

# Molekulardynamische Untersuchung der Stressbeanspruchung von Proteinen

## Molekulardynamische Untersuchung der Stressbeanspruchungen auf Proteine an der Phasengrenzfläche beim Premix-Membranemulgieren

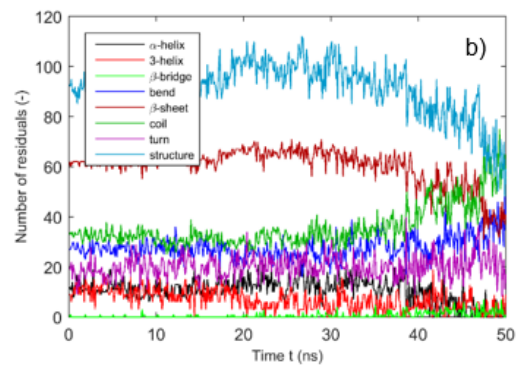
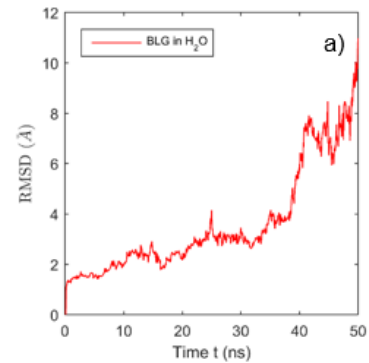
T. Wollborn, L. Luhede, U. Fritsching, Fachgebiet Mechanische Verfahrenstechnik, Universität Bremen

### Kurzgefasst

- Stressbelastung
- Premix-Membranemulgieren
- Phasengrenzflächen
- Molekulardynamik
- Protein

Emulgiervorgänge werden im Rahmen des Downstream-Prozessierens und der Weiterverarbeitung/Formulierung zur Homogenisierung oder auch Verkapselung in biogenen Produkten eingesetzt. Beim Premix-Emulgieren wird eine grobdisperse Voremulsion mittels der Dispergierung in porösen Membranen in eine Feinemulsion bzw. -dispersion überführt. Insbesondere das Stress-Verweilzeitverhalten und die darauf erfolgende Reaktion eines protein-stabilisierten dispersen Systems bedarf einer vertieften wissenschaftlichen Klärung. Hieraus können mechanistische Schädigungsmodelle abgeleitet werden. Die im Emulgiervorgang auftretenden mikromechanischen Belastungen auf biologische Systeme sind nicht vollständig geklärt, die Prozessumgebung ist somit noch weiter zu entwickeln im Hinblick auf die Anpassung an spezielle biologische Systeme.

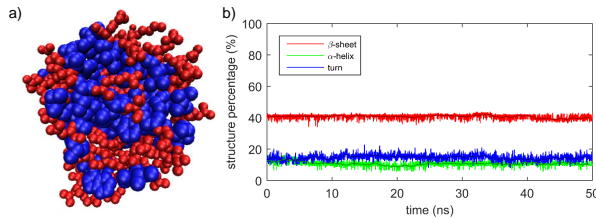
Um den Einfluss des Premix-Emulgiervorgangs und der dabei auftretenden Stress-Verweilzeit-Belastungen auf die agglomerierten Proteine im Fluid und an den Phasengrenzflächen zu untersuchen, werden numerische Untersuchungen auf molekuldynamischer Ebene an Proteinstrukturen durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigen, inwieweit die Proteinstrukturen durch den Emulgiervorgang belastet und geschädigt werden können, beziehungsweise ob eine proteinschonendere Emulgierung mit den Membranen möglich ist. Abbildung 1 zeigt beispielhaft, wie sich die Proteinstruktur eines Proteins ( $\beta$ -Lactoglobulin) unter Stresseinfluss verändern kann.



**Abbildung 1:** Änderung der Root Mean Square Deviation (a) und der Sekundärstruktur (b) von  $\beta$ -Lactoglobulin unter Stresseinfluss

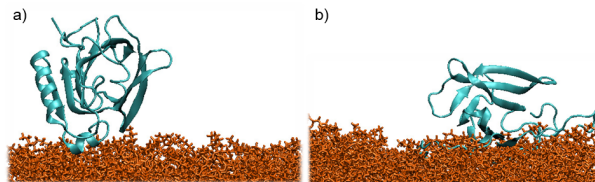
In bisherigen wurde zunächst die Adsorption von Einzelproteinen an der Öl-Wasser-Phasengrenzfläche in Form von molekuldynamischen Simulationen untersucht, um bevorzugte Adsorptionskonfigurationen ausfindig zu machen. Es konnte gezeigt werden, dass abhängig vom eingestellten pH-Wert unterschiedliche Adsorptionskonfigurationen auftreten und das Protein in allen Fällen eine Affinität hin zur Phasengrenzfläche zeigt. Da sich das Protein innerhalb seiner Startkonfiguration in der wässrigen Phase befindet, wird vermutet, dass vor allem die hydrophoben Aminosäuren des Proteins für diese Affinität verantwortlich sind. Eine Analyse der nach Adsorption mit der Phasengrenzfläche interagierenden Aminosäuren zeigt allerdings, dass es sich bei einem großen Teil dieser Aminosäuren um hydrophile Anteile des Proteins handelt, was der Annahme widersprechen würde. Die Ursache dafür zeigt eine Analyse der Proteinstruktur während des Adsorptionsvorgangs. Abbildung 2 a) zeigt dazu

