

KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG OXY HÓA VÀ ỨC CHẾ ENZYME TYROSINASE CỦA VI KHUẨN NỘI SINH PHÂN LẬP TỪ CÂY DỪA CẠN (*CATHARANTHUS ROSEUS*)

INVESTIGATION OF THE ANTIOXIDANT AND TYROSINASE INHIBITORY ACTIVITIES FROM ENDOPHYTIC BACTERIA IN *CATHARANTHUS ROSEUS*

Trần Chí Linh^{1*}, Nguyễn Huỳnh Bích Liễu¹, Lê Thị Xuân Diễm², Dương Tuyết Ngân³, Nguyễn Thị Hồng Hạnh⁴

¹Trường Đại học Nam Cần Thơ, Việt Nam

²Trường Trung học Phổ thông Lê Quý Đôn, Việt Nam

³Trường Đại học Y dược Cần Thơ, Việt Nam

⁴Trường Đại học Đồng Tháp, Việt Nam

*Tác giả liên hệ / Corresponding author: tclinh@ctu.edu.vn

(Nhận bài / Received: 01/11/2024; Sửa bài / Revised: 06/01/2025; Chấp nhận đăng / Accepted: 07/01/2025)

DOI: 10.31130/ud-jst.2025.463

Tóm tắt - Nghiên cứu được tiến hành nhằm xác định hoạt tính kháng oxy hóa và ức chế tyrosinase của dịch ngoại bào từ vi khuẩn nội sinh trong cây dứa dại. Dịch ngoại bào của vi khuẩn nội sinh trong cây dứa dại được xác định về hoạt tính kháng oxy hóa bằng cách trung hòa gốc tự do 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), tiềm năng khử và ức chế sự hình thành gốc tự do nitric oxide. Dịch ngoại bào của vi khuẩn nội sinh trong cây dứa dại chứa chất kháng oxy hóa với hàm lượng dao động từ 33,99±7,06 đến 593,41±2,54 mg TE/mL dịch ngoại bào. Dịch ngoại bào của vi khuẩn nội sinh trong cây dứa dại chứa chất ức chế enzyme tyrosinase với hàm lượng dao động từ 239,20±2,99 đến 354,14±0,78 KAE/mL dịch ngoại bào. Đồng vi khuẩn nội sinh có hoạt tính cao nhất được xác định là *Bacillus* sp. CR-L2. Do đó, dịch ngoại bào của vi khuẩn nội sinh trong cây dứa dại cho thấy, tiềm năng khai thác chất kháng oxy hóa tự nhiên và chất ức chế enzyme tyrosinase.

Từ khóa - Dứa dại; enzyme tyrosinase; kháng oxy hóa; melanin; vi khuẩn nội sinh.

1. Đặt vấn đề

Tăng sắc tố là một sự sẫm màu bất thường của da, chủ yếu bắt nguồn từ sản xuất melanin quá mức. Đây là điển hình của các rối loạn da bao gồm nám liên quan đến mang thai hoặc tuổi tác, tàn nhang, đốm đồi mồi và dày sừng actinic. Tyrosinase (EC 1.14.18.1) là enzyme giới hạn tốc độ tổng hợp melanin và là mục tiêu chính của các biện pháp chống tăng sắc tố. Enzyme này chủ yếu tham gia vào hai phản ứng riêng biệt của quá trình tổng hợp melanin, còn được gọi là con đường Raper-Mason. Thứ nhất, hydroxyl hóa monophenol và thứ hai là chuyển đổi o-diphenol thành o-quinone tương ứng. o-Quinone trải qua một số phản ứng để cuối cùng hình thành melanin [1]. Tyrosinase là một enzyme chứa đồng có trong các mô thực vật và động vật xúc tác cho việc sản xuất melanin và các sắc tố khác từ tyrosine bằng quá trình oxy hóa. Bên cạnh những vấn đề

Abstract - The study was conducted to determine the antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of cell-free supernatant extracted from endophytic bacteria in *Catharanthus roseus*. The cell-free supernatant extracted from endophytic bacteria in *Catharanthus roseus* was determined for its antioxidant activity by neutralizing the free radical 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), ferric reducing-antioxidant power, and the inhibition of nitric oxide free radicals formation. The cell-free supernatant extracted from endophytic bacteria in *Catharanthus roseus* contains antioxidants with concentrations ranging from 33.99±7.06 to 593.41±2.54 mg TE/mL cell-free supernatant. The cell-free supernatant extracted from endophytic bacteria in *Catharanthus roseus* contains tyrosinase enzyme inhibitors with concentrations ranging from 239.20±2.99 to 354.14±0.78 KAE/mL cell-free supernatant. The endogenous bacterial strains with the highest activity was identified as *Bacillus* sp. CR-L2. Thus, cell-free supernatant extracted from endophytic bacteria in *Catharanthus roseus* shows the potential to exploit natural antioxidants and tyrosinase enzyme inhibitors.

