

TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN CÓ HOẠT TÍNH HEMICELLULASE TỪ VỎ CÂY ĐỂ ỨNG DỤNG VÀO QUÁ TRÌNH BÓC VỎ GỖ KEO TRỤC

*Nguyễn Văn Hiếu¹, Nguyễn Thị Hồng Liên¹, Trần Thị Hương¹, Lê Thị Trà¹,
Phan Thị Hồng Thảo¹, Nguyễn Vân Khánh²
Email: hieuan2008.3.20@gmail.com*

Ngày tòa soạn nhận được bài báo: 09/04/2025

Ngày phản biện đánh giá: 09/10/2025

Ngày bài báo được duyệt đăng: 24/10/2025

DOI: 10.59266/houjs.2025.846

Tóm tắt: Từ 14 mẫu vỏ cây, đã phân lập 87 chủng vi khuẩn sinh tổng hợp hemicellulase và đã tuyển chọn được 5 chủng vi khuẩn V244, V11, V23, V119 và V31 có hoạt tính hemicellulase bao gồm xylanase, mannanase trong đó xylanase của 4 chủng V11, V23, V119 và V31 ≥ 1000 U/L và chủng V244 là $363,54 \pm 18,21$ U/L. Bước đầu đánh giá sự thay đổi hoạt tính hemicellulase trong môi trường nước ngâm gỗ, kết quả sau 4 giờ các chủng có hoạt tính xylanase còn hơn 50% so với thời điểm ban đầu, trong đó chủng V244 hoạt tính còn lại 72%. Enzym thu được từ các chủng khi bổ sung vào nước và ngâm gỗ keo trục, có hiệu quả trong việc tách phần vỏ cây với phần gỗ. Chủng vi khuẩn V244 được nghiên cứu một số đặc điểm sinh học về hình thái khuẩn lạc, tế bào, khả năng sinh trưởng ở một số nguồn cacbon, nitơ, pH, nhiệt độ và NaCl. Trình tự gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn V244 có độ tương đồng cao >99% với các gen tương ứng của các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*. Chủng V244 được đặt tên là *Bacillus* sp. V244. Trình tự gen 16S rRNA của chủng *Bacillus* sp. V244 được đăng ký trên cơ sở dữ liệu Genbank với mã số PV688633.

Từ khóa: *Bacillus*, hemicellulase, vỏ gỗ keo, xylanase, mannanase

I. Đặt vấn đề

Hemicellulose là polysaccharide phổ biến đứng thứ hai trong tự nhiên, trong các loại gỗ cứng như gỗ keo, chúng chiếm 20-30% (Hu et al., 2020). Vỏ cây chiếm từ 6-25% khối lượng của cây (Bajpai, 2012). Đối với cây keo, phân vỏ tùy theo từng vị trí, tỷ lệ hemicellulose chiếm 35,22-36,15% (Coetzee, 2011). Ở cây trưởng thành, lớp vỏ bên trong là mô sống, bao gồm lớp trong cùng (periderm), lớp vỏ

ngoài (còn gọi là rhytidome) là mô chết ở trên bề mặt của thân cây cùng. Ranh giới giữa phân gỗ thịt và vỏ cây là tầng cambi (tầng sinh bản), lớp tế bào sống này tạo ra tế bào xylem (mạch gỗ) về phía trong thân và tế bào phloem ra phía ngoài. Các tế bào của lớp cambi phân chia liên tục, do đó chúng có độ bền cơ học thấp hơn so với các phần mô khác trên cây. Lớp cambi có đặc điểm là chứa hàm lượng hemicellulose, cellulose và protein và có ít lignin. Trong

¹ Viện Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Học viện Nông nghiệp Việt Nam

cấu trúc của hemicellulose, các đơn vị đường liên kết theo những cách khác nhau để tạo thành các cấu trúc phân tử xylan, mannans, glucomannans và xyloglucans (Bajpai, 2012, 2018), với cấu trúc đa dạng để thủy phân lớp cambi cần kết hợp nhiều loại enzym, được gộp chung thành phức hệ hemicellulase bao gồm xylanase, mannanase, galactanase và arabinanases (Hu & cộng sự, 2020).

