachfolgend beschrieben werden.

Tabelle 4 listet alle relevanten Informationen zur PEF-Anlage sowie Informationen zum Versuchsmedium auf und orientiert sich dabei an den Empfehlungen von RASO, FREY ET AL <sup>13</sup>. Abbildung 11 zeigt die Außenansicht des PEF-Reaktors. In Abbildung 12 ist der Querschnitt des Reaktors mit dem Elektrodenpaar dargestellt.

Die PEF-Behandlung (treatment) des Propagationsmediums wurde nicht durchgängig, sondern in Intervallen vorgenommen. Das Intervall bestand aus einer 4,5-minütigen Behandlung und 30-minütiger Pause zwischen den Behandlungen. Die Gestaltung des Intervalls erfolgte in grober Anlehnung an die Vorversuche von HERTEL, DILLENBURGER UND KERN <sup>14</sup>, um einen ausreichenden Energieeintrag in das Medium zu ermöglichen.

Tabelle 5 zeigt die für die Versuchsreihen angewandten Ladespannungen und die mittels Oszilloskop (Fa. Pico Technologies, Typ: PicoScope 2000) gemessenen Pulsspannungen im Reaktor zu Beginn von Versuchsreihen. Des Weiteren enthält sie die entsprechende Frequenz der Pulse sowie die elektrische Feldstärke.

Die für die Experimente angewendeten elektrischen Feldstärken von 0,22 bis 1,45 kV wurden gewählt, da sie laut Literatur mild genug sind, um einen Stress auf Mikroorganismen auszuüben und Elektroporation

---

<sup>13</sup> Raso, J.; Frey, W. et al, 2016, S. 312–321

<sup>14</sup> Hertel, M.; Dillenburger, M, Kern, M., 2011, S. 154–157.

hervorzurufen, ohne jedoch eine irreversibel schädliche Wirkung zu entfalten<sup>15 16 17</sup>.

Obwohl RASO, FREY ET AL der parallelen Elektrodenkonfiguration grundlegend homogene Feldstärken zuschreiben<sup>18 13</sup>, weisen DONSI, FERRARI & PATARO auf Effekte an den Grenzflächen hin, welche die Homogenität des elektrischen Feldes stören können<sup>19</sup>. Da es sich bei dieser Elektrodenkonfiguration um runde Elektroden handelt, ist eine gewisse Heterogenität im elektrischen Feld durchaus denkbar, was auch Abbildung 13 verdeutlichen soll.

Es sei hervorzuheben, dass sich die Pulsspannung und somit die elektrische Feldstärke im Verlauf der eines Versuches verändert, da durch den Metabolismus der Hefepopulation lösliche Stoffe (Zucker, Aminosäuren, weitere Nährstoffe) metabolisiert und nur teilweise wieder lösliche Stoffe an das Medium abgegeben werden. Dies führt zu einer Veränderung der elektrischen Leitfähigkeit und somit des elektrischen Widerstandes und der Pulsspannung. Da die elektrische Feldstärke direkt von Letzterer abhängig ist, verändert sich auch diese. Die gleichzeitige Bildung von Biomasse (Hefezellwachstum und -vermehrung) beeinflusst diese Größen zudem. Um die Veränderung der Leitfähigkeit mit fortschreitender Propagation aufzuzeichnen, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die Leitfähigkeit des Versuchsmediums mit einem Leitfähigkeitsmessgerät (Fa. WTW, Typ pH/Cond 340i), sowie der scheinbare Extrakt gemessen. Zudem wurde die Veränderung der Pulsspannung für verschiedene Ladespannungen und Zeitpunkte ermittelt.

## Ergebnisse und Diskussion

### Veränderung der Leitfähigkeit, der Pulsspannung und der elektrischen Feldstärke im Verlauf einer Propagation

Abbildung 14 zeigt Veränderungen der Leitfähigkeit und des scheinbaren Extraktes im Verlauf der Propagation. Sie zeigt deutlich die Abnahme der elektrischen Leitfähigkeit von anfänglich 1,81 auf 1,32 mS/cm, was

27 % entspricht. Dies zeigt sich auch in der veränderten Pulsspannung und somit der elektrischen Feldstärke. Sie wurde über den Verlauf der Propagation mittels Oszillometrie erfasst und ist exemplarisch für einen Versuch mit 100 V Ladespannung in Abbildung 15 aufgetragen. Sie steigt in diesem Versuch von anfänglich ca. 430 auf ca. 500 V/cm, was einer Erhöhung von ca. 16 % entspricht. Dabei verhalten sich die Pulsspannungen und somit die elektrischen Feldstärken für verschiedene Ladespannungen ähnlich, was Abbildung 16 zeigt. Folglich intensiviert sich die Behandlung der Hefezellen im Laufe der Propagation. Es ist denkbar, dass eine zu Beginn gewählte Ladespannung mit entsprechenden elektrischen Feldstärken durch die Veränderung der elektrischen Leitfähigkeit in einem solchen Maße zunehmen könnte, dass sie der Hefepopulation schadet, da eine irreversible Porenbildung hervorgerufen wird oder der induzierte Stress zu stark ist. Es ist jedoch auch ein positiver Effekt denkbar. Da Hefezellen zu Beginn einer Propagation oder Fermentation initiativ einem Stress ausgesetzt sind, da sie sich an veränderte Umweltbedingungen wie osmotischen Druck, hydrostatischen Druck und den pH-Wert anpassen müssen, kann das Applizieren eines zusätzlichen Stresses durch moderate pulsierte elektrische Felder möglicherweise hemmend wirken. Die Zunahme der elektrischen Feldstärke ist maßgeblich vom Fortschritt des Substratabbaus und somit vom Zustand der Hefepopulation bzw. ihrer Wachstumsphase abhängig. Der Substratabbau ist zu

<sup>15</sup> Yarmush, M.; Golberg, A.; Sersa, G.; Kotnik, T.; Miklavcic, D.: Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges; Annual Review of Biomedical Engineering, Volume 16, Issue 1, 2014, S. 295-320.

<sup>16</sup> Kotnik, T.; Kramar, P.; Pucihar, G.; Miklavcic, D.; Tarek, M.: Cell membrane electroporation-Part 1: The phenomenon; IEEE Electrical Insulation Magazine, Volume 28, Issue 5, 2012, S. 14-23.

<sup>17</sup> Mahnič-Kalamiza, S.; Vorobiev, E.; Miklavcic, D., 2014, S. 1279-1304.

<sup>18</sup> Raso, J.; Frey, W. et al, 2016, S. 312-321

<sup>19</sup> Donsi, G.; Ferrari, G.; Pataro, G.: Inactivation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields in a batch treatment chamber: The effect of electric field unevenness and initial cell concentration; Journal of Food Engineering, Volume 78, Issue 3, 2007, S. 784-792.

Beginn gering (Lag-Phase) und intensiviert sich erst bei Erreichen der exponentiellen Phase der Hefepopulation, also in einer Phase, in welcher die Hefezellen eine geringere Empfindlichkeit gegenüber Stressoren aufweisen können. Erst mit Eintreten des beschleunigten Substratabbaus verändert sich die Leitfähigkeit des Mediums und somit auch die elektrische Feldstärke. Letztere intensiviert sich also erst bei Erreichen der logarithmischen Phase. Dies kann positiv gewertet werden, da die Intensivierung erst bei Erreichen einer weniger empfindlichen Phase des Populationswachstums auftritt. Inwiefern diese diskutierten Effekte einen tatsächlichen Einfluss auf die untersuchten Hefepopulationen hatten, konnte im Projekt nicht abschließend geklärt werden. Um die Pulsspannung und somit die elektrischen Feldstärken konstant zu halten, müsste die interne Spannungsmessung in Echtzeit aufgenommen, automatisiert ausgewertet und die Ladespannung angepasst werden. Dafür müsste die bestehende Anlage mit einem internen Oszilloskop, den benötigten Datenverbindungen, einer Steuerung und einem Regler für die Ladespannung nachgerüstet werden.

### **Propagation: Vergleich der Versuchsreihen mit PEF-Behandlungen unterschiedlicher Intensität**

#### **Einfluss auf die Zellzahl, sowie Viabilität der Hefepopulationen**

Für jene Versuche, welche in teils mehrfacher Wiederholung durchgeführt wurden, wird der Mittelwert angegeben, um die Übersichtlichkeit zu verbessern. Um die Streuung abzubilden, wurde für diese Versuche die Standardabweichung angegeben, auch wenn diese bei einer einfachen Wiederholung lediglich die Werte der beiden Einzelversuche abbildet. Bei den Versuchen in Einfachbestimmung wurde die natürliche Streuung der Populationsdynamiken und der Messmethoden durch die Standardabweichung aller Messwerte eines Zeitpunktes angegeben.

Die Gesamtzellzahl über den zeitlichen Verlauf der Propagationen für verschiedene PEF-Einstellungen sowie die Nullproben ohne PEF-Behandlung zeigt Abbildung 17. Aus den Zellzahlen zum Zeitpunkt 0 (Anstellen) ist ersichtlich, dass die initiativen Zellzahlen zu Beginn der Propagationen gleichmäßig auf ca.  $15 \times 10^6$  Zellen/ml ( $\pm 2 \times 10^6$ /ml) eingestellt wurden. Fast alle Zellzahlverläufe zeigen eine typische Entwicklung von Zellpopulationen: sie steigen nach einer Lag-Phase exponentiell an und stagnieren anschließend oder nehmen nach Erreichen eines Maximums ab. Die Abnahme kann durch die typische Agglomeration von untergärtigen Hefezellen erklärt werden. Da der Boden des Propagationstanks nicht zylindrokönisch sondern rund (Klörperboden) und die Umwälzung mittels Pumpe nur gering ist, kann ein Absetzen der agglomerierten Hefeverbände auf den Tankboden nicht ausgeschlossen werden. Diese wären somit nicht mehr im Medium suspendiert und können von den Messungen nicht erfasst werden. Die hohe Agglomerationsneigung des verwendeten Hefestammes W-34 / 70 (Angabe des Herstellers <sup>20</sup>) stützt diese These. Die Zellzahlen wurden durch die Propagation circa verzehnfacht. Für normale Vollwürze ohne Zusatz von Nährstoffen wird in der Literatur eine maximale Zellzahl von 80 - 100 Mio. Zellen/ml genannt <sup>21</sup>. Unter den hier gewählten Propagationsbedingungen wird dieser Wert weit übertroffen, was für den Versuchsaufbau spricht. Die Propagation bei 350 V Ladespannung wurde nach 38 h abgebrochen, da kein Zellwachstum und keine nennenswerte Substratabnahme messbar waren. Die beiden Versuche mit einer Behandlung von 250 V Ladespannung zeigen eine verlängerte Lag-Phase mit niedrigen Hefezellkonzentrationen und einen flachen Anstieg dieser in der exponentiellen Phase. Der verzögerte Beginn der exponentiellen Phase kann auf eine anfängliche Hemmung durch das PEF zurückzuführen sein. Nach einer Anpassung an die bestehenden Bedingungen erreichen die Zellkonzentrationen in beiden Versuchen jedoch ein Niveau, welches über dem der Nullproben liegt. Der Versuch mit einer PEF Behandlung bei 50 V Ladespannung ergab Zellkonzentrationen auf einem Niveau der beiden Nullproben. Unter Berücksichtigung der natürlichen

---

20 Produktdatenblatt SafLager W-34/70 der Fa. Fermentis, online verfügbar unter: <https://fermentis.com/wp-content/uploads/2018/03/SafLager-W-3470.pdf>; zuletzt eingesehen am 20.09.2019, 12:03 Uhr

21 Annemüller, Gerolf; Manger, Hans-J.; Lietz, Peter, 2008, S213.

Schwankungen von Hefepopulationen im Allgemeinen, sowie Schwankungen – hervorgerufen durch Schwächen des Versuchsaufbaus (Geometrie des Tankbodens, Abwesenheit von Rührwerken) und den zufälligen Fehlern der Messmethoden – können die Zellzahlkonzentrationen des 50-V-Versuches nicht von denen der Nullproben unterschieden werden. Die Versuche bei 100 und 150 V Ladespannung zeigen in der Tendenz höhere Zellzahlkonzentrationen als die Nullproben. Dabei liegen jene des 100-V-Versuches im Mittel über jenen des 150-V-Versuches. Bei Betrachtung ihrer Fehlerbalken ist jedoch festzustellen, dass sie sich überlappen und deshalb hier nur von einer Tendenz ausgegangen werden kann. Abbildung 18 zeigt den Anteil viabler Zellen (FACS) an der Gesamtpopulation über den Verlauf der Propagation hinweg. Trotz der Verwendung von Trockenhefe traten leichte Unterschiede in der anfänglichen Viabilität der Populationen auf ( $\Delta_{\max}$  14 % abs.). Diese können auf eine leichte Feuchtigkeitsaufnahme der Trockenhefe während der Lagerung zurückzuführen sein, da dies die Viabilität der Hefe stark beeinträchtigt. Möglicherweise bestanden auch Qualitätsunterschiede innerhalb einer Packung Trockenhefe, welche durch die geringe Entnahme von 50 g pro Versuch (Gesamtinhalt 500 g) besonders zur Wirkung kam. Es ist möglich, dass die Farbaufnahme der Zellen durch die nicht vollständige Rehydratisierung der Zellen beeinflusst sein kann. Dies kann sich negativ auf die Aufnahme des Farbstoffs auswirken und den Fehler der Messung erhöhen. Der Anteil ungefärbter Zellen im ausgewerteten Größenbereich lag zu diesem Zeitpunkt normalerweise zwischen 8 und 16 %, in Ausnahmefällen zwischen 5 und 24 %. Nach 13 h Propagationsdauer ist dieser ungefärbte Anteil jedoch mindestens halbiert, was an einer vollständigeren Rehydratisierung und einer beginnenden Zellvermehrung liegen kann, da durch letztere der Anteil an mitgezählten Trubpartikeln automatisch sinkt. Die anfänglich gemessene Viabilität kann folglich höher sein, als gemessen. Insgesamt sollten wenige Prozent Differenz in der anfänglichen Viabilität keine große Auswirkung auf die Vermehrungsdynamik haben, da eine Verdopplung der Zellzahl pro Generation die anfänglichen Unterschiede in der Lebenszellzahl nivelliert. Zudem gibt es einen gewissen Spielraum bei der Auswertung der Fluoreszenzsignale, welcher die Zuordnung von Signalen um 2- 3 % absolut für den Status „viabel“ oder „nicht-viabel“ beeinflussen kann. Für künftige Versuche soll dennoch eine gleichmäßigere anfängliche Hefeviabilität angestrebt werden.

Im Versuch mit 350 V Ladespannung verringerte sich der Anteil viabler Zellen von anfänglich 37 % rapide auf 3 %, was die unveränderte Zellkonzentration (siehe Abbildung 17) erklärt. Die Ursache für die Abnahme der Viabilität ist primär in der Stärke des applizierten elektrischen Feldes zu vermuten, da sowohl die anderen PEF-Parameter (Frequenz und Intervall), als auch die Propagationsbedingungen nicht verändert wurden. Die Propagationen, welche mit 250 V Ladespannung behandelt wurden, zeigen zu Beginn ebenfalls eine Abnahme der Viabilität, welche jedoch nach 13 h wieder auf das Ausgangsniveau ansteigt, um schließlich wieder leicht zu sinken. Im Vergleich zu den anderen Versuchen ist die Viabilität jedoch insgesamt auf einem niedrigen Niveau, welches für eine Hefepropagation zu gering ist, da ein möglichst hoher Anteil lebender Zellen angestrebt wird. Die Gesamtzellzahl nach 72 h, welche sich mit  $1,12 \times 10^8$  Zellen/ml im Mittel eigentlich auf dem Niveau der anderen Propagationen befindet, ist vor dem Hintergrund der niedrigen Viabilität als nicht gleichwertig zu bewerten. Die Viabilitätsraten der anderen Versuche erreichen meist ihr Maximum nach 38 h Propagation, um dann, mit Ausnahme des Versuches bei 150 V Ladespannung, konstant zu bleiben. Auffällig ist der Verlauf der Viabilität des Versuches mit 150 V Ladespannung gegen Ende der Propagation, da sich diese leicht verringert. Möglicherweise ist dies auf einen zusätzlichen Stress durch das elektrische Feld, nebst Nährstoffmangel und einer höheren Konzentration an Stoffwechselprodukten, zurückzuführen. Die mit 50 und 100 V behandelten Populationen sind in ihrem prozentualen Anteil lebender Zellen jedoch nicht deutlich von den unbehandelten Nullproben zu unterscheiden. In Kombination mit den Daten der Gesamtzellzahlen (Abbildung 17) kann die Zelldichte viabler Zellen ermittelt werden. Diese wird in Abbildung 19 dargestellt. Die Propagationsversuche, welche

mit 100 und 150 V Ladespannung behandelt wurden, scheinen sich spätestens nach 38 h von den Nullproben durch höhere Lebendzellzahlen zu unterscheiden. Auch eine Behandlung mit 50 V Ladespannung scheint leicht positive Tendenzen zu zeigen, auch wenn diese nicht so stark ausgeprägt sind und die Zellzahlen nach Erreichen der stationären Phase unter jene der Nullproben fallen.

Als weitere Methode zur Überprüfung der Zellviabilität der Populationen wurden die koloniebildenden Einheiten (KBE) nach Ausplattierung und Inkubation bestimmt. Abbildung 20 zeigt die Entwicklung der KBE der Propagationen. Die Behandlungen mit 100 V und 150 V Ladespannung weisen nach 44 h KBE auf und setzen sich, im Vergleich zu den mittels FACS bestimmten Lebendzellzahlen, noch deutlicher von jenen der Nullproben ab. Dabei ist jedoch anzumerken, dass die KBE der Nullproben und des Versuches mit 50 Volt Ladespannung weit unter den mit FACS bestimmten Lebendzellzahlen liegen. Ob dies auf die Schwäche bzw. Fehleranfälligkeit der Methode der KBE Bestimmung, oder auf eine geringe Vitalität der Hefezellen und somit ihrer Fähigkeit sich auf dem Agar vermehren zu können zurückzuführen ist, kann nicht abschließend geklärt werden. Es ist jedoch auffällig, dass die sonst schwachen Hefepopulationen der Versuche unter dem Einfluss von 250 V Ladespannung nach 44 h teils mehr KBE ausbilden als die Nullproben, während ihre Lebendzellzahlkonzentrationen (nach FACS) weit unter denen der Nullproben liegen (vgl. Abbildung 19). Die KBE des Versuches mit 350 V Ladespannung zeigt bereits nach 13 h eine Abnahme auf 150.000 KBE. Auch weitere 10 h Propagation mit PEF-Einwirkung bei dieser Intensität verbessern die Viabilität der Population nicht. Sie verringert sich hingegen zusätzlich auf 85.000 KBE. Dies stützt die Messergebnisse der mittels FACS und CC gemessenen Zelldichten und Viabilitäten für diesen Versuch.

Die kombinierte Färbung mit Propidiumiodid und Fluorescein-Diacetat erlaubt auch eine Differenzierung von Zellen, welche auf beide Farbstoffe positiv reagieren. Die Konzentrationen an vitalen Zellen der verschiedenen Propagationen und PEF-Intensitäten zeigt Abbildung 21. Der Versuch mit 350 V Ladespannung zeigt ab 23 h die geringsten Konzentrationen vitaler Zellen. Dies ist dadurch zu erklären, dass über die Propagation keine Zellvermehrung stattfindet und der Todanteil zusätzlich steigt (vgl. Abbildung 17, Abbildung 19 und Abbildung 20). Die Versuche mit 50 V und 100 V Ladespannung zeigen in der Tendenz höhere Konzentrationen vitaler Zellen als die Nullproben, was sich durch die generell höhere Zelldichte erklären lässt. Interessant sind die Verläufe der Versuche mit 150 und 250 V Ladespannung. Ersterer liegt in der Tendenz höher als die anderen Versuche (außer jener mit 250 V), was auf die höhere Intensität des PEF zurückzuführen sein kann, da dieses möglicherweise bei manchen Zellen zu irreversiblen Zellschädigungen geführt haben könnte, was die Aufnahme von PI ermöglicht, obwohl die Zellen noch Stoffwechselaktivität (Fluorescein-Diacetat positiv) zeigen. Die Versuche mit 250 V Ladespannung steigen in ihrer Konzentration vitaler Zellen nach 38 h stark an. Zum Messzeitpunkt nach 62 h liegt diese weit über jenen der anderen Versuche. Auch diese Entwicklung kann auf die PEF-Behandlung zurückzuführen sein, da die Kombination aus Endproduktrepression, Nährstoffmangel und PEF-induzierter Stress zur Ausbildung irreversibler Zellschädigungen führen könnte, was sich in den hohen Konzentrationen vitaler Zellen wieder spiegelt. Es kann als zusätzliches Indiz für die schädigende Wirkung steigender Lade- und Pulsspannungen angesehen werden. Davon lässt sich ableiten, dass die Ladespannung und die daraus resultierende Pulsspannung, sowie elektrische Feldstärke sehr genau gewählt werden müssen, da zu hohe Spannungen zellschädigende Effekte haben können.

### **Stoffliche Veränderungen der Propagationsmedien**

Nachfolgend soll auf die Veränderungen im Zuckerspektrum der Propagationsmedien der Versuche eingegangen werden. Die gemittelte Veränderung des Glucosegehaltes, bezogen auf den Ausgangsgehalt, ist in Abbildung 22 dargestellt. Sie zeigt bei fast allen Propagationen bzw. PEF-Behandlungen einen typischen Verlauf. Die Versuche mit 250 V und 350 V Ladespannung fallen hier durch ihren verzögerten bzw. kaum

vorhandenen Abbau der Glucose auf. Diese wird üblich zu Beginn einer Propagation präferiert metabolisiert, da es sich um einen Einfachzucker handelt. In Hinblick auf die verzögerte und gehemmte Erhöhung der Gesamt- und Lebendzellzahlen der beiden genannten Versuche ist die verzögerte bzw. kaum vorhandene Veränderung der Glucosekonzentration im Medium erklärbar, da die Zellen scheinbar in ihrem Stoffwechsel gehemmt wurden. Im Vergleich zu den Nullproben zeigen die mit PEF behandelten Versuche eine leicht höhere maximale Verringerung des Glucosegehaltes auf. Dies ist jedoch primär auf geringe Unterschiede der einzelnen Batches der verwendeten Propagationswürze zurückzuführen, da die Versuche der Nullproben initiativ einen ca. 1,5 g/l geringeren Glucosegehalt aufwiesen. Folglich ist die maximale Verringerung des Glucosegehaltes der anderen Versuche um diese Differenz höher. Weitere Unterschiede in der Veränderung der Glucosekonzentration zwischen den Behandlungsintensitäten können nicht ausgemacht werden.

Abbildung 23 zeigt den gemittelten Maltoseabbau, bezogen auf den Ausgangsgehalt, zu verschiedenen Zeitpunkten der Propagationen vergleichend für verschiedene PEF-Einstellungen. Die Ausgangskonzentrationen an Maltose betragen im Mittel 49,8 g/l ( $\pm 3,3$  g/l). Die meisten Verläufe sind als typisch einzustufen, da die Hefezellen während der Lag-Phase bevorzugt Glucose als Energielieferant nutzen. Nach 18 h beginnt messbar die Nutzung von Maltose als Energienährstoff, wobei die Propagationen der Nullproben und des Versuches mit 50 V Ladespannung zu diesem Zeitpunkt einen leicht höheren Abbau aufweisen. Der Versuch mit 150 V Ladespannung liegt 23 h nach Versuchsbeginn sichtbar hinter den anderen Versuchen. Ob dies lediglich auf eine bereits hemmende Wirkung des PEF zurückzuführen ist, kann nicht abschließend geklärt werden. Es ist jedoch auffällig, dass dieser Versuch, sowie jene mit 100 V Ladespannung, zu den Zeitpunkten 18 h und 23 h bereits in der Tendenz leicht höhere Zellzahlen als die anderen Versuche aufweisen, der Maltoseabbau dabei jedoch leicht geringer ausfällt. Eine Erklärung könnte eine leicht forcierte Biomassebildung in diesen Versuchen sein, welche eine Antwort auf den leichten Stress, hervorgerufen durch die PEF-Behandlung, sein könnte (hormetische Effekte). Betrachtet man spätere Zeitpunkte, ist ersichtlich, dass auch die Versuche mit 100 und 150 V Ladespannung einen ähnlich hohen Maltoseabbau aufweisen und die anfänglichen Unterschiede nicht mehr vorhanden sind. Es zeigt sich auch, dass nach 38 h keine weitere nennenswerte Verringerung des Maltosegehaltes erfolgt und der Verbrauch ungefähr der Ausgangskonzentration entspricht. Der mengenmäßig wichtigste Nährstoff Maltose scheint somit nach 38 h von den Hefezellen fast gänzlich verbraucht worden zu sein. In der Praxis hätte die Propagation an diesem Zeitpunkt beendet werden können. Sie wurde in den Experimenten fortgeführt, um zu beobachten, ob sich die Viabilität der Hefepopulationen bei Nährstoffmangel und weiterer Belüftung (potentiell oxidativer Stress) für die verschiedenen PEF-Behandlungen unterschiedlich verhält. Die Versuche mit 250 und 350 V Ladespannung zeigen einen sehr verzögerten und niedrigen ( $\emptyset$  32 g/l für 250 V) bzw. nahezu keinen Abbau von Maltose (2,3 g/l für 350-V-Versuch vor Abbruch). Dieser ist durch die geringen Gesamt- und Lebendzellzahlen dieser Versuche erklärbar – wahrscheinlich hervorgerufen durch die Stärke der PEF-Behandlung bei 250 und 350 V Ladespannung. Nebst den kleinen Unterschieden im Maltoseabbau der Versuche mit 100 und 150 V Ladespannung zum Zeitpunkt 23 h können anhand der vorliegenden Daten keine weiteren Unterschiede festgestellt werden. Hier zeigt sich die Schwäche des Versuchsaufbaus, da zwischen 23 und 38 h nach Propagationsbeginn keine Proben gezogen und Daten aufgenommen wurden, da Probenahmen und Messungen nicht automatisiert und online erfolgen konnten. Somit wurden eventuell vorhandene Unterschiede in der Entwicklung des Maltosegehaltes nicht erfasst. Eine Inline-Messung ausgewählter Parameter, wie beispielsweise Zelldichte und scheinbarer Extrakt, würde eine Echtzeitmessung über die gesamte Propagationsdauer hinweg und somit das Erfassen von weitaus mehr Daten ermöglichen.

