

NGHIÊN CỨU CHUYỂN HÓA BÃ ĐẬU TẠO TÁC NHÂN KÌM HÂM SỰ SẼM MÀU CỦA NẤM ROM

Đỗ Biên Cương^{1,*}, Nguyễn Ngọc Anh¹, Hoàng Thị Thanh Thuận¹,

Dương Thị Thu Hà¹, Vũ Thị Lan¹

TÓM TẮT

Biến màu do enzym là một trong những nguyên nhân lớn nhất làm giảm chất lượng nấm tươi. Do đó, các chất tự nhiên khác nhau có khả năng kìm hãm sẫm màu nấm đã được các nhà nghiên cứu sàng lọc trong những năm gần đây. Trong nghiên cứu này, các điều kiện thích hợp về nhiệt độ, pH và thời gian phản ứng để chuyển hóa bã đậu thu từ các cơ sở sản xuất đậu phụ truyền thống của Việt Nam tạo chất ức chế tyrosinase từ nấm rom đã được xác định. Sản phẩm thủy phân giải peptide có khối lượng phân tử 3959. Giá trị IC50 của sản phẩm là 70,48 µg/ml. Phun phủ dịch thủy phân bã đậu lên quả thể nấm 4 giờ trước khi thu hoạch giúp làm chậm sự thay đổi màu sắc và các đặc tính cảm quan khác của nấm rom tươi trong thời gian 5 ngày bảo quản ở nhiệt độ 15 - 18°C. Việc sử dụng kết hợp dịch thủy phân bã đậu nành và các phương pháp bảo quản khác có khả năng kéo dài thêm thời gian bảo quản của các sản phẩm nấm ăn.

Từ khóa: *Tyrosinase, chống sẫm màu, nấm rom, bã đậu tương, peptide kìm hãm.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tyrosinase (EC 1.14.18.1) là metalloenzyme có chức năng quan trọng được tìm thấy trong nhiều loài sinh vật [1]. Trong cơ thể nấm lớn, tyrosinase xúc tác phản ứng hydroxyl hóa monophenol như gamma-L-glutaminyl-4-hydroxy benzene, tyrosin thành L-3,4-dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) và phản ứng oxy hóa L-3,4-dihydroxyphenylalanin thành dopachrom, từ đó hình thành melanin làm màu của nấm bị sẫm nâu, giảm giá trị của sản phẩm nấm trắng sau thu hoạch [1, 2, 3]. Do đó, các biện pháp hóa lý khác nhau như bất hoạt enzym bằng hóa chất hoặc bằng nhiệt độ đã được nghiên cứu để kìm chế sự sẫm màu nấm trong quá trình bảo quản và chế biến [1, 2]. Tuy nhiên, cấu trúc, hương thơm của nấm nhìn chung bị tác động khá nhiều sau quá trình bất hoạt này [3]. Với mong muốn tạo được các thành phần có khả năng chống sẫm màu nấm hiệu quả, nhưng an toàn đối với sức khỏe người sản xuất và tiêu dùng, đã tiến hành khảo sát chuyển hóa một số protein khác nhau tạo peptide có khả năng tạo liên kết hydro với các axit amin trong trung tâm hoạt động của tyrosinase như tyrosine, histidine và do đó kìm hãm enzym này [4, 5]. Trong nghiên cứu này, các thông số chuyển hóa bã đậu tương, nguồn phế liệu còn chứa lượng khá lớn protein của quá trình sản xuất đậu, sữa đậu, tạo sản phẩm kìm hãm tyrosinase của nấm rom sẽ

được trình bày. Những kết quả bước đầu của việc sử dụng sản phẩm trên để chống biến màu nấm rom *Volvariella volvacea* (Bull. Ex Fr.) Sing, là một loại nấm ăn ngon, bổ dưỡng, được nuôi trồng nhiều tại Việt Nam và thế giới [5] cũng sẽ được đề cập.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Bã đậu tương *Glycine max* (độ ẩm 81,2%, protein thô 4,3%, cellulose 9,6%, lipid 2,9%) được mua tại cơ sở sản xuất đậu theo phương pháp truyền thống tại Hà Đông (Hà Nội); chế phẩm Alcalase 2.4L từ *Bacillus licheniformis* (2,4 U/g) của Novo Nordisk, Đan Mạch; nấm rom *Volvariella volvacea* (giống Thần Nông) nuôi trồng tại Vĩnh Bảo (Hải Phòng); 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA), Cystein của Sigma-Aldrich (Mỹ); tyrosinase được tách chiết từ phần đỉnh của vỏ bao của nấm rom ở giai đoạn hình trứng (210 U/L). Các hóa chất tinh khiết khác của Trung Quốc.

