

# Interacción de $\beta$ -lactoglobulina y polielectrolitos fuertes: un estudio computacional.

## Interaction of $\beta$ -lactoglobuline and strong polyelectrolytes: a computational study

Presentación: 06-07/10/2020

Doctorando:

**Paola Beatriz Torres**

Grupo de Bionanotecnología y sistemas complejos, CONICET. Facultad Regional San Rafael, Universidad Tecnológica Nacional

[paotorres89@gmail.com](mailto:paotorres89@gmail.com)

Director:

**Claudio F. Narambuena**

Co-director:

**Evelina Quiroga**

### Resumen

La  $\beta$ -lactoglobulina (BLG) es la principal proteína del suero lácteo, se destaca por su elevado valor nutricional. Se busca purificar la proteína mediante métodos sencillos, rápidos y económicos para su aplicación a escala industrial, ya que en la actualidad los métodos tradicionales son costosos para las PYMES lácteas. Se pueden obtener concentrados de la proteína BLG mediante la formación de un complejo con un polielectrolito (PE). Estos complejos en ciertas condiciones son insolubles y fácilmente separables. En el presente trabajo estudiamos este proceso mediante simulaciones computacionales a nivel molecular. La metodología utilizada consiste en representar a la proteína y el polielectrolito con modelos de grano grueso con un número mínimo de parámetros que permiten reproducir la esencia fisicoquímica del proceso. Se estudió la formación del complejo a distintos valores de pH usando simulación de Monte Carlo. La interacción entre proteína-PE fue cuantificada por un criterio estructural para medir la adsorción del PE en la superficie de la proteína. Se cuantifican la cantidad de pares iónicos (monómero cargado y residuo cargado). Los resultados mostraron que la interacción de la proteína con un polianión se veía favorecida a valores de pH por debajo del punto isoeléctrico (pI) de la proteína. Por otro lado, la formación del complejo entre proteína y polianión comienza a valores de pH por debajo del punto isoeléctrico es decir “del lado equivocado”. Esta formación de complejo del lado equivocado del pI, fue debida al mecanismo de regulación de carga, donde la reversión de la carga es más pronunciada del lado izquierdo del punto isoeléctrico. Los grupos ácidos glutámico y aspártico juegan un rol clave en la reversión de carga.

Palabras clave: polielectrolitos, monte carlo, beta-lactoglobulina, proteína, simulación.

**Abstract**

$\beta$ -lactoglobulina is the main protein on serum lactum, it has an important nutritional value. The principal objective is the purification of the  $\beta$ -lactoglobulina through simple, fast and economic methods for their industrial application. In the presence of a polyelectrolyte (PE) it can be obtained complex with the BLG. This complex formed in specific conditions are insoluble and easily separated. In this work, we study at molecular level the interaction between a protein molecule of BLG and strong polyelectrolytes chain. The methodology used consist in a coarse grain model with a minimum number of parameters that allow us to represent the physicochemical essence of the process and simulations are performed with the Monte Carlo method. The adsorption of the polyelectrolyte on the protein surface was molecularly quantified with a structural criterion. It was quantified the amount of ionic pairs, a charged monomer with an oppositely charged residue of the protein. Results showed that the interaction protein – polyanion was favored at pH below the isoelectric point (pI) of the protein. On the other hand, it was found that the interaction protein-polycation started on the wrong side of the pI of the protein. It was found that this was due to the charge regulation mechanism of the protein, and mainly the glutamic and aspartic groups.

Keywords: polyelectrolyte, monte carlo, protein, simulation, beta-lactoglobulina

## 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 son obtenidas del concentrado del líquido remanente de la producción del queso. La precipitación de estas proteínas usando polielectrolitos es un método simple y puede ser aplicado a escala industrial (Spelzini et al., 2018). Una gran diversidad de polisacáridos es utilizada para formar complejos con las proteínas en la industria alimenticia (Claudio F. Narambuena, Ausar, Bianco, Beltramo, & Leiva, 2005). En el presente trabajo se presenta el estudio de la complejación entre  $\beta$ -lactoglobulina y polielectrolito (catiónico y aniónico) utilizando un modelo de grano grueso para su representación en un amplio rango de pH utilizando la simulación de Monte Carlo.

## Desarrollo

El presente trabajo se llevó a cabo realizando el estudio de la interacción entre  $\beta$ -lactoglobulina y polielectrolitos fuertes mediante simulación computacional. El principal beneficio es poder distinguir detalladamente las contribuciones al proceso de formación del complejo proteína-polielectrolito (C. F. Narambuena, Leiva, & Pérez, 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), ver 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. B. Torres, Quiroga, Ramirez-Pastor, Boeris, & Narambuena, 2019; P. Torres et al., 2017).

