

# SỰ BIẾN ĐỔI HOẠT ĐỘ ENZIM PROTEASE, LIPASE VÀ AMYLASE CỦA HẠT ĐẬU TƯƠNG NÀY MẦM TRONG ĐIỀU KIỆN THIẾU NƯỚC

ĐINH THỊ VĨNH HÀ, NGUYỄN VĂN MÃ

## 1. MỞ ĐẦU

Cây đậu tương (*Glycine max* (L.) Merr.) là một trong những cây lương thực, cây lấy dầu quan trọng. Với hàm lượng protein, lipit cao: protein chiếm đến trên 40%, lipit chiếm đến trên 20% [3], cây đậu tương là cây chiến lược giải quyết nạn đói protein và đảm bảo an ninh lương thực ở các nước đang phát triển, nhất là trong giai đoạn hiện nay, vấn đề khủng hoảng lương thực đang diễn ra rất nghiêm trọng trên toàn cầu.

Quá trình nảy mầm của hạt đậu tương là một giai đoạn quan trọng trong chu trình sống của thực vật để đảm bảo duy trì sự sống và tạo cơ sở ban đầu cho một cơ thể mới. Trong quá trình này, tế bào hút nước rất mạnh, một loạt các enzym được hoạt hoá, tổng hợp ADN và các chất mới trên cơ sở phân giải các chất dự trữ protein, lipit, hydratcacbon... Vì vậy, ở thời kì này, các enzym phân giải có vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi chất giúp cho hạt chuyển từ trạng thái ngủ nghỉ sang trạng thái mới. Sự chuyển trạng thái này của hạt phụ thuộc vào tương quan giữa hai tính chất sinh lí là lực hút nước mạnh của hạt nảy mầm và khả năng chịu hạn của chúng. Nghiên cứu biến đổi hoạt độ một số enzym ở hạt nảy mầm trong điều kiện thiếu nước có thể tìm hiểu rõ hơn bản chất sinh lí của quá trình này và do đó có tầm quan trọng đặc biệt cả về mặt lí luận và thực tiễn.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tìm hiểu sự biến đổi hoạt độ của các enzym protease, lipase, amylase trong hạt đậu tương khi cho nảy mầm trong dung dịch sucrose (là điều kiện thiếu nước), so sánh với đối chứng là cho hạt nảy mầm trong nước cất (là điều kiện đủ nước).

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên liệu

Các giống đậu tương được sử dụng trong nghiên cứu là: DT 84, DT 96, DT 2001, DT 2002 do Trung tâm Tư vấn và Chuyển giao Tiên bộ kĩ thuật - Viện Di truyền Nông nghiệp Việt Nam cung cấp.

### 2.2. Phương pháp

Bố trí thí nghiệm trong dung dịch đường dựa theo phương pháp của Volcova [9] và cải tiến của Nguyễn Huy Hoàng [2]. Gieo hạt đậu tương vào các khay thí nghiệm trong dung dịch sucrose nồng độ 10,8%; tương đương áp suất 9 atm (điều kiện thiếu nước) và trong nước cất (điều kiện đủ nước). Xác định các chỉ tiêu nghiên cứu vào ngày thứ 1, 3, 5 và 7 sau khi gieo.

Hoạt độ enzym amylase xác định theo phương pháp Rukhliadeva Geriacheva [4].

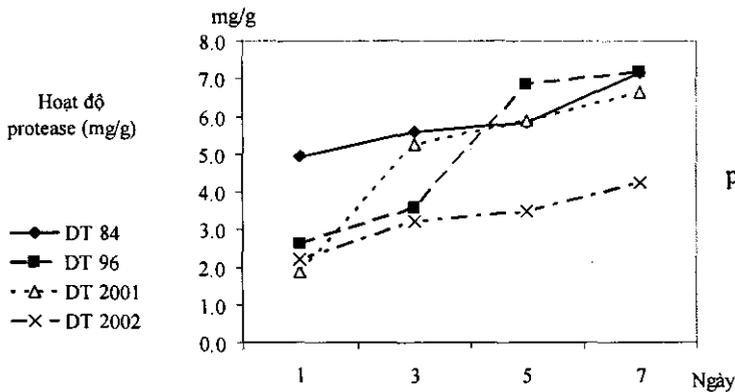
Hoạt độ enzym protease được xác định theo phương pháp chuẩn độ foomaldehyt [1].