Trong sản xuất dăm mảnh và bột giấy, bóc vỏ gỗ không triệt để đã gây ảnh hưởng đến quá trình vận hành và chất lượng bột giấy, sự có mặt nhiều vỏ cây trong dăm mảnh làm tăng tiêu hao kiềm khi nấu bột, tăng độ bụi, giảm độ bền cơ học của bột và giấy... (Bajpai, 2012). Một trong các phương pháp giúp giải quyết vấn đề vỏ cây còn lẫn trong nguyên liệu dăm sau quá trình bóc vỏ cơ học, an toàn, bền vững với môi trường là ứng dụng các enzym vào giai đoạn ngâm gỗ trước khi thực hiện quá trình bóc vỏ gỗ. Vỏ cây gỗ keo với đặc điểm chứa các hợp chất hemicellulose, cellulose và protein, khi được ngâm trong môi trường có chứa các enzym hemicellulase (xylanase, mannanase), cellulase hay protease, các enzym sẽ phân cắt liên kết giữa lớp vỏ cây và phần gỗ, nhờ đó khi đưa vào quá trình bóc cơ học, vỏ cây dễ dàng được tách ra khỏi phần thịt gỗ (Viikari & cộng sự, 1992; Ratto & cộng sự, 1993). Trong bài báo này, chúng tôi trình bày một số kết quả nghiên cứu tuyển chọn một số chủng vi khuẩn có khả năng sinh enzym hemicellulase (xylanase, mannanase) định hướng ứng dụng vào qui trình bóc vỏ cây trong sản xuất dăm mảnh.

II. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

2.1.1. Các mẫu vỏ cây

14 mẫu vỏ cây được thu nhận từ Công ty cổ phần Giấy An Hòa (Tuyên Quang), Tổng công ty Giấy Việt Nam (Phú Thọ), Công ty cổ phần thương mại

Tiến Minh (Phú Thọ) và Công ty TNHH Dịch vụ thương mại Nam Long (Phú Thọ).

Gỗ keo dạng trục có độ tuổi trên 3 năm, độ khô 50,53%; tỷ trọng 650 kg/m³ và chiều dài 1,8±0,5m.

2.1.2. Môi trường nuôi vi sinh vật

- Môi trường MT1 (g/L): Na₂HPO₄.12H₂O: 5,97; KH₂PO₄: 2,27; NaCl: 1,0; MgSO₄.7H₂O: 0,5; MnSO₄.4H₂O: 0,02; CaCl₂.2H₂O: 0,01; FeSO₄: 0,005; pH 6,8.

- Môi trường MSM (g/L): K₂HPO₄ 2,27; KH₂PO₄ 0,95; (NH₄)₂SO₄ 0,67; Dung dịch vi lượng MSM * 2 mL (*Dung dịch vi lượng MSM (g/L): Nước đề ion 1000 mL; Na₂EDTA.2H₂O: 6,37; ZnSO₄.7H₂O: 1,0; CaCl₂.2H₂O: 0,5; FeSO₄.7H₂O: 2,5; NaMoO₄.2H₂O: 0,1; CuSO₄.5H₂O: 0,1; CoCl₂.6H₂O: 0,2; MnSO₄.H₂O: 0,52; MgSO₄.7H₂O: 0,6; điều chỉnh pH ~ 6.5 bằng H₂SO₄.

- Môi trường Meat Peptone- Agar (MPA) (g/L): Cao thịt 5,0; Peptone 10,0; NaCl 5,0; Thạch 15,0; nước cất 1000 mL; pH 6,5-7,0.

- Môi trường ISP9 (g/L): (NH₄)₂SO₄ 2,46; KH₂PO₄ 2,38; K₂HPO₄.3H₂O 5,65; MgSO₄.7H₂O 1,0; Vi lượng B 1,0 mL; Agar 20,0; nước cất 1000 mL; pH 7,0.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phương pháp phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt tính hemicellulase

Cân 10 g vỏ cây cho vào 90 mL nước cất tiệt trùng, lắc 150 vòng/phút trong 1 giờ. Pha loãng mẫu ở các nồng độ pha loãng đến 10³, 10⁴..10⁶, cấy mẫu sau pha loãng vào các đĩa petri chứa môi trường MT1 (lặp ba lần) để phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng sinh hemicellulase (Shanthi & Roymon, 2018). Các chủng vi khuẩn sau phân lập, thuần khiết được lên men trên môi trường MSM có bổ sung cơ chất xylan (xylanase)/ bean gum (mannanase) ở nồng độ 0,5% w/v, với

lượng dịch 50 mL/bình tam giác 250 mL đã được khử trùng ở 121°C trong 20 phút, và được bổ sung 1 mL giống có mật độ vi sinh vật đạt 10^8 cfu/mL. Sau 5 ngày lên men, dịch được ly tâm ở 4°C, với tốc độ 10000 vòng/phút trong 10 phút thu dịch nổi loại sinh khối. Dịch nổi chứa enzym và được sử dụng để xác định enzym theo phương pháp định tính và định lượng bao gồm hemicellulase (xylanase, mannanase) và cellulase.

