

**METHODES CHIMIQUES EMPLOYEES PAR CIMMYT
DANS LA DETERMINATION ET L'EVALUATION DE
LA QUALITE DE LA PROTEINE DU MAIS**

Evangelina Villegas

Edwin T. Mertz



**CENTRO INTERNACIONAL DE MEJORAMIENTO DE MAIZ Y TRIGO
CENTRE INTERNATIONAL POUR L'AMELIORATION DU MAIS ET DU BLE
MEXIQUE**

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION	1
METHODES	2
Préparation de l'échantillon pour faire l'analyse de l'endosperme	2
Détermination de la protéine	3
Détermination du tryptophane	12
Détermination de la lysine	13
DISCUSSION	15
BIBLIOGRAPHIE	15

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient le Programme des Nations Unies pour le Développement (Fond Spécial), pour avoir appuyé le programme des recherches sur les protéines de CIMMYT en l'incorporant au Projet de Recherche Globale No. 1, et US AID, pour avoir financé les investigations coopératives sur la protéine faites dans le Département de Biochimie de l'Université de Purdue, comme faisant partie du contrat AID/ csd-2809 avec l'Université de Purdue.

MÉTHODES CHIMIQUES EMPLOYÉES PAR CIMMYT DANS LA DÉTERMINATION ET L'ÉVALUATION DE LA QUALITÉ DE LA PROTÉINE DU MAÏS

Evangelina Villegas * et Edwin T. Mertz **

INTRODUCTION

En 1964, Mertz, Bates et Nelson (1) découvrirent que le gène mutant opaque-2 du maïs modifie l'équilibre des acides aminés qui constituent la protéine de l'endosperme en augmentant les quantités de lysine et de tryptophane. Cette découverte ouvrit de nouveaux horizons pour les généticiens et pour les chercheurs qui étudient le problème de la nutrition humaine et animale.

Des épreuves d'alimentation avec des régimes seulement à base de maïs opaque-2 ou farineux-2, un autre mutant avec un contenu élevé de lysine découvert postérieurement, ont confirmé que tant les animaux comme les humains, en particulier les jeunes, augmentent de poids beaucoup plus vite que s'ils n'étaient nourris par un régime à base de maïs ordinaire. La portée de cette découverte se manifesta tout de suite pour beaucoup d'hommes de science, de sorte que le mécanisme biochimique, physiologique et génétique des mutations des acides aminés du maïs devint le sujet d'une étude détaillée.

La découverte des mutations du maïs qui ont un contenu élevé de lysine offre la possibilité d'incorporer cette protéine de haute qualité dans des lignées agronomiquement supérieures qui peuvent être adaptées à la structure agricole traditionnelle dans de vastes régions du monde.

Les noms descriptifs "opaque" et "farineux" font allusion à l'apparence matte, sans éclat et crayeuse des grains; apparence, par laquelle ces mutations étaient isolées et identifiées originellement. Ces caractéristiques représentent un obstacle à l'acceptation de ces grains par les agriculteurs habitués à la culture des grains du genre cristallin et denté dont l'apparence est propre brillante et lustrée. Par contre, aux endroits où traditionnellement se cultivent ces grains du genre farineux — par exemple, les hautes

* Chef du Laboratoire de la Qualité de la Protéine, CIMMYT, Mexique.

** Professeur dans le Département de Biochimie, Université de Purdue, Lafayette, Indiana, E. U. A.

terres et vallées de la région andine d'Amérique du Sud— le problème de l'acceptation ne se pose pas: cependant ce genre farineux ne se cultive dans la plupart des régions du monde réservées à la culture du maïs, ni pour la consommation humaine ni pour la consommation animale.

Les lignées ayant un contenu élevé de lysine dans les populations de maïs peuvent s'identifier par une analyse chimique approfondie. Depuis peu le processus d'identification se faisait encore le plus souvent soit en choisissant les grains opaques —ce qui, malheureusement, élimine toute occasion d'améliorer la qualité du grain— soit par l'analyse chimique de petits échantillons de masse. Procédé qui tend à ignorer l'utilité de la variabilité génétique contenant la combinaison désirable.

Dans les dernières années, plusieurs méthodes chimiques ont été recommandées, mais quelques unes sont compliquées et laborieuses, donc non adaptées à l'évaluation et à la séparation des grandes populations de maïs, tandis que d'autres méthodes ne montrent pas, en réalité, les niveaux des acides aminés; ceci a lieu, par exemple, dans une population ségrégative d'opaque-2 dans laquelle agissent certains gènes modifiants.

