

# Khảo sát hoạt tính enzyme tyrosinase ngoại bào của vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* và sàng lọc khả năng ức chế enzyme của một số dịch chiết thực vật

Nguyễn Đức Bách<sup>1,2\*</sup>, Phí Thị Cẩm Miên<sup>1,2</sup>, Trần Thị Phương Thảo<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Thu Hoa<sup>2</sup>,  
Trần Thị Oanh<sup>3</sup>, Tô Thị Mai Hương<sup>4</sup>, Trần Ngọc Hùng<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Nghiên cứu Vi tảo và Dược Mỹ phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

<sup>3</sup>Viện Nghiên cứu và Phát triển sản phẩm thiên nhiên (IRDOP), 12 Phùng Khoang, phường Phùng Khoang, quận Nam Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

<sup>4</sup>Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội (USTH), 18 Hoàng Quốc Việt, phường Nghĩa Đô, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

<sup>5</sup>Viện Nghiên cứu Rau quả, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 17/7/2023; ngày chuyển phản biện 19/7/2023; ngày nhận phản biện 10/8/2023; ngày chấp nhận đăng 15/8/2023

## Tóm tắt:

Enzyme tyrosinase ngoại bào của vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* được tinh sạch một phần bằng kết tủa phân đoạn ammonium sulfate kết hợp với màng Amicon để cô đặc loại muối và các phân tử <10 kDa. Ở phân đoạn ammonium sulfate 80% bão hòa, enzyme tyrosinase của *R. solanacearum* biểu hiện hoạt tính mạnh nhất với hoạt tính monophenolase và diphenolase khi oxy hoá 2 cơ chất L-tyrosine và L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). So với enzyme tyrosinase của nấm mốc *Agaricus bisporus*, hoạt độ và tốc độ  $V_{max}$  của enzyme này từ *R. solanacearum* đạt tương ứng 89,5 và 86,7%. Giá trị  $IC_{50}$  của axit kojic với tyrosinase của *A. bisporus* trong phản ứng với L-tyrosine và L-DOPA tương ứng là 0,0139 và 0,0128 mM và của *R. solanacearum* tương ứng là 0,0181 và 0,0191 mM. Zerumbone từ gừng giở và các phân đoạn flavonoid từ lá mít, hoa hòe và đại kê đều ức chế hoạt tính của cả 2 enzyme. Phân đoạn flavonoid từ lá mít có hiệu quả ức chế bằng 81,76% ở ngưỡng nồng độ 0,1 mg/ml, ( $p < 0,05$ ). Kết quả nghiên cứu ban đầu cho thấy, enzyme tyrosinase ngoại bào của vi khuẩn *R. solanacearum* có thể ứng dụng để sàng lọc các hợp chất tự nhiên có khả năng ức chế enzyme tyrosinase.

**Từ khoá:** *Agaricus bisporus*, flavonoid, hoạt tính ức chế tyrosinase, *Ralstonia solanacearum*, tyrosinase, zerumbone.

**Chỉ số phân loại:** 1.6, 2.8, 4.6

## Investigation of extracellular tyrosinase isolated from *Ralstonia solanacearum* and screening of tyrosinase inhibitors from some plant extracts

Duc Bach Nguyen<sup>1,2\*</sup>, Thi Cam Mien Phi<sup>1,2</sup>, Thi Phuong Thao Tran<sup>2</sup>,  
Thi Thu Hoa Nguyen<sup>2</sup>, Thi Oanh Tran<sup>3</sup>, Thi Mai Huong To<sup>4</sup>, Ngoc Hung Tran<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture, Trau Quỳ Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

<sup>2</sup>Institute of Microalgae and Pharmacocosmetics, Vietnam National University of Agriculture, Trau Quỳ Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

<sup>3</sup>Institute for Research and Development of Organic Products, 12 Phùng Khoang Street, Phùng Khoang Ward, Nam Tu Liem District, Hanoi, Vietnam

<sup>4</sup>University of Science and Technology of Hanoi, 18 Hoang Quoc Viet Street, Nghia Do Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

<sup>5</sup>Fruit and Vegetable Research Institute, Vietnam National University of Agriculture, Trau Quỳ Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

Received 17 July 2023; revised 10 August 2023; accepted 15 August 2023

## Abstract:

The crude extracellular tyrosinase enzyme of *Ralstonia solanacearum* is partially purified by fraction precipitation with ammonium sulfate and combined with Amicon membranes to concentrate and remove salts and molecules <10 kDa. At the fraction of 80% saturation, the tyrosinase enzyme of *R. solanacearum* exhibited the strongest activity with both oxidative activities of monophenolase and diphenolase in the reaction with 2 substrates L-tyrosine and L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). Compared with the tyrosinase of the fungus *Agaricus bisporus*, the activity and  $V_{max}$  of *R. solanacearum* reached 89.5 and 86.7%, respectively. The  $IC_{50}$  values of kojic acid with tyrosinase of *A. bisporus* in reaction with L-tyrosine and L-DOPA were 0.0139 and 0.0128 mM respectively and of *R. solanacearum* were 0.0181 and 0.0191 mM respectively. Zerumbone from *Zingiber zerumbet* and flavonoid fractions from *Artocarpus heterophyllus* leaves, *Styphnolobium japonicum*, and *Cirsium japonicum* inhibited the activity of both enzymes. The flavonoid fraction from leaves of *A. heterophyllus* showed higher enzyme inhibition activity than that of *S. japonicum* and *C. japonicum*. Compared to kojic acid, the flavonoid fraction of leaves of *A. heterophyllus* showed an inhibitory effect of 81.76% at a concentration of 0.1 mg/ml ( $p < 0.05$ ). The initial results show that the extracellular tyrosinase of *R. solanacearum* can be applied to screen for natural compounds inhibiting tyrosinase enzymes.

**Keywords:** *Agaricus bisporus*, flavonoid, *Ralstonia solanacearum*, tyrosinase, tyrosinase inhibition, zerumbone.

**Classification numbers:** 1.6, 2.8, 4.6

\*Tác giả liên hệ: Email: ndbach@gmail.com

## 1. Đặt vấn đề

Melanin là sắc tố có mặt ở thực vật, nấm và động vật có vú, được tổng hợp thông qua con đường sinh tổng hợp melanin xúc tác bởi enzyme tyrosinase [1]. Ở người và động vật có vú, melanin quyết định sắc tố da, lông, tóc và mắt, đồng thời đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ da khỏi những tác hại của tia phóng xạ, gốc tự do, các độc tố và hoá chất độc hại [1]. Tuy nhiên, khi melanin được tích lũy quá nhiều hoặc rối loạn quá trình tổng hợp có thể gây ra những bệnh về da như nám da, tàn nhang, đồi mồi, làm ảnh hưởng đến thẩm mỹ và tâm lý, đặc biệt đối với phụ nữ [2]. Tyrosinase (E.C. 1.14.18.1) là một enzyme chứa đồng (Cu) xúc tác phản ứng oxy hoá các hợp chất phenol thành các quinone khi có mặt oxy nguyên tử [3]. Trong con đường sinh tổng hợp melanin, enzyme tyrosinase xúc tác 2 phản ứng đầu tiên: (i) hydroxyl hoá L-tyrosine bởi hoạt tính monophenolase và (ii) oxy hoá L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) thành o-dopaquinone bởi hoạt tính diphenolase. Sau đó, o-dopaquinone được chuyển hoá thành các dạng melanin khác nhau bởi các phản ứng không cần enzyme xúc tác [4].

Do enzyme tyrosinase xúc tác bước đầu tiên và quyết định tốc độ phản ứng chuyển hoá nên khi ức chế hoạt tính của enzyme này sẽ làm giảm tổng hợp sắc tố melanin [5-7]. Đến nay, nhiều nghiên cứu sàng lọc các hợp chất có hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase để phát triển mỹ phẩm làm sáng da và điều trị các bệnh rối loạn tổng hợp sắc tố da đã được nghiên cứu [2, 8]. Chẳng hạn, hydroquinone là chất ức chế tyrosinase đã được sử dụng trong các sản phẩm làm trắng sáng da nhưng gây nhiều tác dụng phụ như kích ứng, gây viêm da, rối loạn sắc tố da nên đã dần bị hạn chế và cấm [9]. Nhằm phát triển các sản phẩm chăm sóc và làm sáng da an toàn và hiệu quả, nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới sàng lọc các hoạt chất ức chế enzyme tyrosinase mới từ nấm, vi khuẩn và thực vật [8].