Định tính hemicellulase (xylanase, mannanase) và cellulase bằng phương pháp khuếch tán trên môi trường thạch: Chuẩn bị môi trường thạch - cơ chất: với nồng độ thạch (2%, w/v) chứa cơ chất beech wood xylan (xylanase)/bean gum (mannanase) ở nồng độ 0,5%, w/v, đã khử trùng ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút, đổ vào mỗi đĩa petri sao cho môi trường có độ dày 0,5 cm. Sau khi môi trường đông, đục lỗ và nhỏ dịch enzym thô với lượng 0,2 mL/lỗ đục, chuyển vào ủ ở nhiệt độ 4°C trong 4 giờ, đĩa thử tiếp tục được ủ ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 30 phút, nhuộm màu bằng thuốc thử với cơ chất xylanase (cộng gói đỏ 0,5%), mannanase và cellulase (thuốc thử lugol 0,3%), đo đường kính vòng thủy phân cơ chất (Dhaver & cộng sự, 2022).

Định lượng hoạt lực xylanase theo phương pháp của Ghose và Bisaria, 1987; Hoạt lực mannanase theo phương pháp của Pangri và cộng sự (2015) và hoạt lực cellulase theo phương pháp của Akhavan và cộng sự (2011).

2.2.2. Đánh giá khả năng tác động của dịch enzym thô lên lớp Cambi và phần thịt của gỗ keo trực

Dịch lên enzym thô sau khi xác định hoạt lực, bổ sung vào với nước máy sao cho dung dịch cuối đạt nồng độ hemicellulase tổng (với cơ chất xylan) 100 U/L và chuyển các khoanh gỗ keo vào ngâm với các điều kiện: 1 lít dịch enzym/5 khoanh gỗ keo ($\varnothing 8 \div 10$ cm x

5 cm), giữ ở nhiệt độ phòng, theo dõi sự biến động hoạt tính enzym và đánh giá khả năng tách vỏ cây khỏi phần thịt gỗ, xác định đặc điểm của lớp Cambi, phần thịt gỗ. Sử dụng gỗ keo dạng trực có độ tuổi trên 3 năm và chiều dài $1,8 \pm 0,5$ m được đưa vào các bể sau đó bổ sung các dung dịch ngâm (nước, enzym từ chủng VK244 và enzym thương mại), sau thời gian 25 phút đưa lên máy bóc vỏ và sản xuất dăm mảnh, chất lượng dăm mảnh đánh giá theo TCVN 13654-1:2023.

2.2.3. Xác định đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn tuyển chọn

Xác định đặc điểm sinh học gồm hình thái tế bào và khuẩn lạc, khả năng phát triển ở pH, nhiệt độ và nguồn cac của chủng vi khuẩn tuyển chọn theo khoá phân loại Bergey (Williams & cộng sự, 1989).

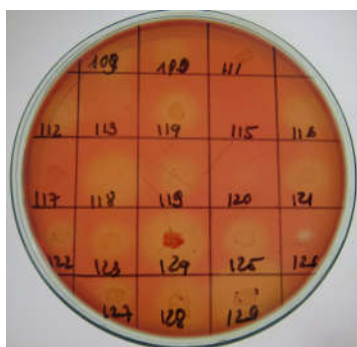
2.2.4. Định danh chủng vi khuẩn được tuyển chọn dựa trên trình tự gen 16S rRNA

DNA tổng số của chủng vi khuẩn được tách theo phương pháp được mô tả bởi Sambrook (Sambrook & cộng sự, 1989). Trình tự gen 16S rRNA của vi khuẩn được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 27F (5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3') và 1429R (5'-GGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3'). Chu kỳ nhiệt: 94°C trong 5 phút, tiếp theo là 30 chu kỳ 94°C trong 90 giây, 53 °C trong 60 giây, 72 °C trong 90 giây, với bước kéo dài cuối cùng ở 72 °C trong 10 phút và giữ 4°C. Sản phẩm khuếch đại được kiểm tra trên gel agarose 1%. Kích thước của các đoạn DNA được so sánh với thang DNA chuẩn (Fermentas). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit PureLink™ - DNA Purification (Invitrogen) và giải trình tự trên máy ABI PRISM®3100-Avant Genetic Analyzer (USA) tại Viện Công nghệ sinh học. Các trình tự được phân tích, so sánh với cơ sở dữ liệu GenBank và dựng cây phả hệ bằng phương pháp Neighbor-joining.

