



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 57.088.3

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11862

Хромато-масс-спектрометрический анализ концентратов растительных белков

Ольга Леонидовна Мещерякова¹✉, Анна Евгеньевна Бугрова²,
Алексей Сергеевич Кононихин³, Оксана Александровна Карташова¹,
Ольга Сергеевна Корнеева¹, Людмила Эдуардовна Глаголева¹,
Владимир Иванович Корчагин¹

¹Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия,
gawshina@mail.ru ✉

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

³Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН, Москва, Россия

Аннотация. Работа посвящена исследованию состава концентратов белка из зерна амаранта (*Amaranthus hypochondriacus* L.), сорт Воронежский. Концентраты белка амаранта получали щелочной экстракцией белков, нейтрализацией раствора с последующей ультрафильтрацией; путем отделения крахмальной фракции амилолитическими ферментами; щелочной экстракцией белков и осаждением их при pH 4.5. Подобраны условия экстракции белков с последующим хромато-масс-спектрометрическим анализом и их идентификацией. Показано, что белки из зерна амаранта более эффективно экстрагируются буфером с мочевиной при концентрации белка в растворе 1.7, 1.9 и 2.9 мг/см³ соответственно, тогда как буфер с детергентами более эффективен для экстракции низкомолекулярных белков при концентрациях белка в растворе 4.9, 2.9 и 9.0 мг/см³ соответственно. В результате ВЭЖХ-МС/МС анализа с последующей идентификацией и поиском по базе данных UNIPROT установлено, что основным белком зерна амаранта является 11S-глобулин, который выполняет роль запасного белка семян амаранта. В концентратах амаранта идентифицировано 14 уникальных белков, принадлежащих только *A. hypochondriacus* L., а также белков, которые не принадлежат данному виду, но достоверно идентифицируются. По результатам полуколичественного анализа пептидного профиля белковых концентратов зерна амаранта установлена высокая частота встречаемости основных белков 11S-глобулинов во всех образцах. Частота встречаемости других белков в образцах, полученных разными способами, значительно отличалась, что связано с особенностями выделения белка из зерна амаранта. Полученные результаты можно использовать для получения концентратов растительных белков с заданным белковым составом.

Ключевые слова: амарант, концентрат белка, хромато-масс-спектрометрия, белки, структура белка, электрофорез.

Благодарности: исследования проводились при финансовой поддержке РФФИ в рамках выполнения Проекта № 22-26-00277

Для цитирования: Мещерякова О.Л., Бугрова А.Е., Кононихин А.С., Карташова О.А., Корнеева О.С., Глаголева Л.Э., Корчагин В.И. Хромато-масс-спектрометрический анализ концентратов растительных белков // Сорбционные и хроматографические процессы. 2023. Т. 23, № 6. С. 1017-1023. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11862>



Original article

Mass spectrometric analysis of plant protein concentrates

Olga L. Meshcheryakova¹✉, Anna E. Bugrova²,
Alexey S. Kononikhin³, Oksana A. Kartashova¹, Olga S. Korneeva¹,
Lyudmila E. Glagoleva¹, Vladimir I. Korchagin¹

¹Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russia, gawshina@mail.ru✉

²Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³Semenov Federal Research Centre for Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Tal'roze Institute of Energy Problems of Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. The work is devoted to the study of the composition of protein concentrates from amaranth grains (*Amaranthus hypochondriacus* L.), Voronezh variety. Amaranth protein concentrates were obtained by the alkaline extraction of proteins, the neutralization of the solution, followed by ultrafiltration; by separating the starch fraction with amylolytic enzymes; alkaline extraction of proteins and their precipitation at pH 4.5. The conditions for protein extraction were selected, followed by gas chromatography-mass spectrometric analysis and their identification. It has been shown that proteins from amaranth grain were more efficiently extracted with a buffer containing urea at protein concentrations in solution of 1.7, 1.9, and 2.9 mg/cm³ respectively, while the buffer with detergents was more effective for the extraction of low molecular weight proteins at protein concentrations in solution of 4.9, 2.9, and 9.0 mg/cm³ respectively. As a result of HPLC-MS/MS analysis followed by a search and identification in the UNIPROT database, it was established that the main protein of amaranth grain is 11S-globulin, which is a reserve protein of amaranth seeds. In amaranth concentrates, 14 unique proteins characteristic only for *A. hypochondriacus* L., as well as proteins that were not characteristic to this species, but were reliably identified. Based on the results of semi-quantitative analysis of the peptide profile of amaranth grain protein concentrates, a high frequency of occurrence of the main 11S-globulin proteins was established in all samples. The frequency of occurrence of other proteins in samples obtained by different methods differed significantly, which was associated with the peculiarities of protein isolation from amaranth grain. The obtained results can be used for the production of plant protein concentrates with a set protein composition.