Để sàng lọc các hợp chất ức chế enzyme tyrosinase, cần phải có enzyme với hoạt tính xúc tác mạnh, ổn định, bền pH và nhiệt độ nhưng phải có đặc điểm tương tự như enzyme tyrosinase của người. Việc nuôi cấy tế bào hắc tố da và biểu mô sắc tố võng mạc của người hoặc động vật có vú để tách chiết thu enzyme tyrosinase rất phức tạp [10]. Đến nay, enzyme tyrosinase sử dụng phổ biến trong nghiên cứu được tách chiết từ loài nấm mốc *Agaricus bisporus* do có mức tương đồng nhất định với enzyme tyrosinase từ động vật có vú và người [11]. Mặc dù enzyme tyrosinase từ nấm mốc *A. bisporus* đã được thương mại hoá nhưng chỉ được dùng ở quy mô thí nghiệm do giá cao vì quá trình tinh sạch enzyme này khó khăn do kém bền nhiệt và pH, đồng thời hoạt tính giảm nhanh trong thời gian bảo quản [12, 13]. Ngoài ra, việc sử dụng enzyme tyrosinase từ nấm *A. bisporus* để sàng lọc các hợp chất ức chế tyrosinase còn hạn chế do một số vị trí chức năng (motif/domain) của enzyme này khác với enzyme tyrosinase của người [11]. Do hướng tiếp cận bằng công nghệ protein enzyme tái tổ hợp vẫn còn hạn chế [10], nên

những nỗ lực nhằm tìm kiếm các nguồn enzyme tyrosinase mới trong tự nhiên vẫn được quan tâm làm cơ sở để sàng lọc các hợp chất mới. Đến nay, một số nghiên cứu thử nghiệm khai thác enzyme tyrosinase từ các nguồn khác nhau đã được thực hiện trên các đối tượng vi khuẩn [14-18].

Theo hướng tiếp cận trên, nghiên cứu này khảo sát hoạt tính của enzyme tyrosinase ngoại bào từ vi khuẩn *R. solanacearum* nhằm tìm kiếm thêm nguồn enzyme tyrosinase mới, đồng thời sử dụng một số hợp chất và phân đoạn flavonoid từ thực vật để thử nghiệm và đánh giá khả năng ức chế hoạt tính của enzyme này nhằm sàng lọc các hợp chất tự nhiên có khả năng ức chế enzyme tyrosinase ứng dụng trong lĩnh vực dược và mỹ phẩm.

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu

L-tyrosine được mua từ Hãng Sigma Aldrich (Hoa Kỳ), 3,4-dihydroxy-l-phenylalanine (L-DOPA), axit kojic được mua từ Hãng Acros Organics (Hoa Kỳ). Enzyme tyrosinase từ nấm mốc *Agaricus bisporus* (T3824-25KU, Sigma-Aldrich) có hàm lượng  $\geq 1000$  unit/mg protein. Enzyme được hoà tan trong dung dịch đệm phosphate 0,5 M, pH 6,5 ở nồng độ 2500 unit/ml và chia thành các ống nhỏ, bảo quản ở  $-40^{\circ}\text{C}$ . Trước khi sử dụng, enzyme tyrosinase từ nấm mốc *A. bisporus* được pha loãng tiếp bằng đệm phosphate loãng đạt nồng độ 500 unit/ml. Trong mỗi phản ứng, enzyme tyrosinase từ nấm mốc *A. bisporus* được sử dụng ở mức 50 unit/phản ứng (tương đương 0,05 mg protein). Dung dịch L-tyrosine và L-DOPA được pha bằng nước khử ion nồng độ 10 mM ngay trước khi thí nghiệm. Các hoá chất khác được sử dụng ở mức sạch phân tích.

Chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh được phân lập và đánh giá lây nhiễm nhân tạo được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu Rau quả để nghiên cứu khả năng tổng hợp enzyme tyrosinase ngoại bào.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

*Nuôi cấy vi khuẩn và thu enzyme ngoại bào:* Các chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường triphenyl tetrazolium chloride (TZC) cải tiến của A. Kelman (1954) [19] (g/l): casein thủy phân (10), peptone (10), glucose (10), agar (17) TZC (0,05), pH 7,0. Để kiểm tra chủng có khả năng sinh tyrosinase, L-tyrosine được bổ sung vào đĩa với hàm lượng L-tyrosine (0,4 g/l) và ủ ở  $25^{\circ}\text{C}$  [20]. Sau thời gian ủ, các khuẩn lạc chuyển thành màu nâu sẫm trên đĩa môi trường chứa L-tyrosine sẽ được lựa chọn là chủng có khả năng sinh tyrosinase mạnh để tiếp tục nuôi lỏng thu enzyme ngoại bào. Trong 1 lít môi trường chứa glucose 8 g, peptone 10 g, tryptone 10 g, NaCl 0,5 g lắc ở  $37^{\circ}\text{C}$  ở tốc độ lắc 200 vòng/phút. Sau 18 giờ ủ, dịch vi khuẩn được chuyển sang môi trường mới chứa (g/l) casein thủy phân (10),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,5),  $\text{MgSO}_4$  (0,25) và L-tyrosine (0,5),  $\text{CuSO}_4$  (100  $\mu\text{M}$ ) ủ ở  $37^{\circ}\text{C}$ , lắc 200 vòng/phút [18].

Dịch enzyme thô ngoại bào được thực hiện theo quy trình cải tiến dựa theo mô tả của E. Valipour và cs (2016) [18]. Khi mật độ tế bào đạt OD<sub>520</sub> khoảng 1,2, dịch huyền phù vi khuẩn được ly tâm ở tốc độ 6.000 g trong 10 phút ở 4°C. Sau khi loại bỏ cặn, dịch trong tiếp tục được ly tâm ở tốc độ 10.000 g trong 15 phút ở 4°C. Dịch enzyme thô sau khi ly tâm được bổ sung đệm phosphate nồng độ 1,0 M, pH 6,5 theo tỷ lệ 19:1 (v/v) để tạo thành dung dịch có nồng độ 0,05 M, pH 6,5 và giữ ở 4°C. Sau đó hút 10 ml dung dịch enzyme và tủa chọn lọc bằng ammonium sulfate ở các phân đoạn từ 10 đến 100% bão hoà ở 4°C với mỗi phân đoạn cách nhau 10%. Sau khi ly tâm ở tốc độ 13.000 g trong 15 phút ở 4°C, kết tủa của mỗi phân đoạn được hoà tan trong dung dịch đệm phosphate 0,05 M, pH 6,5 bổ sung 0,02% sodium azide và 10 μM CuSO<sub>4</sub> [20]. Dịch enzyme được cô đặc, loại muối và các phân tử có khối lượng nhỏ bằng phương pháp ly tâm qua màng cut-off 10 kDa Amicon (Merk Millipore, Đức). Dịch enzyme được bảo quản ở -40°C cho các thí nghiệm, trong đó hàm lượng được sử dụng ở mức 0,05 mg/phản ứng.

**Xác định hàm lượng protein và hoạt độ enzyme ngoại bào:** Hàm lượng protein của dịch enzyme tinh sạch sơ bộ được xác định bằng phương pháp Bradford sử dụng albumin huyết thanh bò (BSA) làm đồ thị chuẩn [20]. Hoạt độ của enzyme tyrosinase từ vi khuẩn *R. solanacearum* được xác định dựa theo mô tả của F. Wang và cs (2021) [17].

Hoạt động enzyme (unit/mg protein) được xác định dựa vào công thức:

$$\text{Units/mg} = \frac{\text{Unit/ml enzyme}}{\text{mg protein/ml enzyme}}$$

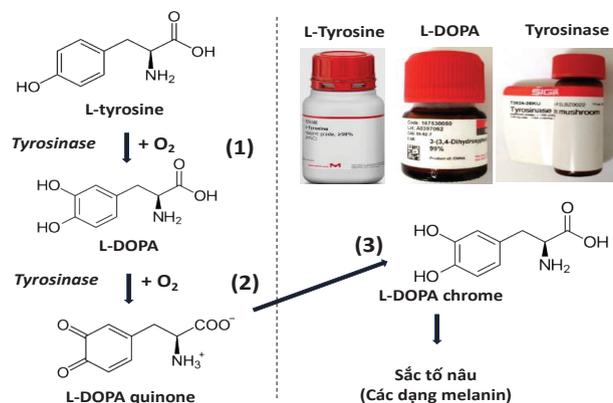
**Tách chiết zerumbone và các phân đoạn flavonoid:** Zerumbone từ củ gừng gió (*Zingiber zerumbet*) được chiết theo phương pháp cải tiến từ V.N. Huong và cs (2006) [21]. Củ gừng gió (kích cỡ từ 5-6 củ/kg) đã loại bỏ rễ nhỏ, nghiền nhỏ và chiết theo phương pháp lôi cuốn hơi nước bổ sung NaCl nồng độ 1 M. Tinh dầu sau khi được chiết gộp bằng n-hexan được đuổi bớt dung môi và cô đặc bằng thiết bị cô quay chân không (RV 10 Digital V, IKA, Đức). Phần tinh dầu được làm khan bằng muối Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> và zerumbone được kết tinh trong điều kiện lạnh (-20°C) qua đêm có dạng tinh thể màu trắng trong và được bảo quản ở -20°C. Zerumbone được hoà tan trong DMSO ở nồng độ 1 mg/ml cho các thí nghiệm.

