

D 2048

**12**  
**2008**

Dezember 2008  
80. Jahrgang

CITEAH 80 (12)  
1731-1868 (2008)  
ISSN 0009-286 X

**Reprint**

**Herausgeber:**

DECHEMA  
GDCh  
VDI · GVC

# Chemie Ingenieur Technik

Verfahrenstechnik · Technische Chemie · Apparatewesen · Biotechnologie

[www.CIT-journal.de](http://www.CIT-journal.de)

**Schwerpunkte**

Biothermodynamik · Reaktoren · Umwelt

 **WILEY-VCH**



# Perspektiven der Biothermodynamik

## III. Thermische Stabilität von Proteinen

Jürgen U. Keller

Die Anwendung von Begriffen und Methoden der Thermodynamik der Gleichgewichte und der Vorgänge auf Systeme und Prozesse der Biotechnologie hat zur Bildung eines neuen Fachgebietes geführt, der technischen Biothermodynamik. Der vorliegende Artikel ist der dritte einer Reihe, in der versucht wird, einen Überblick über die Grundlagen und Möglichkeiten, die dieses Gebiet dem Verfahreningenieur eröffnen, zu geben und dies auch an einzelnen Beispielen zu demonstrieren. In diesem Artikel wird das Problem der thermischen Stabilität von Proteinen in Lösungen thermodynamisch analysiert. Dabei wird der Übergang eines Proteins aus seinem natürlichen Zustand in einen (beliebigen) denaturierten Zustand als quasichemische Reaktion modelliert. Als Beispiel wird die thermische Stabilität von Myoglobin in wässriger Lösung mit Hilfe kalorischer Messdaten analysiert. Dabei zeigt sich, dass dieses Protein sowohl bei zu hohen als auch zu niedrigen Temperaturen denaturiert.

**Schlagerwörter:** Biothermodynamik, Denaturierung, Proteine, Thermische Stabilität

*Eingegangen:* 14. Juli 2008; *akzeptiert:* 30. September 2008

### 1 Einführung

Der vorliegende Artikel ist der dritte einer Serie von Kurzdarstellungen bzw. Einführungen in das verhältnismäßig neue Gebiet der technischen Biothermodynamik [1–3]. Darunter sind Anwendungen thermodynamischer Konzepte und Methoden auf Fragestellungen der Biotechnologie zu verstehen. Nach einer verkürzten Darstellung der Grundlagen unter Berücksichtigung von Systemen mit sogenannten inneren Variablen [2] und der Entwicklung der Thermodynamik von Adsorptionserscheinungen von Proteinen an festen Oberflächen [3] sollen in der vorliegenden Arbeit Fragen nach der thermischen Stabilität von proteinhaltigen Lösungen thermodynamisch analysiert werden.

Die besondere Rolle, die Proteine unter Biomolekülen spielen, wird dadurch begründet, dass sie schlechterdings als Bausteine des Lebens angesehen werden können [17–19]. Proteine besitzen eine Molmasse von vielen Kilodalton (kDa) oder sogar mehreren Megadalton (MDa). Sie kommen in der Natur vor allem in wässrigen Lösungen, aber auch in dichter Packung (crowding) im Inneren von Zellen und Bakterien vor. Ihre biochemischen Eigenschaften hängen stark von ihrem Zustand, insbesondere ihren Faltungseigenschaften (Struktur 3. Ordnung) ab, die empfindlich

auf Änderungen der Temperatur (und des Drucks) in einer Lösung reagieren. Daher ist es in der Praxis wichtig, das Temperaturintervall zu kennen, in dem z. B. ein als medizinischer Wirkstoff pharmazeutisch verwendetes Protein in seiner Lösung oder *Formulierung* thermisch stabil ist. Die Thermodynamik kann diese und ähnliche Fragen beantworten, wenn gewisse kalorische Daten zur Verfügung stehen. Damit lassen sich dann Aussagen über die Haltbarkeitsdauer (shelf life) des Medikaments etwa bei der Vorratshaltung in einer Apotheke machen [16]. Der allgemeine Formalismus wird am Beispiel einer Myoglobin-Lösung numerisch erläutert und diskutiert.

### 2 Thermodynamische Analysen der Denaturierung von Proteinen

Proteine sind in ihrem natürlichen Zustand in der Regel sehr dicht gepackt und ihre Aminosäurekette ist stark gefaltet. In diesem Zustand sind sie oft erstaunlich stabil gegenüber ihrer Umgebung und behalten deswegen auch ihre biokatalytischen Eigenschaften. Ändert sich aber die Umgebung eines Proteins zu stark, z. B. durch extreme Werte von Temperatur, Druck und pH-Wert der umgebenden Lösung, dann kann das Protein seine natür-

**Unter der technischen Biothermodynamik sind Anwendungen thermodynamischer Konzepte und Methoden auf Fragestellungen der Biotechnologie zu verstehen.**

**Es ist in der Praxis wichtig, das Temperaturintervall zu kennen, in dem z. B. ein pharmazeutisch verwendetes Protein in seiner Lösung oder *Formulierung* thermisch stabil ist. Mit Hilfe der Thermodynamik kann dies beantwortet werden.**

**Ein Protein kann in einen denaturierten Zustand übergehen, in dem häufig die Aminosäurenkette des Proteins ganz oder teilweise entfaltet ist und eventuell vorhandene Seitenketten stochastisch im Raum verteilt sind. Dies führt meist zum Verlust der Bioaktivität des Proteins.**

liche Struktur verlieren, d.h. von seinem ursprünglichen oder nativen Zustand (N) in einen denaturierten oder auch deformierten Zustand (D) übergehen. In diesem ist häufig die Aminosäurenkette des Proteins ganz oder teilweise entfaltet und alle eventuell vorhandenen Seitenketten sind stochastisch im Raum verteilt. Dies führt in der Regel zum Verlust der Bioaktivität des Proteins (s. Abb. 1) [2, 13, 16, 17].