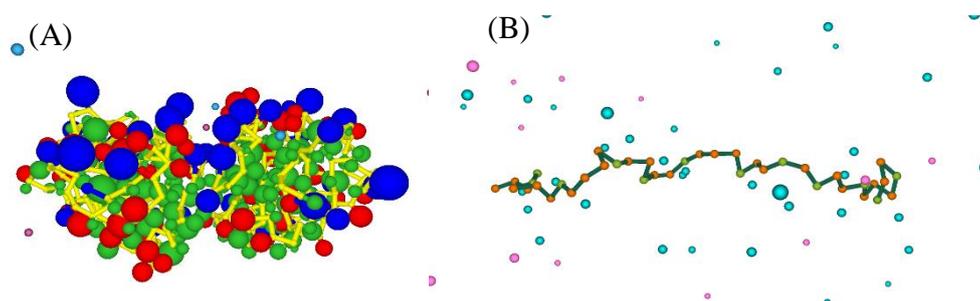


Figura 1. Modelo de Grano Grueso (A)  $\beta$ -lactoglobulina y (B) Polielectrolito.

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 deprotonado, se mueve la carga de la solución al sitio titulable (Proceso de protonación) Si esta protonado, se mueve el protón a la solución (proceso de deprotonación).
3. Los movimientos son aceptados de acuerdo con la probabilidad  $\min(1, e^{-\beta\Delta U_{el} \pm (pH - pK_a) \ln 10})$

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 (de)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-poli-electrolito 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 este trabajo se presentan los resultados obtenidos del estudio de la interacción entre  $\beta$ -lactoglobulina y una cadena de polielectrolito (catiónica y aniónica).

### Proteína Aislada

En primera instancia se estudia el equilibrio ácido-base de la proteína aislada. Se realizaron simulaciones de la forma dimerica de  $\beta$ -lactoglobulina en todo el rango de  $pH$  estudiado, teniendo en cuenta presenta la cantidad de grupos titulables y sus respectivos  $pK_a$  mostrados en Tabla 1.

	<i>Asp</i>	<i>Glu</i>	<i>Cys</i>	<i>Tyr</i>	<i>C – ter</i>	<i>Arg</i>	<i>His</i>	<i>Lys</i>	<i>N – ter</i>
$pK_{ai}$	4.0	4.4	9.5	9.6	3.8	12.0	6.3	10.4	7.5
$\omega_i$	20	32	2	8	2	6	4	30	2

Tabla 1. Cantidad de grupos titulables de la proteína y  $pK_a$  intrínseco.

En la figura 2, se observa como varía la carga neta de la proteína como una función del  $pH$  de la solución. Cuando el  $pH$  es extremadamente ácido la proteína tiene carga neta positiva, esto se debe a que los residuos básicos se encuentran totalmente protonados y los residuos ácidos tienen carga neta 0. A medida que aumenta el  $pH$  comienza el proceso de desprotonación de los grupos ácidos, hasta alcanzar a  $pH = 13$  el máximo valor de cargas negativas. Se observa en el gráfico un valor de  $pH$  en el cual la carga neta de la proteína es  $\langle Z_p \rangle = 0$ , este valor se lo conoce como punto isoeléctrico ( $pI$ ) de la proteína el cual es  $pI \cong 4.8$ . Este valor de punto isoeléctrico está de acuerdo con valores experimentales observados (Morr & Ha, 1993).

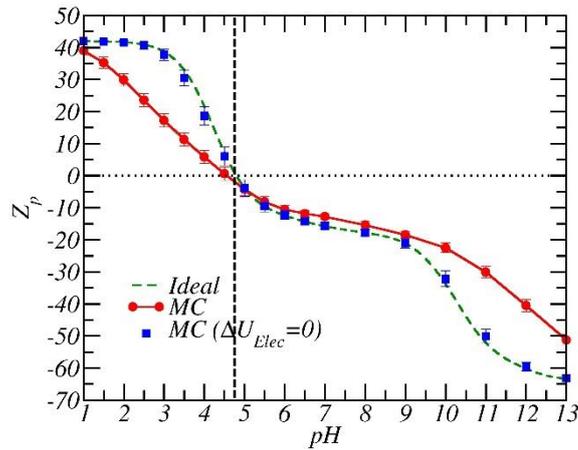


Figura 2. Carga neta de la proteína aislada como una función de Monte Carlo.