Key words - Antioxidant; *Catharanthus roseus*; endophytic bacteria; enzyme tyrosinase; melanin.

nêu trên thì stress oxy hóa cũng ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp melanin của cơ thể. Stress oxy hóa đóng một vai trò thiết yếu trong sinh lý bệnh hắc tố. Một trong những lý do cho mức oxy hoạt động (ROS) cao là việc sản xuất hydro peroxide và tiêu thụ glutathione giảm (GSH) trong quá trình tạo melanin [2]. Các chất kháng oxy hóa từ lâu đã được chứng minh có khả năng ức chế quá trình hình thành melanogenesis bằng cách giảm mức hàm lượng các gốc tự do thuộc nhóm oxy hóa hoạt động và nitơ hoạt động trong tế bào [3]. Đồng thời, các chất chống oxy hóa đã được chứng minh có khả năng làm chậm hoặc trì hoãn quá trình lão hóa [4]. Điều này thúc đẩy các nhà khoa học nghiên cứu để phát hiện nguồn cung cấp chất kháng oxy hóa và ức chế enzyme tyrosinase. Hiện nay, nhiều sự quan tâm tập trung vào các hợp chất có thể kháng oxy hóa và ức chế hoạt động tyrosinase, đặc biệt là các sản phẩm tự nhiên, có nhu

¹ Nam Can Tho University, Vietnam (Tran Chi Linh, Nguyen Huynh Bich Lieu)

² Le Qui Don High school, Vietnam (Le Thi Xuan Diem)

³ Can Tho University of Medicine and Pharmacy, Vietnam (Duong Tuyen Ngan)

⁴ Dong Thap University, Vietnam (Nguyen Thi Hong Hanh)

cần ngày càng tăng trong các lĩnh vực mỹ phẩm và ứng dụng được phẩm.

Trong những năm gần đây, con người có nhu cầu sử dụng các hợp chất có hoạt tính sinh học từ thiên nhiên trong chăm sóc sức khỏe và mỹ phẩm. Vi khuẩn cư trú bên trong các mô thực vật, được gọi là endophyte, có khả năng sản sinh ra nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học. 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 [5]. Dừa cạn loài thực vật phân bố phổ biến ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long. Dừa cạn là một cây thuốc có vị hơi đắng, tính mát, tác dụng hoạt huyết, tiêu thũng, hạ huyết áp, giải độc, thông tiểu tiện, chữa huyết áp cao, tiêu hóa kém, tẩy giun và hạ sốt. Dừa cạn có khả năng kháng oxy hóa [6], kháng khuẩn [7] và gây độc tế bào ung thư [8]. Vi khuẩn nội sinh thực vật được sử dụng để khai thác chất kháng oxy hóa và ức chế enzyme tyrosinase có nhiều lợi thế hơn khi sử dụng thực vật, vì vi khuẩn nội sinh có thể dễ dàng được sản xuất trong điều kiện phòng thí nghiệm, ít tốn kém và rút ngắn thời gian sản xuất hơn so với thực vật. Nghiên cứu mở ra hướng mới về nguồn hợp chất chuyển hóa thứ cấp của vi khuẩn nội sinh trong cây dừa cạn có khả năng kháng oxy hóa và 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

Nghiên cứu này sử dụng các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây dừa cạn đã được mô tả và định danh trong nghiên cứu trước đây của nhóm tác giả [9].

Môi trường Potato Dextrose Broth (PDB) và Potato Dextrose Agar (PDA) của hãng Himadia, Ấn Độ được sử dụng để nuôi cấy và phân lập vi khuẩn nội sinh. Enzyme tyrosinase, L-3,4-dihydroxyphenylalanine, acid kojic, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, iron (III) chloride và 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine được cung cấp từ hãng Sigma-Aldrich của Mỹ. Nitroprusside, kali persulfat, 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), sodium acetate, acetic acid được cung cấp bởi hãng Merck của Đức.