Obwohl der molekulare Mechanismus dieses Übergangs ( $N \rightarrow D$ ) und auch die Struktur des denaturierten Zustandes (D) oft unbekannt sind, weiß man aus Erfahrung, dass sich das denaturierte Protein wieder zurückfalten, der Übergang ( $N \leftrightarrow D$ ) also reversibel sein kann. In diesen Fällen kann man diesen Übergang als quasichemische Reaktion ansehen, bei der sich ein chemisches Gleichgewicht zwischen Proteinen ( $P_N$ ) in ihrem natürlichen Zustand (N) und denen ( $P_D$ ) in einem gewissen denaturierten Zustand (D) einstellt:



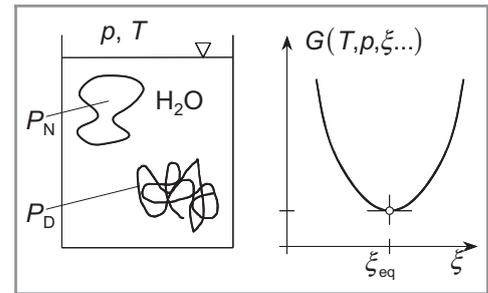
Der Gleichgewichtszustand, der sich in einer Lösung einstellt, die sowohl native (N) als auch denaturierte Proteine (D) bei einem gewissen Druck ( $p$ ) und einer Temperatur ( $T$ ) enthält (s. Abb. 2), kann durch ein Minimum der freien Enthalpie der Lösung gekennzeichnet werden, d. h. es gilt:

$$G = G(n_N, n_D, n_W, n_{H^+}, p, T) \rightarrow \text{Min} \quad (2)$$

bei konstanten Werten von [4, 5, 11, 12]:

$$n = n_D + n_N, n_W, n_{H^+}, p, T$$

Hier bedeuten ( $n_N, n_D, n_W, n_{H^+}$ ) die Molzahlen des Proteins im natürlichen (N) bzw. denaturierten Zustand (D), die Molzahl des



**Abbildung 2.** Wässrige Lösung eines Proteins im natürlichen, dicht gepackten Zustand (N) und im denaturierten, entfalteten Zustand (D). Freie Enthalpie nach Gibbs als Funktion der Reaktionszahl ( $\xi$ ) der quasichemischen Reaktion ( $N \leftrightarrow D$ ) mit dem Gleichgewichtswert ( $\xi_{\text{eq}}(p, T)$ ).

Wassers in der Lösung und die der  $H^+$ -Ionen (pH-Wert).

Durch Einführung der Reaktionszahl ( $\xi$ ) der quasichemischen Reaktion ( $N \leftrightarrow D$ ) durch die Beziehungen:

$$\begin{aligned} n_N &= n_{N0} - \xi \\ n_D &= n_{D0} + \xi \end{aligned} \quad (3)$$

$$\text{d. h. } dn_N = -dn_D = -d\xi \quad (4)$$

erhalten wir aus der Gibbs-Gleichung der freien Enthalpie ( $G$ ):

$$dG = -SdT + Vdp + \mu_N dn_N + \mu_D dn_D + \mu_W dn_W + \mu_{H^+} dn_{H^+} \quad (5)$$

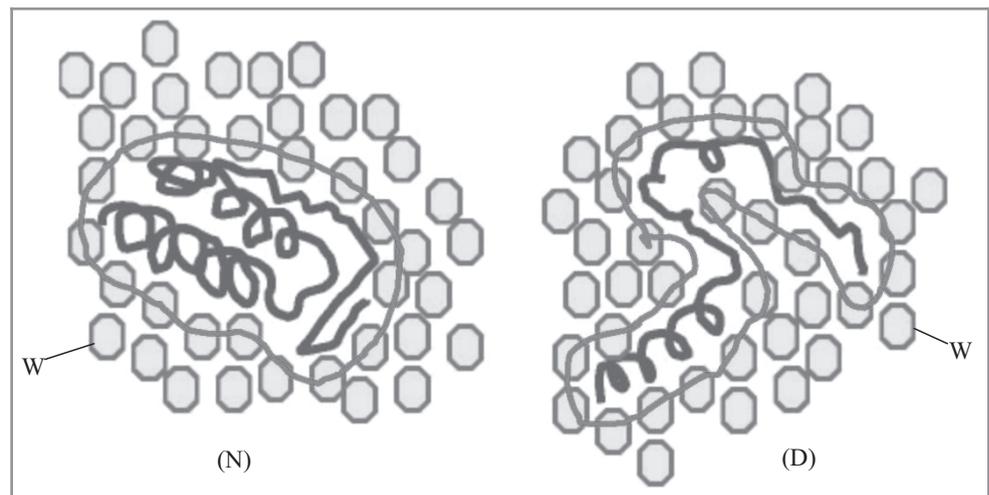
bei konstanten Werten von:

$$p = \text{const}, T = \text{const}, n_W = \text{const}, n_{H^+} = \text{const}$$

die Minimierungsbedingungen

$$dG = (-\mu_N + \mu_D) d\xi = 0$$

$$d^2G = \left( \frac{\partial}{\partial \xi} (-\mu_N + \mu_D) \right) (d\xi)^2 > 0, \quad (6)$$



**Abbildung 1.** Protein (P) in wässriger Lösung (W). N – natürlicher, dicht gepackter Zustand; D – Denaturierter oder entfalteter Zustand [3]; W – Wasser.

