

Aufschluss und Abtötung biologischer Zellen mit Hilfe starker gepulster elektrischer Felder

H. Bluhm, W. Frey, C. Gusbeth, M. Sack, C. Schultheiss, IHM

Einleitung und Grundlagen

Die Behandlung biologischer Zellen mit starken gepulsten elektrischen Feldern kann zur irreversiblen Bildung großer Poren in der Zellmembran führen (Elektroporation) und damit einerseits zur effektiven Gewinnung der Zellinhaltsstoffe andererseits zur Abtötung von Mikroorganismen genutzt werden. Obwohl der Effekt seit Längerem bekannt ist, waren industrielle Anwendungen jedoch bisher selten und auf wenige Gebiete beschränkt. Fortschritte in der Hochleistungsimpulstechnik, die in den letzten Jahren erzielt wurden, bieten nun erstmals die Möglichkeit, die irreversible Elektroporation auch industriell in großem Maßstab wirtschaftlich einzusetzen.

In der Nahrungsmittelproduktion, zur pflanzlichen Rohstoffgewinnung und zur Keimabtötung muss die Membran biologischer Zellen zerstört werden.

Gegenüber herkömmlichen, vorwiegend thermo-chemischen Zellaufschluss- und Sterilisationsverfahren besitzt die Elektroporation ein erhebliches Potential zur Energieeinsparung, zur Vermeidung des Auftretens kritischer chemischer Substanzen und zur Gewinnung von pflanzlichen Nährstoffen mit höherer Reinheit.

Biologische Zellen sind abgeschlossene Systeme, deren innere Strukturen (Zellkern, Zytosol, etc.) durch eine „dichte“ Membran gegen die Außenwelt abgeschirmt sind. Die Grundstruktur dieser Membran besteht aus ei-

ner elektrisch isolierenden Phospholipid-Doppelschicht. Im Gegensatz dazu ist das durch die Membran eingeschlossene Zytoplasma elektrolytisch leitend. Befindet sich die Zelle in einem wässrigen, ebenfalls elektrolytisch leitenden Milieu, so kommt es beim Anlegen eines elektrischen Feldes zur Ionenwanderung und damit zur Polarisierung an der undurchlässigen, isolierenden Membran. Durch die Polarisierung wird das Innere der Zelle nach kurzer Zeit feldfrei, d.h. die gesamte ursprünglich über der Längenausdehnung der Zelle anliegende Potentialdifferenz fällt nun über der nur 5 nm dünnen Membran ab. Die Membranfeldstärke wird dadurch gegenüber der ursprünglich angelegten Feldstärke um einen Faktor erhöht, der dem Verhältnis der Zellausdehnung in Feldrichtung (einige μm) zur Stärke der Zellmem-

bran (ca. 5 nm) entspricht und daher sehr hohe Werte annehmen kann. Für eine kugelige Zelle sind die Verhältnisse in Abb. 1 dargestellt. In diesem Fall hängt der Verstärkungsfaktor zusätzlich vom Azimut ab.

Zur Einstellung der Polarisierung wird eine Zeit benötigt, die durch die Zellabmessungen, die spezifische Membrankapazität und die spezifischen Leitfähigkeiten innerhalb und außerhalb der Zelle bestimmt ist. Überschreitet die Potentialdifferenz über der Membran einen kritischen Wert, – er liegt bei ca. 0,5 V –, so dehnen sich zufällig vorhandene Öffnungen aus. Die Triebkraft für die Vergrößerung der Pore ist die Freie Energie $F(r,t)$ der Porenbildung (Abb. 2) [1, 2]. Sie setzt sich aus einer Summe unterschiedlicher Energieterme zusammen, die die Oberflächenspannung der Mem-

