



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003205

(51) **C12N 1/14**
2006.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00313

(22) 22/09/2020

(67) 1-2020-05449

(45) 25/07/2023 424

(43) 25/01/2021 394

(73) Viện Công nghiệp Giấy và Xenlulo, Bộ Công thương (VN)
59 Vũ Trọng Phụng, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội

(72) Đặng Văn Sơn (VN); Phan Thị Hồng Thảo (VN); Cao Văn Sơn (VN); Ngô Văn Hữu (VN); Trần Thị Hương (VN); Nguyễn Vũ Mai Linh (VN).

(54) **CHŨNG VI KHUẨN CHỊU NHIỆT BREVIBACILLUS AGRI CVSVC1-1 THUẦN
KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn chịu nhiệt *Brevibacillus agri* CVSVC1 - 1 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu vỏ cây trong lòng đồng ủ vỏ cây có nhiệt độ 45- 55°C tại nhà máy Giấy Bãi Bằng, Phú Ninh, Phú Thọ, Việt Nam. Chủng này có khả năng sinh trưởng và làm giảm nhựa cây trong dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn. Chủng vi khuẩn *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 có trình tự gen 16S rARN như nêu trong SEQ ID NO:1 và được đăng ký trên Genbank với mã số MT534040.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng làm giảm nhựa cây trong dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn, được thu thập trên mẫu vỏ cây tại đồng ủ vỏ cây của Nhà máy giấy Bãi Bằng, Phú Ninh, Phú Thọ, Việt Nam nhằm ứng dụng trong giảm nhựa cây trên dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn ứng dụng trong sản xuất bột giấy.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Trong tự nhiên, bên cạnh các loài nấm phân hủy gỗ và các chất chiết trong cây, còn có nhiều loài vi khuẩn trong đất, trong nước thải nhà máy giấy và đồng ủ compost cũng có khả năng phân hủy nhanh các axit nhựa. Chúng có tốc độ phát triển nhanh hơn nấm, nhiều loài có khả năng tạo bào tử và chịu được nhiệt độ cao nên dễ dàng sử dụng trong công nghiệp [13]. Trong ngành công nghiệp sản xuất giấy hiện nay cũng đang hướng tới việc tiên xử lý nguyên liệu bằng phương pháp sinh học với tác nhân chủ yếu là nấm, vi khuẩn, xạ khuẩn. Hiện nay cũng đã có rất nhiều ứng dụng xử lý nhựa cây bằng nấm mục trắng, nấm đất gỗ, tuy nhiên, việc sử dụng vi khuẩn trong phân hủy nhựa cây vẫn còn rất ít và chưa được nghiên cứu nhiều.

Nhựa cây là phần để chỉ các chất trích ly (extractives) trong gỗ, chúng thường tập trung chủ yếu trong các kênh dẫn nhựa, túi nhựa, tế bào nhu mô (hoặc tế bào dầu và tế bào latex (chỉ có trong một số loại gỗ cứng nhiệt đới)). Sự đa dạng trong thành phần nhựa cây phụ thuộc vào loài cây (gỗ cứng và gỗ mềm), bộ phận trên cây, điều kiện sinh trưởng, vị trí địa lý, mùa trong năm và tuổi của cây (Moraes và Pereira, 2012). Đáng chú ý nhất là các chất trích ly béo (lipophilic extractives), tức là các hợp chất chiết được trong dung môi không phân cực như alkan, rượu béo, axit béo, axit nhựa, sterol, các terpenoid, sterol liên hợp, các chất béo trung tính (triglycerid) và sáp (este của rượu béo và axit béo), vì chúng có ảnh hưởng lớn tới quá trình sản xuất bột giấy và giấy (Gutiérrez et al., 2009, 2010; Poletto, 2016; He, Hu, 2013).