Im quasichemischen Gleichgewicht gilt:

$$\mu_N(\dots\xi_{\text{eq}}\dots) = \mu_D(\dots\xi_{\text{eq}}\dots) \quad (7)$$

$$\left(\frac{\partial\mu_D(\xi)}{\partial\xi}\right)_{p,T,\xi_{\text{eq}}} > \left(\frac{\partial\mu_N(\xi)}{\partial\xi}\right)_{p,T,\xi_{\text{eq}}} \quad (8)$$

In den Beziehungen der Gl. (3) bedeuten die Größen ( $n_{N0}$ ,  $n_{D0}$ ) die Molzahlen des nativen bzw. denaturierten Proteins in einem beliebig wählbaren Anfangszustand ( $Z_0$ ) zu einer beliebigen Anfangszeit. Die Größen  $\mu_x$ ,  $x = N, D, W, H^+$  in Gl. (5) sind die chemischen Potentiale der Komponenten  $x = N, D, W, H^+$  in der Lösung.

Aus Gl. (7) kann grundsätzlich die Reaktionslaufzahl im Gleichgewicht der quasichemischen Reaktion algebraisch berechnet werden:

$$\xi_{\text{eq}} = \xi_{\text{eq}}(p, T, n_W, n_{H^+}, n_{D0}, n_{N0}) \quad (9)$$

Diese Größe hängt grundsätzlich vom Druck ( $p$ ), der Temperatur ( $T$ ) und von den Molzahlen ( $n_W, n_{H^+}, n_{D0}, n_{N0}$ ) der Lösung ab.

Die Ungleichung (8) muss grundsätzlich für stabile thermodynamische Protein-Gleichgewichte gelten. Die Grenzkurve bzw. Grenzfläche zwischen dem stabilen und dem instabilen Zustandsbereich ist durch die folgende Bedingung bestimmt:

$$\left(\frac{\partial\mu_D(\xi')}{\partial\xi'}\right)_{p,T,n_w} = \left(\frac{\partial\mu_N(\xi')}{\partial\xi'}\right)_{p,T,n_w} \quad (8a)$$

Aus ihr können durch algebraische Auflösung über Gl. (3) die Grenzkonzentrationen für stabile Proteinlösungen grundsätzlich berechnet werden:

$$\xi' = \xi'(p, T, n_W, n_{H^+}) \quad (8b)$$

Um die Gleichgewichtsbedingung (7) nun auszuwerten, führen wir eine Standard-Darstellung der chemischen Potentiale aller Komponenten durch Aktivitäten bzw. Aktivitätskoeffizienten ( $\gamma_i$ ) ein:

$$\mu_i = \mu_{i0}(p, T, n_W, n_{H^+}, n_i) + R T \ln(x_i \gamma_i), \quad i = N, D. \quad (10)$$

Hier bedeutet:

$$\mu_{i0} = \mu_{i0}(p, T, n_W, n_{H^+}, n_i), \quad i = N, D. \quad (11)$$

das chemische Potenzial des reinen Proteins ( $P_N, P_D$ ) in der Lösung ( $n_W, n_{H^+}$ ) bei ( $p, T$ ). Ferner sind:

$$x_i = \frac{n_i}{n}, \quad n = n_W + n_{H^+} + n_N + n_D \quad (12)$$

die Molkonzentrationen und:

$$\gamma_i = \gamma_i(p, T, n_W, n_{H^+}, n_N, n_D), \quad i = N, D \quad (13)$$

die Aktivitätskoeffizienten der Komponenten ( $i = D, N$ ) [6]. Für ideale Lösungen gilt  $\gamma_i = 1$ . Für reale Proteinlösungen ist aber in der Regel  $\gamma_i \neq 1$ ,  $i = D, N$ . Ein Beispiel zur tatsächlichen Bestimmung der Werte von ( $\gamma_i$ ) wird im Folgeabschnitt diskutiert werden.

Setzt man Gl. (10) in die Gleichgewichtsbedingung (7) ein, so erhält man das Massenwirkungsgesetz der Reaktion (1), d. h. die Beziehung:

$$K_{\text{eq}} = e^{-\Delta G_{\text{DN}}/RT} \quad (14)$$

mit der Gleichgewichtskonstanten:

$$K_{\text{eq}} = \frac{\gamma_D x_D}{\gamma_N x_N} \quad (15)$$

und der freien Enthalpie-Differenz:

$$\Delta G_{\text{DN}} = \mu_{D0}(p, T, n_W, n_{H^+}, n_D) - \mu_{N0}(p, T, n_W, n_{H^+}, n_D) \quad (16)$$

Da diese Größe grundsätzlich als Funktion der Temperatur ( $T$ ) durch mikro-kalorimetrische Messungen an den entsprechenden Proteinlösungen bestimmt werden kann [7, 8, 14], können die Gleichgewichtskonzentrationen ( $x_D, x_N$ ) des Proteins bei idealen Lösungen ( $\gamma_D = \gamma_N = 1$ ) aus dem Massenwirkungsgesetz Gln. (14) und (15) und der Normierungsbedingung ( $x_D + x_N = 1$ ) bestimmt werden. Ein Beispiel dafür wird im nächsten Abschnitt gegeben werden. Es ist jedoch zu betonen, dass die Annahme der Idealität ( $\gamma_D = \gamma_N = 1$ ) nur eine Näherung und bei konkret vorliegenden Proteinlösungen wegen der Wechselwirkung der Proteine untereinander bei Weitem nicht erfüllt ist. In einem solchen Fall müssen die in der Lösung vorliegenden Konzentrationen ( $x_N, x_D$ ) gemessen werden, etwa durch spektroskopische Verfahren [15]. Die dann aus den Gln. (14) und (15) berechneten Werte von ( $\gamma_N, \gamma_D$ ) lassen sich gegebenenfalls inter- und extrapolieren, um z. B. die Gleichgewichtskonzentrationen ( $x_N, x_D$ ) des Proteins bei anderen Temperaturen zu bestimmen.