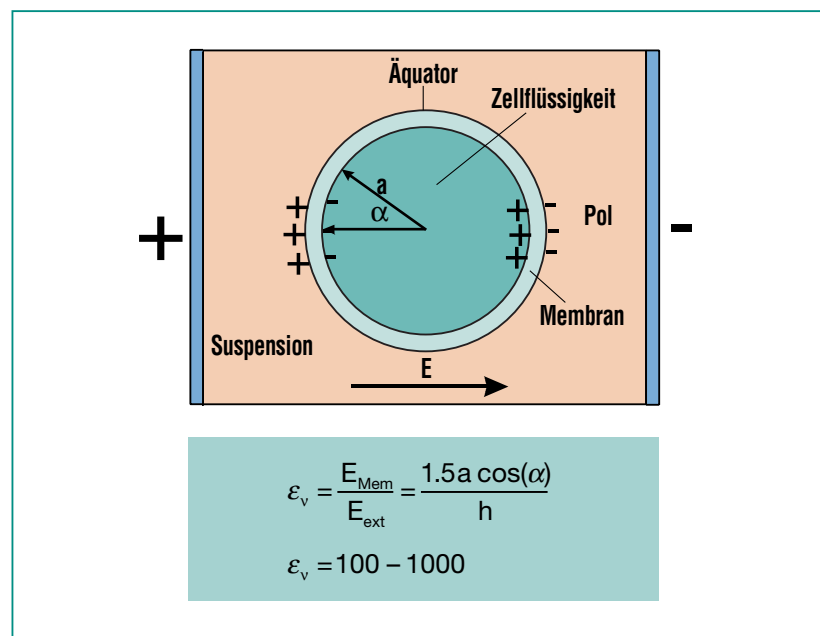


Abb. 1: Feldverstärkung ϵ_v durch Polarisation an der Membran einer kugeligem Zelle (h = Stärke der Zellmembran, E_{ext} = angelegtes externes Feld, E_{Mem} = Feld an der Membran).