Vi khuẩn có khả năng phân hủy nhựa cây đã được chứng minh, mặc dù số lượng công bố là ít hơn so với nấm. Một số khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzym và sinh trưởng trên các loại gỗ có chất chiết với nồng độ axit nhựa cao. Một số vi khuẩn phân lập từ đất, gỗ và các nguồn nước tự nhiên như *Arthrobacter* sp., *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas* sp., và *Flavobacterium resinovorum* đều có khả năng phát

triển trên axit dehydroabietic như nguồn cacbon duy nhất. Một số vi khuẩn Gr (-) cũng có khả năng phân hủy các axit nhựa khác nhau trong gỗ cũng đã được công bố như chi *Sphingomonas*, *Cornamonas*, *Alcaligenes* và *Pseudomonas*. Hơn 75% axit nhựa đã bị phân hủy trong vòng 8 ngày bởi *Sphingomonas* sp. và *Z. ramigera*. *Sphingomonas* sp. có thể sử dụng nhiều loại cacbon thường thấy trong nước thải của nhà máy bột giấy và có thể phát triển trên axit nhựa nhanh hơn trên glucoza. Trong một số nghiên cứu, các loài *Pseudomonas* đã được công bố là có thể phát triển trên nguồn cacbon duy nhất là axit isopimaric. Ngoài ra, chúng có thể phát triển trên axit pimaric và dehydroabietic và axit abietic. Trong một số nghiên cứu về các vi khuẩn phân lập từ nước thải sản xuất bột giấy kraft, hai trong số 9 vi khuẩn phân lập có thể phân hủy trên 50% axit dehydroabietic (ở nồng độ ban đầu là 40 pg mL⁻¹) trong vòng 24 giờ. Các vi khuẩn còn lại có khả năng phân hủy khoảng 30% axit dehydroabietic trong cùng khoảng thời gian. Tuy nhiên, các loài vi sinh vật khác nhau thì khả năng phân hủy các thành phần axit nhựa là khác nhau.

Theo Burnes và cộng sự (2000) tiền xử lý gỗ thông không cần khử trùng với các chủng *P. fluorescens* NRRL B21432 và *Pseudomonas* sp. UM-74 đã làm giảm 40 và 34%, tương ứng chất chiết nhựa trên các loại dăm mảnh tươi. Trong đó, các axit nhựa giảm 25% và các axit béo giảm 36%, tương tự khi xử lý dăm mảnh gỗ với các chủng nấm bạch tạng. Bên cạnh đó, sử dụng các chủng vi khuẩn làm giảm hàm lượng các chất chiết trong gỗ trước khi sản xuất bột giấy dẫn đến giảm các vấn đề về nhựa cây trong suốt quá trình sản xuất giấy và giảm nồng độ các axit nhựa trong dòng thải. Các vi sinh vật này có tiềm năng ứng dụng cao do có khả năng chịu nhiệt, sinh trưởng và phát triển trong môi trường trung tính hoặc hơi kiềm mà nấm phân hủy gỗ không sinh trưởng được. Bên cạnh đó, một số nghiên cứu cho thấy sử dụng vi khuẩn có thể mang lại hiệu quả cao do khả năng phát triển nhanh trên gỗ không cần khử trùng và lần át được sự phát triển của các loài nấm tạp nhiễm.

Nguyên liệu sản xuất bột giấy chính hiện nay tại nước ta là gỗ cứng (bạch đàn, keo tai tượng và keo lai). Cặn nhựa hiện nay là vấn đề gây ảnh hưởng lớn đến quá trình sản xuất bột giấy từ gỗ làm giảm hiệu suất quá trình sản xuất, tăng chi phí sản xuất và ảnh hưởng đến môi trường. Một số giải pháp đã được áp dụng trong bảo quản dăm mảnh, phun nước, bổ sung hóa chất trợ phân tán nhựa trong quá trình nấu bột v.v., nhưng vẫn chưa đem lại hiệu quả thực sự. Các công ty sản xuất bột từ gỗ như Tổng công ty giấy Việt Nam. Công ty CP Giấy An Hòa hiện chịu ảnh hưởng nhiều của vấn đề nhựa cây. Biện pháp kiểm soát nhựa cây bằng vi sinh vật và enzym là thân thiện với môi trường và sức khỏe con người. Tiền xử lý nguyên liệu gỗ bằng vi sinh

vật giúp giảm hàm lượng các chất trích ly nhựa trong nguyên liệu trước nấu dẫn đến cải thiện quá trình sản xuất bột giấy.