Im Übrigen können Proteine auch durch Änderungen des Drucks und des pH-Wertes denaturiert werden. Dies hat seine biotechnische Bedeutung und sollte auch daher grundsätzlich beachtet werden.

Der Denaturierungsprozess selbst kann thermodynamisch mit Hilfe der Thermodynamik irreversibler Prozesse, wie sie in Kapitel (TC) dargelegt worden ist, beschrieben werden. Im vorliegenden Fall kann die Entropie-

**Die Reaktionslaufzahl hängt grundsätzlich vom Druck, der Temperatur und von den Molzahlen der Lösung ab.**

**Proteine können auch durch Änderungen des Drucks und des pH-Wertes denaturiert werden. Dies hat biotechnische Bedeutung.**

**Myoglobin besitzt im natürlichen Zustand als aktives Zentrum einen Protoporphyrin-IX-Ring mit Eisen als Zentralatom. Es ist Teil des Versorgungssystems mit Sauerstoff u. a. für das Herz.**

**Myoglobin reagiert empfindlich auf Schwankungen der Temperatur, wodurch es seine biologische Aktivität verlieren kann.**

produktion ( $P_s$ ) des Denaturierungsvorgangs wegen der in der Praxis häufig anzutreffenden Bedingungen ( $p = \text{const}$ ,  $T = \text{const}$ ) auf einfache Weise mit dem Verlust an freier Enthalpie ( $\dot{G}$ ) (oder Exergie) verknüpft werden. Tatsächlich gilt für diese beiden Größen die Beziehung [10, 12]:

$$\dot{G} = -TP_s \leq 0 \quad (17)$$

Daher lautet die Entropieproduktion des Prozesses im Hinblick auf Gl. (5):

$$P_s = \frac{1}{T}(\mu_N - \mu_D) \dot{\xi} \geq 0 \quad (18)$$

Nach dem Prinzip von Eckard & Onsager [4] kann man daher eine Prozessgleichung für den Denaturierungsvorgang als lineare Beziehung zwischen dem Fluss ( $\dot{\xi}$ ) und der gemäß Gl. (18) zugeordneten *thermodynamischen* Kraft  $(\mu_N - \mu_D)/T$  ansetzen:

$$\dot{\xi} = A_{ND}(\mu_N - \mu_D) + O(2) \quad (19)$$

Das Symbol „ $O(2)$ “ bedeutet dabei Terme von zweiter und höherer Ordnung in Potenzen der Differenz  $(\mu_N - \mu_D)$ .

Für ideale Proteinkomponenten (N, D) in Lösung kann diese Beziehung wegen Gl. (10) auch umgeschrieben werden als:

$$\dot{\xi} = A_{ND}RT \ln \left( \frac{x_N x_{DE}}{x_{NE} x_D} \right) \quad (20)$$

Hier bedeuten  $(x_N, x_D)$  die zur Zeit  $t$  in der Lösung tatsächlich vorliegenden Molkonzentrationen der Proteine und  $(x_{NE}, x_{DE})$  die Gleichgewichtswerte dieser Konzentrationen, die sich bei vorgegebener gesamter Proteinzahl ( $n = n_D + n_N = \text{const}$ ) in der Lösung bei  $(p, T)$  als Gleichgewichtskonzentrationen einstellen würden. Das Argument des Logarithmus in Gl. (20) ist stets von 1 verschieden, solange  $x_D \neq x_{DE}$  und/oder  $x_N \neq x_{NE}$  ist. Es kann daher als Maß für die Abweichung des vorliegenden Zustands  $(x_D, x_N)$  vom Gleichgewichtszustand  $(x_{DE}, x_{NE})$  angesehen werden. Durch seine Größe wird u. a. bestimmt, wie schnell ein Gleichgewicht in der Lösung erreicht wird. Der phänomenologische Parameter ( $A_{ND} \geq 0$ ) kann praktisch nur durch Korrelation von Zeitreihenmessungen der Proteinkonzentrationen  $(x_N(t), x_D(t))$  mit der Beziehung (20) bestimmt werden. Dabei ist zu beachten, dass  $A_{ND}$  grundsätzlich von den übrigen Zustandsparametern der Lösung ( $p, T, \text{pH-Wert}$  etc.) abhängen kann (s. auch [10, 11]).

### 3 Thermische Stabilität von Myoglobin

Myoglobin ist ein mittelgroßes Protein, das aus einer Kette von 153 Aminosäuren besteht. Im natürlichen Zustand besitzt es als aktives Zentrum einen Protoporphyrin-IX-Ring mit Eisen (Fe) als Zentralatom. Die Aminosäuren bilden 8 gekoppelte  $\alpha$ -Helices aus, die das Zentrum umgeben und dem Protein eine annähernd ellipsoidale Form mit den Durchmessern ( $44 \text{ \AA} \times 44 \text{ \AA} \times 25 \text{ \AA}$ ) geben. Die Summenformel von Myoglobin ist  $C_{738}H_{1166}FeN_{203}O_{208}S_2$  und die molare Masse  $M = 17,053 \text{ g/mol}$ . Die Folge der Aminosäuren und Bilder ihrer räumlichen Anordnung sind z. B. in [8, p. 167] enthalten. Myoglobin ist in allen Lebewesen vorhanden, die Sauerstoff aufnehmen. Es ist Teil des Versorgungssystems mit Sauerstoff für das Herz und für andere Muskeln. Es dient zum Transport und auch zur Speicherung von Sauerstoff in Geweben und in Zellen. Seine natürliche Konzentration beträgt dort normalerweise  $c < 100 \text{ \mu mol/L}$ , kann aber auch, etwa bei tief und lang tauchenden Walen, deutlich höher sein.