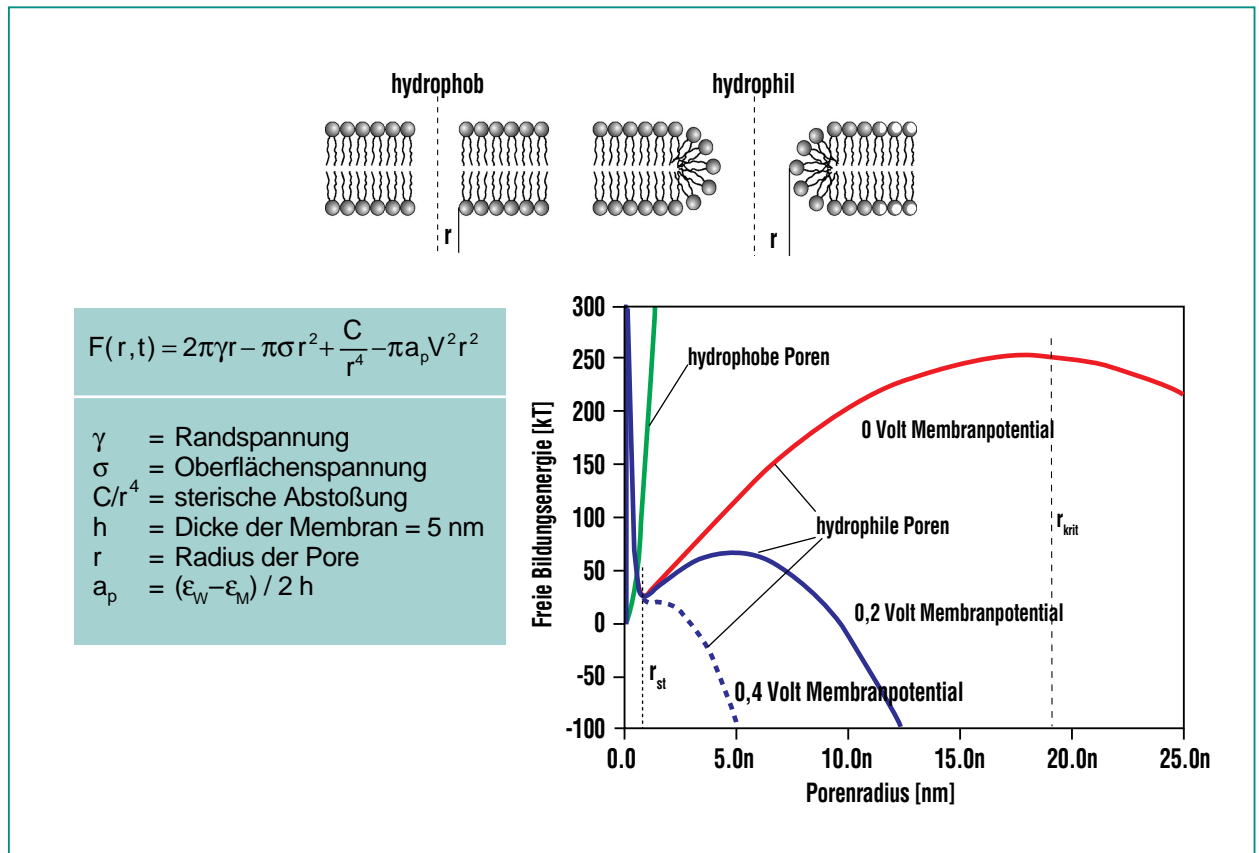


Abb. 2: Modell zur Beschreibung des Porenwachstums unter dem Einfluss elektrischer Felder: Aufgrund thermischer Fluktuationen entstehen Poren zunächst in hydrophober Form. Überschreitet ihr Radius einen bestimmten Wert, ändert sich ihre Gestalt und sie wandeln sich in hydrophile Poren um. Die Triebkraft für die dann einsetzende weitere Vergrößerung der Pore ist die Freie Energie $F(r,t)$ der Porenbildung. Sie setzt sich aus einer Summe unterschiedlicher Energietерme zusammen. Überschreitet der Porenradius während der Dauer des Feldimpulses einen kritischen Wert, so bleibt die Pore irreversibel geöffnet.

bran, die Ringspannung in der gebildeten Pore, die sterische Abstoßung zwischen den polaren Köpfen der Phospholipid-Moleküle in der Pore und die kapazitive elektrische Energie berücksichtigen. Letztere gibt die Differenz zwischen der kapazitiven Energie mit und ohne Membran als Dielektrikum wieder und bewirkt die Abhängigkeit der Freien Energie vom Quadrat der elektrischen Feldstärke. Überschreitet der Porenradius während der Dauer des Feldimpulses einen

kritischen Wert, so bleibt die Pore irreversibel geöffnet, d. h. die Zelle ist nicht mehr in der Lage, die Pore auszuheilen, das Zytoplasma fließt aus, und die Zelle stirbt ab. Die vorübergehende oder permanente Öffnung von Poren unter dem Einfluss des elektrischen Feldes wird als reversible bzw. irreversible Elektroporation bezeichnet.

Aus dem beschriebenen Modell wird deutlich, dass die Amplitude, die Form und die Dauer der

Feldimpulse einen entscheidenden Einfluss auf die Porenbildung besitzen. Will man einen Zellaufschluss durch dauerhafte Öffnung der Zellmembran erreichen, so muss die Dauer der elektrischen Feldimpulse größer sein als die Summe der Zeitkonstanten für die Einstellung der Polarisation und für das Erreichen des kritischen Porenradius. Die zugehörigen Feldamplituden hängen von der Größe der Zelle ab und liegen zwischen 0,1 MV/m und 10 MV/m.

Impulserzeugung

Für industrielle Anwendungen der Elektroporation geeignete Pulsgeneratoren müssen in der Lage sein, die notwendigen elektrischen Feldstärken von 0,1-10 MV/m für die erforderlichen Pulsdauern von 10 ns bis 10 μ s in einem durch den gewünschten Durchsatz bestimmten Volumen aufrecht zu erhalten. Zusätzlich muss gewährleistet sein, dass jede Zelle, die für den gewünschten Effekt notwendige Anzahl von Impulsen gesehen hat, wodurch bei vorgegebener Fließgeschwindigkeit und Länge der Behandlungstrecke die Repetitionsrate des Generators festgelegt ist. Zur Realisierung der für die meisten Anwendungen aus ökonomischen Gründen notwendigen hohen Durchsätze

(> 100 m³/h) sind daher relativ große Elektrodenflächen (> 1000 cm²) und Elektrodenabstände (> 20 cm) erforderlich. Die elektrolytische Leitfähigkeit der Zellsuspensionen liegt typischerweise bei 0,1 S/m. Bei einer Feldstärke von 1 MV/m und einer Elektrodenfläche von 1000 cm² beträgt die Pulsstrombelastung des Generators 10 kA. Als Generatoren sind daher nur Hochspannungspulsgeneratoren, mit kleinem Innenwiderstand und einer Impulsleistung im Gigawattbereich geeignet. Abhängig vom Elektrodenabstand sind Impulsamplituden bis in den Megavolt-Bereich erforderlich. Solche Impulse lassen sich mit Marxgeneratoren, Kettenleiteranordnungen, Kabelimpulseneratoren oder Kombinationen derselben erzeugen.

