

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYME TYROSINASE CỦA VI KHUẨN NỘI SINH PHÂN LẬP TỪ CÂY RAU DỆU (*ALTERNANTHERA SESSILIS* (L.) R.Br. ex DC., AMARANTHACEAE)

INVESTIGATION OF TYROSINE ENZYME INHIBITORY ACTIVITY OF ENDOPHYTIC BACTERIA ISOLATED FROM *ALTERNANTHERA SESSILIS* (L.) R.Br. ex DC., AMARANTHACEAE

Trần Chí Linh¹, Nguyễn Tấn Thành², Đỗ Văn Mãi¹, Ngô Thị Lan Hương¹, Huỳnh Văn Trương^{3*}

¹Trường Đại học Nam Cần Thơ, Việt Nam

²Trường Đại học Cần Thơ, Việt Nam

³Trường Đại học Y dược Cần Thơ, Việt Nam

*Tác giả liên hệ / Corresponding author: hvtruong@ctump.edu.vn

(Nhận bài / Received: 25/6/2024; Sửa bài / Revised: 14/8/2024; Chấp nhận đăng / Accepted: 26/9/2024)

Tóm tắt - Nghiên cứu được thực hiện để phân lập, xác định hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase của các dòng vi khuẩn nội sinh trong rau Dệu. Nghiên cứu đã phân lập được 12 dòng vi khuẩn nội sinh từ rễ, thân và lá rau Dệu. Vi khuẩn nội sinh trong rau Dệu có khả năng ức chế enzyme tyrosinase với hiệu suất dao động từ 13,08±2,82 đến 64,91±0,90%. Vi khuẩn nội sinh trong rau Dệu có khả năng sản sinh chất ức chế enzyme tyrosinase với hàm lượng dao động từ 84,21±13,97 đến 341,17±4,45 KAE/mL dịch ngoại bào hoặc từ 140,61±22,06 đến 546,33±7,03 mg AE/mL dịch ngoại bào. Vi khuẩn nội sinh trong rau Dệu còn có khả năng sản sinh polyphenol, flavonoid với hàm lượng lần lượt dao động từ 32,15±0,51 đến 77,28±1,34 mg GAE/mL dịch ngoại bào và 24,24±0,77 đến 60,85±1,55 mg QE/mL dịch ngoại bào. Ba dòng vi khuẩn nội sinh có hoạt tính cao nhất được định danh là *Enterobacter* sp. AS-L1, *Pantoea* sp. AS-R2, *Pantoea* sp. AS-R4. Như vậy, các dòng vi khuẩn nội sinh trong rau dệu cho thấy, tiềm năng sản sinh chất ức chế enzyme tyrosinase đầy hứa hẹn.

Từ khóa - Rau Dệu; vi khuẩn nội sinh; Enzyme tyrosinase; flavonoid; polyphenol;

Abstract - The study was conducted to isolate and determine the tyrosinase enzyme inhibitory activity of endophytic bacteria in *Alternanthera sessilis* (AS). The study isolated 12 strains of endophytic bacteria from the roots, stems and leaves of AS. Endophytic bacteria in AS are capable of inhibiting the tyrosinase enzyme with an efficiency ranging from 13.08±2.82 to 64.91±0.90%. Endophytic bacteria in AS are capable of producing tyrosinase enzyme inhibitors with concentrations ranging from 84.21±13.97 to 341.17±4.45 mg KAE/mL cell-free supernatant or from 140.61±22.06 to 546.33±7.03 mg AE/mL cell-free supernatant. Endophytic bacteria in AS are also capable of producing polyphenols, flavonoids with concentrations ranging from 32.15±0.51 to 77.28±1.34mg GAE/mL cell-free supernatant, and 24.24±0.77 to 60.85±1.55 mg QE/mL cell-free supernatant, respectively. The three endophytic bacterial strains with the highest activity were identified as *Enterobacter* sp. AS-L1, *Pantoea* sp. AS-R2, *Pantoea* sp. AS-R4. Thus, endophytic bacterial strains in AS show promising potential for producing tyrosinase inhibitors.

Key words - *Alternanthera sessilis*; endophytic bacteria; enzyme tyrosinase; flavonoid; polyphenol

1. Đặt vấn đề

Melanin là sắc tố đen trong da và rất cần thiết để bảo vệ da con người khỏi bức xạ. Melanin tích tụ ở lớp biểu bì dẫn đến sự hình thành hắc tố hoặc sắc tố da và đây có thể là điều mà nhiều người không mong muốn. Về mặt dược lý, sự hình thành hắc sắc tố có thể được kiểm soát bằng cách ức chế hoạt động của enzyme tyrosinase hoặc các enzyme tạo hắc tố có liên quan khác. Trong số các enzyme tạo hắc sắc tố, tyrosinase là enzyme giới hạn tốc độ kiểm soát việc sản xuất melanin [1]. Việc sử dụng các chất ức chế tyrosinase là phương pháp hứa hẹn nhất để ức chế sự hình thành hắc sắc tố. Các sản phẩm tự nhiên không độc hại được sử dụng trong công thức mỹ phẩm và được phẩm đang được quan tâm đáng kể. Các sản phẩm tự nhiên có nguồn gốc từ thực vật đã được sử dụng rộng rãi như chất làm trắng nhờ vào khả năng ức chế enzyme tyrosinase [2]. Bên cạnh các sản phẩm thuần thiên nhiên, nghiên cứu này

càng làm phong phú việc cung cấp các chất ức chế enzyme tyrosinase.

