

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG AXIT BÉO CHƯA NO TRÊN GIỐNG ĐẬU TƯƠNG CHỊU MẶN

Nguyễn Đăng Minh Chánh^{1*}

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, 3 giống đậu tương (ĐT26, DT2008 và ĐT31) có tiềm năng chịu mặn đã được trồng trong nhà lưới và xử lý mặn với nồng độ 100 mM NaCl. Mỗi giống gồm 15 chậu, mỗi chậu 3 cây. Mẫu hạt được thu hoạch và phân tích để xác định hàm lượng axit béo chưa no (axit oleic, axit linoleic và axit linolenic) bằng hệ thống sắc ký khí khối phổ GC/MS. Kết quả cho thấy cả 3 giống đều có chứa hàm lượng của 3 axit: oleic, linoleic và linolenic. Đối với giống ĐT26 hàm lượng oleic, linoleic và linolenic lần lượt là 47, 112 và 10 µg/mg. Giống DT2008 hàm lượng oleic, linoleic và linolenic lần lượt là 46, 124 và 12 µg/mg. Giống ĐT31 hàm lượng oleic, linoleic và linolenic lần lượt là 30, 72 và 7 µg/mg. Ba giống có sự khác biệt đáng kể so sánh cho mỗi thành phần axit. Giống có thành phần axit oleic cao nhất là ĐT26, sau đó đến giống DT2008 và thấp nhất là ĐT31. Thành phần axit linoleic và axit linolenic của giống cao nhất là DT2008, thấp nhất là giống ĐT31. Kết quả này cho thấy giống DT2008 và ĐT26 là 2 giống có hàm lượng axit béo chưa no cao.

Từ khóa: Axit béo, chịu mặn, đậu tương, sắc ký.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu tương (đậu nành) là cây thực phẩm và cây lấy dầu quan trọng của nhiều nước. Hạt đậu tương có chứa hàm lượng dầu béo cao hơn các loại đậu đỗ khác nên được coi là cây cung cấp dầu thực vật quan trọng. Lipit của đậu tương chứa một tỷ lệ cao các axit béo chưa no (khoảng 60 - 70%) có hệ số đồng hoá cao, mùi vị thơm, axit linoleic chiếm 52 - 65%, oleic từ 25 - 36% và axit linolenic khoảng 2 - 3% [1]. Dùng dầu đậu tương (đậu nành) thay mỡ động vật có thể tránh được xơ vữa động mạch. Dầu đậu nành chứa khoảng 23% chất béo chưa no (axit béo không bão hòa), có khả năng giảm thiểu bệnh nhồi máu cơ tim và ngăn ngừa ung thư, chống táo bón, làm chậm quá trình lão hóa và ngăn ngừa ung thư. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh axit linolenic là một axit béo omega 3 có lợi ích để tăng cường sức khỏe tim mạch bằng cách giảm chất béo trung tính (Triglyceride).

Ở Việt Nam, đất nhiễm mặn có xấp xỉ 2 triệu ha, chiếm gần 6% tổng diện tích đất tự nhiên [2]. Đất nhiễm mặn là một vấn đề mang tính toàn cầu, hiện có khoảng 1 tỷ ha đất nông nghiệp trên thế giới được coi là không trồng trọt được do nhiễm mặn. Liên Hợp Quốc ước tính, độ mặn ảnh hưởng đến cây trồng trên diện tích khoảng 80 triệu ha đất canh tác [3].... Mức