Trên thế giới và Việt Nam chưa có công bố nào về chủng vi khuẩn *Brevibacillus agri* CVSVC1-1, phân lập trên mẫu vỏ cây tại đồng ủ vỏ cây của nhà máy giấy Bãi Bằng ứng dụng để phân hủy nhựa cây trên nguyên liệu dăm mảnh gỗ keo. Chủng vi khuẩn này làm giảm hàm lượng chất trích ly nhựa cây trong nguyên liệu gỗ Keo khoảng 40% sau 14 ngày và khoảng 50% sau 21 ngày ủ.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề xuất chủng vi khuẩn *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 thuần khiết về mặt sinh học, có khả năng làm giảm hàm lượng nhựa cây trong nguyên liệu gỗ Keo và Bạch đàn. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 phân lập trên mẫu vỏ cây tại đồng ủ vỏ cây của nhà máy giấy Bãi Bằng, Phù Ninh, Phú Thọ, Việt Nam làm giảm hàm lượng chất trích ly nhựa cây trong nguyên liệu dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn khoảng 50 % sau 21 ngày ủ. Việc phân lập và xác định chủng do Phòng Vi sinh vật đất - Viện Công nghệ sinh học-Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam tiến hành. Trình tự gen 16S rARN của chủng này có kích thước 1337 bp như nêu trong SEQ ID NO:1 và được đăng ký trên Genbank với mã số MT534040.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. Ảnh chụp SEM hình thái tế bào của vi khuẩn *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 thuần khiết về mặt sinh học.

Hình 2. Trình tự gen 16S rARN của chủng vi khuẩn *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 thuần khiết về mặt sinh học.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Trong phạm vi của giải pháp hữu ích, chủng vi khuẩn *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 thuần khiết về mặt sinh học sẽ được bộc lộ rõ ràng ở đây thông qua các phương án thực hiện giải pháp hữu ích.

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 thuần khiết về mặt sinh học làm giảm hàm lượng nhựa trong nguyên liệu dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn. Chủng *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 được phân lập trên mẫu vỏ cây tại đồng ủ vỏ cây của Nhà máy Giấy Bãi Bằng, Phù Ninh, Phú Thọ, được mô tả và định danh bởi Phòng Vi sinh vật đất - Viện Công nghệ sinh học - Viện Hàn lâm KH và CN Việt Nam.

Chủng vi khuẩn *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập như sau: mẫu vỏ cây trong lòng đồng ủ vỏ cây (nhiệt độ lòng đồng ủ 45- 55°C) tại nhà máy Giấy Bãi Bằng, Phù Ninh, Phú Thọ, được thu nhận và tiến hành