### Interacción Proteína-Polielelectrolito

Se realizó el estudio de la interacción entre la  $\beta$ -lactoglobulina-polianión y  $\beta$ -lactoglobulina-policación, se analizó cual era el efecto de esta interacción en el equilibrio ácido-base de la proteína y además se cuantifico la interacción mediante el criterio estructural mencionado en la sección de desarrollo.

En la figura 3 se muestra la formación de pares iónicos como una función del  $pH$ . En la figura 3A, se observa la tendencia de formación de pares iónicos cuando la proteína interactúa con un polielelectrolito aniónico. La interacción comienza a valores de  $pH$  por debajo de  $pH = 5$ , es decir por debajo del punto isoeléctrico de la proteína. En este rango de  $pH$  la proteína tiene carga positiva, y el polielelectrolito aniónico fuerte siempre está cargado negativamente en todo el rango del  $pH$  estudiado. Se realizaron simulaciones con distinto grado de polimerización para el polielelectrolito ( $N_m = 20, 40, 80$ ). En los resultados se observó que a medida que el  $pH$  disminuye la formación de pares iónicos aumenta rápidamente hasta alcanzar un plateau. Adicionalmente, en la interacción de la proteína con el PE con cadena de  $N_m = 80$ , se observa que el máximo de pares iónicos formados es  $\sim 20$ . Se puede concluir que la proteína tendría una capacidad limitada de formar pares iónicos, ya que incluso aumentando aún más el grado de polimerización el máximo de pares iónicos se limita a dichos valores.

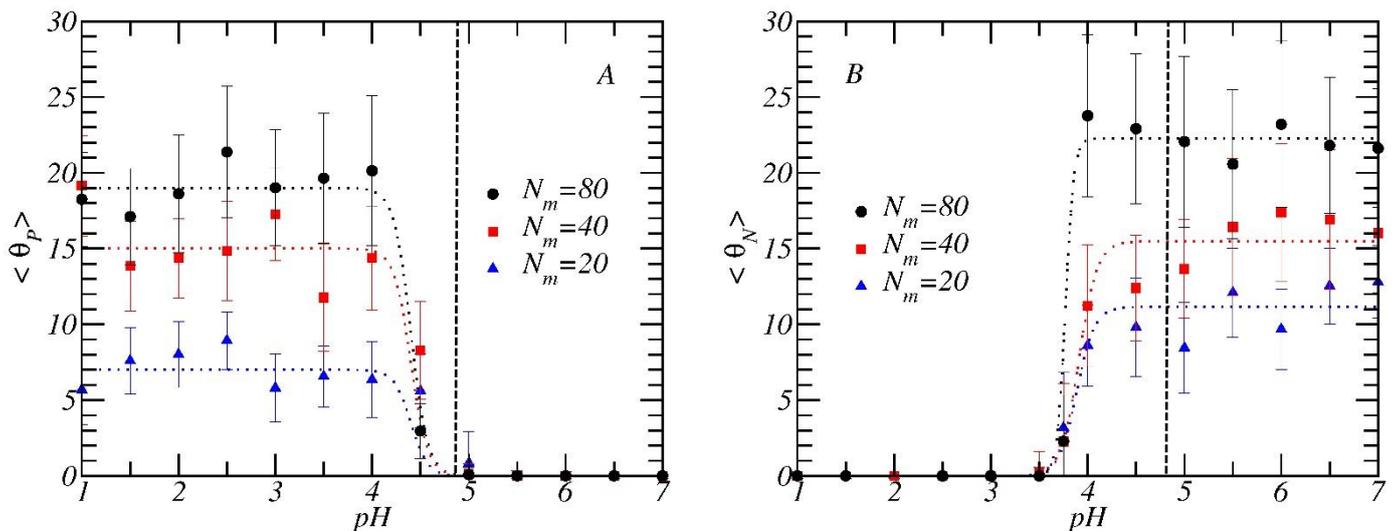


Figura 3. Formación de pares iónicos como una función del  $pH$   
 (A) Interacción BLG-Polianión y (B) Interacción BLG-Policación.

En la figura 3B, se muestra el número de pares iónicos formados como una función del  $pH$  cuando la proteína interactúa con un polielelectrolito catiónico. Se realizaron simulaciones con distinto grado de polimerización para el polielelectrolito ( $N_m = 20, 40, 80$ ). Se observó que la formación de pares iónicos comenzó a un valor por debajo del punto isoeléctrico, a  $pH \approx 3.5$ , el cual es un rango en donde la proteína aislada tiene carga positiva aún. A medida que aumenta el valor de  $pH$  se observó que la formación de pares iónicos alcanza un máximo y se mantiene en un plateau.

