

# 玉米子粒蛋白質及離氨酸含量測定方法之研究<sup>1</sup>

鄭 心 嫻<sup>2</sup>

## 一、引 言

玉米為本省主要飼料作物之一，為提高玉米的營養價值，本所正進行提高其蛋白質及離氨酸含量之育種工作，期育成高蛋白質及離氨酸的玉米品種。玉米育種選拔必有大量樣本，為求得簡單迅速而經濟的測定方法，以配合育種工作，極為重要。就目前而言，一般測定蛋白質含量均以 Kjeldahl 氏方法最常用，亦較準確；離氨酸之測定則以 D. H. Spackman, W. H. Stein, S. Moore<sup>(4,5)</sup> 氏方法行之最久，亦較準確。

本研究之目的在以迅速簡便的 Dye-binding 方法與 Kjeldahl 法估計樣本蛋白質含量，比較其準確性，以決定 Dye-binding 方法<sup>(6)</sup> 是否可以應用。至於離氨酸測定則以 TNBS (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid)<sup>(1)</sup> 法與自動氨基酸分析儀分析後之結果比較，以明瞭其可靠性。

## 二、材料及方法

### (一) 玉米蛋白質測定方法之比較

1. 材料：採用 opaque—2 玉米自交系 54 種

2. 方法：

a. 樣品處理：玉米子粒烘乾後研磨成粉，通過 50 目 (mesh) 篩。

b. 粗蛋白質測定方法：

(1) Kjeldahl 氏法：稱樣本 0.2gm 加濃硫酸 4ml 分解，然後稀釋成 100ml，取其中 10ml 於培養皿中，以擴散法測定樣本中含氮量，乘常數 6.25，即為粗蛋白質含量。

(2) Dye-binding 法：Dye-binding 測定蛋白質之原理為樣本中蛋白質的鹼性氨基酸與 monosulfonic azo dye 及 Acid orange 12 溶液反應後形成不溶性混合物，然後用光電比色計測定與蛋白質作用後溶液中剩餘的 monosulfonic azo dye 及 Acid orange 12 的濃度，以決定蛋白質含量，因為染色液其蛋白質中鹼性氨基酸結合量 (dye-binding capacity)，有密切的相關存在。

測定之過程為取 500mg 樣本加 20ml 染色試藥，攪拌 60 分鐘後，於  $25^{\circ}\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  下靜置 5 到 10 分鐘，此時用 reference dye (約 12% 蛋白質) 調整比色計在刻度「42」處，然後將攪拌後之混濁液過濾或離心，取其澄清液，比色，波長  $480\text{ m}\mu$ ，依據下列公式可得蛋白質含量。

$$\text{蛋白質} = (1.100 - C) / 0.0545 \quad (C \text{ 為染色液之濃度})$$

### (二) 玉米離氨酸 (Lysine) 測定方法之比較

1. 材料：採用 opaque—2 玉米自交系 10 種，floury—2 玉米 5 種，及普通玉米臺南 5 號共 16 種。

2. 方法：

a. 樣品處理：與測定蛋白質的樣本相同。

b. 測定步驟：

(1) W. H. Stein, S. Moore 氏方法測離氨酸 (簡稱 A. A. A.)

(A) 原理：離氨酸為鹼性氨基酸，蛋白質經鹽酸加水分解後，成為游離的各種氨基酸，然後將各種氨基酸之混合液，通過一離子交換樹脂，調整溶液 PH 值，使與鹼性氨基酸之導電點

1. 試驗報告農試字第六六四號

2. 臺灣省政府農林廳技士

(Isoelectric point) 相同，則該氨基酸可被吸收，其他則溶出，因此不斷調整PH值，可分離出各種氨基酸來。分離之離氨酸加 Ninhydrin 試劑，使與之作用而得 DYDA Raheman 色素，用光電比色計波長 $570\text{ m}\mu$  測量之。