Die mittlere Veränderung der Maltotriosekonzentration, bezogen auf den Ausgangsgehalt, in den Propagationsmedien ist in Abbildung 24 dargestellt. Auch hier verändert sich der Gehalt an Maltotriose für den

Versuch mit 350 V kaum. Für die Versuche mit 250 V Ladespannung zeigt sich ebenfalls eine verzögerte Verringerung der anfänglichen Zuckerkonzentration, was auf die verzögerte Bildung von Biomasse (siehe Gesamt- und Lebendzellzahl) zurückzuführen ist. Auch Maltotriose scheint nach 38 h fast gänzlich von den Hefepopulationen metabolisiert worden zu sein, da sich die Gehalte nach 38 h kaum verringern. Die maximalen Verringerungen scheinen insgesamt für die Versuche mit 100 V auch im Mittel größer als jene der Nullproben oder der Versuche mit 50 V Ladespannung zu sein. Auch unter Berücksichtigung der leicht unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen an Maltotriose, welche bei den Versuchen mit 100 V Ladespannung im Mittel um ca. 1,5 g/l (in einem Versuch um 3 g/l) höher liegen, beträgt die Verringerung bei den Nullproben im Mittel 61,5 % und bei den Versuchen mit 100 V Ladespannung 78 %. Dieser prozentual leicht stärkere Abbau ist wahrscheinlich auf die höhere Zelldichte dieser Versuche zurückzuführen, wodurch nach Verbrauch der anderen Zucker verstärkt Maltotriose verstoffwechselt wurde.

Abbildung 25 zeigt den gemittelten Ethanolgehalt der Propagationsmedien im Laufe der Propagation für die Versuche verschiedener PEF-Einstellungen. Die Ethanolkonzentrationen verändert sich nach 38 h nicht mehr, was zu den gleichbleibenden Zuckerkonzentrationen in den Medien passt. Die Versuche mit 100 V Ladespannung weisen leicht höhere maximale Konzentrationen auf ( $\approx + 1,6$  g/l im Mittel), verglichen mit den Nullproben. Diese Unterschiede kommen einerseits durch die leicht höheren initialen Zuckerkonzentrationen zustande, wodurch leicht mehr Substrat für die Hefen zur Verfügung stand. Andererseits war die Zelldichte in diesen Versuchen höher, was die Verwertung des Dreifachzuckers Maltotriose erhöhen konnte und so die leicht höhere Ethanolbildung erklären kann. Interessant sind die geringeren Gehalte zu den Zeitpunkten 13 h und 18 h. Obwohl die Lebendzellzahlen der Versuche mit 100 V Ladespannung bereits zu diesen Zeitpunkten höher waren als jene der Kontrolle, sind die Ethanolgehalte niedriger. Dies kann durch eine forcierte Biomassebildung während der logarithmischen Phase erklärt werden, da so der Sekundärstoffwechsel weniger stark ausgeprägt war und weniger Ethanol gebildet wurde. Da nebst der Intensität des PEF keine Parameter verändert wurden, kann vermutet werden, dass die Behandlung bei 100 V Ladespannung (elektrischen Feldstärke von ca. 0,43 - 0,5 kV) den Effekt ausgelöst hat. Weitere Versuche wären sinnvoll, um den Effekt weiter zu untersuchen.

### **Fermentation bei 20 °C im Laborfermenter**

#### **Einfluss auf die Zellzahl sowie Viabilität der Hefepopulationen nach initiativer PEF-Behandlung**

Abbildung 26 zeigt die Entwicklung der gemittelten Gesamtzellzahl der verschiedenen Versuchsreihen. Im Vergleich zu den Propagationen sind die maximalen Zellzahlen um die Hälfte niedriger, was auf das begrenzte Angebot an Sauerstoff zurückzuführen ist, da in den Fermentern keine weitere Belüftung erfolgte. Folglich war die Biomassebildung in diesen Versuchen gehemmt. Die Versuche ohne initiativ PEF-Behandlung zeigen maximale Zelldichten von im Mittel  $50 \times 10^6$  Zellen/ml (max.  $60 \times 10^6$  Zellen/ml). Im Vergleich zu den Nullproben zeigen manche Versuchsreihen ähnliche Entwicklungen in der Zelldichte, so die Versuche mit initiativ PEF-Behandlung bei 50, 150 und 250 V Ladespannung. Sie liegen im Mittel zwar alle leicht über den Werten der Nullproben, der Unterschied scheint jedoch nur marginal zu sein. Die Versuche mit 100 V zeigen auch in diesen Experimenten in der Tendenz höhere mittlere Gesamtzellzahlen. Überraschend ist, dass der Versuch mit der größten Ladespannung von 350 V die höchsten Zelldichten erreicht. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Propagationsversuche, bei denen trotz besserer Sauerstoffversorgung kein Wachstum und sogar eine Verringerung der Zellzahl ermittelt wurde. Der Unterschied zu den Propagationsversuchen liegt in der Häufigkeit der PEF-Behandlungen. Für die Fermentationen wurde das Propagationsmedium nur für drei Intervalle mit gepulsten elektrischen Feldern behandelt. Daraus lässt sich ableiten, dass die dauerhafte Behandlung bei 350 V Ladespannung ( $\approx 1.300 - 1.500$  V/cm elektrische Feldstärke) scheinbar einen hemmenden oder destruktiven Effekt auf

die Hefezellen hat – eine begrenzte Behandlung jedoch nicht. Ob ein positiver Effekt hinsichtlich der Bildung von Biomasse bei diesem Versuch vorliegt, kann nicht mit ausreichend Evidenz belegt werden. Ein Hinweis darauf liegt jedoch, auch vor dem Hintergrund der Versuche von HERTEL, DILLENBURGER UND KERN<sup>22</sup>, vor. Da die Behandlung direkt zu Beginn der Experimente durchgeführt wurde und sich die Hefezellen noch am Anfang der Lag-Phase befanden, kann die Fragestellung formuliert werden, ob eine spätere PEF-Behandlung einen stärkeren Effekt haben könnte. Die Applikation eines Stressors wäre tendenziell zu einem späteren Zeitpunkt sinnvoller, da die Zellen sich dann an die Umweltbedingungen angepasst und ihren Stoffwechsel auf Biomasseproduktion eingestellt haben. Hormetische Effekte könnten so forciert werden, bzw. besser zur Geltung kommen.

Die gemittelten Lebendzellzahlen (FACS) sind in Abbildung 28 aufgetragen. Auch hier zeigen die Versuchsreihen mit 100 und 350 V Ladespannung in der Tendenz höhere Lebendzellzahlen als die Kontrolle. Andere Versuchsreihen unterscheiden sich nicht nennenswert von den Nullproben, auch wenn ihre Mittelwerte tendenziell auch über jenen der Nullproben liegen.

Die Viabilität der Hefepopulationen, ausgedrückt als relativen Totanteil in Prozent, zeigt Abbildung 27. Der Totanteil zu Beginn der Fermentation liegt zwischen 30 und 36 %. In den meisten Versuchen sinkt dieser nach spätestens 23 h auf ein Niveau von 15 bis 20 % und bleibt bis Ende der Experimente auf einem konstanten Niveau. Hervorzuheben ist der leichte Anstieg des Totanteils bei allen Versuchen, welche initiativ mit PEF behandelt wurden. Dies zeigt, dass die PEF-Behandlung einen stressenden Effekt auf die Hefepopulationen hat. Für den Versuch mit 350 V Ladespannung – also der höchsten Intensität – ist der Anstieg des Totanteils am höchsten. Die Hefepopulationen scheinen sich jedoch in der Folge von dem initiativen Stress zu erholen, was sich in dem stark sinkenden Totanteil zeigt. Dieser ist bei den Versuchsreihen mit 100 und 150 V im Mittel sogar geringer als jener der Nullproben, was positiv zu bewerten ist. Diesbezüglich ist jedoch auch zu erwähnen, dass nach 23 h die Anteile toter Zellen auf einem gleichen Niveau wie bei den Kontrollversuchen sind und sich die anfänglichen Unterschiede nivellieren. Die Versuchsreihen mit 250 und 350 V zeigen, anders als die anderen Versuchsreihen, einen weiteren Anstieg im Totanteil der Hefepopulationen bis circa 13 h nach Fermentationsbeginn. Dies stützt die These des Auftretens eines stressenden und hemmenden Effektes der intensiveren PEF-Behandlung bei elektrischen Feldstärken von circa 1,1 und 1,5 kV/cm. In der Folge scheinen sich die Hefepopulationen bei diesen Versuchen jedoch von der Behandlung zu erholen und zeigen einen starken Abfall des Totanteils, da eine ausgeprägte Zellvermehrung eintritt. Der Versuch mit 350 V Ladespannung zeigt nach 38 h sogar in der Tendenz einen leicht niedrigeren Totanteil als die Kontrollen. Dies spiegelt sich auch in den höheren Lebendzellzahlen wieder (Abbildung 28). **Dies stützt die These von hormetischen Effekten als Folge von gepulsten elektrischen Feldern.**

Abbildung 29 zeigt den Verlauf der Anzahl koloniebildender Einheiten der Versuchsreihen. Es fällt auf, dass diese bei manchen Versuchsreihen zum Messzeitpunkt 62 h höher sind, als bei früheren Messzeitpunkten. Vor dem Hintergrund, dass sich die Hefepopulationen in den Fermentationsmedien zu diesem Zeitpunkt in der stationären Phase befinden und die Nährstoffe aufgebraucht sind, erscheinen die gestiegenen KBE auffällig, da weniger viable und vitale Zellen in den Populationen vermutet werden können. Möglicherweise wurde das auf dem Agar vorhandene Nährstoffangebot von den Hefezellen dieser Versuche jedoch rasch angenommen, wodurch sich mehr Kolonien ausbildeten. Die Ergebnisse können zu einem gewissen Maß auch auf Ungenauigkeiten der Methode zurückgeführt werden. Die KBE der Nullproben liegen im Mittel stets unter jenen der anderen Versuche mit initiativer PEF-Behandlung. Die KBE des Versuches mit 50 V Ladespannung liegen auch unter Berücksichtigung der natürlichen Schwankungen zu jedem Messzeitpunkt über jenen der Nullproben. Die KBE der Versuche mit 100 V Ladespannung sind im

---

<sup>22</sup> Hertel, M.; Dillenburger, M., Kern, M., 2011, S. 154–157.

Mittel deutlich höher als jene der Nullproben. Bei den Versuchen mit 150 und 250 V Ladespannung liegen die Mittelwerte zwar über jenen der Nullproben, die Schwankungen der Einzelversuche bzw. die natürliche Schwankungsbreite lässt eine strengere Diskrimination jedoch nicht zu. Insgesamt stützen die Ergebnisse der KBE-Bestimmung die Ergebnisse der flusscytometrischen Messung in Hinsicht auf die höheren Lebendzellzahlen der Versuchsreihen mit 100 und 350 V Ladespannung.

Zusammenfassend lassen sich von den Ergebnissen der Fermentationen bei 20 °C Hinweise auf einen **positiven Effekt bestimmter PEF-Behandlungen auf die Lebendzellzahlen sowie die Viabilität der Hefepopulationen** ableiten. Es kann die Empfehlung für künftige Forschung ausgesprochen werden, die positiven Effekte weitergehend in angepassten Experimenten zu untersuchen, um diese genauer quantifizieren und mit höherer Evidenz belegen zu können.

### **Stoffliche Veränderungen in den Fermentationsmedien**

Abbildung 30 zeigt die Veränderung des Glucosegehaltes, bezogen auf den Ausgangsgehalt in den Fermentationsmedien der verschiedenen Versuchsreihen. Es ist ersichtlich, dass nach 13 h ab Fermentationsbeginn keine oder fast keine Glucose in den Medien mehr enthalten ist. Dies kann als typisch bewertet werden. Während in den Medien der Nullproben nach 13 h keine Glucose mehr vorhanden ist, enthalten die Medien der anderen Versuchsreihen vereinzelt noch geringe Mengen Glucose (bis zu 3,7 g/l). Es kann die vage Vermutung aufgestellt werden, dass die Zellen in diesen Versuchsreihen nach der initiativen PEF-Behandlung etwas mehr Zeit für die Reaktivierung ihres Stoffwechsels benötigten, was sich in der leicht verzögerten Metabolisierung von Glucose bemerkbar macht. Da das PEF als zusätzlicher Stressor einzustufen ist, läge eine solche Verzögerung als Effekt des PEF nahe. Häufigere Probenahmen und Messungen innerhalb der ersten 13 h könnten den eigentlichen Beginn der Stoffwechselaktivität aufzeichnen und vorhandene Unterschiede hervorheben.

Der Maltosegehalt der Fermentationsmedien ist in Abbildung 32 abgebildet. Dieser verändert sich nach 13 h nur geringfügig durch eine Abnahme von ca. 4 - 5 g/l. Im weiteren Verlauf der Fermentation sinkt der Gehalt stetig, was für eine ununterbrochene Fermentation spricht. Nach 38 h ist die Maltose in den Fermentationsflüssigkeiten aller Versuchsreihen vollständig metabolisiert. Unterschiede in den mittleren Maltosegehalten der Versuchsreihen zeigen sich ab 18 h nach Fermentationsbeginn für die Versuchsreihen mit 250 und 350 V Ladespannung. Bei diesen liegen die Maltosegehalte über jenen der anderen Versuchsreihen, es wurde folglich weniger Maltose von diesen Hefepopulationen metabolisiert. Unter Berücksichtigung der Lebendzellzahlen dieser Versuchsreihen (siehe Abbildung 28) ist die geringere Metabolisierung von Maltose in der Versuchsreihe mit 350 V Ladespannung nicht auf geringere Lebendzellzahlen zurückzuführen. Diese liegen zum Zeitpunkt 18 h auf dem Niveau der Nullproben und dem Versuch mit 50 V Ladespannung. Zum Zeitpunkt 23 h übersteigen die Lebendzellzahlen jene der anderen Versuchsreihen, wobei der Maltosegehalt dieses Versuches um ca. 8 g/l höher ist, also weniger Substrat verstoffwechselt wurde. Daraus kann geschlossen werden, dass in der Versuchsreihe mit 350 V Ladespannung eine leicht forcierte Biomasseproduktion bei geringerem Substratverbrauch stattgefunden hat.

Abbildung 31 zeigt die gemittelten Maltotriosekonzentrationen der Fermentationsflüssigkeiten der Versuchsreihen. Diese nehmen erst ab 13 h nennenswert ab, was typisch ist. Es fällt auf, dass die Maltotriosegehalte der Versuchsreihen (behandelt mit 100, 150, 250 und 350 V Ladespannung) niedriger sind, als jene der Nullproben. Dies ist trotz höherer anfänglicher Maltotriosegehalte in den Versuchsreihen mit 100 und 350 V Ladespannung, wahrscheinlich auf ihre insgesamt höheren Lebendzellzahlen zurückzuführen.

Abbildung 33 bildet die gemittelten Ethanolgehalte der Fermentationsmedien der Versuchsreihen ab. Im Vergleich der Versuchsreihen fallen erneut die Versuche mit 250 und 350 V Ladespannung auf, da die Ethanolgehalte zu den Zeitpunkten 13, 18 und 23 h niedriger sind, als bei den anderen Versuchsreihen.

Für die Versuche bei 250 V kann dies auf die geringere Lebendzellzahl in den ersten 24 h der Fermentation zurückzuführen sein, da so folglich weniger Ethanol als Stoffwechselprodukt sekundären Stoffwechsels gebildet wurde. Für den Versuch bei 350 V sind die geringeren Ethanolgehalte nicht durch niedrigere Zellzahlen zu erklären, da die Lebendzellzahlen zu den Zeitpunkten 18 und 23 h sogar höher als bei den anderen Versuchsreihen waren. Dies stützt die These, dass in diesem Versuch der Primärstoffwechsel zur Bildung von Biomasse forciert war und weniger Sekundärstoffwechsel (alkoholischer Gärung) stattfand. Dies wäre grundsätzlich durch **hormetische Effekte erklärbar, ausgelöst durch die Behandlung mit PEF**. Es wurde der Substratverwertungskoeffizient ( $S_v$ ) für die verschiedenen Zeitpunkte und Versuchsreihen entsprechend Formel 3 gebildet.

$$S_v = \frac{\text{Gebildetes Ethanol} \left[ \frac{g}{l} \right]}{\sum \left( \text{Veränderung der Zuckergehalte} \left[ \frac{g}{l} \right] \right)}$$

Formel 3: Berechnung des Substratverwertungskoeffizienten ( $S_v$ ) mittels der per HPLC bestimmten Ethanol- und Zuckergehalte.

Dieser ist in Abbildung 34 für die Messergebnisse ab 18 h nach Fermentationsbeginn für die verschiedenen Versuchsreihen aufgetragen. Zusätzlich ist der Mittelwert der Koeffizienten aller Versuche sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken aufgetragen. Fast alle Versuchsreihen zeigen sehr ähnliche Koeffizienten und liegen innerhalb des Bereiches von einem  $\sigma$ . Lediglich der Versuch mit 350 V zeigt auch im Koeffizienten tendenziell einen Unterschied zu den anderen Versuchen. Ein kleinerer Koeffizient weist dabei auf eine geringere Ethanolbildung und eine forcierte Biomassebildung hin. Dies bestätigt somit auch die Beobachtung höherer Zellzahlen bei geringerem Substratverbrauch. Der zum Zeitpunkt von 18 h höhere Koeffizient ist möglicherweise auf eine verlängerte Lag-Phase oder einem gestressten Zustand zurückzuführen. Die vergleichsweise nicht geringe Zelldichte in dem Versuch spricht jedoch gegen die Höhe des Koeffizienten.

Zusammenfassend zeigen sich **Hinweise auf einen Effekt der PEF-Behandlungen**. Dieser scheint vereinzelt den **Stoffwechsel der Hefepopulationen zu beeinflussen**. Für künftige Forschung kann das Ziel abgeleitet werden diesen Effekt forciert zu untersuchen und ihn mit höherer Evidenz zu belegen.

### Fermentation bei 14 °C im Laborfermenter

#### Einfluss auf die Zellzahl sowie Viabilität der Hefepopulationen nach initiativer PEF-Behandlung

Abbildung 35 zeigt die Entwicklung der Gesamtzellzahlen der verschiedenen Versuchsreihen. Die Lag-Phase ist verzögert, was auf die geringere Temperatur zurückzuführen ist. Vor Ende der Fermentation, nach 62 h, ist die Zellvermehrung noch nicht abgeschlossen. Die maximalen Zellzahlen sind bei manchen Versuchsreihen etwas niedriger als bei den Fermentationen bei 20 °C, was ebenfalls temperaturbedingt ist. Zudem wurden die Versuche planmäßig nach 62 h beendet, wodurch eine mögliche weitere Zellvermehrung nicht beobachtet werden konnte. Bei Betrachtung der Werte nach 62 h zeigt sich, dass alle Versuchsreihen, welche initiativ mit PEF behandelt wurden, tendenziell höhere Zellzahlkonzentrationen aufweisen als die Kontrollversuche ohne PEF-Behandlung. Vor allem für die Versuchsreihen mit 100 und 350 V Ladespannung ist diese Tendenz ausgeprägt, da auch unter Berücksichtigung der natürlichen Schwankungen der Populationen die maximal erreichten Zellzahlen jene der Kontrolle übersteigen. Dies ist hervorzuheben, da bei dem Versuch mit 350 V Ladespannung Gesamtzellzahl und Lebendanteil der Population zu Beginn der Fermentation sinken, um im weiteren Verlauf über das Niveau der anderen Versuchsreihen anzusteigen. Es wird deshalb vermutet, dass die einführende PEF-Behandlung bei diesem Versuch zuerst einen hemmenden Effekt auf die Population hatte, da die applizierte Feldstärke im Vergleich zu den anderen Versuchsreihen und PEF-Behandlungen stark war. Der hemmende Effekt dieser

Intensität konnte bereits bei den Versuchen der Propagation beobachtet werden. Gleichzeitig kann ein hormetischer Effekt, hervorgerufen durch die PEF-Behandlung, vermutet werden, welcher die stark steigenden Zellzahlen im Verlauf der Fermentation erklären könnte. Die vorliegenden Daten stehen jedoch im Widerspruch zu den niedrigeren Zellzahlen der Versuche mit 150 und 250 V Ladespannung und den höheren Zellzahlen der Versuchsreihe mit 100 V. Potentielle Effekte einer PEF-Behandlung sind jedoch nicht nur von der Ladespannung und der resultierenden elektrischen Feldstärke abhängig, sondern auch von anderen Parametern des PEF, wie zum Beispiel der Frequenz<sup>23 24</sup>. Diese determiniert bei diesem Versuchsaufbau die Häufigkeit, mit der eine Zelle einen elektrischen Puls beim Durchströmen des Reaktors erfährt. In dem für dieses Projekt angewendeten Versuchsaufbau wurde die Frequenz der Pulse für die jeweiligen Ladespannungen angepasst (siehe Tabelle 5). Im Detail wurde bei niedrigeren Ladespannungen die Frequenz erhöht, um einem zu starken Abfall der in das System bzw. der Hefezelle eingetragenen Energie entgegenzuwirken. Es liegt daher nahe, dass die hormetischen Effekte nicht nur in Abhängigkeit der Intensität der elektrischen Feldstärke auftreten, sondern auch andere PEF-Parameter wie die Frequenz und etwaige Interaktionen einen Einfluss haben. Für ein potentielles **Folgeprojekt** ergeben sich daraus einige sehr relevante Fragestellungen bezüglich der Effekte der gewählten Parameter.

Die gemittelten Lebendzellzahlen der verschiedenen Versuchsreihen sind zusätzlich in Abbildung 36 dargestellt. Auch bei den Lebendzellzahlen zeigen die meisten Versuchsreihen, welche eine PEF-Behandlung zu Beginn der Fermentation erfahren haben, gegen Ende des Experimentes eine höhere mittlere Lebendzellzahl als die Kontrolle. Dabei weisen die Versuche mit 100 V Ladespannung sowie der Versuch mit 350 V Ladespannung unter Berücksichtigung der Schwankungen der Einzelversuche ausgeprägt höhere Konzentrationen an lebenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollversuchen auf. Die oben für die Gesamtzellzahl diskutierten Tendenzen und Effekte der Versuchsreihen werden somit auch durch die Ergebnisse der Lebendzellzahlen unterstützt.

Abbildung 37 zeigt die Viabilität der Hefepopulationen der Versuchsreihen in Form des relativen Totanteils. In allen Versuchen stieg der Totanteil nach dem Überführen in die Fermenter (Zeitpunkt 1 h) bis zu dem Zeitpunkt 13 h um 10 bis 15 Prozentpunkte an, was sowohl auf Nachwirkungen der PEF-Behandlung, als auch auf die Verringerung der Temperatur zurückzuführen sein kann. Da die Nullproben innerhalb der ersten Stunde in ihrem Totanteil sinken, nach Überführen in die Fermenter und die Kältekammer dieser jedoch steigt, ist die Veränderung der Temperatur als Ursache für den steigenden Totanteil wahrscheinlicher. Manche Versuche der Versuchsreihe mit 100 V Ladespannung fallen durch einen flacheren Anstieg des Totanteils auf. Dies ist möglicherweise auf die hormetischen Effekte einer moderaten PEF-Behandlung zurückzuführen. Zwischen 13 und 18 h nach Fermentationsbeginn verändert sich der Totanteil nur geringfügig, wobei er im Mittel bei manchen Versuchsreihen steigt und sich bei anderen verringert. Im Vergleich zu den Nullproben weisen manche Versuchsreihen, behandelt mit PEF, höhere und manche ähnlich hohe Totanteile auf. Da nebst den Versuchen mit stärkerer PEF-Behandlung (250 und 350 V Ladespannung) auch der Versuch mit 50 V Ladespannung einen höheren Totanteil als die Kontrollversuche aufzeigt, kann hier nur vage eine Tendenz abgeleitet werden. Im weiteren Verlauf des Experimentes sinkt der Totanteil in allen Versuchsreihen. Die Abnahme ist dabei nicht bei allen Versuchsreihen gleichmäßig, was auf eine schnellere Zellvermehrung bei manchen Versuchen hindeutet. Dies zeigt auch der stärkere Anstieg der Lebendzellzahlen (Abbildung 36). Der Totanteil mancher Versuchsreihen mit PEF-Behandlung weist in der Tendenz am Ende der Experimente leicht niedrigere Totanteile als die Kontrollversuche auf, wobei aufgrund der Schwankungen innerhalb der Versuchsreihen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden kann.

---

<sup>23</sup> Mattar, J.; Turk, M. et al, 2013, o.S.

<sup>24</sup> Raso, J.; Frey, W.; Ferrari, G.; Pataro, G.; Knorr, D.; Teissie, J.; Miklavčič, D., 2016, S. 312 - 321

Abbildung 38 zeigt die KBE über den Verlauf der Fermentation. Die Anzahl der KBE differenziert sich erst nach dem Überwinden der Lag-Phase, was typisch ist. So zeigen manche Versuche mit PEF-Behandlung 44 h nach Fermentationsbeginn höhere KBE als die Kontrollversuche. Manche liegen auf einem ähnlichen Niveau wie die Kontrollen. Hervorzuheben sind die Versuche mit 100 und 350 V Ladespannung, da sie die KBE der Nullproben stark übertreffen. Der Versuch mit 350 V zeigt zu Beginn des Experiments einen Rückgang der KBE, was in keinem anderen Versuch auftritt. Nach Überwinden der Lag-Phase steigen die KBE jedoch stark und erreichen nach 44 h den Maximalwert aller Versuche. Dies kann als Indiz dafür gedeutet werden, dass die PEF-Behandlung bei 350 V Ladespannung (entspricht einer elektrischen Feldstärke von mind. 4,36 kV/cm) einen starken Stress auf die Hefepopulation ausgeübt hat, was nach der PEF-Behandlung zu einer geringeren Viabilität führte. Im Laufe der Fermentation und nach Überwinden der Lag-Phase könnte sich bei diesem Versuch ein ausgeprägter hormetischer Effekt gezeigt haben, was die gesteigerte und hohe Viabilität erklären würde. Nicht gänzlich erklärbar ist das Fehlen eines solchen Effektes bei den Versuchen mit Ladespannungen zwischen 100 und 350 V. Es kann jedoch auch hier vermutet werden, dass nicht die Intensität der Ladespannung allein den hormetischen Effekt beeinflusst, sondern dieser auch von der Frequenz der Pulse abhängig ist. Auch nicht vollständig erklärbar ist die geringe Anzahl an KBE für den Versuch mit 350 V am Ende des Experimentes nach 62 h Fermentation. Auch der Versuch mit 100 V Ladespannung zeigt geringere KBE am Ende des Experimentes, auch wenn die Abnahme weniger stark ist.