độ nhiễm mặn đã được dự báo sẽ tăng lên do vấn đề mực nước biển tăng là hậu quả của quá trình biến đổi khí hậu toàn cầu. Do vậy, phát triển cây trồng trong đó có đậu tương chịu mặn là một việc hết sức cần thiết để duy trì sự ổn định và mở rộng diện tích trồng trọt sang các vùng nhiễm mặn. Nghiên cứu mức phản ứng của đậu tương với các liều lượng xử lý mặn NaCl cho thấy năng suất giảm khi hàm lượng muối cao hơn 5 dS/m [4] tương đương với nồng độ trên 200 mM NaCl. Khi bị nhiễm mặn, có ba vấn đề chính ảnh hưởng đến cây trồng: (i) thiếu nước cho cây do thể thẩm thấu thấp ngoài môi trường xung quanh rễ; (ii) bị độc do quá nhiều ion Na⁺ và Cl⁻ xâm nhập vào trong mô rễ; (iii) mất cân bằng các nguyên tố dinh dưỡng do sự cạnh tranh của các nguyên tố dinh dưỡng với Na⁺ [5]. Do đó nghiên cứu chọn tạo ra các giống đậu tương chịu mặn và thành phần EPA, DHA và axit béo chưa no cao đang được các nhà nghiên cứu quan tâm giải quyết [6].

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Sử dụng 3 giống đậu tương có tiềm năng chịu mặn gồm: ĐT26, ĐT31 (Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm) và DT2008 (Viện Di truyền Nông nghiệp).

- Hóa chất và dung môi: chloroform, hexane, Boron trifluoride-methanol (BF₃-MeOH, axit

¹ Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm
*Email: ndmchanh75@gmail.com

tridecanoic, natri sunfat... được mua từ Hãng Merck của Đức.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Bố trí nhiệm vụ cho các giống đậu tương

Áp dụng theo phương pháp của Lee *et al.* (2008) có điều chỉnh [7]. Hạt đậu tương được gieo vào chậu cát và được cung cấp dinh dưỡng từ môi trường Hoagland. Cây vào giai đoạn V2 - V3 sau khi gieo khoảng 2 - 3 tuần (đảm bảo 3 cây/chậu), sẽ tiến hành xử lý mặn bằng tưới nước muối với nồng độ 100 mM NaCl đến mức bão hòa. Nước muối được thay hàng tuần, tuy nhiên cần bổ sung nước nhằm giữ cho cây đủ ẩm và thay đổi độ dẫn điện của môi trường. Mỗi giống gieo trong 15 chậu, mỗi chậu gồm 3 cây. Hạt sẽ được thu đồng đều ở các cây của mỗi giống để phân tích hàm lượng axit oleic, axit linoleic và axit linolenic.

2.2.2. Phương pháp sắc ký khí khối phổ (GC - MS):

Thiết bị được sử dụng: Máy sắc ký khí GC-MS (Agilent 7890B GC/5977A MSD, cột HP-88 dài 30 m, đường kính trong 0,25 μ m; Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA).

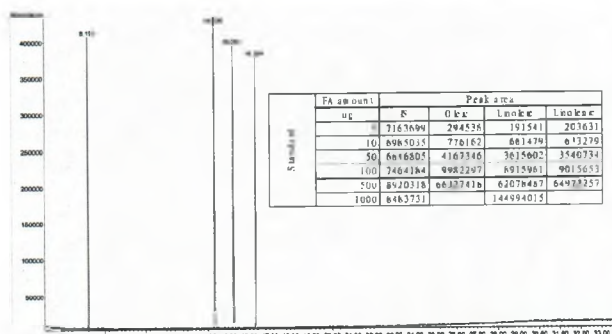
Chuẩn bị mẫu: Lấy chính xác 5 mg mẫu đậu tương đã được đồng hóa cho vào ống falcon 50 mL. Thêm chính xác 100 μ L Choroform, 4 mL BF₃-MeOH và chất chuẩn (Axit tridecanoic C13: 0). Đậy nắp thật chặt, kín. Vortex cho đến khi hỗn hợp mẫu đồng nhất. Phản ứng dẫn xuất được xảy ra trong lò ở nhiệt độ 60°C trong 20 phút. Để nguội tới nhiệt độ phòng, sau đó thêm 2 mL *n*-hexane và 1 mL nước cất, vortex tới khi đồng nhất. Đem hỗn hợp mẫu đi ly tâm ở 1.200 rpm trong 20 phút. Hỗn hợp phân lớp, lấy 1 ml lớp dung dịch phía trên. Mẫu lọc qua Natri Sunfat được đem đi phân tích bằng máy sắc kí GC - MS.