phân lập ngay. Mẫu vỏ cây 100 gam được cho vào bình tam giác có chứa 500 ml nước muối sinh lý và lắc trong 30 phút ở nhiệt độ 50°C, dịch pha loãng này được hút và cho vào đĩa Petri có môi trường thạch muối khoáng Czapek (g/L: NaNO₃ 3g; K₂HPO₄ 1g; MgSO₄.7H₂O 0,5g; KCl 0,5g; FeSO₄. 7H₂O 0,01g; pH 7) và 100 µM stigmasterol. Nuôi cấy ở 50°C trong 3 ÷ 5 ngày và phân lập vi khuẩn xuất hiện. Chủng vi khuẩn CVSVC1-1 được đánh số CVSVC1-1 (CVS là vi khuẩn chịu nhiệt, VC là mẫu vỏ cây số 2 trên đồng ủ và chủng vi sinh phân lập số 1) được tách, đánh số và cấy chuyển sang môi trường khoáng Czapek lỏng có bổ sung 100 µM stigmasterol để kiểm tra lại khả năng sinh trưởng trên môi trường có cơ chất cacbon duy nhất là stigmasterol và được giữ giống trên môi trường Bennet có bổ sung 100 µM stigmasterol. Chủng *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 được lựa chọn phân loại dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự gen 16S rRNA dựa trên cặp mồi 27F (5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3') và 1492R (5'-GG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3') theo chu trình nhiệt: 94°C trong 5 phút, 30 chu trình (94°C trong 60 giây, 60°C trong 60 giây, 72°C trong 90 giây), 72°C trong 10 phút, giữ mẫu ở 4°C. Tác giả tiến hành, nghiên cứu sơ bộ một số đặc điểm sinh học của vi khuẩn CVSVC1-1 và thử khả năng sinh trưởng, sinh tổng hợp enzym phân hủy nhựa cây sterol esteraza, laccaza, lignin peroxidaza, xenluloza và giảm nhựa cây trong dăm mảnh gỗ bằng phương pháp đánh giá trích ly trong axeton. Trình tự gen 16S rARN của chủng này có kích thước 1337 bp như nêu trong SEQ ID NO:1 và trình tự này được đăng ký trên Genbank với mã số MT534040. Hiện tại, chủng *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 này đang được lưu giữ tại Phòng Vi sinh vật đất, Viện Công nghệ sinh học.

Chủng vi khuẩn *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 thuần khiết về mặt sinh học khuẩn lạc có dạng tròn, trơn bóng, màu vàng hơi nâu, mép ngoài khuẩn lạc trơn, dưới kính hiển vi điện tử, vi khuẩn CVSVC1-1 có hình elip, kích thước tế bào khoảng 8 x 14 µm. Chủng vi khuẩn chịu nhiệt sinh trưởng trong khoảng từ 20-60°C, sinh trưởng tốt trong khoảng từ 37-45°C, pH sinh trưởng của chủng từ 5-10. Khi nuôi cấy chủng trên môi trường khoáng Czapek bổ sung 0,5% glucoza, 0,2% pepton và 0,5% nhựa cây từ gỗ keo, sau 72 giờ chủng này có khả năng sinh tổng hợp enzym sterol esteraza khoảng 4592 U/L, laccaza khoảng 0,62 U/L, không có hoạt tính phân hủy xenluloza (thử nghiệm với cơ chất là tinh thể xenluloza). Chủng sinh trưởng tốt trên dăm mảnh gỗ. Theo giải pháp hữu ích, chủng *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 thuần khiết về mặt sinh học, khác biệt ở chỗ, chủng vi khuẩn này được phân lập trên mẫu vỏ cây trong

lòng đồng ủ vỏ cây (nhiệt độ lòng đồng ủ 45- 55°C) của nhà máy giấy Bãi Bằng, Phù Ninh, Phú Thọ, Việt Nam, có khả năng làm giảm hàm lượng nhựa trong nguyên liệu gỗ Keo và Bạch đàn khoảng 50 % và không làm ảnh hưởng đến hiệu suất nấu thu hồi bột giấy trong quá trình sản xuất giấy theo công nghệ nấu Sulphat hiện đang thực hiện tại Tổng Công ty giấy Việt Nam (trong điều kiện xử lý: tỷ lệ giống CVSVC1-1 bổ sung 5 % (dịch giống có mật độ 10^7 CFU/ml), điều kiện ủ có độ ẩm 50- 60%, ở nhiệt độ (30 - 45°C) sau 21 ngày).

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Các ví dụ dưới đây chỉ nhằm minh họa các phương án thực hiện giải pháp hữu ích mà không làm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Ví dụ 1: Phân lập vi khuẩn và chụp ảnh SEM tế bào vi khuẩn chịu nhiệt *Brevibacillus agri* CVSVC1-1.