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 (Thermo Scientific Multiskan GO, Phần Lan), bếp điện từ (SHD 6800, Shunhouse, 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 ước (SA-300VL, Sturdy Industrial Co., Ltd, Đài Loan) và một thiết bị khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nuôi cấy và thu lấy dịch ngoại bào của các dòng vi khuẩn nội sinh

Các dòng vi khuẩn nội sinh được nuôi cấy trong môi trường PDB để thu lấy dịch ngoại bào bằng cách cấy chủng 0,4 mL của dòng vi khuẩn nội sinh ($OD_{600}=0,5$) vào 19,6 mL môi trường PDB, pH 7. Sau đó, các dòng vi khuẩn nội sinh được nuôi tăng sinh trên máy lắc ngang 200 vòng/phút

trong 24 giờ ở 30°C. Sau đó, dịch nuôi tăng sinh được ly tâm 3000 vòng/phút trong 15 phút loại bỏ tế bào thu được dịch ngoại bào. Dịch ngoại bào được lưu trữ trong lọ thủy tinh ở 4°C sử dụng cho khảo sát tiếp theo trong 24 giờ [9].

2.2.2. Khảo sát khả năng kháng oxy hóa in vitro

Khảo sát hiệu quả trung hòa gốc tự do ABTS^{•+}: Hoạt tính kháng oxy hóa của các dòng vi khuẩn nội sinh được xác định bằng phương pháp khử màu ABTS^{•+} được mô tả bởi Tran et al. có hiệu chỉnh [10]. ABTS^{•+} được tạo ra do phản ứng ABTS 7 mM với 2,45 mM kali persulfate ($K_2S_2O_8$). Hỗn hợp được ủ trong tối ở nhiệt độ phòng 16 giờ trước khi sử dụng. Sau đó, hỗn hợp được pha loãng để đạt mật độ quang ở bước sóng 734 nm là $0,70 \pm 0,05$. Khảo sát được tiến hành bằng cách cho 10 μ L dịch ngoại bào, sau thêm 990 μ L ABTS^{•+} ở nhiệt độ 37°C trong 6 phút, độ hấp thụ quang phổ được đo ở bước sóng 734 nm. Hàm lượng chất trung hòa gốc tự do ABTS^{•+} được biểu thị bằng mg đương lượng trolox trên mL dịch ngoại bào của vi khuẩn nội sinh dựa vào phương trình: $y = -0,0911x + 0,7033$ ($R^2 = 0,9951$) của trolox (mg TE/mL dịch ngoại bào).

Khảo sát khả năng ức chế sự hình thành nitric oxide ($NO^{\cdot}$): Khả năng ức chế sự hình thành nitric oxide của các dòng vi khuẩn nội sinh được thực hiện theo mô tả bởi Tran et al. có hiệu chỉnh [10]. Khảo sát được thực hiện bằng cách cho 100 μ L dịch ngoại bào của các dòng vi khuẩn nội sinh vào 200 μ L sodium nitroprusside 5 mM và ủ sáng 60 phút ở 25°C. Sau đó, thêm 300 μ L thuốc thử Griess (1% sulfanilamide, 2% H_3PO_4 và 0,1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride). Độ hấp thụ quang phổ được đo ở bước sóng 546 nm. Hàm lượng chất ức chế sự hình thành nitric oxide được biểu thị bằng mg đương lượng trolox trên mL dịch ngoại bào của vi khuẩn nội sinh dựa vào phương trình: $y = -0,0062x + 1,0414$ ($R^2 = 0,9933$) của trolox (mg TE/mL dịch ngoại bào).

Khảo sát tiềm năng khử (FRAP): Khả năng kháng oxy hóa của các dòng vi khuẩn nội sinh được xác định bằng cách xác định tiềm năng khử sắt theo mô tả của Tran et al. có hiệu chỉnh [10]. Khảo sát được thực hiện bằng cách cho 10 μ L dịch ngoại bào của các dòng vi khuẩn nội sinh, sau đó thêm 990 μ L dung dịch FRAP và ủ tối trong 30 phút, độ hấp thụ quang phổ được đo ở bước sóng 593 nm. Hàm lượng chất có tiềm năng khử được biểu thị bằng mg đương lượng trolox trên mL dịch ngoại bào của vi khuẩn nội sinh dựa vào phương trình: $y = 0,0602x + 0,0151$ ($R^2 = 0,9977$) của trolox (mg TE/mL dịch ngoại bào).