(B) 過程：取樣本  $100\text{ mg}$  加  $6\text{ N}$  定沸點鹽酸約  $3\text{ ml}$  於試管中，用冰塊在試管末端降低溫度，以真空幫浦抽出溶於液體中之氣體，待全部氣體抽出後，即行封口，置於  $110^\circ\text{C}$  加水分解爐  $24$  小時，加水分解後取出試管冷至室溫，敲開試管口，用真空幫浦抽乾鹽酸，再加  $5\text{ ml}$   $\text{PH}2.2$  醋酸緩衝液稀釋，置低溫恆溫箱  $4^\circ\text{C}$  中貯藏備用。在樣本處理中，須盡量避免氨之污染。

取約含  $1\text{ mg}$  蛋白質之水解物樣本加入自動氨基酸分析儀器中。(Yanagimoto Mfg. Co. Ltd. Model LC-5A) 測定之。

## (2) TNBS法測定離氨酸

(A) 原理： $2, 4, 6$ -trinitrobenzenesulfonic (TNBS) 與離氨酸作用，產生  $\epsilon$ -trinitrophenyl (TNP)-L-lysine 及  $1$ -chloro- $2, 4, 6$ -trinitrobenzene，而  $\epsilon$ -trinitrophenyl-L-lysine 與鹽酸作用，產生  $\epsilon$ -TNP-L-lysine HCl， $\text{H}_2\text{O}$  之量與離氨酸量相當，故用波長  $420\text{ m}\mu$ ，比色做一標準曲線(如圖1)，可求出樣本中離氨酸之含量。

(B)過程：秤樣本  $100\text{ mg}$ ，先用  $0.14\text{ m}$   $70\%$  酒精，攪拌  $5$  分鐘再用  $1\text{ ml}$   $0.5\%$   $\text{NaOH}$  攪拌  $5$  分鐘，則抽出樣本中蛋白質約  $98\%$ 。取  $0.2\text{ ml}$  抽出之蛋白質加  $0.8\text{ ml}$   $4\%$   $\text{NaHCO}_3$  ( $\text{PH}8.5$ )，加  $1\text{ ml}$  新鮮  $0.1\%$  TNBS。空白試驗要在加鹽酸後才加 TNBS。然後置保溫箱  $40^\circ\text{C}$ ， $2$  小時後，加  $3\text{ ml}$   $6\text{ N}$  鹽酸，置於高壓釜 (autoclave)  $120^\circ$  ( $15$ — $17\text{ psi}$ )  $1$  小時，加  $5\text{ ml}$  蒸餾水，然後用  $10\text{ ml}$  乙醚抽取兩次，再加熱  $5$  分鐘，冷卻後用光電比色計  $420\text{ m}\mu$  波長測定之。未知濃度的離氨酸在已知離氨酸的濃度下所做之曲線(如圖1)上可求出。

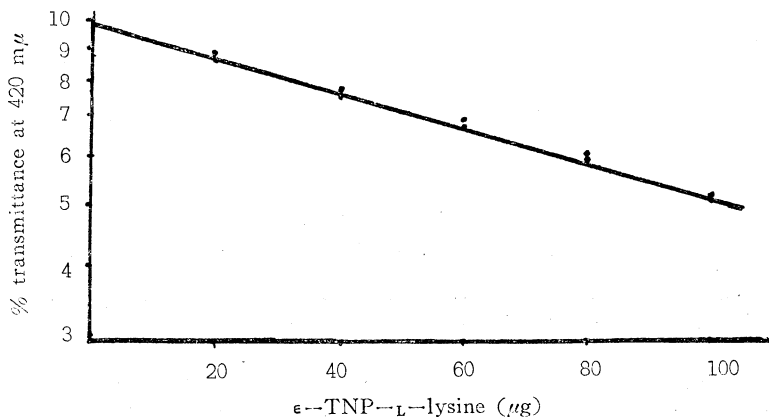


圖 1 TNBS 法測定 離氨酸的標準曲線

Fig.1. Standard curve relating percent transmittance at  $420\text{ m}\mu$  to quantity of  $\epsilon$ -TNP-L-lysine ( $\mu\text{g}$ ) in final reaction mixture.