De igual manera a lo observado en la interacción proteína-polianión, para una cadena de policación de  $N_m = 80$  el máximo de pares iónicos formados es  $\sim 20$ , es decir al aumentar el grado de polimerización del polielectrolito la proteína alcanza un límite de formación de complejo.

Para entender el comportamiento de la proteína cuando interactúa con el polielectrolito se analiza la carga neta de la proteína como una función del pH de la solución, ver figura 4. En ambas figuras se muestran las curvas teóricas (línea de trazo negro) y de simulación de Monte Carlo de la proteína aislada (símbolos cuadrados negros y línea continua) con fines de comparativos.

En la figura 4A, se observa la carga neta de la proteína como una función del pH cuando interactúa con el polianión. El tamaño de la cadena de polielectrolito ( $N_m$ ) tiene un mínimo de 10 y un máximo de 80 monómeros, los cuales están totalmente cargados durante todo el rango de  $pH$  estudiado. A  $pH$  ácido la molécula de proteína tiene una carga neta positiva que origina una interacción electrostática atractiva con el PE. Esto se observa directamente en el incremento de la carga neta positiva de la proteína por debajo del  $pI$ . El aumento en el tamaño de la cadena de PE amplifica el efecto en la carga neta de la proteína. Como resultado la carga neta es mayor cuando interactúa con la cadena de PE más larga y la curva se asimila más a la ideal. La carga neta no se ve modificada por la presencia del poli electrolito a  $pH$  superior al punto isoeléctrico. Esto se debe a que la proteína tiene una carga neta negativa que genera una interacción electrostática repulsiva con el PE. La proteína en presencia del PE más largo estudiado ( $N_m = 80$ ) es alrededor de 20 cargas positivas más que la proteína aislada a  $pH = 3.5$ . Los grupos titulables básicos se encuentran totalmente en todo el rango de  $pH$  estudiado incluso con la presencia del PE anionico. Los grupos C-ter, GLU y ASP están más cargados negativamente (más deprotonados) en la proteína aislada que en condiciones ideales. Sin embargo, en presencia de la cadena de PE aislada, se intensifica el proceso de protonación de los grupos glutámicos y aspárticos comparado a la proteína aislada. Así, la carga negativa de los grupos GLU y ASP es neutralizada. La contribución de la carga parcial de estos grupos en presencia de un PE se hace muy similar a la carga en condiciones ideales. Los grupos GLU y ASP son los principales responsables del aumento de la carga neta de la proteína en presencia del PE a  $pH = 3.5$ . Cada grupo pierde cerca de 10 cargas negativas lo cual consecuentemente aumenta la carga positiva de la proteína.