Phân tích trên thiết bị GC - MS: Mẫu được tiêm vào trong Injector ở nhiệt độ 240°C với tỷ lệ chia dòng 10: 1, khí mang He với tốc độ dòng là 1 mL/phút; chương trình nhiệt: nhiệt độ đầu 60°C (2 phút), tốc độ gia nhiệt là 20°C/phút tới 120°C, tiếp tục gia nhiệt với tốc độ 5°C/phút tới 240°C, giữ trong 2 phút; khối phổ MS sử dụng nguồn ion hóa điện tử tại 230°C, đầu dò khối phổ tứ cực (Quadrupole) ở nhiệt độ 150°C giúp cô lập và phân mảnh ion.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định thời gian lưu của 3 loại axit béo chưa no bằng sắc ký đồ

Nhằm xác định hàm lượng các axit béo chưa no axit oleic, axit linoleic và axit linolenic trong các mẫu đậu tương, phương pháp sắc ký khí được sử dụng trong nghiên cứu này. Đầu tiên, dãy dung dịch mẫu chất chuẩn tương ứng với 6 nồng độ khác nhau (5, 10, 50, 100, 500 và 1.000 μ g) cùng với chất nội chuẩn (internal control) axit Tridecanoic có nồng độ 100 μ g được phân tích sắc kí khí cho kết quả tương ứng.



Hình 1. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn chứa axit Tridecanoic và 3 axit béo chưa no: axit oleic, axit linoleic và axit linolenic cùng ở nồng độ 1.000 ppm phân tích bằng phương pháp sắc kí khí.

Giá trị diện tích pic ở các hàm lượng khác nhau được thể hiện trong bảng với ID là diện tích pic của chất nội chuẩn

Tại mẫu chuẩn chứa 3 axit béo chưa no và chất nội chuẩn ở cùng hàm lượng 100 μ g (Hình 1), sắc ký đồ của dung dịch chuẩn 3 axit béo chưa no cho thấy mỗi loại axit béo có thời gian lưu (retention time) khác nhau. Theo đó, thời gian lưu của ba loại axit béo chưa no lần lượt là 14,360 phút với axit oleic, 15,266 phút với axit linoleic và 16,338 phút với axit linolenic cùng với thời gian lưu của chất nội chuẩn tại 8,190 phút. Diện tích pic của chất nội chuẩn và 3 chất béo chưa no cũng thể hiện sự tương đồng lần lượt là 7.464.184; 9.982.297; 8.915.961 và 9.015.643 khi được tiêm ở cùng hàm lượng như nhau (100 μ g).

