

# Purificación de proteínas de suero lácteo mediante coacervación con polielectrolitos: un estudio mediante el método de Monte Carlo.

## Whey protein coacervation with polyelectrolytes: a monte carlo study

Presentación: 4 y 5 de Octubre de 2022

Doctorando/a:

**Paola Beatriz Torres**

Grupo de Bionanotecnología y sistemas complejos, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) - Facultad Regional San Rafael, Universidad Tecnológica Nacional - Argentina  
paotorres89@gmail.com

Director/a:

**Claudio Fabian Narambuena**

Codirector/a:

**Evelina Quiroga**

### Resumen

El suero lácteo es el subproducto obtenido durante la elaboración del queso tras la separación del coágulo lácteo formado por la gelificación de las caseínas. Las proteínas del suero lácteo (PSL) constituyen el 0.7 % P/V de los nutrientes del suero lácteo y representan el 20% de las proteínas totales de la leche, siendo sus principales componentes  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina y glicomacropéptido. Resulta de interés comprender el comportamiento a nivel macro de las proteínas presente en el suero lácteo. Utilizando un modelo de grano grueso para representar una molécula de  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) y una cadena de polielectrolito (PE) se estudió la formación del complejo a distintos valores de pH. Se observó que el comportamiento del polielectrolito aislado es independiente de su pKa. Los resultados mostraron que la interacción entre BLG-PE es significativa a pH por debajo del punto isoeléctrico de la proteína  $\sim 4.8$ . En este rango la carga de la proteína se ve modificada adquiriendo una mayor carga positiva lo cual se debe a la presencia de PE aniónico favoreciendo la interacción electrostática atractiva entre ambos. Por el contrario, a pH  $> 4.8$  ambas macromoléculas tienen carga negativa, por lo tanto, la interacción entre las macromoléculas es de carácter repulsiva.

**Palabras clave:** polielectrolitos, monte carlo, proteínas, suero lácteo, simulación

## Abstract

Beta-lactoglobulin is one of the main proteins in the lacteum serum. We studied the interaction of one beta-lactoglobulin (BLG) molecule with one polyelectrolyte (PE) chain. For this study both molecules were represented with a coarse-grained model and monte carlo simulations at different pH values. We observed that in isolated conditions the polyelectrolyte behaviour was independent of its intrinsic pKa value. The results demonstrated that the main interaction protein - polyelectrolyte was at pH below the isoelectric point of the protein  $\sim 4.8$ . In this pH range the protein has a net positive charge which in the presence of the anionic polyelectrolyte becomes more positive, this benefits the attractive electrostatic interaction between the two macromolecules. On the contrary, at  $\text{pH} > 4.8$  the main interaction is repulsive since in these conditions both molecules have a net negative charge.

**Keywords:** polyelectrolytes, monte carlo, proteins, lacteum serum, simulation

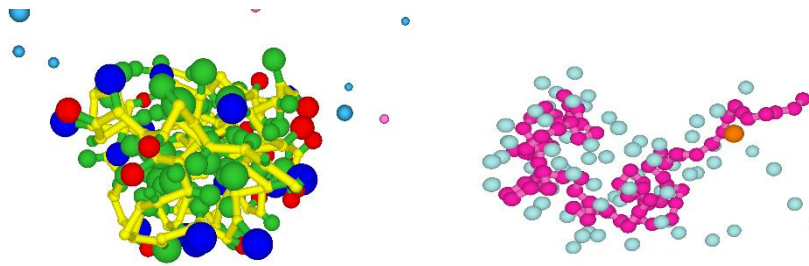
## Introducción

Las proteínas de suero lácteo son importantes en la industria alimenticia debido a sus propiedades funcionales. Las proteínas en mayor proporción son la  $\alpha$ -lactalbumina (20%) y  $\beta$ -lactoglobulina (50%). Estas proteínas se obtienen como un concentrado del líquido remanente en la producción del queso. La precipitación de estas proteínas usando polielectrolitos es un método simple y puede ser aplicado a escala industrial. Una gran diversidad de polisacáridos es utilizada para formar complejos con proteínas en la industria alimenticia (Harnsilawat et al., 2006; Narambuena et al., 2005). En el presente trabajo se estudia la coacervación entre una molécula de  $\beta$ -lactoglobulina y una cadena de polielectrolito en un amplio rango de pH utilizando simulaciones de Monte Carlo.