Mẫu vỏ cây tại bãi ủ vỏ cây của nhà máy Giấy Bãi Bằng, Phù Ninh, Phú Thọ, được máy xúc ủi phần vỏ sâu trong đồng có nhiệt độ khoảng trên 45 - 55°C.

+ Phân lập vi khuẩn chịu nhiệt CVSVC1-1

Mẫu vỏ cây tại đồng ủ vỏ cây của nhà máy Giấy Bãi Bằng, Phù Ninh, Phú Thọ, được máy xúc ủi phần vỏ sâu trong đồng có nhiệt độ khoảng trên 45 - 55°C được thu nhận và tiến hành phân lập ngay. Mẫu vỏ cây sau thu thập (100 gam vỏ cây được cho vào bình tam giác có chứa 100 ml nước muối sinh lý và lắc trong 30 phút ở nhiệt độ 50°C, dịch pha loãng này được hút và cho vào đĩa Petri có môi trường thạch khoáng Czapek (g/L: NaNO_3 3g; K_2HPO_4 1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5g; KCl 0,5g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01g; pH 7) và bổ sung 100 μM stigmasterol. Các đĩa môi trường được nuôi cấy ở 50°C trong 3 ÷ 5 ngày. Khuẩn lạc các chủng vi khuẩn phân lập được đánh số và được cấy chuyển sang môi trường khoáng Czapek lỏng có bổ sung 100 μM stigmasterol để kiểm tra sự sinh trưởng. Chủng CVSVC1-1 sinh trưởng tốt trên môi trường lỏng được tách làm sạch giữ giống trên môi trường Bennet (g/L: Cao nấm men: 1g; Cao thịt: 1g; N-Z amin typ A: 2g, Glucoza: 10g, pH=7). Thu được chủng vi khuẩn chịu nhiệt *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 thuần khiết về mặt sinh học.

+ Kiểm tra đặc điểm sinh học và chụp kính hiển vi điện tử quét SEM. Chủng vi khuẩn chịu nhiệt *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 là chủng vi khuẩn có khuẩn lạc có dạng tròn, trơn bóng, màu vàng hơi nâu, mép ngoài khuẩn lạc trơn, dưới kính hiển vi điện tử, vi khuẩn CVSVC1-1 có hình elip, kích thước tế bào khoảng 8 x 14 μm . Chủng vi khuẩn chịu nhiệt CVSVC1-1 sinh trưởng trong khoảng từ 25-60°C, sinh trưởng tốt trong khoảng từ 37-45°C, pH sinh trưởng của chủng từ 5-10. Kết quả chụp

Sem của vi khuẩn *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 thuần khiết về mặt sinh học được thể hiện trên hình 1.

+ Xác định trình tự gen 16S rARN của chủng vi khuẩn chịu nhiệt *Brevibacillus agri* CVSVC1-1:

ADN tổng số của chủng CVSVC1-1 được tách chiết theo kit tách chiết ADN tổng số (NucleoSpin® Tissue extraction kit, Macherey-Nagel, Germany) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Gen mã hóa 16S rARN của chủng vi khuẩn được khuếch đại bằng phản ứng PCR từ ADN tổng số sử dụng cặp mồi 27F (5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3') và 1492R (5'-GG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3') theo chu trình nhiệt: 94°C trong 5 phút, 30 chu trình (94°C trong 60 giây, 60°C trong 60 giây, 72°C trong 90 giây), 72°C trong 10 phút, giữ mẫu ở 4°C. Sản phẩm của phản ứng PCR được phân tích trên máy đọc trình tự ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer, xử lý bằng phần mềm SeqAssem version 01/2005 và Sequencher version 4.0.5. Trình tự gen mã hóa 16S rARN của chủng vi khuẩn chịu nhiệt CVSVC1-1 có độ tương đồng cao trên 99% với các gen tương ứng của một số vi khuẩn thuộc loài *Brevibacillus agri*: dựa trên đặc điểm sinh học và phân tích trình tự gen 16S rARN, chủng vi khuẩn chịu nhiệt CVSVC1-1 được đặt tên là *Brevibacillus agri* CVSVC1-1, trình tự gen 16S rARN của chủng có kích thước 1337 bp được nêu trong SEQ ID NO:1, Mã số đăng ký trên Genbank MT534040.