Keywords: amaranth, protein concentrate, gas chromatography-mass spectrometry, proteins, protein structure, electrophoresis.

Acknowledgments: the research was supported by the Russian Science Foundation as part of Project No. 22-26-00277.

For citation: Meshcheryakova O.L., Bugrova A.E., Kononihin A.S., Kartashova O.A., Korneeva O.S., Glagoleva L.E., Korchagin V.I. Mass spectrometric analysis of plant protein concentrates. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(6): 1017-1023. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11862>

Введение

Растительные белки широко используются в пищевой промышленности и кормопроизводстве. Амарант является одним из перспективных источников белка в качестве альтернативы белкам растительного и животного происхождения [1, 2]. Данная культура привлекает к себе внимание высоким уровнем адаптации, быстрым приростом биомассы, высоким содержанием белка и его сбалансированностью по аминокислотному составу [3, 4]. Биологические функции белков амаранта

во многом зависят от области возделывания культуры, климатических условий и сорта [5], структуры белка [6] и способов его выделения из растения [7]. При оценке биологических свойств концентратов белка из зерна амаранта важным является определение и идентификация входящих в их состав белков. Известно, что в результате физико-химических воздействий на молекулы белка при его выделении снижается растворимость [8], что затрудняет его экстракцию для дальнейшего анализа и идентификации. В связи с этим, целью работы являлось: подбор условий экстракции белков при



получении концентратов белка из зерна амаранта сорта Воронежский с последующим хромато-масс-спектрометрическим анализом и идентификацией белкового состава.

Экспериментальная часть

Объектом исследования являлось зерно амаранта сорта Воронежский. Концентраты белков из зерна амаранта были получены следующим образом: 1 – щелочной экстракцией белков и нейтрализацией раствора с последующей ультрафильтрацией на УМТКп-1 «Водопад» с размером пор 0.14 мкм; 2 – отделением крахмальной фракции из зерна амилолитическими ферментами; 3 – щелочной экстракцией белков и осаждением их при рН 4,5. Массовая доля белка (м.д.б.) в полученных концентратах составила, %: 73, 55 и 83 соответственно.

Концентраты белков растворяли в фосфатном буфере и добавляли лизирующий Буфер 1 (50 мМ Трис, рН 8.0, 150 мМ NaCl, 0.1% додецилсульфат натрия, 0.25 % деоксихолат натрия, 0.5 % Нонидет Р-40) с коктейлем ингибиторов протеаз (Roche, Швейцария). Затем экстрагировали повторно Буфером 2 (8М мочевины, 50 мМ Трис) в течение 30 минут при комнатной температуре при постоянном перемешивании и центрифугировали при 10000g, +4°C.

Концентрацию белков определяли БСА-методом с использованием набора бицинхониновой кислоты (ThermoFisher, США). Эффективность экстракции белков оценивали электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ).

Гидролиз белков в растворе осуществляли последовательно ферментными препаратами Lys C (Promega, США) 1/100 в течение 4 часов, затем трипсином (Promega, США) 1/50 в течение 16 часов.

Для ВЭЖХ МС анализа использовали нанопоточный хроматограф Agilent 1100 с самодельной колонкой на основе C18 с электроспрейным эмитером. Колонку

изготавливали непосредственно перед измерением.

Масс-спектрометрический анализ проводился на тандемном масс-спектрометре LTQ FT Ultra в 2-х стадийном режиме автоматического измерения спектров по [9, 10].

Контроль результатов ВЭЖХ-МС проводили с помощью программы Qual Browser. С помощью программы Raw2msm из масс-хроматограмм были получены списки точных масс пептидов и масс их фрагментов и использованы для поиска и идентификации белков по базе данных при помощи программы Peaks Studio (Bioinformatics Solutions Inc., США, version 8.5). Для идентификации пептидов использовалась аминокислотная последовательность белка согласно базе данных Uniprot KB.