Die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen der Fermentationen bei 14 °C zeigen, dass sich die mit PEF behandelten Versuchsreihen in Zellzahl und der Viabilität von den unbehandelten Kontrollen unterscheiden. PEF-Behandlungen mit 100 und 350 V Ladespannung fielen durch eine erhöhte Lebendzellzahl auf, was als positiver Effekt gewertet werden kann.

### **Stoffliche Veränderungen in den Fermentationsmedien**

Abbildung 39 zeigt die gemittelte Veränderung der Glucosekonzentration, bezogen auf die Ausgangsgehalte in den Fermentationsmedien der verschiedenen Versuchsreihen bei 14 °C. Während der ersten 13 h werden zwischen 3 und 7 g/l Glucose abgebaut, wobei sich leichte Unterschiede zwischen den Fermentationsreihen zeigen. So weisen die Nullproben und der Versuch mit 50 V Ladespannung einen leicht höheren Glucoseabbau auf. Da die Versuche zu diesem Zeitpunkt noch fast gleiche Lebendzellzahlen zeigen, kann dies als Ursache ausgeschlossen werden. Die Unterschiede scheinen sich zum Zeitpunkt von 18 h weiter auszuprägen, nivellieren sich jedoch im weiteren Verlauf der Fermentation. Unter Berücksichtigung der Entwicklung der Lebendzellzahlen sind die Verläufe erklärbar. Die mit PEF behandelten Hefepopulationen scheinen zu Beginn der Experimente etwas weniger vital zu sein als die Kontrolle oder der Versuch bei 50 V Ladespannung. Nach Überwinden der Lag-Phase und dem Einsetzen der Zellvermehrung nivellieren sich die anfänglichen Unterschiede, da die Versuchsreihen mit PEF-Behandlung zum Teil höhere Lebendzellzahlen aufweisen und so mehr Glucose metabolisieren. Die Unterschiede im Abbau am Ende des Experimentes kommen durch Unterschiede im ursprünglichen Glucosegehalt der Medien zustande, wodurch sich auch die maximal abbaubare Menge um 1 bis 2 g/l unterscheidet. Nach 38 h Fermentationsdauer ist bei fast allen Versuchsreihen jegliche Glucose metabolisiert. Lediglich ein Versuch der Versuchsreihe mit 100 V Ladespannung weist noch ca. 1 g/l Glucose auf.

Die Betrachtung des Glucoseabbaus zeigt zusammenfassend, dass kleine Unterschiede im Stoffwechsel der Hefepopulationen während der Lag-Phase auftraten, sich diese jedoch im weiteren Verlauf ausglich.

Abbildung 40 zeigt die gemittelte Veränderung der Maltosekonzentration, bezogen auf die Ausgangsgehalte in den Fermentationsmedien der verschiedenen Versuchsreihen bei 14 °C. Bis 38 h nach Fermentationsbeginn wurde über alle Versuchsreihen hinweg nahezu keine Maltose abgebaut. Erst nach 38 h sind

zwischen 10 und 20 g/l metabolisiert. Unter Berücksichtigung der Schwankungen der Einzelversuche kann keine Signifikanz im Unterschied zwischen den Versuchsreihen festgestellt werden. Lediglich die Versuche mit 250 V Ladespannung scheinen in der Tendenz einen geringeren Maltoseabbau zu zeigen, welcher ca. 5 g/l Unterschied ausmacht. Dieser Unterschied besteht auch nach 44 h fort und beträgt dann im Mittel circa 8 g/l. Dies ist insofern auffällig, da diese Versuchsreihe im Mittel nach 38 und 44 h tendenziell höhere Lebendzellkonzentrationen als die Kontrollversuche aufweisen. Dies ist ein Hinweis auf eine forcierte Nutzung des Substrates für Biomassebildung. Obwohl die Sauerstoffkonzentrationen in den Fermentern nicht gemessen wurden, kann aufgrund der gleichen Behandlung der Fermenter davon ausgegangen werden, dass die Sauerstoffgehalte über die Versuchsreihen hinweg gleich waren, was somit nicht die Ursache für die Unterschiede sein kann. Eine forcierte Biomassebildung während der Fermentation kann sowohl positiv, als auch negativ gewertet werden. In der industriellen Bierproduktion ist eine ausgeprägte Hefevermehrung für die Hefeversorgung günstig. Gleichzeitig soll ein möglichst rascher Abbau der vergärbaren Zucker und Ethanolbildung erfolgen. Inwiefern die Anregung zur Biomassebildung für die Brauerei positiv oder negativ ist, hängt schließlich auch von den vorherrschenden Produktionsbedingungen und etwaigen Defiziten ab und sollte individuell bewertet werden. Die anderen Versuchsreihen zeigen nach 44 h im Mittel keinen Unterschied im Vergleich zur Kontrolle, mit Ausnahme des Versuches mit 350 V Ladespannung. Dieser zeigt auch unter Berücksichtigung der natürlichen Schwankungen einen um 5 g/l höheren Abbau, der aber auf die höheren Lebendzellzahlen zurückgeführt werden kann (Abbildung 36). Dies gilt auch für einen Versuch bei 100 V Ladespannung. In diesem war die Lebendzellzahl bei nach 44 h ebenfalls weit höher als bei den Kontrollversuchen, wodurch der stärkere Abbau erklärt werden kann. Nach 62 h zeigen die Versuche mit 100 und 350 V einen höheren Maltoseabbau. Obwohl der Abbau der 100-V-Versuche im Mittel nur 1,3 g/l größer als die Kontrollversuche ist, zeigt ein Einzelversuch einen um 10 g/l größeren Abbau als die Nullproben. Da am Ende des Experimentes in allen Versuchsreihen noch Maltose vorhanden ist, sind geringe Unterschiede in den anfänglichen Maltosegehalten der Fermentationsmedien hier nicht relevant. Zusammenfassend zeigt sich für den Versuch mit 250 V tendenziell eine leicht forcierte Nutzung des Substrates für Biomassebildung und für manche Versuche eine beschleunigter Maltoseabbau, wobei der Versuch mit 350 V Ladespannung hervorgehoben werden kann.

Abbildung 41 zeigt die gemittelte Veränderung der Maltotriosekonzentration, bezogen auf die Ausgangsgehalte in den Fermentationsmedien der verschiedenen Versuchsreihen bei 14 °C. Auch bei Maltotriose zeigt sich erst nach 38 h ein nennenswerter Abbau. Erneut zeigen die Versuche mit 250 V Ladespannung im Vergleich zur Kontrolle leicht geringere Veränderungen der Substratkonzentration. In den anderen Versuchsreihen liegt bei den jeweiligen Einzelversuchen teils ein höherer, teils ein niedrigerer Abbau vor. Dies setzt sich für den Messzeitpunkt nach 44 h fort. Am Ende des Experimentes weisen die Versuche mit 50, 100 und 250 V Ladespannung im Mittel höhere Veränderungen des Maltotriosegehaltes als die Nullproben auf. Dabei liegen manche Einzelversuche in der Veränderung der Konzentration unter jenen der Nullproben. Lediglich beim Versuch mit 350 V Ladespannung ist die Veränderung des Gehaltes auch unter Berücksichtigung der natürlichen Schwankungen um, im Mittel, 3 g/l höher als bei den Nullproben.

Abbildung 42 zeigt die gemittelten Ethanolgehalte der Fermentationsmedien im zeitlichen Verlauf. Eine nennenswerte Bildung von Ethanol tritt erst nach 13 h ein. Die Spurengehalte zu Beginn der Fermentation sind wahrscheinlich auf eine geringfügige Bildung während der Rehydratisierung und dem damit einsetzenden Stoffwechsel der Hefezellen zurückzuführen. Unterschiede in den Konzentrationen zeigen die Versuche mit 250 V Ladespannung zu den Messzeitpunkten 18, 23, 38 und 44 h. Die Gehalte sind dabei geringer als in der Kontrolle. Dies ist mit einem geringeren Verbrauch an Zuckern erklärbar und stützt die These, dass in diesen Versuchen eine forcierte Biomassebildung stattgefunden hat. Zum Ende des Experimentes sind diese Unterschiede im Mittel jedoch nicht mehr vorhanden, was wahrscheinlich auf den ver-

stärkten Sekundärmetabolismus gegen Ende der logarithmischen Phase zurückzuführen ist. Zu den Zeitpunkten 38 und 44 h zeigen manche Einzelversuche der Versuchsreihen zum Teil erheblich höhere Ethanolgehalte als die Nullproben. Diese können auf vitalere Hefen einerseits und auf die höheren Lebendzellzahlen andererseits zurückzuführen sein. Beide möglichen Ursachen sind positiv zu bewerten, da für industrielle Anwendungen sowohl eine verstärkte Biomassebildung, als auch eine beschleunigte alkoholische Gärung vorteilhaft sein können. Manche Einzelversuche der mit PEF behandelten Versuchsreihen fallen durch höhere Gehalte auf. Bei Betrachtung der am Ende des Experimentes noch vorhandenen Maltose- und Maltotriosegehalte in den Fermentationsmedien wird deutlich, dass die Unterschiede nicht allein auf die unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen zurückzuführen sein können. Die leicht unterschiedlichen Glucosegehalte ( $\Delta_{\max} = 1,8 \text{ g/l}$ ) können folglich zu  $0,9 \text{ g/l}$  (max.) zusätzlichem Ethanol beitragen. Daraus folgt, dass einige der behandelten Hefepopulationen aufgrund einer höheren Vitalität mehr Ethanol bilden konnten als die Kontrollversuche.

Abbildung 43 zeigt die Substratverwertungskoeffizienten ( $S_v$ ) der Fermentationsversuche bei  $14 \text{ }^\circ\text{C}$  für verschiedene Zeitpunkte. Die Versuchsreihe mit  $250 \text{ V}$  Ladespannung zeigt lediglich zum Zeitpunkt 18 h in der Tendenz niedrigere Koeffizienten. Zu den anderen Zeitpunkten sind sie jenen der Nullproben sehr ähnlich. Am Ende des Experimentes scheint der  $S_v$  lediglich in der Tendenz kleiner als bei den Nullproben zu sein, wobei er sich innerhalb des Schwankungsbereiches von einem  $\sigma$  befindet und sein Unterschied zu diesem Zeitpunkt somit nicht als signifikant angesehen werden kann. Der Versuch mit  $350 \text{ V}$  Ladespannung zeigt zu einzelnen Zeitpunkten stark unterschiedliche Koeffizienten. So ist er nach 18 h ebenfalls höher als bei den anderen Versuchen, was sich bereits für den Versuch bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  zeigte. Möglicherweise haben sich die Zellen der Population nach 18 h noch nicht auf die Nutzung des noch vorhandenen Sauerstoffs eingestellt und das Substrat für die Bildung von Ethanol genutzt. Zu späteren Zeitpunkten ist der Koeffizient geringer als jener der Nullproben und liegt bei 38 und 62 h außerhalb des Schwankungsbereiches, wodurch eine gewisse Signifikanz für einen Unterschied angenommen werden kann. Der Substratverwertungskoeffizient kann somit zeigen, dass die PEF-Behandlung zumindest vereinzelt eine Auswirkung auf die Substratverwertung von Hefezellpopulationen hat.

Die Nullproben fallen insgesamt durch sehr niedrige Schwankungen der Stoffkonzentrationen in den Fermentationsversuchen auf. Jene der Versuche mit PEF-Behandlung sind teils viel größer. Für die mikrobiologischen Kennzahlen sind die Unterschiede in den Schwankungen zwischen den PEF-behandelten Proben und Kontrollen weniger stark ausgeprägt. Für die Propagationsversuche kann diese Beobachtung nicht gemacht werden. Die geringen Schwankungen innerhalb der Versuchsreihe der Kontrolle sind grundsätzlich positiv, da dies für eine gewisse Reproduzierbarkeit des Versuchsaufbaus spricht. Die höheren Schwankungen innerhalb der Versuchsreihen mit PEF-Behandlung legen einen Effekt auf die Populationen nahe, welcher jedoch nicht unterschiedliche Auswirkungen zu haben scheint. Für eine industrielle Anwendung wäre ein reproduzierbarer oder steuerbarer Effekt vorteilhaft. Hieraus kann insgesamt **weiterer Forschungsbedarf** abgeleitet werden, welcher das Ziel hat, die Ursachen der Schwankungen aufzudecken und diese im besten Fall zu minimieren.

### Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse

Im Rahmen dieses Vorhabens wurde eine Pilotanlage zur Erzeugung gepulster elektrischer Felder für den Einsatz in der Brau- und Getränkeindustrie gebaut und erfolgreich in das Technikum der VLB implementiert. Diese konnte für die Durchführung von Experimenten im Technikumsmaßstab in Betrieb genommen werden. In den Experimenten wurde ein potentieller Effekt einer Behandlung gepulster Elektrischer Felder (PEF) auf Hefepopulationen untersucht. Bei der Auswertung der aufgenommenen Daten konnten Hinweise für Effekte der PEF-Behandlung gefunden werden. Die Behandlung scheint sich insgesamt tendenziell positiv auf die Gesamt- und Lebendzellzahlen während der Hefepropagation und Fermentation von

Bierwürze auszuwirken. Vor allem eine regelmäßige Applikation von elektrischen Feldstärken von ca. 0,5 kV/cm bei 65 Hz zeigte einen deutlichen Unterschied zu Kontrollversuchen ohne PEF-Behandlung. Es zeigte sich zudem, dass eine PEF-Behandlung eine partiell hemmende Wirkung auf Hefepopulationen haben kann. Sie geben zudem Hinweise auf die in der Literatur genannten hormetischen Effekte, nach Zufügen eines Stresses mittels PEF. Zudem konnte in manchen Versuchen eine forcierte Biomassebildung nach PEF-Behandlung festgestellt werden. Durch die Versuche konnten zu hohe und zu niedrige Intensitäten der PEF-Behandlung identifiziert und ein Bereich für günstige Parameter festgelegt werden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine wiederholte PEF-Behandlung mit elektrischen Feldstärken von 1,3 - 1,5 kV/cm einen stark inhibierenden Effekt auf Hefepopulationen haben kann. Die Versuche von HERTEL, DILLENBURGER & KERN<sup>25</sup>, sowie von MATTAR, TURK ET AL<sup>26</sup> konnten in Ansätzen bestätigt werden. Weiterhin konnten bereits viele Erkenntnisse und Ansätze für eine Weiterentwicklung der PEF-Hefepropagationsanlage mit dem Ziel der Marktreife gewonnen werden. Die Vorlauforschung kann insgesamt als positiv abgeschlossen betrachtet werden.

### 3. Bewertung der erzielten Ergebnisse in Gegenüberstellung mit den Zielsetzungen des Antrages, Bezugnahme auf die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

#### 3.1. Bewertung der erzielten Ergebnisse in Gegenüberstellung mit den Zielsetzungen des Antrages

##### AP 1: Versuchsplanung

Obwohl die Konstruktion und Auslieferung der KEA-Hefevitalisierungsanlage mit Komplikationen verbunden und somit verzögert war, konnte sie insgesamt erfolgreich konstruiert und in Betrieb genommen werden. Da es sich bei der PEF-Technologie um eine vergleichsweise neue handelt, war das Risiko für Komplikationen und Verzögerungen generell höher als bei etablierten Technologien. Durch gute Zusammenarbeit und Flexibilität der Beteiligten konnten die Ziele dieses Arbeitspaketes schließlich erfolgreich erfüllt und Erfahrungen für potentielle Folgeprojekte gesammelt werden.

##### AP 2: Implementierung des Versuchsaufbaus in der Brauerei

Dieses AP konnte ebenfalls erfolgreich umgesetzt werden, auch wenn die Implementierung mit vielen Komplikationen und Nachjustierungen verbunden und deshalb weitaus zeitintensiver war, als ursprünglich geplant. Insgesamt ließ sich die PEF-Anlage in die bestehende Propagationsanlage integrieren und Reinigungs- und Desinfektionsabläufe konnten angepasst werden. Auch der regelmäßige, zeitliche Aufwand für die Vor- und Nachbereitung der Versuche stellte sich als weitaus größer heraus als angenommen, konnte jedoch in Hinblick auf die Prozesssicherheit nicht reduziert werden. Da er für den Erfolg der Versuche essentiell ist, kann er als angemessen bewertet werden. Im Verlauf des Projektes stellte sich eine gewisse Routine in den Abläufen ein, was für die Übertragung auf eine industrielle Anwendung positiv zu bewerten ist. Es konnten jedoch wertvolle Erkenntnisse für die Optimierung der Pilotanlage gewonnen und formuliert werden.

##### AP 3 + AP 4

Die in diesen Arbeitspaketen erzielten Ergebnisse erfüllen die Zielstellungen des Antrages in Hinsicht auf den Nachweis von positiven Effekten der PEF-Technologie auf die Hefeviabilität und -vitalität. Die für diese Arbeitspakete geleistete Arbeit war größer als erwartet, da vor und während der Bearbeitung zusätzliche,

---

<sup>25</sup> Hertel, M.; Dillenburg, M, Kern, M., 2011, S. 154–157.

<sup>26</sup> Mattar, J.; Turk, M. et al, 2013, o.S.

für Vorlaufforschung typische Komplikationen gelöst werden mussten. Auch war der Aufwand für die Vor- und Nachbereitung der Propagationsanlage, sowie die Herstellung des Propagations- und Fermentationsmediums höher, als bei Experimenten in kleinerem Maßstab.

### **Weitere Arbeitspakete**

Weitere Arbeitspakete des Antrages wurden nicht bearbeitet, da viel Arbeit in die Bearbeitung neu aufgetretener Fragestellungen und Problemstellungen investiert wurde. Diese nicht kalkulierbaren, aber für Vorlaufforschung typische, Fragestellungen waren so arbeitsaufwändig, dass sie als eigene Arbeitspakete angesehen werden können. Dazu zählen beispielsweise die Untersuchung der Korrosionserscheinungen mit aufwändiger Spezialanalytik, die Überarbeitung des Reaktors sowie die Untersuchung des Verhaltens von Lade und Pulsspannung. Ihre erfolgreiche Bearbeitung generierte zusätzliches Wissen über eine potentielle Anwendung der PEF-Technologie in der Industrie, weshalb die investierte Zeit und Arbeit als angemessen bewertet werden kann. Der regelmäßige Arbeits- und Zeitaufwand für das Warten und Instandhalten der Anlage sowie das Lösen akuter Probleme müssen auch berücksichtigt werden. Vor diesem Hintergrund ist der Umfang der bearbeiteten Arbeitspakete und die darin erhobenen Daten und erzielten Ergebnisse angemessen.

## **3.2. Bezugnahme auf die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit**

Das Projekt wurde durch fünf wissenschaftliche Mitarbeiter (Qualifikation A) sowie zwei Laboranten (Qualifikation C) der VLB Berlin bearbeitet. Je nach Intensität wurden bestimmte Arbeitspakete gleichzeitig durch alle Mitarbeiter parallel bearbeitet. Innerhalb der Laufzeit von 24 Monaten wurden insgesamt 50,13 Personenmonate (PM) an dem Projekt gearbeitet. Die geleistete Arbeit lag rund 11,27 % unter der kalkulierten Kapazitätsplanung von 56,5 PM. Die eingesetzten Personalressourcen waren für die Durchführung dieses anspruchsvollen Projekts notwendig, die geleistete Arbeit der Zielstellung angemessen.

## **3.3. Bezugnahme auf die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises**

Die für das Projekt eingeplanten Ausgaben sind mit geringen Abweichungen (Mehrausgaben) von 9.257,32 € (+2,49 %) so, wie ursprünglich geplant, eingetreten.

### **3.3.1. Personalausgaben**

Die tatsächlichen Ausgaben für das eingesetzte Personal lagen mit 157.856 € bei rund 106,71 % der ursprünglich geplanten Ausgaben.

### **3.3.2. Allgemeine Ausgaben**

Die Allgemeinen Ausgaben wurden wie geplant berücksichtigt. Die Vorkalkulation, für die pauschal 90 % der Personalkosten angesetzt wurden, stimmte mit den tatsächlichen Kosten gut überein (siehe zahlenmäßiger Nachweis).

### **3.3.3. Ausgaben für Material und Kleingeräte**

Die tatsächlichen Ausgaben für Material und Kleingeräte lagen mit 16.407 € bei rund 63,10% der geplanten Werte. Grund hierfür ist, dass bereits beim Zuwendungsempfänger vorhandenes Material, speziell Verbrauchsmaterial, teilweise eingesetzt werden konnte.

### 3.3.4. Ausgaben für Einzelgeräte

Um die Effekte der Pulsed-Electric-Field Technologie auf Hefepopulationen zu untersuchen, musste ein entsprechendes Gerät in ausreichender Dimensionierung geplant und konstruiert werden. Dies wurde durch den Projektpartner der Firma KEA-TEC erfolgreich ausgeführt. Da es sich hierbei um eine nicht seriengefertigte Anlage handelte, sind die dafür entstandenen Kosten gerechtfertigt. Der Projektpartner bot bei Problemen und Rückfragen Hilfestellung und Lösungen an, ohne diese zusätzlich zu berechnen. Auch der Umbau des Reaktors sowie der Austausch der Elektrodenhalterungen wurden auf Kulanzbasis vorgenommen.

Die tatsächlichen Ausgaben für dieses Einzelgerät lagen bei 64.736 € genau im geplanten Bereich.

## 4. Darstellung der Innovationspotenziale und Applikationsmöglichkeiten

Da PEF-Experimente meist im Kleinst- oder Labormaßstab durchgeführt werden, ist der in diesem Projekt angewendete Maßstab als Novum anzusehen. Die wissenschaftliche Bedeutung ist, trotz aller offenen Fragen, als nicht-geringfügig einzuschätzen. Unter Berücksichtigung der durch das Upscaling entstandenen Risiken im Versuchsaufbau können die Ergebnisse als wissenschaftlich wertvoll bewertet werden. Für die Erhöhung der Evidenz ist jedoch weitere Forschung notwendig.

Die in dem Projekt gewonnenen technologischen Erkenntnisse zu Verbesserungspotentialen der PEF-Hefepropagationsanlage können in **Folgeprojekten** angewendet werden.

Aus den Vorhabensergebnissen ergeben sich Anwendungspotentiale in der Brauereiindustrie, welche sich möglicherweise auch auf Branchen der Biotechnologie ausweiten lassen. In der Brau- und Getränkeindustrie bieten sich Anwendungen im Hefemanagement – also der Hefepropagation und der Fermentation von Getränken – an. Das Potential der Anwendung ergibt sich aus der Vitalitäts- und Viabilitätssteigerung der Hefepopulationen, wodurch die Effizienz der damit verbundenen Prozesse gesteigert und Kapazitäten ausgeweitet werden könnten. Die Applikation könnte, ähnlich wie in diesem Projekt bereits erprobt, durch die Integration einer PEF-Anlage in bestehende Anlagen zur Propagation oder Fermentation zum Umpumpen und behandeln von Zellsuspensionen erfolgen. Da viele Produkte der Biotechnologie auf der Vermehrung oder dem Metabolismus von Hefepopulationen basieren, sind die Anwendungsbereiche weitaus vielfältiger und die Potentiale, auch monetär, entsprechend höher, als in der Brauereiindustrie. Zum jetzigen Forschungsstand kann das exakte Ausmaß des Potentials nicht mit ausreichender Sicherheit beziffert werden. Sollten sich die in den Experimenten gezeigten positiven Tendenzen durch weitere Forschung bestätigen, ist das Potential als groß zu bewerten. Weitere Forschung bietet sich aus den genannten Gründen folglich an.

Da sich aus dem Projekt neue Fragestellungen für weitere Forschung ergeben haben, das Potential weiterhin hoch ist und die Hauptinvestition in eine Anlage mit PEF-Technologie bereits getätigt wurde, sind die Perspektiven und Chancen für anschließende Entwicklungsarbeiten hoch. Für diese bietet sich marktorientierte Forschung an.

## 5. Angaben zu erworbenen bzw. angemeldeten Schutzrechten für Vorhabensergebnisse

Im Rahmen des Projektes und der erzielten Ergebnisse wurden keine Schutzrechte angemeldet. Die Nutzung des vorhandenen Patents wurde im Rahmen eines Lizenzvertrages für die Dauer des Projekts sowie fünf Jahre darüber hinaus geregelt.

## 6. Zusammenstellung aller erfolgten bzw. geplanten Veröffentlichungen

Erfolgte Veröffentlichungen: keine

Geplante Veröffentlichungen: Zwecks Ergebnisverwertung sollen die Vorhabensergebnisse auf den VLB-durchgeführten Seminaren, Symposien und Tagungen, welche sich mit den wissenschaftlich-technischen Neuheiten beschäftigen, vorgestellt werden. Diese fungieren als Multiplikator für die Wissensverbreitung in der Industrie und steigern das Interesse für Technologien. Weiterhin sind Print-Publikationen in den VLB-eigenen Formaten wie dem „Brauerei-Forum“ sowie der „Brewing Science“ geplant. Aus der genannten inhaltlichen Verwendung für die VLB Veranstaltungen ergibt sich die eigene Nutzung sowie der Technologietransfer. Ein Know-how-Verkauf ist zum aktuellen Stand der Forschung unwahrscheinlich. Auf diesem Projekt aufbauende Forschung könnte dies jedoch ermöglichen.

