

KHẢ NĂNG SINH TỔNG HỢP XYLANASE TRONG ĐIỀU KIỆN pH THẤP CỦA CHỦNG NẤM CHỊU ACID *Talaromyces* sp. ASM-115

Nguyễn Bảo Châu¹, Anin Keosavanh², Trần Trà My¹,
Vũ Nguyên Thành¹, Nguyễn Thanh Thủy^{1*}

*Tác giả liên hệ, Email: thuynt@firi.vn. ORCID: 0009-0000-5666-4672

Ngày tòa soạn nhận được bài báo: 03/03/2026

Ngày phản biện đánh giá: 25/05/2026

Ngày bài báo được duyệt đăng: 25/06/2026

DOI: 10.59266/houjs.2026.1315

Tóm tắt: Xylanase là enzyme có tiềm năng ứng dụng lớn trong công nghiệp giấy, thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và sản xuất nhiên liệu sinh học. Nghiên cứu này nhằm đánh giá khả năng sinh tổng hợp xylanase của chủng nấm chịu acid *Talaromyces* sp. ASM-115 trong điều kiện pH thấp. Chủng được nuôi cấy trên các nguồn cơ chất khác nhau gồm glucose, xylose, xylan, avicel, cám mì và cám gạo ở pH 2,5 và pH 5. Hoạt tính enzyme thô được xác định bằng phương pháp DNS cho thấy môi trường chứa xylan ở pH 2,5 cho hoạt tính xylanase cao nhất, đạt khoảng 2,02 U/mL sau 7 ngày nuôi cấy. Các mẫu nuôi trên cám mì và cám gạo ở pH thấp cũng ghi nhận hoạt tính enzyme tương đối cao. Phân tích SDS-PAGE và zymogram cho thấy chỉ một số băng protein thể hiện hoạt tính xylanase thủy phân xylan mặc dù có nhiều protein ngoại bào được tiết ra. Enzyme sau quá trình cô đặc và trao đổi đệm duy trì 73% hoạt tính sau xử lý ở 70°C trong 60 phút. Quá trình làm sạch bằng sắc ký lọc gel thu được 20 phân đoạn, trong đó phân đoạn F4 thể hiện tính bền nhiệt cao nhất (54%). Trong phạm vi hai mức pH khảo sát, xylanase thu nhận khi nuôi cấy ở pH 2,5 thể hiện độ bền nhiệt cao hơn so với pH 5, cho thấy nuôi cấy ở pH thấp là điều kiện tiềm năng để thu nhận xylanase bền nhiệt từ *Talaromyces* sp. ASM-115.

Từ khóa: nấm sợi chịu acid, hemicellulose, *Talaromyces*, xylan, xylanase

I. Đặt vấn đề

Hemicellulose là thành phần polysaccharide quan trọng trong thành tế bào thực vật và chiếm khoảng 25-30% sinh khối lignocellulose (Scheller & Ulvskov, 2010). Trong đó, xylan là dạng

hemicellulose phổ biến nhất (Ebringerová & Heinze, 2000; Scheller & Ulvskov, 2010). Xylan thường bao gồm một khung xương chính D-xylosyl liên kết β -(1 $\rightarrow$ 4), trên đó được gắn thêm các gốc thế khác nhau như α -L-arabinose, α -D-glucuronic

¹ Viện Công nghiệp Thực phẩm, Hà Nội, Việt Nam

² Đại học Quốc gia Lào, Lào

acid, 4-O-methyl-glucuronic acid (MeGlcA) và acid acetic (Ebringerová & Heinze, 2000). Xylanase đóng vai trò xúc tác quá trình thủy phân xylan thành xylose và các xylooligosaccharide. Hệ enzyme thủy phân xylan thực hiện quá trình thủy phân xylan thường bao gồm một loạt các enzyme thủy phân, bao gồm endo-1,4- β -xylanase (E.C.3.2.1.8), xylan -1,4- β - xylosidase (E.C. 3.2.1.37), α -glucuronidase (E.C.3.2.1.139), α -arabinofuranosidase (E.C. 3.2.1.55) và acetylxylan esterase (E.C.3.1.1.72). Tất cả các enzyme này hoạt động phối hợp để chuyển xylan thành các loại đường cấu thành (Bajpai, 2014; Li và cộng sự, 2022). Các enzyme xylanase hiện được ứng dụng rộng rãi trong công nghiệp giấy và bột giấy, xử lý lignocellulose, sản xuất thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và nhiên liệu sinh học (Rahim và cộng sự, 2020).

Trong những năm gần đây, nhu cầu tìm kiếm các enzyme hoạt động bền ở điều kiện acid và nhiệt độ cao ngày càng gia tăng nhằm đáp ứng yêu cầu của các quy trình công nghiệp khắc nghiệt (Kumar và cộng sự, 2018; Li và cộng sự, 2022; Rahim và cộng sự, 2020). Các chủng nấm sợi thuộc chi *Talaromyces* được xem là nguồn tiềm năng để thu nhận xylanase nhờ khả năng tiết enzyme ngoại bào mạnh và thích nghi tốt với điều kiện môi trường (Long và cộng sự, 2019; Sakthiselvan và cộng sự, 2014; Zaccarim và cộng sự, 2019). Các chủng thuộc chi *Talaromyces* đã được ghi nhận có khả năng thích nghi với điều kiện acid, với nhiều chủng sinh trưởng tối ưu ở pH 2,5-4,5 và thể hiện hoạt tính phân giải lignocellulose cao trong môi trường pH thấp (Thuy và cộng sự, 2025). Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã ghi nhận khả

năng sinh tổng hợp xylanase của các chủng *Talaromyces* trong nuôi cấy sử dụng phụ phẩm nông nghiệp làm cơ chất. Các phụ phẩm nông nghiệp giàu xylan, đặc biệt là cám mì, có tiềm năng làm cơ chất bền vững để sản xuất xylanase bằng chủng nấm *Talaromyces amestolkiae*, với hoạt tính enzyme đạt 13,02 U/mL ở điều kiện tối ưu gồm 20 g/L cám mì, 2,5 g/L yeast extract, 3 g/L K_2HPO_4 và pH 7 (Barbieri và cộng sự, 2022). Tuy nhiên, các nghiên cứu về chủng nấm chịu pH thấp phân lập tại Việt Nam còn khá hạn chế, đặc biệt là các nghiên cứu liên quan đến khả năng sinh xylanase cũng như độ bền nhiệt và độ bền pH của enzyme.