Myoglobin reagiert empfindlich auf Schwankungen der Temperatur, d. h. es kann durch zu hohe und auch zu niedrige Temperaturen leicht entfaltet bzw. denaturiert werden, wodurch es seine biologische Aktivität verliert. Zur quantitativen Beschreibung dieser Situation werden einige Daten der Änderung der freien Enthalpie einer Proteinlösung beim Übergang vom reinen natürlichen Zustand (N) in einen (wie immer gearteten) denaturierten Zustand (D) betrachtet, vgl. Gl. (16):

$$\Delta G_{DN} = \mu_{D0} - \mu_{N0}$$

In Tab. 1 sind Daten von  $\Delta G_{DN}$  für  $p = 1 \text{ bar}$  im Temperaturintervall ( $270 \text{ K} < T < 340 \text{ K}$ ) und konstantem pH-Wert angeführt. Diese Daten wurden durch mikrok calorische und spektroskopische Messungen bestimmt [3–15] und sind in Tab. 1 durch die zugehörigen Änderungen der Enthalpie und der Entropie ergänzt, die durch die Standardbeziehungen:

$$\Delta H_{DN} = H_{D0} - H_{N0} = \Delta G_{DN} - T \left( \frac{\partial \Delta G_{DN}}{\partial T} \right)_p \quad (21)$$

$$\Delta S_{DN} = S_{D0} - S_{N0} = - \left( \frac{\partial \Delta G_{DN}}{\partial T} \right)_p \quad (22)$$

aus  $\Delta G_{DN}$  berechnet werden können. Dabei bedeuten ( $H_{i0}, S_{i0}$ ,  $i = D, N$ ) die Enthalpien und Entropien der Lösung, die entweder nur je 1 Mol denaturiertes Protein ( $i = D$ ) oder

T/K	270	280	290	300	310	320	330	340
$\Delta G_{DN}$ (kJ/mol)	-3.16	5.13	11.8	15	15.8	11.8	5.13	-3.53
$\Delta H_{DN}$ (kJ/mol)	-289.8	-204	-115	-23	72.2	170.4	271.8	376.4
$\Delta S_{DN}$ (kJ/mol)	-1.066	-0.754	-0.442	-0.13	0.182	0.494	0.806	1.118

**Tabelle 1.** Thermodynamische Daten der Differenzen der freien Enthalpien ( $\Delta G_{DN}$ ), Enthalpien ( $\Delta H_{DN}$ ) und der Entropien ( $\Delta S_{DN}$ ) von Myoglobin-Lösungen im natürlichen (N) bzw. denaturierten Zustand (D). Zur Definition dieser Größen beachte man die Beziehungen (16), (21) und (22) [16].

1 Mol natürliches Protein ( $i = N$ ) bei selbem Druck, Temperatur und pH-Wert enthält.

Die  $\Delta G_{DN}$ -Daten der Tab. 1 können einfach durch eine Parabel 2. Ordnung korreliert werden:

$$\Delta G_{DN}(T) = A_2 T^2 + A_1 T + A_0 \quad (23)$$

Mit:

$$A_2 = 1.56 \cdot 10^{-2} \text{ kJ/mol K}^2$$

$$A_1 = 9,49 \text{ kJ/mol K}$$

$$A_0 = -1427 \text{ kJ/mol} \quad (24)$$

Diese Funktion ist zusammen mit Daten der Tab. 1 in Abb. 3a dargestellt. Numerische Daten der zugehörigen Werte von  $H_{DN}$  und  $S_{DN}$  sind in Abb. 3b auch als Funktion der Temperatur zu sehen. Die entsprechenden Korrelationen können mit Hilfe von Gl. (23) gemäß den Beziehungen (21) und (22) einfach berechnet werden:

$$\Delta H_{DN} = -A_2 T^2 + A_0 \quad (21a)$$

$$\Delta S_{DN} = -A_2 T - A \quad (22a)$$

Da in einem isotherm-isobaren thermodynamischen System Zustandsänderungen nur auftreten können, wenn die freie Enthalpie des Endzustands kleiner als die des Anfangszustands ist [4, 5], erkennt man, dass die Myoglobin-Lösung thermisch stabil ist, wenn gilt:

$$\Delta G_{DN} > 0 \text{ oder } \mu_{D0} > \mu_{N0} \quad (25)$$

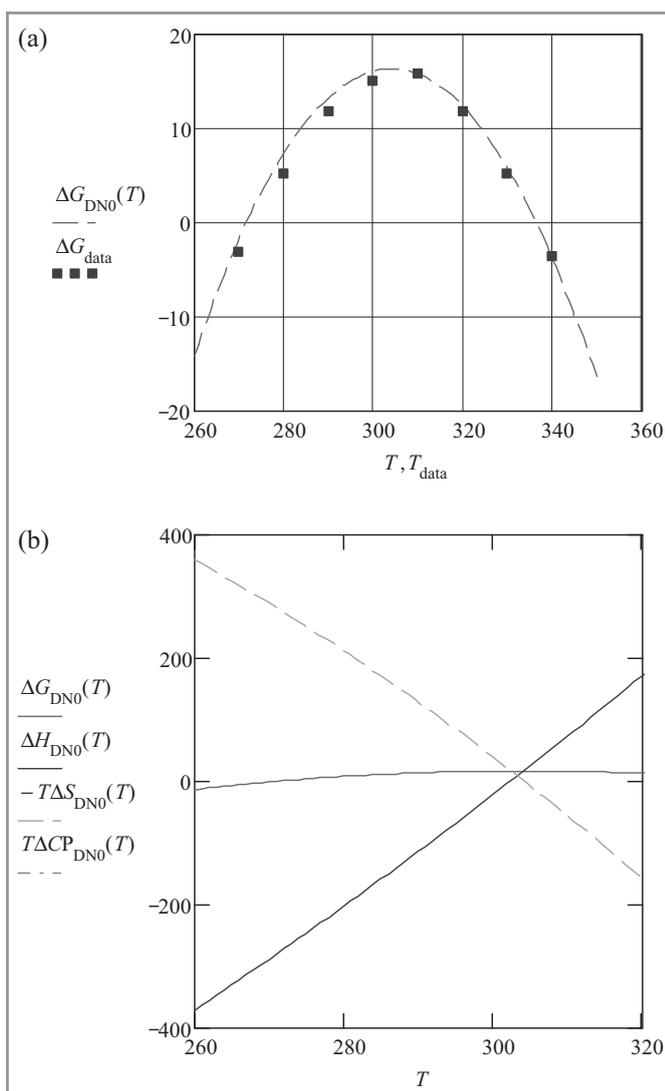
aber thermisch instabil ist für:

$$\Delta G_{DN} < 0 \text{ oder } \mu_{D0} < \mu_{N0} \quad (26)$$

Die Temperaturen, für die gilt:

$$\Delta G_{DN}(T) = 0 \quad (27)$$

sind Grenztemperaturen zwischen stabilen und instabilen Temperaturbereichen der Myo-



**Abbildung 3.** (a) Differenzen der freien Enthalpien ( $\Delta G_{DN}$  (kJ/mol)) von Myoglobin-Lösungen als Funktion der Temperatur ( $T/K$ ) nach Tab. 1 korrelieren gemäß Gln. (23) und (24). Der Bereich thermischer Stabilität der Myoglobin-Lösung ( $\Delta G_{DN} > 0$ ) und die Bereiche thermischer Instabilität ( $\Delta G_{DN} < 0$ ) lassen sich bestimmen. (b) Enthalpiedifferenzen ( $\Delta H_{DN0}$ ) und Entropiedifferenzen ( $-T\Delta S_{DN0}$ ) als Funktion der Temperatur ( $T/K$ ). Daten berechnet gemäß Gln. (23) und (24), d. h. nach Gln. (21a) und (22a). Enthalpische Stabilität der Lösung besteht im Bereich  $\Delta H_{DN}(T) > 0$ , d. h. für  $T > 302,4$  K. Entropische Stabilität besteht für  $\Delta S_{DN} > 0$ , d. h. für  $T < 304,2$  K. Enthalpische und entropische Stabilität besteht daher nur für den kleinen Temperaturbereich ( $302,4 \text{ K} < T < 304,2 \text{ K}$ ) bzw. ( $29,3 \text{ }^\circ\text{C} < T < 31,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

globin-Lösung. Aus den Gln. (23) und (24) erhält man daher mit der Bedingung (27) die Grenztemperaturen zu:

$$T_{10} = 336,5 \text{ K} = 63,3 \text{ °C}$$

$$T_{20} = 271,86 \text{ K} = -1,3 \text{ °C} \quad (27a)$$

Das heißt, die Lösung ist nur im Bereich  $T_{20} < T < T_{10}$  thermisch stabil, ansonsten instabil.

Wird für die Myoglobin-Lösung Idealität angenommen, d. h.  $\gamma_D = \gamma_N = 1$ , kann aus den Gln. (14) und (15) abgeleitet werden, dass für  $T_{10}$  und  $T_{20}$  gilt:

$$x_D(T_{i0}) = x_N(T_{i0}) = \frac{1}{2}, \quad i = 1, 2 \quad (28)$$

Bei diesen Temperaturen befinden sich in der Lösung gleich viele Proteine im natürlichen und im denaturierten Zustand.

Allerdings ist die ideale Näherung dieses Ergebnisses sehr unbefriedigend. Bei der vorliegenden Datensituation kann sie allerdings auch vermieden und durch eine schwächere Näherung ersetzt werden. Zu diesem Zweck wird die Temperatur betrachtet, bei der  $\Delta G_{DN}$  einen maximalen Wert besitzt. Für diesen gilt:

$$\left(\frac{\partial \Delta G_{DN}}{\partial T}\right)_{p, T_{\max}} = -\Delta S_{DN}(T_{\max}) = 0 \quad (29)$$

Numerisch ergibt sich damit nach den Gln. (19) und (20)  $T_{\max} = 304,17 \text{ K} = 31,1 \text{ °C}$ . In diesem Zustand sind gemäß Gl. (22) die Entropien des Myoglobins im nativen (N) und im denaturierten Zustand (D) einander gleich. Diese beiden Zustände unterscheiden sich thermodynamisch nur durch ihre Enthalpien. Für die entsprechende Differenz gilt nach den Gln. (21) und (21a):

$$\begin{aligned} \Delta H_{DN}(T_{\max}) &= H_{D0}(T_{\max}) - H_{N0}(T_{\max}) \\ &= 16,27 \text{ kJ/mol.} \end{aligned} \quad (30)$$

Betrachtet man daher eine Mischung aus (D)- und (N)-Myoglobin bei dieser Temperatur ( $T_{\max}$ ), so müssen die Besetzungszahlen der Zustände bzw. ihre Molenbrüche durch eine einfache Boltzmann-Verteilung bestimmt sein. Daher gilt in diesem speziellen Zustand:

$$\left(\frac{x_D}{x_N}\right)_{T_{\max}} = \exp\left(-\frac{\Delta H_{DN}(T_{\max})}{RT_{\max}}\right) \quad (31)$$

bzw. wegen Gl. (16):

$$\left(\frac{x_D}{x_N}\right)_{T_{\max}} = 1,606 \cdot 10^{-3} \quad (31a)$$

Damit kann für diesen Zustand aus dem Massenwirkungsgesetz (14) und (15) das Verhältnis der Aktivitätskoeffizienten ( $\gamma_D/\gamma_N$ ) bestimmt werden, da  $\Delta G_{DN}(T_{\max})$  gemäß Gln. (23) und (24) bekannt ist:

$$\begin{aligned} \ln\left(\frac{\gamma_D}{\gamma_N}\right)_{T_{\max}} + \ln\left(\frac{x_D}{x_N}\right)_{T_{\max}} \\ = -\Delta G_{DN} T_{\max} / (RT_{\max}) \end{aligned} \quad (32)$$