Hoạt độ enzym lipase xác định theo Phạm Thị Trân Châu [1].

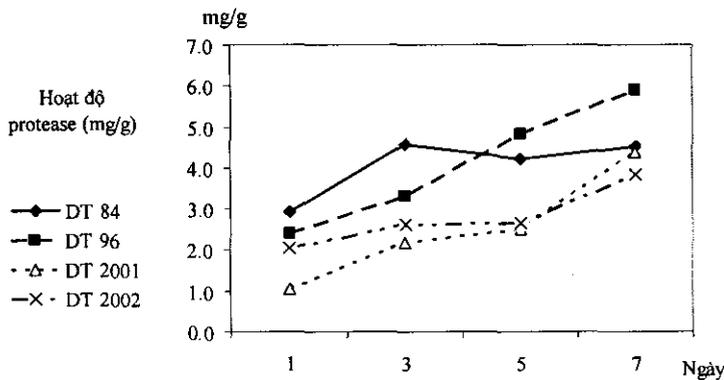
### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Sự biến đổi của enzym protease trong điều kiện thiếu nước

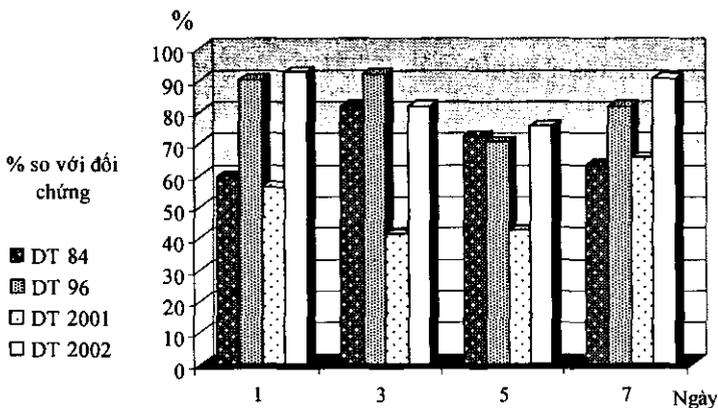
Trong hạt đậu tương nảy mầm, protease phân giải protein dự trữ thành các sản phẩm có khối lượng phân tử nhỏ như axit amin, chuỗi polipeptit, đây là nguyên liệu khởi đầu tổng hợp nên các protein cấu trúc và các loại protein chức năng khác.



Hình 1.1. Sự biến đổi hoạt độ protease ở hạt đậu tương nảy mầm trong điều kiện đủ nước



Hình 1.2. Sự biến đổi hoạt độ protease ở hạt đậu tương nảy mầm trong điều kiện thiếu nước



Hình 1.3. Sự giảm hoạt độ protease ở các giống đậu tương trong điều kiện thiếu nước

Kết quả nghiên cứu về hoạt độ protease được trình bày trong hình 1.1, 1.2 và 1.3. Hoạt độ enzym protease tăng dần từ ngày 1 đến ngày thứ 7 sau khi gieo ở cả lô thí nghiệm và lô đối chứng. Hàm lượng protein ở hạt đậu tương cao, do đó, trong quá trình nảy mầm sự phân giải protein dự trữ diễn ra rất mạnh ngay ở pha thấm nước. Hoạt độ protease tăng cao trong quá trình nảy mầm đồng thời với lượng protein dự trữ được phân giải ngày càng nhiều, cung cấp nguyên liệu sơ cấp và năng lượng cho mầm đậu tương tổng hợp các vật chất mới. Kết quả này cũng khẳng định chiều hướng biến đổi hoạt độ enzym protease trong những nghiên cứu của Trần Thị Phương Liên, hoạt độ enzym protease trong hạt nảy mầm đạt đỉnh cao vào ngày nảy mầm thứ 6 đến thứ 8 [3].