2.2.3. Khảo sát khả năng ức chế enzyme tyrosinase

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 et al. có điều chỉnh [11]. 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. Acid kojic là những chất ức chế enzyme tyrosinase đã biết, được sử dụng làm đối chứng dương cho thử nghiệm. Bên cạnh

đó, hàm lượng chất ức chế enzyme tyrosinase được biểu thị bằng mg đường lượng acid kojic trên mL dịch ngoại bào của vi khuẩn nội sinh dựa vào phương trình: $y = -0,009x + 1,0432$ ($R^2 = 0,9975$) của acid kojic (mg KAE/mL dịch ngoại bào).

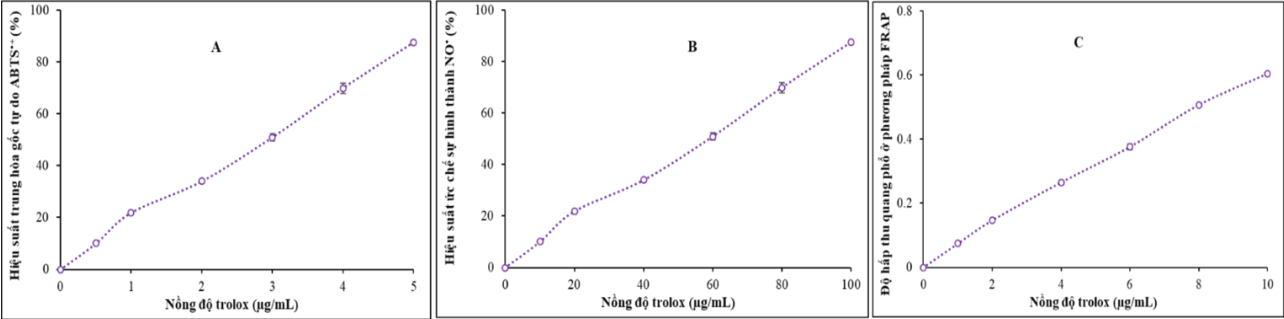
2.2.4. Thống kê và phân tích số liệu

Dữ liệu được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ sai số chuẩn của thí nghiệm với ba lần lặp lại. Các số liệu được phân tích phương sai (ANOVA) với kiểm định Tukey's bằng phần mềm Minitab 16 (Sydney, NSW, Australia), sự khác biệt được xác định có ý nghĩa thống kê ở mức 5% ($p < 0,05$).

3. Kết quả nghiên cứu và khảo sát

3.1. Khả năng kháng oxy hóa in vitro

Gốc tự do là nguyên nhân của nhiều bệnh tật và sự lão hóa. Vì vậy, để ngăn ngừa bệnh tật và làm chậm quá trình lão hóa, cần sử dụng càng nhiều chất chống oxy hóa càng tốt để loại bỏ gốc tự do trong cơ thể. Các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây dừa cạn có chứa nhiều nhóm hợp chất chuyển hóa thứ cấp cho thấy tiềm năng kháng oxy hóa cao.



Hình 1. Hoạt tính kháng oxy hóa của trolox ở phương pháp ABTS^{•+} (A), NO[•] (B) và FRAP (C)

Phương pháp trung hòa gốc tự do ABTS^{•+} được định nghĩa là một phương pháp dựa trên sự chuyển điện tử được sử dụng để đo tổng khả năng kháng oxy hóa của các hợp chất bằng cách giảm gốc ABTS^{•+} màu xanh dương thành ABTS không màu, có thể được xác định bằng quang phổ UV-Vis. Trong nghiên cứu này, hàm lượng chất kháng oxy hóa theo phương pháp ABTS được tính bằng cách quy về lượng tương đương chất chuẩn trolox với phương trình tuyến tính $y = -0,0911x + 0,7033$ kết quả được biểu diễn bằng mg TE/mL dịch ngoại bào. Cụ thể, với sự khác biệt ở độ tin cậy 95% thì hàm lượng chất trung hòa gốc tự do ABTS^{•+} của dòng vi khuẩn CR-L2 cho giá trị cao nhất với hàm lượng chất có khả năng trung hòa gốc tự do ABTS^{•+} là 326,34 $\pm$ 2,20 mg TE/mL dịch ngoại bào.