Ngày càng có nhiều nghiên cứu quan tâm đến các hợp chất chuyển hóa thứ cấp của vi khuẩn nội sinh thực vật. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh vi khuẩn nội sinh thực vật có khả năng sản sinh ra các hợp chất chuyển hóa thứ cấp tương tự như thực vật chủ [3]. Điều này cho thấy tiềm năng ứng dụng vi khuẩn nội sinh thực vật để khai thác các hợp chất chuyển hóa thứ cấp giúp giảm gánh nặng khai thác thực vật. Rau Dệu loài thực vật phân bố phổ biến ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long. Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy, cây rau Dệu sở hữu nhiều hoạt động dược lý quan trọng, bao gồm khả năng kháng viêm, giảm đau, hạ nhiệt, an thần, kháng vi sinh vật, kháng oxy hóa, hạ glucose huyết và chống độc thủy tinh thể [4]. Cây rau Dệu chứa nhiều hợp chất chuyển hóa thứ cấp quan trọng như: tannin, saponin, flavonoid, steroid, terpenoid, glycoside, phenol,

¹ Nam Can Tho University, Vietnam (Tran Chi Linh, Do Van Mai, Ngo Thi Lan Huong)

² Can Tho University, Vietnam (Nguyen Tan Thanh)

³ Can Tho University of Medicine and Pharmacy, Vietnam (Huynh Van Truong)

phytosterol và alkaloid [4-7]. Nghiên cứu được thực hiện nhằm sàng lọc vi khuẩn nội sinh trong cây rau Dệu có khả năng sản sinh các nhóm hợp chất chuyển hóa thứ cấp ức chế enzyme tyrosinase, tạo tiền đề ứng dụng trong mỹ phẩm.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Cây rau Dệu được thu mẫu tại huyện Phong Điền, thành phố Cần Thơ vào tháng 06/2023. Cây rau Dệu được định danh bởi ThS. Trần Chí Linh và lưu trữ tại phòng thí nghiệm Phòng thí nghiệm Thực vật và Động vật, Bộ môn Sinh học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ với mã số lưu trữ là: CT_Ase202306010015.

Môi trường Potato Dextrose Broth (PDB), Potato Dextrose Agar (PDA) của hãng Himadia, Ấn Độ được sử dụng để nuôi cấy và phân lập vi khuẩn nội sinh. Folin-Ciocalteu, enzyme tyrosinase, L-3,4-dihydroxyphenylalanine, kojic acid, arbutin, gallic acid, quercetin được cung cấp từ hãng Aldrich-Sigma của Mỹ. Sodium hypochlorite, tween 20, sodium carbonate, aluminum chloride, sodium nitrite, sodium hydroxide được cung cấp bởi hãng Xilong của Trung Quốc. Bộ nhuộm Gram được sử dụng trong nghiên cứu của hãng Nam Khoa, Việt Nam.

Thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm: Tủ sấy (Mettler UNB 200, Mettler, Đức), tủ cấy vô trùng (ThienTruong Scientific, Việt Nam), cân phân tích (PA213, Ohaus, Mỹ), máy đo quang phổ (SP-UV1100, DLAB, Mỹ), bếp điện từ (SHD 6800, Sunhouse, Trung Quốc), micropipette (Nichiryo LE, Nhật Bản), máy đo pH (C1020, Consort, Bỉ) và máy khuấy từ gia nhiệt (MS7-H550-Pro, Scilogex, Mỹ), nồi hấp khử trùng nhiệt ướt (SA-300VL, Sturdy Industrial Co., Ltd, Đài Loan).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và ly trích dịch ngoại bào từ vi khuẩn nội sinh

Vi khuẩn nội sinh trong cây rau Dệu được phân lập theo mô tả của Basumatary và cộng sự [8], Trần Chí Linh và cộng sự [9], có điều chỉnh. Cây rau Dệu được rửa dưới vòi nước để loại bỏ các hạt đất bám dính. Sau đó, cây rau Dệu được chia thành rễ, thân, lá để khử trùng bề mặt bằng dung dịch sodium hypochlorite (2%) chứa 0,1% tween 20 trong 3 phút. Rễ, thân, lá cây rau Dệu được rửa liên tiếp ba lần bằng nước cất vô trùng và làm khô bằng khăn giấy vô trùng. Rễ, thân, lá cây rau Dệu được kiểm tra độ vô trùng rút 100 μ L dung dịch nước cất vô trùng ở lần rửa mẫu cuối cùng trải đều lên môi trường PDA, ủ ở 30°C trong 48 giờ. Các mẫu sẽ bị loại bỏ nếu phát hiện thấy sự phát triển của vi sinh vật trong quá trình kiểm tra độ vô trùng. Mẫu đã khử trùng được cho vào cối chày vô trùng, giã nhuyễn, cho thêm 1 mL nước cất vô trùng vào cối, khuấy đều và để yên. Phần dịch trích bên trên được cho 100 μ L vào các ống nghiệm chứa môi trường PDA chứa 0,18% agar. Các ống nghiệm được ủ ở 30°C từ 2 - 4 ngày. Các ống nghiệm được quan sát nếu thấy có một lớp màng mỏng (pellicle) gần bề mặt môi trường thì chứng tỏ có sự hiện diện của vi khuẩn nội sinh. Lớp màng mỏng này được thu lấy và trải đều lên

môi trường PDA, ủ ở 30°C. Sau 48 giờ, các khuẩn lạc khác nhau mọc trên bề mặt môi trường tiếp tục cấy chuyển sang các đĩa môi trường PDA mới vài lần đến khi các khuẩn lạc xuất hiện trên đường cấy rời nhau và hình thái khuẩn lạc thuần nhất. Quan sát và mô tả hình thái khuẩn lạc vi khuẩn (hình dạng, màu sắc, độ nổi khuẩn lạc), nhuộm Gram, quan sát hình thái tế bào vi khuẩn.