Aufschluss pflanzlicher Zellen

Um die in einer Pflanzenzelle akkumulierten Nahrungsmittel, wie Zucker, Stärke, Fette etc. gewinnen zu können, muss die Zellmembran und meist auch noch die Membran von Organellen, die im Inneren der Zelle als Speicher dienen, geöffnet werden. Dies kann thermisch, mechanisch, chemisch-enzymatisch oder eben auch mit Hilfe starker gepulster elektrischer Felder erfolgen. Die Vorteile der Elektroporation gegenüber den herkömmlichen Verfahren sollen hier zunächst am Beispiel der Gewinnung von Zucker aus Zuckerrüben dargestellt werden, einer Anwendung, die von uns zusammen mit der Südzucker AG und



Abb. 3: Die mobile Karlsruher Elektroporations-Anlage KEA. Links eine Gesamtansicht der Anlage. Rechts das Prozessgefäß mit den in die Wand eingelassenen 4 Elektrodenpaaren aus Edelstahl. Bei nominaler Pulsspannung erreicht das Feld zwischen den Elektroden 12 kV/cm. Die elektrischen Impulse werden mit einer Frequenz von bis zu 10 Hz, mit einer Amplitude von 300 kV und einer Dauer von $\sim 1 \mu$ s mit Hilfe eines sechsstufigen Marxgenerators erzeugt. Die Rüben durchfallen das Rohr von oben nach unten in einem Wasserbad und verlassen es mit Hilfe eines Schneckenförderers.

dem Ingenieurbüro Lutz & Kern entwickelt wird [3].

Das Standardverfahren zur Gewinnung von Zucker aus Zuckerrüben besteht darin, die Zuckerrüben zu schnitzeln und anschließend bei erhöhten Temperaturen mit so wenig Wasser wie möglich zu extrahieren [4]. Der im Zellsaft enthaltene Zucker kann die Zelle nur verlassen, wenn die Membranen der Zelle und der Vakuole, die als Speicher dient, zerstört wurden. In modernen Zuckerfabriken wird dies durch thermische Denaturierung bei Temperaturen von mehr als 70° C erreicht. Bei diesen Temperaturen werden auch unerwünschte Substanzen aus den Zellwänden wasserlöslich. Diese Substanzen müssen später durch ein aufwändiges Reinigungsverfahren wieder aus dem Rohsaft entfernt werden.

Erhebliche Energieeinsparungen und weniger aufwändige Reini-

gungsprozeduren sind denkbar, wenn der Zellaufschluss mit Hilfe gepulster elektrischer Felder erfolgen kann. Dazu müssen die Vorteile der neuen Technik allerdings nicht nur im Labor demonstriert werden, sondern auch ein gangbarer Weg aufgezeigt werden, wie die in einer Zuckerfabrik notwendigen Durchsätze von mehr als 10 000 t Rüben pro Tag erreicht werden können.

Um die potentiellen Vorteile des Verfahrens auszuloten, wurde zunächst die mobile Anlage KEA (Karlsruher Elektroporations-Anlage) (Abb. 3) gebaut und im Technikum der Südzucker AG in Offstein in mehreren Versuchskampagnen eingesetzt.

Die an KEA behandelten Zuckerrüben wurden geschnitzelt und entweder mit hohem Druck kalt gepresst oder mit Wasser bei unterschiedlichen Temperaturen extrahiert. Die Abb. 4 zeigt die Kon-

sistenz einer Rübe vor und nach der Behandlung zusammen mit der entsprechenden Saftausbeute durch 15 minütiges Kaltpressen mit 32 bar. Um die gleiche Saftausbeute wie bei thermischer Denaturierung zu erzielen, ist ein vielfach geringerer Energieaufwand erforderlich. Daneben konnte durch die Experimente mit KEA auch gezeigt werden, dass sich ein reinerer Rohsaft, der weniger durch unerwünschte Stoffe belastet ist, gewinnen lässt.