Trong điều kiện đủ nước hoạt độ protease của các giống đậu tương biến đổi khác nhau ở ngày 1, 3 và 5; khác nhau không đáng kể ở ngày 7 (trừ DT 2002). Hình 1.1 cho thấy hoạt độ của protease ở DT 84 rất cao ngay sau khi gieo, đây là điều kiện thuận lợi thúc đẩy sự phân giải protein diễn ra nhanh chóng, cung cấp nguyên liệu sơ cấp và năng lượng cho hạt nảy mầm. DT 96 có hoạt độ enzym cao ở ngày 5 và 7, sự biến đổi mạnh mẽ nhận thấy ở ngày thứ 5 sau khi gieo. Hoạt độ enzym này ở giống DT 2001 tăng mạnh từ ngày thứ 3, trong khi đó tăng ít ở DT 2002.

Khi thiếu nước, hoạt độ protease có sự biến đổi khác so với đối chứng. Đường cong biến đổi hoạt độ protease trong hình 1.2 cho thấy, DT 84 có hoạt độ cao ở ngay những ngày đầu, đạt cực đại vào ngày thứ 3, giảm xuống không đáng kể vào ngày 5 và tăng lên vào ngày 7. DT 2001 có hoạt độ protease thấp nhất trong các giống đậu tương thí nghiệm ở ngày 1, 3 và 5 trong khi DT 96 tăng lên nhiều trong điều kiện thiếu nước và đạt kết quả cao ở ngày 7.

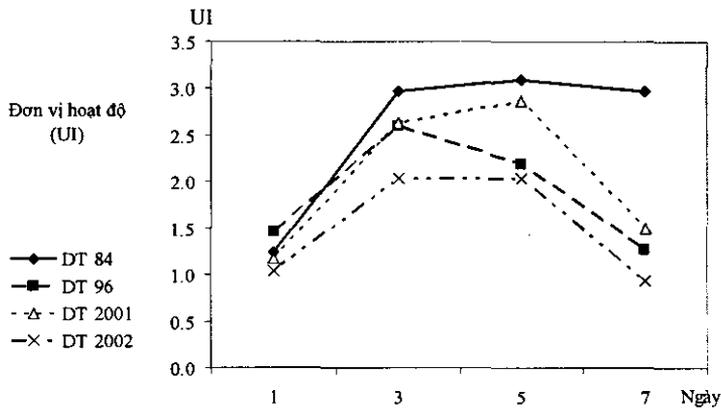
Điều kiện thiếu nước làm giảm hoạt độ protease và đạt từ 41 đến 92% so với đối chứng (hình 1.3). Môi trường áp suất thẩm thấu cao làm giảm hàm lượng nước tự do bao quanh gốc mang điện của protein enzym trong tế bào chất của mầm đậu tương dẫn đến giảm hoạt độ của protease. Ở đa số các giống đậu tương sự chênh lệch giữa đối chứng và thí nghiệm nhiều nhất ở ngày 5. Các giống đậu tương khác nhau có sự chênh lệch hoạt độ enzym giữa đối chứng và thí nghiệm khác nhau. Khi thiếu nước hoạt độ enzym của giống DT 2001 giảm xuống nhiều nhất, của giống DT 2002 giảm xuống ít nhất ở hầu hết các ngày thí nghiệm. Sự khác nhau về hoạt độ enzym giữa các giống đậu tương và giữa các ngày thí nghiệm là do sự đa dạng về protein và isozyme của các protease ở các giống đậu tương [3].