Các dòng vi khuẩn nội sinh thuần chủng được nuôi cấy trong môi trường PDB để thu lấy dịch ngoại bào bằng cách: 4 mL dung dịch chứa vi khuẩn nội sinh có mật độ quang ở bước sóng 600 nm là 0,5 được bổ sung vào trong bình Erlenmeyer chứa 196 mL môi trường PDB có pH 7. Các bình Erlenmeyer chứa vi khuẩn nội sinh được ủ ở 30°C trên máy lắc ngang 200 vòng/phút trong 24 giờ. Sau đó, môi trường nuôi cấy vi khuẩn được ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 15 phút. Dịch lỏng ở bên trên được thu lấy và gọi là dịch ngoại bào để bảo quản trong lọ thủy tinh ở 4°C dùng cho các khảo sát tiếp theo [9].

2.2.2. Khảo sát khả năng sản sinh polyphenol và flavonoid của vi khuẩn nội sinh

Hàm lượng polyphenol tổng số (total polyphenol content, TPC) được xác định bằng thuốc thử Folin-Ciocalteu theo mô tả của Trần Chí Linh và cộng sự có điều chỉnh [9]. Các chất lần lượt được cho vào phản ứng với tỷ lệ bằng nhau như sau: dịch ngoại bào của vi khuẩn nội sinh, nước khử ion và thuốc thử Folin-Ciocalteu 20%, ủ 10 phút ở 30°C. Sau khi ủ 10 phút, thêm sodium carbonate 10% cùng thể tích như các chất trên, tiếp tục ủ ở 40°C trong 30 phút. Độ hấp thụ quang phổ của hỗn hợp được đo ở bước sóng 765 nm. TPC được biểu thị bằng mg đương lượng gallic acid trên mL dịch ngoại bào dựa vào phương trình: $y = 0,0164x - 0,0175$ ($R^2 = 0,999$) của gallic acid (mg GAE/mL dịch ngoại bào).

Hàm lượng flavonoid tổng (total flavonoid content, TFC) được xác định dựa vào thuốc thử aluminum chloride theo mô tả của Trần Chí Linh và cộng sự có điều chỉnh [9]. Phản ứng gồm có 200 μ L dịch ngoại bào trộn với 200 μ L nước khử ion và 40 μ L sodium nitrite 5% để yên 5 phút tiếp tục cho thêm 40 μ L aluminum chloride 10% vào hỗn hợp và ủ trong 6 phút. Sau đó, 400 μ L sodium hydroxide 1 M được thêm vào cùng dung dịch được trộn với 120 μ L nước khử ion, tiếp tục ủ 15 phút ở 30°C và đo độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 510 nm. TFC được biểu thị bằng mg đương lượng quercetin trên mL dịch ngoại bào dựa vào phương trình: $y = 0,0065x + 0,0019$ ($R^2 = 0,9994$) của quercetin (mg QE/mL dịch ngoại bào).

2.2.3. Khảo sát khả năng ức chế enzyme tyrosinase của vi khuẩn nội sinh

Hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase của dịch ngoại bào chiết xuất từ vi khuẩn nội sinh được thực hiện theo mô tả của Arung và cộng sự có điều chỉnh [10]. Hỗn hợp phản ứng gồm có 225 μ L dịch ngoại bào, 225 μ L dung dịch đệm phosphate (0,1 M; pH 6,8) và 50 μ L dung dịch enzyme tyrosinase (10 U/mL). Hỗn hợp trên được ủ ở 37°C trong 30 phút. Sau đó, phản ứng được bắt đầu bằng việc thêm 500 μ L dung dịch L-3,4-dihydroxyphenylalanine (1,5 mM; L-DOPA). Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C trong 7 phút và độ hấp thụ quang phổ ở bước sóng 475 nm. Kojic acid,

arbutin là những chất ức chế enzyme tyrosinase đã biết, được sử dụng làm đối chứng dương cho thử nghiệm. Hoạt tính ức chế tyrosinase được biểu thị bằng phần trăm ức chế enzyme tyrosinase theo công thức: $(1-B/A) \times 100$, trong đó A và B là hoạt động của enzyme tyrosinase khi không có dịch ngoại bào (thay thế bằng môi trường PDB, đối chứng âm) và có dịch ngoại bào vi khuẩn nội sinh. Bên cạnh đó, hàm lượng chất ức chế enzyme tyrosinase được biểu thị bằng mg đương lượng kojic acid/ arbutin trên mL dịch ngoại bào của vi khuẩn nội sinh dựa vào phương trình: $y = -0,009x + 1,0432$ ($R^2 = 0,9975$) của kojic acid (mg KAE/mL dịch ngoại bào) và $y = -0,0057x + 1,053$ ($R^2 = 0,9951$) của arbutin (mg AE/mL dịch ngoại bào).