Chủng *Talaromyces* sp. ASM-115 phân lập tại Việt Nam đã cho thấy khả năng sinh trưởng trong điều kiện pH thấp và có hoạt tính xylanase đáng chú ý (Thuy và cộng sự, 2025). Tuy nhiên, hiện vẫn chưa có nhiều thông tin về ảnh hưởng của các nguồn cơ chất khác nhau đến khả năng cảm ứng sinh tổng hợp enzyme của chủng này, cũng như tác động của pH nuôi cấy đến hoạt tính và độ bền nhiệt của enzyme thu nhận được. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá khả năng sinh enzyme xylanase của chủng *Talaromyces* sp. ASM-115 trên nhiều nguồn cơ chất khác nhau ở pH 2,5 và pH 5, đồng thời khảo sát hoạt tính enzyme, phổ protein và khả năng bền nhiệt của enzyme thu nhận được.

II. Phương pháp và vật liệu nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chủng nấm *Talaromyces* sp. ASM-115 sử dụng trong nghiên cứu được lưu giữ trong Bảo tồn gen Vi sinh vật công nghiệp tại Viện Công nghiệp Thực phẩm.

2.2. Phương pháp nuôi cấy và thu nhận enzyme

Để khảo sát khả năng sinh enzyme, chủng nấm mốc chịu pH thấp được nuôi cấy trên các nguồn cơ chất glucose (Sigma-Aldrich), xylose (Sigma-Aldrich), xylan from birch wood (Apollo Scientific Ltd.), Avicel (Sigma-Aldrich), cám mì và cám gạo (mua tại chợ địa phương) trong điều kiện pH 2,5 và pH 5. Chủng được hoạt hóa trên môi trường PDA ở 30 °C trong 7 ngày để thu bào tử ($1,3 \times 10^8$ bào tử/mL). Môi trường nuôi cấy (*Fungal base medium (FBM)*): 4 g/L KH_2PO_4 , 13.6 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.8 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.6 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L Peptone, 0.1 g/L Yeast extract, 0.2 mL Tween- 80, 1 mL 1000X Trace Elements (10 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.2 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.8 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4.0 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3.5 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Các nguồn cơ chất khảo sát được bổ sung 2% (w/v). pH môi trường được điều chỉnh về pH 2,5 và pH 5 trước khi nuôi cấy. Bào tử được cấy với mật độ ban đầu 10^6 bào tử/mL và nuôi lắc ở 180 rpm, 30 °C trong 7 ngày. Mẫu được thu tại các thời điểm 0, 1, 2, 5, 6 và 7 ngày để đánh giá sinh trưởng và hoạt tính enzyme. Dịch enzyme thô được thu bằng ly tâm ở 4.500 rpm trong 15 phút ở 4°C, sau đó lọc qua giấy lọc và màng Sartorius™ Minisart™ NML Syringe 0,45 µm. Enzyme thô được loại muối bằng cột HiTrap™ Desalting với đệm sodium citrate 50 mM, pH 5 để đánh giá độ bền nhiệt.

2.3. Phương pháp xác định hoạt tính xylanase và protein

Hoạt tính xylanase được xác định bằng phương pháp DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) (Miller, 1959). 0,1 mL enzyme đã pha loãng thích hợp

được trộn với 0,2 mL xylan from birch wood (Apollo Scientific Ltd.) 1% (w/v) trong dung dịch đệm ở pH mong muốn. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 50°C trong 20 phút, sau đó lượng đường khử giải phóng được xác định bằng phương pháp DNS, sử dụng đường chuẩn xylose. Một đơn vị hoạt tính enzyme (U/mL) được định nghĩa là lượng enzyme giải phóng 1 µmol đường khử trong một phút dưới điều kiện phản ứng. Đối chứng âm được thực hiện bằng cách đun dịch enzyme ở 100 °C trong 10 phút trước khi tiến hành phản ứng. Giá trị đường khử từ mẫu đối chứng được trừ khỏi mẫu thí nghiệm nhằm loại bỏ ảnh hưởng của lượng đường có sẵn trong cơ chất. Nồng độ protein được xác định bằng Bradford reagent B6916 Sigma-Aldrich (Bradford, 1976).

2.4. Phương pháp điện di

Phổ protein được phân tích bằng phương pháp điện di SDS-PAGE (Sambrook và cộng sự, 1989). Phân tích zymogram được thực hiện dựa trên phương pháp SDS-PAGE biến tính thông thường sử dụng gel polyacrylamide 10% có bổ sung 1% xylan làm cơ chất (Cano-Ramírez và cộng sự, 2017). Sau điện di, gel được rửa hai lần bằng dung dịch Triton X-100 2% trong 30 phút ở nhiệt độ phòng nhằm loại bỏ SDS và phục hồi hoạt tính protein, tiếp theo rửa hai lần bằng đệm sodium citrate 50 mM pH 5 lạnh trong 15 phút. Phản ứng thủy phân cơ chất trong gel được tiến hành bằng cách ủ gel trong đệm sodium citrate 50 mM pH 5,0 ở 50 °C trong 1 giờ. Sau đó, gel được rửa 4-5 lần bằng nước cất và nhuộm bằng dung dịch Congo Red 0,1% ở 50°C trong 1 giờ. Quá trình hiện màu được thực hiện bằng dung dịch NaCl 1 M. Các băng

enzyme có hoạt tính xylanase xuất hiện dưới dạng các vùng trong suốt trên nền gel đỏ. Kết quả điện di được ghi nhận bằng cách chụp ảnh.