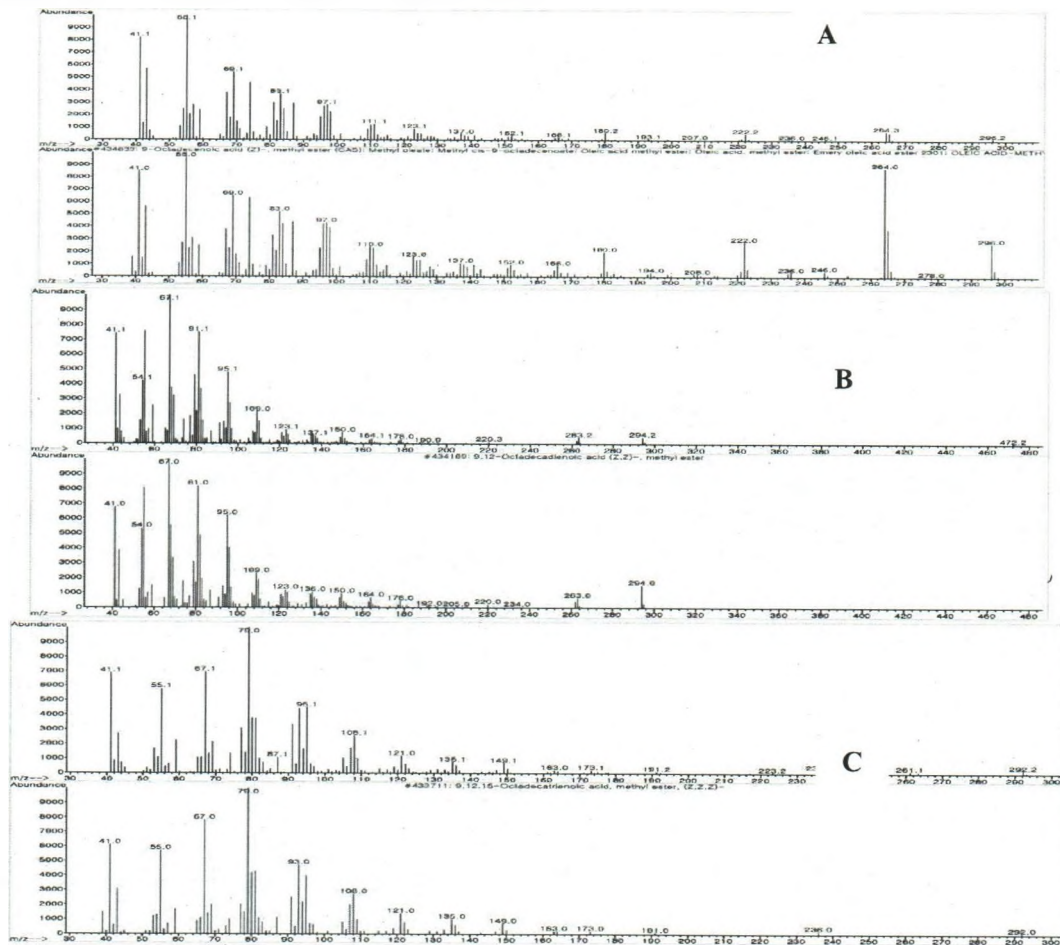
3.2. Định danh các chất bằng phương pháp khối phổ (Mass Spectrometer - MS)

Từ kết quả sắc ký đồ thu được ở trên, 3 loại axit béo chưa no được cho là có thời gian lưu tương ứng tại 14,3 phút, 15,2 phút và 16,3 phút. Tuy nhiên, nếu chỉ dựa vào thời gian lưu thì việc định danh một loại hợp chất là chưa đủ căn cứ. Do vậy, phương pháp

khối phổ (MS) được sử dụng trong nghiên cứu này nhằm xác định chính xác hợp chất mong muốn. Trong thí nghiệm này, mẫu sau khi qua sắc kí khí được ion hóa để trở thành các phân tử mang điện tích khác nhau. Tại đây, đầu dò khối phổ tứ cực (Quadrupole) phân tách và cô lập chúng dựa vào sự sai khác về giá trị m/z .

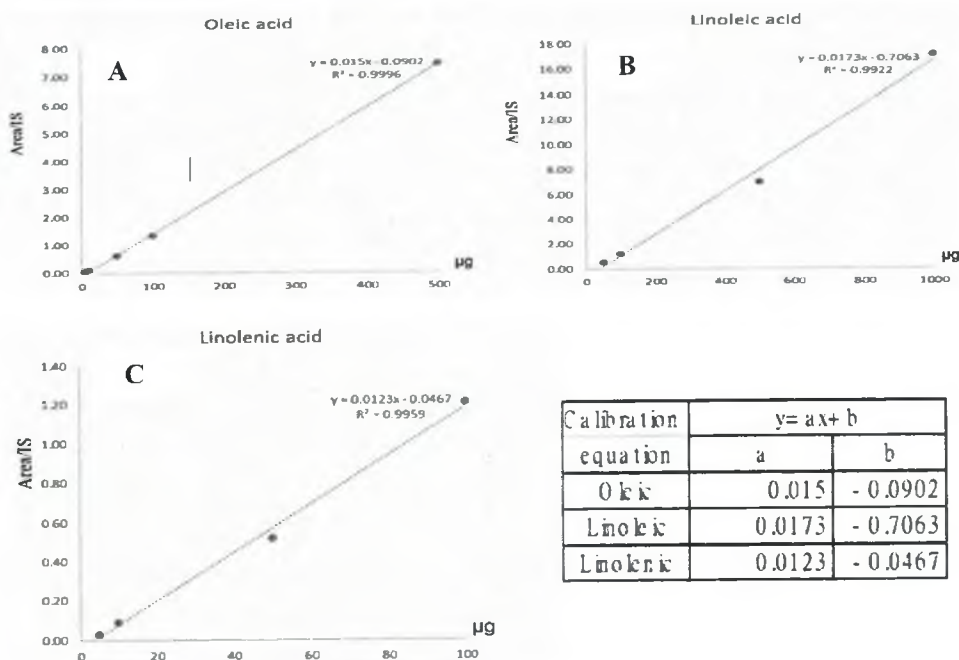
Theo đó, biểu đồ sự phân mảnh được đánh giá tại 3 thời điểm khác nhau (axit oleic tại 14,333 phút, axit linoleic tại 15,246 phút và axit linolenic tại 16,324 phút). Kết quả được đem đối chiếu với sự phân mảnh của 9-axit Octadecenoic (Z)-; 9,12-axit Octadecadienoic (Z,Z)- và 9,12,15-axit