III. Kết quả và thảo luận

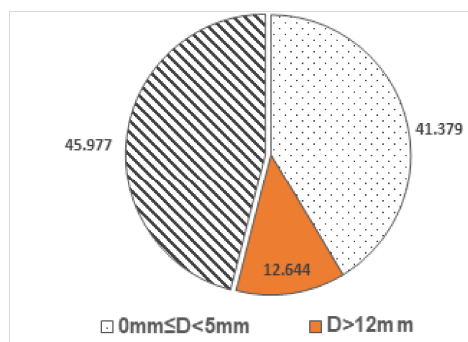
3.1. Phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn có khả năng sinh hemicellulase

Từ 14 mẫu vỏ cây đã phân lập các vi sinh vật có hoạt tính hemicellulase trên môi trường MT1 có bổ sung beech wood xylan 1% (w/v), kết quả thu được 87 chủng vi khuẩn, kiểm tra hemicellulase với cơ chất xylan kết quả thể hiện ở hình 1 và hình 2. Kết quả thể hiện ở hình 2 cho



Hình 1. Vòng thủy phân cơ chất xylan của một số chủng vi khuẩn

thấy có 36 chủng có đường kính (D-d) vòng thủy phân cơ chất xylan từ 0-5mm chiếm 41,97%; 40 chủng có đường kính vòng thủy phân cơ chất từ 5-12 mm chiếm 45,97% và có 11 chủng có đường kính vòng thủy phân cơ chất xylan lớn hơn 12 mm chiếm 12,64%. Từ 11 chủng có vòng thủy phân cơ chất xylan lớn, đã lên men trên môi trường lỏng MSM có bổ sung cơ chất lớp cambi của cây keo, kết quả thu được 5 chủng có hoạt lực cao được thể hiện ở bảng 1.



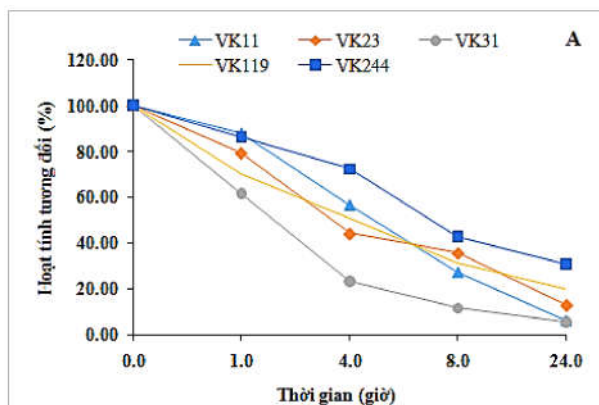
Hình 2. Tỷ lệ các chủng vi khuẩn có khả năng sinh hemicellulase

Bảng 1. Kiểm tra enzym hemicellulase (xylanase và mannanase) và cellulase trong dịch sau lên men

Kí hiệu	Xylanase (U/L)	Mannanase (U/L)	Cellulase (U/L)
V23	1584,25 ± 74,56	75,25 ± 3,84	13,09 ± 0,58
V31	1708,56 ± 89,22	72,16 ± 3,49	13,36 ± 0,62
V119	1666,68 ± 85,92	76,33 ± 3,51	11,37 ± 0,59
V11	1691,81 ± 78,13	79,53 ± 4,15	8,31 ± 0,37
V244	363,54 ± 18,21	1663,54 ± 87,92	7,06 ± 0,67

Sau 5 ngày lên men lỏng, xác định hoạt lực hemicellulase (xylanase, mannanase) và cellulase (Bảng 1), hoạt lực xylanase của các chủng thu được dao động 1584,25 ± 74,56 đến 1708,56 ± 89,22 (U/L) và mannanase dao động 75,25 ± 3,84 đến 79,53 ± 4,15 (U/L), đặc biệt chủng V244 có hoạt lực xylanase chỉ đạt 363,54 ± 18,21 tuy nhiên hoạt lực mannanase cao nhất trong số 5 chủng đạt 1663,54 ± 87,92 (U/L), đồng thời hoạt lực cellulase thấp nhất trong số 5 chủng đạt 7,06 ± 0,67 (U/L). Dịch enzym thô được đánh giá tính hoạt tính trong môi trường nước ngâm gỗ cho thấy, hoạt

tính hemicellulase đều có xu hướng giảm nhanh sau 4 giờ sau khi được bổ sung vào dịch ngâm gỗ keo trực, hoạt tính còn lại lớn hơn 50% so với thời điểm ban đầu có enzym từ các chủng vi khuẩn V11, V119 và V244, trong đó chủng V244 hoạt tính vẫn còn lại 72% (Hình 3). Sự suy giảm hoạt tính của enzym trong môi trường nước ngâm gỗ có thể một trong nguyên nhân pH môi trường không thích hợp, một số chất hoà tan như nhựa cây..., ngoài ra có một lượng lớn các vi sinh vật có trong vỏ cây, tất cả các yếu tố trên đã tác động đến độ bền của hoạt tính.