### 3.2. Sự biến đổi của enzym lipase trong điều kiện thiếu nước

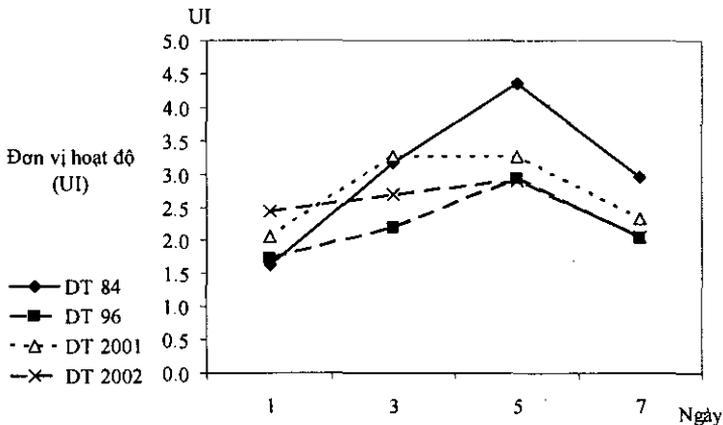
Hạt đậu tương chứa trên 20% lipit, bởi vậy không chỉ là cây cung cấp protein, đậu tương còn là cây lấy dầu quan trọng. Trong hạt chứa dầu, lipit dự trữ và triaxyl – glixerol được lưu giữ trong các cấu trúc chuyên hoá. Khi hạt nảy mầm, các chất này thường được phân giải theo con đường  $\beta$  – oxi hoá và đi vào con đường glioxilic, sản phẩm của quá trình này đi vào phần bào tan để tổng hợp và tích lũy các chất mới.

Hình 2.1 cho thấy, khi đủ nước hoạt độ lipase tăng dần từ ngày 1 đạt đỉnh cao ở ngày 3 (DT 96 và DT 2002 đạt cực đại ở ngày 3 và giữ ổn định đến ngày 5 hoặc đạt cực đại ở ngày 5 (DT 84 và DT 2001) và đều giảm xuống ở ngày 7 sau khi gieo. Yon-Hui Lin và cộng sự khi nghiên cứu về sự phân giải lipit trong hạt đậu tương nảy mầm đã khẳng định hoạt độ lipase đạt đỉnh cao từ ngày 5 đến ngày 7 sau khi gieo [8].

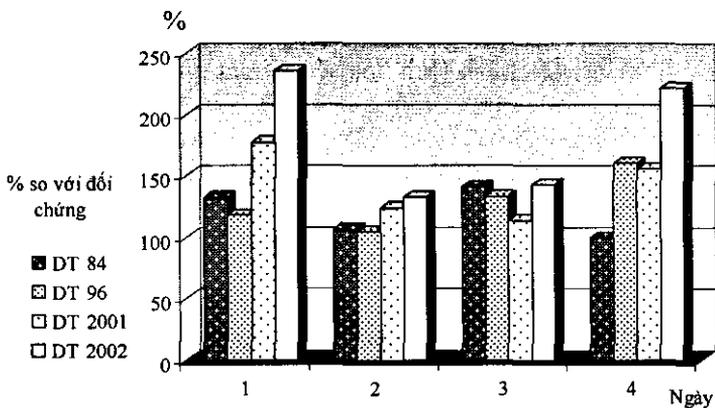
Điều kiện thiếu nước làm hoạt độ enzym đạt cực đại chậm hơn khi đủ nước ở một số giống đậu tương, kết quả ở hình 2.2 cho thấy, hoạt độ enzym tăng từ ngày 1 đạt cực đại vào ngày 5, hoạt độ lipase cao nhất ở DT 84, tiếp đó là DT 2001, thấp nhất ở DT 2002 và DT 96.



Hình 2.1. Sự biến đổi hoạt độ lipase ở hạt đậu tương này mầm trong điều kiện đủ nước



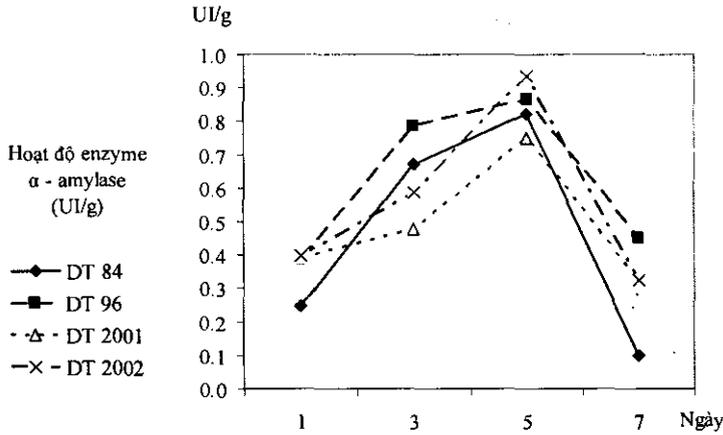
Hình 2.2. Sự biến đổi hoạt độ lipase ở hạt đậu tương này mầm trong điều kiện thiếu nước



