

MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CỦA TYROSINASE TỪ VỎ BAO NẤM ROM VIỆT NAM

Đỗ Biên Cương^{1,*}, Nguyễn Thế Duyệt¹

TÓM TẮT

Tyrosinase có vai trò quan trọng trong sự biến màu của các sản phẩm nấm, nhưng các đặc tính của enzym này trên các mô ở bề mặt, nơi quyết định tính chất cảm quan của nấm rom (*Volvariella volvacea*) sau thu hoạch vẫn chưa được biết đến. Trong nghiên cứu này, tyrosinase từ vỏ bao của giống nấm rom được trồng khá phổ biến tại Việt Nam, thường gọi là giống Thần Nông, ở giai đoạn hình trứng đã được tinh chế bằng quy trình kết hợp kết tủa ammonium sulfate 60-80% độ bão hòa, sắc ký kỵ nước Butyl Sepharose 4 Fast Flow và sắc ký lọc gel Sephadex G-50, với độ sạch tăng gấp 16,4 lần so với ban đầu. Từ kết quả phân tích zymogram và SDS-PAGE, enzym này có thể là oligomer có khối lượng phân tử khoảng 110 kDa, với các dưới đơn vị có khối lượng xấp xỉ 22 kDa. Tyrosinase từ vỏ bao nấm rom hoạt động tối ưu ở nhiệt độ 45°C và pH 6,8, bền trong khoảng pH hẹp từ 6,8 đến 8,0 và ở nhiệt độ dưới 30°C. K_m và V_{max} của enzym với cơ chất L-DOPA lần lượt là 0,82 mM và 0,056 $\mu\text{M/s}$. Ở cùng nồng độ 1 mM, các ion sắt (II), đồng (II) hoạt hóa mạnh, natri benzoat và kali sorbat hoạt hóa nhẹ tyrosinase. Trái lại, EDTA, nisin và đặc biệt là canxi ức chế mạnh enzym ở nồng độ 1 mM.

Từ khóa: Tyrosinase, vỏ bao nấm, đặc tính, chống biến màu, nấm rom.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm rom - *Volvariella volvacea* (Bull. Ex Fr.) Singer là một loại nấm ăn ngon, bổ dưỡng, được nuôi trồng nhiều tại Việt Nam và thế giới [1]. Tuy nhiên, nấm rom có thời gian bảo quản rất ngắn [2], quả thể nhanh chuyển sang màu sậm hơn, gây khó cho việc lưu thông, tiêu thụ nội địa và xuất khẩu sản phẩm tươi. Do đó, hạn chế sự biến màu nấm bằng cách đình chỉ hoặc trì hoãn phản ứng chuyển hóa tyrosine tạo melamin được xúc tác bởi tyrosinase (EC 1.14.18.1), một monooxygenase vốn có trong nấm, nhờ các tác nhân hóa lý, trong đó có các chất kìm hãm enzym là một trong những giải pháp được quan tâm chú ý trong nhiều năm qua [2].

Để sàng lọc được tác chất kìm hãm tyrosinase từ các nguồn tự nhiên hoặc tổng hợp, trong đa phần các nghiên cứu sử dụng chế phẩm tyrosinase thương mại thu nhận từ nấm mỡ, có độ tinh khiết khác nhau, có thể còn chứa một số enzym phụ như laccase (có thể sử dụng các cơ chất tương tự như tyrosinase) hoặc glycosidase (có thể chuyển hóa những hợp chất vốn không có thành chất có hoạt tính ức chế tyrosinase) [3], dẫn tới việc áp dụng chất được coi là kìm hãm tyrosinase trong thực tế bảo quản nấm tươi có thể không đạt được như mong đợi. Ngoài ra, các enzym từ các nguồn khác nhau, thậm chí các isozyme từ

cùng một nguồn thu nhưng có những tính chất khác nhau cũng là yếu tố có thể ảnh hưởng đến kết quả sàng lọc tác nhân chống biến màu của nấm. Vì vậy, việc thu nhận tyrosinase tinh sạch từ chính đối tượng nấm ăn cần bảo quản và xác định đặc tính hóa lý của enzym là cần thiết để chọn được tác nhân chống biến màu hiệu quả. Bài báo này trình bày các kết quả tinh sạch và đặc tính của tyrosinase từ vỏ bao của nấm rom mà màu sắc của phần mô này quyết định tính chất cảm quan của nấm rom trong giai đoạn hình trứng (là giai đoạn mà quả thể nấm có hương vị thơm ngon được người tiêu dùng ưa thích [2]).