Dans l'effort d'offrir des techniques simples et appropriées pour l'évaluation et pour la séparation d'un grand nombre de petits échantillons, différentes méthodes analytiques couramment employées pour déterminer les niveaux de lysine et de tryptophane ont été étudiées et re-évaluées au Laboratoire de la Qualité de la Protéine du Centre International pour l'Amélioration du Maïs et du Blé (CIMMYT), et au Laboratoire de Biochimie de l'Université de Purdue. A la suite de cette re-évaluation, les recommandations énoncées ci-après peuvent s'employer pour faire une analyse routinière des populations et des matériels de ségrégation qui sont produits par les programmes qui visent à améliorer la culture du maïs.

MÉTHODES *

1. Préparation de l'échantillon pour l'analyse de l'endosperme

Pour identifier rapidement les matériels contenant une protéine de meilleure qualité, il est conseillé de faire l'analyse sur l'endosperme de l'échantillon. L'endosperme du maïs est déficient en lysine et en tryptophane, tandis que l'embryon a une composition relativement constante et bien équilibrée des acides aminés; composition qui est indépendante de la généalogie génétique de l'échantillon. En même temps, en analysant le grain dans sa totalité, le péricarpe peut donner des pigments peu désirables qui gênent les déterminations colorimétriques. Si l'analyse du grain, prise dans sa totalité, est donc souhaitable, il faudra prendre tous ces éléments en considération.

* Le laboratoire de la Qualité de la Protéine du CIMMYT peut fournir, sur demande, la liste de l'installation nécessaire pour effectuer ces épreuves.

a) **Évaluation des familles génétiques**

(i) Prendre au hasard un échantillon de 10 graines comme représentatives de chaque épi.

(ii) Enlever tout vestige de pesticide avec de l'eau distillée au cas où les graines ont été traitées; autrement, éliminer cette démarche.

(iii) Tremper les graines dans de l'eau distillée pendant a peu près 30 minutes. Eplucher le péricarpe et enlever le germe avec des pinces et un bistouri. Ce qui reste de la graine est considéré comme tissu de l'endosperme. Laisser sécher à l'air l'endosperme jusqu'au lendemain.

(iv) Faire moudre cet endosperme sec dans un petit moulin à cylindre au degré le plus fin du moulin.

(v) Faire dégraisser l'échantillon moulu avec de l'hexane dans un extracteur continu du type Soxhlet pendant 6 heures.

(vi) Faire sécher à l'air ces échantillons et les pulvériser finement avec un amalgameur Wig-L-Bug.

b) **Comment faire l'analyse d'un seul grain**

Dans certains cas, où, par exemple, une famille de maïs à l'endosperme dur, (genre normal) est identifiée comme possédant des niveaux élevés de tryptophane dans la protéine, il est recommandé de faire une analyse de chaque grain dans un autre sous-échantillon afin d'identifier la possibilité de ségrégation à l'intérieur d'une famille. Au cas où la ségrégation existe, identifier les grains ayant les plus hautes concentrations de tryptophane. Le ~~procédé suivant~~ ne détruit pas l'embryon du grain analysé et, il permet ainsi la germination et le développement des grains sélectionnés comme ayant la plus haute concentration de tryptophane dans le but de continuer les analyses génétiques. Ce procédé a été initié par Bates à CIMMYT, au Laboratoire de la Qualité des Protéines.

(i) Prendre au hasard 5 ou 6 graines de chaque famille; les laver pour enlever le pesticide et les faire sécher à l'air.

(ii) Une petite portion de l'endosperme est perforée aux différents endroits de la graine au moyen d'une drille électrique qui emploie une mèche de 1.59 mm. (1/16 inch).

(iii) Dégraisser l'échantillon dans un Soxhlet avec de l'hexane.

(iv) Faire sécher à l'air l'échantillon, le moudre, et le réduire à une très fine poudre dans un amalgameur Wing-Bug.

2. **Détermination de la Protéine**

Le contenu de nitrogène peut se calculer par le procédé du Micro-Kjeldahl (2) et le pourcentage de la protéine peut se calculer en employant le coefficient 6.25.

a) **Réactifs**

(i) Acide sulfurique concentré (38 %); (d = 1.84) sans nitrogène.

(ii) Mélange d'agents catalytiques: 99.0 g de K_2SO_4 ; 4.1 g de HgO et 0.8 g de $Cu SO_4$.

(iii) Solution d'hydroxyde de sodium - thiosulfate de sodium. Faire dissoudre 50 g de $NaOH$ et 5 g de $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ dans de l'eau distillée et diluer jusqu'à obtenir 100 ml.