Trình tự gen 16S rARN của chủng *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 thuần khiết về mặt sinh học cũng được thể hiện trên hình 2.

Ví dụ 2: Xác định khả năng làm giảm nhựa cây trong dăm mảnh gỗ

+ 01 tấn dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn thu nhận từ nhà máy giấy Bãi Bằng, được cấy 5 % (v/w) (mật độ vi khuẩn trong dịch giống cấy $\geq 10^7$ CFU/ml) chủng vi khuẩn chịu nhiệt *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 được ủ ở nhiệt độ ngoài trời giao động (30 - 40°C). Trích ly kiểm tra hàm lượng nhựa cây còn lại trong nguyên liệu gỗ bằng phương pháp trích ly trong axeton và nấu đánh giá hiệu suất thu hồi xenluloza, đánh giá hàm lượng lignin thông qua chỉ số Kappa. Hàm lượng nhựa cây được kiểm tra bằng phương pháp trích ly nhựa trong axeton giảm trong nguyên liệu gỗ Keo và Bạch đàn khoảng 50 % sau 21 ngày, điều kiện ủ có độ ẩm 50 - 60%, chủng không làm giảm hiệu suất thu hồi xenluloza sau 21 ngày ủ (hiệu suất thu hồi bột là 46,04 % tương đương với đối chứng là 46,01%; hệ số kappa của bột giấy xử lý là 17,39 so với bột giấy đối chứng là 18,01). Kết quả phân tích chất trích ly nhựa cây trên dăm mảnh gỗ Keo theo thời gian được thể hiện trên bảng 1.

Bảng 1. Bảng phân tích hàm lượng nhựa cây trên dăm mảnh gỗ Keo theo thời gian

Ngày xử lý	Hàm lượng nhựa còn lại (mg/100 g gỗ)	
	Đối chứng	Thí nghiệm
0	$2,34 \pm 0,025$	$2,34 \pm 0,025$
14	$2,20 \pm 0,015$	$1,32 \pm 0,015$
21	$2,18 \pm 0,017$	$1,09 \pm 0,020$