Bột các nguyên liệu khô từ lá mít (*Artocarpus heterophyllus*), nụ hoa hòe (*Styphnolobium japonicum*) và đại kê (*Cirsium japonicum*) được chiết bằng n-hexan theo tỷ lệ mẫu/dung môi 1:5 (w/v), phần bột nguyên liệu sau đó được sấy khô. Cân 10 g bột nguyên liệu đem chiết bằng Soxhlet với ethanol 96% cho tới khi không phản ứng dương tính với FeCl<sub>3</sub>. Dịch chiết được dẫn đến thể tích xác định 200 ml. Phần bã được sấy khô đến khối lượng không đổi (m<sub>1</sub>). Hút 20 ml dịch chiết ethanol đuổi bay hơi bằng máy cô quay chân không (RV 10 Digital V, IKA, Đức) thu được cao

chiết có khối lượng m<sub>2</sub>. Cao sau được hoà tan trong nước cất nóng, chỉnh pH 3-4 bằng HCl, sau đó chiết gộp 3 lần bằng ethylacetate. Pha ethylacetate được loại bỏ dung môi thu được flavonoid toàn phần (m<sub>3</sub>). Hàm lượng các hợp chất chiết rút kiệt (mg/g bột dược liệu) được xác định theo công thức:  $m = (10 - m_1) / 10$ , trong đó 10 là khối lượng bột dược liệu. Hàm lượng cao chiết (mg) được tính =  $m_2 * (200 / 20)$ . Hàm lượng flavonoid toàn phần (mg) được xác định =  $m_3 * (200 / 20)$ , trong đó, 20 là thể tích dịch chiết đem đi đuổi dung môi (ml), 200 là tổng thể tích dịch chiết thu được (ml). Flavonoid được hoà tan trong dung môi DMSO ở nồng độ 1 mg/ml và bảo quản ở 4°C.

**Nghiên cứu động học phản ứng enzyme:** Phản ứng enzyme khi không có mặt chất ức chế.

Phản ứng enzyme với 2 cơ chất L-tyrosine và L-DOPA tương ứng với 2 hoạt tính monophenolase và diphenolase được trình bày ở hình 1. Phản ứng monophenolase với cơ chất L-tyrosine và diphenolase với cơ chất L-DOPA được thực hiện theo phương pháp mô tả bởi L. Qin và cs (2014) [22]. Chuẩn bị hỗn hợp gồm: 9 ml nước khử ion; 10 ml dung dịch đệm phosphate pH 6,5 và 10 ml dung dịch L-tyrosine hoặc 10 ml dung dịch L-DOPA. Hỗn hợp được sục bão hoà bằng khí O<sub>2</sub> y tế (độ sạch 99,9%) trong khoảng 3-5 phút. Đối với mẫu thí nghiệm, hút 2,9 ml hỗn hợp cho vào cuvet, sau đó bổ sung 0,1 ml dung dịch enzyme trộn đều nhẹ nhàng bằng cách đảo ngược cuvet. Với mẫu đối chứng (blank), enzyme sẽ được thay thế bằng 0,1 ml dung dịch đệm phosphate. Hai enzyme tyrosinase của vi khuẩn *R. solanacearum* và nấm mốc *A. bisporus* sử dụng trong thí nghiệm được sử dụng với cùng hàm lượng protein, tương đương 0,05 mg/phản ứng. Ngay sau khi trộn, mẫu được đo bằng máy đo quang phổ UV-VIS (Shimadzu, Nhật Bản) trong dải từ 240 đến 650 nm ở tốc độ 10 nm/giây liên tục trong 12 phút với khoảng cách mỗi lần đo cách nhau 1 phút.



**Hình 1. Phản ứng tổng hợp sắc tố xúc tác bởi tyrosinase.**

Phản ứng chuyển hoá từ L-tyrosine thành L-DOPA quinone được thực hiện thông qua 2 bước, trong đó hai phản ứng monophenolase (1) và diphenolase (2) được xúc tác bởi enzyme tyrosinase khi có mặt oxy (O<sub>2</sub>). Các phản ứng chuyển hoá tiếp theo (3) chuyển hoá thành L-DOPA chrome không cần enzyme xúc tác.

Phản ứng enzyme khi có mặt chất ức chế: Để đánh giá khả năng ức chế enzyme của các hợp chất, hỗn hợp phản ứng được chuẩn bị như đã mô tả ở trên, hút 0,1 ml hỗn hợp các thành phần (9 ml nước khử ion, 10 ml dung dịch đệm phosphate pH 6,5 và 10 ml dung dịch L-tyrosine hoặc 10 ml dung dịch L-DOPA), sau đó bổ sung các dung dịch zerumbone từ gừng gió, phân đoạn flavonoid tổng số từ dịch chiết lá mít, hoa hoè và ké sưa để đạt các mức nồng độ cuối cùng 0; 0,01; 0,015; 0,02; 0,025, 0,05 và 0,1 mg/ml. Để giữ thời gian phản ứng như nhau ở các mẫu, dung dịch enzyme tyrosinase (0,1 ml) từ nấm mốc *A. bisporus* hoặc từ vi khuẩn *R. solanacearum* được bổ sung vào sau cùng bằng pipette đa kênh. Phản ứng được trộn trên đĩa microtiter (96-Well Microtiter™ Microplates/Thermo Scientific™) và đọc độ hấp thụ của DOPAquinone và DOPochrome ở bước sóng 320 và 475 nm bằng máy đo ELISA tại thời điểm enzyme bão hoà cơ chất [23-25]. Axit kojic ở các nồng độ như trên được sử dụng để xác định giá trị  $IC_{50}$  và so sánh khả năng ức chế của các hợp chất. Đối chứng âm không sử dụng chất ức chế và thay bằng đệm phosphate 0,01 M, pH 6,5. Hiệu quả ức chế tyrosinase (IE) được xác định theo công thức:

$$IE (\%) = [(A_{475i} - A_{475}) / (A_0 - A_{475})] \times 100$$

trong đó:  $A_0$  là độ hấp thụ ánh sáng khi không có mặt enzyme tyrosinase (đối chứng âm),  $A_{475i}$  là độ hấp thụ ánh sáng khi có chất ức chế,  $A_{475}$  là độ hấp thụ ánh sáng khi không bổ sung chất ức chế. Giá trị  $IC_{50}$  của chất ức chế được xác định tại nồng độ mà 50% hoạt độ của enzyme bị ức chế và được quy đổi thông qua lượng sản phẩm tạo thành bằng  $\frac{1}{2}$  so với đối chứng (không có mặt chất ức chế) trong cùng điều kiện thí nghiệm. Mức độ ức chế của các chất được so sánh với khả năng ức chế của axit kojic trong cùng điều kiện thí nghiệm [26].

### 2.3. Phân tích số liệu

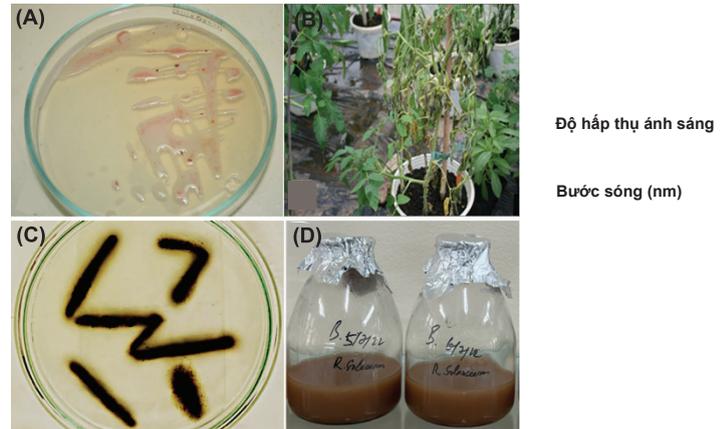
Các thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần, sự sai khác giữa các nhóm được so sánh bằng phân tích phương sai một chiều (ANOVA). Tất cả dữ liệu được trình bày bằng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (SD). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê khi giá trị p nhỏ hơn 0,05.