## Desarrollo

El presente trabajo se llevó a cabo realizando el estudio de la interacción entre  $\beta$ -lactoglobulina y polielectrolitos débiles mediante simulación computacional. El principal beneficio es poder distinguir detalladamente las contribuciones al proceso de formación del complejo proteína-polielectrolito. (Narambuena et al., 2015)

El modelo de grano grueso utilizado para la proteína fue construido a partir de la posición de cada átomo que la compone obtenida del Protein Data Bank (1BEB), figura 1A. Cada aminoácido es representado por dos esferas, una para el carbono  $\alpha$  y otra para la cadena lateral del residuo del aminoácido. Los carbonos  $\alpha$  constituyen la columna vertebral de la proteína, cada uno está conectado a un residuo (Grupo R), el cual establece la naturaleza de cada aminoácido. Cada grupo R comprende un grupo de átomos y fue representado como una esfera rígida para aproximar el volumen excluido correspondiente. La cadena de polielectrolito fue modelada como un grupo de perlas cargadas (o monómeros) enlazados formando una cadena lineal, ver figura 1B. Cada esfera fue representada como una esfera rígida con su correspondiente carga eléctrica embebida en el centro y separadas una distancia  $l_0$ . (P. Torres et al., 2017; P. B. Torres et al., 2019)



**Figura 1.** Modelo de Grano Grueso: (A)  $\beta$ -lactoglobulina y (B) Polielectrolito.

El algoritmo Metrópolis Monte Carlo es un método estocástico basado en movimientos al azar en un espacio coordinado, en el cual cada configuración tiene un peso estadístico definido por la distribución de Boltzman. Durante la simulación de Monte Carlo los iones pequeños tienen la posibilidad de trasladarse en cualquier dirección mientras la carga de la proteína fluctúa de acuerdo a los siguientes movimientos en ensamble semi-canónico:

1. Un sitio titulable en la proteína es elegido al azar.
2. Si se encuentra *desprotonado*, se mueve la carga de la solución al sitio titulable (proceso de protonación). Si está *protonado*, se mueve el protón a la solución (proceso de desprotonación).
3. Los movimientos son aceptados de acuerdo con la probabilidad:  $(1, e^{-\beta\Delta U_{el} \pm (pH - pK_a) \ln 10})$ . Donde  $\Delta U_{el}$  es el cambio en la energía electrostática total. El segundo término en la exponencial tiene en cuenta el cambio de energía libre del proceso de (des) protonación para un aminoácido, no afectado por la presencia del resto de la proteína ni la sal. La magnitud de este término es determinada por el  $pH$  y la constante intrínseca  $pK_a$ .

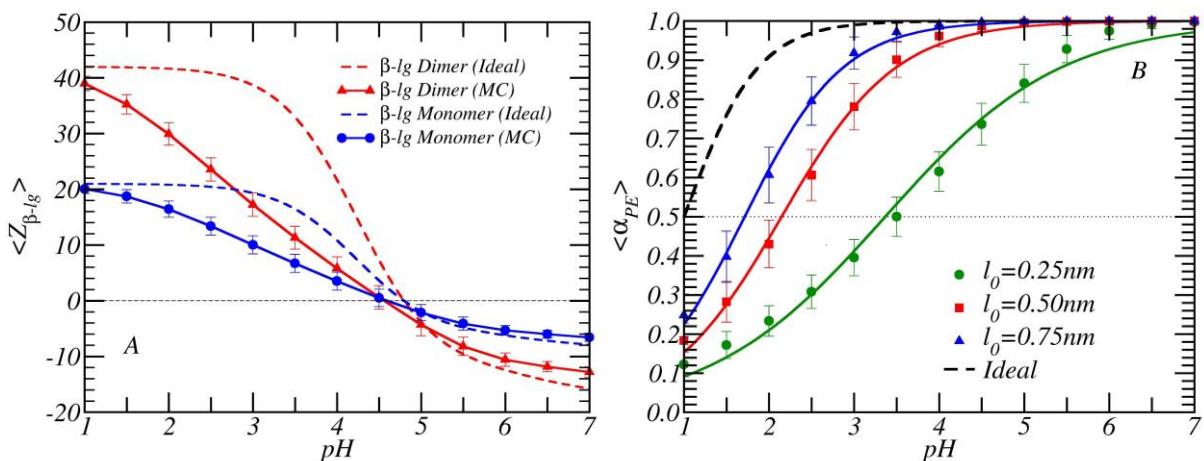
La interacción  $\beta$ -lactoglobulina-polielectrolito fue molecularmente cuantificada por medio de un simple criterio estructural, calculando el número de monómeros de la cadena del polielectrolito que está en íntimo contacto con el grupo titulable de la proteína. Se calculó también la distancia de separación  $\Delta r$  entre el centro de cada monómero y cada residuo titulable. Se adopta como criterio para considerar un monómero adsorbido que la distancia cumpla:  $r < r_c$ , donde  $r_c = 0.5 \text{ nm}$  es el radio de corte. Este simple criterio de distancia fue utilizado para cuantificar la condensación de las cadenas del PE, mostrando una excelente coincidencia con los datos experimentales (P. Torres et al., 2017).