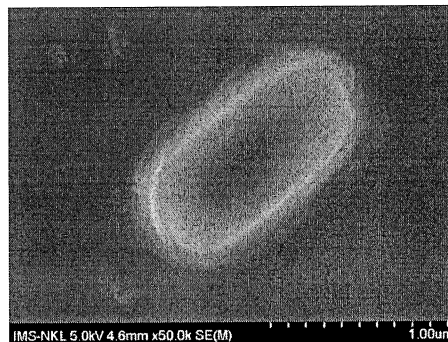
Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Chủng vi khuẩn chịu nhiệt *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 thuần khiết về mặt sinh học theo giải pháp hữu ích được phân lập trên mẫu vỏ cây trong lòng đồng ủ vỏ cây (nhiệt độ lòng đồng ủ 45- 55°C) tại nhà máy Giấy Bãi Bằng, Phù Ninh, Phú Thọ, Việt Nam có khả năng làm giảm chất trích ly nhựa cây trong dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn khoảng 50 % sau khi ủ 21 ngày (trong điều kiện xử lý: tỷ lệ giống CVSVC1-1 bổ sung 5 % (dịch giống có mật độ vi khuẩn 10^7 CFU/ml), điều kiện ủ có độ ẩm 50 - 60%, ở nhiệt độ (30 - 45°C) so với đối chứng (dăm mảnh xử lý với nước). Việc làm giảm hàm lượng nhựa cây trên dăm mảnh khi ủ chủng *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 thuần khiết về mặt sinh học đưa ra khả năng ứng dụng chủng vi khuẩn chịu nhiệt *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 trong tiền xử lý nguyên liệu dăm mảnh tại các nhà máy giấy, để phân hủy nhựa cây, giảm lượng hóa chất xử lý nhựa, tăng hiệu quả sử dụng thiết bị trong quá trình sản xuất giấy từ nguyên liệu gỗ cứng Keo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn chịu nhiệt *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 thuần khiết về mặt sinh học, được phân lập trên mẫu vỏ cây trong lòng đồng ủ vỏ cây có nhiệt độ 45- 55°C, tại nhà máy Giấy Bãi Bằng, Phù Ninh, Phú Thọ, Việt Nam, có các đặc tính sau:
 - Có khả năng sinh tổng hợp enzym sterol esteraza khoảng 4592 U/L và laccaza khoảng 0,62 U/L sau 72 giờ nuôi cấy trên môi trường khoáng Czapek bổ sung 0,5% glucoza, 0,2% pepton và 0,5% nhựa cây từ gỗ Keo;
 - Có khả năng sinh trưởng và làm giảm nhựa cây trong dăm mảnh gỗ Keo, Bạch đàn, nguyên liệu dăm mảnh gỗ Keo và Bạch đàn sau 21 ngày ủ với chủng vi khuẩn này có hàm lượng nhựa giảm khoảng 50 %, điều kiện ủ dăm mảnh với chủng: độ ẩm 50 - 60%, nhiệt độ 30-45°C; và
 - Chủng vi khuẩn chịu nhiệt *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 có trình tự gen 16S rARN với kích thước 1337 bp như nêu trong SEQ ID NO:1 và được đăng ký trên Genbank với mã số MT534040.

Hình 1. Hình thái của vi khuẩn CVSVC1-1 dưới kính hiển vi điện tử (50.000 x).



Hình 2. Trình tự gen 16S rRNA của chủng *Brevibacillus agri* CVSVC1-1

```

1  ggccccccct  ttcagggggg  aaaactaggg  aaatTTTgtt  natccggaag  gTTTTtgat
61  cccatTTTTa  aaaaanaaaaa  aggtTTTTcc  cttccctggg  naatggcctg  ggggccttag
121  ctagttgggg  ggtaacggcc  taccaagggg  acgatgggta  gccgacctga  gagggtgacc
181  ggccannctg  ggactgagac  ccggcccaga  ttcctacggg  aggcagcagt  agggaatttt
241  ccacaatgga  cgaaagtctg  atggagcaac  gccgcgtgaa  cgatgaaggt  cttcggattg
301  taaagttctg  ttgtcaggga  cgaacacgta  ccgttcgaac  agggcgggtac  cttgacggta
361  cctgacgaga  aagccacggc  taactacgtg  ccagcagccg  cggtaatacg  taggtggcaa
421  gcgttggtccg  gatttattgg  gcgtaaagcg  cgcgcagggc  gctatgtaag  tctggtgtta
481  aagcccgggg  ctcaacccccg  gttcgcatcg  gaaactgtgt  agcttgagtg  cagaagagga
541  aagcgggtatt  ccacgtgtag  cggtgaaatg  cgtagagatg  tggaggaaca  ccagtggcga
601  aggcggcctt  ctggtctgta  actgacgctg  aggcgcgaaa  gcgtggggag  caaacaggat
661  tagataccct  ggtagtccac  gccgtaaacg  atgagtgtta  ggtgttgggg  gtttcaatac
721  cctcagtgcc  gcagctaacg  caataagcac  tccgcctggg  gagtacgctc  gcaagagtga
781  aactcaaagg  aattgacggg  ggcccgcaca  agcggtgagg  catgtggttt  aattcgaagc
841  aacgcgaaga  accttaccag  gtcttgacat  cccgctgacc  gctctggaga  cagagcttcc
901  cttcggggca  gcggtgacag  gtggtgcatg  gttgtcgtca  gctcgtgtcg  tgagatgttg
961  ggттаagtcc  cgcaacgagc  gcaaccctta  tctttagtgt  ccagcattca  gttgggcact
1021  ctagagagac  tgccgtcgac  aagacggagg  aaggcgggga  tgacgtcaaa  tcatcatgcc
1081  ccttatgacc  tgggctacac  acgtgctaca  atggttggtg  caacgggatg  ctacctcgcg
1141  agaggacgcc  aatctcttaa  aaccaatctc  agttcggatt  gtaggctgca  actcgcttac
1201  atgaagtcgg  aatcgctagt  aatcgcggat  cagcatgccg  cggatgaatac  gttcccgggc
1261  cttgtacaca  ccgcccgtca  caccacggga  gtttgcaaca  cccgaagtcg  gtgaggtaac
1321  cgcaaggagc  cagccgc