2.2.4. Định danh dòng vi khuẩn nội sinh tiềm năng

Các khuẩn lạc đơn lẻ được chọn lọc và nuôi cấy trong môi trường PDB ở 30°C trên máy lắc ở tốc độ 200 vòng/phút trong 16 đến 24 giờ để thu được huyền phù vi khuẩn. Trình tự gene 16S rRNA của chúng vi khuẩn được khuếch đại bằng phản ứng chuỗi polymerase (polymerase chain reaction, PCR) với trình tự đoạn mồi 27F (50-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-30) và 1492R (50-TACGGT-TACCTTGTTACGACTT-30). PCR được thực hiện ở 95°C (5 phút), 35 chu kỳ 94°C (1 phút), 53°C (1 phút), 72°C (1,5 phút) và 72°C (5 phút). Sản phẩm của PCR đã được gửi đến Công ty TNHH T và N Biosolution (Địa chỉ: 3/25/15H, đường 182, khu phố 3, phường Tăng Nhơn Phú A, quận Thủ Đức, thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam) để giải trình tự gene 16S rRNA. Sử dụng chương trình BLAST N để so sánh trình tự 16S rRNA của các dòng vi khuẩn với trình tự gene 16S rRNA ở các loài vi khuẩn có trong ngân hàng gene National Coalition Building Institute (NCBI). Bên cạnh đó, cây phát sinh chủng loài của các dòng vi khuẩn nội sinh được xây dựng dựa vào trình tự gene bằng phần mềm Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11.0.13 (MEGA 11.0.13).

2.2.5. Xử lý và phân tích số liệu

Các số liệu trong nghiên cứu được lặp lại 3 lần, xử lý bằng phần mềm Minitab 16.0 kiểm định ANOVA-Tukey’s và trình bày dưới dạng MEAN±STDEV. Biểu đồ được vẽ bằng phần mềm Microsof Excel 2013.

3. Kết quả nghiên cứu và khảo sát

3.1. Phân lập và ly trích dịch ngoại bào từ vi khuẩn nội sinh trong cây rau Dệu

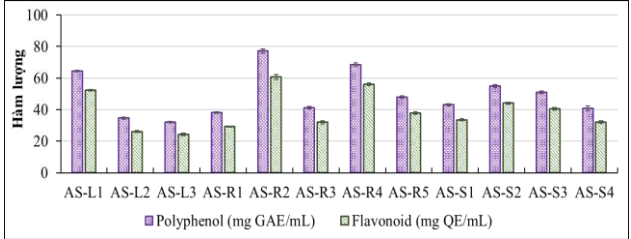
Vi khuẩn nội sinh phân lập từ cây rau Dệu được kí hiệu là AS-R, AS-L, AS-S tương ứng với *Alternanthera sessilis* (AS), roots (rễ), leaves (lá) và stems (thân). Nghiên cứu đã phân lập được 12 dòng vi khuẩn nội sinh từ cây rau Dệu. Trong đó, 5 dòng được phân lập từ rễ (chiếm 41,67%), 4 dòng được phân lập từ thân (chiếm 33,33%) và 3 dòng (chiếm 25%) được phân lập từ lá cây rau Dệu. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây rau Dệu được trình bày trong Bảng 1. Vi khuẩn nội sinh trong cây rau Dệu chủ yếu có khuẩn lạc tròn, bìa nguyên, độ nổi mô, màu trắng ngà, kích thước dao động từ 0,3 đến 4 mm. Hầu hết, tế bào của vi khuẩn nội sinh trong cây rau Dệu có dạng hình que và Gram âm.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây rau Dệu

Vị khuẩn	Hình dạng khuẩn lạc	Dạng bìa	Độ nổi	Kích thước (mm)	Màu sắc	Hình dạng tế bào/ Gram
AS-L1	Tròn	Nguyên	Mô	1	Trắng ngà	Que/âm
AS-L2	Tròn	Nguyên	Mô	0,3	Trắng ngà	Que/âm
AS-L3	Tròn	Răng cưa	Lài	0,5	Trắng sữa	Que/âm
AS-R1	Tròn	Răng cưa	Mô	0,8	Trắng ngà	Cầu/âm
AS-R2	Tròn	Nguyên	Mô	4	Trắng sữa	Que/âm
AS-R3	Tròn	Răng cưa	Lài	1	Trắng ngà	Cầu/dương
AS-R4	Tròn	Nguyên	Mô	1	Vàng nhạt	Que/âm
AS-R5	Tròn	Nguyên	Mô	0,8	Trắng sữa	Que/dương
AS-S1	Tròn	Răng cưa	Mô	0,5	Trắng ngà	Que/âm
AS-S2	Tròn	Nguyên	Lài	0,4	Vàng nhạt	Que/âm
AS-S3	Tròn	Nguyên	Mô	1	Trắng ngà	Que/dương
AS-S4	Tròn	Nguyên	Mô	2	Vàng nhạt	Cầu/ âm

3.2. Khả năng sản sinh polyphenol và flavonoid của vi khuẩn nội sinh trong cây rau Dệu

Polyphenol và flavonoid là những hợp chất chuyển hóa thứ cấp phổ biến ở thực vật và được ứng dụng nhiều trong dược phẩm và mỹ phẩm. Những hợp chất thuộc nhóm polyphenol và flavonoid cho thấy, vai trò quan trọng trong ức chế hoạt động của enzyme tyrosinase [11]. Vi khuẩn nội sinh thực vật được chứng minh có khả năng sản sinh polyphenol và flavonoid [12]. Do đó, nhóm nghiên cứu đã tiến hành xác định khả năng sản sinh polyphenol và flavonoid của vi khuẩn nội sinh trong cây rau Dệu. Hàm lượng polyphenol và flavonoid mà các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây rau Dệu sản sinh được trình bày trong Hình 1. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây rau Dệu có khả năng sản sinh polyphenol với hàm lượng dao động từ 32,15±0,51 đến 77,28±1,34 mg GAE/mL dịch ngoại bào và flavonoid với hàm lượng dao động từ 24,24±0,77 đến 60,85±1,55 mg QE/mL dịch ngoại bào. Trong đó, dòng vi khuẩn AS-R2, AS-R4 và AS-L1 có khả năng sản sinh polyphenol và flavonoid nhiều hơn các dòng vi khuẩn còn lại.