## 三、結果及討論

### (一) 玉米蛋白質含量測定方法之比較

以 Kjeldahl 氏法及 Dye-binding 方法分別測定臺南 5 號玉米的蛋白質含量，先後共  $15$  次，Kjeldahl 法的平均數為  $10.20\%$ ，Dye-binding 為  $10.17\%$ ，兩者非常相近，經以  $t$  測驗之結果兩者差異不顯著 ( $t=1.20$ ,  $d.f.=14$ )。兩種方法  $15$  次測定的蛋白質含量相當近似，表示重複性很高，同時 Kjeldahl 法與 Dye-binding 法測定的結果，其 C. V. 值各為  $1.75\%$  與  $1.46\%$  (見表 1)，故兩者變異情形亦約略相似。

表1. 兩種不同方法測定臺南5號玉米蛋白質含量(%)的差異

Table 1. The protein % of corn kernel of Tainan No. 5. measured by Kjeldahl and Dye-binding methods

測定次數*	蛋 白 質 (%)	
	Dye-binding	Kjeldahl
1	10.18	10.26
2	10.24	10.38
3	10.41	10.50
4	10.33	10.50
5	10.27	10.38
6	10.05	10.01
7	10.28	10.01
8	10.27	10.01
9	10.08	10.23
10	10.14	10.03
11	10.19	10.03
12	10.23	10.20
13	10.11	10.19
14	9.82	10.20
15	9.98	10.03
(X±S. E)	10.17±0.039	10.20±0.046
C. V. %	1.46%	1.75%

\* 62年5月23日進行第一次測定，至7月12日第15次測定終了。

此外，以54種 $O_2$ 玉米各別同時以Kjeldahl法及Dye-binding法測定蛋白質之含量，兩法所得結果，其蛋白質含量的相關係數 $r=0.857$ （圖2），亦表示兩法對任何樣品而言，分析結果亦相接近，因此應用Dye-binding法迅速測定玉米蛋白質含量，在玉米育種上採用可獲準確結果。此外Dye-binding法每天可測定已研磨成粉之樣品132個，而Kjeldahl氏法平均每天僅能測樣品10個，其速度約快13倍，對育種選拔需在短時間內測大量樣品而言，非常有利。

#### (二) 玉米離氨酸含量測定之比較

玉米離氨酸經自動氨基酸分析儀器及TNBS兩法測定15個樣品及對照普通玉米臺南5號結果，列於表2。

由表2，可知兩法之結果就Opaque-2玉米而言，較為接近，大部份樣品相差僅0.1~0.2 gm/100gm蛋白質，而最大的差異仍可達到0.6 gm/100gm蛋白質，但差異中有正負，此可能由於TNBS法在蛋白質加水分解只需1小時，而試管不封口，氨基酸游離不完全；而A. A. A. 測定則需24小時加水分解，又在封口抽真空的試管中，完全控制下進行之故（Conn and Stumpt 1963）。

但 floury-2 玉米兩法測定之離氨酸含量相差較大，A. A. A. 測定之含量較低，此結果與 Meritz 等 (1964) 研究  $o_2$  及  $fl_2$  玉米蛋白質性質之結果相印證，即 opaque-2 的蛋白質酒精可溶部分 (Zein) 僅為正常者之三分之二，而 floury-2 Zein 部分之 lysine 含量為 opaque-2 之三分之一，而且  $o_2$  與  $fl_2$  玉米蛋白質 Starch-gel 電泳分析結果，兩者酒精可溶部份的組成不同。又 TNBS 法最初