die hydrophilen (rot) und hydrophoben (blau) Aminosäuren des Proteins. Wie zu erkennen ist, liegen die hydrophilen Aminosäuren in wässriger Lösung erwartungsgemäß weiter außen, als die Hydrophoben.



**Abbildung 2:** Hydrophile (rot) und hydrophobe (blau) Aminosäuren von *b*-Lactoglobulin (a) und Sekundärstruktur des Proteins während des Adsorptionsvorgangs (b)

Damit es zu einer Interaktion der hydrophoben Anteile mit der Phasengrenzfläche kommen kann, ist daher eine Änderung der Proteinstruktur (Entfaltung) erforderlich. Experimentell wurde die Proteinentfaltung an Öl-Wasser-Phasengrenzen unter anderem in (Zhai et al., 2010) beschrieben. Ein Vergleich mit der Proteinstruktur während des simulierten Adsorptionsvorgangs in Abbildung 2 b) zeigt allerdings, dass während des gesamten Simulationszeitraums die Proteinentfaltung ausbleibt und es so nicht zu einer stärkeren Adsorption der hydrophoben Aminosäuren an der Phasengrenzfläche kommt. Eine Ursache dafür könnte sein, dass die nötige Zeit für diese Entfaltung deutlich über der möglichen Simulationszeit liegt oder das Protein in einem Energieminimum liegt, dessen Überwindung im Rahmen der Simulation nicht möglich ist. Daher wurde zu einer Überprüfung dieser These die kinetische Energie des Systems für einzelne Beispielkonfigurationen aus den vorherigen Untersuchungen erhöht (Erhöhung der Temperatur). Das Resultat in Abbildung 3 zeigt bei erhöhter kinetischer Energie eine deutliche Entfaltung des Proteins an der Phasengrenzfläche.



**Abbildung 3:** Protein an der Phasengrenzfläche vor (a) und nach Entfaltung (b)

Die Analyse der Kontaktstellen zwischen Protein und Grenzfläche weist zudem einen größeren Anteil an hydrophoben Aminosäuren auf, was die Anfangshypothese bestätigt. Das zeigt, dass bei erhöhter kinetischer Energie eine Überwindung der

Barrieren zur Strukturänderung möglich ist und sich die Aminosäuren des Proteins gemäß ihrer hydrophilen oder hydrophoben Neigung ausrichten können. Zudem lässt sich ein Rückgang der  $\beta$ -Faltblattstrukturen erkennen, wie in (Zhai et al., 2010) beschrieben wurde. Neben der Beschreibung der Orientierung des Proteins bei der ersten Anlagerung kann also zudem das weitere Verhalten an der Phasengrenzfläche in Form von den in der Literatur beschriebenen Strukturänderungen erläutert werden. Dadurch sind genauere Aussagen über den Zustand des Proteins an der Phasengrenzfläche möglich, die für die Betrachtung der Stressbeanspruchungen entscheidend sind.

In dieser Antragsperiode wird daher die Proteinentfaltung an der Phasengrenzfläche molekulardynamisch untersucht und mit experimentellen Daten (Circular Dichroism) verglichen. Dabei werden verschiedene Adsorptionskonfigurationen verwendet, wie sie in vorherigen Untersuchungen analysiert wurden. Ziel dabei ist es zunächst, die idealen Simulationsbedingungen für die Beschreibung der Proteinentfaltung ausfindig zu machen und die Strukturänderungen und Wechselwirkungen an der Phasengrenzfläche zu beschreiben. Im Anschluss werden die nach Entfaltung erhaltenen Konfigurationen Stressbeanspruchungen in Form von Schergradienten ausgesetzt. Ziel dabei ist es dabei zu beschreiben, wie sich das Protein unter Scherstress an der Phasengrenzfläche verhält und inwiefern Deformationen und Strukturänderungen auftreten. Die Resultate werden mit weiteren Untersuchungen des oben genannten Emulgierprozesses zusammengebracht werden, um eine mögliche Proteinschädigung in diesem Prozess beschreiben zu können.

#### Literatur

Zhai, J. et al. (2010). Changes in *b*-Lactoglobulin Conformation at the Oil / Water Interface of Emulsions Studied by Synchrotron Radiation Circular Dichroism Spectroscopy, 2136-2142.

WWW

<http://www.iwt-bremen.de>

Weitere Informationen

Förderung

DFG SPP 1934 DISPBiotech