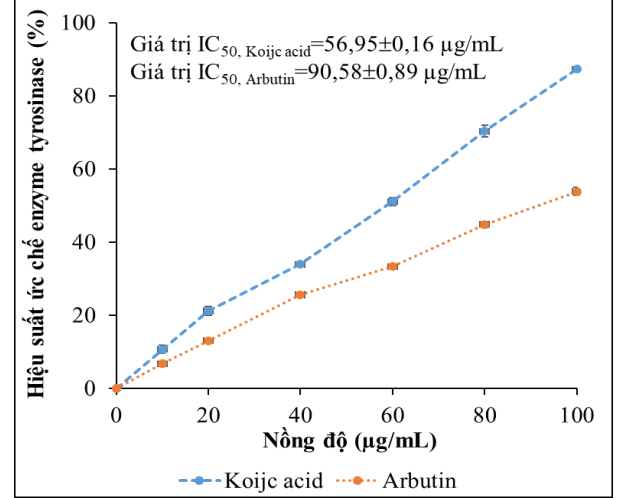


Hình 1. Hàm lượng polyphenol, flavonoid của vi khuẩn nội sinh

3.3. Khả năng ức chế enzyme tyrosinase của vi khuẩn nội sinh

Sự tổng hợp melanin quá mức liên quan đến nhiều khía cạnh tiêu cực trong cuộc sống, chẳng hạn như tăng sắc tố ở lớp biểu bì, ảnh hưởng đến thẩm mỹ và làm tăng đáng kể nguy cơ u ác tính và hiện tượng hóa nâu của enzyme trong trái cây và rau củ, dẫn đến giảm giá trị dinh dưỡng. Tyrosinase là enzyme chủ chốt trong quá trình sinh tổng hợp melanin và xúc tác hai loại phản ứng: (1) hoạt động của monophenolase để chuyển L-tyrosine thành 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) và (2) hoạt tính diphenolase để oxy hóa L-DOPA thành o-dopaquinone. Ức chế hoạt động của tyrosinase là một cách hiệu quả và quan trọng để tránh sự tổng hợp melanin [12]. Hiệu suất ức chế enzyme tyrosinase của dịch ngoại bào chiết xuất từ vi khuẩn nội sinh trong cây rau Dệu đã được xác định và trình bày trong Bảng 2. Vi khuẩn nội sinh trong cây rau Dệu có hiệu suất ức chế enzyme tyrosinase dao động từ 13,08±2,82 đến 64,91±0,90%. Kojic acid và arbutin là những chất làm mất sắc tố, chất ức chế enzyme tyrosinase hiệu quả thường được sử dụng làm đối chứng dương trong sàng lọc các thành phần hoặc chiết xuất mới có tác dụng ức chế tổng hợp melanin [14]. Hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase của kojic acid và arbutin được trình bày trong Hình 2. Kết quả nghiên cứu cho thấy, kojic acid và arbutin có hiệu suất ức chế enzyme tyrosinase dao động từ 6,74±0,66 đến 87,24±0,39%. Trong đó, kojic acid (IC_{50} =56,95±0,16 µg/mL) cho thấy hiệu quả ức chế enzyme tyrosinase tốt hơn arbutin (IC_{50} =90,58±0,89 µg/mL) 1,59 lần. Dựa vào phương trình đường chuẩn của kojic acid và arbutin, nhóm nghiên cứu đã xác định được hàm lượng chất ức chế enzyme tyrosinase tương đương với kojic acid và arbutin trình bày trong Bảng 2. Vi khuẩn nội sinh có khả năng sản sinh chất ức chế enzyme tyrosinase dao động từ 84,21±13,97 đến 341,17±4,45 mg KAE/mL dịch ngoại bào đối với chất chuẩn là kojic acid hoặc dao động từ 140,61±22,06 đến 546,33±7,03 mg AE/mL dịch ngoại bào đối với chất chuẩn là arbutin. Nghiên cứu còn cho thấy, các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây rau Dệu có khả năng sản sinh polyphenol, flavonoid nhiều thì có khả năng ức chế enzyme tyrosinase cao. Cụ thể, dòng vi khuẩn AS-R2, AS-R4 và AS-L1 có hiệu suất và hàm lượng chất ức chế enzyme tyrosinase cao hơn các dòng vi khuẩn nội sinh còn lại, phù hợp với kết quả định lượng polyphenol và flavonoid trong mục 3.2. Như vậy, hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase của vi khuẩn nội sinh trong cây rau Dệu phụ thuộc vào hàm lượng các chất chuyển hóa thứ cấp mà cụ thể ở đây là polyphenol và flavonoid. Một số polyphenol, flavonoid đã được chứng minh là ức chế sự hoạt động của enzyme tyrosinase thông qua tác động đến con đường truyền tín hiệu (quá trình phosphoryl hóa protein MITF, AMPK và MAPK, CREB và p38) [15], thúc đẩy sản xuất các enzyme chống oxy hóa nội bào (UDP-glucuronosyltransferase, sulfotransferase, N-acetyltransferase, glutathione S-transferase, superoxide dismutase, catalase và methyltransferase) [16]. Ngoài ra, polyphenol, flavonoid có thể ức chế hoạt động của enzyme tyrosinase nhờ vào hoạt động tạo phức với kim loại do cấu trúc phenolic polyhydroxyl hóa đặc trưng chúng, có thể kết

hợp với các ion đồng của vị trí hoạt động của enzyme tyrosinase [17].