## 3. Kết quả và bàn luận

### 3.1. Nuôi cấy vi khuẩn và thu enzyme ngoại bào

Các chủng vi khuẩn *R. solanacearum* được nuôi trong môi trường TZC (hình 2A), chúng biểu hiện độc tính mạnh bằng lây nhiễm nhân tạo vào vùng rễ của cà chua (hình 2B) sẽ được lựa chọn để nuôi cấy trên môi trường TZC bổ sung L-tyrosine (0,4 g/l) và ủ ở 25°C. Kết quả cho thấy, sau 2 ngày ủ, các chủng có khả năng tổng hợp enzyme tyrosinase ngoại bào sẽ chuyển thành màu nâu sẫm (hình 2C). Chúng

biểu hiện hoạt tính mạnh sẽ được lựa chọn để chuyển sang nuôi lỏng để thu enzyme ngoại bào. Sau thời gian từ 18 giờ trong môi trường cảm ứng bởi L-tyrosine và  $CuSO_4$ , vi khuẩn *R. solanacearum* sinh enzyme tyrosinase ngoại bào, dịch huyền phù vi khuẩn chuyển sang màu nâu và tăng dần theo thời gian sau 24 giờ cho màu nâu sẫm (hình 2D).

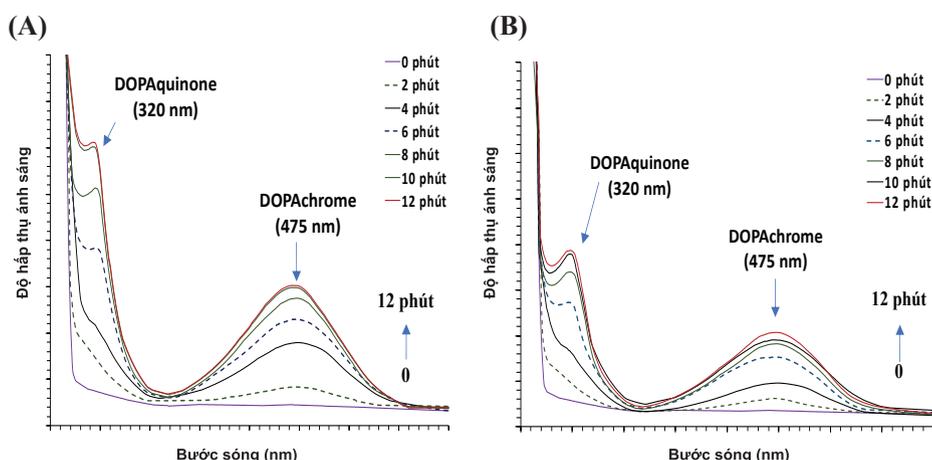


**Hình 2. Vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh cà chua và hoạt tính tyrosinase ngoại bào.** (A) Vi khuẩn *R. solanacearum* phân lập trên đĩa Petri và (B) lây nhiễm nhân tạo trên cà chua, (C) biểu hiện hoá nâu trên đĩa thạch trong môi trường chứa 0,4 g/l L-tyrosine và 100  $\mu$ M  $CuSO_4$ , (D) môi trường nuôi cấy *R. solanacearum* sau 48 giờ.

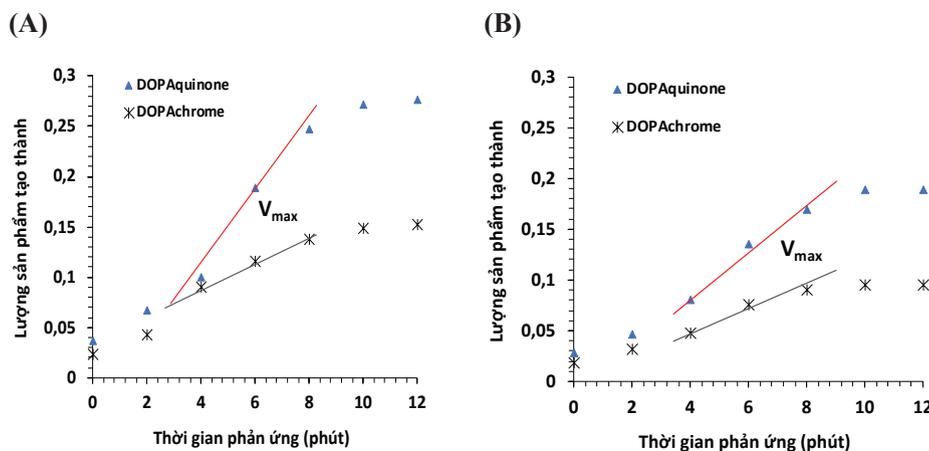
### 3.2. Phản ứng monophenolase của enzyme tyrosinase với cơ chất L-tyrosine

Enzyme tyrosinase ngoại bào của vi khuẩn *R. solanacearum* được kết tủa ammonium sulfate ở các phân đoạn từ 20 đến 80% ammonium sulfate bão hoà đều biểu hiện hoạt tính tyrosinase, trong đó phân đoạn 80% cho hoạt tính enzyme cao nhất (số liệu không trình bày). Kết quả nghiên cứu tương tự của B. Arikian và cs (2016) [18] đối với vi khuẩn *Bacillus megaterium* chủng M36 có hoạt tính cao nhất ở phân đoạn ammonium sulfate 85% và enzyme tyrosinase có khối lượng phân tử 34 kDa [18]. Trong nghiên cứu này, enzyme từ nấm mốc *A. bisporus* (Sigma-Aldrich) được sử dụng làm đối chứng với cùng hàm lượng protein (0,05 mg cho mỗi phản ứng). Kết quả cho thấy, enzyme từ vi khuẩn *R. solanacearum* có hoạt tính monophenolase tương tự như enzyme từ nấm *A. bisporus* (hình 3A, 3B). Lượng sản phẩm tạo thành DOPAquinone (đỉnh 320 nm) và DOPochrome (đỉnh 475 nm) có sự khác biệt giữa 2 enzyme. Lượng DOPAquinone và DOPochrome cao hơn 1,25 (25%) và 1,14 lần (14%) tương ứng so với enzyme từ nấm mốc *A. bisporus* và vi khuẩn *R. solanacearum* (hình 3A, 3B).

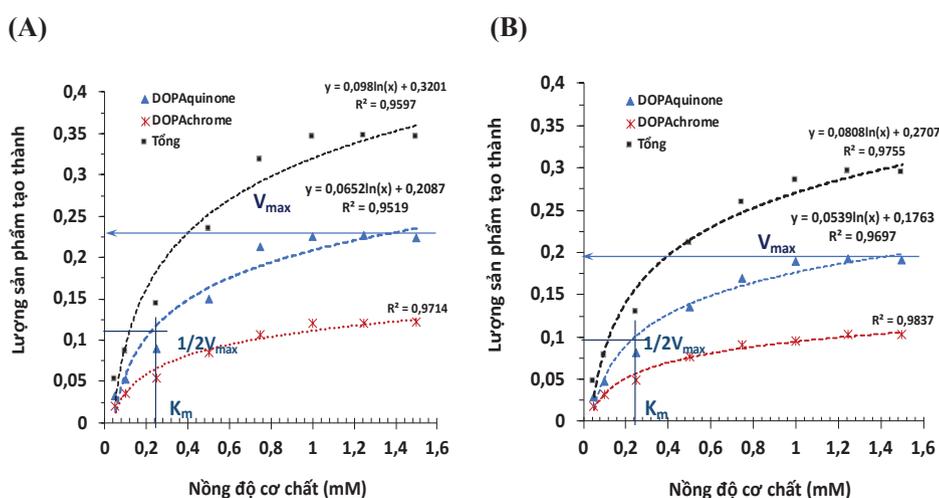
Theo phương trình Michaelis-Menten [27], nồng độ cơ chất (L-tyrosine và L-DOPA) được sử dụng ở mức lớn hơn nhiều so với  $K_m$  do đó tốc độ phản ứng  $V = V_{max}$  khi enzyme ở trạng thái bão hoà cơ chất, tốc độ phản ứng chỉ



**Hình 3. Chuyển hoá cơ chất L-tyrosine bởi enzyme tyrosinase. (A)** Enzyme tyrosinase từ nấm *A. bisporus* và **(B)** vi khuẩn *R. solanacearum*.