2.2. Phương pháp

Xác định hoạt tính ức chế tyrosinase [4]: 100 µL dung dịch thủy phân bã đậu và 400 µL dung dịch đệm natriphosphat pH 6,5 được bổ sung vào ống chứa 250 µL enzyme tyrosinase. Dung dịch sau đó được ủ ở 30°C trong 10 phút, rồi được bổ sung thêm 250 µL L-DOPA 10 mM và đem 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). Tương tự, làm mẫu đối chứng, trong đó dịch thủy phân bã đậu được thay bằng dung dịch đệm natriphosphat pH 6,5. Tính

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

hoạt độ kim hãm tyrosinase theo công thức: hoạt độ kim hãm tyrosinase (U/L) = $(\Delta OD_{KC} - \Delta OD_{TN}) \cdot 10^6 \cdot V_T / (\epsilon \cdot l \cdot V_i)$. Trong đó, ΔOD_{KC} : trung bình hiệu số mật độ quang đo được trong 30 giây phản ứng ở mẫu kiểm chứng; ΔOD_{TN} : trung bình hiệu số mật độ quang đo được trong 30 giây phản ứng ở mẫu thí nghiệm; V_T : tổng thể tích phản ứng (μL); V_i : thể tích dịch thủy phân kim hãm tyrosinase (μL); ϵ : độ hấp phụ phân tử của dopachrome ($\epsilon_{\text{dopachrome}} = 3600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$); l : độ dày cuvet ($l = 1 \text{ cm}$), t : thời gian phản ứng enzym (phút).

Thủy phân bã đậu tương: bã đậu tương được pha 5% w/v trong nước cất (pH 7) được bổ sung alcalase cho đạt 6 U/g bã đậu, hỗn dịch được ủ ở nhiệt độ xác định (60 hoặc 45, 50, 55, 60, 75°C); trong thời gian nhất định (1 hoặc 2, 3, 4 và 5 giờ). Phản ứng được đình chỉ bằng cách đun sôi dung dịch trong 10 phút. Ly tâm 6000 vòng/phút, 15 phút, thu dịch thủy phân. Mẫu đối chứng, tiến hành tương tự, nhưng alcalase đã được vô hoạt (đun sôi 10 phút) trước khi được bổ sung vào hỗn dịch bã đậu.

Phân tích khối lượng peptide bằng khối phổ MALDI-TOF: 3 μL của hỗn dịch phân tích và sinapic acid (tỷ lệ 1:5) được đặt lên đĩa phân tích (Bruker Daltonics, Bremen, Đức), được làm khô và phân tích trên thiết bị Microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Đức) sử dụng phần mềm FlexAnalysis phiên bản 3.4 (Bruker Daltonics) và laser nitrogen 60 Hz (337 nm). Phổ khối được thu thập ở chế độ tuyến tính và ion dương trong phạm vi từ 0 đến 150000

m/z.

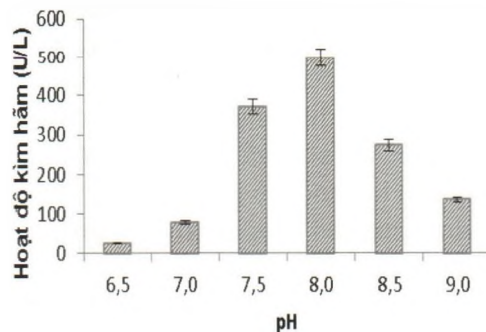
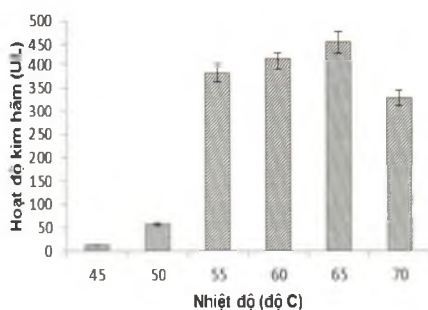
Phân tích thành phần dịch thủy phân bằng sắc kí bản mỏng TLC [6]: sử dụng hệ dung môi n-butyllic: axit acetic: nước = 3:1:1 (v/v); hiện màu bằng ninhydrin 0,5% pha trong acetone ở 110°C trong 5 phút.