Um zu demonstrieren, dass sich diese Technik auch zu den in einer großen Zuckerfabrik notwendigen Durchsätzen skalieren und wirtschaftlich vorteilhaft betreiben lässt, wurde anschließend die Anlage KEA-ZAR (Zellaufschlussreaktor) auf dem Gelände der Zuckerfabrik Offstein errichtet und im Herbst 2002 erprobt. Obwohl noch Verbesserungen der Feldhomogenität notwendig

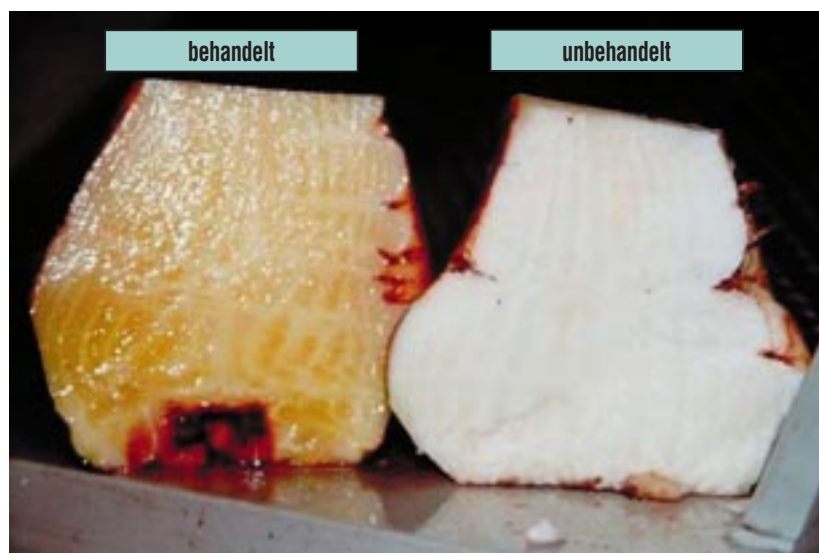


Abb. 4: Links: Konsistenz einer Zuckerrübe rechts vor und links nach Elektroporation. Safttropfen auf der linken Schnittfläche der behandelten Rübe sind ein Indikator für die Zerstörung der Zellmembranen. Rechts: Saftausbeute nach Elektroporation und 15-minütigem Kaltpressen mit 32 bar (links), Saftausbeute nach klassischer Behandlung (rechts).

erscheinen, hat sich das Grundkonzept der KEA-ZAR-Anlage dabei bewährt und bildet die Grundlage für den Bau einer Anlage mit Durchsätzen von bis zu 2500 t/d.

Sterilisation mit gepulsten elektrischen Feldern

Die Abtötung von Bakterien und anderen Mikroorganismen ist ein weiteres attraktives Anwendungsfeld der Elektroporation. Allerdings sind hierfür erheblich höhere Feldstärken als zum Aufschluss pflanzlicher Zellen notwendig, und die Realisierbarkeit einer effektiven Sterilisation allein durch Anwendung starker gepulster elektrischer Felder erscheint erheblich unsicherer.

Die Effizienz der Keimabtötung hängt dabei von einer großen Zahl variabler Parameter (Impulsamplitude, Impulsdauer, Repetitionsfrequenz, Anstiegszeit, Temperatur, Keimtyp, Stadium der Keimentwicklung, etc.) ab. Dies ist vermutlich der Grund für die sehr widersprüchlichen Angaben in der Literatur. Daher haben wir in Zusammenarbeit mit dem ITC-WGT mit eigenen systematischen Untersuchungen zur Keimabtötung begonnen.

Mittelfristiges Ziel ist dabei die Nachbehandlung gereinigter Abwässer aus Kläranlagen zur Reduktion der Keimzahl. Die Attraktivität des Verfahrens beruht hierbei auf der möglichen Vermeidung unerwünschter Nebeneffekte, die bei chemischen Desinfektionsverfahren auftreten können. Im Abwasser von Kläranlagen treten in wachsender Zahl

auch antibiotikaresistente Bakterien auf, deren Freisetzung in die aquatische Umwelt unvorhersehbare Folgen haben kann. Eine Reduktion der bakteriellen Belastung dieser Abwässer mit einem umweltfreundlichen und ökonomisch attraktiven Verfahren vor ihrer Abgabe in die Umwelt ist daher äußerst wünschenswert.

Bislang wurde der Einfluss zweier Impulsformen auf die keimabtötende Wirkung an dem Laborbakterienstamm *Pseudomonas putidas* untersucht.