(iv) Solution d'acide borique au 4 %.

(v) Solution "indicatrice" de rouge de méthyle dans le vert de bromocresol. Mélanger 5 parties de solution d'éthanol de bromocresol vert au 0.2% avec une partie de solution d'éthanol de rouge de méthyle au 2%.

(vi) Solution d'acide chlorhydrique - 0.02N.

b) **Procédé.**

(i) Mettre entre 30-40 mg de l'échantillon dans une fiole de digestion. Ajouter 1.0 g du mélange d'agent catalytique et 2 ml de l'acide sulfurique concentré.

(ii) Faire digérer pendant 40 minutes et laisser refroidir; ajouter la quantité d'eau minimum nécessaire pour dissoudre les éléments solides formés, laisser refroidir et enduire le bord de la fiole avec une petite quantité de vaseline.

(iii) Transférer cette solution digérée à l'appareil de distillation et rincer la fiole 5 à 6 fois avec 1-2 ml d'eau distillée.

(iv) Mettre dans une fiole Erlenmeyer de 125 ml, 6 ml d'une solution d'acide borique et 3 gouttes de solution d'indicateur coloré tournesol (Litmus); mettre ceci sous un condensateur dont la pointe restera sous la surface de la solution.

(v) Ajouter 8ml, d'une solution d'hydroxyde de sodium - sodium thiosulfate, et commencer la distillation jusqu'à obtenir 20 ml du distillat.

(vi) Titrer la solution jusqu'à obtenir la couleur grise ou la première manifestation de la couleur violette.

(vii) Faire une détermination à blanc pour vérifier en employant les mêmes quantités de réactifs et le même procédé de digestion et distillation.

(viii) Calculer le pourcentage de nitrogène.

$$\% \text{ nitrogène} = \frac{(\text{ml HCl dans determ.} - \text{ml blanc}) \times \text{normalité} \times 14.007 \times 100}{\text{mg d'échantillon}}$$

$$\% \text{ protéine} = \% \text{ de nitrogène} \times 6.25$$

De chaque épi prenez au hasard un échantillon de 10 graines à fin d'évaluer la famille génétique.

A





Au-dessus: Pour obtenir un échantillon de l'endosperme, il faut éplucher les graines et enlever le germe.



Au-dessous: Pour faire l'analyse d'une seule graine, l'endosperme est perforé aux différents endroits avec une drille. L'endosperme ainsi obtenu est celui qui est analysé.



Au-dessus: Les échantillons sont dégraissés dans un extracteur Soxhlet avec de hexane.

Au-dessous: Faire moudre les échantillons et les réduire à une très fine poudre dans un amalgameur Wig-L-Bug.







Au-dessus à gauche: Digestion Micro-Kjeldahl pour déterminer le contenu de nitrogène.

Centre: Distillation de nitrogène pour calculer la quantité de protéine.

Droite: Pour faire l'hydrolyse de la protéine on y ajoute une solution de papaïne.

Au-dessous à gauche: Pipetter une aliquote de l'hydrolyse pour faire l'évaluation colorimétrique du tryptophane.





Au-dessus à gauche: Agiter vigoureusement les complexes de cuivre des acides aminés dans la détermination colorimétrique de la lysine.

Au-dessous à gauche: L'excès du réactif employé dans la détermination colorimétrique de la lysine s'extrait dans la phase de l'acétate d'éthyle au moyen d'une seringue à laquelle on a adapté un tuyau de polyéthylène.

Au-dessus: En faisant la détermination de lysine ou de tryptophane l'absorption se lit dans un Spectronic 20.

3. Détermination du tryptophane

A cause du rapport observé par Hernandez et Bates (3) entre le tryptophane et la lysine dans la protéine de l'endosperme du maïs (environ 1 à 4), le tryptophane peut s'employer comme un seul paramètre dans l'évaluation de la qualité du maïs.

La détermination du tryptophane par la méthode colorimétrique Opienska-Blauth et modifiée par Hernandez et Bates (3), est recommandée à cause de sa simplicité. Avec cette méthode, on arrive à analyser par jour jusqu'à 75 échantillons en double exemplaire.

a) Réactifs

(i) Dissoudre 270 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dans 0.5 ml d'eau distillée et le diluer avec 1 litre d'acide acétique glacial. (Réactif A.)

(ii) Solution de H_2SO_4 30N (acide sulfurique) (Réactif B).

(iii) Mélanger les réactifs A et B (1:1 v/v), 1 à 2 heures avant d'être utilisés. (Réactif C).