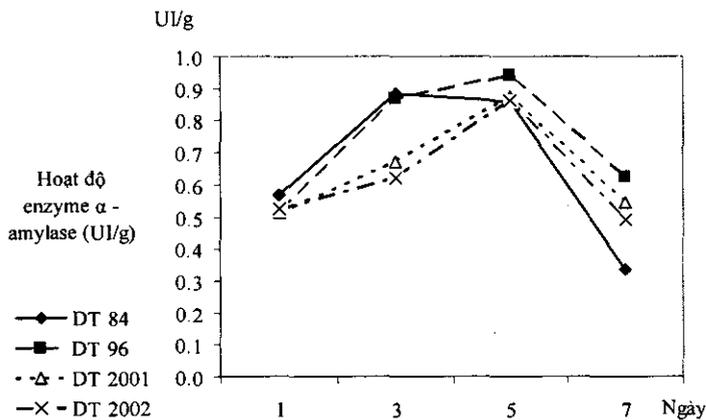
Hình 2.3. Ảnh hưởng của điều kiện thiếu nước đến hoạt độ lipase trong hạt đậu tương này mầm

Khi thiếu nước hoạt độ enzym lipase tăng cao hơn khi đủ nước, hoạt độ enzym của hạt đậu tương này mầm trong lô thí nghiệm cao hơn và đạt từ 100 – 235% so với lô đối chứng. Qua các ngày thí nghiệm, hoạt độ enzym tăng nhiều nhất ở giống DT 2002, tăng ít nhất ở DT 96 (ngày 1, 3); DT 2001 (ngày 5) và DT 84 (ngày 7). Hayat El Maarouf và cộng sự khi nghiên cứu về hoạt tính và biểu hiện gen trong điều kiện thiếu nước của enzym phospholipase D ở hạt đậu dũa này mầm đã khẳng định: hoạt tính enzym phospholipase D tăng lên khi gặp hạn, sự tăng nhiều hơn ở giống nhạy cảm với nước, và tăng ít ở giống chịu hạn. Sự tăng hoạt độ của lipase được điều chỉnh ở mức phiên mã của gen quy định mã hoá enzyme, sự biểu hiện gen mạnh hơn được điều chỉnh ở mức độ hạn trung bình ở giống chịu hạn kém, ngược lại giống có khả năng chịu hạn thể hiện sự kiên định của gen trong điều kiện thiếu nước [7].

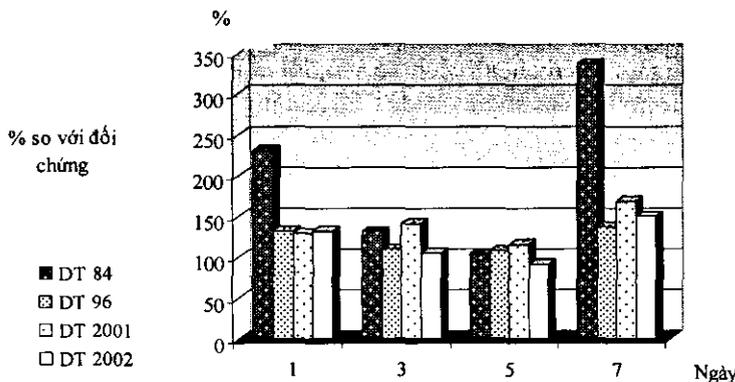
Nghiên cứu của Bastiaan và cộng sự cho biết các lipase ở thực vật có nhiều loại và không đồng nhất, sự khác nhau giữa các đồng phân có liên quan đến các phản ứng chống chịu riêng biệt. Phospholipase D và sản phẩm của nó, phosphatidic acid, có ý nghĩa trong sự truyền tín hiệu khi cây bị stress và ảnh hưởng đến tính chất của lipid màng. Khi gặp hạn, hoạt tính của enzym lipase trong lá đậu tương tăng lên gấp 2 lần trong 4 ngày đầu của hạn và quay lại trạng thái như đối chứng sau 3 ngày tưới nước trở lại [6].