## 7. Literaturverzeichnis

- Annemüller, Gerolf; Manger, Hans-J.; Lietz, Peter: Die Hefe in der Brauerei. Hefemanagement, Kulturhefe - Hefereinzucht, Hefepropagation im Bierherstellungsprozess. 2., überarb. Aufl., 2008, Berlin: VLB Berlin (VLB-Fachbücher); S 13.
- Donsi, G.; Ferrari, G.; Pataro, G.: Inactivation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields in a batch treatment chamber: The effect of electric field unevenness and initial cell concentration. In: Journal of Food Engineering, Volume 78, Issue 3, 2007, S. 784–792.
- Gad, A.; Jayaram, S.: Electrode Material Migration During Pulsed Electric Field (PEF) Treatment. Proc. ESA Annual Meeting on Electrostatics, 2011, online verfügbar unter: [https://www.researchgate.net/profile/S\\_Jayaram/publication/267219343\\_Electrode\\_Material\\_Migration\\_During\\_Pulsed\\_Electric\\_Field\\_PEF\\_Treatment/links/571b82d508ae408367bd6f9f.pdf](https://www.researchgate.net/profile/S_Jayaram/publication/267219343_Electrode_Material_Migration_During_Pulsed_Electric_Field_PEF_Treatment/links/571b82d508ae408367bd6f9f.pdf), zuletzt aufgerufen am 23.10.2019
- Góngora-Nieto, M. M.; Sepúlveda, D. R.; Pedrow, P.; Barbosa-Cánovas, G. V.; Swanson, B. G.: Food Processing by Pulsed Electric Fields: Treatment Delivery, Inactivation Level, and Regulatory Aspects. In: LWT - Food Science and Technology, Volume 35, Issue 5, 2002, Seiten: 375-388
- Hertel, M.; Dillenburger, M, Kern, M.: Elektrische Poration: Ein neuer Ansatz zur Hefevitalisierung. In: Brauwelt (5-6), 2011, S. 154–157.
- Kotnik, T.; Kramar, P.; Pucihar, G.; Miklavcic, D.; Tarek, M.: Cell membrane electroporation-Part 1: The phenomenon. In: IEEE Electrical Insulation Magazine, Volume 28, Issue 5, 2012, S. 14-23.
- Mahnič-Kalamiza, S.; Vorobiev, E.; Miklavcic, D.: Electroporation in Food Processing and Biorefinery. The Journal of Membrane Biology, Volume 247, Issue 12, 2014, S. 1279-1304.
- Mattar, J.; Turk, M.; Nonus, M.; Lebovka, N. I.; Zakhem, H. El; Vorobiev, E.: Electro-stimulation of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts by Pulsed Electric Field and its effect on fermentation performance. 2013, Online verfügbar unter: <https://arxiv.org/vc/arxiv/papers/1304/1304.5681v1.pdf>; zuletzt aufgerufen am 11.09.2019, 10:50 Uhr.
- Morren, J.; Roodenburg, B.; De Haan, S.: Electrochemical reactions and electrode corrosion in pulsed electric field (PEF) treatment chambers. In: Innovative Food Science & Emerging Technologies, Volume 4, Issue 3, 2003, S. 285–295.
- Pataro, G.; Donsi, G.; Ferrari, G.: Modeling of Electrochemical Reactions During Pulsed Electric Field Treatment. In: Miklavcic (Hg.): Handbook of Electroporation, Springer International Publishing, Cham, 2018, S. 1059 – 1089
- Raso, J.; Frey, W.; Ferrari, G.; Pataro, G.; Knorr, D.; Teissie, J.; Miklavčič, D.: Recommendations guidelines on the key information to be reported in studies of application of PEF technology in food and biotechnological processes. In: Innovative Food Science & Emerging Technologies, Volume 37, 2016, S. 312–321
- Roodenburg, B.; Morren, J.; Berg, H.; De Haan, S.: Metal release in a stainless steel Pulsed Electric Field (PEF) system Part I. Effect of different pulse shapes; theory and experimental method. In: Innovative Food Science & Emerging Technologies, Volume 6, Issue 3, 2005, S. 327-336
- Yarmush, M.; Golberg, A.; Sersa, G.; Kotnik, T.; Miklavcic, D.: Electroporation-based technologies for medicine: principles, applications, and challenges. In: Annual Review of Biomedical Engineering, Volume 16, Issue 1, 2014, S. 295-320.

## 8. Anhang



Abbildung 1: Technischer Aufbau für Propagationsversuche, hier in Reinigungs-Konfiguration:

- 1: Auslauf Propagator
- 2: Umwälzpumpe
- 3: Einlauf PEF-Anlage / Probenahmeventil
- 4: Auslauf PEF-Anlage
- 5: Einlauf Propagator / Domarmaturen
- 6: Propagationstank / Kühlflächen
- 7: Frequenzumwandler
- 8: Sterilluftpaneel mit Luftfilter und Volumenstromregulierung



Abbildung 2: Dichtung bei Übergang Rohrleitung zu Reaktor, deutlich in den Raum ragend.



Abbildung 3: Aufnahmen der Elektroden nach verschiedenen Versuchen:

1: Versuch mit geringer Spannung

2+3: Elektrodenpaar nach Versuch mit Stadtwasser; hohe Rauigkeit der Reaktorinnenwand erkennbar

4: Versuch mit Bierwürze Spannung



Abbildung 4: Elektrode mit Belag nach Versuch bei 3.130 Volt Pulsspannung und Bierwürze als Medium.



Abbildung 5: Komplementäre, gegenüberliegende Elektrode nach Versuch mit 3.130 Volt Pulsspannung.

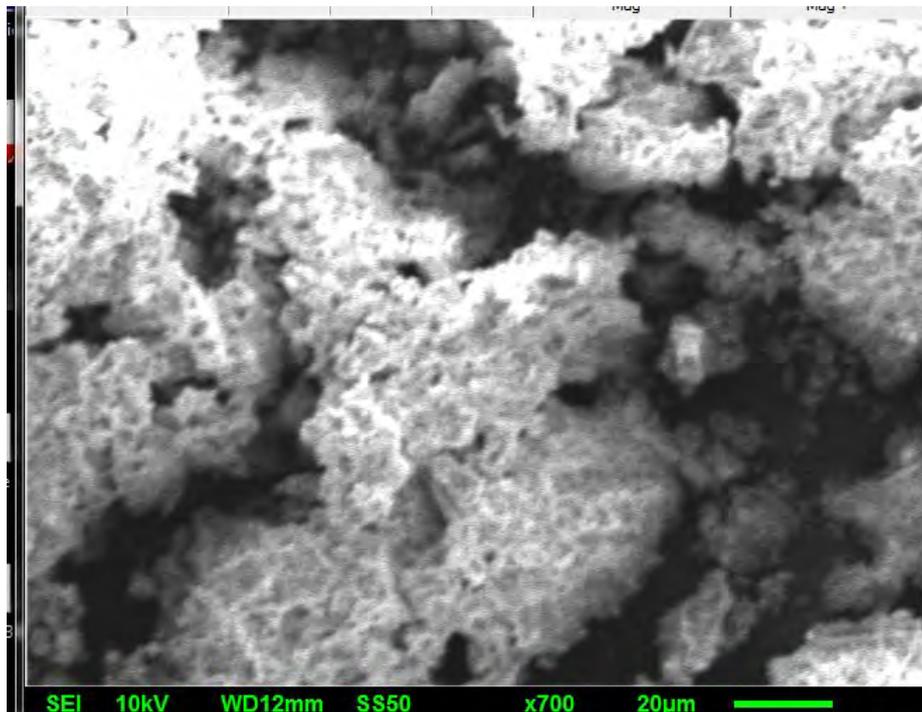


Abbildung 6: Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme (REM) einer Belag-Probe von der Oberfläche einer Elektrode nach einem Versuch mit 3.130 V Pulsspannung

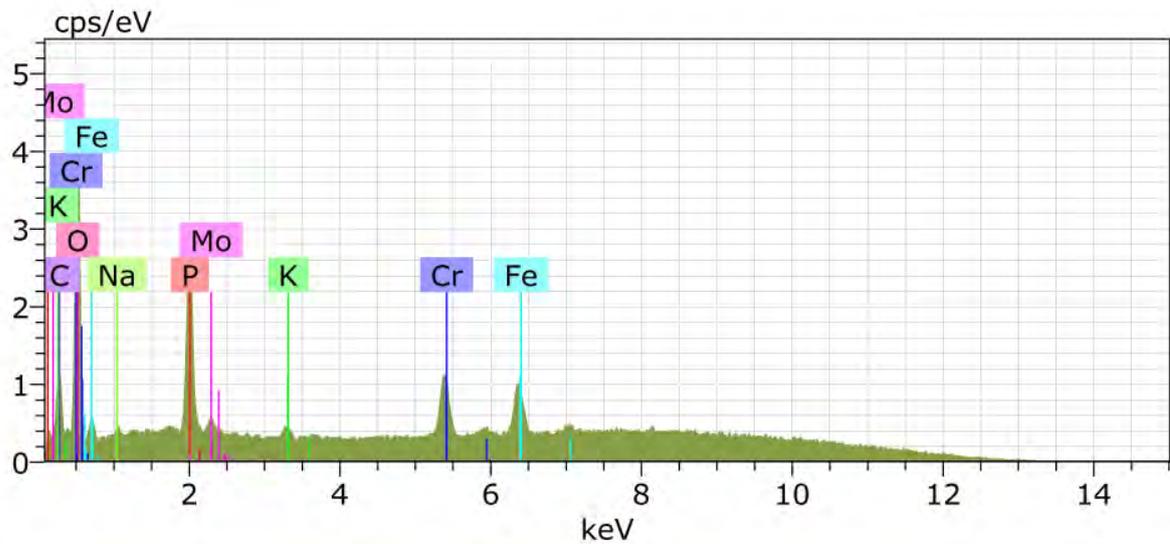


Abbildung 7: EDX-Element-Spektrum (Energiedispersive Röntgenspektroskopie) eines ausgewählten Teilbereiches des Belages einer Elektrodenoberfläche.

Tabelle 1: Konzentrationen und prozentuale Verteilung der Elemente im untersuchten Bereich der Probe

Element	Nicht normiert [% mas]	Normiert nach Atommasse (Bezug C) [% mas]	Normiert nach Gesamtanzahl Atome [%]
C	5,49	43,24	57,21
O	4,34	34,17	33,94
Na	0,06	0,51	0,35
P	1,11	8,72	4,48
K	0,05	0,43	0,17
Cr	1,07	8,40	2,57
Fe	0,58	4,54	1,29

Tabelle 2: Konzentrationen ausgewählter Metallionen in Stadtwasser vor und nach einer PEF-Behandlung

Probe	c(Chrom) [µg/l]	c(Eisen) [µg/l]	c(Nickel) [µg/l]
Stadtwasser vor PEF	< 1	11,3	4,1
Stadtwasser nach PEF	35,1	45,4	55,0



Abbildung 8: aufgrund einer kleinen Leckage ausgetretene und angetrocknete Bierwürze an Verschraubung des Reaktors.

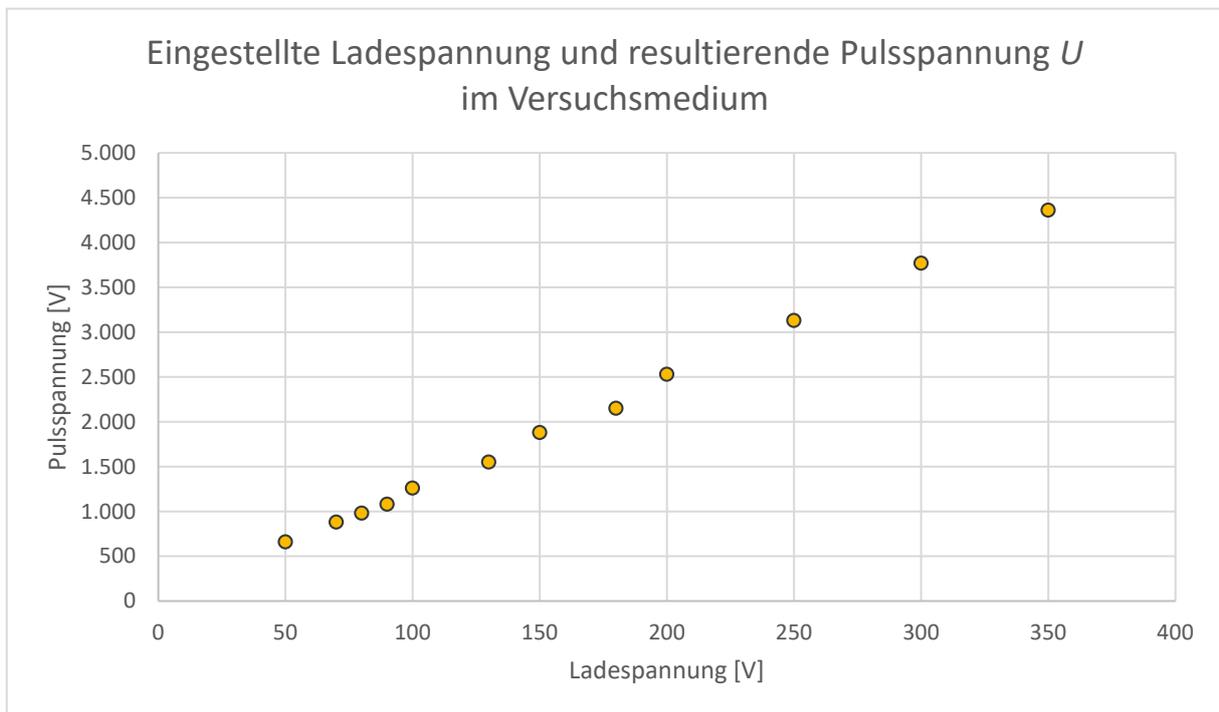


Abbildung 9: Überprüfte Ladespannung und ihre resultierende Pulsspannung im Versuchsmedium Vollbierwürze mit 11,5 °P und ca.  $15 \times 10^6$  Hefezellen/ml.

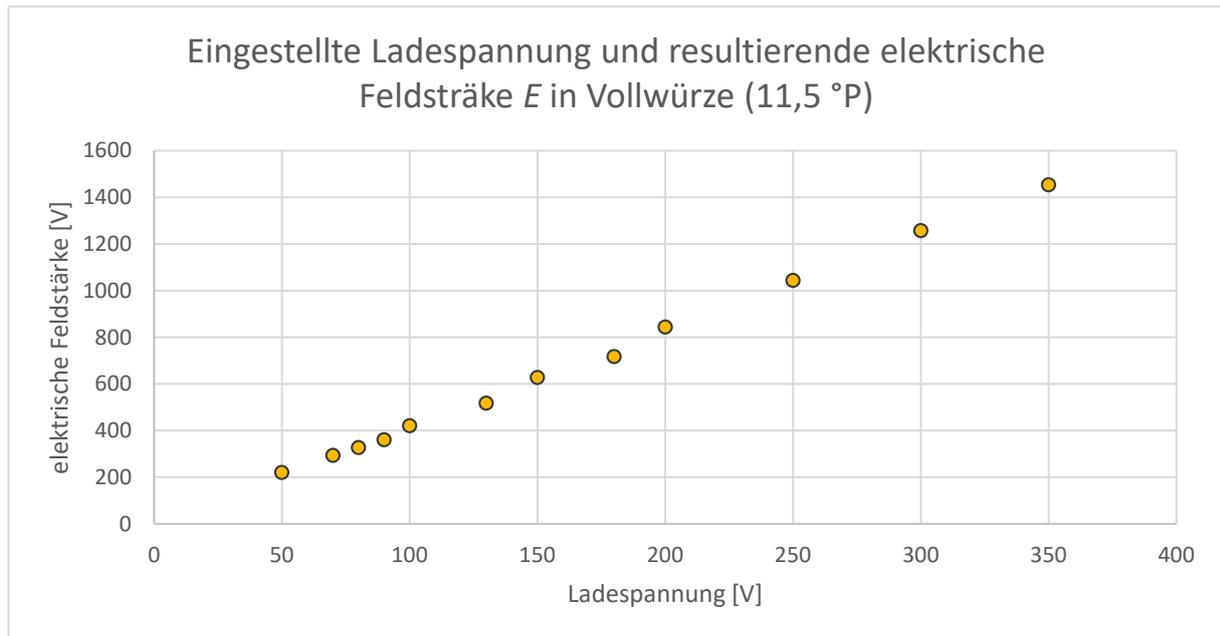


Abbildung 10: elektrische Feldstärke für 11,5 %-ige Versuchswürze mit  $15 \times 10^6$  Hefezellen in Abhängigkeit der eingestellten Ladespannung

Tabelle 3: Probenahme- und Analysenplan für die Propagationsversuche mit begleitender Fermentation in Laborfermentern

Zeitpunkt	KBE-Bestimmung	Flow Cytometrie	Gesamtzellzahl Coulter Counter	Vergärbare Zucker HPLC	pH*	Extrakt, scheinbar*
0	X					
1	X					
13						
18						
23	X	X	X	X	X	X
38						
44	X					
62	x					

\*Messung von pH- und scheinbarem Extrakt nur bei Propagationsmedium, nicht bei Fermentern. Nutzung zur täglichen Routinekontrolle.

Tabelle 4: Übersicht über relevante Informationen und Parameter für die PEF-Behandlung, sofern verfügbar

<b>PEF-Generator</b>	
Anlagenhersteller	KEA-TEC GmbH
Anlagentyp	KEA-PT/10-100/25
Spannungsversorgung	230 V AC
Pulsform	exponentiell
Pulsdauer /-weite	< 500 $\mu$ s
Pulsenergie	Max. 113 J
Ladespannung	Einstellbar, bis 500 V
Pulsspannung	einstellbar, bis 10.000 V
Elektrische Feldstärke	Max. 3333 V/cm
Pulse Protokoll	270 s Behandlung / 1800 s Pause
Frequenz	0 - 250 Hz
<b>Behandlungsreaktor</b>	
Produktberührende Werkstoffe	
Verschaltung	Polypropylen (PP)
Elektroden	V4A-Stahl
Dichtungswerkstoff	Silikon
Elektroden	
-Konfiguration	Parallel
-Abstand	$\approx$ 3 cm
-Form	stabförmig
-Länge	8,4 cm
-Durchmesser	0,6 cm
<b>Steuerungstechnik</b>	
SPS	OMRON CP1E-N CPU 24 V
Steuerspannung	24
Bedienpanel	OMRON
Sicherheitsrelais	OMRON G9SB-3012A
<b>Medium</b>	
Eingangs- Ausgangstemperatur	19,5 - 20,5 °C
pH	5,24 – 3,35 / im Verlauf des Experiments dynamisch
Elektrische Leitfähigkeit	$\approx$ 1,3 – 1,8 mS/cm
Massestrom	$\approx$ 0,32 kg/s

Tabelle 5: Für die Versuchsreihen angewendete Lade- und Pulsspannungen, sowie Frequenzen

Ladespannung [V]	Pulsspannung gemessen [V]	Elektrische Feldstärke $E$ [V/cm]	Frequenz [Hz]	Wiederholungen
0*	-	-	-	2
50	660	220	120	1
100	1.260	420	65	3
150	1.880	627	47	1
250	3.130	1.043	29	2
350	4.360	1.453	21	1
*Nullprobe / Referenzversuch ohne PEF Behandlung (AP 3)				



Abbildung 11: PEF-Reaktor, Ansicht außen

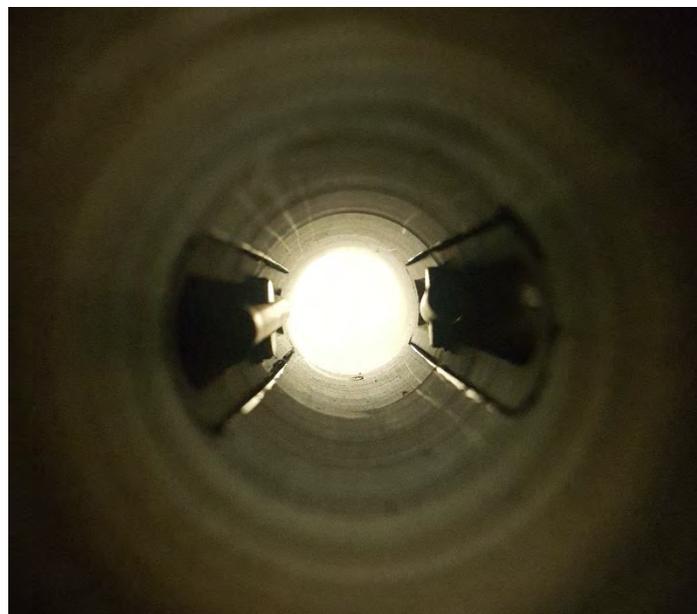


Abbildung 12: Querschnitt durch überarbeiteten Reaktor mit Blick auf die Elektroden

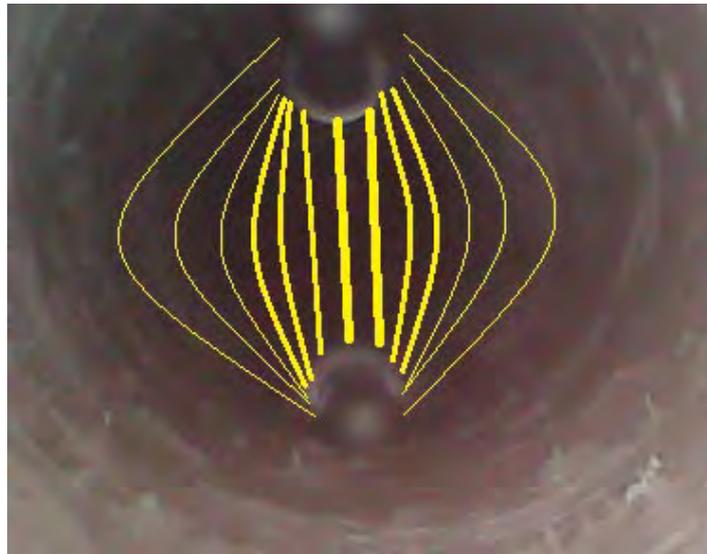


Abbildung 13: Querschnitt durch Reaktor (nicht-überarbeitete Version mit rauer Innenwand) mit Blick auf Elektroden und schematisch eingezeichneten (theoretischen) elektrischen Feldlinien

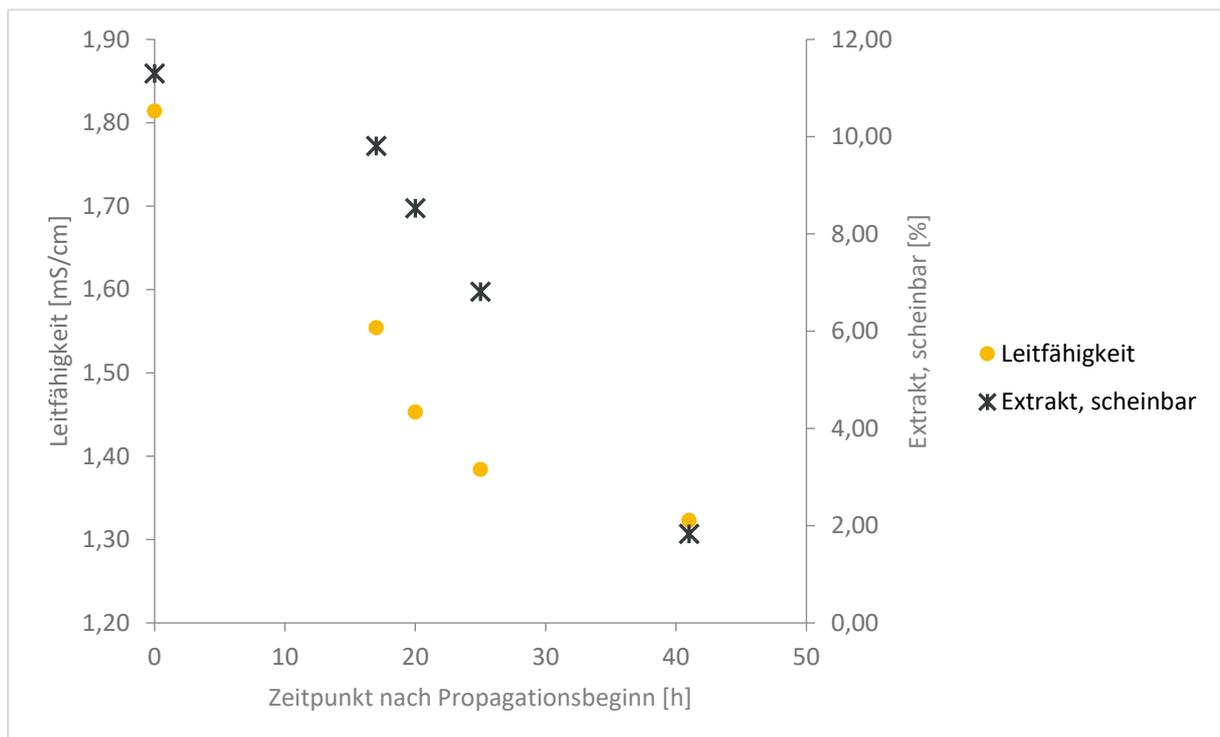


Abbildung 14: Veränderung der Leitfähigkeit und des scheinbaren Extraktes im Verlauf der Propagation