2.5. Phương pháp tinh sạch enzyme

Dịch enzyme thô được cô đặc và trao đổi đệm bằng hệ thống Vivaflow 200 sử dụng màng PES MWCO 5.000 Da với đệm sodium citrate 50 mM pH 5,0. Dịch enzyme sau khi cô đặc và trao đổi đệm tiếp tục được phân đoạn bằng sắc ký lọc gel sử dụng Sephadex G-25 (Cytiva) trên hệ thống ÄKTA purifier™ 100. Mẫu enzyme được nạp lên cột 10 mL với tốc độ dòng 0,5 mL/phút và được rửa giải bằng đệm sodium citrate 50 mM pH 5,0. Các phân đoạn protein được thu nhận dựa trên tín hiệu hấp thụ tại bước sóng 280 nm để phục vụ cho các phân tích hoạt tính enzyme và điện di tiếp theo.

2.6. Phương pháp đánh giá độ bền nhiệt

Độ bền nhiệt của enzyme được xác định bằng cách xử lý mẫu enzyme ở 70°C trong 60 phút, sau đó đo hoạt tính còn lại và tính phần trăm hoạt tính duy trì so với mẫu không xử lý nhiệt.

2.7. Phương pháp xử lý số liệu

Các thí nghiệm được bố trí lặp lại 3 lần. Số liệu được biểu diễn dưới dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn và được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 365. Sự khác biệt giữa các nghiệm thức được đánh giá bằng phân tích phương sai một yếu tố (one-way ANOVA) kèm kiểm định hậu định Tukey, với mức ý nghĩa thống kê $p < 0,05$. Các đánh giá khác biệt có ý nghĩa thống kê được ký hiệu bằng các chữ cái khác nhau (a, b, c) trên đồ thị.

III. Kết quả và thảo luận

3.1. Đánh giá sinh trưởng và khả năng sinh xylanase của *Talaromyces* sp. ASM-115 trên các cơ chất khác nhau

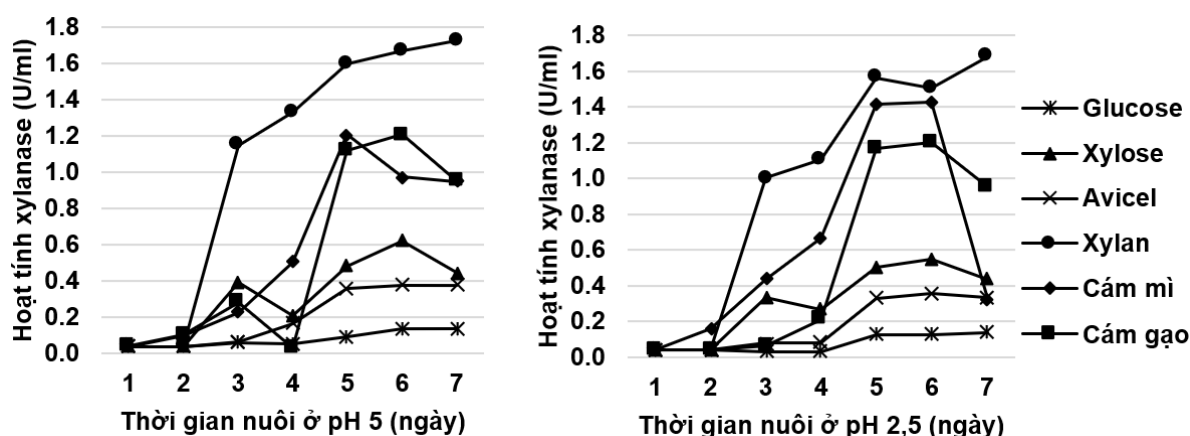
Kết quả nuôi cấy cho thấy chủng *Talaromyces* sp. ASM-115 có khả năng sinh trưởng trên nhiều nguồn cơ chất khác nhau trong điều kiện pH 2,5 và pH 5. Sau khoảng 2 ngày nuôi cấy, sự phát triển của hệ sợi nấm đã được ghi nhận. Trong số các cơ chất khảo sát, glucose và xylose hỗ trợ sinh trưởng mạnh nhất, đặc biệt ở pH 2,5. Đây là các đường đơn có thể được hấp thu trực tiếp qua màng tế bào mà không cần quá trình thủy phân ngoại bào, giúp vi sinh vật nhanh chóng sử dụng làm nguồn carbon cho tăng trưởng. Đối với các cơ chất polymer như xylan và avicel, chủng nấm vẫn sinh trưởng tốt nhưng chậm hơn so với glucose và xylose do cần tiết enzyme ngoại bào để phân giải cơ chất trước khi hấp thu. Các mẫu sử dụng cám mì và cám gạo khó quan sát mức độ sinh trưởng. Kết quả cho thấy điều kiện pH 2,5 phù hợp hơn đối với sự phát triển của chủng nấm so với pH 5, phản ánh đặc tính thích nghi với môi trường pH thấp của *Talaromyces* sp. ASM-115. Cần lưu ý rằng các nhận định về sinh trưởng ở đây dựa trên quan sát hình thái hệ sợi; nghiên cứu chưa định lượng sinh khối hay tốc độ sinh trưởng, do đó các so sánh mức độ sinh trưởng giữa các cơ chất chỉ mang tính định tính.

Kết quả ở hình 1 cho thấy hoạt tính enzyme xylanase tăng mạnh sau ngày nuôi thứ ba và đạt cực đại vào khoảng ngày thứ năm đến ngày thứ bảy tùy theo cơ chất khảo sát. Trong đó, môi trường bổ sung xylan ở pH 2,5 cho hoạt tính cao nhất, đạt khoảng 2,02 U/mL vào ngày thứ bảy. Ngoài ra, các mẫu sử dụng cám mì

và cám gạo ở pH 2,5 cũng ghi nhận hoạt tính enzyme tương đối cao, lần lượt đạt khoảng 1,70 U/mL và 1,44 U/mL. Trong khi đó, glucose là cơ chất cho hoạt tính thấp nhất ở cả hai điều kiện pH, với hoạt tính luôn dưới 0,2 U/mL.