Hình 3.1. Sự biến đổi hoạt độ amylase ở hạt đậu tương nảy mầm trong điều kiện đủ nước



Hình 3.2. Sự biến đổi hoạt độ amylase hạt đậu tương nảy mầm trong điều kiện thiếu nước



Hình 3.3. Ảnh hưởng của điều kiện thiếu nước đến hoạt độ enzym amylase ở hạt đậu tương nảy mầm

### 3.3. Sự biến đổi của enzym $\alpha$ - amylase trong điều kiện thiếu nước

Amylase thuộc nhóm enzym hydrolase xúc tác cho các phản ứng thủy phân các loại cơ chất: tinh bột, glycogen, polysacarit khác. Amylase được biết đến có 3 loại:  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase và glucoamylase. Trong quá trình động viên chất dự trữ ở hạt nảy mầm, tinh bột thường được sử dụng để phân giải thành nguyên liệu đồng hoá sơ cấp và cung cấp năng lượng. Enzim chủ yếu xúc tác chuyển hóa tinh bột thành đường cung cấp cho quá trình hô hấp và sinh trưởng của cây mầm khi chưa có lá và rễ hoàn thiện là  $\alpha$ -amylase. Ở đậu tương, amylase hoạt động rất mạnh ngay ở giai đoạn hình thành hạt [3] cấu trúc của các  $\alpha$ -amylase ở đậu tương cũng rất khác nhau [5].

Hình 3.1 trình bày sự biến đổi hoạt độ  $\alpha$ - amylase trong giai đoạn nảy mầm của đậu tương. Hoạt độ  $\alpha$  - amylase tăng dần từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 5 và giảm xuống ở ngày thứ 7 sau khi gieo. Ngày 1 hoạt độ  $\alpha$ - amylase của DT 84 thấp so với các giống khác, ngày 3 và ngày 5 hoạt độ  $\alpha$ - amylase của các giống đậu tương khác nhau rõ rệt. Sự giảm hoạt độ  $\alpha$ - amylase ở ngày 7 diễn ra rất rõ thể hiện bằng độ dốc trên hình biểu diễn. Dưới tác động của các phytohormon (đặc biệt là gibberellin) sự tổng hợp  $\alpha$ -amylase được kích thích mạnh theo con đường phụ thuộc  $\text{Ca}^{2+}$  và không phụ thuộc  $\text{Ca}^{2+}$ . Trong hạt đậu tương hydrata carbon được tích lũy chủ yếu là nhóm oligosacarit raffinosa, nhóm này đóng vai trò quan trọng để bảo vệ các cấu trúc tế bào. Khi nảy mầm sự phân giải chất dự trữ trong hạt tăng dần, từ khi bắt đầu sự hút nước mạnh của hạt, đến khi các chất dự trữ được động viên tối đa là cơ sở xây dựng các thành phần của cơ quan đang lớn. Sau đó quá trình này giảm dần cùng với sự giảm lượng chất dự trữ trong hạt, mầm non bớt dần sự lệ thuộc vào lượng chất dự trữ để bắt đầu cuộc sống tự dưỡng [3].

Môi trường áp suất thẩm thấu cao ảnh hưởng khác nhau đến sự biến đổi hoạt độ enzym này ở các giống đậu tương. Hình 3.2 cho thấy: khi gặp hạn hoạt độ  $\alpha$ - amylase của DT 84 cao hơn các giống khác ngay ở thời điểm 1 ngày sau khi gieo, mặc dù khi đủ nước, hoạt độ của enzym  $\alpha$ -amylase của giống này thấp hơn các giống khác. Có thể DT 84 khả năng thích ứng cao với điều kiện hạn và có các phản ứng hoá sinh thuận lợi cho tế bào chất tăng áp suất thẩm thấu nhanh chóng.