Hình 3. Ảnh hưởng của dịch ngâm gỗ đến hoạt lực hemicellulase của 5 chủng vi khuẩn

Bước đầu đánh giá cảm quan sự tác động của enzyme thô từ các chủng đến quá trình tách vỏ cây khỏi phần thịt gỗ cho thấy: đa số các enzyme từ các chủng đã có tác động đến lớp Cambi phía trong giữa vỏ cây và phần thịt gỗ, sự tác động này giúp quá trình tách phần vỏ và thịt gỗ trở nên dễ dàng hơn, phần thịt gỗ phía trong không có sự thay đổi về màu sắc, trạng thái khi so với mẫu đối chứng ngâm nước. Phần vỏ phía ngoài không bị xé vụn thành những mảnh nhỏ, chỉ cần một lực kéo nhẹ đã dễ dàng tách bỏ lớp vỏ cây khỏi phần thịt gỗ

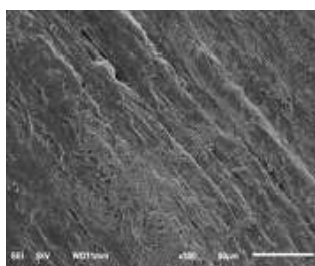


Hình 4. Tác động của dịch enzyme từ chủng vi khuẩn V244 đến lớp vỏ cây của gỗ keo

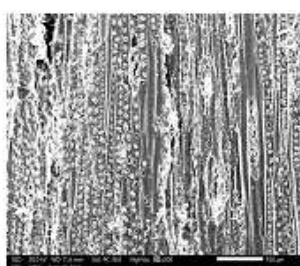
phía trong, tạo ra các mảng vỏ lớn không thấy có các sợi xơ giống như ở phần đối chứng ngâm với nước máy (Hình 5). Bước đầu cũng đã thử nghiệm enzyme thu nhận từ chủng và enzyme thương mại vào quá trình ngâm gỗ và thực hiện bóc bằng máy và đánh giá chất lượng dăm mảnh (Bảng 2), với tỉ lệ mùn có trong dăm ở hai mẫu enzyme đều thấp hơn so với mẫu đối chứng ngâm nước với giá trị thu được lần lượt 0,11% cho enzyme thu từ chủng V244 và 0,12% cho enzyme thương mại.

Bảng 2. Chất lượng nguyên liệu dăm sau quá trình nguyên liệu gỗ trực được xử lý

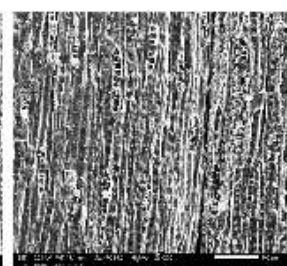
Thông số	Đơn vị	Kết quả		
		Ngâm nước	Mẫu xử lý bằng enzyme thu nhận từ chủng V244	Mẫu xử lý bằng enzyme thương phẩm
Tỷ lệ vỏ	%	1,09	0,90	0,88
Mảnh hợp cách	%	92,6	93,01	93,35
Độ ẩm	%	48,3	47,45	47,49
Tỷ lệ mùn	%	0,46	0,11	0,12



A



B



C

Hình 5. Phần bề mặt vỏ cây phía trong tiếp xúc với phần gỗ của gỗ keo trực sau xử lý (A: Mẫu ngâm với nước và B: mẫu ngâm với dịch enzyme thô của chủng vi khuẩn V244 và C: Mẫu ngâm với enzyme thương phẩm).