Phương pháp ức chế sự hình thành gốc tự do NO[•] dựa trên nitrate có trong mẫu được khử thành nitrite bằng cách giảm nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) với sự có mặt của enzyme nitrate reductase (NR). Nitrit hình thành phản ứng với sulfanilamide và N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride để tạo ra thuốc nhuộm diazo màu đỏ tím. Hàm lượng chất có khả năng ức chế sự hình thành gốc tự do NO[•] được tính bằng cách quy về lượng tương đương chất chuẩn trolox với phương trình tuyến tính $y = -0,0062x + 1,0414$ kết quả được biểu diễn bằng mg TE/mL dịch ngoại bào. Kết quả ở Bảng 1 cho thấy, dòng vi

Kết quả đánh giá tiềm năng kháng oxy hóa của các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây dừa cạn được thực hiện thông qua 3 phương pháp (ABTS^{•+}, NO[•] và FRAP) và dựa vào phương trình đường chuẩn được dựng bằng trolox.

Trolox là một chất kháng oxy hóa có thể hòa tan trong nước tổng hợp thường được sử dụng rất phổ biến để làm chất kháng oxy hóa tiêu chuẩn trong các thử nghiệm kháng oxy hóa. Hoạt tính kháng oxy hóa của trolox ở phương pháp ABTS^{•+}, NO[•] và FRAP được trình bày trong Hình 1. Kết quả nghiên cứu cho thấy, trolox có khả năng trung hòa gốc tự do ABTS^{•+} với hiệu suất dao động từ 5,85 $\pm$ 0,45 đến 66,55 $\pm$ 0,39% trong khoảng nồng độ khảo sát từ 0,5 đến 5 µg/mL (Hình 1A). Khả năng ức chế sự hình thành gốc tự do NO[•] của trolox đạt 5,87 $\pm$ 0,70% ở nồng độ 10 µg/mL và đạt 57,90 $\pm$ 0,28% ở nồng độ 100 µg/mL (Hình 1B). Kết quả trình bày ở Hình 1C cho thấy, trolox ở nồng độ từ 1 đến 10 đã làm cho độ hấp thụ quang phổ ở phương pháp FRAP tăng từ 0,074 $\pm$ 0,002 lên 0,604 $\pm$ 0,003. Kết quả nghiên cứu cho thấy, đã xác định được hàm lượng chất kháng oxy hóa của các dòng vi khuẩn nội sinh trong cây dừa cạn được trình bày trong Bảng 1.

khuẩn CR-L2 (467,52 $\pm$ 1,12 mg TE/mL dịch ngoại bào) có hàm lượng chất ức chế sự hình thành gốc tự do NO[•] vượt trội hơn các dòng vi khuẩn nội sinh còn lại.