Mit dem numerischen Wert  $\Delta G_{DN}(T_{\max}) = 17,06 \text{ kJ/mol}$  und Gl. (31a) erhält man damit:

$$\left(\frac{\gamma_D}{\gamma_N}\right)_{T_{\max}} = 0,731 \quad (33)$$

Weiter wird angenommen, dass dieses Verhältnis der Aktivitätskoeffizienten im ganzen Temperaturbereich gemäß Abb. 3a, d. h. für  $260 \text{ K} < T < 350 \text{ K}$  konstant sei. Dann kann das Molverhältnis von (D)- und (N)-Myoglobin bei den Grenztemperaturen ( $T_{10}$ ,  $T_{20}$ ) für thermische Stabilität genauer bestimmt werden. In diesen Zuständen gilt wegen  $\Delta G_{DN} = 0$  nach Gl. (14):

$$\left(\frac{\gamma_D x_D}{\gamma_N x_N}\right)_{T_{i0}} = 1, \quad i = 1, 2 \quad (34)$$

Damit erfolgt aus Gl. (33),  $x_D(T_{i0}) = 0,58$ ,  $x_N(T_{i0}) = 0,42$ ,  $i = 1, 2$ . Dieses Ergebnis zeigt umgekehrt, dass die Annahme der Idealität der Proteinlösung ( $\gamma_D = \gamma_N = 1$ ) gar nicht so schlecht ist, da sich in diesem Fall ( $x_D = x_N = 0,5$ ) ergeben hätte.

Abschließend soll noch der Temperaturbereich bestimmt werden, in dem die Myoglobinlösung aufbewahrt werden muss, wenn gewisse Grenzkonzentrationen des natürlichen (N) bzw. denaturierten (D) Zustands in der Lösung, z. B.  $x_N \geq 0,99$ ,  $x_D \leq 0,01$  eingehalten werden sollen. Hierzu wird wieder das Massenwirkungsgesetz (14) und (15) zusammen mit der  $\Delta G_{DN}$ -Korrelation (23) und (24) und dem Verhältnis der Aktivitätskoeffizienten (33) betrachtet. Dies führt zu einer quadratischen Gleichung für die gesuchten Grenztemperaturen:

$$A_2 T^2 + A_1 T + A_0 = -RT \ln\left(\frac{\gamma_D x_D}{\gamma_N x_N}\right) \quad (35)$$

Für die o. a. Daten erhält man das Temperaturintervall  $287,1 \text{ K} < T < 318,7 \text{ K}$  bzw.  $14 \text{ °C} < T < 45,5 \text{ °C}$ . Diese Information ist sicher für Apotheker nützlich, die die Myoglobinlösung etwa während ihres *Regaldaseins* bei der richtigen Temperatur lagern müssen, um Denaturierung des Myoglobins durch zu hohe aber möglicherweise auch durch zu tiefe Tempe-

rationen zu vermeiden, damit die biologische Aktivität des Proteins erhalten bleibt.

Der Autor dankt für wertvolle Diskussion seiner Kollegen W. Arlt, Berlin und Erlangen, R. Buchholz, Erlangen, J. Büchs, Aachen, R. Dietz, Merck KGaA, Darmstadt, P. Jennissen, Essen, W. Muschik, Berlin, W. Norde, Wageningen, NL, J. M. Prausnitz, Berkeley, USA, T. Randolph, Boulder, USA, U. von Stockar, Lausanne, CH, R. Winter, Dortmund und manch anderen mehr. Der Autor hat dadurch verschiedene Informationen und Anregungen erhalten, die mit in diese Arbeit eingeflossen und natürlich überall dort, wo es möglich war, durch entsprechende Zitate auch explizit erwähnt und belegt sind.

Dank gilt auch den Herren P. Baselt und D. Holtmann, DECHEMA e. V., Frankfurt Main, für die Unterstützung beim Aufbau bzw. der Weiterführung eines Arbeitskreises *Biothermodynamik* seit 2002.

Dadurch wurde eine Plattform geschaffen, auf der sich zahlreiche Wissenschaftler aus Industrie und Hochschule und verschiedenen Einzelwissenschaften zum Informations- und Meinungsaustausch treffen konnten mit dem Ziel, Methoden und Verfahren der Thermodynamik in der Biotechnologie und in den Lebenswissenschaften anzuwenden. Aus diesem Arbeitskreis resultierten bislang verschiedene über Drittmittel finanzierte Forschungsvorhaben und zwei internationale Tagungen zur Biothermodynamik (1st ISB, 2005; 2nd ISB, Februar 2008). Weitere Informationen können über [www.dechema.de/conferences](http://www.dechema.de/conferences) abgerufen werden.

Dank gilt auch Herrn Kollegen Flaschel, Bielefeld, für sein stetes Interesse am Thema und für die Anregung, den vorliegenden Artikel in deutscher Sprache zu verfassen.

Schließlich sei auch noch Frau U. Haagemans für das sorgfältige Schreiben des Manuskripts und Herrn M. U. Göbel für das Zeichnen verschiedener Figuren herzlich gedankt.

#### J. U. Keller

([keller@ift.maschinenbau.uni-siegen.de](mailto:keller@ift.maschinenbau.uni-siegen.de)),  
Inst. Fluid- und Thermodynamik, Universität  
Siegen, D-57068 Siegen, Germany.

