

**Hochdruckinaktivierung von *Saccharomyces cerevisiae* -
Einfluss und Wirkweise statischer, dynamischer sowie
gepulster Druckbelastungen auf den induzierten Zellschaden**

Der Technischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades Dr.-Ing.

vorgelegt von
Marika Izydor
aus Stettin

Als Dissertation genehmigt
von der Technischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2017

Vorsitzender des Promotionsorgans: Prof. Dr.-Ing. Reinhard Lerch

Gutachter: Prof. Dr.- Ing. Eberhard Schlücker

Prof. Dr. rer. nat. Andreas Wierschem

Schriftenreihe des Lehrstuhls für Prozessmaschinen und
Anlagentechnik

Band 32

Marika Izydor

**Hochdruckinaktivierung von *Saccharomyces
cerevisiae* – Einfluss und Wirkweise statischer,
dynamischer sowie gepulster Druckbelastungen
auf den induzierten Zellschaden**

D 29 (Diss. Universität Erlangen-Nürnberg)

Shaker Verlag
Aachen 2017

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Erlangen-Nürnberg, Univ., Diss., 2017

Copyright Shaker Verlag 2017

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-5460-6

ISSN 1614-3906

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Prozessmaschinen und Anlagentechnik an der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg, die in den ersten Jahren durch ein Stipendium der Erlangen Graduate School in Advanced Optical Technologies unterstützt wurde. Ein Teil der zugrunde liegenden wissenschaftlichen Untersuchungen wurde im Rahmen eines von der ALFRED-KÄRCHER Förderstiftung geförderten Forschungsprojekts durchgeführt. Da eine solche Arbeit nicht ohne die Hilfe anderer zu schaffen ist, möchte ich mich an dieser Stelle von ganzem Herzen bei meinen Unterstützern bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr.-Ing. Eberhard Schlücker, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an seinem Lehrstuhl zu promovieren und der immer daran geglaubt hat, dass aus meiner Neugier und meiner Vorliebe für mikroskopisch kleine Organismen eine wissenschaftliche Arbeit entstehen kann.

Prof. Dr. rer. nat. Andreas Wierschem danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie die gute Zusammenarbeit während der Dauer meiner Promotion.

Mein weiterer Dank gilt der Erlangen Graduate School in Advanced Optical Technologies, die meinen Start in die Promotion mit ihrer finanziellen Unterstützung deutlich erleichtert hat. Frau Sheila Regan danke ich dafür, dass sie mir stets geholfen hat, aus meinem englischen Buchstabensalat lesbare Abstracts und Paper zu formen.

Für die praktische Hilfestellung möchte ich den technischen Mitarbeitern des Lehrstuhls und der lehrstuhleigenen Werkstatt danken. Durch ihren Einsatz haben Werner Sippl, Oliver Weisert, Florian Klein und Piotr Reichel-Lesnianski maßgeblich zur erfolgreichen Inbetriebnahme der Hochdruckapparate beigetragen und waren immer zu Stelle, um sich um die kleinen und großen Wehwehchen der Anlagen zu kümmern. Dr.-Ing. Nico Alt, Dr.-Ing. Benjamin Frey und Dr. Stefan Schwab möchte ich für den wissenschaftlichen Austausch sowie die gute Zusammenarbeit und wertvolle Unterstützung während meiner gesamten Promotionszeit danken.

Das freundschaftliche Verhältnis und die gute Arbeitsatmosphäre haben dazu beigetragen, dass die Jahre am Lehrstuhl zu einer ganz besonderen Zeit für mich geworden sind. Ich möchte daher allen Mitarbeitern danken, die mit Rat und Tat, fachlichen Diskussionen, Kaffee und Schokolade dazu beigetragen haben, dass sich der manchmal einschleichende Promotions-Blues schnell wieder verflüchtigt hat und ich die Arbeit zu einem guten Abschluss bringen konnte. Herrn Thomas Pircher danke ich für die Fotos, die meine Hochdrucksichtzelle ins rechte Licht gerückt haben.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich bei Katharina Stach, Lisa Rippstein, Lisa Engelhardt, Markus Zwiefeler, Matthias Geißbauer, Patrick Siuda, Igor Landa, Laura Roth

sowie Jennifer Schmidt bedankten, die in ihren Diplom-, Master-, Bachelor- und HiWi-Arbeiten mit wertvollen Ideen und umfangreichen Experimenten an der vorliegenden Arbeit mitgewirkt haben.