Обсуждение результатов

Для подбора оптимального буфера для растворения и денатурации белков использовали два наиболее часто используемых лизирующих буфера: Буфер 1 (на основе детергентов) и Буфер 2 (на основе мочевины). Для последующего масс-спектрометрического анализа и электрофореза в ПААГ была определена концентрация белка в образцах массой 10 мг (табл. 1).

По результатам электрофореза в полиакриламидном геле (рис.1) установлено, что более эффективно белки экстрагировались буфером 2 (с мочевиной), однако, буфер 1 (с детергентами) более эффективен для экстракции низкомолекулярных белков. Было отмечено сходство между образцами 1', 2', и 3', причем содержание белка росло с увеличением массовой доли белка в препарате. Так как буферы отличались по экстрагирующей способности, для дальнейших исследований использовали обе фракции.

В результате гидролиза белкового содержимого концентратов белков из амаранта и ВЭЖХ-МС/МС анализа с последующей идентификацией и поиском по

Таблица 1. Концентрация белка в растворах белковых концентратов
 Table 1. Protein concentration in solutions of protein concentrates

№ образца	Объем буфера 1, см ³	Концентрация белка, мг/см ³	Объем буфера 2, см ³	Концентрация белка, мг/см ³
1	0.5	1.7	0.18	4.9
2	0.5	1.9	0.32	2.9
3	0.5	2.9	0.22	9.0

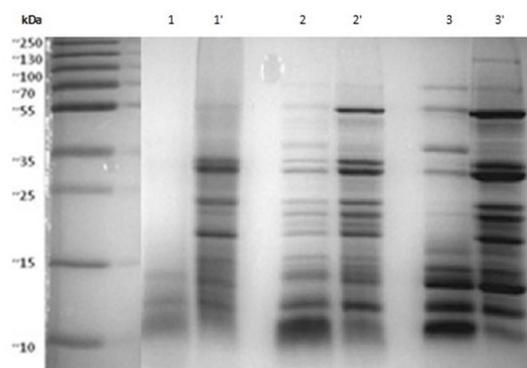


Рис. 1. Электрофорез концентратов белков из зерна амаранта в 12 % ПААГ: 1 – ультрафильтрационный концентрат, м.д.б. 73 %, 2 – концентрат белка, м.д.б. 55 %, 3 – концентрат белка, м.д.б. 83%. На парные дорожки нанесены последовательные экстракты: Буфер 1, затем Буфер 2 (').

Fig. 1. Electrophoresis of protein concentrates from amaranth grain in 12% PAGE: 1 – ultrafiltration concentrate, mass fraction of protein 73%, 2 – protein concentrate, mass fraction of protein 55%, 3 – protein concentrate, mass fraction of protein 83%. Sequential extracts were applied to paired lanes: Buffer 1, then Buffer 2 (')

базе данных UNIPROT было идентифицировано 188 белков без учета видовой принадлежности, основные из которых представлены в таблице 2. Однако, отобрав белки, принадлежащие только *A. hypochondriacus L.*, и уникальные белки, которые не приписываются данному виду, но достоверно идентифицируются, получили список идентификаций из 14 белков (табл. 2). Небольшое количество идентификаций обусловлено низкой наполненностью базы не только для растения этого вида, но и для других видов амаранта.

Как видно из табл. 2, основными белками зерна амаранта являются: 11S-глобулин, который относится к основному запасному белку семян, а также белок теплового шока (Hsp70) стресспротективного действия, агглютинин, рибосомальный белок, белок-переносчик липидов и белки-ферменты.

Полуколичественный анализ гидролизатов белковых концентратов амаранта позволил выявить белки и соответствующие пептиды, которые наибольшим образом отличают образцы, полученные разными способами (рис. 2).

Как видно из рис. 2, белковый состав образцов амаранта значительно различался. Показана высокая частота встречаемости основных запасных белков 11S-глобулинов во всех образцах. Однако образец 2 отличался от образца 3 наличием большего количества таких белков, как белок теплового шока (Hsp70) стресспротективного действия, ферменты глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, 5-метилтетрагидроптерилтриглутамат-гомоцистеин-S-метилтрансфераза, участвующей в синтезе метионина, малатдегидрогеназа, фермент гликогеноза IV типа и др. Малое количество других идентифицированных белков может объясняться действием на структуру белков агрессивных

Таблица 2. Белки, идентифицированные в гидролизатах концентратов белка из зерна амаранта сорта Воронежский
 Table 2. Proteins identified in hydrolysates of protein concentrates from amaranth grain of the Voronezh variety