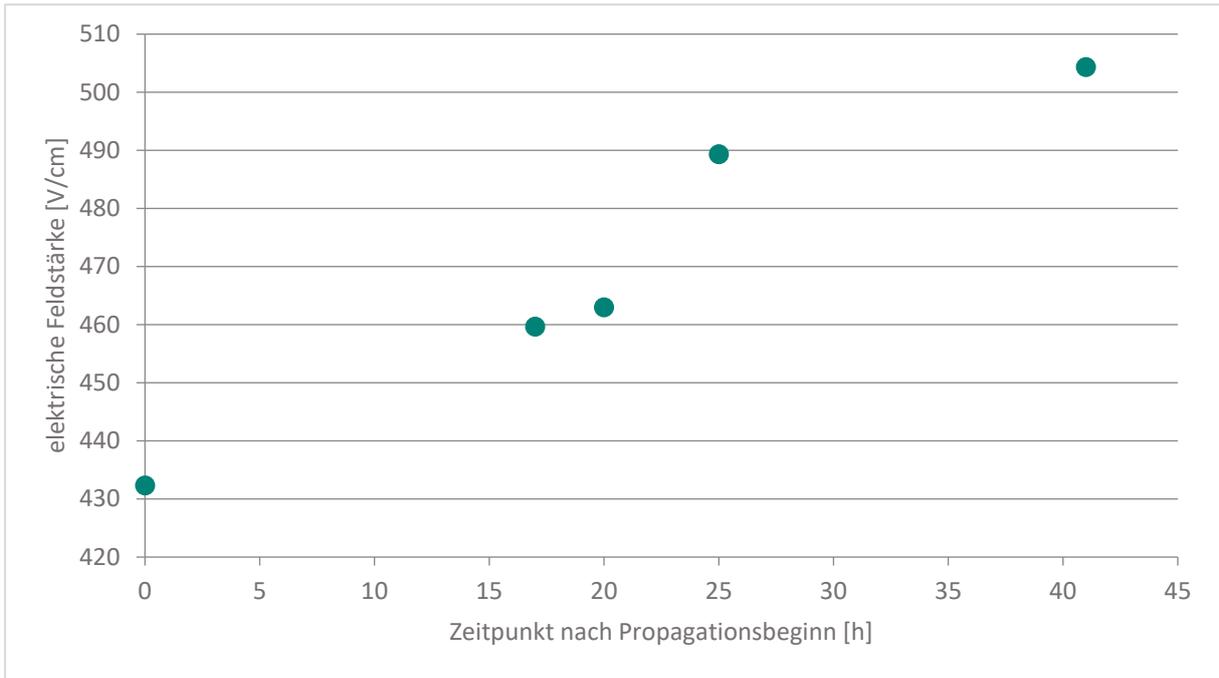


Abbildung 15: Veränderung der elektrischen Feldstärke bei 100 V Ladespannung im Verlauf der Propagation

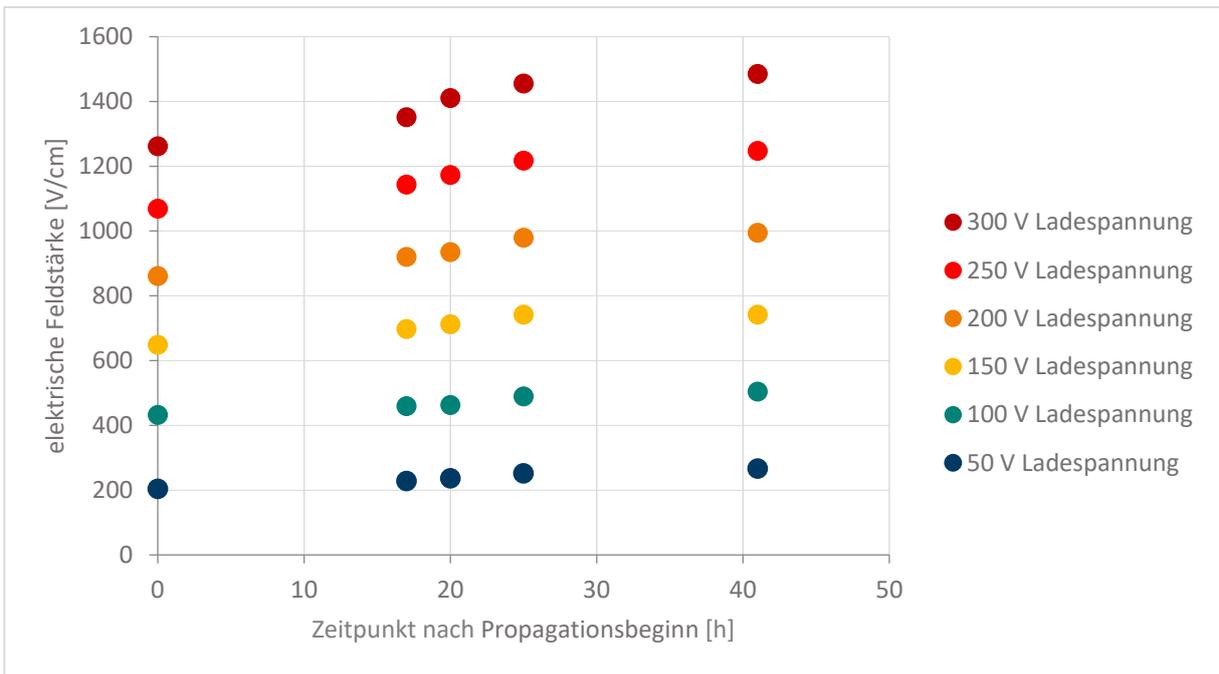


Abbildung 16: Veränderung der elektrischen Feldstärken bei verschiedenen Ladespannungen im Verlauf der Propagation

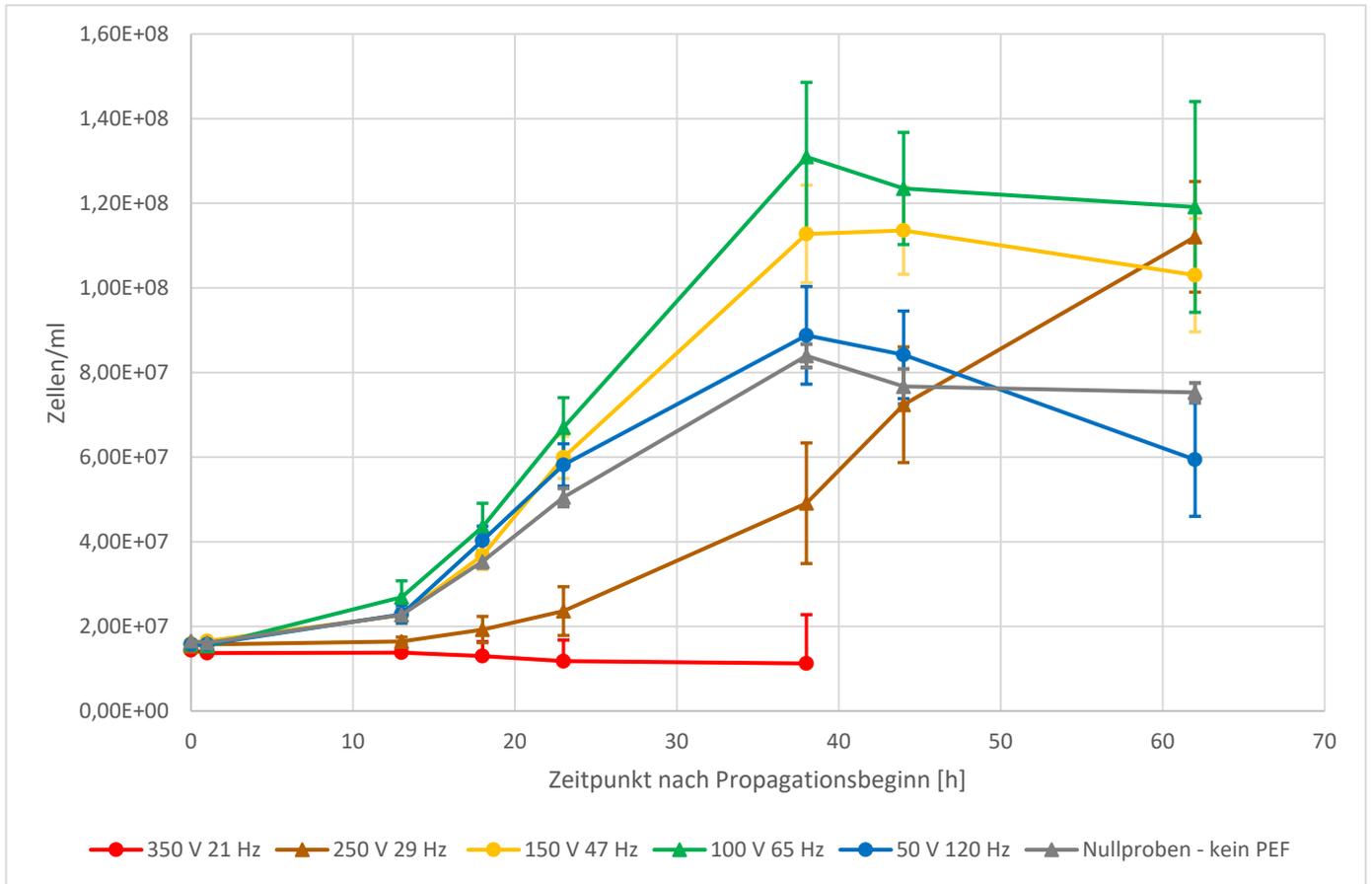


Abbildung 17: Gesamtzellzahl der Populationen, gemittelt aus Messungen von Coulter Counter und Flowcytometer

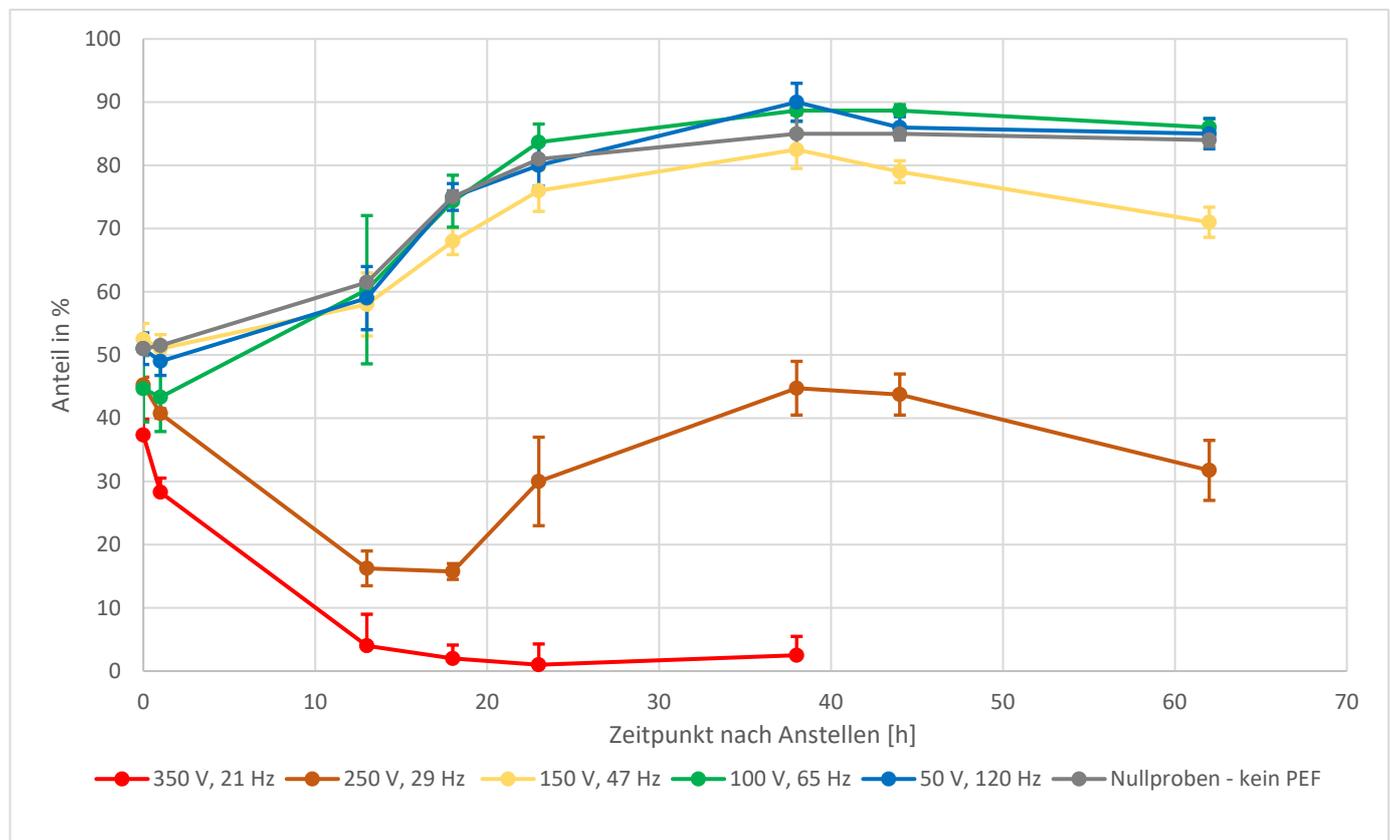


Abbildung 18: Verlauf des Anteils viable Zellen bei verschiedenen PEF-Behandlungen nach kombinierter Färbung und Fluoreszenzmessung im Durchflusscytometer

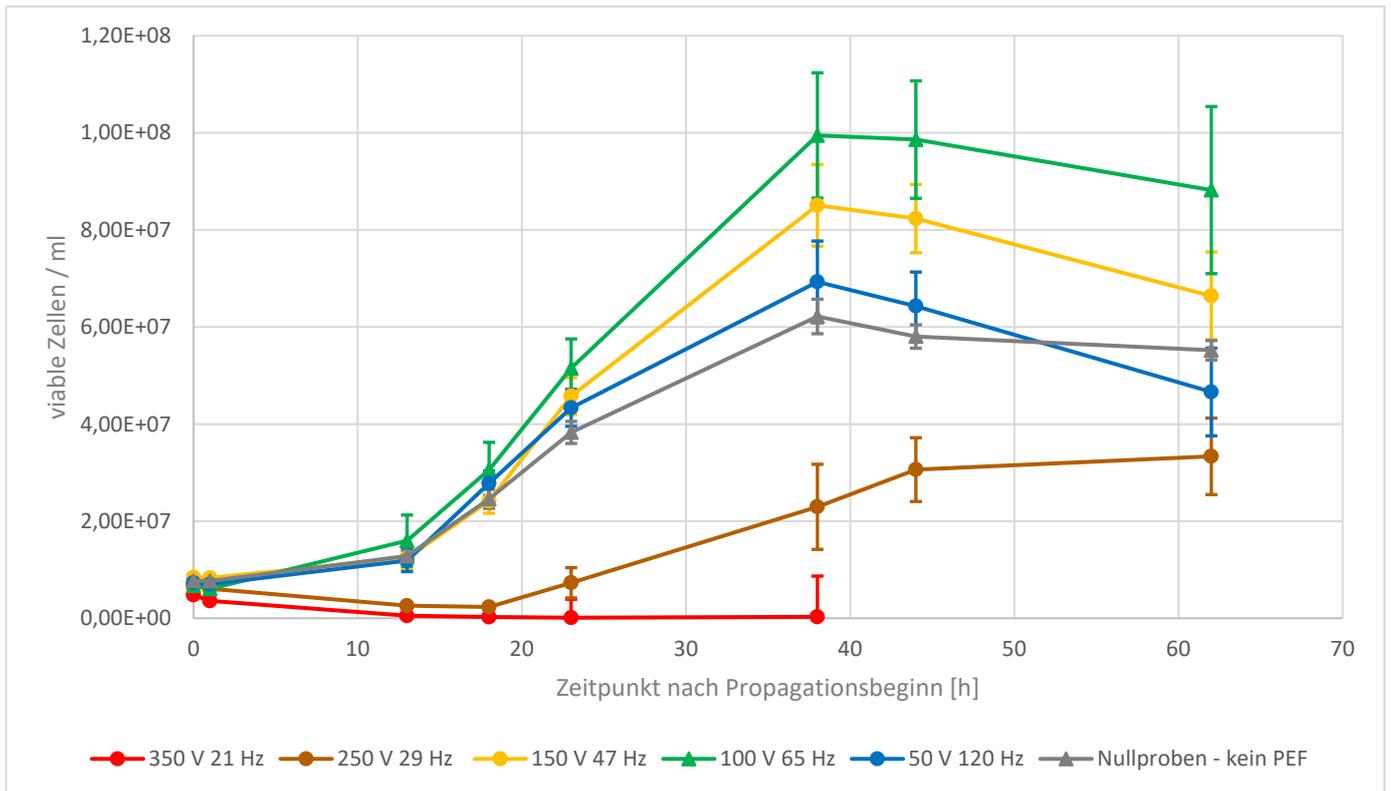


Abbildung 19: Zelldichte viable Zellen der verschiedenen Propagationen über den zeitlichen Verlauf hinweg

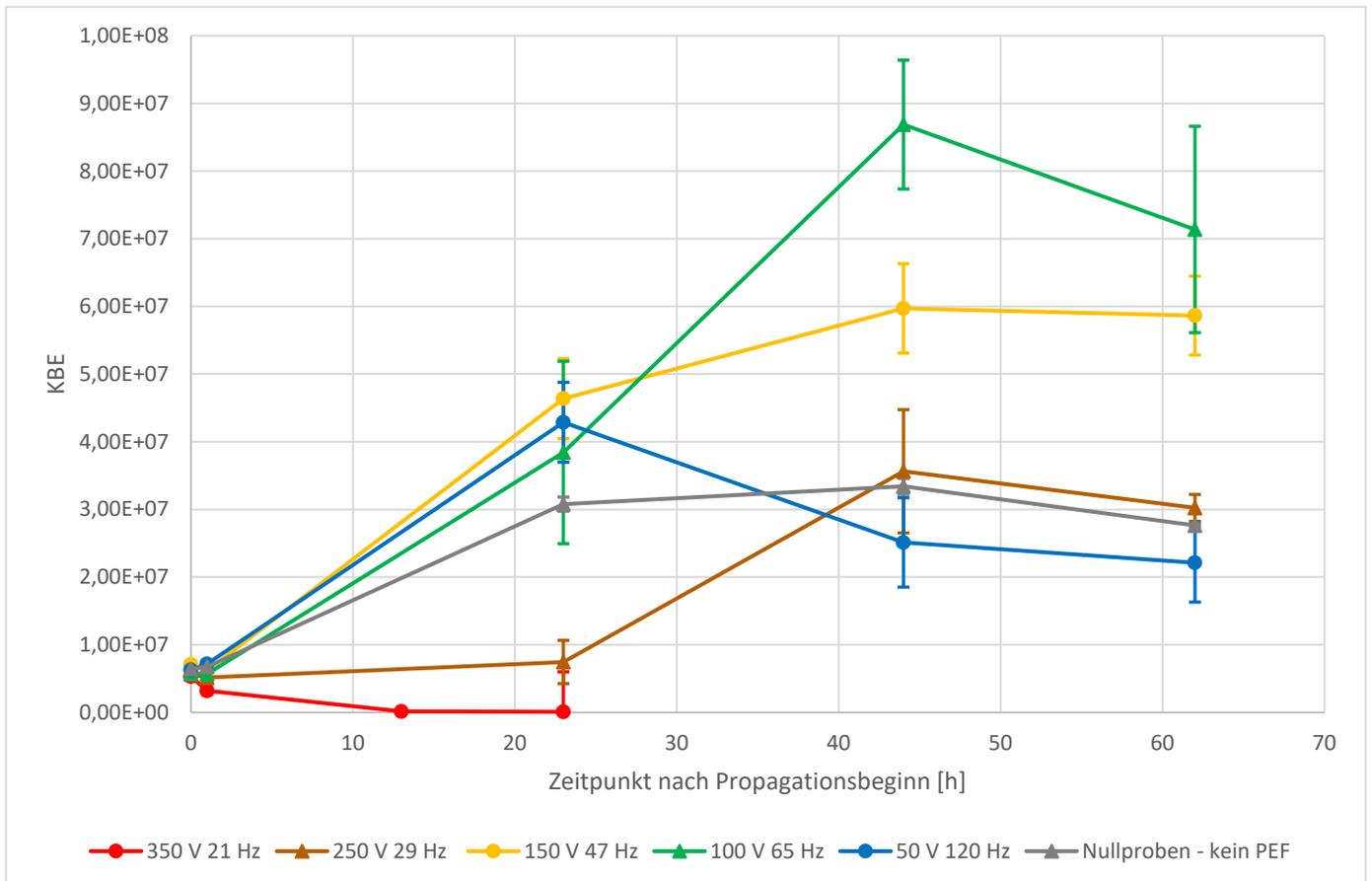


Abbildung 20: Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) der Hefezellpopulationen bei verschiedenen PEF-Behandlungen

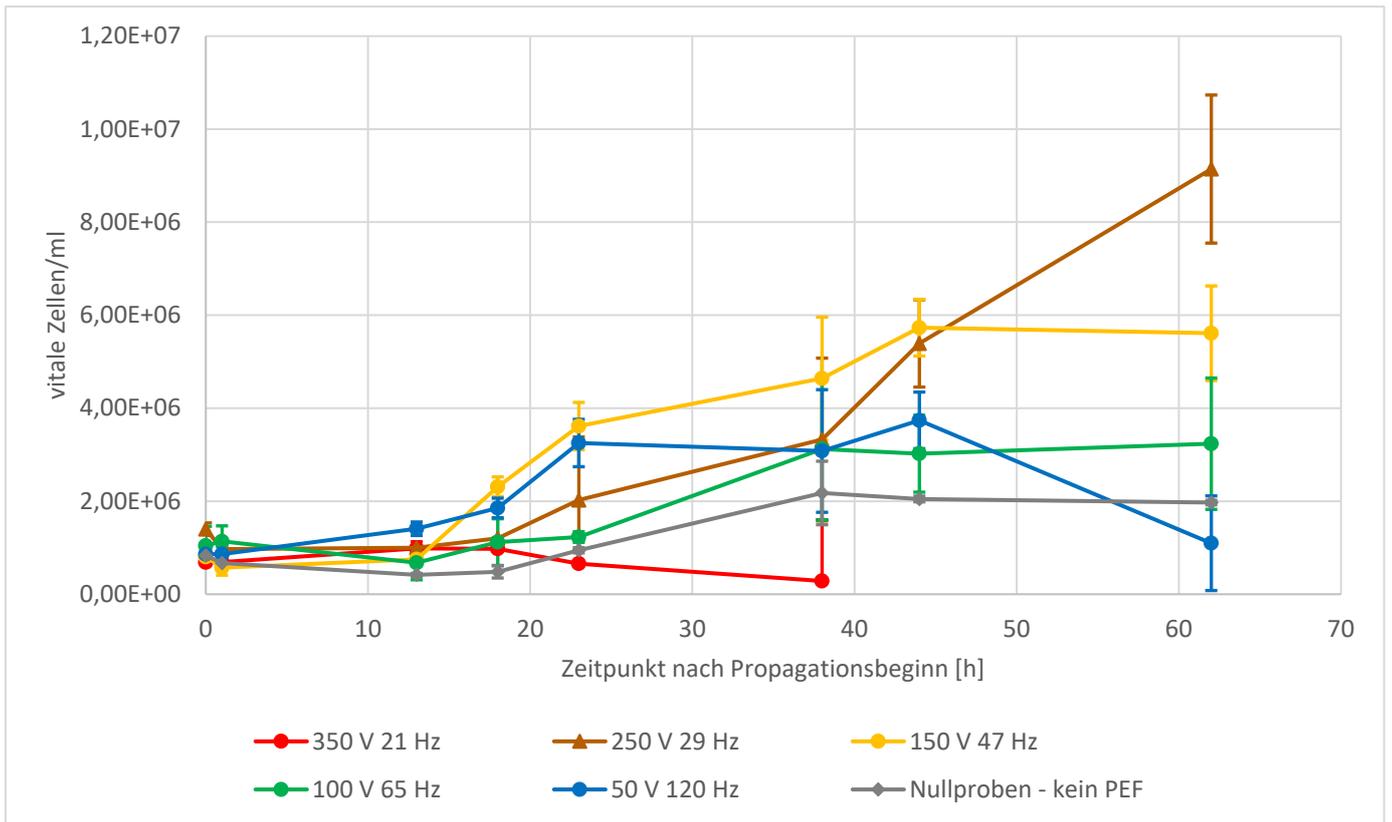


Abbildung 21: vitale Zellen (PI und Fluorescein-Diacetat positiv gefärbt) der Populationen bei verschiedenen PEF-Behandlungen

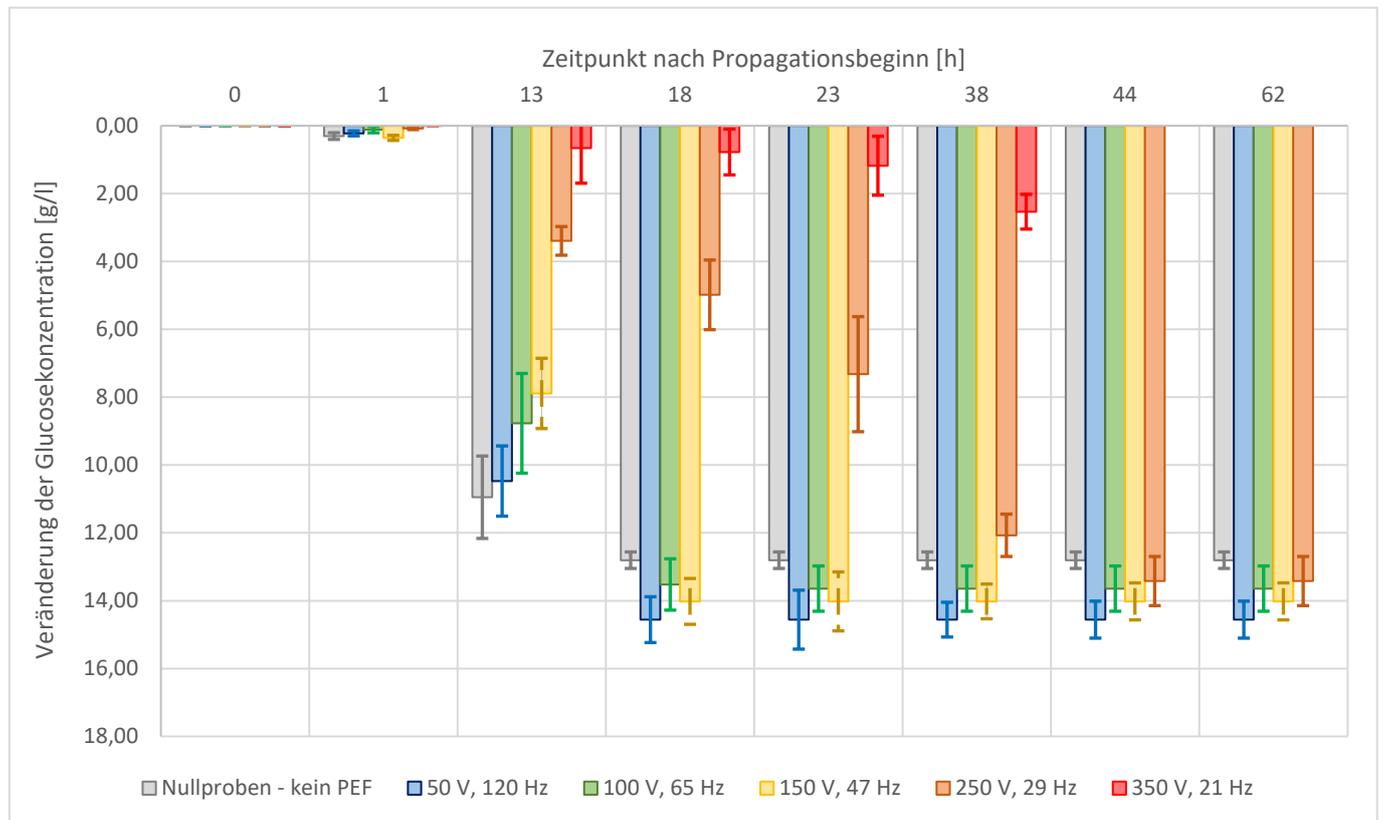


Abbildung 22: Mittlerer Glucoseabbau der Propagationen mit verschiedenen PEF-Behandlungen im Vergleich