(iv) Solution de Papaine.² Dissoudre l'enzyme (4 mg/ml) dans une solution tampon d'acetate de sodium, 0.1N, pH = 7.0. Cette solution de papaine doit être préparée avant son utilisation.

b) Procédé

(i) Peser entre 90 à 100 mg de l'échantillon moulu finement et dégraissé de l'endosperme du maïs; mettre ceci dans une éprouvette et ajouter —4 ml de solution de papaine. Fermer les éprouvettes et les agiter— avec soin, en s'assurant que l'échantillon soit totalement, mouillé, en même temps, une éprouvette à blanc contenant uniquement de la papaine est utilisée.

(ii) Garder les échantillons jusqu'au lendemain dans une couveuse artificielle à 65° C.

(iii) Enlever les hydrolysés de la couveuse artificielle, les agiter et les laisser refroidir à une température ambiante, après quoi le surnageant doit être clair. (Au cas où le surnageant n'est pas clair, faire centrifuger les échantillons).

(iv) Pipetter un ml de hydrolysé dans une éprouvette qui contient 4 ml du réactif C; le mélange est agité vigoureusement, et la couleur est développée pendant 15 minutes à une température de 65° C.

(v) Laisser refroidir ces solutions colorées et les transférer dans des pipettes jaugées. Les lectures pourront se faire dans un photocolorimètre Bausch & Lomb Spectronic 20 à une longueur d'onde de 545 m μ .

1 Chaque bouteille d'acide acétique doit être mise à l'épreuve pour vérifier le développement de la couleur en présence du tryptophane.

2 Papaine-Tech. commerciale, Nutritional Biochemical Corp. (Cleveland, Ohio).

(vi) Préparer une courbe-étalon qui s'étend de 0 à 40 µg/ml employant le DL-tryptophane.

(vii) Le contenu de tryptophane de l'échantillon se calcule à partir de la courbe-étalon et il est rapporté à base de la protéine.

4. Détermination de la Lysine

La détermination de la lysine se fait seulement sur des matériels sélectionnés par le procédé colorimétrique ayant une haute concentration de tryptophane, ou quand on cherche à connaître le niveau de lysine en plus de celui du tryptophane.

La méthode colorimétrique développée par Tsai (Purdue University) et modifiée par Villegas (CIMMYT) est recommandée. Avec cette méthode jusqu'à 60 échantillons dupliqués peuvent être analysés par jour.

a) Réactifs

(i) Solution de papaïne, 4 mg de papaïne par ml de solution tampon de phosphate 0.03 M, pH 7.4.

(ii) Solution tampon de carbonate 0.05 M, avec pH 9.0.

(iii) Solution tampon de borate 0.05 M, avec pH 9.0.

(iv) Suspension de phosphate de cuivre. Solution A: Dissoudre 2.8 g de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 100 ml d'eau distillée. Solution B: Dissoudre 13.6 g de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dans 200 ml d'eau distillée. Mélanger A et B en les agitant, les faire centrifuger à 2000 r.p.m. pendant 5 minutes et rejeter la liqueur surnageante. Le précipité est alors remis en suspension 3 fois dans 15 ml de solution tampon de borates ou pH 9; en centrifugant après chaque suspension. Après le troisième lavage, il faut remettre le précipité dans 80 ml de solution tampon de borates. Ce réactif peut s'employer seulement pendant une semaine.

(v) Solution HCl, 1.2N.

(vi) Mélange d'acides aminés.

Cystine	20 mg	Phénylalanine	40 mg
Methionine	20 mg	Valine	40 mg
Histidine	30 mg	Arginine	50 mg
Alanine	30 mg	Sérine	50 mg
Isoleucine	30 mg	Acide Aspartique	60 mg
Threonine	30 mg	Acide Glutamique	300 mg
Tyrosine	30 mg	Leucine	80 mg
Glycine	40 mg	Proline	80 mg

Peser 100 mg du mélange d'acides aminés et les faire diluer dans 10 ml de solution tampon de carbonate.

b) Procédé

(i) Peser 100 mg de l'échantillon dégraissé et finement moulu dans une fiole et y ajouter 5 ml de solution de papaïne. S'assurer que l'échantillon soit complètement mouillé, et l'agiter, au moins, deux fois pendant la première heure de l'incubation. Préparer en même temps des épreuves a blanc avec la solution de papaïne.

(ii) Incuber jusqu'au lendemain à une température de 65°C. Enlever les hydrolysés de la cuveuse artificielle les remuer et les laisser refroidir à une température ambiante, après quoi la liqueur surnageante doit être claire, autrement, la centrifuger. (Une aliquote d'un ml de cette hydrolyse peut s'employer dans la détermination du tryptophane).