№ п/п	ID белка	Количество пептидов	Количество уникальных пептидов	Покрытие белка, %	Масса белка, Да	Название белка
1	Q8S390	13	1	56	34959	Seed protein AmA1
2	Q38719	13	1	56	34958	Agglutinin
3	O48859	6	5	25	28077	rRNA N-glycosylase
4	A0A221C716	2	2	7	36460	Malate dehydrogenase
5	P83167	4	4	36	9747	Non-specific lipid-transfer protein 1
6	Q9ZTZ5	2	1	11	31348	rRNA N-glycosylase
7	A0A346NUD2	3	3	40	9317	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (OS=Amaranthus californicus)
8	A0A346NUG8	3	3	36	10422	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (OS=Amaranthus hypochondriacus)
9	A0A6C0T503	2	2	7	48429	Heat shock protein 70
10	Q38712	66	7	64	56672	11S globulin seed storage protein
11	Q94G66	1	1	12	12560	Small ribosomal subunit protein eS25
12	A2I9A6	62	3	60	55065	11S globulin
13	A0A0F7R6Z9	9	9	11	108503	1,4-alpha-glucan branching enzyme
14	E3VW74	6	6	11	83736	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine S-methyltransferase

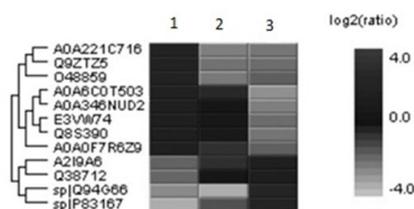


Рис. 2. Тепловая карта для сравнительного анализа белковых профилей между образцами белковых экстрактов из амаранта с массовой долей: 1 – 55%, 2 – 83%, 3 – 73%. Максимум в шкале интенсивности белка отражен 4.0, минимум – -4.0.

Fig. 2. Heat map of a comparative analysis of protein profiles between samples of protein extracts from amaranth with mass fraction: 1 – 55%, 2 – 83%, 3 – 73%. The maximum in the protein intensity scale was 4.0, the minimum was -4.0.

сред при их выделении. В концентрате белка, полученном после ультрафильтрации (образец 3) наблюдалось большое ко-

личество белков агглютининов, рибосомальных белков, неспецифических белков-переносчиков липидов, тогда как количество других белков минимально, что

может быть следствием потерь белков при проходе через мембрану. В концентрате белка амаранта без химической экстракции белков (образец 1) наблюдалась высокая частота встречаемости всех идентифицированных белков, за исключением белков, присутствующих в образце 3, что может объясняться наличием прочных связей данных белков с биополимерами семян растения и невозможности их экстракции.

Заключение

Подобраны условия экстракции белков из зерна амаранта, полученных разными способами выделения. Методом хромато-масс-спектрометрического анализа и идентификации основных белков установлено, что основным белком всех концентратов амаранта является запасной белок 11S-глобулин. В концентрате белка амаранта, полученном щелочной экстракцией и осаждением белка при pH 4.5, установлена высокая частота встречаемости белков теплового шока (Hsp70) стресспротективного действия и белков-

ферментов. Состав ультрафильтрационного концентрата отличался высоким содержанием белков агглютининов, рибосомальных белков, неспецифических белков-переносчиков липидов и минимальным количеством белков-ферментов. Наибольшим количеством идентифицированных белков отличался концентрат белка амаранта, полученный после ферментативного удаления крахмала. При этом отмечено низкое содержание агглютининов, рибосомальных белков, неспецифических белков-переносчиков липидов. Полученные результаты позволяют рекомендовать разные способы получения растительных белковых концентратов с заданным белковым составом.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

Список литературы/References

1. Pavlenkova S., Shuvaeva G., Meshcheryakova O., Miroshnichenko L., Korneeva O. Amaranth – A promising crop for fodder manufacturing. *Journal of Biotechnology: European biotechnology congress. Dubrovnik. Croatia.* 2017; 27. <https://doi.org/10.1016/J.JBI-OTEC.2017.06.642>
2. Chirkova T.V., Amaranth – the culture of the 21st century, *Soros. education magazine*, 1999; 10: 22-27. (In Russ.)
3. Khandaker, L.; Masum-Akond, A.S.M.G.; Ali, M.B.; Oba, S., Biomass yield and accumulations of bioactive compounds in red amaranth (*Amaranthus tricolor L.*) grown under different colored shade polyethylene in spring season, *Sci. Hortic.*, 2010; 123: 289-294. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.09.012>
4. Cordero-de-los-Santos, M.Y., J.A.Osuna-Castro, A. Borodanenko and O.,