Xác định hàm lượng sản phẩm thủy phân theo phương pháp ninhydrin: 1 mL mẫu được bổ sung thêm 200 μL dung dịch ninhydrin 0,35% (pha trong ethanol) và được đun sôi 15 phút, làm lạnh nhanh và đem đo độ hấp thụ quang OD tại bước sóng 570 nm [6], sử dụng đường chuẩn tyrosine.

Sử dụng dịch thủy phân bã đậu để kim hãm sự biến màu của nấm rom: dịch thủy phân bã đậu sau khi được loại cặn bằng ly tâm 10000 vòng/phút ở 4°C trong 20 phút, được phun phủ lên trên quả thể nấm tươi 4 giờ trước thu hoạch hoặc trên nấm ngay sau hái. Quả thể sau thu hoạch được vận chuyển về phòng thí nghiệm, bảo quản ở 15-18°C và được theo dõi màu sắc hàng ngày. Độ tăng sẫm màu của nấm thí nghiệm được tính trên cơ sở phân tích trị số L (độ trắng) của nấm (và của băng dính giấy màu trắng trên nấm) tại thời điểm đo bằng máy đo màu thực phẩm Colorimeter so với trị số L tại thời điểm ban đầu. Trạng thái và khối lượng quả thể cũng được đánh giá hàng ngày.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định điều kiện chuyển hóa bã đậu tạo chất kim hãm tyrosinase nấm rom



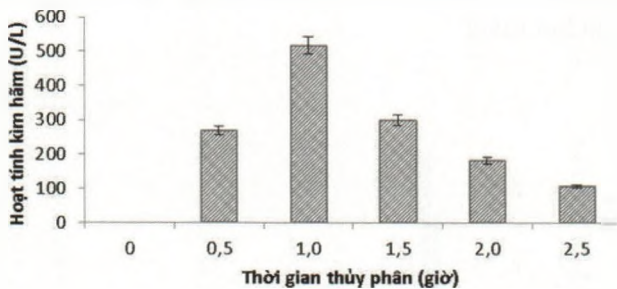
Hình 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH tới quá trình thủy phân bã đậu tạo chất kim hãm

Sự khác biệt về trạng thái tồn tại của protein trong nguyên liệu ban đầu cũng như tyrosinase từ nấm rom được sử dụng để sàng lọc điều kiện cho hoạt tính kim hãm cao thay vì enzym tách từ nấm mốc có thể sẽ dẫn đến sự khác biệt về các thông số của phản ứng thủy phân. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng

của nhiệt độ (Hình 1) cho thấy hiệu suất tạo chất kim hãm đạt cao khi thủy phân bã tăng theo nhiệt độ trong phạm vi từ 55°C đến 70°C và đạt cực đại ở 65°C (Hình 1). Trong khi cũng với thời gian thủy phân 1 giờ ở pH 8, nhiệt độ tối ưu thủy phân bột đậu là 60°C [4].

Ở 65°C, pH đầu của phản ứng có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu suất thủy phân bã đậu tạo chất kim hãm (Hình 1). Khi tăng pH từ 6,5 – 8,0 hoạt độ kim hãm tyrosinase của sản phẩm thủy phân tăng, sau đó giảm mạnh trong khoảng pH từ 8,5 – 9,0. Với pH đầu 8,0 hoạt độ kim hãm đạt giá trị cao nhất. Do đó, đã lựa chọn pH cho phản ứng thủy phân bã đậu là 8,0.