#### Formelzeichen

$A_{ND}$	$[\frac{\text{mol}^2}{\text{Js}}]$	Phänomenologischer Koeffizient der Denaturierungsreaktion ( $N \leftrightarrow D$ )
$D$	$[-]$	Symbol für einen denaturierten Proteinzustand
$G$	$[\text{J}]$	Gibbs Enthalpie eines Wasser/Protein-Systems
$N$	$[-]$	Symbol für einen natürlichen (nativen) Proteinzustand
$n = n_w + n_D + n_N$	$[\text{mol}]$	Gesamtzahl von Molen an Protein ( $N, D$ -Zustände) und Wasser in einem System
$n_D$	$[\text{mol}]$	Molzahl denaturierter Proteine in einer Protein/Wasser-Lösung
$n_{D0}$	$[\text{mol}]$	Molzahl denaturierter Proteine in einem Anfangszustand ( $Z_0$ ) einer Protein/Wasser-Lösung
$n_H^+$	$[\text{mol}]$	Molzahl von Wasserstoffionen (Protonen) in einer Protein/Wasser-Lösung
$n_N$	$[\text{mol}]$	Molzahl nativer Proteine in einer Protein/Wasser-Lösung
$n_{N0}$	$[\text{mol}]$	Molzahl nativer Proteine in einem Anfangszustand ( $Z_0$ ) einer Protein/Wasser-Lösung
$n_p = n_D + n_N$	$[\text{mol}]$	Gesamte Molzahl von Protein in einer Lösung
$n_w$	$[\text{mol}]$	Molzahl von Wasser in einer Lösung
$P$	$[\text{Pa}]$	Druck
$P_s$	$[\text{J}/\text{Ks}]$	Entropieproduktion des Denaturierungsprozesses in einer Proteinlösung
$S$	$[\text{J}/\text{K}]$	Entropie einer Proteinlösung
$T$	$[\text{K}]$	Temperatur
$V$	$[\text{m}^3]$	Volumen einer Proteinlösung
$x_i = n_i/n$	$[1]$	Molenbruch der Komponente ( $i = D, N, W$ ) einer Protein/Wasser-Lösung
$Z_0$	$[-]$	Anfangszustand einer Lösung
$\gamma_i$	$[1]$	Aktivitätskoeffizient des chemischen Potentials der Komponente ( $i = D, N, W$ ) einer Proteinlösung

$\Delta G_{\text{DN0}} = \mu_{\text{D0}} - \mu_{\text{N0}}$	[J/mol]	Änderung der molaren Gibbsschen Enthalpie der denaturierten Proteine nach vollständiger Renaturierung bei $(p, T)$
$\Delta H_{\text{DN}} = H_{\text{D0}} - H_{\text{N0}}$	[J/mol]	Änderung der molaren Enthalpie der denaturierten Proteine nach vollständiger Renaturierung bei $(p, T)$
$\Delta S_{\text{DN}} = S_{\text{D0}} - S_{\text{N0}}$	[J/mol]	Änderung der molaren Entropie der denaturierten Proteine nach vollständiger Renaturierung bei $(p, T)$
$\mu_{\text{D}}$	[J/mol]	Chemisches Potenzial der denaturierten Proteine in einer Lösung
$\mu_{\text{N}}$	[J/mol]	Chemisches Potenzial der nativen Proteine einer Lösung
$w$	[J/mol]	Chemisches Potenzial des Wassers in einer Protein/Wasser-Lösung
$\xi$	[mol]	Reaktionszahl oder Reaktionsgrad der quasichemischen Denaturierungsreaktion ( $\text{N} \rightarrow \text{D}$ ) eines Proteins
$\xi_{\text{eq}}$	[mol]	Gleichgewichtswert der Reaktionszahl der Denaturierungsreaktion eines Proteins in einer Lösung.

## Literatur

- [1] J. U. Keller, *J. Non-Equilib. Thermodyn.* **2008**, 33, 321.
- [2] J. U. Keller, *Chem. Ing. Tech.* **2008**, 80, 741.
- [3] J. U. Keller, *Chem. Ing. Tech.* **2008**, 80, 755.
- [4] Keller J. U., *Thermodynamik der irreversiblen Prozesse, Teil 1: Thermostatik und Grundbegriffe*, W. de Gruyter, Berlin, New York **1977**.
- [5] M. Päsler, *Phänomenologische Thermodynamik*, W. de Gruyter, Berlin – New York **1975**.
- [6] P. Ball, *Chemical Reviews*, published in Web (28-12-2007).
- [7] J. U. Keller, *J. Non-Equilib. Thermodyn.* **2009**, 34, in Druck.
- [8] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York **1995**, 141.
- [9] T. Randolph, *Persönliche Mitteilung*, Muerren **2005**.
- [10] J. Kestin, *A Course in Thermodynamics*, Vols. 1, 2, Blaisdell Publicity Company, London **1968**.
- [11] K. G. Denbigh, *The Principles of Chemical Equilibria: With Applications in Chemistry and Chemical Engineering*, Cambridge University Press, Cambridge, UK **1971**.
- [12] S. Sandler, *Chemical and Engineering Thermodynamics*, 3rd Ed., J. Wiley & Sons, New York **1999**.
- [13] J. E. Ladbury, M. L. Doyle, *Biocalorimetry 2, Applications of calorimetry in the biological sciences*, J. Wiley & Sons, New York **2004**.
- [14] D. Lörinczy, *The Nature of Biological Systems as Revealed by Thermal Methods*, Kluwer, Dordrecht **2004**, 355.
- [15] J. Cavanagh et al., *Protein NMR Spectroscopy. Principles and Applications*, 2nd Ed., Elsevier Academic Press, Burlington, San Diego, London (UK) **2007**.
- [16] T. W. Randolph et al., *Pharmaceutical Research* **2003**, 20 (9), 1325.
- [17] T. E. Creighton, *Proteins, Structures and Molecular Properties*, 2nd Ed., W. H. Freeman, New York **1993**.
- [18] C. M. Dobson, *Nature* **2003**, 426, 884.
- [19] C. M. Dobson, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, 24, 329.