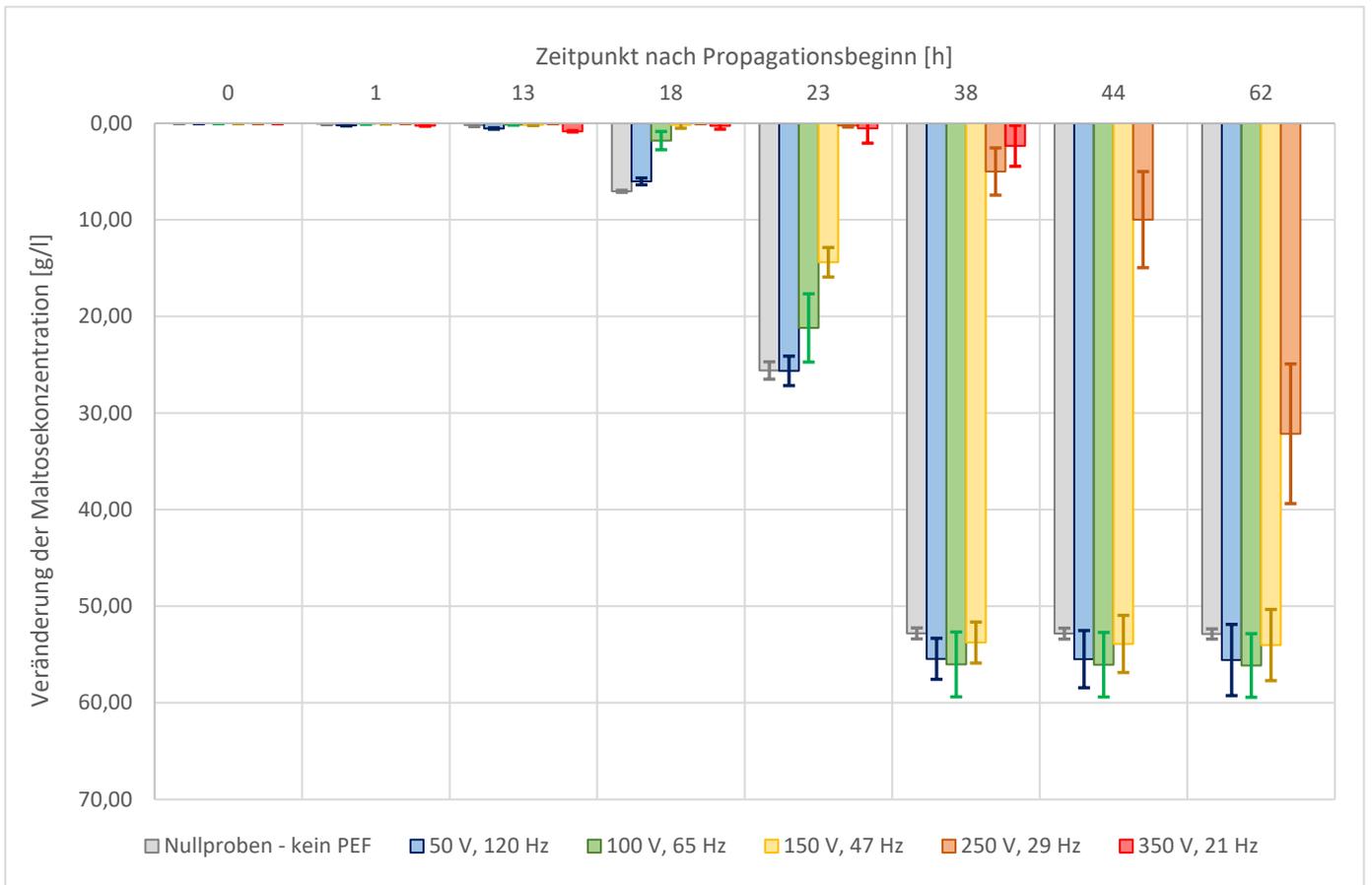


Abbildung 23: Gemittelte Veränderung der Maltosekonzentrationen der Propagationsmedien bei verschiedenen PEF-Bedingungen

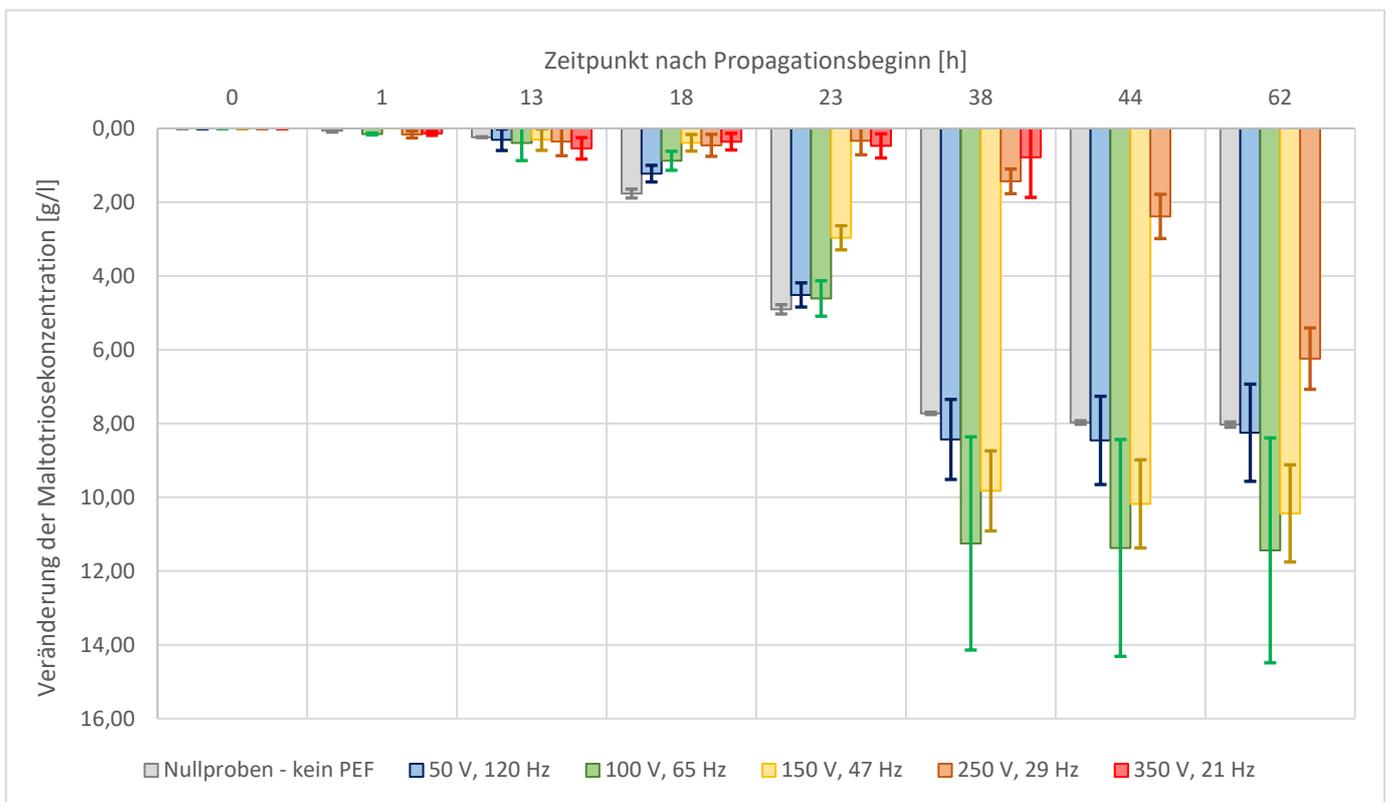


Abbildung 24: gemittelte Veränderung der Maltotriosekonzentrationen der Propagationsmedien bei unterschiedlichen PEF-Behandlungen im Vergleich

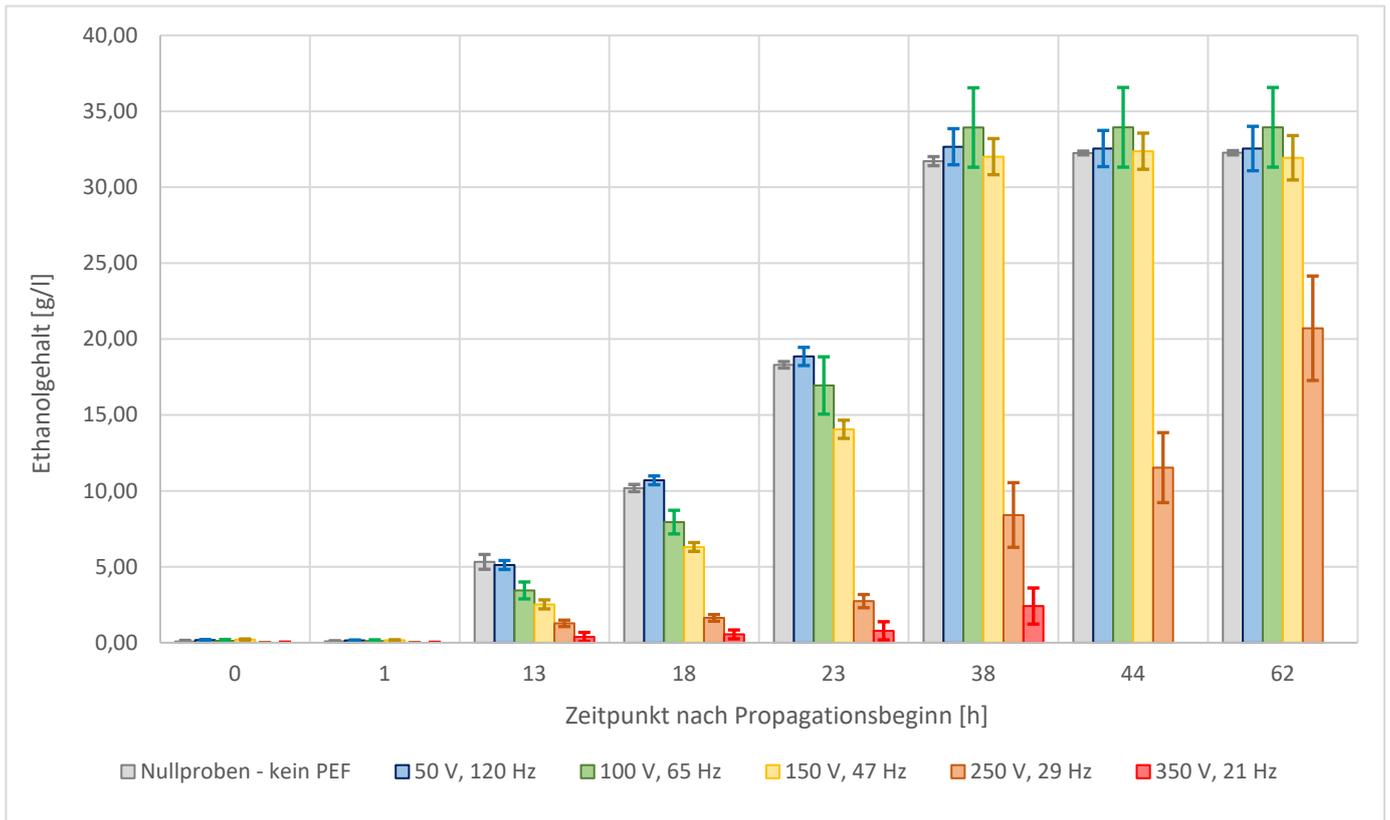


Abbildung 25: Mittlerer Ethanolgehalt der Versuche mit unterschiedlichen PEF-Behandlungen im Vergleich

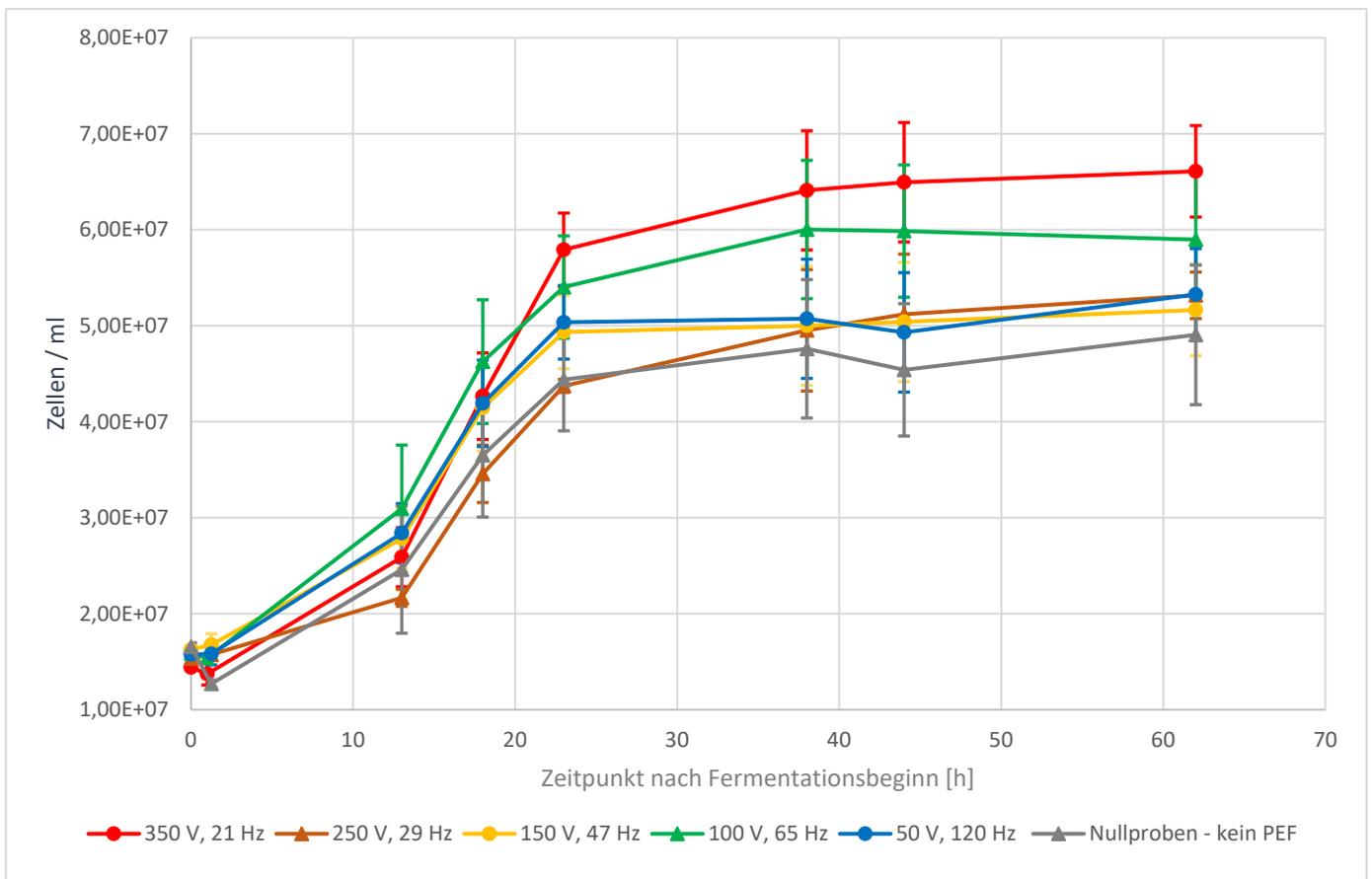


Abbildung 26: Gesamtzellzahl gemittelt aus CoulterCounter und FlowCytometrie-Messungen der Fermentationen bei 20 °C nach initiativen PEF-Behandlung unterschiedlicher Intensität

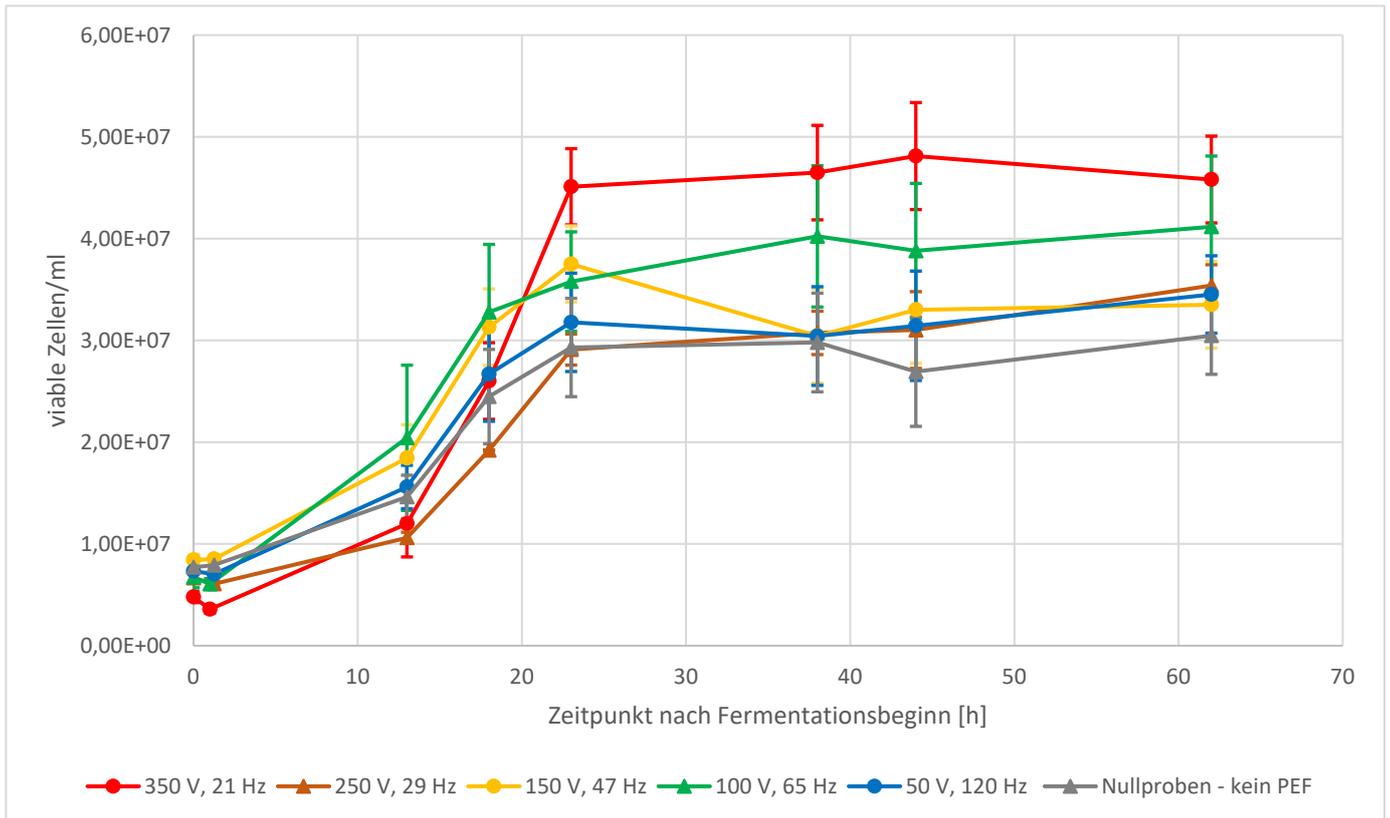


Abbildung 28: Gemittelte Lebendzellzahl nach Färbung mit PI und Fluoresceindiacetat und flusscytometrischer Messung der Fermentationen bei 20 °C

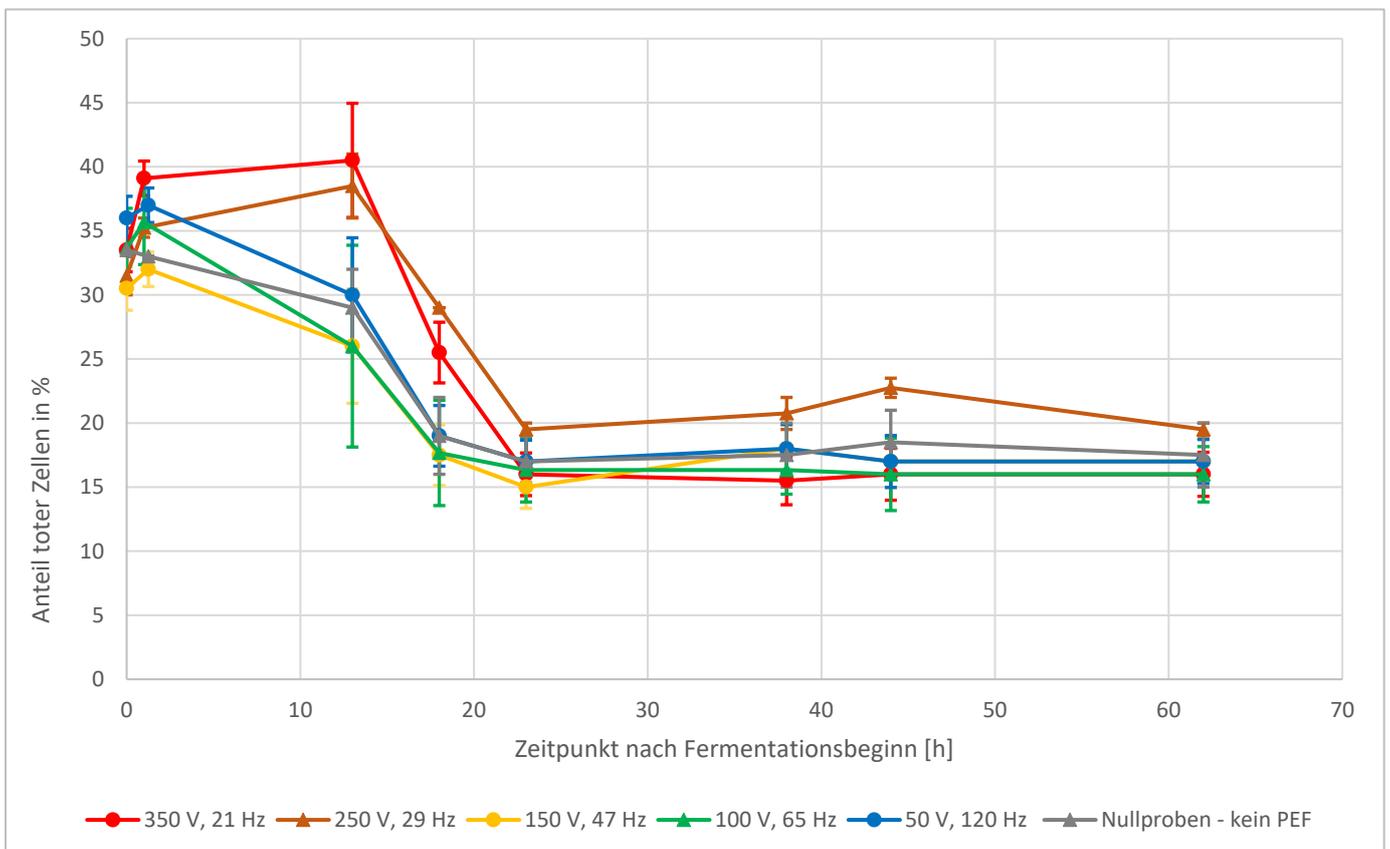


Abbildung 27: Vergleich der Viabilität in Form des Anteils toter Zellen in den Hefepopulationen der verschiedenen Versuchsreihen im Verlauf der Fermentation bei 20 °C