Hoạt tính xylanase cực đại thu được trong nghiên cứu này (khoảng 2,02 U/mL) thấp hơn so với nhiều công bố trên các chủng *Talaromyces* khác. Chẳng hạn, *T. amestolkiae* đạt 13,02 U/mL khi nuôi cấy trên cám mì trong điều kiện đã tối ưu hóa (20 g/L cám mì, 2,5 g/L cao nấm men, 3 g/L K_2HPO_4 , pH 7) (Barbieri và cộng sự., 2022). Sự chênh lệch này có thể được giải thích bởi một số yếu tố như môi trường nuôi cấy trong nghiên cứu này chưa được

tối ưu hóa về thành phần dinh dưỡng và nồng độ cơ chất, trong khi các công bố đối chứng thường áp dụng quy trình tối ưu hóa đa yếu tố. Mặt khác, điều kiện pH cực thấp (pH 2,5) tuy phù hợp với đặc tính ưa acid của chủng nhưng không nhất thiết là điều kiện cho năng suất enzyme cao nhất, do quá trình sinh tổng hợp và tiết enzyme chịu ảnh hưởng mạnh của pH. Do vậy, giá trị 2,02 U/mL nên được xem là kết quả bước đầu trong điều kiện chưa tối ưu, và cần tối ưu hóa môi trường và điều kiện nuôi cấy. Điểm có ý nghĩa của nghiên cứu không nằm ở mức hoạt tính tuyệt đối mà ở khả năng sinh xylanase vừa hoạt động vừa bền nhiệt trong môi trường acid mạnh, đặc tính có giá trị cho các quy trình công nghiệp vận hành ở pH thấp.



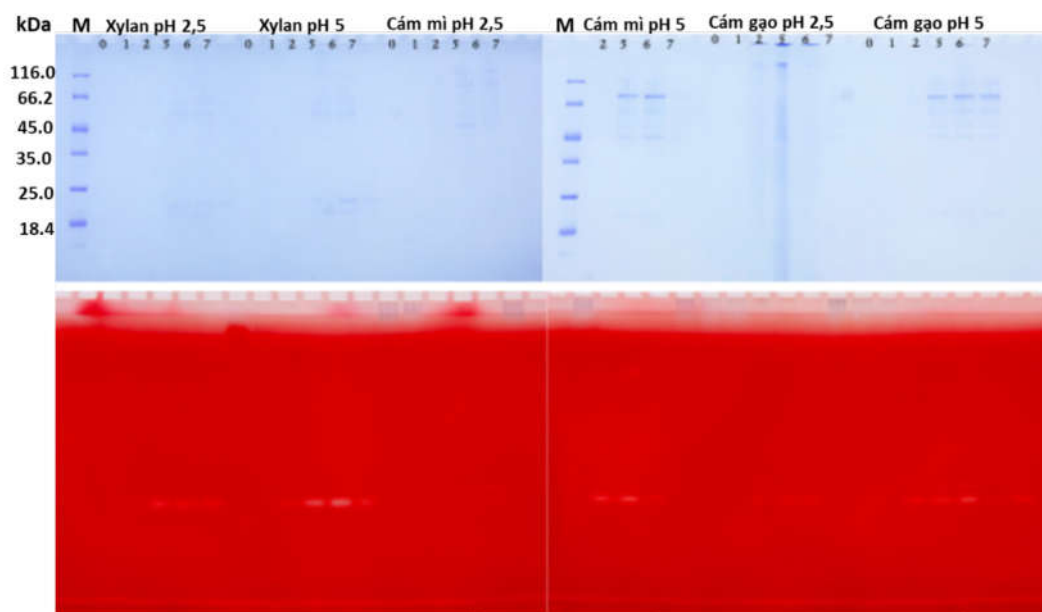
Hình 1. Khả năng biểu hiện hoạt tính xylanase của chủng *Talaromyces* sp. ASM-115 trên các nguồn carbon khác nhau ở pH 2,5 và pH 5 trong quá trình nuôi cấy 7 ngày

Phân tích SDS-PAGE cho thấy sự xuất hiện của nhiều băng protein trong dịch enzyme ngoại bào. Tuy nhiên, kết quả zymogram chỉ ghi nhận một số băng có hoạt tính thủy phân xylan, cho thấy không phải tất cả protein tiết ra đều tham gia vào quá trình phân giải cơ chất. Kết quả điện di cũng cho thấy sự khác biệt về phổ protein giữa các cơ chất nuôi cấy khác nhau. Các vùng hoạt tính tập trung

chủ yếu ở các mẫu nuôi trên xylan, cám mì và cám gạo, đặc biệt rõ ở giai đoạn ngày 5-7. Điều này cho thấy các cơ chất giàu hemicellulose có khả năng tổng hợp xylanase mạnh hơn so với các nguồn carbon đơn giản. Các mẫu cám mì pH 5 và cám gạo pH 5 xuất hiện nhiều băng protein hơn, trong khi mẫu xylan pH 2,5 dù có hoạt tính enzyme cao nhưng số lượng băng protein không nhiều (Hình 2).