## Resultados

En esta sección se presentan los resultados obtenidos de las simulaciones entre una molécula de beta-lactoglobulina y una cadena de polielectrolito aniónico débil. Como primera sección se presentan los resultados obtenidos para cada macromolécula en estado aislado, es decir sin interactuar entre ellas. Y como segunda sección se presentan los resultados de la interacción.

### I. Titulación de Proteína Aislada y Polielectrolito Aislado.

La carga neta de la proteína aislada es estudiada como una función del pH, figura 2A. Los resultados obtenidos de la simulación de monte carlo a  $c_{salt} = 10 \text{ mM}$  son representados con símbolos y comparado a la curva de titulación en línea de trazo. En condiciones de extrema acidez ( $pH = 1.0$ ) la proteína tiene una carga neta positiva. Con el aumento del pH comienza la desprotonación de los grupos ácidos, es decir la proteína adquiere una carga negativa negativa.

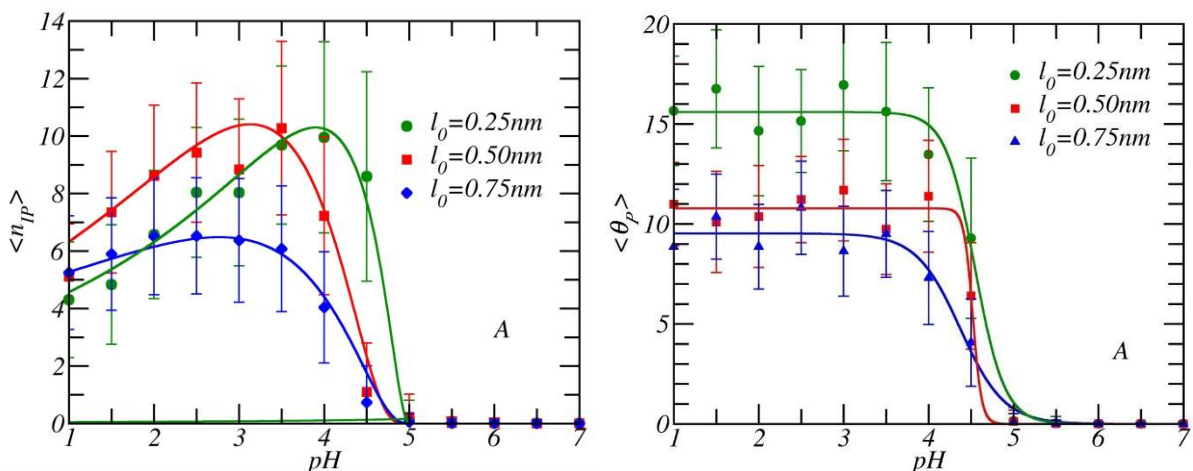


**Figura 2.** (A) Carga neta de la proteína como una función del pH. (B) Grado de disociación del PE aislado como una función del pH. Resultados obtenidos de la simulación de monte carlo.