Bảng 1. Hàm lượng chất kháng oxy hóa của vi khuẩn nội sinh trong cây dừa cạn

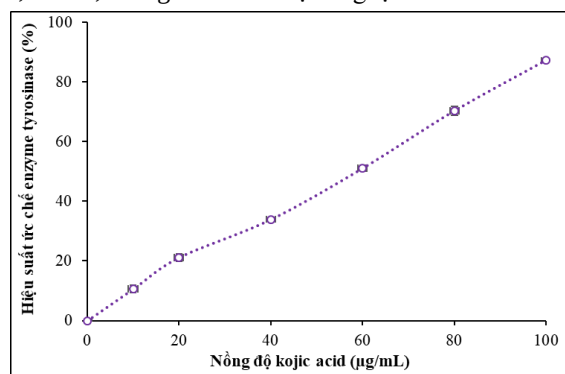
STT	Dòng vi khuẩn	Hàm lượng chất kháng oxy hóa (mg TE/mL dịch ngoại bào)		
		ABTS ^{•+}	NO [•]	FRAP
1	CR-L1	33,99 $\pm$ 7,06 ^f	107,59 $\pm$ 9,31 ^d	344,24 $\pm$ 3,84 ^e
2	CR-L2	326,34 $\pm$ 2,20 ^a	467,52 $\pm$ 1,12 ^a	593,41 $\pm$ 2,54 ^a
3	CR-L3	221,70 $\pm$ 13,99 ^d	330,05 $\pm$ 24,91 ^{bc}	464,40 $\pm$ 15,43 ^{cd}
4	CR-R1	238,16 $\pm$ 1,68 ^{bcd}	356,13 $\pm$ 1,48 ^b	484,33 $\pm$ 2,54 ^{bc}
5	CR-R2	246,94 $\pm$ 8,87 ^b	368,04 $\pm$ 9,67 ^b	496,51 $\pm$ 7,24 ^b
6	CR-R3	243,29 $\pm$ 9,59 ^{bc}	360,31 $\pm$ 10,42 ^b	491,53 $\pm$ 10,37 ^{bc}
7	CR-R4	226,82 $\pm$ 6,62 ^{cd}	343,57 $\pm$ 3,66 ^{bc}	477,69 $\pm$ 6,71 ^{bc}
8	CR-R5	239,26 $\pm$ 3,35 ^{bcd}	357,41 $\pm$ 3,66 ^b	490,97 $\pm$ 5,83 ^{bc}
9	CR-S1	229,02 $\pm$ 2,29 ^{bcd}	344,86 $\pm$ 2,43 ^{bc}	483,78 $\pm$ 12,58 ^{bc}
10	CR-S2	241,46 $\pm$ 1,68 ^{bc}	345,50 $\pm$ 30,42 ^{bc}	478,79 $\pm$ 20,77 ^{bc}
11	CR-S3	199,38 $\pm$ 3,53 ^e	310,41 $\pm$ 4,43 ^c	445,57 $\pm$ 3,46 ^d

Ghi chú: Các giá trị có m ẫu tự (a, b, c, d) theo sau giống nhau trong cùng một phương pháp thì khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ($p > 0,05$).

Tiềm năng khử của các dòng vi khuẩn nội sinh từ cây dừa cạn có thể được đánh giá dựa vào tiềm năng tạo thành phức chất với các ion kim loại, đặc biệt là sắt và đồng. Trong đó, các phức chất chứa sắt thường được sử dụng rộng rãi trong việc đánh giá hoạt tính kháng oxy hóa theo hướng khử các ion Fe^{3+} thành Fe^{2+} . Hàm lượng chất kháng oxy hóa theo phương pháp FRAP được tính bằng cách quy về lượng tương đương chất chuẩn trolox với phương trình tuyến tính $y = 0,0602x + 0,0151$ kết quả được biểu diễn bằng mg TE/mL dịch ngoại bào. Khả năng sản sinh chất có tiềm năng khử của dòng vi khuẩn CR-L2 ($593,41 \pm 2,54$ mg TE/mL dịch ngoại bào) được xác định là nhiều nhất, khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê so với các dòng vi khuẩn còn lại ($p < 0,05$). Và dòng vi khuẩn cho hàm lượng thấp nhất là dòng CR-L1 với giá trị hàm lượng chất có tiềm năng khử là $344,24 \pm 3,84$ mg TE/mL dịch ngoại bào, thấp hơn dòng vi khuẩn CR-L2 là 1,72 lần.

3.2. Khả năng ức chế enzyme tyrosinase in vitro

Melanin là một sắc tố sinh học thường có trong da hoặc lông người/động vật dưới dạng polymer. Tuy nhiên, lắng đọng melanin quá mức có thể gây ra sắc tố bất thường và gây ra các bệnh về da như chloasma và tàn nhang. Các sản phẩm làm trắng thương mại như hydroquinone, acid kojic và arbutin đã được sử dụng để kiểm soát sinh tổng hợp quá mức melanin. Tuy nhiên, việc sử dụng lâu dài các sản phẩm này có thể ảnh hưởng đến sức khỏe con người [12]. Các nghiên cứu hiện nay đã phát hiện ra rằng, một số chiết xuất từ vi khuẩn và thực vật có tác dụng ức chế melanin đáng kể. Trong nghiên cứu của nhóm tác giả, acid kojic đã được sử dụng để là chất đối chứng dương. Hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase của acid kojic được trình bày trong Hình 2. Kết quả cho thấy, acid kojic có hiệu suất ức chế hoạt động của enzyme tyrosinase dao động từ $10,64 \pm 1,14\%$ ở nồng độ $10 \mu\text{g/mL}$ đến $87,24 \pm 0,39\%$ ở nồng độ $100 \mu\text{g/mL}$. Hàm lượng chất ức chế enzyme tyrosinase của dịch ngoại bào chiết xuất từ vi khuẩn nội sinh trong cây dừa cạn đã được xác định dựa vào phương trình đường chuẩn của chất chuẩn acid kojic và trình bày trong Hình 3. Vi khuẩn nội sinh trong cây dừa cạn có khả năng sản sinh chất ức chế enzyme tyrosinase dao động từ $239,20 \pm 2,99$ đến $354,14 \pm 0,78$ mg KAE/mL dịch ngoại bào.