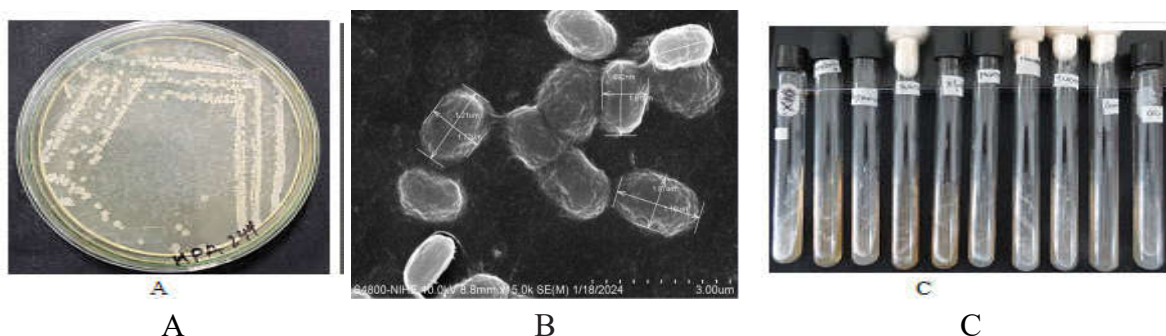
Kết quả chụp kính hiển vi điện tử các mẫu vỏ cây sau quá trình ngâm gỗ trực với enzym thu nhận từ chủng và chế phẩm enzym thương mại cho thấy, lớp bề mặt vỏ cây của mẫu đối chứng khi ngâm nước có cấu trúc ít thay đổi, bề mặt còn nguyên tạo thành mảng liên mạch gần như không phát hiện các liên kết bị phá hủy tạo thành các lỗ. Đối với mẫu có bổ sung enzym thu nhận từ chủng VK244 và enzym thương phẩm, bề mặt vỏ cây hình thành nhiều lỗ, các điểm đứt gãy, lộ ra các khoang tế bào phía bên trong của vỏ cây. Như vậy hemicellulase đã có tác động phân cắt thành phần hemicellulose trong lớp Cambi của vỏ cây, dẫn đến vỏ

cây dễ dàng được tách ra khỏi thân gỗ. Các nghiên cứu, gỗ trực được xử lý bằng cách ngâm với các enzym, dẫn đến các quá trình bóc vỏ phía sau sẽ rất hiệu quả và đơn giản (Ratto & cộng sự, 1993).

3.2. Nghiên cứu đặc điểm sinh học và phân loại chủng vi khuẩn V244

3.2.1. Đặc điểm hình thái và sinh lý sinh hóa

Dựa theo các phương pháp nghiên cứu về vi sinh vật học của khoá phân loại Bergey (Williams & cộng sự, 1989), một số đặc điểm sinh học cơ bản của chủng V244 được trình bày ở bảng 3 và hình 6.



Hình 6. Một số đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn V244 (A: hình thái khuẩn lạc; B: Hình thái tế bào x5000X và C: Khả năng phát triển trên môi trường ISP9 có nguồn đường 1%).

Bảng 3. Một số đặc điểm sinh học của chủng V244

Đặc điểm	Đặc điểm mô tả
Đặc điểm khuẩn lạc	Khuẩn lạc có bề mặt nhẵn, mép ziczac (đường kính 2-4mm) màu vàng nâu
Đặc điểm tế bào	Hình que, bắt màu tím thuộc nhóm vi khuẩn Gram (+)
Nhiệt độ (°C)	20-45
Nồng độ muối (%)	< 7%
pH ban đầu	5÷10
Khả năng phát triển :	
D-glucose	+
D-matose	+
D-fructose	+
D-xylose	+
Arabinose	+
Saccharose	+
Đối chứng	-
Khả năng sinh enzym:	
Pectinase	+
Protease	+
Amylase	+

Ghi chú: +: Có khả năng phát triển và - : Không có khả năng phát triển.

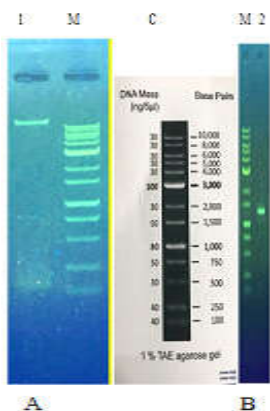
Chủng vi khuẩn V244 có khả năng sinh trưởng tốt ở nồng độ NaCl <7%, nhiệt độ 20-45 °C thuộc nhóm vi khuẩn ưa ấm và pH từ 5-10 (Bảng 3). Khi kiểm tra khả năng sinh một số loại enzym khác cho thấy chủng V244 có khả năng sinh cả 3 loại enzym bao gồm pectinase, protease và amylase (Bảng 2). Về đặc điểm hình thái khuẩn lạc, trên môi trường MPA sau 4 ngày nuôi ở nhiệt độ 37°C, khuẩn lạc có bề mặt nhẵn, mép ziczac, đường kính 2-4mm, màu vàng nâu (Hình 6A). Hình thái tế bào khi chụp bằng kính hiển vi điện tử ở độ phóng đại 5000X có dạng que ngắn, kích thước 1,6-1,72 μm x 0,99-1,21 μm (Hình 6B) và bắt màu tím thuộc nhóm vi khuẩn Gram (+) (Bảng 2). Chủng có khả năng phát triển tốt trên một số nguồn đường bao gồm: D-glucose; D-matose; D-fructose; D-xylose; arabinose và saccharose (Bảng 3).