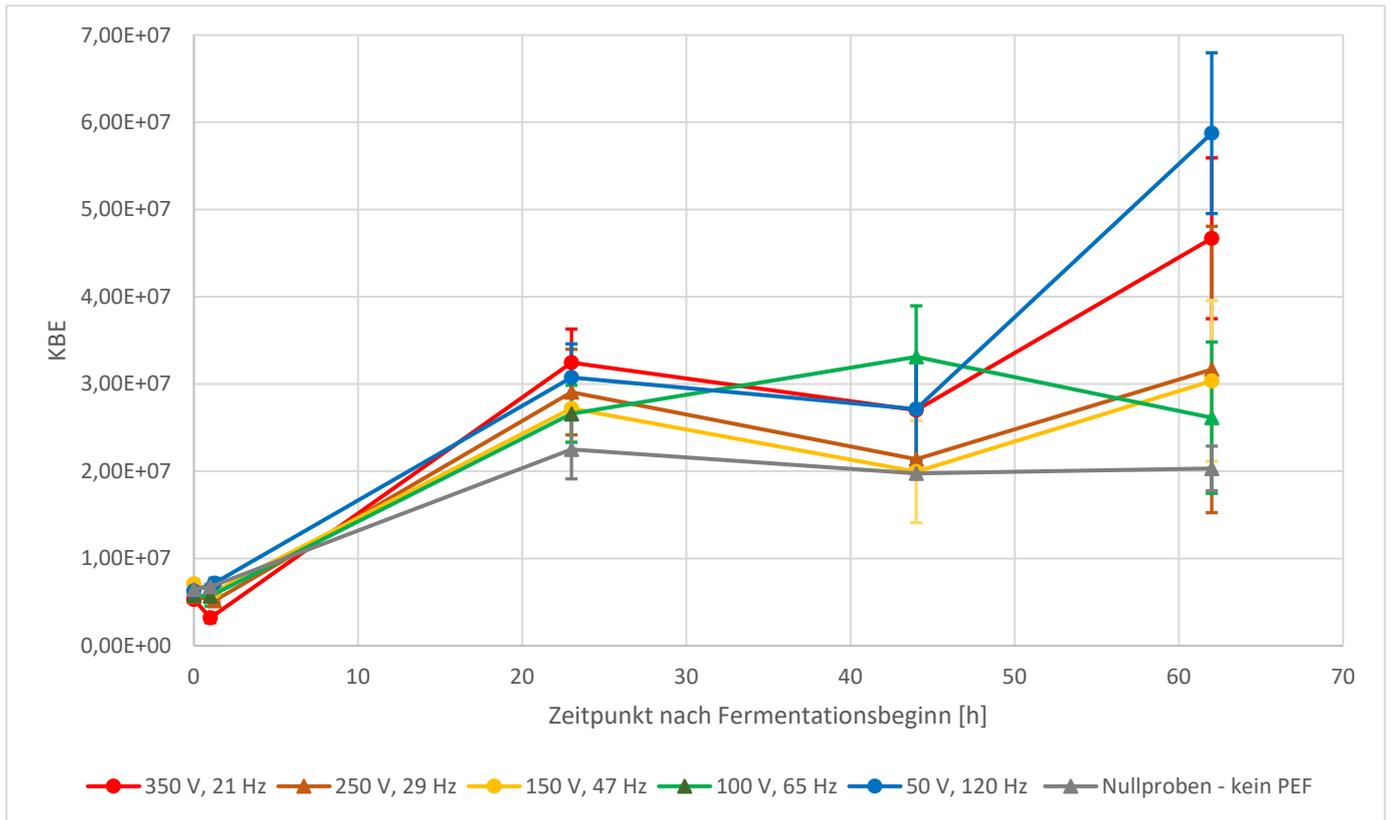


Abbildung 29: Mittelwert der koloniebildenden Einheiten (KBE) über den Verlauf der Fermentation der Versuche bei 20 °C mit unterschiedlicher, initiativen PEF-Behandlung im Vergleich

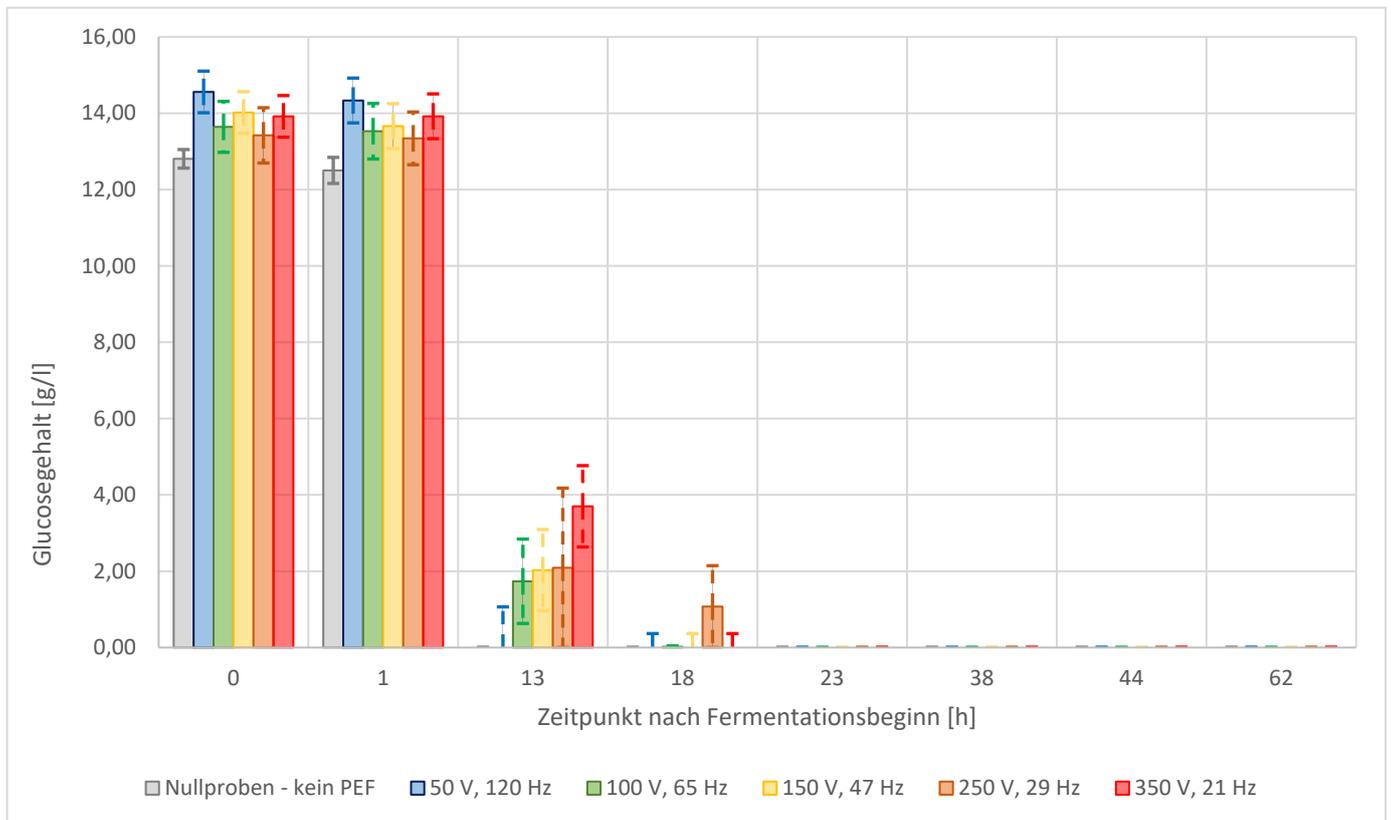


Abbildung 30: Gemittelte Veränderung der Glucosekonzentration in den Fermentationsmedien der Versuchsreihen bei 20 °C

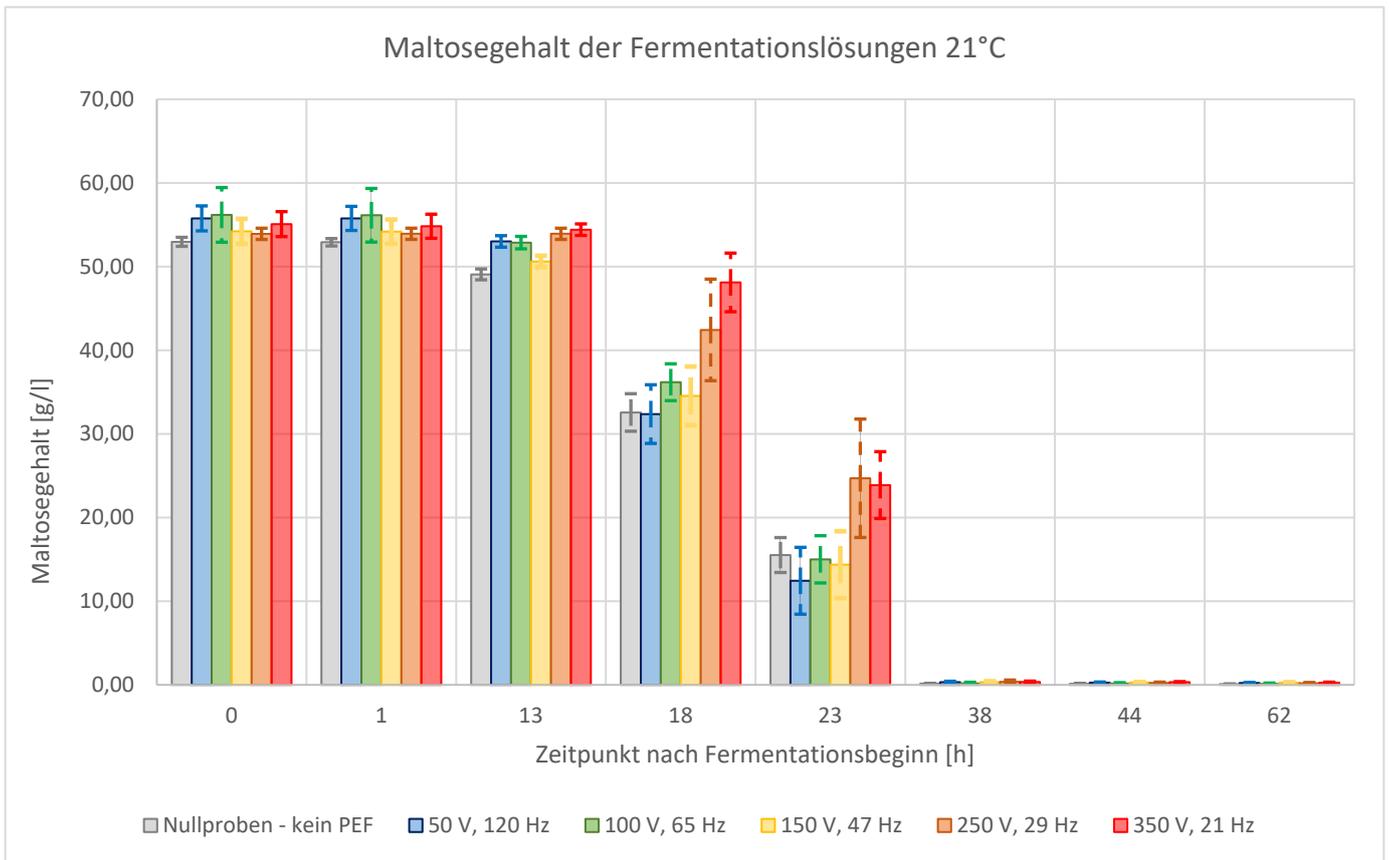


Abbildung 32: Gemittelte Veränderung der Maltosekonzentration in den Fermentationsmedien der Versuchsreihen bei 20 °C

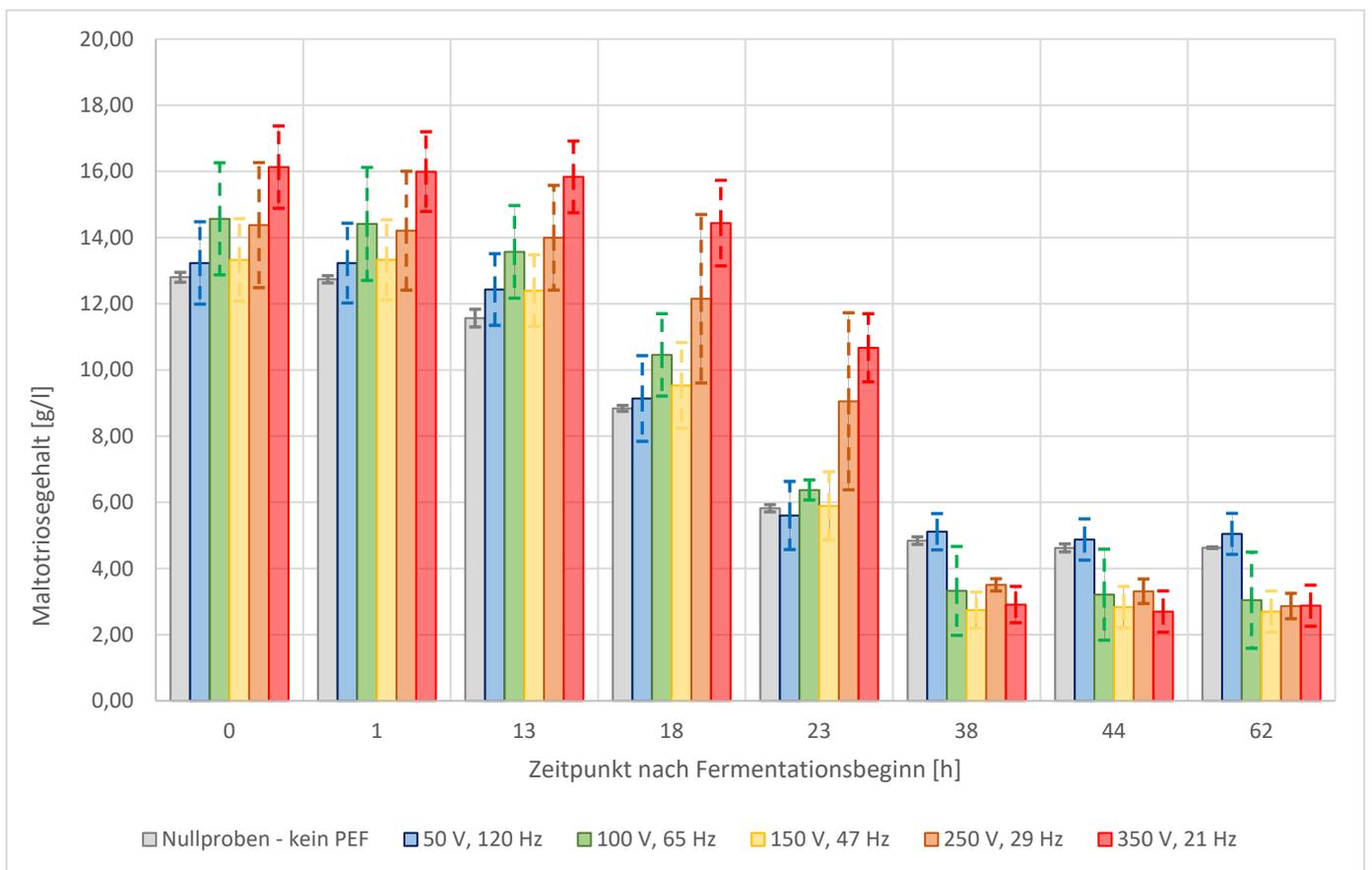


Abbildung 31: Gemittelte Veränderung der Maltotriosekonzentration der Fermentationsmedien der Versuchsreihen bei 20 °C

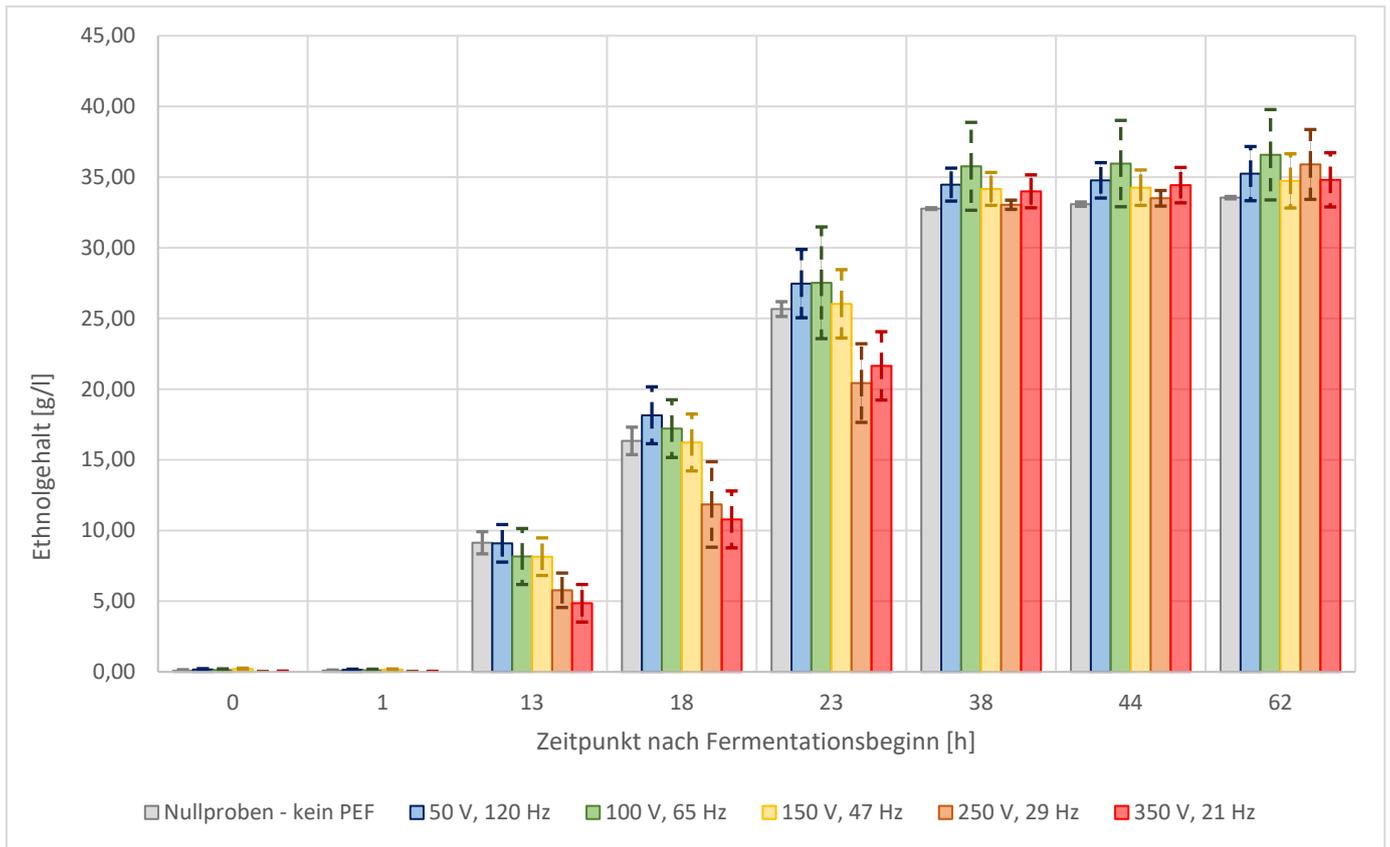


Abbildung 33: Gemittelte Veränderung der Ethanolkonzentration in den Fermentationsmedien der Versuchsreihen bei 20 °C

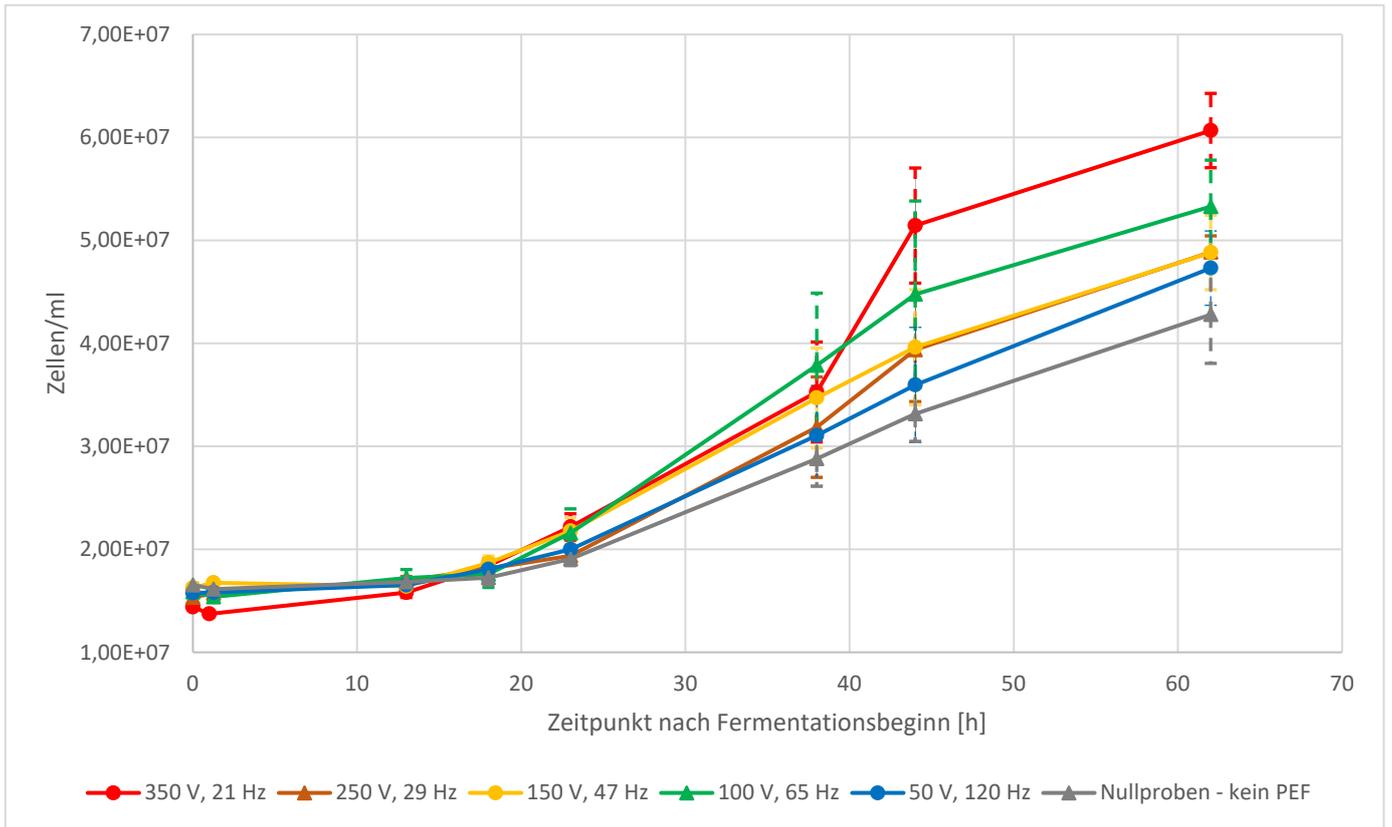


Abbildung 35: Gesamtzellzahl gemittelt aus CoulterCounter und FlowCytometrie-Messungen der Fermentationsreihen bei 14 °C nach initiativen PEF-Behandlungen unterschiedlicher Intensitäten

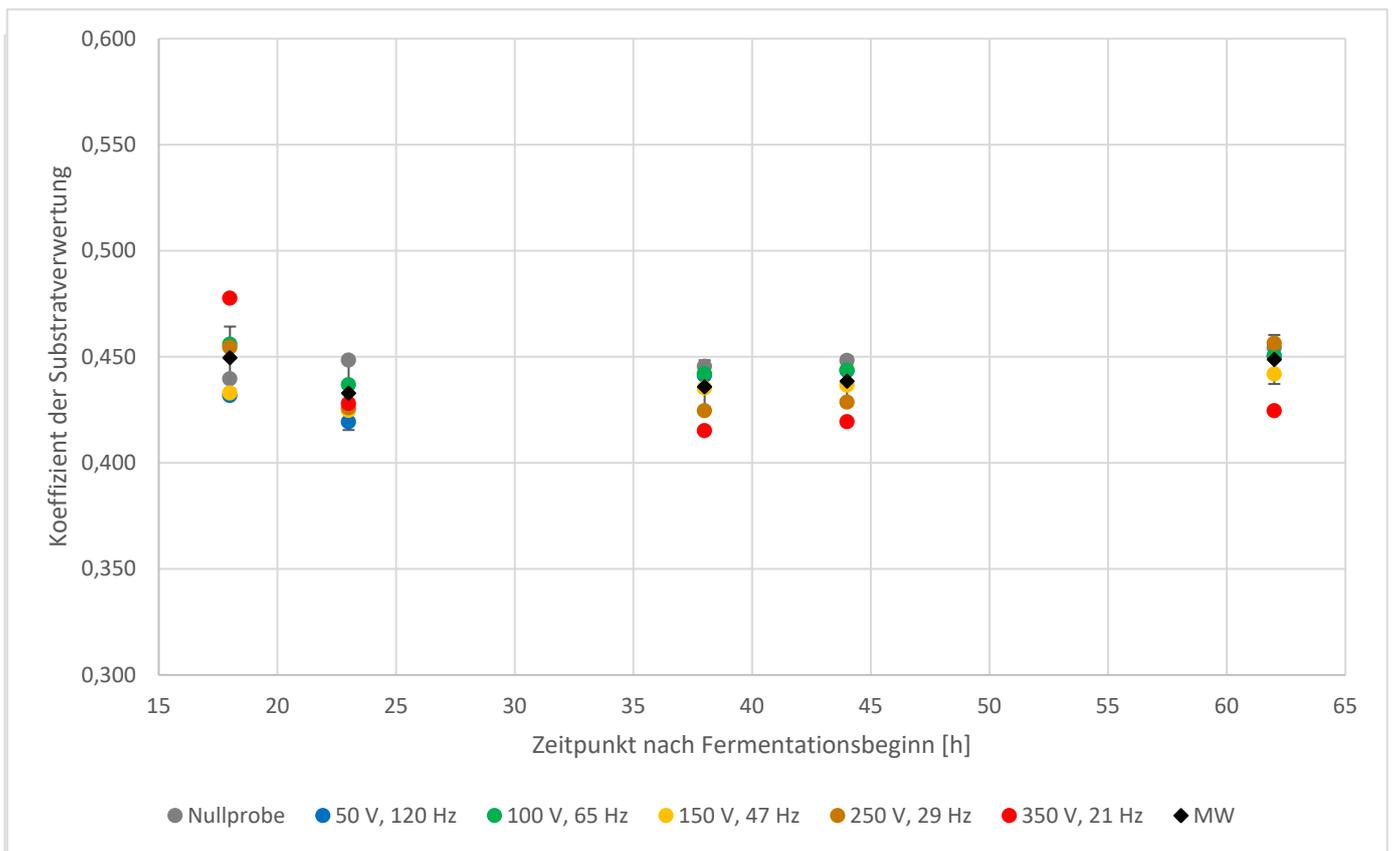


Abbildung 34: Substratverwertungskoeffizient der verschiedenen Versuchsreihen der Fermentationen bei 20 °C. Der Mittelwert aller Versuche ist in schwarz eingezeichnet. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung über alle Versuche dar.