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu, hóa chất

Nấm rom Thần Nông - *Volvariella volvacea* (Bull. Ex Fr.) Singer (ở giai đoạn hình trứng) được thu mua từ cơ sở trồng nấm ở Hà Nội.

3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA), Tyrosine, Butyl Sepharose 4 Fast Flow, Sephadex G-75 superfine của Sigma-Aldrich (Mỹ), hỗn hợp protein chuẩn GangNam-STAIN[®] Prestained Protein Ladder của iNtRON Biotechnology (Hàn Quốc). Các hóa chất tinh khiết khác của Trung Quốc.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chiết enzym từ vỏ bao nấm: phần phía trên cùng của quả thể nấm tươi sau khi được cắt sẽ được tách bỏ phần mũ và cuống ở phía trong, rồi xay nhuyễn trong máy xay sinh tố với dung dịch đệm phosphate

¹ Trường Đại học Bách khoa Hà Nội
*Email: cuong.dobien@hust.edu.vn

50 mM pH 6,8 (theo tỉ lệ 1: 3 w/v). Hỗn dịch được lọc sơ bộ qua vải màn rồi được đem đi ly tâm 10.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, thu dịch enzyme thô.

Kết tủa tyrosinase: dịch enzyme thô (được đặt trong cốc để trên đá) được bổ sung từ ethanol lạnh hoặc ammonium sulfate cho đạt nồng độ nhất định. Sau đó, hỗn dịch được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Kết tủa thu được sẽ được hòa tan trong đệm phosphate 50 mM, pH 6,8 theo tỉ lệ 1: 3 (w/v). Dịch hòa tan được đem ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, thu dịch trong.

Làm sạch tyrosinase bằng sắc ký cột: 500 µl dịch hòa tan kết tủa muối ammonium sulfate được cấp lên cột Butyl Sepharose 4 Fast Flow (kích thước 1 cm x 50 cm, đã được ổn định trước bằng dung dịch muối ammonium sulfate 80% độ bão hòa), hoặc cột Sephadex G-50 (1 cm x 50 cm, đã được ổn định bằng đệm phosphate 50 mM, pH 6,8). Mẫu được rửa giải ra khỏi cột bằng dung dịch đệm phosphate 50 mM, pH 6,8 với tốc độ 1 mL/phút, mỗi phân đoạn thu 1,5 mL. Các phân đoạn được đem đi đo OD₂₈₀ và xác định hoạt độ tyrosinase với cơ chất L-DOPA.

Xác định hoạt độ tyrosinase [4]: 200 µL enzym được bổ sung vào cuvet có chứa sẵn 200 µL L-DOPA 10 mM và 400 µL dung dịch đệm phosphate pH 6,8. Đo mật độ quang tại bước sóng 475 nm (sau 30 giây ghi giá trị OD một lần, cho đến phút thứ 5 thì dừng đo). Một đơn vị hoạt độ tyrosinase được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết xúc tác chuyển hóa L-DOPA tạo 1 µmol sản phẩm dopachrome trong thời gian 1 phút. Hoạt độ được tính theo công thức:

$$\text{Hoạt độ tyrosinase (U/L)} = \Delta\text{OD} \cdot 10^6 \cdot V_T / (\epsilon \cdot l \cdot \Delta t \cdot V_E)$$

Trong đó: ΔOD là trung bình hiệu số mật độ quang đo được trong 10 giây phản ứng; V_T là tổng thể tích phản ứng (µL); V_E là thể tích tyrosinase phản ứng (µL), ε là độ hấp phụ phân tử của dopachrome (ε_{dopachrome} = 3600 M⁻¹.cm⁻¹); l là độ dày cuvet (l = 1 cm), Δt là thời gian phản ứng enzyme của hai lần đo liên tiếp, tính theo phút.

Xác định hàm lượng protein theo Lowry và cs (1951) [5].

Điện di protein theo Laemmli (1970) [6]: các mẫu (sau khi được cô đặc qua màng cut-off ly tâm 3 kDa, ngoại trừ dịch chiết thô) được phân tách trên gel polyacrylamid 12%, 16 mA trong 1,5 giờ. Protein được nhuộm bằng Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma, Mỹ).

Kiểm tra hoạt tính trên gel (zymogram): bản gel thu được sau khi chạy điện di SDS-PAGE được loại bỏ SDS bằng Triton X100 2,5%, rồi được ủ trong dung dịch L-DOPA 10 mM qua đêm. Các băng có hoạt tính tyrosinase có màu đen trên gel.

Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH và hóa chất đến hoạt tính tyrosinase: tiến hành tương tự như phần xác định hoạt tính tyrosinase, phản ứng được tiến hành ở các nhiệt độ khác nhau (và pH 6,8), hoặc ở các pH khác nhau (và nhiệt độ 45°C), hoặc có mặt các hóa chất khác nhau (ở pH 6,8 và 45°C). Để xác định độ bền, enzym được ủ với các nhiệt độ, pH khảo sát trong các thời gian khác nhau rồi xác định hoạt độ còn lại so với ban đầu. Khi xác định thông số động học, phản ứng được tiến hành với các nồng độ cơ chất khác nhau (ở pH 6,8 và 45°C).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Làm sạch tyrosinase

Kết quả khảo sát tác nhân kết tủa và nồng độ tác nhân kết tủa tyrosinase từ dịch chiết phần vỏ bao phía đỉnh búp (vị trí có hoạt độ tyrosinase cao nhất trên quả thể nấm ở giai đoạn hình trứng, 168 U/mg mô) được trình bày trong bảng 1 cho thấy, kết tủa ethanol ở các nồng độ từ 20-80% cho hiệu suất thu hồi tyrosinase chỉ đạt 4-6%, trong khi kết tủa ammonium sulfate 60% và 80% độ bão hòa cho hiệu suất thu hồi đạt 67,9% và 79,7%. Do đó, trong nghiên cứu này, kết tủa phân đoạn 60-80% độ bão hòa ammonium sulfate được lựa chọn để cô đặc và phân đoạn tyrosinase từ dịch chiết thô.

Bảng 1. Kết tủa tyrosinase từ dịch chiết vỏ bao nấm rom

Nồng độ tác nhân kết tủa (%)	Ethanol		Ammonium sulfate	
	Hoạt độ tyrosinase (U/L)	Hiệu suất thu hồi tyrosinase (%)	Hoạt độ tyrosinase (U/L)	Hiệu suất thu hồi tyrosinase (%)
20	13	4,91	0	0
40	16	6,04	6	4,44
60	12	4,41	242	67,94
80	10	3,78	287	79,72
90	17	6,42	38	28,15

Dịch hòa tan kết tủa tyrosinase bằng muối ammonium sulfate 60-80% độ bão hòa còn chứa một lượng muối lớn tiếp tục được làm sạch lần lượt qua cột sắc ký kỵ nước và sắc ký lọc gel. Kết quả được

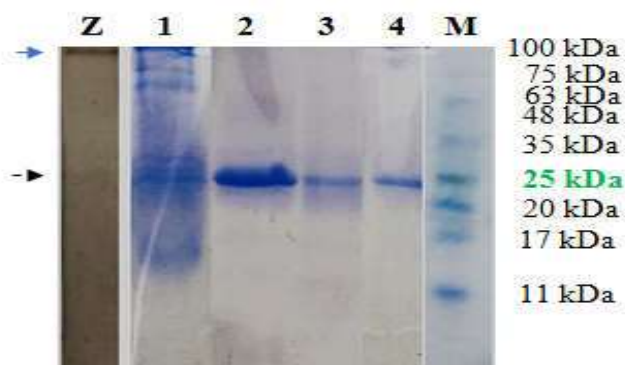
trình bày trong bảng 2. Qua cột sắc ký kỵ nước, tyrosinase bị đẩy ra ở các phân đoạn 11-15 và có hoạt độ cao nhất ở phân đoạn 13 (trùng với đỉnh protein thứ 3 trong 8 đỉnh protein thu được, kết quả không được trình bày). Các phân đoạn 11-15 được gộp lại và

đưa tiếp lên trên cột Sephadex G50, kết quả thu được tyrosinase ở các phân đoạn 10-24 (trùng với đỉnh protein cao nhất) với hoạt độ cao nhất ở phân đoạn 14, độ sạch tăng 16,4 lần so với dịch thô, hiệu suất thu hồi đạt 0,83% (Bảng 2).