Octadecatrienoic (Z,Z,Z)- từ kho dữ liệu thư viện NIST (Hình 2). Đúng như dự đoán từ kết quả phân tích sắc ký đồ, sự phân mảnh của hợp chất tại thời điểm 14,333 phút, 15,246 phút và 16,324 phút hoàn toàn trùng khớp với dữ liệu có được từ thư viện NIST với sự xuất hiện tương ứng của các mảnh ion đặc trưng giá trị m/z của cả 3 loại axit béo chưa no kể trên. Các mảnh m/z có sự liên kết chặt chẽ giữa nguồn thư viện và nguồn mẫu. Từ thí nghiệm này, axit oleic, axit linoleic và axit linolenic được xác nhận có thời gian lưu lần lượt tại 14,3 phút, 15,2 phút và 16,3 phút.



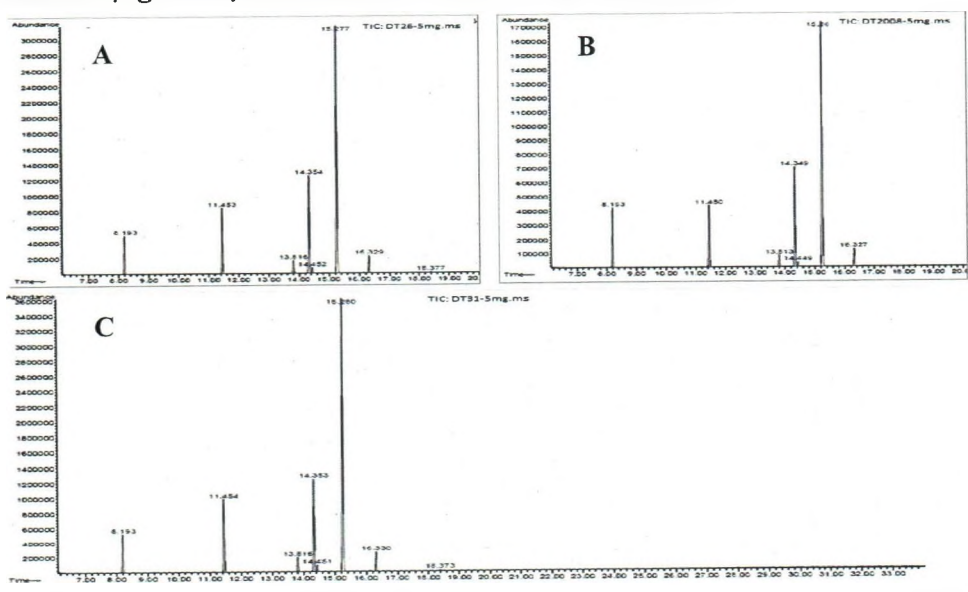
100, 500 và 1.000 ppm) của 3 axit (Hình 3). Hàm lượng của axit oleic được thể hiện theo phương trình $y=0,015x-0,0902$. Hàm lượng của axit linoleic được thể hiện theo phương trình $y=0,00173x-0,7063$. Hàm lượng của axit lonolenic được thể hiện qua phương

trình $y=0,0123x-0,0467$. Cả 3 axit béo chưa no đều cho thấy tuyến tính R^2 có giá trị rất cao. Các đường chuẩn có giá trị R^2 là 0,9996, 0,9922 và 0,9959 lần lượt đối với axit oleic, axit linoleic và axit linolenic.