Abschließend möchte ich meinen Eltern, all meinen Freunden und speziell Bene Pohrer danken, die mich während der gesamten Zeit unterstützt, beruhigt, ermutigt, aufgebaut und ertragen haben. Eine Promotion ist nicht nur eine fachliche sondern auch eine persönliche Herausforderung, die ich vor allem dank ihrer Hilfe gemeistert habe.

Nürnberg, März 2017

Marika Izydor

Kurzzusammenfassung

Die moderne Lebensmittelproduktion ist aufgrund zentralisierter Herstellungsprozesse, langer Transportwege und der Forderung nach ständiger Verfügbarkeit von Nahrungsmitteln auf wirtschaftliche und zuverlässige Konservierungsverfahren angewiesen. Der stetig steigenden Nachfrage der Verbraucher nach naturbelassenen, wenig prozessierten und qualitativ hochwertigen Produkten ohne künstliche Zusätze können konventionelle Verfahren zur Haltbarkeitsverlängerung jedoch häufig nicht gerecht werden, weshalb das Bestreben, produktschonende und effiziente Verfahren zu entwickeln, sehr hoch ist. Die Behandlung von Lebensmitteln mit hohen hydrostatischen Drücken (600 MPa bis 1.000 MPa) stellt dabei das wohl am weitesten entwickelte sogenannte Minimal Processing-Verfahren dar und erlaubt die zuverlässige Inaktivierung von Mikroorganismen, Pathogenen und Enzymen ohne hohe sensorische und ernährungsphysiologische Qualitätseinbußen. Niedermolekulare Verbindungen wie Vitamine, Farb- und Aromastoffe sowie Struktur und Farbe der Produkte bleiben aufgrund des geringen Energieeintrags weitestgehend erhalten.

Trotz der Vorteile, die dieses Verfahren gegenüber konventionellen Konservierungsmethoden bietet, haben apparative und legislative Hürden dazu geführt, dass die Hochdruckinaktivierung vor allem in Europa kaum bzw. nahezu ausschließlich im hochpreisigen Produktsegment Anwendung findet. Neuartige Prozess- und Anlagenkonzepte wie der Einsatz von Druckwechselbelastungen sollen dazu beitragen, eine effiziente und wirtschaftliche Prozessführung zu ermöglichen. Zur Überwindung der legislativen Hürden ist jedoch die Erforschung der Wirkweise hoher Drücke notwendig, weshalb sich die vorliegende Arbeit der Untersuchung der durch unterschiedliche Druckbehandlungen verursachten Schäden am Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* widmet.

Durch den Einsatz speziell entwickelter apparativer Aufbauten wie einer eigens für die Druckwechselbelastung konzipierten Hochdrucksichtzelle sowie zellbiologischer Analysemethoden werden neben den Folgen des bisher hauptsächlich eingesetzten, statischen Druckprofils erstmals auch die Auswirkungen unterschiedlicher Druckwechselbelastungen (dynamisch, gepulst) auf die innere und äußere Zellmorphologie, die Cytoplasmamembranintegrität, den Energiehaushalt sowie die Art des Zelltods näher betrachtet. Da Wirksamkeit und Effizienz einer Behandlung im realen Produkt letztendlich ausschlaggebend für den industriellen Einsatz eines neuartigen Konservierungsverfahrens sind, werden die Untersuchungen nicht nur in synthetischen, sondern auch in lebensmittelnahen Umgebungen durchgeführt. Eine schrittweise Annäherung standardisierter Nährmedien an die Zusammensetzung realer Lebensmittel soll dabei ein größeres Verständnis für die Wirkung einzelner Lebensmittelbestandteile sowie deren Zusammenspiel schaffen und so langfristig eine höhere Übertragbarkeit der in synthetischen Nährlösungen generierten Ergebnisse ermöglichen.