Sự tương phản giữa số lượng băng protein trên SDS-PAGE và số ít băng có hoạt tính trên zymogram cho thấy hệ enzyme ngoại bào của chủng gồm nhiều protein tiết ra nhưng chỉ một phần nhỏ trực tiếp tham gia thủy phân xylan. Đặc điểm này phù hợp với hiểu biết hiện nay rằng xylanase nấm chủ yếu thuộc hai họ glycoside hydrolase GH10 (khối lượng phân tử thường khoảng 30-40 kDa) và GH11 (khoảng 20 kDa), trong khi phần

lớn protein ngoại bào còn lại là các enzyme phụ trợ hoặc protein không liên quan trực tiếp đến phân giải xylan (Li và cộng sự, 2022). Số băng hoạt tính hạn chế ở mẫu xylan pH 2,5 gợi ý chủng tiết ra một tập hợp xylanase tương đối chọn lọc trong điều kiện acid mạnh. Tuy nhiên, do các băng trên gel chưa được phân tách hoàn toàn, việc gán chính xác khối lượng phân tử và quy về từng họ GH cần được thực hiện thận trọng.



Hình 2. Phân tích SDS-PAGE (trên) và zymogram (dưới) của enzyme ngoại bào từ chủng *Talaromyces* sp. ASM-115 nuôi cấy trên các cơ chất khác nhau ở pH 2,5 và pH 5. Các mẫu được thu ở các thời điểm nuôi cấy 0, 1, 2, 5, 6 và 7 ngày. M: Thang chuẩn protein Unstained Protein Molecular Weight Marker 26610 (Thermo Fisher, USA). Các vùng sáng trên zymogram biểu thị các băng protein có hoạt tính xylanase.

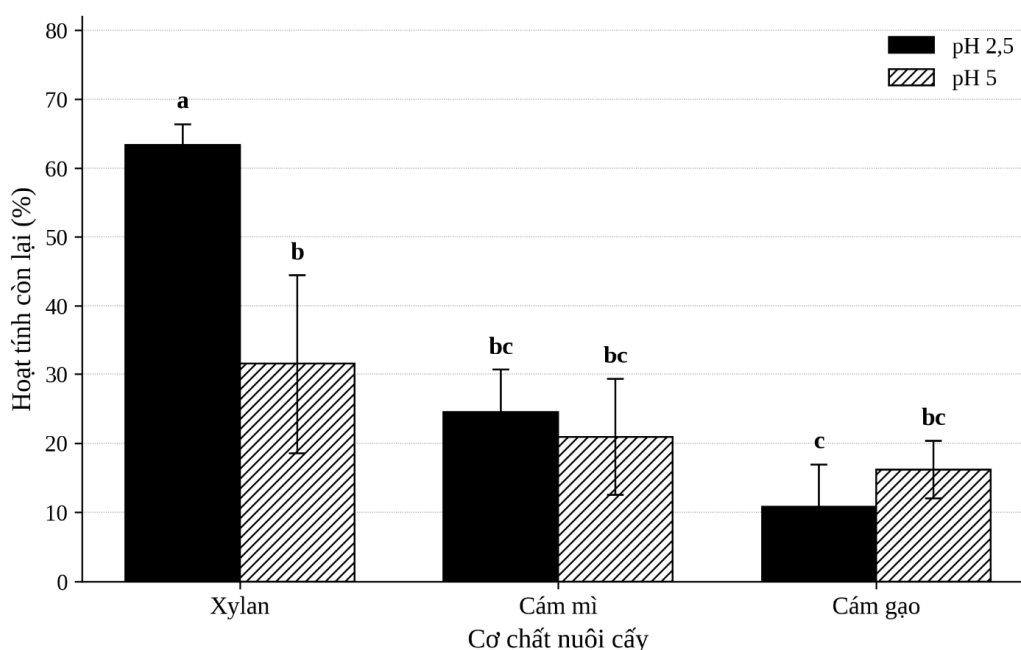
Hình trên cho thấy hoạt tính xylanase giữa pH 2,5 và pH 5 không khác biệt quá lớn ở một số cơ chất, giá trị hoạt tính cao nhất vẫn được ghi nhận ở môi trường xylan pH 2,5. Mặt khác, do *Talaromyces* sp. ASM-115 là chủng nấm ưa pH thấp, điều kiện này được xem là phù hợp hơn cho quá trình sinh trưởng và tiết enzyme ngoại bào.

3.2. Đánh giá khả năng bền nhiệt của xylanase sinh bởi *Talaromyces* sp. ASM-115 trên các cơ chất khác nhau

Kết quả khảo sát độ bền nhiệt cho thấy hoạt tính xylanase còn lại của chủng *Talaromyces* sp. ASM-115 thay đổi đáng kể tùy theo điều kiện nuôi cấy và nguồn cơ chất sử dụng (Hình 3). Trong số các mẫu khảo sát, enzyme thu nhận từ môi trường xylan pH 2,5 duy trì hoạt tính cao nhất sau

xử lý nhiệt, với hoạt tính còn lại 63,34%, cho thấy enzyme có độ bền nhiệt tương đối tốt. Ngược lại, mẫu xylan pH 5 chỉ duy trì khoảng 31,48% hoạt tính, cho thấy điều kiện pH thấp trong quá trình nuôi cấy có thể góp phần tạo ra enzyme ổn định nhiệt hơn. Đối với các mẫu sử dụng cám mì và cám gạo, hoạt tính enzyme sau xử lý nhiệt giảm đáng kể, chỉ còn khoảng 10-25%. Trong đó, cám gạo pH 2,5 cho giá trị thấp

nhất, khoảng 10%, chứng tỏ enzyme tạo thành trong điều kiện này kém bền nhiệt hơn. Các mẫu nuôi cấy trên Avicel cho thấy hoạt tính rất thấp, cho nên số liệu có độ lệch chuẩn khá lớn, phản ánh sự không ổn định của kết quả phân tích enzyme trong điều kiện này. Do vậy, hình 3 chỉ thể hiện hoạt tính xylanase còn lại sau xử lý nhiệt đối với cơ chất xylan, cám mì và cám gạo ở các pH khác nhau.



One-way ANOVA: $F = 18,67$; $p < 0,001$ ($n = 3$, trung bình $\pm$ SD). Các cột mang chữ cái khác nhau khác biệt có ý nghĩa (Tukey HSD, $p < 0,05$).