Bảng 2. Tóm tắt quá trình làm sạch tyrosinase từ vỏ bao nấm rơm

Bước làm sạch	Protein (mg/L)	Hoạt độ tyrosinase (U/L)	Hoạt độ riêng (U/mg)	Độ sạch (lần)	Hiệu suất thu hồi (%)
Enzym thô	677	84	0,124	1	100
Kết tủa ammonium sulfate 60-80% độ bão hòa	202	281	1,392	11,2	22,3
Sắc ký Butyl Sepharose 4 Fast Flow	42	76	1,773	14,3	2,99
Sắc ký Sephadex G-75	10	21	2,039	16,4	0,83

Để kiểm tra độ sạch của tyrosinase sau quá trình tinh chế, đã tiến hành điện di SDS-PAGE. Kết quả thu được cho thấy dịch tyrosinase thu được sau sắc ký lọc gel khá sạch, chủ yếu ở băng protein có trọng lượng phân tử khoảng 22 kDa (Hình 1).



Hình 1. Điện di đồ tyrosinase qua các bước làm sạch

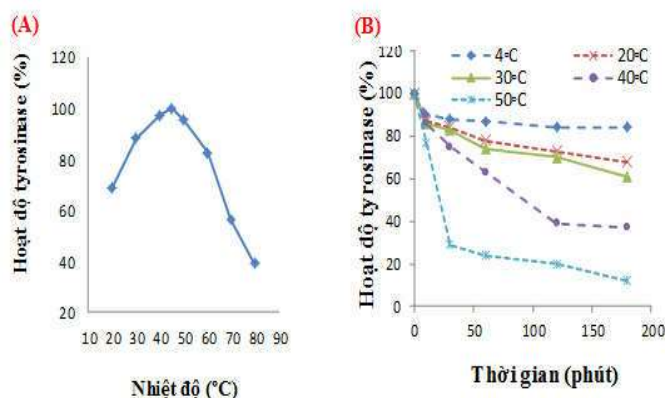
1. Dịch chiết thô; 2. Phân đoạn 60-80% ammonium sulfate; 3. Phân đoạn sau sắc ký kỵ nước; 4. Phân đoạn sau sắc ký lọc gel; M. Hỗn hợp protein chuẩn GangNam- STAIN™; Z. Zymogram dịch chiết thô.

Kết quả chạy zymogram với mẫu dịch chiết thô cho thấy, khi ủ bản gel (sau khi chạy SDS-PAGE và loại SDS với Triton X100) trong dung dịch cơ chất 1 ngày thấy xuất hiện 1 vạch màu đen tương ứng protein khối lượng khoảng 110 kDa và một vạch rất mờ ở vị trí tương ứng với protein có khối lượng 22 kDa (Hình 1 - giếng Z). Tyrosinase từ vỏ bao nấm rơm có thể có khối lượng phân tử khoảng 110 kDa, gồm các dưới đơn vị có khối lượng khoảng 22 kDa. Kết quả này phù hợp với dự đoán của T. Suen (199) về khối lượng phân tử oligomer và dưới đơn vị của polyphenol oxidase thu từ nấm rơm [7].

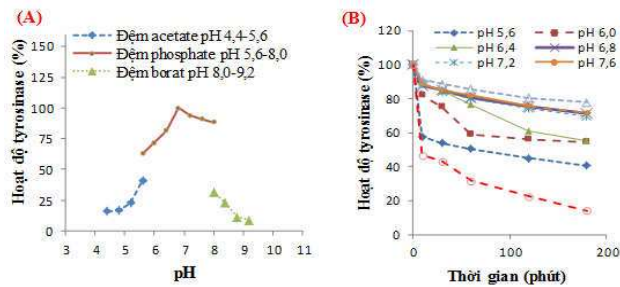
3.2. Xác định tính chất của tyrosinase từ vỏ bao nấm rơm

3.2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính và độ bền của tyrosinase

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt tính tyrosinase được trình bày ở hình 2 cho thấy, enzym từ vỏ bao nấm rơm hoạt động trong một khoảng nhiệt độ rộng từ 20°C - 80°C, với nhiệt độ tối ưu là 45°C (thời gian phản ứng 5 phút), tương tự như nhiệt độ tối ưu của tyrosinase được tách thu từ mẫu nấm toàn phần đã được công bố bởi Suen T. (1999) [7] và cao hơn nhiệt độ tối ưu của tyrosinase từ *Agaricus bisporus* (35°C), *Bacillus megaterium* và *Lentinula boryana* (40°C) [8]. Ở nhiệt độ 4°C - 30°C, hoạt tính tyrosinase từ vỏ bao nấm rơm khá bền, nhưng kém bền ở nhiệt độ cao (Hình 2B). Thời gian bán hủy của enzym này ở 50°C chỉ khoảng 21 phút, trong khi thời gian bán hủy ở 40°C và 30°C lần lượt là 116 và 228 phút.



Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính (A) và độ bền của tyrosinase (B)



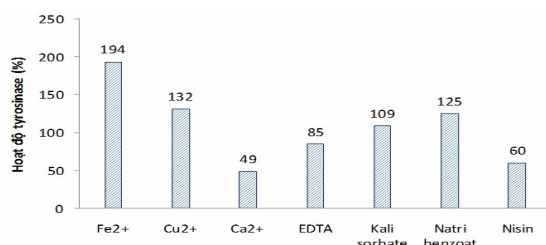
Hình 3. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính (A) và độ bền của tyrosinase (B)

3.2.2. Ảnh hưởng của pH đến hoạt tính và độ bền của tyrosinase

Hình 3 cho thấy, tyrosinase từ vỏ bao nấm rơm có thể hoạt động trong một khoảng pH rộng từ pH 4,4 - pH 9,2 nhưng hoạt động tốt và bền trong môi trường pH 6,8 - pH 8,0. Trong khoảng pH từ trung tính đến hơi kiềm, sau 180 phút, enzyme vẫn giữ được trên 70% hoạt tính. Tương tự, tyrosinase từ nấm *Pleurotus djamor* cũng khá bền trong khoảng pH từ 6-8 [9]. Tyrosinase có pH tối ưu là 6,8 (Hình 3A).

3.2.3. Ảnh hưởng của các hóa chất đến hoạt tính tyrosinase

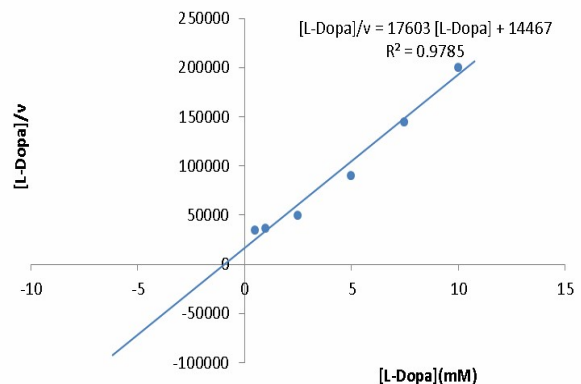
Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các ion kim loại và một số hóa chất khác (thường được dùng bảo quản thực phẩm và chống biến nâu một số loại nấm) đến hoạt tính tyrosinase được trình bày trong hình 4 cho thấy, tương tự như các tyrosinase thu nhận từ các nguồn khác, Cu^{2+} là chất hoạt hóa và EDTA, Ca^{2+} là chất kìm hãm tyrosinase nấm [7, 8]. Tuy nhiên, với tyrosinase vỏ bao nấm, Ca^{2+} ức chế rất mạnh (hoạt tính còn lại khi có mặt ion này ở nồng độ 1 mM là 49%). Đáng chú ý, ở 1 mM, nisin cũng làm giảm mạnh hoạt tính tyrosinase vỏ bao nấm (hoạt tính còn 60%), trong khi Fe^{2+} và natri benzoate làm tăng mạnh hoạt tính tyrosinase (hoạt độ tương ứng là 194% và 125% so với đối chứng). Kali sorbat 1 mM có ảnh hưởng hoạt hóa không nhiều. Kết quả này gợi ý sử dụng Ca^{2+} phối hợp với nisin hoặc kali sorbat để bảo quản nấm rơm.



Hình 4. Ảnh hưởng của một số hóa chất đến hoạt tính tyrosinase vỏ bao nấm rơm

3.2.4. Xác định các thông số động học phản ứng tyrosinase

Với cơ chất L-DOPA, sử dụng đồ thị Hanes và phần mềm Microsoft Excel xác định được tốc độ cực đại của phản ứng V_{max} là 0,056 $\mu\text{M/s}$ và hằng số Michaelis Menten K_m của enzyme là 0,82 mM, thấp hơn so với K_m với L-DOPA của nấm mỡ (0,933 mM) [8]. Giá trị K_m nhỏ chứng tỏ ái lực lớn của enzyme với cơ chất mà có thể có liên quan đến khả năng gây biến màu rất nhanh ở nấm rơm.



Hình 5. Biểu đồ Hanes biểu diễn phương trình Michaelis-Menten ở dạng $[S]/v = K_m/V_{max} + [S]/V_{max}$ để xác định K_m và V_{max} của tyrosinase nấm rơm

4. KẾT LUẬN

Kết hợp kết tủa 60-80% độ bão hòa ammonium sulfate, sắc ký qua cột Butyl Sepharose 4 Fast Flow và Sephadex G-50, tyrosinase ở phần vỏ bao của nấm rơm giai đoạn hình trứng đã được tinh sạch với độ sạch gấp 16,4 lần, hiệu suất thu hồi đạt 0,8%.