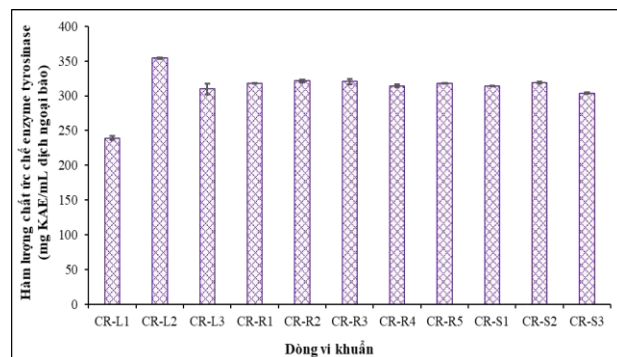


Hình 2. Hoạt tính ức chế tyrosinase của acid kojic

Trong nghiên cứu trước đây nhóm tác giả đã công bố, dòng vi khuẩn CR-L2 có khả năng sản sinh polyphenol ($132,97 \pm 0,62$ mg GAE/mL dịch ngoại bào) và flavonoid

($29,84 \pm 0,24$ mg QE/mL dịch ngoại bào) nhiều hơn các dòng vi khuẩn còn lại [9]. Điều này cho thấy, hoạt tính kháng oxy hóa (phương pháp ABTS, $\text{NO}^{\cdot}$ và FRAP) và ức chế enzyme tyrosinase có thể phụ thuộc bởi hàm lượng polyphenol, flavonoid.

Trong công bố trước đây dòng vi khuẩn CR-L2 cũng thể hiện hoạt tính kháng oxy hóa tốt nhất so với các dòng vi khuẩn còn lại ở phương pháp trung hòa gốc tự do (DPPH), năng lực khử (RP) và kháng oxy hóa tổng số (TAC) [9]. Kết quả này có sự tương đồng trong nghiên cứu này, khi mà dòng vi khuẩn CR-L2 vẫn có khả năng kháng oxy hóa tốt nhất ở phương pháp trung hòa gốc tự do ABTS, tiềm năng khử và ức chế sự hình thành gốc tự do $\text{NO}^{\cdot}$.



Hình 3. Hàm lượng chất ức chế enzyme tyrosinase

Kết quả định danh được nhóm công bố trước đây cho thấy dòng vi khuẩn CR-L2 thuộc chi *Bacillus* [9]. Các dòng vi khuẩn nội sinh thuộc chi *Bacillus* có khả năng sản sinh ra nhiều hợp chất chuyển hóa thứ cấp sở hữu hoạt tính sinh học đáng quý trong đó có kháng oxy hóa và ức chế enzyme tyrosinase [11, 13]. Các nghiên cứu trước đây đã cho thấy vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng sản sinh chất ức chế hoạt động của enzyme tyrosinase. Jin và cộng sự [14] đã phân lập được 691 dòng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* từ thực phẩm có nguồn gốc từ đậu nành. Các dòng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* đã được thử nghiệm ức chế enzyme tyrosinase. Nghiên cứu cho thấy, các dòng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng ức chế hoạt động của enzyme tyrosinase. Trong số các dòng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* được thử nghiệm có 5 dòng có khả năng sản sinh arbutin đáng kể đã được xác định là vi khuẩn *Bacillus subtilis* thông qua trình tự gene *16S rRNA* [14].