3.2.2. Phân tích trình tự gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn V244

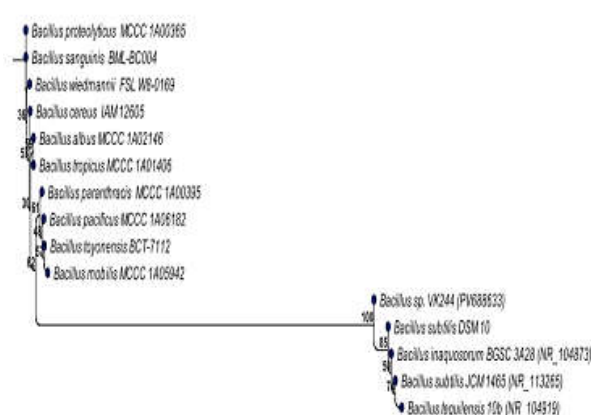
DNA tổng số của chủng vi khuẩn V244 được tách chiết và kiểm tra trên gel agarose 1,0% (hình 7A),. Kết quả thu được sản phẩm DNA tổng số cho kết quả tốt, chứng tỏ sản phẩm không có sự lẫn các phân tử protein. Sản phẩm DNA khi được sử dụng để khuếch đại trình tự gen 16S rRNA bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu 27F và 1429R cho một

băng DNA rõ nét duy nhất có kích thước khoảng 1,5 kb khi đối chiếu với thang DNA marker chuẩn (Hình 7B). Kết quả trên cho thấy phản ứng PCR trong thí nghiệm này là đặc hiệu và đoạn gen thu được sau phản ứng PCR có chất lượng cao, sản phẩm đủ yêu cầu để thực hiện các bước nghiên cứu tiếp theo.

Gen 16S rRNA của chủng V244, sau đó được giải trình tự, lắp ráp và phân tích trình tự nucleotide. So sánh trên cơ sở dữ liệu GenBank với trình tự nucleotide tương ứng cho thấy, chủng V244 có độ tương đồng 100% với các chủng như *Bacillus subtilis* TMC1465 (NR113265); *B. inaquosinus* BGSC 3A28 (NR104873) *B. tequilensis* 105 (NR104910) (Hình 8) và trình tự gen 16S rRNA của chủng V244 đã được đăng kí trên cơ sở GenBank với mã số PV688633. Kết quả thu nhận về các đặc điểm và đặc tính enzym của chủng V244 khá tương đồng với một số nghiên cứu trên thế giới cho biết, các nhóm vi khuẩn có khả năng sinh hemicellulase cao thường thuộc các chi như *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*. Đặc biệt chi *Bacillus* rất có tiềm năng để sản xuất hemicellulase (xylanase, mananase) với các loài đại diện như *B. circulans*, *B. tequilensis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. cabrialesii*, *B. stercoris*... (Subramanian, 2002).



Hình 7. Điện di đồ DNA trên gel agarose 1% của chủng V244 (AI: DNA tổng số và BM2: Sản phẩm PCR sử dụng cặp 27F và 1429R).



Hình 8. Cây tương đồng di truyền của chủng V244 dựa trên trình tự gen 16S rRNA với các chủng vi khuẩn được đăng ký trên GenBank

IV. Kết luận

Từ 14 mẫu vỏ cây phân lập được 87 chủng vi khuẩn, đã chọn 5 chủng vi khuẩn (V244; V11; V23; V119 và V31) có khả năng sinh hemicellulase tổng cao bao gồm xylanase và mananase (có 4 chủng có hoạt tính xylanase >1000 U/L và riêng chủng V244 có hoạt tính xylanase $363,54 \pm 18,21$ U/L). Chủng V244 có khả năng sinh enzym hemicellulase (xylanase, mannanase) đáp ứng được yêu cầu ứng dụng vào quá trình bóc vỏ gỗ keo trực. Chủng vi khuẩn V244 thuộc vi khuẩn ưa ấm, sinh trưởng tốt trong môi trường pH 5-10 và ở nồng độ muối $<7\%$, có khả năng phát triển tốt trên nguồn cacbon là D-glucose; D-matose; D-fructose; D-xylose; arabinose và saccharose. Trình tự gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn V244 có độ tương đồng cao ($>99\%$) với trình tự gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* và đã được đăng kí trên cơ sở dữ liệu Genbank với mã số PV688633. Enzym từ chủng V244 có tiềm năng ứng dụng trong ngành công nghiệp chế biến dăm mảnh cũng như sản xuất bột giấy.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ kinh phí bởi Đề tài “Nghiên cứu quy trình công nghệ và mô hình thiết bị sản xuất chế phẩm enzym pectinase và hemicellulase ứng dụng bóc vỏ cây nguyên liệu gỗ cứng”, mã số ĐTKHCN.017/22 cấp Bộ Công thương.