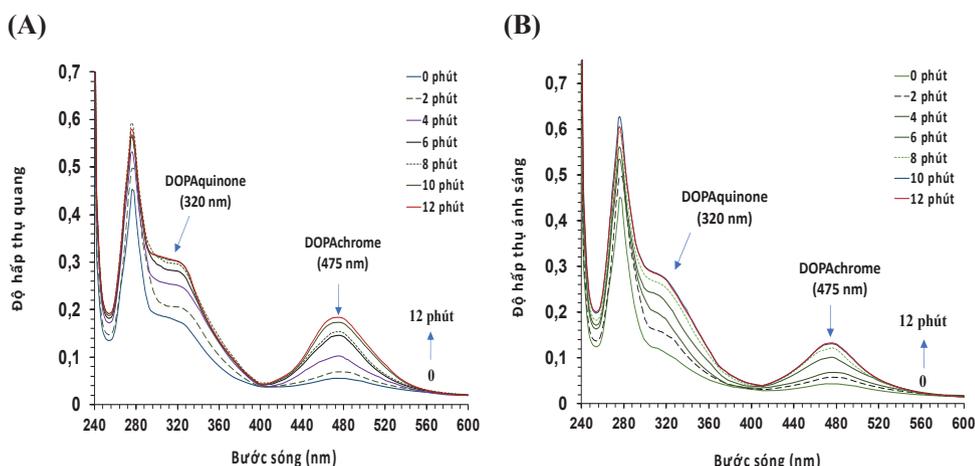
**Hình 4. Tốc độ chuyển hoá DOPAquinone và DOPAchrome từ cơ chất L-tyrosine. (A)** Phản ứng chuyển hoá L-tyrosine bởi 2 enzyme tyrosinase từ nấm *A. bisporus* và **(B)** vi khuẩn *R. solanacearum* tạo sản phẩm DOPAquinone (320 nm) và DOPAchrome (475 nm).



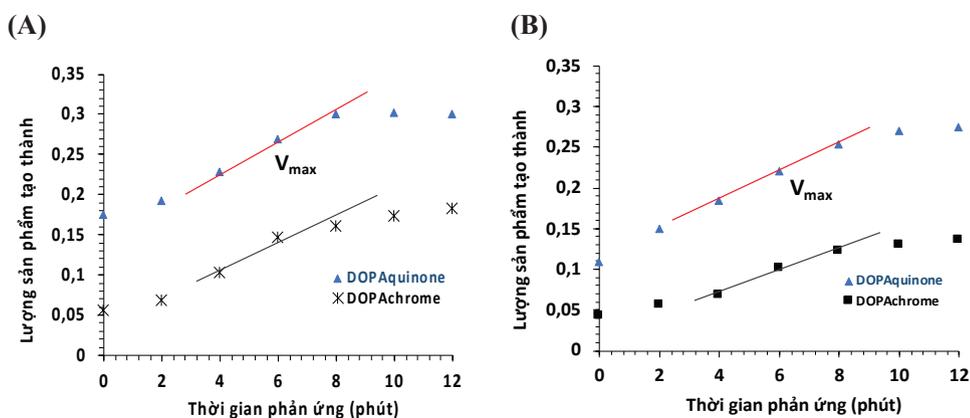
**Hình 5. Động học phản ứng chuyển hoá cơ chất L-tyrosine xúc tác bởi enzyme tyrosinase. (A)** Phản ứng tạo 2 sản phẩm DOPAquinone (320 nm) và DOPAchrome (475 nm) xúc tác bởi nấm *A. bisporus* và **(B)** vi khuẩn *R. solanacearum*. Phương trình hồi quy tuyến tính xây dựng dựa vào tổng lượng sản phẩm tạo thành ở phút thứ 8.

phụ thuộc vào nồng độ enzyme. Việc khảo sát ban đầu với mục tiêu cố định ngưỡng nồng độ enzyme để xác định thời điểm (t) phản ứng đạt tốc độ tối đa. Trong điều kiện thí nghiệm, thời gian phản ứng đạt  $V_{max}$  trong khoảng phút thứ 4 đến phút thứ 8 sau đó phản ứng ở trạng thái cân bằng đối với cả 2 sản phẩm tạo thành là DOPAquinone và DOPAchrome (hình 4A, 4B). Không có sự khác biệt về tỷ lệ chuyển hoá giữa DOPAquinone và DOPAchrome đối với enzyme từ nấm *A. bisporus* và từ vi khuẩn *R. solanacearum*. Điều này cũng gợi ý tốc độ chuyển hoá DOPAchrome phụ thuộc vào lượng DOPAquinone tạo thành từ phản ứng chuyển hoá xúc tác bởi enzyme tyrosinase. Chính vì vậy, sản phẩm DOPAchrome ( $A_{475}$ ) đã được định lượng trong các nghiên cứu về tyrosinase [18, 23-26].

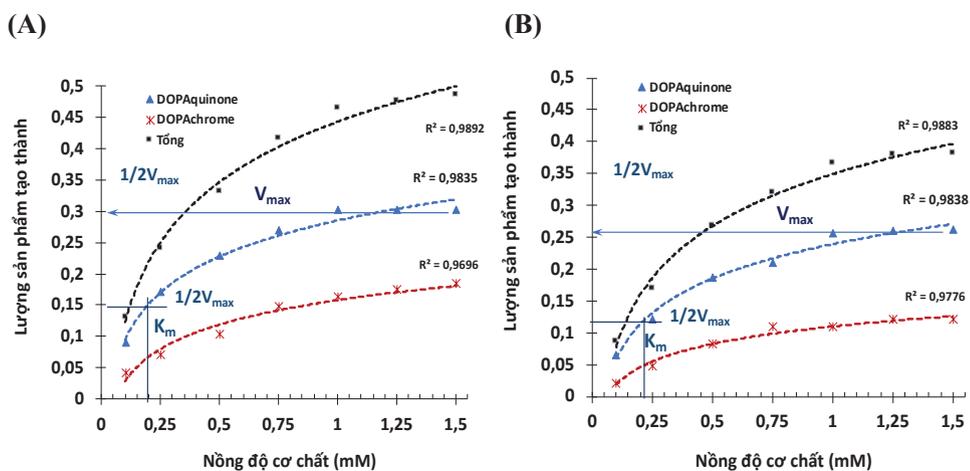
Trên cơ sở khảo sát, phản ứng động học được thực hiện với các nồng độ cơ chất L-tyrosine từ 0,05 đến 1,5 mM trong khi lượng enzyme của nấm *A. bisporus* (đối chứng) được giữ cố định 50 unit/phản ứng (theo thông tin từ nhà cung cấp Sigma Aldrich), sản phẩm của phản ứng gồm DOPAquinone (320 nm), DOPAchrome (475 nm) được đo ở phút thứ 8 (tại thời điểm  $V_{max}$ ). Kết quả cho thấy, giá trị  $K_m$  đối với enzyme tyrosinase từ nấm *A. bisporus* và từ vi khuẩn *R. solanacearum* đều đạt ở mức 0,24 mM (hình 5A, 5B). Mặc dù giá trị  $K_m$  tương tự nhau nhưng lượng sản phẩm (DOPAquinone) của phản ứng xúc tác bởi enzyme tyrosinase của nấm *A. bisporus* cao hơn vi khuẩn *R. solanacearum* 10,5% đối với cơ chất L-tyrosine. Như vậy, hoạt động của enzyme *R. solanacearum* trong phản ứng ở



Hình 6. Chuyển hoá cơ chất L-DOPA bởi enzyme tyrosinase. (A) Enzyme tyrosinase nấm *A. bisporus* và (B) vi khuẩn *R. solanacearum*.



Hình 7. Tốc độ phản ứng chuyển hoá cơ chất L-DOPA xúc tác bởi 2 enzyme tyrosinase từ nấm *A. bisporus* (A) và vi khuẩn *R. solanacearum* (B). Phản ứng tạo 2 sản phẩm DOPAQuinone (320 nm) và DOPACHrome (475 nm), (Tổng) là phương trình hồi quy tuyến tính xây dựng dựa vào tổng lượng sản phẩm tạo thành ở phút thứ 8.



Hình 8. Động học phản ứng chuyển hoá cơ chất L-DOPA xúc tác bởi 2 enzyme tyrosinase. Phản ứng tạo 2 sản phẩm DOPAQuinone (320 nm) và DOPACHrome (475 nm) xúc tác bởi (A) nấm *A. bisporus* và (B) vi khuẩn *R. solanacearum*. Phương trình hồi quy tuyến tính xây dựng dựa vào tổng lượng sản phẩm tạo thành ở phút thứ 8.