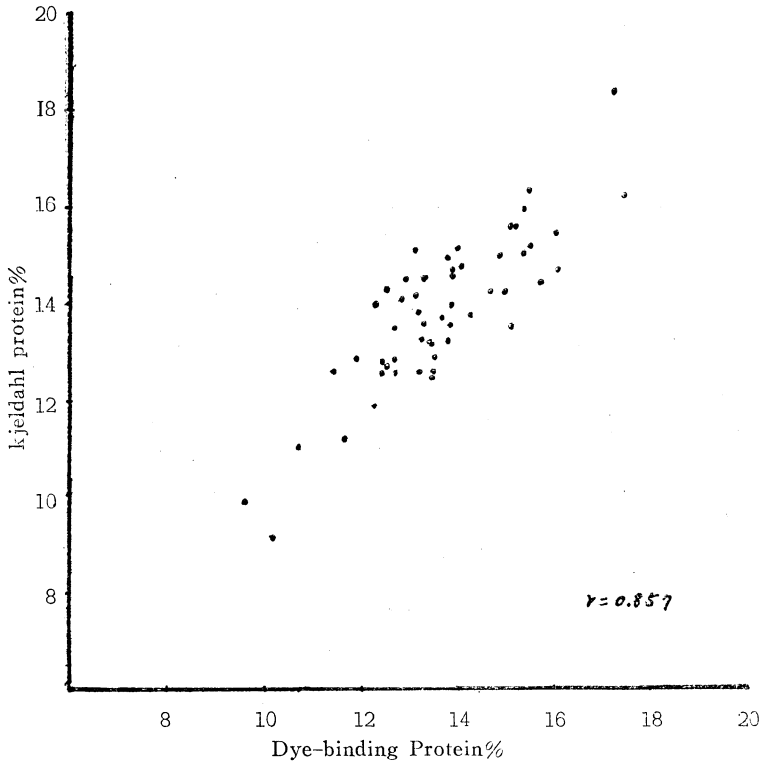


圖 2. kjeldahl 氏法與 Dye-binding 法測定蛋白質含量的相關情形  
Fig. 2. Relationship of protein% obtained from kjeldahl and Dye-binding methods.

表2. 兩種不同方法測定玉米子粒離氨酸含量 (gm lysine/100gm protein)  
Table 2. The lysine contents (gm/100gm protein) of corn kernel obtained by TNBS and automatic amino acid analyzer

種類及代號	品系名稱	自動氨基酸儀 (AAA)	TNBS	差異
普通玉米	1 臺南5號	2.68	3.15	-- 0.47
opaque-2	2 TA1	5.10	5.00	+ 0.10
〃	3 TA2	5.70	5.10	+ 0.60
〃	4 TA3	4.19	4.33	-- 0.14
〃	5 TA7	4.10	3.70	+ 0.40
〃	6 TA8	3.60	4.20	-- 0.60
〃	7 TA10	5.40	5.20	+ 0.20
〃	8 TA11	3.10	3.50	-- 0.40

◇	9	TA13	3.90	3.80	+ 0.10
◇	10	TA19	3.70	4.10	-- 0.40
◇	11	TA43	4.59	5.05	-- 0.46
floury—2	12	F12	3.75	4.21	-- 0.46
◇	13	F27	3.31	4.35	-- 1.04
◇	14	F34	3.65	4.75	-- 1.10
◇	15	F43	3.04	3.14	-- 0.14
◇	16	F185	4.64	3.92	+ 0.72

由樣本抽出蛋白質是用酒精與鹼，可能是造成 $o_2$ 與 $fl_2$ 玉米結果不同的原因。故 TNBS 法可能對 floury—2 玉米離氨酸測定時，不能應用。

一般而言，TNBS 法每日可測定 20 個樣本，遠較自動氨基酸測定儀器為速；同時應用 A. A. A. 法測定氨基酸之費用過高，大量樣品測定不僅費時，費用亦較昂貴，依目前的藥品材料而言，分析一個樣品的費用估計需新臺幣八百元左右，當然應用自動分析儀器，其結果較為精確，但是蛋白質水解等過程仍需留意，如有誤差，則仍然不能獲準確結果。故在育種上而言，初期選拔，樣品過多時，自動氨基酸分析儀器似不宜應用；在後期樣品數量較少，而需作各種氨基酸組成分析 (Complete analysis) 時較為有利。就 opaque—2 玉米而言，如單獨測定離氨酸時，則仍可採用 TNBS 法。