Tyrosinase từ vỏ bao nấm rơm có khối lượng phân tử 110 kDa, với các dưới đơn vị có khối lượng 22 kDa; có K_m và V_{max} với cơ chất L-Dopa là 0,82 mM và 0,056 $\mu\text{M/s}$; hoạt động tối ưu ở nhiệt độ 45°C, pH 6,8, bền trong khoảng nhiệt độ từ 4-30°C và bền trong khoảng pH từ 6,8 đến 8,0; bị ức chế bởi EDTA, nisin và Ca^{2+} ; được hoạt hóa bởi Fe^{2+} , Cu^{2+} , kali sorbate và natri benzoat ở nồng độ 1 mM.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện với sự tài trợ kinh phí của đề tài T2020-PC-005 (Trường Đại học Bách khoa Hà Nội).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Dulay R. (2015). Nutrient composition and functional activity of different stages in the fruiting body development of Philippine paddy straw

- mushroom, *Volvariella volvacea* (Bull.:Fr.) Sing.. *Advances in Environmental Biology*, 9, 54-56.
2. Jamjumroon S., Wongs-Aree C., McGlasson W. B., Srilaong V., Chalermklin P., Kanlayanarat S. (2012). Extending the shelf-life of straw mushroom with high carbon dioxide treatment. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 10(1):78-84.
 3. Neeley E, Fritch G, Fuller A, Wolfe J, Wright J, Flurkey W (2009). Variations in IC50 values with purity of mushroom tyrosinase. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 3811-3823.
 4. Do Bien Cuong, Ha Ngoc Linh (2015). Selection of hydrolysis conditions of soybean by Alcalase to produce tyrosinase inhibitors. *Journal of Science and Technology Technical University*. 105. 103-107.
 5. Lowry O., Rosebrough N. J., Farr Al, Randall R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193 (1):265-275.
 6. Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-685.
 7. Suen T. (1999). *Enzymatic browning of straw mushroom, Volvariella volvacea*. Master Thesis. The Chinese University of Hong Kong.
 8. Zaidi K. U., Ali A. S., Ali S. A. (2014). *Purification and characterization of melanogenic enzyme tyrosinase from button mushroom*. *Enzyme Research*; 2014:120739.
 9. Sharma J., Sharma D., Sharma A., Bansal S. (2021). Thermo stable tyrosinase purified from *Pleurotus djamor* grown in biomimetic calcium carbonate: A biological strategy to industrial waste remediation. *Environmental Technology & Innovation*, 21, 2021:101294.

CHARACTERISTICS OF TYROSINASE FROM THE VULVA TISSUE OF VIETNAM PADDYSTRAW MUSHROOM

Do Bien Cuong, Nguyen The Duyet

Summary

Tyrosinase plays an important role in browning of mushroom products, but characteristics of this enzyme in surface tissue where its color determines sensory quality of harvested *Volvariella volvacea* still have not admittedly known. In this study, a tyrosinase from volva of a Vietnam paddy straw mushroom strain, more called Than-Nong, at the egg stage, was isolated by 60-80% saturated ammonium sulfate precipitation, following hydrophobic chromatography on Butyl Sepharose 4 Fast Flow and gel filtration chromatography on Sephadex G-50 with a purification fold of 16.4. Judged from zymogram analysis and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, the volva tyrosinase was an oligomer that had a native molecular size of ~110 kDa and contained a single subunit with a size of ~22 kDa. The purified enzyme was optimally active at temperature of 45°C and pH 6.8 and stable in a narrow range of pH from 6.8 to 8.0 and below 30°C. Km and Vmax of the enzyme for L-DOPA were 0.82 mM and 0.056 $\mu\text{M/s}$, respectively. At the same concentration of 1 mM, ferrous and cupric strongly activated tyrosinase, and potassium sorbate and sodium benzoate slightly promoted the enzyme activity. By contrast, EDTA, nisin, and especially calcium inhibited the tyrosinase severely at 1 mM.

Keywords: *Tyrosinase, volva, characterization, anti-browning, paddystraw mushroom.*

Người phản biện: TS. Trần Thị Mai

Ngày nhận bài: 15/12/2021

Ngày thông qua phản biện: 17/01/2022

Ngày duyệt đăng: 24/01/2022