El polielectrolito fue modelado con un valor de pKa intrínseco  $pK_a = 1.0$  y una cadena de  $N_m = 40$  monómeros. Adicionalmente, se modificó la distancia de equilibrio entre monómeros ( $l_0$ ), siendo la misma de 0.25 nm (círculos), 0.50 nm (cuadrados) y 0.75 nm (triángulos) en la figura 2B. El grado de disociación aumenta con el pH, con la variación de la distancia de equilibrio se observa que el máximo grado de disociación se alcanza más rápidamente para  $l_0 = 0.75$  nm. En comparación a la curva ideal de disociación del PE (línea de trazo) se puede notar que a medida que disminuye la distancia de equilibrio entre monómeros se produce un corrimiento del  $pK_a$  efectivo del PE, es decir el valor de pH al cual el PE tiene  $\alpha_{PE} = 0.5$ .

## II. Interacción proteína-polielectrolito

En la sección anterior se observó el comportamiento de la proteína aislada, la cual tiene una carga positiva por debajo del punto isoeléctrico. Con esto podemos predecir una interacción electrostática atractiva con el polielectrolito aniónico en dicho rango de pH. La interacción de la proteína con una cadena de PE débil fue cuantificada molecularmente mediante un criterio estructural, detallado en la sección de Desarrollo.

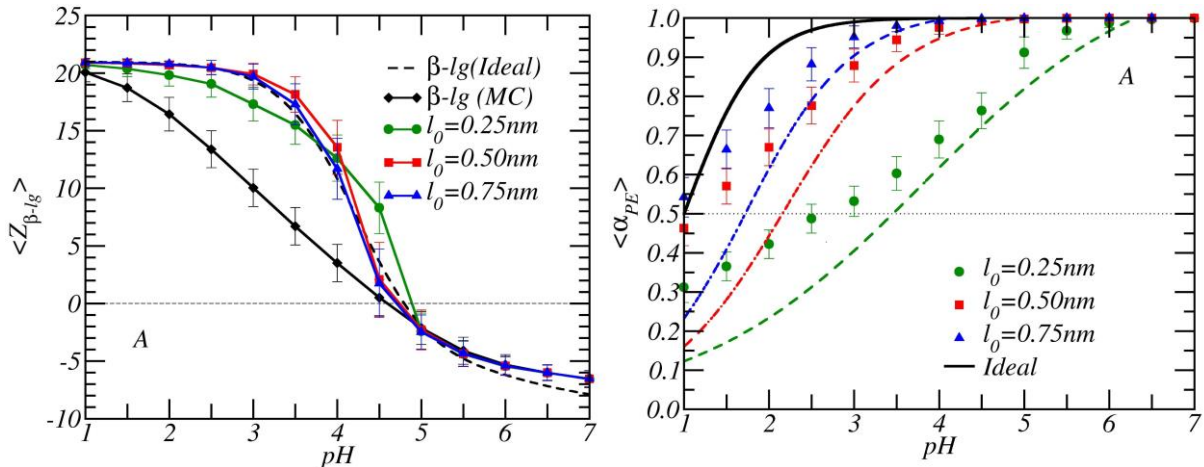


**Figura 3.** Cantidad de monómeros adsorbidos en residuos cargados opuestamente de la proteína como una función del pH. (A) Proteína-PE Débil (B) Proteína-PE Fuerte. Resultados obtenidos de la simulación de monte carlo.

La figura 3A muestra la adsorción de monómeros en residuos cargados opuestamente de la proteína como una función del pH para la interacción proteína-PE débil. Cuando el pH aumenta por encima del punto isoeléctrico la proteína tiene carga neta negativa que genera una repulsión electrostática con la cadena de PE aniónica. A  $pH < pI$  la adsorción de monómeros aumenta rápidamente

hasta alcanzar un máximo de  $n_{ip}=10$ . Luego la adsorción de monómeros decae con el pH hasta un mínimo de  $n_{IP}\approx 6$ . Es interesante comparar la interacción de la proteína y un polielectrolito débil con lo observado en un trabajo anterior de la proteína con un polielectrolito fuerte, figura 3B. En el caso del polielectrolito fuerte se puede notar a  $\text{pH}\approx 4$  la adsorción alcanza un plateau, es decir la proteína tiene una capacidad limitada para formar pares iónicos con monómeros de la cadena de PE. A pH por encima del punto isoeléctrico el comportamiento es similar al del polielectrolito débil.