Hình 3. Đường chuẩn (standard curve) hàm lượng của 3 axit béo chưa no: axit Oleic (A), axit Linoleic (B) và axit Linolenic (C). Các nồng độ chất chuẩn sử dụng để lập đường chuẩn cho mỗi axit là 5, 10, 50, 100, 500 và 1.000 ppm. Phương trình của đường chuẩn các chất lần lượt là $y=0,015x-0,0902$ với axit oleic (A), $y=0,0173x-0,7063$ với axit linoleic (B), $y=0,0123x-0,0467$ với axit linolenic (C). Trong đó Area/IS là tỷ lệ diện tích pic của chất chuẩn trên diện tích pic nội chuẩn (internal standard).

3.4. Xác định hàm lượng các loại axit béo chưa no trong 3 giống đậu tương



Hình 4. Sắc ký đồ hàm lượng axit béo chưa no của mẫu chất chuẩn hàm lượng 100 µg và 3 mẫu hạt đậu tương giống DT26 (A), giống DT2008 (B) và giống DT31 (C) với 5 mg mẫu mỗi giống

Bảng 1. Diện tích pic của chất nội chuẩn và 3 loại chất béo chưa no khảo sát được trong 3 giống đậu tương

Tên giống	Diện tích pic (5 mg)			
	IS	Axit oleic	Axit linoleic	Axit linolenic
ĐT26	8874531	30440390	79863762	5109857
DT2008	9156463	30608212	91923932	6402397
ĐT31	7576448	16590514	41558647	3110336

Phân tích sắc ký khí của 3 mẫu hạt đậu tương với 5 mg mỗi giống, sắc ký đồ cho thấy trong hạt cây đậu tương có sự khác biệt lớn trong hàm lượng các loại chất béo không no (Hình 4). Nhìn chung ở cả 3 giống, lượng axit linoleic nhiều vượt trội khi so sánh với lượng axit oleic và axit linoleic. Điều này cũng được ghi nhận ở diện tích pic của từng loại axit béo không no trên cả 3 giống (Bảng 1). Trong đó, bảng diện tích pic cho thấy hàm lượng axit oleic, linoleic và linolenic của giống ĐT31 là thấp nhất khi so sánh với số liệu của 2 giống đậu tương còn lại.

Thông qua đường chuẩn của 3 loại axit béo đã lập ở trên, hàm lượng các loại axit béo chưa bão hòa trong 5 mg hạt đậu tương (x) của 03 giống có thể được tính toán dựa vào số liệu diện tích pic. Theo đó giá trị trục tung (y) được tính toán theo công thức:

$$y = S_{\text{sample}}/S_{\text{IS}}, \text{ trong đó } S_{\text{sample}} \text{ là diện tích mẫu và } S_{\text{IS}} \text{ là diện tích chất nội chuẩn.}$$

Bảng 2. Thành phần axit béo của 3 giống đậu tương

Tên giống	Thành phần axit béo (µg/mg)		
	Axit oleic	Axit linoleic	Axit linolenic
ĐT26	47	112	10
DT2008	46	124	12
ĐT31	30	72	7