Theo tiến trình thủy phân, phổ sản phẩm phản ứng có thể sẽ khác nhau và do đó hoạt tính kim hãm tyrosinase sẽ ảnh hưởng. Kết quả ở hình 2 cho thấy, ở thời gian thủy phân 1 giờ, hoạt độ kim hãm tyrosinase thu được cao nhất. Khi tăng thời gian phản ứng, hoạt độ kim hãm giảm nhanh. Kết quả này cùng với kết quả ở hình 2 cho thấy, tương tự như các nghiên cứu khác đã công bố, chỉ có thể thu sản phẩm có hoạt tính kim hãm tyrosinase trong điều kiện thủy phân nửa vôi [4]. Khi để phản ứng diễn ra triệt để, các sản phẩm có hoạt tính kim hãm có thể bị phân cắt tiếp hoặc hỗn hợp thu được có thể xuất hiện các chất hoạt hóa tyrosinase và hoạt tính kim hãm tổng vì thế sẽ giảm.



Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian tới quá trình thủy phân bã đậu tạo chất kim hãm

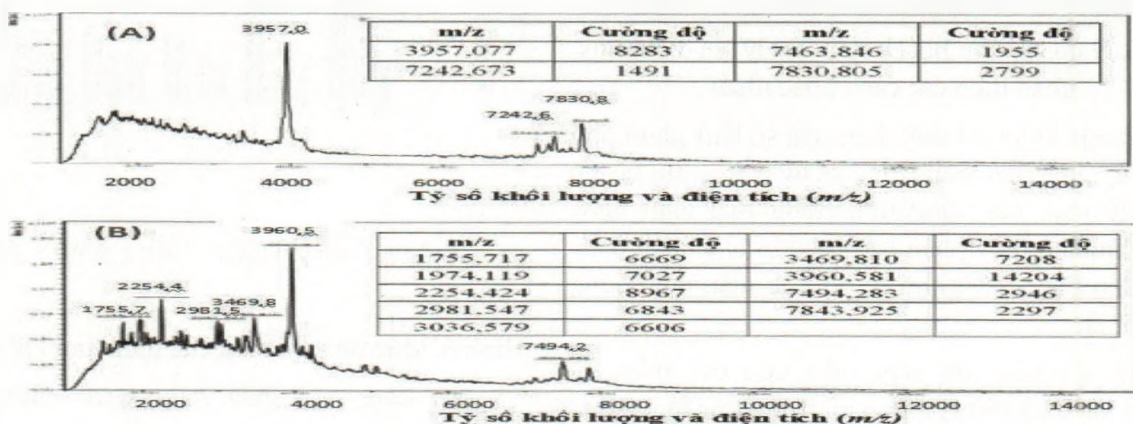
3.2. Phân tích thành phần và xác định giá trị IC 50 của dịch thủy phân

Kết quả phân tích thành phần dịch thủy phân bằng sắc ký lớp mỏng (Hình 3) cho thấy, dịch thủy phân chứa các peptide/axit amin phản ứng với ninhydrin, nhưng không chứa cystein là thành phần được Kahn (1985) công bố có hiệu quả ngăn chặn hình thành melanine [7]. Trong sản phẩm thủy phân, theo kết quả phân tích MALDI-TOF (Hình 4) cũng không thấy xuất hiện peptid nhỏ 234 dalton là thành phần chủ yếu trong dịch thủy phân protein trong dịch chiết từ bột đậu tương (ở 95°C trong 1 giờ) [4]. Sản phẩm chính có trong dịch thủy phân bã đậu trong nghiên cứu này là oligopeptide ngắn có khối lượng khoảng 3959 dalton (Hình 4). Ngoài ra trong sản phẩm thủy phân còn chứa các peptide nhỏ có khối lượng 1754, 1973, 2253, 2980, 3035 và 3468 dalton (Hình 4).



Hình 3. Sắc ký đồ TLC sản phẩm thủy phân bã đậu.

Ghi chú: 1, 2: Sản phẩm thủy phân; 3: Cystein.



Hình 4. Phân tích thành phần sản phẩm thủy phân bằng MALDI-TOF

(A) Mẫu kiểm chứng, thủy phân bã với enzym vô hoạt; (B) Mẫu thí nghiệm.