(iii) Pipetter une aliquote de 1 ml. dans une éprouvette de centrifuge et ajouter 0.5 ml de solution tampon de carbonates et 0.5 ml de la suspension de phosphate de cuivre.

(iv) Agiter le mélange pendant 5 minutes et le faire centrifuger à 2000 r.p.m.

(v) Pipetter une aliquote de 1 ml de la liqueur surnageante dans une éprouvette; ajouter 0.1 ml de solution de 2-chlore-3 5 dinitropyridine-methanole, et agiter vigoureusement.

(vi) Laisser reposer le mélange dans les éprouvettes à une température ambiante en agitant toutes les 30 minutes.

(vii) Ajouter 5 ml de HCl - 1-2 N à chaque éprouvette et agiter vigoureusement.

(viii) Ajouter 5 ml d'acetate d'éthyle. Fermer les éprouvettes; les bien mélanger en les retournant au moins 10 fois; ensuite enlever la partie supérieure à l'aide d'une seringue à laquelle on a adapté un typau de polythylène. Cette démarche doit se répéter trois fois.

(ix) Transférer la partie aqueuse dans des éprouvettes jaugées et lire dans le photocolorimètre "Spectronic 20" à une longueur d'onde de 390 μm contre l'épreuve en blanc.

(x) Calculer la quantité de lysine des échantillons par comparaison avec une courbe étalon et rapporter les résultats à base de la protéine.

c) La Courbe Etalon

Préparer une courbe étalon qui s'étend de 0 à 200 μg de lysine par ml. Solution stock de lysine: Peser 62.5 mg de lysine-monohydrochlorydrique dans 20 ml de solution tampon de carbonate (12,500 μg lysine/ml).

Diluer avec la solution tampon de carbonate la solution stock de lysine jusqu'à atteindre les concentrations suivantes de lysine: 0, 250, 500, 750 et 1000 μg ml.

De chacune de ces solutions prendre 1 ml et ajouter 4 ml de solution de papaïne. (5 mg de papaïne/ml de solution tampon de phosphate).

Pipetter 1 ml de chaque solution dans une éprouvette centrifuge; y ajouter 0.5 ml du mélange d'acide aminé et 0.5 ml de la suspension de phosphate de cuivre.

Continuer avec le procédé décrit à partir du numéro (iv) de la partie b.

DISCUSSION

En moyenne, les analyses de l'endosperme donnent les suivantes valeurs colorimétriques du:

(a) maïs normal, environ 0.45 g de tryptophane et 1.8 g de lysine pour 100 g de protéine (avec approximativement 9% de protéine dans l'échantillon), et

(b) maïs opaque-2 environ 0.85 g de tryptophane et 3.6 g de lysine pour 100 g de protéine (avec approximativement 8% de protéine dans l'échantillon).

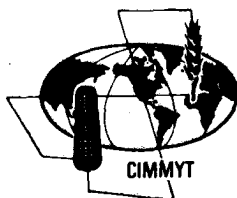
Les valeurs notées ci-dessus peuvent varier soit selon le contenu génétique de l'échantillon soit selon le contenu de protéine de l'échantillon. Des valeurs intermédiaires de tryptophane et de lysine dans la protéine peuvent se trouver dans des matériels avec le gène farineux-2 ou dans quelques échantillons dont l'endosperme est dur. L'emploi des méthodes analytiques, déjà mentionnées pour évaluer et séparer de grandes quantités d'échantillons de maïs, permet de coordonner le travail du laboratoire avec celui des généticiens. Puisque les résultats du laboratoire doivent être employés par les phytogénéticiens et les généticiens pour sélectionner le germoplasme dans le but de continuer les programmes pour améliorer la culture du maïs. Les résultats de ces analyses doivent être connus au temps opportun.

Actuellement ces méthodes sont employées à grande échelle par le programme de maïs de CIMMYT.

BIBLIOGRAPHIE

1. Mertz, E. T., Bates, L. S., and Nelson O. E., Mutant Gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science* 145:279-280. (1964).
2. A. O. A. C. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 10th Ed. 744-745 (1965).
3. Hernández H. and Bates L. S., Modified method for rapid tryptophan analysis of maize. *Research Bull. No. 13, CIMMYT*, (1969).

Traduit par: Marta R. Gucovsky



**CENTRO INTERNACIONAL DE MEJORAMIENTO DE
MAIZ Y TRIGO**

**CENTRE INTERNATIONAL POUR L'AMELIORATION
DU MAIS ET DU BLE**

londres 40, Mexico 6, D. F., mexique