Abstract

Due to centralized production processes, long transportation distances, and a growing demand for constantly available products, modern food industry depends on reliable and sustainable preservation methods. Equally, consumers' preference for natural, mildly processed high-quality products without artificial additives leads to an increase in new sterilization and preservation processes. High pressure (600 MPa – 1,000 MPa) is a modern minimal-processing technique that allows food-spoiling microorganisms and enzymes to be inactivated, minimizing adverse effects on valuable components such as vitamins, texture, and flavor.

Despite the benefits of high-pressure treatment, the process is still restricted to high-quality products due to long pressurization times, high pressure levels, and long authorization procedures for treated food (Novel Food legislation). To overcome these restrictions, new process types are being developed. The innovative use of pulsed and dynamic high pressure offers the possibility of convey a liquid or paste-like product further during low-pressure periods to enable a quasi-continuous mode of operation. In this work, the damaging effects of three different high-pressure treatments (static, pulsed and dynamic) on the model organism *Saccharomyces cerevisiae* are investigated.

To visualize pressure-induced changes in the cell's outer and inner morphology, membrane integrity, energy production and to see the effect of different pressure treatments on the cell death pathway, a high-pressure optical cell and special cell biological analysis methods were developed. Since the efficacy and effectiveness of treatment for real products is decisive for the industrial application of a novel preservation technique, high-pressure experiments were carried out in food-grade environments, as well as synthetic. It is proposed that a step-by-step convergence of standardized nutrient media toward the composition of real foods will provide a greater understanding of the effects of food components as well as their interplay. This is intended to enable higher transferability of the results generated in synthetic nutrient solutions.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Motivation.....	2
1.2	Zielsetzung und Aufbau der Arbeit.....	4
2	STAND DER TECHNIK: KONSERVIERUNG UND HALTBARMACHUNG IN DER LEBENSMITTELINDUSTRIE	6
2.1	Konventionelle Konservierungs- und Sterilisationsverfahren.....	6
2.2	Minimal Processing als wachsender Markt.....	9
3	DIE HOCHDRUCKBEHANDLUNG IN DER LEBENSMITTELTECHNIK	11
3.1	Druck als Prozessgröße.....	13
3.1.1	Druckerzeugung.....	13
3.1.2	Kompressibilität und ihr Verhalten unter Druck.....	14
3.1.3	Adiabate Kompressionswärme	16
3.2	Verfahrenstechnische und apparative Umsetzung der Hochdruckbehandlung .	17
3.3	Auswirkungen von Druck auf chemische und biotische Systeme	20
3.3.1	Inter- und intramolekulare Bindungen und Wechselwirkungen.....	20
3.3.2	Chemische Reaktionen	21
3.3.3	Makromoleküle.....	24
3.3.3.1	Proteine als komplexe, dreidimensionale Biomoleküle	24
3.3.3.2	Enzyme und ihre katalytische Wirkung	27
3.3.3.3	Wertgebende Inhaltsstoffe	27
3.3.4	Biologische Zellen.....	28
3.3.4.1	Einfluss des zellulären Aufbaus	30
3.3.4.2	Einfluss der Prozessparameter	31
3.3.4.3	Einfluss des extrazellulären Umfeldes	33
4	DER MODELLORGANISMUS SACCHAROMYCES CEREVISIAE	36
4.1	Zellulärer Aufbau.....	37
4.2	Wachstumsverhalten einer statischen Kultur.....	42
4.3	Anpassung an veränderte Umweltbedingungen	44
4.3.1	Veränderungen der osmotischen Bedingungen.....	45
4.3.2	Veränderungen des extrazellulären pH-Werts	46
4.4	Der Zelltod	47
4.4.1	Nekrose.....	48
4.4.2	Apoptose.....	49