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã xác định được hoạt tính kháng oxy hóa và ức chế enzyme tyrosinase của 11 dòng vi khuẩn nội sinh trong cây dừa cạn. Sau khi thực hiện các khảo sát khả năng sản sinh chất kháng oxy hóa, ức chế hoạt động của enzyme tyrosinase đã cho thấy, dòng vi khuẩn CR-L2 thuộc chi *Bacillus* có hoạt tính kháng oxy hóa và ức chế enzyme tyrosinase hiệu quả nhất. Hoạt tính kháng oxy hóa và ức chế enzyme tyrosinase cho thấy, tiềm năng sử dụng các chiết xuất từ vi khuẩn nội sinh trong chăm sóc sức khỏe. 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 dừa cạn ứng dụng trong sản xuất mỹ phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C. M. Kumar, U. V. Sathisha, S. Dharmesh, A. A. Rao, and S. A. Singh, "Interaction of sesamol (3, 4-methylenedioxyphenol) with tyrosinase and its effect on melanin synthesis", *Biochimie*, vol. 93, no. 3, pp. 562-569, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.11.014>.
- [2] D. E. Barton, B. S. Kwon, and U. Francke, "Human tyrosinase gene, mapped to chromosome 11 (q14→ q21), defines second region of homology with mouse chromosome 7", *Genomics*, vol. 3, no. 1, pp. 17-24, 1988. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(88\)90153-x](https://doi.org/10.1016/0888-7543(88)90153-x).
- [3] A. Balaguer, A. Chisvert, and A. Salvador, "Environmentally friendly LC for the simultaneous determination of ascorbic acid and its derivatives in skin-whitening cosmetics", *Journal of separation science*, vol. 31, no. 2, pp. 229-236, 2008. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700414>.
- [4] M. E. Rusu, I. Fizeşan, L. Vlase, and D. S. Popa, "Antioxidants in age-related diseases and anti-aging strategies", *Antioxidants*, vol. 11, no. 10, p. 1868, 2022. <https://doi.org/10.3390/books978-3-0365-5590-4>.
- [5] M. Singh, A. Kumar, R. Singh, and K. D. Pandey, "Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds", *Biotech*, vol. 3 no. 7, pp. 1-14, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0942-z>.
- [6] M. Meyer, M. Goboza, and Y. G. Aboua, "In vitro Antidiabetic and Antioxidant effects of different extracts of *Catharanthus roseus* and its indole alkaloid, vindoline", *Molecules*, vol. 25, no. 23, p. 5546, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25235546>.
- [7] D. Neglo *et al.*, "Antibiofilm activity of *Azadirachta indica* and *Catharanthus roseus* and their synergistic effects in combination with antimicrobial agents against fluconazole-resistant *Candida albicans* strains and MRSA", *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2022, no. 1, p. 9373524, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/9373524>.
- [8] S. Rajashekara, D. Reena, M. V. Mainavi, L. S. Sandhya, and U. Baro, "Biological isolation and characterization of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don methanolic leaves extracts and their assessment for antimicrobial, cytotoxic, and apoptotic activities", *BMC Complementary Medicine and Therapies*, vol. 22, no. 1, p. 328, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12906-022-03810-y>.
- [9] C. L. Tran *et al.*, "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, pp. 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] C. L. Tran V. M. Do, V. T. Huynh, and K. T. D. Chong, "Antioxidant and antidiabetic effects in vitro of extract from the above-ground parts of *Acanthus ilicifolius*", *Bionatura Journal*, vol. 1, no. 3, p. 3, 2024. <https://doi.org/10.70099/bj/2024.01.03.4>.
- [12] S. C. Lee, C. H. Chen, C. W. Yu, H. L. Chen, W. T. Huang, Y. S. Chang, and T. L. Lee, "Inhibitory effect of *Cinnamomum osmophloeum* Kanehira ethanol extracts on melanin synthesis via repression of tyrosinase expression", *Journal of bioscience and bioengineering*, vol. 122, no. 3, pp. 263-269, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.03.002>.
- [13] N. K. N. Tran, T. K. N. Nguyen, H. L. Vo, C. L. Tran, and T. X. T. Dai, "Investigating endophytic bacteria from *Anoectochilus setaceus* for antioxidant production", *Can Tho University Journal of Science*, vol. 60, pp. 358-365, 2024. <https://doi.org/10.22144/ctu.jos.2024.356>.
- [14] Y. H. Jin, A. R. Jeon, and J. H. Mah, "Tyrosinase inhibitory activity of soybeans fermented with *Bacillus subtilis* capable of producing a phenolic glycoside, arbutin", *Antioxidants (Basel)*, vol. 9, no. 12, p. 1301, 2020. <https://doi.org/10.3390/antiox9121301>.