Hình 3. Hoạt tính xylanase còn lại (%) của enzyme ngoại bào từ chủng *Talaromyces* sp. ASM-115 sau xử lý nhiệt. Enzyme được thu nhận từ các môi trường nuôi cấy sử dụng các cơ chất khác nhau tại pH 2,5 và pH 5. Giá trị được biểu diễn dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. One-way ANOVA: $F = 18,67$; $p < 0,001$ ($n = 3$, trung bình $\pm$ SD). Các cột mang chữ cái khác nhau có ý nghĩa (Tukey HSD, $p < 0,05$).

Kết quả cho thấy nguồn cơ chất và pH môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng rõ rệt đến tính ổn định nhiệt của xylanase. Enzyme thu nhận từ môi trường xylan ở pH 2,5 vừa cho hoạt tính xylanase cao vừa thể hiện độ bền nhiệt tốt nhất, lựa chọn điều kiện này cho các bước thu nhận và tinh sạch enzyme tiếp theo.

Cơ chế của hiện tượng enzyme sinh ra ở pH 2,5 bền nhiệt hơn so với pH 5 hiện chưa được làm rõ và cần được nghiên cứu thêm. Có thể đặt ra một số giả thuyết. Thứ nhất, điều kiện pH cực thấp có thể chọn lọc biểu hiện một hoặc một số isoenzyme xylanase có cấu trúc bền nhiệt hơn, dẫn đến khác biệt về thành phần enzyme tiết ra giữa hai điều kiện pH. Quan sát trên

zymogram cho thấy phổ băng hoạt tính ở mẫu xylan pH 2,5 khác với mẫu pH 5, phù hợp với khả năng có sự thay đổi thành phần isoenzyme (Polizeli và cộng sự, 2005). Thứ hai, pH nuôi cấy có thể ảnh hưởng đến mức độ glycosyl hóa của protein tiết ra, trong khi mức glycosyl hóa cao thường liên quan đến độ bền nhiệt và độ bền protease tốt hơn của xylanase nấm (Fonseca-Maldonado và cộng sự, 2013). Tuy nhiên, các giả thuyết này mới dừng ở mức gợi ý và cần được kiểm chứng trực tiếp bằng các phân tích chuyên sâu hơn (tinh sạch từng isoenzyme, xác định khối lượng phân tử và mức glycosyl hóa, phân tích cấu trúc) trong các nghiên cứu tiếp theo.

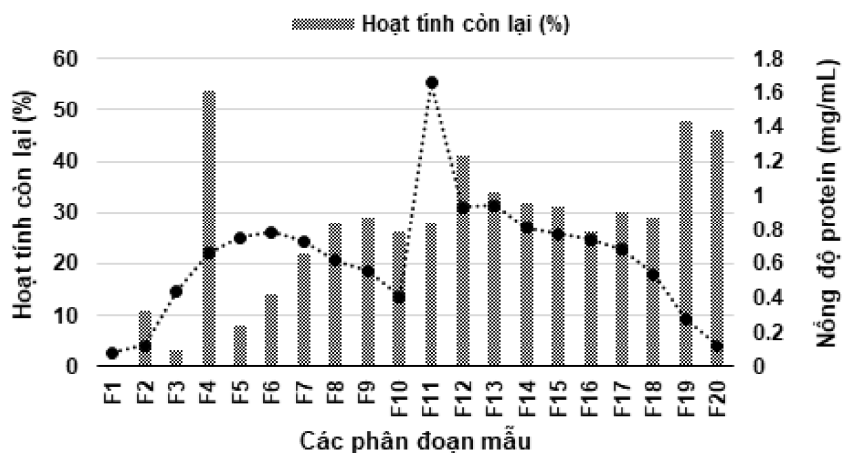
3.3. Phân đoạn và đánh giá độ bền nhiệt của xylanase sinh bởi *Talaromyces* sp. ASM-115 trên cơ chất xylan ở pH 2,5

Thí nghiệm tinh sạch và thu hồi enzyme này được thực hiện trên một mẻ

nuôi cấy riêng. Sau quá trình nuôi cấy chủng *Talaromyces* sp. ASM-115 trên cơ chất xylan ở pH 2,5, enzyme thô được tiến hành quá trình cô đặc và đổi đệm. Hoạt tính enzyme sau cô đặc đạt 20,43 U/mL với hàm lượng protein 1,66 mg/mL, tương ứng hoạt tính riêng khoảng 12,28 U/mg. So với dịch enzyme thô ban đầu (6,54 U/mL; 0,74 mg/mL; 8,85 U/mg), bước cô đặc bằng siêu lọc làm tăng hoạt tính theo thể tích khoảng 3,1 lần, đạt hệ số tinh sạch 1,39 lần với hiệu suất thu hồi 39,0% (Bảng 1). Kết quả đánh giá độ bền nhiệt cho thấy enzyme sau khi trao đổi đệm và cô đặc vẫn duy trì 73% hoạt tính sau xử lý ở 70°C trong 60 phút. Quá trình phân đoạn bằng sắc ký lọc gel thu được 20 phân đoạn (Hình 4). Trong đó, các phân đoạn F4-F8 thể hiện hoạt tính xylanase và hàm lượng protein cao nhất (Hình 4).