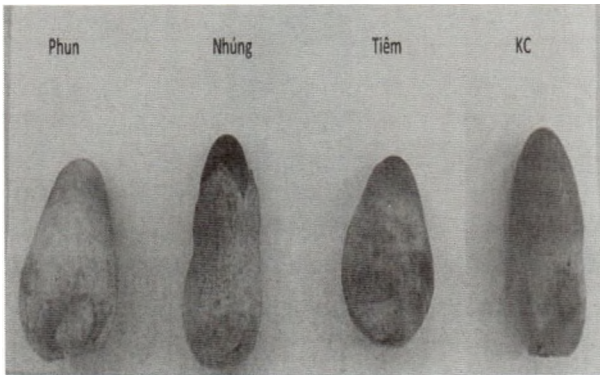
Phương trình biểu diễn mối quan hệ giữa phần trăm kim hãm và nồng độ sản phẩm thủy phân (được xác định bằng phản ứng với ninhydrin) có dạng $y =$

$0,0069x + 0,0137$ với hệ số tương quan R^2 là 0,9984 cho thấy hiệu quả kim hãm tyrosinase (y) của dịch tỉ lệ thuận với nồng độ sản phẩm thủy phân (x). Từ

phương trình này, nồng độ ức chế 50% hoạt tính kim hàm tyrosinase của dịch thủy phân bã đậu được xác định là 70,48 $\mu\text{g/ml}$. Trong khi đó IC50 của lysozyme, của axit kojic là >10 mg/ml và 5,11 $\mu\text{g/ml}$ (10 μM) [8].

3.3. Bước đầu sử dụng dịch thủy phân bã đậu kim chế sự sẫm màu của nấm rom tươi

Nấm rom tươi có hoạt độ nước cao, nên tiêm dịch thủy phân (~30 $\mu\text{L/quả}$) làm cho nấm đen (và nhũn) hơn mẫu kiểm chứng (KC) không xử lý (Hình 5). Việc nhúng quả thể trong dịch nhìn chung cho kết quả tốt hơn. Khi nhúng quả thể sau thu hái trong dịch thủy phân trong thời gian 1 phút và phối hợp với thổi khí oxy liên tục với tốc độ 0,5 L/phút, trong bình có chứa chất hút ẩm và có đục lỗ, sau 3 ngày màu sắc và trạng thái của nấm rom không thay đổi (kết quả không được trình bày). Tuy nhiên, phun phủ dịch lên quả thể sau thu hoạch cho kết quả tốt nhất trong các phương án khảo sát (Hình 5), quá trình thực hiện cũng đơn giản, nên được lựa chọn để xử lý quả thể nấm cho mục tiêu chống sẫm màu.

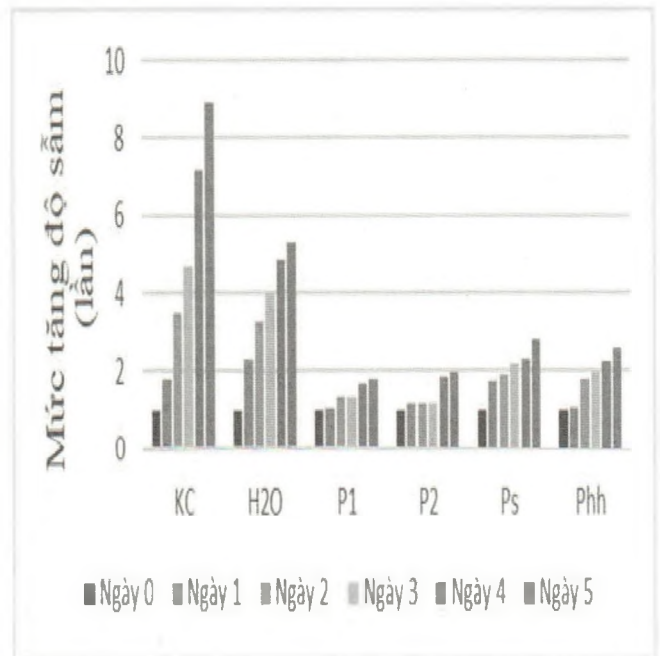


Hình 5. Nấm sau thu hoạch được xử lý với dịch thủy phân theo các cách khác nhau

Kết quả khảo sát thời điểm (và số lần) phun phủ dịch thủy phân lên nấm trước và ngay sau thu hoạch cho thấy màu sắc cũng như trạng thái nấm được phun phủ dịch thủy phân bã đậu (khi bảo quản ở 15-18°C) đều thay đổi ít hơn so với các mẫu đối chứng (Hình 6, 7).