```

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghiệp Giấy và Xenlulô, Bộ Công Thương

<120> Chủng vi khuẩn chịu nhiệt *Brevibacillus agri* CVSVC1-1 thuần khiết về mặt sinh học

<160> 1

<210> 1

<211> 1337

<212> ADN

<213> *Brevibacillus agri*

<400> 1

```

1  ggccccccct ttcagggggg aaaactaggg aaattttggt natccggaag gtttttggat 60
61  cccattttta aaaaanaaaa aggccttttc cttccctggg naatggcctg ggggccttag 120
121 ctagttgggg ggtaacggcc taccaagggg acgatgggta gccgacctga gaggggtgacc 180
181 ggccannctg ggactgagac ccggcccaga ttcctacggg aggcagcagt agggaatatt 240
241 ccacaatgga cgaaagtctg atggagcaac gccgcgtgaa cgatgaaggt cttcggattg 300
301 taaagttctg ttgtcaggga cgaacacgta ccgttcgaac agggcggtac cttgacggta 360
361 cctgacgaga aagccacggc taactacgtg ccagcagccg cggtaatacg taggtggcaa 420
421 gcgttggtcc gatttattgg gcgtaaagcg cgcgcaggcg gctatgtaag tctgggtgta 480
481 aagcccgggg ctcaaccccg gttcgcacgc gaaactgtgt agcttgagtg cagaagagga 540
541 aagcgggtatt ccacgtgtag cggtgaaatg cgtagagatg tggaggaaca ccagtggcga 600
601 aggcgggcttt ctggtctgta actgacgctg aggcgcgaaa gcgtggggag caaacaggat 660
661 tagataccct ggtagtcac gccgtaaagc atgagtgcga ggtgttgggg gtttcaatac 720
721 cctcagtgcc gcagctaacg caataagcac tccgcctggg gagtacgctc gcaagagtga 780
781 aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca agcgtggag catgtggtt aattcgaagc 840
841 aacgcgaaga accttaccag gtcttgacat cccgctgacc gctctggaga cagagcttcc 900
901 cttcggggca gcgtgacag gtggtgcatg gttgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg 960
961 ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctta tctttagttg ccagcattca gttgggcact 1020
1021 ctagagagac tgccgtcgac aagacggagg aaggcgggga tgacgtcaaa tcatcatgcc 1080
1081 cttatgacc tgggctacac acgtgctaca atggttggt caacgggatg ctacctcgcg 1140
1141 agaggacgcc aatctcttaa aaccaatctc agttcggatt gtaggctgca actcgcctac 1200
1201 atgaagtcgg aatcgctagt aatcgcggat cagcatgccg cggatgaatac gttcccgggc 1260
1261 cttgtacaca ccgccgtca caccacggga gtttgcaaca cccgaagtcg gtgaggtaac 1320
1321 cgcaaggagc cagccgc 1337

```