Mit den nahezu rechteckförmigen Impulsen eines Kettenleitergenerators und steilen Impulsflanken ergaben sich dabei die besten Ergebnisse. Hier liegt die elektrische Feldstärke nahezu während des gesamten Impulse über dem kritischen Wert. Die ursprüngliche Keimzahl wurde dabei um mindestens den Faktor 1000 pro Impuls reduziert. Leider setzt sich der exponentielle Verlauf der Abtötungsrate mit zunehmender Impulszahl nicht fort. Vielmehr wird eine Sättigung beobachtet, deren Ursachen bisher nicht verstanden sind. Die Untersuchungen werden gegenwärtig mit anderen Bakterienstämmen fortgeführt.

Weiteres Potential der Elektroporation

Der im vorigen Abschnitt beschriebenen Aufgabe ähnlich ist die Unterdrückung von Biofouling, d.h. die Anlagerung von biologischem Material auf feuchten Oberflächen, in aquatischen Systemen im Kraftwerksbereich und in der chemischen Prozesstechnik.

Eine Vielzahl sehr unterschiedlicher Organismen wie Bakterien, Protozoen, Pilzen, Muscheln, Algen, etc. kann an der Bildung solcher Anlagerungen beteiligt sein. Die Bekämpfung mit Bioziden ist häufig schwierig und wegen der damit verbundenen Umweltbelastungen oder einer möglichen Unvereinbarkeit mit dem industriellen Prozess manchmal unakzeptabel. Es ist daher geplant, zu untersuchen, ob mit Hilfe gepulster elektrischer Felder die Entstehung solcher Biofilme vermieden werden kann und ob sich vorhandene Biofilme mit dieser Technik beseitigen lassen.

Ein weiteres bisher weitgehend unerschlossenes Forschungsgebiet ist der Einsatz der Elektroporation für die Gewinnung hochwertiger Inhaltsstoffe, z.B. von Biopolyester, aus Mikroorganismen wie Mikroalgen und Bakterien. Mit dem Umweltbiotechnologischen Zentrum des Umweltforschungszentrums Leipzig UFZ) soll untersucht werden, ob sich durch Kombination der Elektroporation mit bisher verwendeten chemisch-enzymatischen Aufschlussverfahren eine Verbesserung der Wirtschaftlichkeit bei der Gewinnung von Biopolyestern erreichen lässt.

Schlussfolgerungen

Mit Hilfe starker gepulster elektrischer Felder lassen sich biologische Zellen aufschließen und abtöten. Dieser Effekt besitzt das Potential für zahlreiche neuartige Anwendungen zur Gewinnung von werthaltigen Grundstoffen für die Nahrungsmittelindustrie und eine nachhaltige Chemieindustrie.

trie, zur Reduktion der Keimzahl in der Wasseraufbereitung und zur Unterdrückung von Biofouling in aquatischen Systemen im Kraftwerksbereich und in der chemischen Prozesstechnik. In Kombination mit anderen physikalischen, chemischen und bio-

logischen Verfahren kann die Elektroporation zudem zu erheblichen Verfahrensverbesserungen führen.

Sowohl die Erforschung als auch die Anwendung der Wirkung starker gepulster elektrischer Felder

auf biologische Zellen erfordert eine intensivere Kooperation zwischen Physikern, Hochspannungs- und Chemieingenieuren, Biologen und Medizinern.

Literatur

- [1] J. C. Weaver, Yu. A. Chizmadzhev, *Theory of electroporation: A review, Bioelectrochemistry and Bioenergetics Vol. 41, 135-160, 1996*
- [2] R. P. Joshi, K. H. Schoenbach, *Electroporation dynamics in biological cells subjected to ultra fast electrical pulses: A numerical simulation study, Phys. Rev. Vol. 62, No. 1, 1025-1033, 2000*
- [3] C. Schultheiss, H. Bluhm, H.-G. Mayer, M. Kern, T. Michelberger, G. Witte, *Processing of sugar beets with pulsed-electric fields, Plasma Science, IEEE Transactions on, Vol. 30 Issue 4, 1547-1551, 2002*
- [4] H. Schiweck, M. Clarke, *in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Sixth Edition, 2001 Electronic Release, Wiley-VCH, Weinheim, Germany 2001*