Tài liệu tham khảo

- [1]. Akhavan, S. A., Ghazi, S., & Akhavan, S. M. (2011). Cost-Effective Production and Optimization of Alkaline Xylanase by Indigenous *Bacillus mojavensis* AG137 Fermented on Agricultural Waste. *Enzyme Research*, 593624. doi: 10.4061/2011/593624.
- [2]. Bajpai, P. (2012). Biotechnology for pulp and paper processing, *Springer New York Dordrecht Heidelberg London*, 43-49.
- [3]. Bajpai, P. (2018). Biotechnology for Pulp and Paper Processing, *Biodebarking*, Second Edition, *Springer*, 57 - 65.
- [4]. Coetzee, B., Schols, H. A., & Wolfaardt, F. (2011). Determination of pectin content of eucalyptus wood. *Holzforschung*, 65(3), 327 - 331.
- [5]. Dhaver, P., Pletschke, B., Sithole, B., & Govinden, R. (2022). Isolation, screening, preliminary optimisation and characterisation of thermostable xylanase production under submerged fermentation by fungi in Durban, South Africa. *Mycology*, 13(4), 271-292.
- [6]. Ghose, T. K., & Bisaria, V. S. (1987). Measurement of hemicellulase activities: Part 1: Xylanases. *Pure and Applied Chemistry*, 59(12), 1739 - 1752.
- [7]. Hu, L., Fang, X., Du, M., Luo, F., & Guo, S. (2020). Hemicellulose-Based Polymers Processing and Application. *American Journal of Plant Sciences*, 1, 2066-2079.
- [8]. Pangri, P., Piwpankew, Y., Ingkakul, A., Nitisinprasert, S., & Keawsompong, S. (2015). Characterization of mannanase from *Bacillus circulans* NT 6.7 and its application in mannooligosaccharides preparation as prebiotic. *Springer Plus*, 4(1), 771. doi:10.1186/s40064-015-1565-7.
- [9]. Ratto, M., Kantelinen, A., Bailey, M., & Viikari, L. (1993). Potential of enzymes for wood debarking, *Enzymatic Debarking*, *Tappi Journal*, 76(2), 1-5.
- [10]. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [11]. Shanthi, V., & Roymon, M. G. (2018). Isolation, Identification and Partial Optimization of Novel Xylanolytic Bacterial Isolates from Bhilai-Durg Region, Chhattisgarh, India. *Iranian Journal of Biotechnology*, 16(3):e1333. doi: 10.15171/ijb.1333.

- [12]. Subramaniyan, S., & Prema, P. (2002). Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(1), 33-64.
- [13]. Viikari, L., Ratto, M., & Kantelinen, A. (1992). *Method for the debarking of logs*, United States Patent US005103883A.
- [14]. Williams, S. T., Sharpe, M. E., & Holt, J. G. (1989). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, Vol. 4.

SELECTION OF BACTERIAL STRAINS WITH HEMICELLULASE ACTIVITY FROM TREE BARK FOR APPLICATION IN THE DEBARKING PROCESS OF ACACIA WOOD

***Nguyen Van Hieu³, Nguyen Thi Hong Lien³, Tran Thi Huong³, Le Thi Tra³,
Phan Thi Hong Thao³, Nguyen Van Khanh⁴***

Abstract: From 14 bark samples, 87 strains of hemicellulose-producing bacteria were isolated. Among these five bacterial strains - V244, V11, V23, V119, and V31 - were selected for their hemicellulase activity, including xylanase and mannanase. The xylanase activity for the strains V11, V23, V119, and V31 was ≥ 1000 U/L, while strain V244 showed an activity of 363.54 ± 18.21 U/L. Preliminary evaluation of hemicellulase activity in a wood-soaked water environment showed that after 4 hours, xylanase activity remained over 50% of the initial level, with strain V244 retaining 72% of its activity. The enzyme obtained from the strains, when added to water and soaked in acacia wood, was found to be effective in separating the bark from the wood. The strain V244 was studied for several biological characteristics, including colony morphology, cell structure, growth potential on various carbon sources, nitrogen, pH, temperature, and NaCl. The 16S rRNA gene sequence of bacterial strain V244 showed high similarity (>99%) with the corresponding genes of *Bacillus* sp. strains. Thus, strain V244 was named *Bacillus* sp. V244. The 16S-rRNA gene sequence of strain *Bacillus* sp. V244 was registered in GenBank under the accession code PV688633.

Keywords: *Bacillus*, hemicellulase, acacia bark, xylanase, mannanase

³ Institute of Biology, Vietnam Academy of Science and Technology

⁴ Vietnam National University of Agriculture