Luego analizamos cómo afecta la presencia del polielectrolito a la proteína y asimismo como se ve afectado el polielectrolito. Para ello, analizamos el comportamiento de ionización de ambas macromoléculas, figura 4.



**Figura 4.** (A) Carga neta de la proteína en presencia de una cadena de PE débil como una función del pH. (B) Densidad de carga lineal del polielectrolito en presencia de la proteína como una función del pH. Resultados obtenidos de la simulación de monte carlo.

La interacción del polielectrolito cargado a valores de pH por debajo del punto isoeléctrico genera una modificación en la carga neta de la proteína, figura 4A. Los grupos ácidos de la proteína se encuentran protonados por lo tanto la carga neta de la proteína toma valores más positivos. Con el incremento de la distancia de equilibrio entre monómeros  $l_0$  la carga neta de la proteína se acerca a la carga ideal de proteína. Adicionalmente, estudiamos el efecto de esta interacción en el grado de disociación del polielectrolito, figura 4B. Notamos que en el rango de interacción ( $1 < \text{pH} < 4.8$ ) el grado de disociación del polielectrolito se incrementó en los tres casos estudiados. Se encontró que a medida que aumenta el pH desde valores extremadamente ácidos la densidad de carga lineal toma valores más negativos. Para el caso de  $l_0=0.5\text{nm}$  y  $l_0=0.75\text{nm}$  se alcanza la máxima densidad lineal carga que corresponde a la cadena a  $\text{pH}\approx 1$ .

## Conclusiones

La interacción molecular de beta-lactoglobulina con un polielectrolito débil aniónico fue estudiada usando el método de monte carlo. Estudiamos el equilibrio ácido base de los grupos titulables de la proteína y polielectrolito usando un esquema semi-gran canónico. Utilizamos un PE con un valor intrínseco de  $pK_a=1.0$  y tres valores de distancia de equilibrio de separación ( $l_0$ ): 0.25 nm, 0.50 nm y 0.75 nm. La interacción entre proteína y polielectrolito tuvo lugar a valores de pH menores al punto isoeléctrico. Encontramos que la adsorción tenía un máximo para los tres casos estudiados de PE. A pH superior al punto isoeléctrico las dos especies tienen carga neta negativa por lo que se genera una interacción electrostática repulsiva. La carga neta de la proteína fue modificada debido a la presencia del PE aniónico que generó un aumento de la carga neta positiva por debajo del pI. El perfil de disociación del PE también se vio modificado por la presencia de la proteína adquiriendo un mayor grado de disociación comparado al PE aislado a valores de pH ácidos.

## Referencias

- Harnsilawat, T., Pongsawatmanit, R., & McClements, D. J. (2006). Characterization of  $\beta$ -lactoglobulin-sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids*, 20(5), 577–585. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.05.005>
- Narambuena, C. F., Ausar, F. S., Bianco, I. D., Beltramo, D. M., & Leiva, E. P. M. (2005). Aggregation of casein micelles by interactions with chitosans: A study by Monte Carlo simulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 459–463. <https://doi.org/10.1021/jf049202v>
- Narambuena, C. F., Leiva, E. P. M., & Pérez, E. (2015). Counterion condensation on polyelectrolyte chains adsorbed on charged surfaces. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 487, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.09.038>
- Torres, P. B., Quiroga, E., Ramirez-Pastor, A. J., Boeris, V., & Narambuena, C. F. (2019). Interaction between  $\beta$ -Lactoglobuline and Weak Polyelectrolyte Chains: A Study Using Monte Carlo Simulation. *The Journal of Physical Chemistry B*. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b03276>
- Torres, P., Bojanich, L., Sanchez-Varretti, F., Ramirez-Pastor, A. J., Quiroga, E., Boeris, V., & Narambuena, C. F. (2017). Protonation of  $\beta$ -lactoglobulin in the presence of strong polyelectrolyte chains: a study using Monte Carlo simulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 160, 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.09.018>