Bảng 1. Tóm tắt quá trình tinh sạch xylanase từ *Talaromyces* sp. ASM-115 trên cơ chất xylan ở pH 2,5

Bước tinh sạch	Thể tích (mL)	Tổng protein (mg)	Tổng hoạt tính (U)	Hoạt tính riêng (U/mg)	Hiệu suất thu hồi (%)	Hệ số tinh sạch (lần)
Dịch nổi (enzyme thô)	800	591,40	5234,57	8,85	100	1,0
Cô đặc bằng siêu lọc Vivaflow (MWCO 5.000 Da)	100	166,39	2043,21	12,28	39,0	1,39

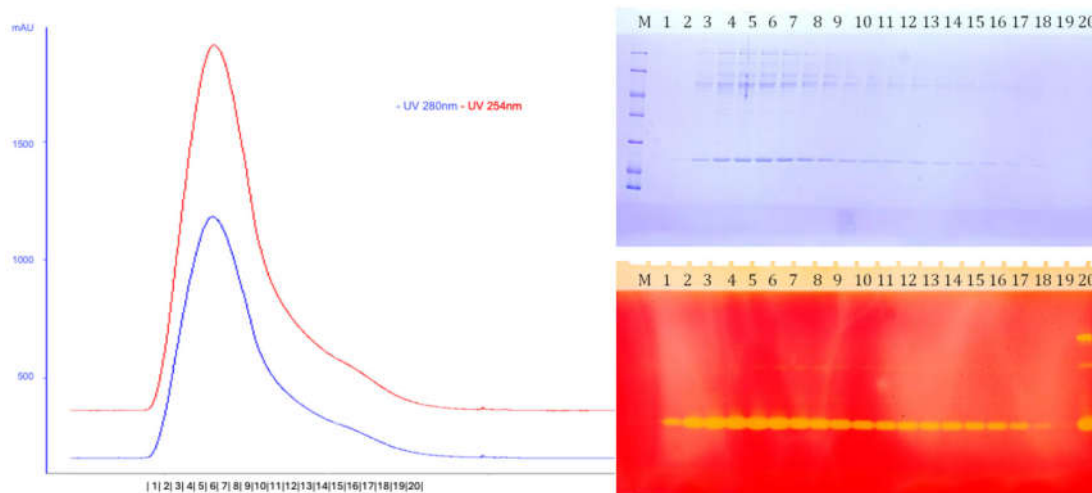


Hình 4. Hàm lượng protein và hoạt tính còn lại của các phân đoạn enzyme sau xử lý nhiệt ở

70°C trong 60 phút

Khả năng chịu nhiệt của từng phân đoạn lại có sự khác biệt lớn. Trong đó, phân đoạn F3 mặc dù có hàm lượng protein tương đối cao (0,44 mg/mL), nhưng chỉ duy trì được 3% hoạt tính sau xử lý nhiệt. Ngược lại, phân đoạn F4 thể hiện đặc tính

hàm lượng protein không tỷ lệ thuận với độ bền nhiệt của enzyme.



Hình 5. Phổ hấp thụ UV-Vis của enzyme xylanase tinh sạch (trái) và phân tích điện di SDS-PAGE kết hợp zymogram đánh giá hoạt tính enzyme (phải)

Chú thích: M: thang chuẩn protein Unstained Protein Molecular Weight Marker 26610 (Thermo Fisher, USA); 1-20 là thứ tự phân đoạn (F) thu mẫu theo phổ hấp phụ UV-Vis

Mặc dù vậy, kết quả phân tích điện di cho thấy các băng protein chưa được phân tách rõ ràng sau khi tinh sạch, chứng tỏ quy trình sắc ký hiện tại chưa đạt hiệu quả tối ưu (Hình 5). Điều này có thể liên quan đến sự tương đồng về điện tích hoặc kích thước của các protein trong hỗn hợp enzyme. Trong khi phần lớn nghiên cứu trước đây về *Talaromyces* tập trung vào tối ưu hóa sản xuất xylanase ở pH trung tính hoặc hơi acid, rất ít nghiên cứu khảo sát khả năng sinh xylanase bền nhiệt trong điều kiện pH thấp. Nghiên cứu này cho

ưu việt với hàm lượng protein đạt 0,66 mg/mL và khả năng giữ hoạt tính lên tới 54% sau xử lý nhiệt, chứng minh đây là phân đoạn giàu các xylanase bền nhiệt tiềm năng. Đối với phân đoạn F5, dù có hàm lượng protein cao hơn F4 (0,75 mg/mL), nhưng chỉ duy trì được 8% hoạt tính sau gia nhiệt, điều này khẳng định tổng

thấy chủng *Talaromyces* sp. ASM115 phân lập tại Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp xylanase bền nhiệt trong điều kiện pH 2,5, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong các quy trình công nghiệp acid hóa.

IV. Kết luận và kiến nghị

Kết quả nghiên cứu cho thấy *Talaromyces* sp. ASM-115 có khả năng sinh tổng hợp xylanase trong điều kiện pH thấp. Trong phạm vi hai mức pH được khảo sát, xylanase thu nhận khi nuôi cấy ở pH 2,5 bước đầu cho thấy độ bền nhiệt cao hơn so với ở pH 5,0. Tuy nhiên, kết luận về vai trò của pH thấp đối với độ bền nhiệt của enzyme cần được kiểm chứng chính xác thông qua phân tích cấu trúc hay sinh

hóa chuyên sâu. Phân tích SDS-PAGE và zymogram cho thấy hệ enzyme ngoại bào của chủng nghiên cứu có tính đa dạng cao nhưng chỉ một số băng protein thể hiện hoạt tính thủy phân xylan rõ rệt. Enzyme sau loại muối duy trì 73% hoạt tính khi xử lý ở 70°C trong 60 phút. Quá trình phân đoạn bằng sắc ký lọc gel trong nghiên cứu này chưa phân tách hoàn toàn các protein trong hỗn hợp enzyme. Bên cạnh đó, mức hoạt tính thu được (khoảng 2,02 U/mL) còn thấp so với các công bố trên môi trường đã tối ưu, do đó, tối ưu hóa thành phần môi trường và điều kiện nuôi cấy cũng là hướng cần thiết để nâng cao năng suất enzyme. Nghiên cứu tiếp theo cần tập trung tối ưu quy trình tinh sạch để phân tách và xác định đặc tính của các xylanase trong hỗn hợp, đồng thời khảo sát thêm dải pH và làm rõ cơ chế phân tử của tính bền nhiệt.