5	APPARATIVE AUFBAUTEN ZUR UNTERSUCHUNG DES HOCHDRUCKEIN- FLUSSES AUF <i>S. CEREVISIAE</i>	51
5.1	Hochdrucksichtzelle zur online und <i>in situ</i> -Untersuchung mikroskopischer Objekte bis 400 MPa	51
5.1.1	Materialauswahl.....	53
5.1.2	Optischer Zugang	55
5.1.2.1	Optische Konstruktionskriterien	56
5.1.2.2	Festigkeitsberechnung.....	58
5.1.2.3	Auslegung des optischen Zugangs.....	59
5.1.3	Metallringdichtung.....	61
5.1.4	Schraubenverbindung.....	63
5.1.5	FEM-Simulation	66
5.1.6	Gesamtkonstruktion der Hochdrucksichtzelle.....	71
5.2	Hochdruckkammer bis 400 MPa	73
5.3	Druckerzeuger I bis 400 MPa	74
5.4	Druckerzeuger II bis 600 MPa	76
6	ZELLANALYTISCHE METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG DES HOCHDRUCK- EINFLUSSES AUF <i>S. CEREVISIAE</i>	80
6.1	Bestimmung der Anzahl vitaler und vermehrungsfähiger Zellen	80
6.2	Mikroskopische Bestimmung der Gesamtzellzahl	82
6.3	Einsatz von Farbstoffen zur Untersuchung des Zellschadens.....	83
6.3.1	Analyse der Cytoplasmamembranintegrität.....	84
6.3.2	Analyse des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$	88
6.3.3	Charakterisierung des Zelltods	91
7	AUSWIRKUNGEN UNTERSCHIEDLICHER HOCHDRUCKBEHANDLUNGEN AUF <i>S. CEREVISIAE</i>	96
7.1	Einfluss unterschiedlicher Druckbehandlungen auf <i>S. cerevisiae</i> in Standard- YEPD Medium	96
7.1.1	Wachstumsverhalten von <i>S. cerevisiae</i>	97
7.1.2	Versuchsdurchführung.....	98
7.1.3	Druckbedingte Veränderungen des Zellvolumens.....	99
7.1.4	Schädigung der Cytoplasmamembran	109
7.1.4.1	Einfluss von Druckhöhe und Haltezeit	110
7.1.4.2	Phasenübergang und zelluläre Kompression	113
7.1.4.3	Einfluss von Druckaufbau/Abbaugeschwindigkeit und Intervallzeit	118

7.1.5	Veränderungen innerer Strukturelemente sowie der zellulären Energieversorgung	121
7.1.6	Charakterisierung des Zelltods	126
7.1.7	Zusammenfassung und abschließende Beurteilung der Ergebnisse.....	130
7.2	Einfluss unterschiedlicher Druckbehandlungen auf <i>S. cerevisiae</i> in lebensmittelnahen Kulturmedien	132
7.2.1	Eigenschaften und Parameter zur Charakterisierung der Medienzusammensetzung.....	133
7.2.2	Wachstumsverhalten von <i>S. cerevisiae</i> in Medien unterschiedlicher Zusammensetzung.....	135
7.2.3	Versuchsdurchführung	138
7.2.4	Einfluss der Medienzusammensetzung auf die Hochdruckinaktivierung	139
7.2.5	Umgebungs- und druckbedingte Veränderungen des Zellvolumens	144
7.2.6	Einfluss hypertoner sowie saurer Umgebungen auf den druckbedingten physischen Zellschaden.....	149
7.2.7	Einfluss hoher Drücke auf den zellulären Energiehaushalt in hypertonen Nährlösungen.....	156
7.2.8	Vom synthetischen Nährmedium zum Lebensmittel: Einfluss von Kombinationslösungen und Modellmedien auf die Hochdruckinaktivierung	158
7.2.9	Zusammenfassung und abschließende Beurteilung der Ergebnisse.....	162
7.3	Diskussion anwendungsspezifischer Prozessparameter und Randbedingungen	164
7.3.1	Vorbehandlung der Fruchtmaische	165
7.3.2	Zellaufschluss während der Weinherstellung.....	167
7.3.3	Abschließende Produktkonservierung	167
8	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	169
9	ANHANG	174
9.1	Werkstoffdatenblatt INCONEL® Alloy 718.....	174
9.2	Prüfzeugnis INCONEL® Alloy 718.....	175
10	SYMBOL- UND ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	176
10.1	Symbolverzeichnis	176
10.2	Abkürzungsverzeichnis	181
11	LITERATURVERZEICHNIS	183