Mức độ tăng độ sẫm màu của các mẫu thí nghiệm với dịch thủy phân nằm trong khoảng xấp xỉ 2 lần (Hình 6). Các mẫu được phun trước khi hái tăng độ sẫm chậm, hay nói cách khác sự sẫm màu được kìm chế tốt hơn mẫu phun sau hái. Mẫu nấm được phun dịch thủy phân 1 lần (trước khi thu hái 4 giờ) và 2 lần (trước thu hái 4 giờ và ngay trước lúc thu hái) có mức độ kìm hãm sự sẫm màu là tương

đương nhau (và tốt hơn so với mẫu phun hỗn hợp có chứa natri benzoate là chất chống mốc nhưng hoạt hóa nhẹ tyrosinase vỏ bao nấm rom), nên để tiết kiệm kinh phí phun 1 lần trước khi thu hái 4 giờ. Mẫu phun dịch thủy phân 1 lần trước khi hái 4 giờ không bị mốc, thổi nhũn trong 5 ngày bảo quản. Trong khi đó nấm rom được xử lý sóng siêu âm và bảo quản trong điều kiện kiểm soát độ ẩm, sau 3 ngày đã hỏng [9]. Độ sẫm của các mẫu nấm rom được bảo quản trong CO₂ được Jamjumroon và cs. (2012) công bố sau 3 ngày tăng trên 2,1; sau 4 và 5 ngày tăng 2,5-2,7 [10]. Việc phun dịch thủy phân 1 lần trước khi thu hái có hiệu quả kìm chế sự sẫm màu tốt. Tuy nhiên khối lượng của nấm (được phun và đối chứng) đều giảm khoảng 32% (trong thời gian 5 ngày bảo quản có độ ẩm thấp 45-60%) cho thấy sự hô hấp của nấm cần được kiểm soát tốt hơn (bằng cách phối hợp với các biện pháp công nghệ khác như bao gói biến đổi khí quyển MAP, kiểm soát độ ẩm và nhiệt độ bảo quản...) để giữ được chất lượng của nấm rom tươi trong thời gian dài hơn với mức độ hao hụt thấp.



Hình 6. Mức độ sẫm màu của nấm tươi khi bảo quản

Ghi chú: KC: mẫu nấm kiểm chứng, không phun; H₂O: mẫu phun phủ nước cất; P1: mẫu phun phủ dịch thủy phân trước thu hoạch 4 giờ; P2: mẫu phun phủ dịch thủy phân trước 4 giờ và ngay trước khi thu hoạch; Ps: mẫu phun ngay sau thu hoạch; Phh: mẫu phun hỗn hợp dịch thủy phân, natri benzoate và CaCl₂ trước thu hoạch 4 giờ.

	Ngày 0	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5
KC						
H ₂ O						
Phun 1 lần						
Phun 2 lần						
Phun sau						
Hỗn hợp						

Hình 7. Sự thay đổi hình thái của quả thể nấm rơm được phun phủ dịch thủy phân trong thời gian bảo quản ở trong phòng 15-18°C

Ghi chú: KC: mẫu nấm kiểm chứng, không phun; H₂O: mẫu phun phủ nước cất trước khi thu hoạch 4 giờ; Phun 1 lần: mẫu phun phủ dịch thủy phân trước thu hoạch 4 giờ; Phun 2 lần: mẫu phun phủ dịch thủy phân trước 4 giờ và ngay trước khi thu hoạch; Phun sau: mẫu phun ngay sau thu hoạch; Hỗn hợp: mẫu phun hỗn hợp dịch thủy phân, natri-benzoate và CaCl₂ trước thu hoạch 4 giờ.

4. KẾT LUẬN

Đã xác định được điều kiện chuyển hóa bã đậu tương (5%) bằng alcalase (6 U/g bã) tạo chất kìm hãm tyrosinase: nhiệt độ: 65°C pH: 8,0; thời gian: 1 giờ. Sản phẩm thủy phân thu được giàu peptide có khối lượng nhỏ hơn 3596 dalton, có IC₅₀ là 70,48 µg/ml.