Lời cảm ơn: Bài báo này được hỗ trợ bởi nhiệm vụ Bảo tồn và lưu giữ nguồn gen Vi sinh vật Công nghiệp và hợp tác giữa Viện Công nghiệp Thực phẩm với Trường Đại học Chalmers theo hợp đồng số 2020-03475.

Tài liệu tham khảo

- Bajpai, P. (2014). Chapter 2 - Xylan: Occurrence and Structure. In *Xylanolytic Enzymes* (pp. 9-18). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801020-4.00002-0>
- Barbieri, G. S., Bento, H. B. S., de Oliveira, F., Picheli, F. P., Dias, L. M., Masarin, F., & Santos-Ebinuma, V. C. (2022). Xylanase Production by *Talaromyces amestolkiae* Valuing Agroindustrial Byproducts. *BioTech (Basel)*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/biotech11020015>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cano-Ramírez, C., Santiago-Hernández, A., Rivera-Orduña, F. N., Pineda-Mendoza, R. M., Zúñiga, G., & Hidalgo-Lara, M. E. (2017). One-step zymogram method for the simultaneous detection of cellulase/xylanase activity and molecular weight estimation of the enzyme. *Electrophoresis*, 38(3-4), 447-451. <https://doi.org/10.1002/elps.201600347>
- Ebringerová, A., & Heinze, T. (2000). Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*, 21(9), 542-556. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1521-3927\(20000601\)21\(9\)542::AID-MRCA542.0.CO;2](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1521-3927(20000601)21(9)542::AID-MRCA542.0.CO;2)
- Fonseca-Maldonado, R., Vieira, D. S., Alpointi, J. S., Bonneil, E., Thibault, P., & Ward, R. J. (2013). Engineering the Pattern of Protein Glycosylation Modulates the Thermostability of a GH11 Xylanase. *Journal of Biological Chemistry*, 288(35), 25522-25534. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.485953>
- Kumar, V., Dangi, A. K., & Shukla, P. (2018). Engineering Thermostable Microbial Xylanases Toward its Industrial Applications. *Molecular Biotechnology*, 60(3), 226-235. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0059-6>
- Li, X., Dilokpimol, A., Kabel, M. A., & de Vries, R. P. (2022). Fungal xylanolytic enzymes: Diversity and applications. *Bioresource technology*, 344, 126290. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126290>

- Long, C., Liu, J., Gan, L., Zeng, B., & Long, M. (2019). Optimization of Xylanase Production by *Trichoderma orientalis* Using Corn Cobs and Wheat Bran via Statistical Strategy. *Waste and Biomass Valorization*, 10(5), 1277-1284. <https://doi.org/10.1007/s12649-017-0149-x>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 67(5), 577-591. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7>
- Rahim, K., Wei, J., & Basit, A. (2020). Xylanase and Its Industrial Applications. In T. Peixoto Basso, T. O. Basso, & L. C. Basso (Eds.), *Biotechnological Applications of Biomass*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92156>
- Sakthiselvan, P., Naveena, B., & Partha, N. (2014). Molecular characterization of a Xylanase-producing fungus isolated from fouled soil. *Brazilian journal of Microbiology*, 45(4), 1293-1302
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*.
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual review of plant biology*, 61(1), 263-289. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Thuy, N. T., Coleman, T., Christopher, M., Chau, N. B., Bach, C. X., Hanh, L. T. M., Nikolaivits, E., Larsbrink, J., Olsson, L., & Thanh, V. N. (2025). Extremely acidophilic filamentous fungi are more prevalent in diverse ecosystems than previously documented. *Scientific Reports*, 15(1), 30445. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-06321-1>
- Zaccarim, B. R., de Oliveira, F., Passarini, M. R. Z., Duarte, A. W. F., Sette, L. D., Jozala, A. F., Teixeira, M. F. S., & de Carvalho Santos-Ebinuma, V. (2019). Sequencing and phylogenetic analyses of *talaromyces amestolkiae* from amazon: A producer of natural colorants. *Biotechnology Progress*, 35(1), e2684. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/btpr.2684>

EVALUATION OF XYLANASE PRODUCTION UNDER LOW-PH CONDITIONS BY *Talaromyces* sp. ASM-115

Nguyen Bao Chau¹, Anin Keosavanh², Tran Tra My¹,
Vu Nguyen Thanh¹, Nguyen Thanh Thuy¹

Abstract: *Xylanases are important industrial enzymes widely used in the pulp and paper, food, feed, and biofuel industries. In this study, the acidophilic fungal strain Talaromyces sp. ASM-115 was evaluated for xylanase production under low-pH conditions using different carbon sources, including glucose, xylose, xylan, avicel, wheat bran, and rice bran. Cultivation was conducted at pH 2.5 and pH 5 under submerged conditions at 30°C for 7 days. Xylanase activity was determined using the DNS assay, while protein profiles and enzymatic activities were analyzed by SDS-PAGE and zymogram analyses. The highest xylanase activity (2.02 U/mL) was obtained in xylan-containing medium at pH 2.5 after 7 days of cultivation. Wheat bran and rice bran also supported relatively high enzyme production under acidic conditions. Zymogram analysis revealed that only a few extracellular protein bands exhibited xylan-hydrolyzing activity despite the presence of multiple secreted proteins. The crude enzyme retained 73% residual activity after heat treatment at 70°C for 60 min following concentration and buffer exchange, indicating relatively high thermostability. Gel filtration chromatography generated 20 protein fractions, among which fraction F4 showed the highest thermal stability, retaining 54% activity after heat treatment. Within the two pH levels tested, cultivation at pH 2.5 yielded xylanase with higher thermostability than at pH 5, suggesting low-pH cultivation as a promising condition for obtaining thermostable xylanase from Talaromyces sp. ASM-115 and highlight its potential application in acidic industrial bioprocesses.*

Keywords: *acidophilic fungi, hemicellulose, Talaromyces, xylanase, xylan*

¹ Food Industries Research Institute, Hanoi, Vietnam

² National University of Laos, Laos