điều kiện thí nghiệm chỉ tương đương với 89,5% so với enzyme của nấm mốc. Giá trị  $V_{max}$  của phản ứng xúc tác bởi enzyme của vi khuẩn *R. solanacearum* cũng chỉ đạt tương ứng 86,7% (hình 5A). Dựa vào lượng sản phẩm tạo thành tương ứng với hàm lượng protein cho mỗi phản ứng, hoạt động của enzyme của vi khuẩn *R. solanacearum* đạt 44,7 unit/0,05 mg protein.

### 3.3. Phản ứng diphenolase của enzyme tyrosinase với cơ chất L-DOPA

Enzyme từ vi khuẩn *R. solanacearum* có khả năng xúc tác phản ứng diphenolase tương tự như enzyme từ nấm *A. bisporus* (hình 6). Mặc dù với cùng lượng enzyme, tốc độ chuyển hoá L-DOPA thành hợp chất màu DOPACHrome bởi enzyme từ vi khuẩn *R. solanacearum* đạt 86,7% so với enzyme từ nấm mốc *A. bisporus* (hình 6).

Trong điều kiện bão hoà cơ chất, phản ứng chuyển hoá L-DOPA bởi enzyme tyrosinase từ nấm mốc *A. bisporus* đạt tốc độ tối đa trong khoảng từ và vi khuẩn thời gian cho phản ứng đạt tốc độ tối đa trong khoảng từ phút thứ 4 đến phút thứ 8 (hình 7).

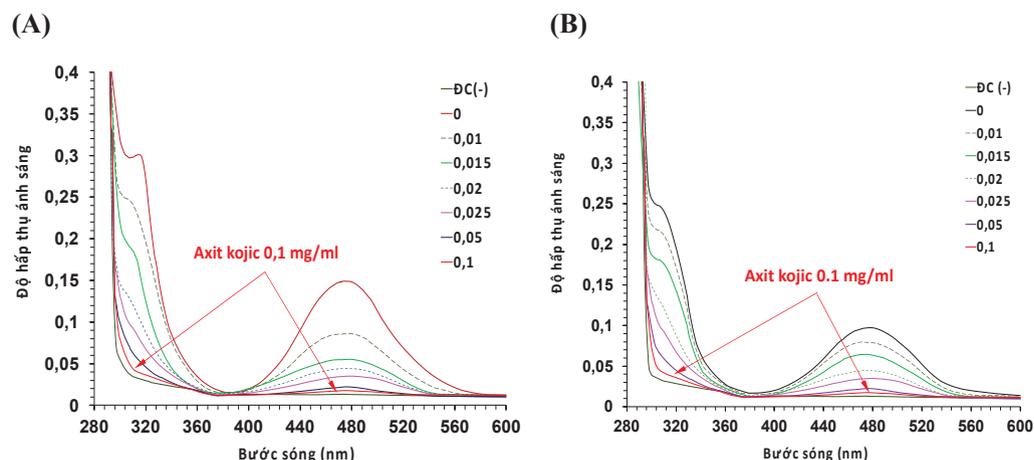
Tương tự như đối với cơ chất L-tyrosine, phản ứng động học được thực khảo sát với các nồng độ cơ chất L-DOPA cuối cùng từ 0,05 đến 1,5 mM trong khi nồng độ enzyme được giữ cố định 50 unit/phản ứng và phản ứng được đo tại phút thứ 8 (tốc độ phản ứng tối đa  $V_{max}$ ). Kết quả cho thấy, giá trị  $K_m$  đối với enzyme tyrosinase từ nấm mốc *A. bisporus* và từ vi khuẩn *R. solanacearum* là 0,195 và 0,215 mM (hình 8A, 8B).

Do phản ứng tạo 2 sản phẩm DOPAquinone và DOPochrome với các đỉnh hấp thụ cực đại tương ứng ở bước sóng 320 và 475 nm, trong đó DOPAquinone là sản phẩm được chuyển hoá bởi enzyme còn DOPochrome không cần enzyme xúc tác. Do đó, giá trị  $K_m$  đã được khảo sát dựa vào lượng DOPA quinone và DOPochrome riêng rẽ. Tuy nhiên, kết quả cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa về giá trị  $K_m$  khi lựa chọn lượng sản phẩm DOPochrome hay DOPAquinone hoặc tổng sản phẩm tạo thành (hình 8A, 8B). Điều này cũng phù hợp với hầu hết các kết quả nghiên cứu đã công bố sử dụng giá trị  $A_{475}$  là đỉnh hấp thụ của DOPochrome cho các nghiên cứu động học [23-26]. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng đồng thời cả DOPAquinone ( $A_{320}$ ) và DOPochrome ( $A_{475}$ ) để phân tích lượng sản phẩm.

### 3.4. Hoạt tính ức chế tyrosinase của các hợp chất và phân đoạn flavonoid

Để xác định khả năng ức chế hoạt tính monophenolase và diphenolase của các hợp chất và phân đoạn flavonoid từ một số loại thực vật, axit kojic được sử dụng làm đối chứng dương khi nghiên cứu động học phản ứng. Kết quả đối với cơ chất L-tyrosine, mức độ ức chế phụ thuộc vào nồng độ axit kojic, ở nồng độ 0,1 mg/ml, mức độ ức chế đạt ngưỡng bão hoà ở mức 86,60 và 81,64% tương ứng với enzyme của nấm *A. bisporus* và vi khuẩn *R. solanacearum* (hình 9A, 9B). Đối với cơ chất L-DOPA, mức độ ức chế hoạt tính diphenolase bởi axit kojic cũng biểu hiện tương tự đối với cả 2 enzyme của nấm *A. bisporus* và vi khuẩn *R. solanacearum* (số liệu không trình bày).

Hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase của zerumbone chiết xuất từ củ gừng giò và phân đoạn flavonoid của lá mít, nụ hoa hoè và đại kế được thử nghiệm với dải nồng độ từ 0,01 đến 0,1 mg/ml. Kết quả cho thấy, hoạt tính ức chế với cơ chất L-tyrosine tương ứng ở cả 2 enzyme đều phụ thuộc vào nồng độ (hình 10A, 10B). Giá trị  $IC_{50}$  của zerumbone chiết xuất từ gừng giò đạt 0,0203 đến 0,293 mM. So với hoa hoè và đại kế, phân đoạn flavonoid từ lá mít cho hiệu quả ức chế gần tương tự với axit kojic ( $p > 0,05$ ) ở ngưỡng nồng độ từ 0,05 đến 0,1 mg/ml (hình 10A, 10B). Giá trị  $IC_{50}$  của các hợp chất và phân đoạn flavonoid đối với 2 enzyme được tổng hợp ở bảng 1.



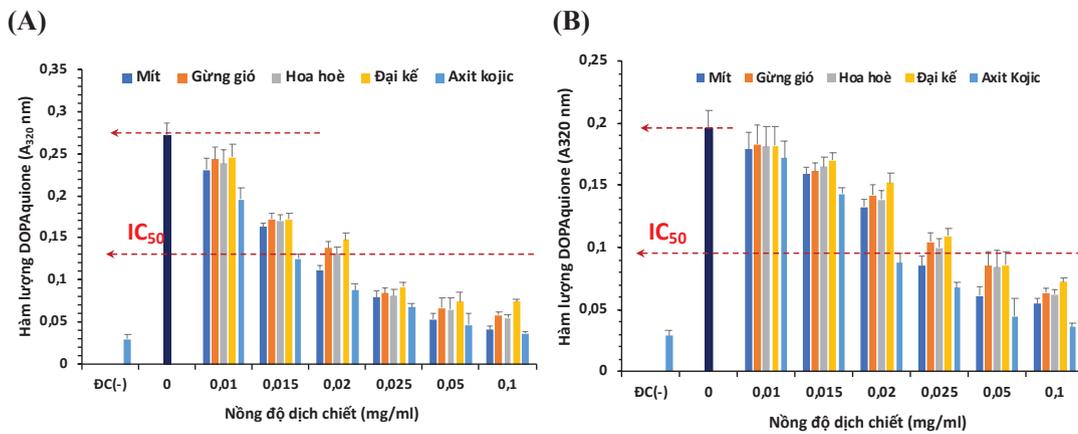
**Hình 9.** Ảnh hưởng của nồng độ axit kojic đến khả năng ức chế enzyme tyrosinase. Phản ứng với (A) enzyme tyrosinase từ nấm mốc *A. bisporus* và (B) enzyme tyrosinase từ vi khuẩn *R. solanacearum* được đo dải quang phổ tại phút thứ 8, giá trị  $IC_{50}$  được xác định theo sản phẩm của phản ứng DOPAquinone (đỉnh hấp thụ tại 320 nm). ĐC(-) là mẫu đối chứng không có mặt enzyme tyrosinase.