Parades-Lopez: Physicochemical and functional characterization of amaranth (*Amaranthushypochondriacus*) protein isolates obtained by isoelectric precipitation and micellisation, *Food Sci. Technol. Int.*, 2005; 11: 269-280. <https://doi.org/10.1177/1082013205056491>

5. Taipova R.M., Kuluev B.R., Amaranth: cultural features, application, prospects for cultivation in Russia and the creation of transgenic domestic varieties, *Biomika*, 2015; 7(4): 284-299. (In Russ.)

6. Avanza M.V., Puppo M.C., Añón M.C. Structural characterization of amaranth protein gels, *J. Food Sci.*, 2005; 70: 223–229. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07139.x>

7. Nasser A.T., Rasoul-Amini S., Morowvat M.H., Ghasemi Y., Single Cell Protein: Production and Process, *American Journal of Food Technology*. 2011; 6: 103-116. <https://doi.org/10.3923/ajft.2011.103.116>



8. Meshcheryakova O.L., Vasilenko L.I., Gubin A.S., Sviridova T.V., Korneeva O.S., Analysis of an amino acid composition and the structure of amaranth protein isolates under different conditions of protein isolation, *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2022; 22 (6): 841-848. <https://doi.org/10.17308/sorp-chrom.2022.22/10890> (In Russ.)

9. Aebersold R., Mann M., Mass spectrometry-based proteomics, *Nature*, 2003;

422 (6928): 198-207. <https://doi.org/10.1038/nature01511>

10. Weisser H., Nahnsen S., Grossmann J., Nilse L., Quandt A., Brauer H., Sturm M., Kenar E., Kohlbacher O., Aebersold R., Malmström L., An automated pipeline for high-throughput label-free quantitative proteomics, *J. Proteome Res*, 2013; 12: 1628. <https://doi.org/10.1021/pr300992u>

Информация об авторах / Information about the authors

О.Л. Мещерякова – доцент кафедры биохимии и биотехнологии ФГБОУ ВО ВГУИТ, Воронеж, Россия

А.Е. Бугрова – старший научный сотрудник ИБХФ РАН, Москва, Россия

А.С. Кононихин – ведущий научный сотрудник ИНЭПХФ им. В.Л. Тальрозе ФИЦ ХФ РАН, Москва, Россия

О.А. Карташова – экстерн ФГБОУ ВО ВГУИТ, Воронеж, Россия

О.С. Корнеева – заведующая кафедрой биохимии и биотехнологии ФГБОУ ВО ВГУИТ, Воронеж, Россия

Л.Э. Глаголева – профессор кафедры биохимии и биотехнологии ФГБОУ ВО ВГУИТ, Воронеж, Россия

В.И. Корчагин – профессор кафедры промышленной экологии и техносферной безопасности ФГБОУ ВО ВГУИТ, Воронеж, Россия

O.L. Meshcheryakova – Associate Professor Department of Biochemistry and Biotechnology, Voronezh State University of Engineering technologies, Voronezh, Russia, gawshina@mail.ru

A.E. Bugrova – senior researcher of Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, anna.bugrova@gmail.com

A.S. Kononikhin – leading researcher V.L. Talrose Institute for Energy Problems of Chemical Physics, N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia, konoleha@yandex.ru

O.A. Kartashova – external student of Biochemistry and Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russia

O.S. Korneeva – Head of Department of Biochemistry and Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russia, korneeva-olgas@yandex.ru

L.E. Glagoleva – Professor of the Department of Biochemistry and Biotechnology, Voronezh State University of Engineering technologies, Voronezh, Russia, irochka2n@gmail.com

V.I. Korchagin – Professor of the Department of Industrial Ecology and Technosphere Safety, Voronezh State University of Engineering technologies, Voronezh, Russia, kvi-vgta@rambler.ru

Статья поступила в редакцию 22.11.2023; одобрена после рецензирования 04.12.2023; принята к публикации 06.12.2023.

The article was submitted 22.11.2023; approved after reviewing 04.12.2023; accepted for publication 06.12.2023.