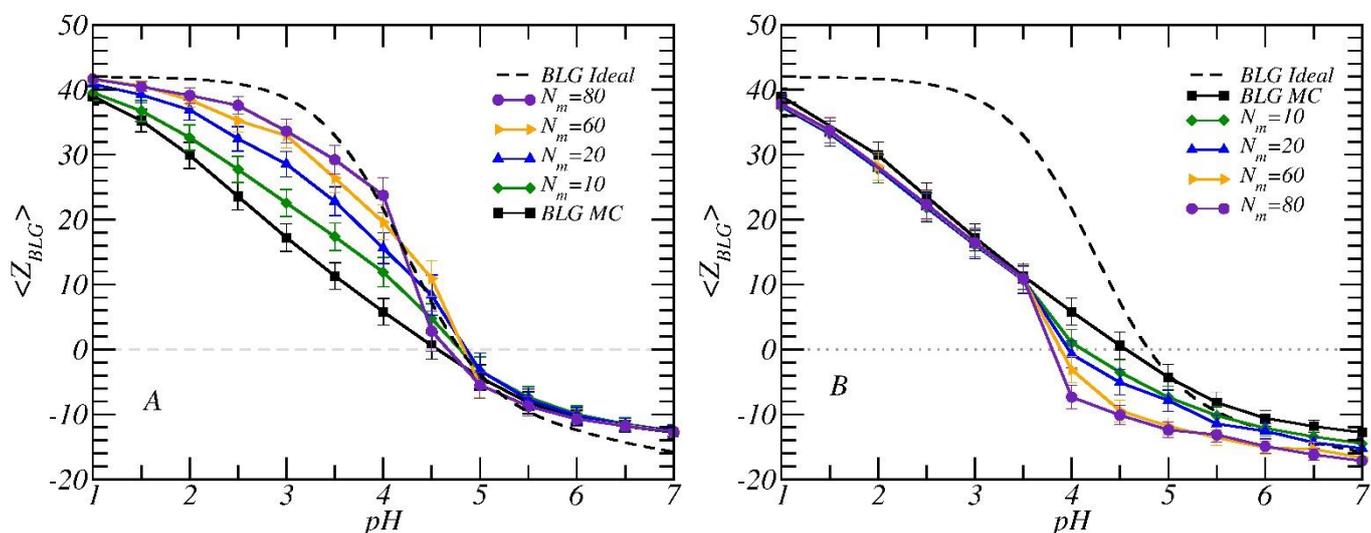


Figura 4. Carga neta de la proteína en presencia del polielectrolito como una función del pH (A) Interacción BLG-Polianión y (B) Interacción BLG-Policación.

La figura 4B presenta efecto del tamaño de cadena de un policación en la carga neta de la proteína como una función del  $pH$ . Las curvas obtenidas de la simulación de MC también son graficadas para comparar. A valores de  $pH$  bajos la carga de la proteína en presencia del PE catiónico es un poco menor que la correspondiente al perfil de la proteína aislada. Sin embargo, a  $pH > 3.75$  la carga neta de la proteína disminuye fuertemente de forma tal que se convierte en negativa. Esta reversión de la carga ocurre con la adsorción de monómeros del PE en la proteína. La capacidad de la proteína de cambiar la carga neta explica la formación del complejo BLG-PE en el lado equivocado del punto isoeléctrico. Luego, la proteína que forma parte del complejo tiene un punto isoeléctrico que es cerca de una unidad menor que el  $pI$  de la proteína aislada. A medida que el tamaño de la cadena de PE aumenta, el punto isoeléctrico efectivo de la proteína se mueve a valores menores. La ionización de los grupos titulables cambia notablemente en el

rango de  $3 < pH < 6$ , en presencia del poli catión, se intensifica especialmente la ionización del ácido glutámico. La formación del complejo a  $pH = 4$  procede con la deprotonación de aproximadamente 10 residuos glutámicos, por lo tanto la proteína adquiere 10 cargas negativas. Sin embargo, el cambio en la carga de la proteína a  $pH = 4$  es de aproximadamente 16 unidades. Los residuos GLU son los principales responsables de la reversión de carga. (P. Torres et al., 2017).

## Conclusión

La interacción molecular entre la  $\beta$ -lactoglobulina y una cadena de polielectrolito fuerte fue estudiada usando el método de Monte Carlo. El punto isoeléctrico de la proteína aislada obtenido de la simulación de MC fue consistente con el valor experimental. El polianión fue adsorbido en la superficie de la proteína desde condiciones extremadamente ácidas hasta valores de  $pH$  cercanos al punto isoeléctrico. Sin embargo, la adsorción del policátion en la proteína comienza a valores de  $pH$  por debajo del punto isoeléctrico y persiste a valores de  $pH$  más altos. En ambos casos, la presencia del polielectrolito modificó la carga neta de la proteína. Este mecanismo de regulación de carga se hace más evidente a valores de  $pH$  por debajo del pI, donde la capacitancia de la proteína muestra un máximo, dado que un importante número de grupos ácidos tiene su valor de pKa en este rango (principalmente glutámico y aspártico). El efecto general es que el punto isoeléctrico de la proteína se mueve hacia la derecha aproximadamente un cuarto de la unidad de  $pH$  por la presencia del polianión, y se mueve hacia la izquierda aproximadamente una unidad de  $pH$  cuando interactúa con la cadena de policátion más larga.

Este trabajo predice que en la interacción de la proteína con un polianión o policátion, el mecanismo de regulación de carga juega un rol clave. Adicionalmente, con polielectrolitos de características estructurales similares, el fenómeno de formación del complejo “en el lado equivocado del pI” es más evidente con el policátion que con el polianión.

## Referencias

- Morr, C. V., & Ha, E. Y. W. (1993). Whey Protein Concentrates and Isolates: Processing and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.  
<https://doi.org/10.1080/10408399309527643>
- 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>
- Narambuena, Claudio 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>
- Spelzini, D., Torres, P., Franchetti, M. C., Tobares, T., Sanchez Varretti, F., Narambuena, C. F., & Boeris, V. (2018). Tratamiento del suero lácteo con polisacáridos ionizables: recuperación y concentración de proteínas. In F. Freire Costa (Ed.), *Recuperación Sostenible de Residuos: Manual de procedimientos para el desarrollo de procesos innovadores* (1st ed., pp. 45–71).
- 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>