#### 四、摘 要

- (一) Dye-binding 與 Kjeldahl 兩法測定 54 個  $o_2$  玉米的粗蛋白質量，根據駢對比較差異不顯著，兩者的相關係數  $r=0.857$ ，故兩法結果相當一致。
- (二) Dye-binding 法經重複測定同一樣品 (臺南 5 號) 的結果 (表 1)，與 Kjeldahl 法非常接近，故以此法測定玉米蛋白質含量頗為穩定與準確，但其測定樣品的速度較 Kjeldahl 法快 13 倍。
- (三) 測定離氨酸方法以 TNBS 法與自動氨基酸分析儀比較，兩者雖有差異，但就  $o_2$  玉米而言，最低相差 0.1，最高相差 0.6gm/100gm 蛋白質，而各樣品間，兩法所得結果互有高低，故如能在分析時加以注意，TNBS 法可以應用。但  $fl_2$  玉米則兩法差別甚大，TNBS 法不能應用，其原因尚需再加探討。

誌謝：本研究承蒙所長萬博士雄、林技正家茶兩位先生斧正，謹表深摯之謝意。

#### 五、參考文獻

- (1) Kakade, M. L., and I. E. Lieber. 1969. Determination of Available Lysine in protein. *Anal. Biochem.* 27; 273—280.
- (2) Mertz, E. T., and R. Bressani. 1937. Studies on corn protein. I A New Method of Extraction. *Cereal Chem.* 63; 34—69.
- (3) Mertz, E. T., N. E. Lloyd., and R. Bressani. 1938. Studies on corn protein. II Electrophoretic Analysis of Germ and Endosperm Extracts *Cereal Chem.* 35; 146—155.
- (4) Moore, S., D. H. Spachman., W. H. Stein. 1958. Chromatography of Amino Acid on Sulfonated Polystyrene Resins. *Anal. Chem.*, 30; 1185—1190.
- (5) Spachman., D. H., W. H. Stein., and S. Moore., 1958. Chromatography of Amino Acids. *Anal. Chem.*, 30; 1190—1206.
- (6) Udy, D. C. 1971. Improved Dye Method for Estimating protein. *Journal of the American Oil Chemist" Society*, 48; 29A—33A.

(7) 張爲憲等。1971。廉價高品質蛋白之研究，食品工業發展研究所研究報告第十三號。

(8) 萬 雄。1958。玉米蛋白質品質之改良及其營養價值。農業中心遺傳及作物育種學講習會季刊。pp120-129.

## STUDIES ON THE METHODS FOR DETERMINING PROTEIN AND LYSINE CONTENT OF CORN KERNELS<sup>1</sup>

Hsing—Hsien Cheng<sup>2</sup>

### Summary

The purpose of this study was to compare the rapid method for measuring protein and lysine content of corn kernels, Dye—binding and TNBS vs. Kjeldahl and automatic amino acid analyzer we are using respectively in order to facilitate the analysis of protein and lysine in our high protein and high lysine corn breeding program.

The results indicated that the Dye—binding method for rapid estimation of protein was almost equal to the protein content obtained by Kjeldahl method. (10.17% and 10.20%, See Table 1). The correlation coefficient was 0.857 for protein content obtained by two methods from 54 different opaque—2 inbred lines. One technician could analyze 132 samples per day by using dye—binding method, but it was only 10 samples by Kjeldahl method.

The lysine content for opaque—2 corn estimated by TNBS method was relatively close to that of the A. A. A. method. However lysine content estimated by this method for floury—2 corn was much lower. This would be due to the different nature of protein for o<sub>2</sub> & fl<sub>2</sub> corn. The TNBS could analyze 20 samples per day which was much rapid than A. A. A. method.

It is suggested that Dye—binding method for protein estimation and TNBS method for lysine determination of o<sub>2</sub> corn can be used in corn breeding program.

---

1. Serial No (Q) 664.

2. Associate Chemist, Taiwan Agricultural Research Institute.