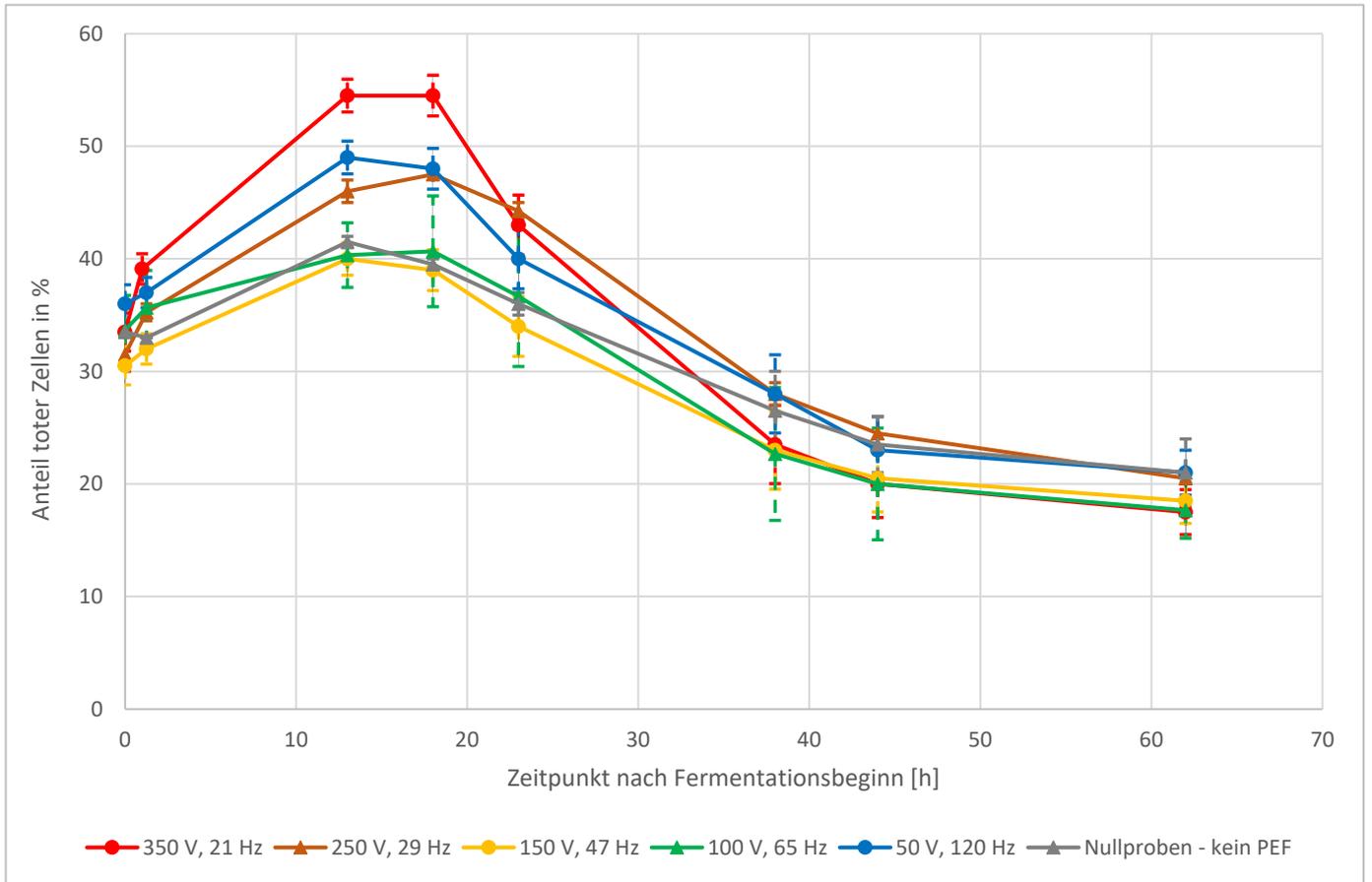


Abbildung 37: Vergleich der Viabilität in Form des Anteils toter Zellen in den Hefepopulationen der verschiedenen Versuchsreihen im Verlauf der Fermentation bei 14 °C

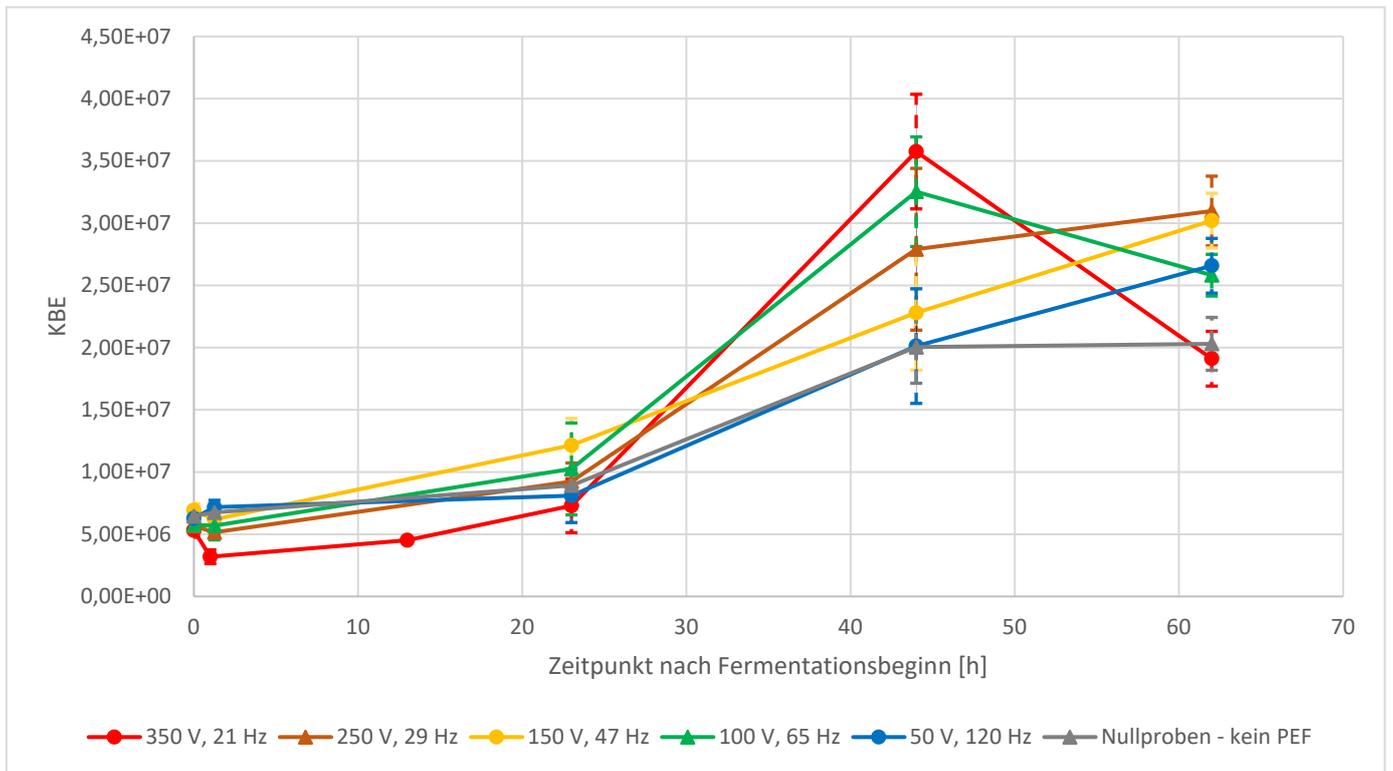


Abbildung 38: KBE (gemittelt) der Fermentationsreihen bei 14 °C nach initiativen PEF-Behandlungen unterschiedlicher Intensitäten

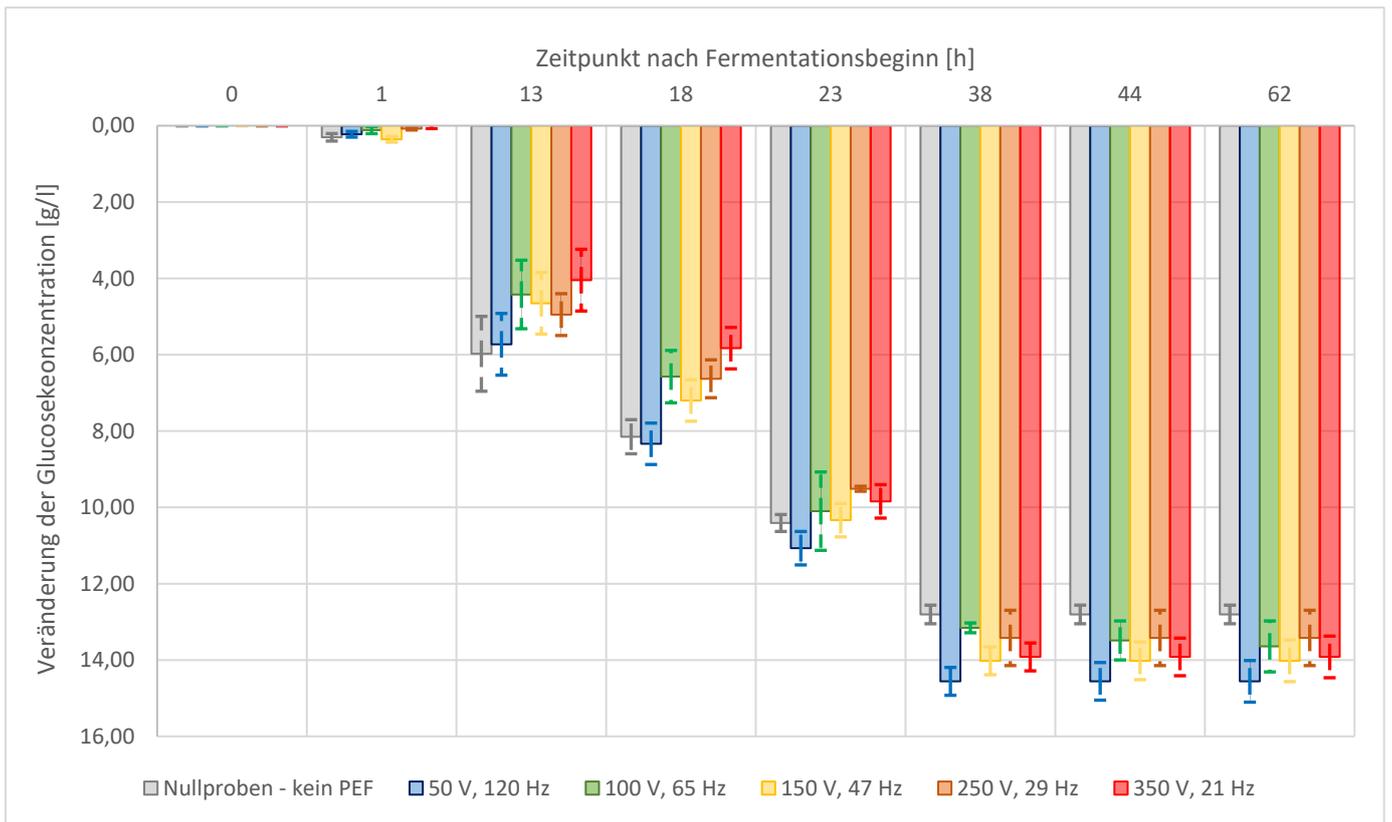


Abbildung 39: Gemittelte Veränderung der Glucosekonzentration in den Fermentationsmedien der verschiedenen Versuchsreihen bei 14 °C

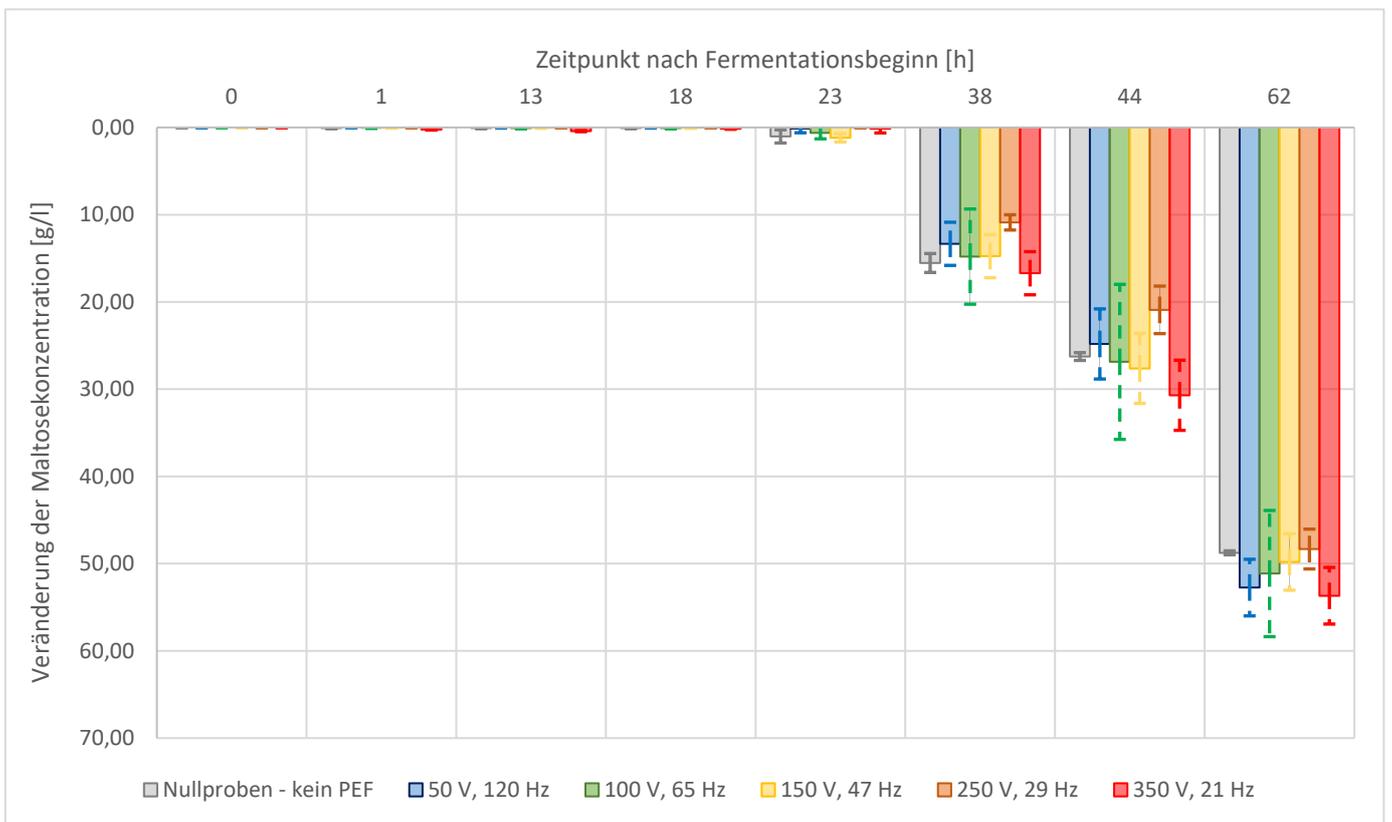


Abbildung 40: Gemittelte Veränderung der Maltosekonzentration in den Fermentationsmedien der verschiedenen Versuchsreihen bei 14 °C

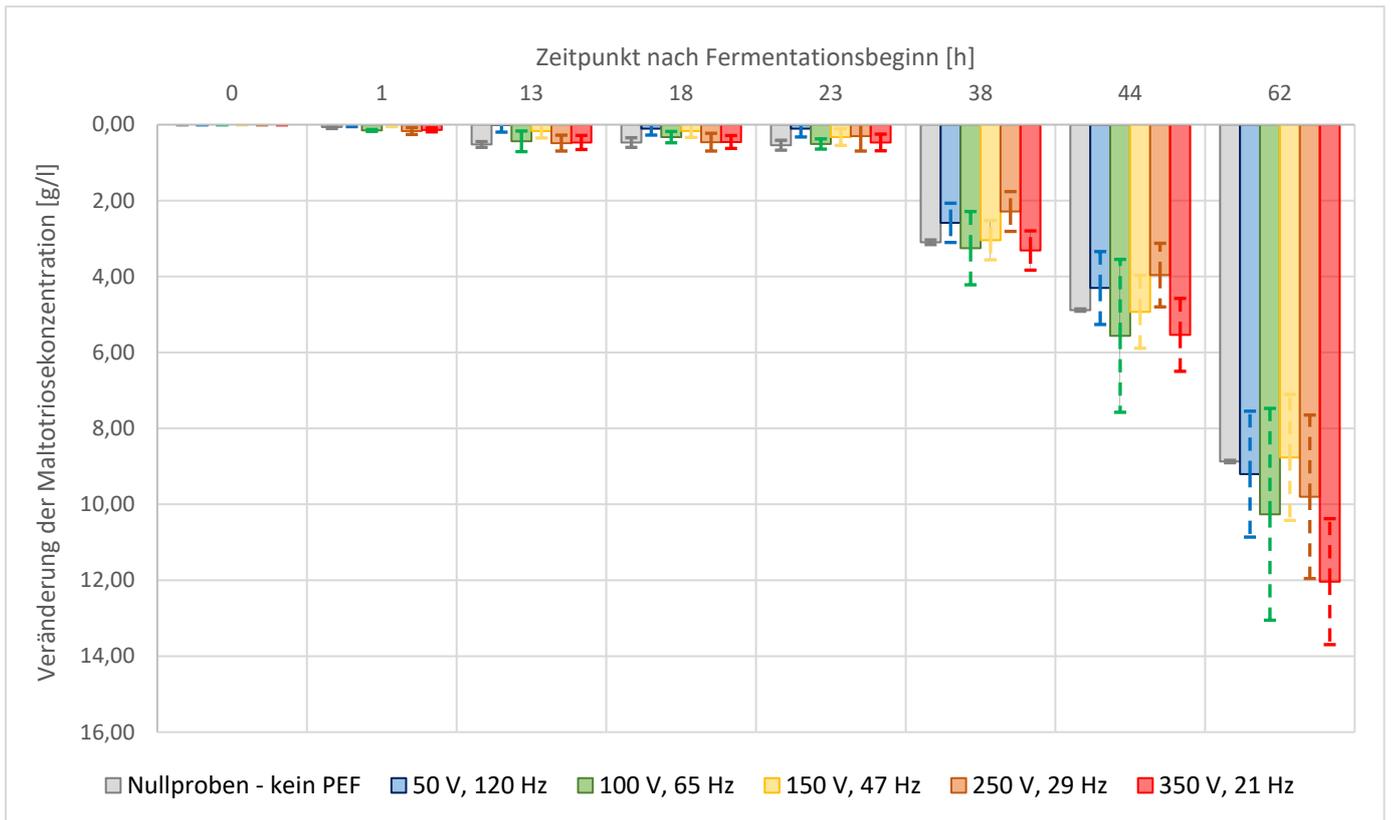


Abbildung 41: Gemittelte Veränderung der Maltotriosekonzentration in den Fermentationsmedien der verschiedenen Versuchsreihen bei 14 °C

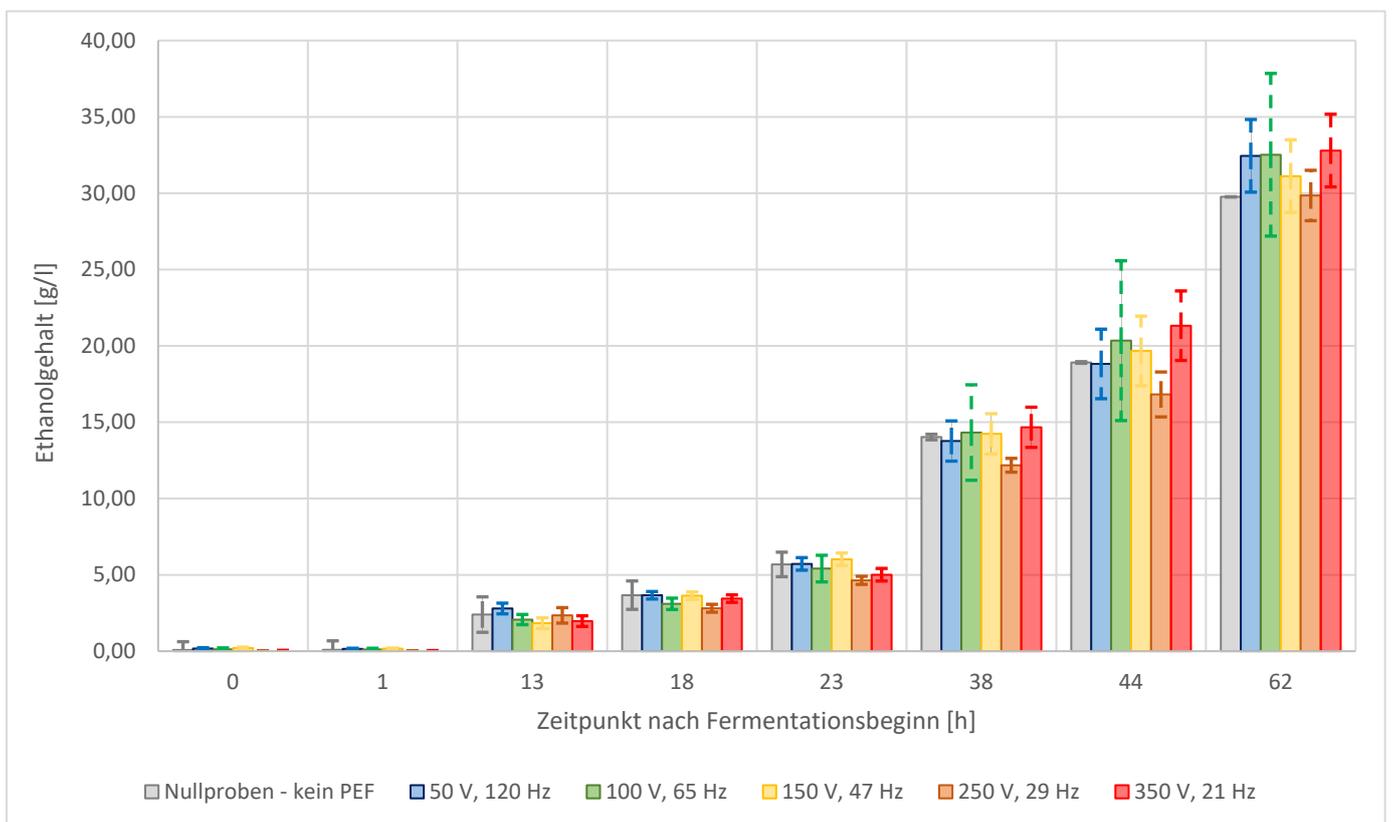


Abbildung 42: Gemittelte Ethanolbildung in den Fermentationsmedien der verschiedenen Versuchsreihen bei 14 °C

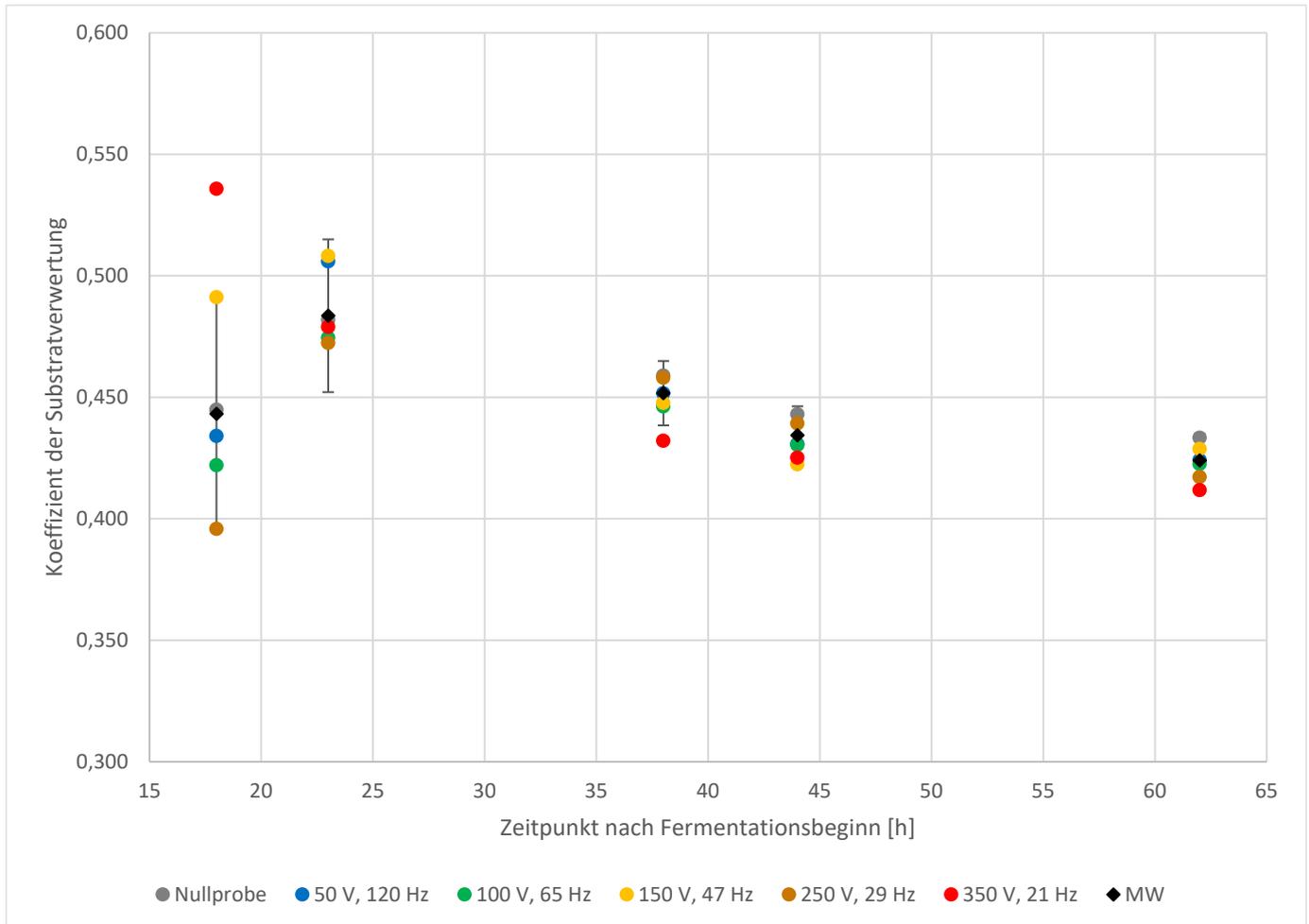


Abbildung 43: Substratverwertungskoeffizient der verschiedenen Versuchsreihen der Fermentationen bei 14 °C. Der Mittelwert aller Versuche ist in schwarz eingezeichnet. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung über alle Versuche dar.