Hình 2. Hoạt tính ức chế tyrosinase của kojic acid, arbutin
Bảng 2. Khả năng ức chế enzyme tyrosinase của vi khuẩn nội sinh

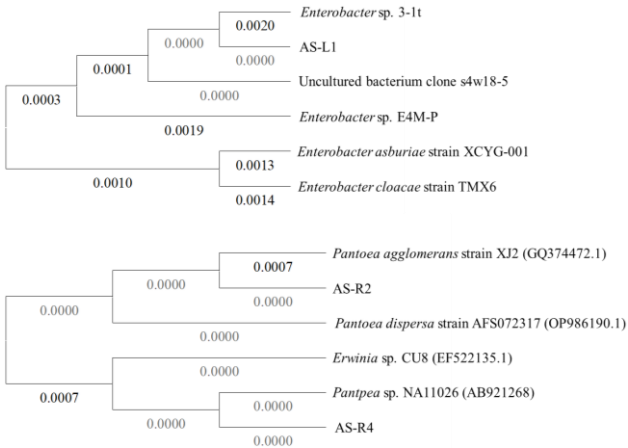
Vi khuẩn	Hiệu suất ức chế enzyme tyrosinase (%)	Hàm lượng chất ức chế enzyme tyrosinase tương đương kojic acid (mg KAE/mL)	Hàm lượng chất ức chế enzyme tyrosinase tương đương arbutin (mg AE/mL)
AS-L1	59,36 ^b ±0,36	313,68 ^b ±1,78	502,92 ^b ±2,81
AS-L2	19,06 ^g ±1,76	113,84 ^g ± 8,70	187,39 ^g ±13,74
AS-L3	13,08 ^b ±2,82	84,21 ^h ±13,97	140,61 ^h ±22,06
AS-R1	27,79 ^f ±0,70	157,14 ^f ±3,46	255,75 ^f ±5,46
AS-R2	64,91 ^a ±0,90	341,17 ^a ±4,45	546,33 ^a ±7,03
AS-R3	33,57 ^e ±1,96	185,78 ^e ±9,73	300,97 ^e ±15,36
AS-R4	61,99 ^{ab} ±0,65	326,68 ^{ab} ±3,21	523,46 ^{ab} ±5,07
AS-R5	43,89 ^d ±1,29	236,97 ^d ±6,37	381,81 ^d ±10,06
AS-S1	36,92 ^e ±1,15	202,40 ^e ±5,68	327,23 ^e ±8,97
AS-S2	51,76 ^c ±0,77	275,98 ^c ±3,84	443,40 ^c ±6,06
AS-S3	47,44 ^d ±1,00	254,58 ^d ±4,97	409,62 ^d ±7,85
AS-S4	34,13 ^e ±1,55	188,58 ^e ±7,69	305,39 ^e ±12,14

Ghi chú: Các giá trị có mẫu tự (a, b, c, d,...) theo sau trong cùng một cột giống nhau khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5%.

3.4. Định danh dòng vi khuẩn nội sinh tiềm năng

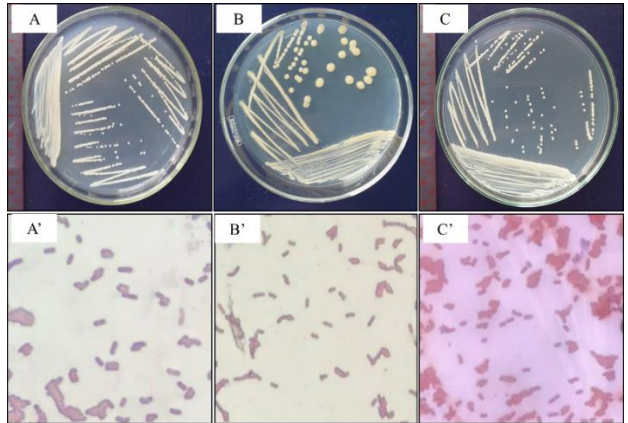
Kết quả khảo sát cho thấy, dòng vi khuẩn AS-R2, AS-R4 và AS-L1 có khả năng sản sinh polyphenol, flavonoid và ức chế enzyme tyrosinase hiệu quả hơn các dòng vi khuẩn còn lại. Do đó, dòng vi khuẩn AS-R2, AS-R4 và AS-L1 đã được chọn để giải trình gene 16S RNA. Trình tự gene 16S RNA của dòng vi khuẩn AS-R2, AS-R4 và AS-L1 được so sánh với trình tự của các dòng vi khuẩn trong ngân hàng gene bằng phần mềm BLASTN của NCBI (National Center for Biotechnology Information). Kết quả định danh được trình bày trong Bảng 3 cho thấy, dòng vi khuẩn AS-R2, AS-R4 và AS-L1 có mức độ tương đồng cao lần lượt với dòng vi khuẩn *Enterobacter* sp. 3-1t, *Pantoea agglomerans* strain XJ2 và *Pantoea* sp. NA11026. Như vậy, dòng vi khuẩn AS-L1 thuộc chi *Enterobacter* còn dòng vi khuẩn AS-R2 và AS-R4 thuộc chi *Pantoea*. Đặc điểm hình thái và cây phát sinh chủng loài của dòng vi khuẩn AS-R2, AS-R4 và AS-L1 lần lượt được trình bày