Từ tổng lượng axit béo mỗi loại trong hạt các giống đậu tương, hàm lượng các hợp chất trong 1 mg đơn vị mẫu có thể dễ dàng được xác định (Bảng 2). Đối chiếu với sắc ký đồ ở trên, axit linoleic trong hạt là thành phần chiếm ưu thế ghi nhận ở cả 3 giống ĐT26, DT2008 và ĐT31 với hàm lượng lần lượt là 112, 124 và 72 µg/mg. Ngay sau đó là axit oleic, 2 giống ĐT26 và DT2008 cho hàm lượng gần như tương đồng cũng như cao hơn 1,5 lần khi so sánh với số liệu có được từ hạt cây giống ĐT31. Điều tương tự cũng được ghi nhận với hợp chất có hàm lượng thấp nhất ở cả 3 giống đậu tương: axit linolenic. Nhìn chung, hàm lượng của tất cả các loại axit béo đang xét ở giống ĐT31 là thấp nhất và thấp hơn 1,5 lần khi

so sánh với số liệu tương ứng ở cả 2 giống cây còn lại.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Sử dụng phương pháp sắc ký khí khối phổ (GC - MS) đã xác định được hàm lượng 3 axit béo chưa no (axit oleic, axit linoleic và axit linolenic) của 3 giống đậu tương có tiềm năng chịu mặn. Giống DT2008 có hàm lượng 3 axit chưa no cao nhất, lần lượt là 46, 124 và 12 µg/mg tương ứng với axit oleic, axit linoleic và axit linolenic.

4.2. Đề nghị

Giống đậu tương DT2008 có hàm lượng axit béo chưa no cao, cần được sử dụng làm nguồn vật liệu trong các nghiên cứu về chất lượng lương thực thực phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ngô Thế Dân, Trần Đình Long, Trần Văn Lại, Đỗ Thị Dung và Phạm Thị Đào (1999). Cây đậu tương. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội, tr 338-345.
2. FAOSTAT (2016). Cơ sở dữ liệu thống kê. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>.
3. <https://vov.vn/kinh-te/chinh-phuc-dat-nhiem-man-buoc-dot-pha-cho-an-ninh-luong-thuc-722055.vov>.
4. Ashraf M, Wu L. (1994). Breeding for salinity tolerance in plants. Critical Reviews in Plant Sciences 13: 17 – 42.
5. Marschner H, Marschner P. (2012). Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, 3rd ed. Elsevier/Academic Press, London; Waltham, MA.
6. Wafaa MH, Abouzienna HF, Abd-El-Kreem F, El Habbasha S. (2015). Agriculture biotechnology for management of multiple biotic and abiotic environmental stress in crops. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 7 (10): 882–889.

7. Lee JD, Scotty LS, David D, Margarita V, Calvin RS, Thomas EC, Grover SJ. (2008). Evaluation of a Simple Method to Screen Soybean Genotypes for Salt Tolerance. *Crop Science* 48: 2194 – 2200.

DETERMINATION OF FATTY ACIDS COMPOSITION OF SALT TOLERANCE SOYBEAN VARIETIES

Nguyen Dang Minh Chanh

Summary

In this study, several soybean varieties was evaluated based on practical experiments. Three varieties of soybean (DT26, DT2008 and DT31) with salt tolerance were grown in a net house and treated with 100 mM NaCl concentration. Each variety includes 15 pots, each pot has 3 plants. Seed samples were harvested and analyzed for the determination of unsaturated fatty acids composition (oleic acid, linoleic acid and linolenic acid) by gas chromatography-mass spectrometry GC/MS. The results showed that all three varieties contain high levels of 3 acids: oleic, linoleic and linolenic. For variety DT26, the oleic, linoleic and linolenic contents were 47, 112 and 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectively. The soybean variety DT2008 contained oleic, linoleic and linolenic concentrations of 46, 124 and 12 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectively. The oleic, linoleic and linolenic contents in soybean variety DT31 were 30, 72 and 7 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectively. The 3 varieties had significant comparative differences for each acid composition. The variety with the highest oleic acid content is DT26, followed by DT2008 and the lowest is DT31. The composition of linoleic acid and linolenic acid of the cultivar DT2008 was the highest, and the lowest composition was the cultivar DT31. This result shows that soybean varieties DT2008 and DT26 are two varieties with high unsaturated fatty acid content.

Keywords: *Fatty acids, salt tolerance, soybean, chromatography.*

Người phân biện: PGS.TS. Nguyễn Thị Việt Anh

Ngày nhận bài: 11/6/2021

Ngày thông qua phân biện: 12/7/2021

Ngày duyệt đăng: 19/7/2021