

Einfluss von Prozessfaktoren auf die Bildung und den Abbau von amyloiden und amyloidartigen Aggregaten von beta-Lactoglobulin

M.Sc Timon R. Heyn

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. K. Schwarz

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses von Prozessparametern auf die Bildung und den Abbau von amyloiden und amyloidartigen Aggregaten aus beta-Lactoglobulin (BLG). Amyloide Strukturen zeichnet die Stapelung von beta-Strängen zu sogenannten cross-beta- Faltblättern aus. Bei einem pH-Wert von 2 und ausreichend hohen Temperaturen, niedriger Ionen- und moderater Proteinkonzentration bilden sich aus dem Proteinmolekül lange, semiflexible amyloide Fibrillen. Bei den gleichen Prozessbedingungen, aber bei einem pH-Wert von 3,5, entstehen flexible wurmartige Aggregate, die als amyloidartig bezeichnet werden können. Während die BLG Fibrillen bezüglich ihrer Struktur relativ gut untersucht sind, gibt es wenig Informationen bezüglich der Struktur der wurmartigen Aggregate bei pH 3,5. Darüber hinaus wurde bisher kein Vergleich der unterschiedlichen Morphologien hinsichtlich physikalisch-chemischer Eigenschaften sowie Bildungskinetik und Stabilität in Abhängigkeit von mechanischer Belastung oder Grenzflächen durchgeführt. Diese Information ist relevant, um den Wert der jeweiligen Aggregate für unterschiedliche Anwendungen, wie z.B. neue Materialien oder medizinische Anwendungen, sowie für innovative lebensmitteltechnologische Applikationen einschätzen zu können. In der Vergangenheit konnten bereits die, im Vergleich zum Ausgangsprotein veränderten, Grenzflächeneigenschaften belegt werden. So führt z.B. die Anwendung von Fibrillen zu höherer physikalischer und chemischer Stabilisierung von Öl-Wasser-Emulsionen und Schäumen. Das hohe Längen-Breiten-Verhältnis der Fibrillen erzeugt höhere Kapillarkräfte und größere Elastizitäts- und Verlustmodule an den Grenzflächen, wodurch BLG-Fibrillen idealerweise in innovativen Pickering-Emulsionen eingesetzt werden können. Bei der Emulsionsherstellung sind die Proteinstrukturen allerdings hohen Scherkräften und z.T. Kavitation in Kombinationen mit einer hohen spezifischen Oberfläche der Öl-Wasser Grenzfläche ausgesetzt. Diese Prozessfaktoren können zu einem Abbau der amyloiden Aggregate beitragen. Andererseits haben Scherung und Grenzflächen – neben anderen Faktoren wie Temperatur, pH-Wert und Ionenkonzentration – auch eine hohe Relevanz für die Entstehung von amyloiden Strukturen. Bis jetzt wurden die Szenarien der Aggregatbildung und des -abbaus nicht gegenübergestellt und auch noch keine tiefere Untersuchung der relevanten Prozessfaktoren angestellt. Erkenntnisse hierüber sind aber von Bedeutung, um z.B. die Bildung von amyloiden Aggregaten zu optimieren, ihren Abbau in verarbeitenden Prozessen zu minimieren oder ihre ungewollte Bildung in lebensmittelverarbeitenden Prozessketten zu verhindern.

In dieser Arbeit erfolgte als erster Schritt die Untersuchung der Struktur und der physikalisch-chemischen Eigenschaften der unterschiedlichen Aggregate. Es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu den Fibrillen, die aus Peptiden entstehen, bei pH 3,5 unhydrolysiertes BLG zu den wurmartigen Morphologien assembliert. Nach der Fraktionierung von aggregierten und unaggregierten Proteinen konnte ein höherer Anteil an beta-Faltblättern, eine höhere Kompaktheit, eine höhere Oberflächenladung und eine geringere Hydrophobizität der Fibrillen im Vergleich zu den wurmartigen Aggregaten festgestellt werden. Im zweiten Schritt wurde die Abhängigkeit der Aggregationskinetik von verschiedenen Prozessparametern, wie Temperatur, pH-Wert, Proteinkonzentration, Ionenkonzentration und Rührgeschwindigkeit im Inkubationsgefäß untersucht. Die Temperatur konnte als wichtigster Faktor identifiziert werden. Es konnten außerdem Wechselwirkungen der Temperatur mit pH-Wert und der Rührgeschwindigkeit festgestellt werden. Diese basierten auf der pH-abhängigen Reduzierung der Denaturierungstemperatur sowie der viskositätsabhängigen Schubspannung. In weiteren Schritten wurde der Einfluss von mechanischen Energieeinträgen und Oberflächen auf die Aggregationskinetik durch den Einsatz von chemisch modifizierten Glaskugeln im Schüttelinkubator untersucht. Es zeigte sich, dass die Aggregationskinetik von amyloiden Fibrillen eine starke Abhängigkeit vom mechanischen Energieeintrag und von der Oberflächen-Chemie aufweist, während amyloidartige Aggregate gegenüber beiden Faktoren unabhängig sind. Bereits durch den Einsatz der Glaskugeln konnte eine Verkürzung der Aggregatlänge festgestellt werden, welche im nächsten Schritt unter Einsatz von Rotor-Stator-Dispersion und Ultraschall in ein- oder zweiphasigen (Öl-Wasser) Systemen tiefergehend untersucht wurde. Hierbei konnte eine Abhängigkeit der Fibrillenverkürzung von der Rotor-Stator-Scherung festgestellt werden, während die wurmartigen Aggregate unverändert blieben. Eine hohe Fragmentierung von beiden Aggregaten wurde durch Applikation von Kavitation erreicht. In zweiphasigen Systemen wurden geringere Aggregatlängen bereits bei niedrigeren Energieeinträgen erreicht, was auf einen scherkraft-maximierenden Einfluss der Grenzflächen hinweist.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit zeigen, dass beide Aggregationsformen unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich ihrer Struktur, physikalisch-chemischen Eigenschaften, Bildungskinetik und Prozessstabilität aufweisen, was sie für unterschiedliche technologische Anwendungen geeignet macht. Die Verwendung von wurmartigen Aggregaten könnte zu neuen Materialien oder Funktionalitäten in Lebensmittelprodukten führen. Der innovative Ansatz amyloide Fibrillen mit Hilfe von freibeweglichen Glaskugeln beim Schütteln herzustellen, kann zu einer effizienteren und kostensparenderen Möglichkeit der Fibrillen-Produktion führen.