trong Bảng 1, Hình 3 và Hình 4. Dòng vi khuẩn AS-R2, AS-R4 và AS-L1 được mô tả là có tế bào hình que và Gram âm phù hợp với kết quả định danh (chi *Pantoea* và *Enterobacter* có tế bào hình que, Gram âm). Cây phát sinh chủng loài cũng cho thấy, dòng vi khuẩn AS-L1, AS-R2 và AS-R4 lần lượt nằm cùng nhánh với vi khuẩn *Enterobacter* sp. 3-1t, *Pantoea agglomerans* strain XJ2 và *Pantoea* sp. NA11026. Như vậy, vi khuẩn AS-L1, AS-R2 và AS-R4 sống nội sinh trong cây rau Dệu có khả năng sản sinh polyphenol, flavonoid, ức chế enzyme tyrosinase được định danh là *Enterobacter* sp. AS-L1, *Pantoea* sp. AS-R2 và *Pantoea* sp. AS-R4.



Hình 3. Cây phát sinh chủng loài dòng vi khuẩn AS-L1, AS-R2 và AS-R4 trong cây rau Dệu

Pantoea sp. MV-R3 sống nội sinh trong cây Cò sen (*Milusa velutina*) cho thấy, khả năng sản sinh polyphenol, flavonoid và chất kháng oxy hóa [15]. *Pantoea* sp. MV-R3 có khả năng sản sinh polyphenol, flavonoid lần lượt là 30,03±1,50 mg GAE/mL dịch ngoại bào và 21,40±1,07 QE/mL dịch ngoại bào. *Pantoea* sp. AS-R2, *Pantoea* sp. AS-R4 có khả năng sản sinh polyphenol nhiều lần lượt gấp 2,57 và 2,28 lần so với *Pantoea* sp. MV-R3; flavonoid nhiều lần lượt gấp 2,84 và 2,62 lần so với dòng vi khuẩn *Pantoea* sp. MV-R3.



Hình 4. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào của vi khuẩn AS-L1, AS-R2 và AS-R4

A, B, C lần lượt là đặc điểm hình thái khuẩn lạc của dòng vi khuẩn AS-L1, AS-R2 và AS-R4;
A', B', C' lần lượt là đặc điểm hình thái tế bào của dòng vi khuẩn AS-L1, AS-R2 và AS-R4.

Nghiên cứu của Trần Chí Linh và cộng sự đã phân lập được dòng vi khuẩn *Enterobacter* sp. CR-R2 và *Enterobacter* sp. CR-R3 có khả năng sản sinh polyphenol, flavonoid, chất kháng oxy hóa và chất kháng viêm [9]. Dòng vi khuẩn *Enterobacter* sp. CR-R2 và *Enterobacter* sp. CR-R3 có khả năng sản sinh polyphenol lần lượt là *Enterobacter* sp. CR-R2 và *Enterobacter* sp. CR-R3 112,60±1,67 và 110,55±0,25 mg GAE/mL dịch ngoại bào; flavonoid lần lượt là 22,76±0,32 và 21,89±0,31 QE/mL dịch ngoại bào. Trong nghiên cứu của nhóm tác giả, dòng vi khuẩn *Enterobacter* sp. AS-L1 có khả năng sản sinh polyphenol thấp hơn dòng vi khuẩn *Enterobacter* sp. CR-R2, *Enterobacter* sp. CR-R3 lần lượt là 1,75 và 1,71 lần. Tuy nhiên, dòng vi khuẩn *Enterobacter* sp. AS-L1 lại có khả năng sản sinh flavonoid hiệu quả hơn dòng vi khuẩn *Enterobacter* sp. CR-R2, *Enterobacter* sp. CR-R3 lần lượt là 2,30 và 2,40 lần. Vi khuẩn nội sinh thuộc chi *Pantoea* và *Enterobacter* có khả năng sản sinh các hợp chất chuyển hóa thứ cấp sở hữu nhiều hoạt tính sinh học.

Bảng 3. Kết quả nhận diện các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây rau Dệu

Dòng	Loài tương đồng	Chiều dài đoạn gene	Độ phủ (%)	Mức độ tương đồng (%)	Accession number
AS-L1	<i>Enterobacter</i> sp. 3-1t	1503	100	100	EU543690.1
AS-R2	<i>Pantoea agglomerans</i> strain XJ2	1500	100	100	GQ374472.1
AS-R4	<i>Pantoea</i> sp. NA11026	1503	100	100	AB921268.1

4. Kết luận

Nghiên cứu lần đầu tiên phân lập được 12 dòng vi khuẩn nội sinh trong cây rau Dệu để đánh giá hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase. Sau khi thực hiện các khảo sát khả năng sản sinh hàm lượng polyphenol, flavonoid, ức chế hoạt động của enzyme tyrosinase đã tuyển chọn được 3 dòng vi khuẩn tiềm năng là AS-L1, AS-R2 và AS-R4 lần lượt thuộc chi *Enterobacter*, *Pantoea*. Kết quả nghiên cứu là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo trong việc ly trích chất ức chế enzyme tyrosinase từ vi khuẩn nội sinh trong cây rau Dệu ứng dụng trong sản xuất mỹ phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] L. Wu, C. Chen, C. Cheng, H. Dai, Y. Ai, C. Lin, and Y. Chung, "Evaluation of tyrosinase inhibitory, antioxidant, antimicrobial, and antiaging activities of *Magnolia officinalis* extracts after *Aspergillus niger* fermentation", *BioMed Research International*, vol. 15, p. 5201786, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5201786>.