Đã sử dụng dịch thủy phân bã đậu phối hợp với nhiệt độ thấp bảo quản nấm rơm tươi. Trong điều kiện: phun dịch thủy phân trên nấm trước khi thu hái khoảng 4 giờ, bảo quản nhiệt độ 15 – 18°C, sau 5 ngày bảo quản, nấm tươi ít bị biến đen và thối nhũn hơn so với không bảo quản. Phương pháp bảo quản này không đòi hỏi các trang thiết bị phức tạp, có tiềm năng triển khai tại cơ sở trồng nấm ở Việt Nam và các nước đang phát triển.

LỜI CẢM ƠN

Tập thể tác giả xin cảm ơn đề tài T2020-PC-005 (Trường Đại học Bách khoa Hà Nội), nhóm phân tích protein của TS. Phạm Đình Minh (Viện Công nghệ Sinh học), ông Phạm Văn Thành (Dũng Tiến,

Vinh Bảo, Hải Phòng) đã giúp đỡ trong quá trình thực hiện nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Te SC (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors, *Int. J. Mol. Sci.* 10: 2440-2475.
2. Lozano JE (2006). Inhibitor and control of browning, Chapter 18, *In: Fruit manufacturing*, Springer.
3. R. D. Rai, T. Arumuganathan (2008). Post harvest technology of mushrooms. National Research Centre for Mushroom, Indian Council of Agricultural Research, India.
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. Shen Z., Wang Y., Guo Z., Tan T., Zhang Y (2019). Novel tyrosinase inhibitory paptides with free radical scavenging ability. *Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry.* 34 (1). 1633-1640.

6. Bhushan R., Martens J. and Batra S. (2014). Amino acids: Thin-layer (planar) chromatography. In: Reedijk, J. (Ed.) Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, Elsevier
7. Kahn V (1985). Effect of proteins, protein hydrolysates and amino acids on o-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado, and banana. *Journal of Food Science*; 50, 111-115.
8. Neeley E, Fritch G, Fuller A, Wolfe J, Wright J, Flurkey W (2009). Variations in IC50 values with purity of mushroom tyrosinase, *Int. J. Mol. Sci.*, 2009, 20, 3811-3823.
9. Na Li *et al.* (2017) Improved postharvest quality and respiratory activity of straw mushroom (*Volvariella volvacea*) with ultrasound treatment and controlled relative humidity, *Scientia Horticulturae*, 56-64.
10. S. Jamjumroon, C. Wongs-Aree, W. B. McGlasson, V Srilong, P. Chalermklin, S. Kanlayanarat (2012). Extending the shelf-life of straw mushroom with high carbon dioxide treatment. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 10(1):78-84.

BIOCONVERSION OF SOYBEAN RESIDUES INTO PADDY STRAW MUSHROOM ANTIBROWNING AGENTS

**Do Bien Cuong, Nguyen Ngoc Anh, Hoang Thi Thanh Thuan,
Duong Thi Thu Ha, Vu Thi Lan**

Summary

Enzymatic browning is one of the largest causes of quality loss in fresh mushroom. Therefore, various natural anti-browning agents have been screened by researchers in recent years. In this publication, suitable conditions for converting soybean residues exhausted from Vietnam traditional tofu manufacturers to produce tyrosinase inhibitors for prevention of paddy straw mushroom browning were determined. The hydrolysate was rich of peptides with a molecular weight of 3959 dalton. The IC50 value of the product was 70.48 µg/ml. Spraying this soybean residues hydrolysate on mushroom 4 hours before harvesting fruit bodies helped to slow color changing and remain other sensory characters of fresh straw mushroom during the 5-day storage at 15-18°C. The combined use of soybean residue hydrolysate and other preservation methods has potential to prolong shelf life of edible mushroom products.

Keywords: *Tyrosinase, anti-browning, straw mushroom, Alcalase, soybean residues, peptide inhibitors.*

Người phản biện: TS. Trần Thị Mai

Ngày nhận bài: 02/12/2021

Ngày thông qua phản biện: 6/01/2022

Ngày duyệt đăng: 25/02/2022