**Bảng 1.** Giá trị  $IC_{50}$  của một số dịch chiết ức chế hoạt tính monophenolase và diphenolase của enzyme tyrosinase từ nấm mốc *A. bisporus* và vi khuẩn *R. solanacearum*.

Các hợp chất	$IC_{50}$ của một số dịch chiết (mg/ml)			
	L-tyrosine (monophenolase)		L-DOPA (diphenolase)	
	Nấm mốc <i>A. bisporus</i>	Vi khuẩn <i>R. solanacearum</i>	Nấm mốc <i>A. bisporus</i>	Vi khuẩn <i>R. solanacearum</i>
Axit kojic	0,0139±0,0025 <sup>a</sup>	0,0181±0,0021 <sup>c</sup>	0,0128±0,0021 <sup>a</sup>	0,0191±0,0021 <sup>b</sup>
Zerumbone	0,0203±0,0031 <sup>b</sup>	0,0272±0,0027 <sup>d</sup>	0,0186±0,0021 <sup>c</sup>	0,0293±0,0021 <sup>d</sup>
Flavonoid lá mít	0,0170±0,0012 <sup>c</sup>	0,0221±0,0019 <sup>b</sup>	0,0170±0,0019 <sup>c</sup>	0,0223±0,0021 <sup>b</sup>
Flavonoid đại kế	0,0220±0,0024 <sup>b</sup>	0,0443±0,0052 <sup>e</sup>	0,0220±0,0025 <sup>b</sup>	0,0441±0,0021 <sup>e</sup>
Flavonoid hoa hoè	0,0193±0,0017 <sup>b</sup>	0,0262±0,0034 <sup>d</sup>	0,0196±0,0021 <sup>b</sup>	0,0268±0,0021 <sup>d</sup>

Các chữ khác nhau (a-e) thể hiện sự khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm ( $p < 0,05$ ).

Trong nghiên cứu này, hoạt tính ức chế  $IC_{50}$  của zerumbone và các phân đoạn flavonoid thấp hơn so với axit kojic (bảng 1). Trong phản ứng monophenolase xúc tác bởi enzyme tyrosinase của *A. bisporus* và của *R. solanacearum*,  $IC_{50}$  của zerumbone cao hơn so với  $IC_{50}$  của axit kojic tương ứng 1,22 và 1,5 lần, ở hoa hoè là 1,39 và 1,22 lần. Phân đoạn flavonoid của đại kế cho hoạt tính ức chế thấp nhất, với  $IC_{50}$  so với  $IC_{50}$  của axit kojic tương ứng 1,58 và 2,44 lần (bảng 1). Tương tự, với phản ứng diphenolase với cơ chất L-DOPA,  $IC_{50}$  của phân đoạn flavonoid đại kế lớn hơn với axit kojic tương ứng 1,72 và 2,31 lần. Đối với cả 2 hoạt tính monophenolase và diphenolase, phân đoạn flavonoid của lá mít biểu hiện hoạt tính ức chế mạnh chỉ thấp hơn so với axit kojic (bảng 1). Nhiều flavonoid là dẫn xuất của hợp chất polyphenol chứa vòng pyrane và phenol có mặt ở nhiều bộ phận của thực vật có khả năng ức chế hoạt tính monophenolase và diphenolase của enzyme tyrosinase [28]. Hầu hết các hợp chất này đều ức chế enzyme tyrosinase theo phương thức ức chế cạnh tranh bằng cách gắn với trung tâm



**Hình 10. Xác định khả năng ức chế enzyme tyrosinase của một số dịch chiết thực vật. (A)** Ảnh hưởng của nồng độ của các dịch chiết đến khả năng ức chế hoạt tính monophenolase của enzyme tyrosinase từ nấm *A. bisporus* và **(B)** vi khuẩn *R. solanacearum*.

hoạt động của enzyme [28]. Cho đến nay, nhiều nghiên cứu sàng lọc các hợp chất có hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase đã được tiến hành trên thế giới và ở Việt Nam. Chẳng hạn, aloesin là một hydroxychromone glucoside được tinh chế từ cây lô hội (*Aloe vera*) có khả năng làm sáng da do ức chế hoạt tính tyrosinase dẫn đến hạn chế quá trình tổng hợp melanin theo phương thức phụ thuộc vào nồng độ [29]. Dịch chiết lá của cây nho *Vitis vinifera* trong nước có  $IC_{50}$  đạt 3,84 mg/ml [30] và dịch chiết lá trong ethanol có  $IC_{50}$  đạt 0,197 mg/ml [31]. Các nghiên cứu ở cây cam thảo (*Glycyrrhiza uralensis*), dâu tằm (*Morus alba*), mít đều cho thấy các hợp chất thuộc nhóm flavonoid có khả năng ức chế enzyme tyrosinase [32-34] và nhiều hợp chất từ các đối tượng thực vật khác có khả năng ức chế enzyme tyrosinase thậm chí mạnh hơn so với axit kojic [31].

Đến nay, trong hầu hết các nghiên cứu này, enzyme tyrosinase được sử dụng đều từ nấm mốc *A. bisporus*. Các nghiên cứu tìm kiếm nguồn enzyme tyrosinase mới từ vi khuẩn và các nguồn khác còn hạn chế, một số nghiên cứu thực hiện ở vi khuẩn [14-18]. Một số vi khuẩn đất biểu hiện hoạt tính enzyme tyrosinase ngoại bào khi cảm ứng bằng tyrosine và  $CuSO_4$  [35]. Ở vi khuẩn *Bacillus* sp., các nghiên cứu enzyme tyrosinase gần đây được thực hiện ở một số loài, chẳng hạn *B. megaterium* sp. chủng M36 biểu hiện hoạt tính monophenolase và diphenolase [18]. Vi khuẩn *B. aryabhatai* TCCC 111983 cũng được phân lập và nghiên cứu đặc điểm cho thấy enzyme này hoạt động trong phạm vi pH rộng (từ 3 đến 10) và bền nhiệt [17]. Về mặt ứng dụng, thông thường dịch chiết thô enzyme ngoại bào thường đơn giản và hiệu quả hơn so với enzyme tinh sạch, vì vậy, nghiên cứu phương pháp thu enzyme tyrosinase thô từ nấm mốc *A. bisporus* cho thấy enzyme thô có độ bền nhiệt và giữ hoạt tính tới 95% sau 9 tháng bảo quản ở  $-20^{\circ}C$  [13]. Chính vì vậy, nghiên cứu ban đầu này khảo sát hoạt tính enzyme ngoại bào của vi khuẩn *R. solanacearum* nhằm tìm kiếm thêm một nguồn enzyme mới.

#### 4. Kết luận

Enzyme tyrosinase ngoại bào từ vi khuẩn *R. solanacearum* có hoạt tính oxy hoá monophenolase và diphenolase. Việc tinh sạch để nghiên cứu sâu về các đặc điểm của enzyme này là cần thiết, nhằm bổ sung thêm nguồn enzyme mới để sàng lọc các hợp chất tự nhiên có khả năng ức chế enzyme tyrosinase. Trên cơ sở đó có thể

ứng dụng trong lĩnh vực dược và mỹ phẩm để kiểm soát quá trình tổng hợp melanin an toàn và hiệu quả.

#### LỜI CẢM ƠN

Bài báo được hỗ trợ kinh phí của đề tài “Nghiên cứu bào chế sản phẩm kem làm sáng da từ Gừng gió (*Zingiber zerumbet* Smith) và một số dược liệu Việt Nam có hoạt tính ức chế enzyme tyrosinase”, mã số 01C-06/07-2020-3. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M.A. Maranduca, D. Branisteanu, D.N. Serban, et al. (2019), “Synthesis and physiological implications of melanic pigments”, *Oncol. Lett.*, **17**(5), pp.4183-4187, DOI: 10.3892/ol.2019.10071.
- [2] N.M. Mohammad, K.Yamauchi, T. Mitsunaga, et al. (2019), “Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources as skin-lightening agents”, *Reviews in Agricultural Science*, **7**, pp.41-58, DOI: 10.7831/ras.7.41.
- [3] R. Nairn, W. Cresswell, J. Nairn, et al. (2015), “Mushroom tyrosinase: A model system to combine experimental investigation of enzyme-catalyzed reactions, data handling using R, and enzyme-inhibitor structural studies”, *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, **43**(5), pp.370-376, DOI: 10.1002/bmb.20887.
- [4] M. Mine, H. Mizuguchi, T. Takayanagi, et al. (2022), “Kinetic analyses of two-steps oxidation from L-tyrosine to L-dopaquinone with tyrosinase by capillary electrophoresis/dynamic frontal analysis”, *Anal. Biochem.*, **655**(114856), DOI: 10.1016/j.ab.2022.114856.
- [5] T. Pillaiyar, M. Manickam, V. Namasivayam, et al. (2017), “Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors”, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **32**(1), pp.403-425, DOI: 10.1080/14756366.2016.1256882.
- [6] T. Pillaiyar, V. Namasivayam, M. Manickam, et al. (2018), “Inhibitors of melanogenesis: An updated review”, *J. Med. Chem.*, **61**(17), pp.7395-7418, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00967.