[2] J. K. Liu, "Natural products in cosmetics", *Natural Products and Bioprospecting*, vol. 12, no. 1, p. 40, 2022. <https://doi.org/10.1007/s13659-022-00363-y>.

[3] Z. Narayanan and B. R. Glick, "Secondary metabolites produced by plant growth-promoting bacterial endophytes", *Microorganisms*, vol. 10, no. 10, p. 2008, 2022. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102008>.

[4] S. Kota, V. R. Govada, R. K. Anantha, and M. K. Verma, "An investigation into phytochemical constituents, antioxidant, antibacterial and anti-cataract activity of *Alternanthera sessilis*, a predominant wild leafy vegetable of South India", *Biocatalysis and*

- Agricultural Biotechnology*, vol. 10, pp. 197-203, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.03.008>.
- [5] K. Muniandy, S. Gothai, and W. S. Tan, "In vitro wound healing potential of stem extract of *Alternanthera sessilis*", *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2018a, pp. 1-13, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3142073>.
- [6] K. Muniandy, S. Gothai, K. M. H. Badran, S. S. Kumar, N. M. Esa, and P. Arulselvan, "Suppression of proinflammatory cytokines and mediators in LPS-induced RAW 264.7 macrophages by stem extract of *Alternanthera sessilis* via the inhibition of the NF- κ B pathway", *Journal of Immunology Research*, vol. 2018b, pp. 1-12, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3430684>.
- [7] R. N. N. Mohd, S. S. Teh, S. H. Mah, Y. K. Yong, C. T. Ng, Y. M. Lim, and L. Y. Fong, "Protective effects of *Alternanthera sessilis* ethanolic extract against TNF- α or H₂O₂-induced endothelial activation in human aortic endothelial cells", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 8738435, pp. 1-12, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/8738435>.
- [8] B. Basumatary, D. Das, B. N. Choudhury, P. Dutta, and A. Bhattacharyya, "Isolation and characterization of endophytic bacteria from tomato foliage and their *in vitro* efficacy against root-knot nematodes", *Journal of Nematology*, vol. 53, pp. e2021-2104, 2021. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2021-104>.
- [9] C. L. Tran, L. T. Ta, T. K. N. Nguyen, H. L. Vo, K. N. Tran, K. N. Ly, T. T. Nguyen, and V. T. Huynh, "Investigation of *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of endophytic bacteria in *Catharanthus roseus*", *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 229, no. 10, 254-261, 2024. <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.10250>.
- [10] E. T. Arung, I. W. Kusuma, Y. M. Iskandar, S. Yasutake, K. Shimizu, and R. Kondo, "Screening of Indonesian plants for tyrosinase inhibitory activity", *Journal of Wood Science*, vol. 51, pp. 520-525, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10086-004-0690-7>.
- [11] H. D. Kim, H. Choi, H., F. Abekura, Y. J. Park, W. S. Yang, S. H. Yang, and C. H. Kim, "Naturally-occurring tyrosinase inhibitors classified by enzyme kinetics and copper chelation", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, no. 9, p. 8226, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24098226>.
- [12] P. P. Tshikhudo, K. Ntushelo, and F. N. Mudau, "Sustainable applications of endophytic bacteria and their physiological/biochemical roles on medicinal and herbal plants: Review", *Microorganisms*, vol. 11, no. 2, p. 453, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020453>.
- [13] W. Wang, Y. Gao, W. Wang, J. Zhang, J. Yin, T. Le, J. Xue, U. H. Engelhardt, and H. Jiang, "Kojic acid showed consistent inhibitory activity on tyrosinase from mushroom and in cultured b16f10 cells compared with arbutins", *Antioxidants (Basel)*, vol. 11, no. 3, p. 502, 2022. <https://doi.org/10.3390/antiox11030502>.
- [14] S. Zolghadri, A. Bahrami, M. T. Hassan Khan, J. Munoz-Munoz, F. Garcia-Molina, F. Garcia-Canovas, and A. A. Saboury, "A comprehensive review on tyrosinase inhibitors", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 34, no. 1, pp. 279-309, 2019. <https://doi.org/10.1080%2F14756366.2018.1545767>.
- [15] H. A. S. El-Nashar, M. I. G. El-Din, L. Hritcu, and O. A. Eldahshan, "Insights on the inhibitory power of flavonoids on tyrosinase activity: A survey from 2016 to 2021", *Molecules*, vol. 26, no. 24, p. 7546, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26247546>.
- [16] D. Procházková, I. Boušová, and N. Wilhelmová, "Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids", *Fitoterapia*, vol. 82, pp. 513-523, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>.
- [17] V. Jacob, T. Hagai, and K. Soliman, "Structure-activity relationships of flavonoids", *Current Organic Chemistry*, vol. 15, pp. 2641-2657, 2011. <http://dx.doi.org/10.2174/138527211796367309>.
- [18] T. T. X. Dai, T. T. Chau, T. P. T. Truong, C. L. Tran, and N. T. K. Nguyen, "Isolating *Miliusa velutina* endophytic bacteria to generate antioxidants and optimizing culture conditions for antioxidant production", *South African Journal of Botany*, vol. 166, pp. 561-570, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.01.052>.