Khi thiếu nước hoạt độ của  $\alpha$ - amylase trong mầm đậu tương sớm đạt được giá trị cao hơn khi đủ nước, DT 84 đạt cực đại ngay ở ngày 3. Sự phân giải tinh bột thành các monosacarit và các dạng đường tan làm tăng áp suất thẩm thấu trong tế bào chất, giúp cho hạt lấy được nước từ môi trường có áp suất thẩm thấu cao.

Điều kiện thiếu nước làm tăng hoạt độ  $\alpha$ - amylase trong mầm đậu tương từ 105% đến 336% so với đối chứng (hình 3.3). Trong lô thí nghiệm, hoạt độ là  $\alpha$ - amylase của DT 84 tăng ngay ở ngày 1 và giảm xuống chậm ở ngày 7 nên chênh lệch so với đối chứng tăng cao hơn rất nhiều so với các giống khác (336%). Trong khi chỉ số này ở DT 2002 tăng chậm hơn, sự chênh lệch so với đối chứng thấp hơn rất nhiều so với DT 84. Sự biến đổi của hoạt độ  $\alpha$ - amylase ở DT 2001 cũng tương tự với sự biến đổi của DT 84.

### 3.4. Tỷ lệ nảy mầm của đậu tương trong điều kiện thiếu nước

Quá trình nảy mầm của hạt đậu tương bắt đầu bằng sự hút nước và trương nước của hạt, lượng nước tối thích cho sự nảy mầm bằng 50 – 60% khối lượng của hạt. Khi gieo hạt trong điều kiện áp suất thẩm thấu cao, những hạt nảy mầm được là do chúng có sức hút nước lớn hơn sức hút của môi trường. Những giống đậu tương có tỷ lệ nảy mầm cao trong môi trường thiếu nước là những giống có những biến đổi hoá sinh thuận lợi hơn cho việc tăng áp suất thẩm thấu trong tế bào chất, nên chỉ tiêu tỷ lệ nảy mầm phản ảnh khả năng chịu hạn của cây.

Bảng 1. Tỷ lệ nảy mầm của đậu tương trong dung dịch sucrose

Giống	Số hạt nảy mầm		% so với đối chứng
	Đối chứng	Thí nghiệm	
DT 84	19,33 ± 0,33 <sup>a</sup>	13,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	67,24
DT 96	19,00 ± 0,58 <sup>a</sup>	5,67 ± 0,67 <sup>b</sup>	29,82
DT 2001	19,00 ± 0,58 <sup>a</sup>	13,67 ± 0,33 <sup>a</sup>	71,93
DT 2002	18,67 ± 0,88 <sup>a</sup>	6,67 ± 0,88 <sup>b</sup>	35,71

Số liệu trong mỗi cột kèm theo các chữ cái giống nhau thể hiện sự sai khác không có ý nghĩa thống kê; các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy  $\alpha = 0,05$ .

Kết quả nghiên cứu về tỷ lệ nảy mầm được trình bày trong bảng 1, giống DT 84 và DT 2001 có tỷ lệ nảy mầm cao hơn giống DT 96 và DT 2002. Kết quả này góp phần khẳng định những biến đổi hoạt độ enzym protease, lipase và amylase của hai giống đậu tương DT 84 và DT 2001 là những phản ứng thuận lợi cho việc chống chịu với stress nước của môi trường.

#### 4. KẾT LUẬN

Hoạt độ protease trong hạt đậu tương tăng dần trong thời gian nảy mầm, cao nhất ở ngày thứ 7 sau khi gieo. Khi thiếu nước hoạt độ protease giảm so với đối chứng.

Hoạt độ lipase tăng dần từ ngày thứ 1 đến ngày thứ 5 sau khi gieo và giảm xuống ở ngày thứ 7. Trong điều kiện thiếu nước hoạt tính lipase tăng so với đối chứng, đạt đến giá trị cực đại chậm hơn và cũng giảm xuống chậm hơn ở ngày 7 so với khi đủ nước.