- [7] X.W. Zhang, G.L. Bian, P. Kang, et al. (2021), "Recent advance in the discovery of tyrosinase inhibitors from natural sources via separation methods", *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **36(1)**, pp.2104-2117, DOI: 10.1080/14756366.2021.1983559.
- [8] S. Zolghadri, A. Bahrami, M.T.H. Khan, et al. (2019), "A comprehensive review on tyrosinase inhibitors", *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **34(1)**, pp.279-309, DOI: 10.1080/14756366.2018.1545767.
- [9] C.C.A. Juliano (2022), "Spreading of dangerous skin-lightening products as a result of colourism: A review", *Appl. Sci.*, **12(3177)**, DOI: 10.3390/app12063177.
- [10] X. Lai, M.S. Lopez, B.W. Dijkstra, et al. (2016), "Large-scale recombinant expression and purification of human tyrosinase suitable for structural studies", *PLOS ONE*, **11(8)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0161697.
- [11] T. Mann, W. Gerwat, J. Batzer, et al. (2018), "Inhibition of human tyrosinase requires molecular motifs distinctively different from mushroom tyrosinase", *Journal of Investigative Dermatology*, **138(7)**, pp.1601-1608, DOI: 10.1016/j.jid.2018.01.019.
- [12] M. Fernandes, S. Kerkar (2017), "Microorganisms as a source of tyrosinase inhibitors: A review", *Ann. Microbiol.*, **67**, pp.343-358, DOI: 10.1007/s13213-017-1261-7.
- [13] M.A. Morosanova, T.V. Fedorova, A.S. Polyakova, et al. (2020), "Agaricus bisporus crude extract: Characterization and analytical application", *Molecules*, **25(24)**, DOI: 10.3390/molecules25245996.
- [14] S. Ashraf, A.S.A.F.E. Sayed, G.H. Rabie, et al. (2021), "Microbial tyrosinase: Biochemical, molecular properties and pharmaceutical applications", *Biomed. Pharmacol. J.*, **14(3)**, DOI: 10.13005/bpj/2229.
- [15] S.S. Deepthi, M.K. Reddy, N. Mishra, et al. (2021), "Melanin production by *Pseudomonas* sp. and *in silico* comparative analysis of tyrosinase gene sequences", *BioTechnologia (Pozn)*, **102(4)**, pp.411-424, DOI: 10.5114/bta.2021.111106.
- [16] M. Harir, M. Bellahcene, S. Pollini, et al. (2018), "Isolation and characterization of a novel tyrosinase produced by Sahara soil actinobacteria and immobilization on nylon nanofiber membranes", *J. Biotechnol.*, **265**, pp.54-64, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2017.11.004.
- [17] F. Wang, Z. Xu, Z. Guo, et al. (2021), "Biochemical characterization of a tyrosinase from *Bacillus aryabhatai* and its application", *Int. J. Biol. Macromol.*, **176**, pp.37-46, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.042.
- [18] E. Valipour, B. Arikan (2016), "Characterization of tyrosinase enzyme from native *Bacillus megaterium* sp. strain M36", *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.*, **5(5)**, pp.465-469, DOI: 10.15414/jmbfs.2016.5.5.465-469.
- [19] A. Kelman (1954), "The relationship of pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance in a tetrazolium medium", *Phytopathology*, **44(12)**, pp.693-695.
- [20] M.M. Bradford (1976), "A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, **72(1976)**, pp.248-254, DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [21] V.N. Huong, D.T.T. Thuy (2006), "Wild ginger (*Zingiber zerumbet* Sm.) from Tam Dao region - a valuable ingredient for preparing zerumbone", *Journal of Science and Technology*, **44(3)**, pp.65-69 (in Vietnamese).
- [22] L. Qin, Y. Wu, Y. Liu, et al. (2014), "Dual effects of alpha-arbutin on monophenolase and diphenolase activities of mushroom tyrosinase", *PLOS ONE*, **9(10)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0109398.
- [23] Y.F. Fan, S.X. Zhu, F.B. Hou, et al. (2021), "Spectrophotometric assays for sensing tyrosinase activity and their applications", *Biosensors (Basel)*, **11(8)**, DOI: 10.3390/bios11080290.
- [24] L.M. Vermeer, C.A. Higgins, D.L. Roman, et al. (2013), "Real-time monitoring of tyrosine hydroxylase activity using a plate reader assay", *Anal. Biochem.*, **432(1)**, pp.11-15, DOI: 10.1016/j.ab.2012.09.005.
- [25] R. Nairn, W. Cresswell, J. Nairn, et al. (2015), "Mushroom tyrosinase: A model system to combine experimental investigation of enzyme-catalyzed reactions, data handling using R, and enzyme-inhibitor structural studies", *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, **43(5)**, pp.370-376, DOI: 10.1002/bmb.20887.
- [26] W. Wang, Y. Gao, J. Zhang, et al. (2022), "Kojic acid showed consistent inhibitory activity on tyrosinase from mushroom and in cultured B16F10 cells compared with arbutins", *Antioxidants*, **11(502)**, DOI: 10.3390/antiox11030502.
- [27] L. Michaelis, M.L. Menten (1913), "The kinetics of invertin action", *Biochemische Zeitschrift*, **49**, pp.333-369 (in Germany).
- [28] Y. Lu, Y. Xu, M.T. Song, et al. (2021), "Promotion effects of flavonoids on browning induced by enzymatic oxidation of tyrosinase: Structure-activity relationship", *RSC Adv.*, **11(23)**, pp.13769-13779, DOI: 10.1039/D1RA01369F.
- [29] G. Jeon, H.S. Ro, H.Y. Lee, et al. (2022), "Enhancement of melanogenic inhibitory effects of the leaf skin extracts of *Aloe barbadensis* Miller by the fermentation process", *Fermentation*, **8(580)**, DOI: 10.3390/fermentation8110580.
- [30] Y.S. Lin, H.J. Chen, P.C. Lee, et al. (2017), "Kinetics of tyrosinase inhibitory activity using *Vitis vinifera* leaf extracts", *Biomed. Res. Int.*, **2017**, DOI: 10.1155/2017/5232680.
- [31] N.T.T. Nhi, D.T. Luan, T.G. Khiem, et al. (2022), "Inhibition of tyrosinase activity by grape leaf extract *Vitis vinifera* L. (Vitaceae)", *TNU Journal of Science and Technology*, **227(14)**, pp.10-15, DOI: 10.34238/tnu-jst.6121 (in Vietnamese).
- [32] X. Liu, J. Rao, K. Wang, et al. (2022), "Highly potent inhibition of tyrosinase by Mulberrosides and the inhibitory mechanism *in vitro*", *Chem. Biodivers.*, **19(1)**, DOI: 10.1002/cbdv.202100740.
- [33] N.C. Minh, T.L.T. Chau, H.N. Trinh, et al. (2021), "Evaluation of tyrosinase inhibitory activity, *in vitro* antioxidant activity and *in vivo* anti-inflammatory effect of topical gel preparation from *Houttuynia cordata* extract", *Ho Chi Minh City Journal of Medicine*, **25(6)**, pp.55-61 (in Vietnamese).
- [34] P.T. Hai, N.B. Yen, B.T. Tung, et al. (2017), "Screening of potential tyrosinase inhibitors using *in silico-in vitro* approach", *VNU Journal of Science, Medical and Pharmaceutical Sciences*, **33(1)**, pp.12-18 (in Vietnamese).
- [35] V. Shuster, A. Fishman (2009), "Isolation, cloning and characterization of a tyrosinase with improved activity in organic solvents from *Bacillus megaterium*", *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **17(4)**, pp.188-200, DOI: 10.1159/000233506.