Enzim amylase có hoạt độ tăng dần từ ngày 1 đến ngày 5 sau khi gieo, giảm xuống ở ngày 7, hạt nảy mầm trong điều kiện áp suất thẩm thấu cao có hoạt độ enzym cao hơn hạt nảy mầm trong nước cất. Khi thiếu nước, hoạt tính amylase tăng so với đối chứng, sớm đạt được giá trị cao, song suy giảm chậm hơn ở ngày 7.

DT 84 và DT 2001 có sự biến đổi hoạt độ enzym thuận lợi cho quá trình nảy mầm và cho sự chống chịu với stress nước.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thị Hiền, Phùng Gia Tường - Thực hành hoá sinh học, Nhà xuất bản Giáo dục, Hà Nội, 1997.
2. Nguyễn Huy Hoàng, Trần Đình Long - Đánh giá khả năng chịu nóng của tập đoàn đậu tương nhập nội ở miền Bắc Việt Nam, Tạp chí Sinh học 17 (3) (1995) 45-48.
3. Trần Thị Phương Liên - Nghiên cứu đặc tính hoá sinh và sinh học phân tử của một số giống đậu tương có khả năng chịu nóng, chịu hạn ở Việt Nam, Luận án Tiến sĩ sinh học, 1999.
4. Nguyễn Văn Mùi - Thực hành hoá sinh, Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Hà Nội, 2001.

5. Akira Hirata, Motoyasu Adachi, Atsushi Sekine, You-Na Kang, Shigeru Utsumi, and Bunzo Mikami - Structural and enzymatic analysis of soybean  $\beta$  - amylase mutants with increased pH optimum, *E Journal of Biological Chemistry* **279** (8) (2004) 7287-7295.
6. Bastiaan O Bargmann and Teun Munnik - The role of phospholipase D in plant stress responses, *Plant Biology* (9) (2006) 515-522.
7. Hayat El Maarouf, et al - Enzymatic activity and gene expression under water stress of phospholipase D in two cultivars of *Vigna unguiculata* L.Walp. differing in drought tolerance, *Plant Molecular Biology* **39** (6) (1999) 1257-1265.
8. Yon-Hui Lin, et al - Involvement of glyoxysomal lipase in the hydrolysis of storage triacylglycerols in the cotyledons of soybean seedlings, *Plant Physiology* **70** (1982) 108-112.
9. Volcova A. M. - Xác định tính chịu hạn và chịu nóng tương đối của các mẫu giống ngũ cốc bằng cách gieo hạt trong dung dịch sacarose và xử lý nhiệt, Nhà xuất bản Leningrat, 1984 (tiếng Nga).

## SUMMARY

### ALTERATION OF ACTIVITY OF PROTEASE, LIPASE, AMYLASE IN SOYBEN SEED GERMINATED IN WATER DEFICIENT CONDITION

Germination is initial process in plant life cycle. The first event in the germination sequence is imbibition and biochemolysis provision in seeds. In this state, hydrolizing enzyme play an important role. In this research, soybean was hydroponically planted in distilled water and in sucrose solution at 10,8% (equivalence 9 atm). During gemination stage the activity of protease, lipase and amylase enzymes was measured at 1, 3, 5 and 7 days after planting. Protease increased gradually and reached the peak at 7 days. The increase was much higher in planted in distilled water, and enzyme activity was changed differrently between the cultivars. Lipase activity had been increased since the gemination had started to 5<sup>th</sup> day, and decreased at 7<sup>th</sup> day. The activity of lipase in plants planted in high osmatic presure (in sucrose solution) was increased more readily and higher than those in plants in distilled water. Lipase activity altered differrently between cultivars that differred in their tolerance to drought. Amylase and lipase activity had the same tendency of the change:, increased from the 1<sup>st</sup> to 5<sup>th</sup> days and decreased at 7<sup>th</sup> day. Thus, the alteration of enzyme activity was differred in planted condition and cultivars.

*Địa chỉ:*

*Nhận bài ngày 12 tháng 2 năm 2007*

Đinh Thị Vĩnh Hà,

Trường THPT Bến Tre, Phúc Yên, Vĩnh Phúc.

Nguyễn Văn Mã,

Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2.