



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0026550

(51)⁷ C12N 1/00

(13) B

(21) 1-2018-04597

(22) 17/10/2018

(45) 25/12/2020 393

(43) 25/02/2019 371A

(73) Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội (VN)
Nhà E2, 144 Xuân Thủy, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Đinh Thúy Hằng (VN); Nguyễn Quỳnh Uyên (VN).

(54) CHỦNG VI KHUẨN *PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS* PD1 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC, PHÂN LẬP ĐƯỢC TỪ PHÂN TRỂ SƠ SINH CÓ ĐẶC TÍNH LỢI KHUẨN

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Pediococcus pentosaceus* Pd1 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ phân trẻ sơ sinh khỏe mạnh ở Việt Nam, dưới 6 tháng tuổi và đang bú mẹ hoàn toàn. Chủng Pd1 được chứng minh an toàn và có những đặc tính lợi khuẩn tốt như (i) có khả năng lên men nhiều loại hợp chất hydratecacbon (bao gồm cả lactoza) để sinh axit lactic và làm giảm pH môi trường tới dưới 4 chỉ sau 24 giờ, (ii) có khả năng sống sót sau 2 giờ tiếp xúc với điều kiện khắc nghiệt của đường ruột với pH = 1 và nồng độ muối mật 1 %, (iii) sinh trưởng tốt ở điều kiện kỵ khí và vi hiếu khí và (iv) có tác dụng tăng sức đề kháng và chất lượng thịt gà khi được bổ sung vào nước uống hàng ngày cho gà dưới dạng sinh khối đông khô theo tỷ lệ 1 g /lít nước (tương đương 10^5 - 10^6 MPN/ml). Chủng *Pediococcus pentosaceus* Pd1 có tiềm năng ứng dụng tốt làm lợi khuẩn cho chăn nuôi.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Pediococcus pentosaceus* Pd1 thuần khiết về mặt sinh học, có các đặc tính lợi khuẩn, phù hợp để sử dụng làm probiotic cho chăn nuôi gia súc, gia cầm. Chủng vi khuẩn này được phân lập từ phân trẻ sơ sinh khỏe mạnh ở Việt Nam, dưới 3 tháng tuổi và bú mẹ hoàn toàn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Pediococcus là một chi vi khuẩn Gram dương thuộc nhóm vi khuẩn lactic (LAB), họ *Lactobacillaceae*. Các loài *Pediococcus* được tìm thấy từ nhiều nguồn khác nhau, phổ biến nhất là trong các loại thực phẩm thịt lên men, sữa, các sản phẩm lên men nguồn gốc thực vật. Hiện nay trên thế giới có 11 loài *Pediococcus* đã được công bố (Bảng 1), trong đó chủng *P. pentosaceus* đầu tiên được phát hiện năm 1934 bởi Mees và cộng sự trong quá trình nghiên cứu thực phẩm lên men chua.

Bảng 1. Các loài *Pediococcus* đã được công bố

TT	Tên loài	Nguồn gốc	Tài liệu tham khảo
1	<i>P. acidilactici</i>	Rom rạ ủ chua (Nhật)	Shkerman <i>et al.</i> , 1980
2	<i>P. argentinus</i>	Rượu lên men (Trung Quốc)	De Bruyne <i>et al.</i> 2008
3	<i>P. cellicola</i>	Rượu lên men (Trung Quốc)	Zhang <i>et al.</i> 2005
4	<i>P. clausenii</i>	Bia bị hỏng	Pittet <i>et al.</i> , 2012
5	<i>P. damnosus</i>	Bia, rượu	Shkerman <i>et al.</i> , 1980
6	<i>P. ethanolidurans</i>	Rượu lên men (Trung Quốc)	Liu <i>et al.</i> , 2006
7	<i>P. inopinatus</i>	Bia, rượu	Validation list N25, 1988
8	<i>P. parvulus</i>	Rượu vang	Immerstrand <i>et al.</i> , 2010
9	<i>P. pentosaceus</i>	Thực vật	Shkerman <i>et al.</i> , 1980
10	<i>P. siamensis</i>	Lá trà lên men (Thái Lan)	Tanasupawat <i>et al.</i> 2007
11	<i>P. stilesii</i>	Hạt ngô (Pháp)	Franz <i>et al.</i> 2006

Các đặc điểm sinh học và di truyền của *P. pentosaceus*

Giống như hầu hết các loài *Pediococcus*, *P. pentosaceus* sống kỵ khí và lên men đường, sản phẩm cuối cùng của quá trình chuyển hóa là axit lactic. Chúng chịu được môi trường axit, nhiệt độ và độ muối cao. *P. pentosaceus* gồm các tế bào dạng cầu đôi, hoặc cặp bốn đôi xứng hai bên, Gram dương, không di động và không hình thành bào tử (Holzapfel *et al.*, 2006).

Hệ gen của *P. pentosaceus* đã được giải trình tự, gồm 1.832.387 nucleotit, trong đó đã xác định được 1.755 gen mã hóa cho các protein và 72 gen ARN, hàm lượng GC trong hệ gen (genome) là 37,4%. Ngoài ra, *P. pentosaceus* còn có 3-5 plasmit mang chức năng chuyển hóa các loại cơ chất khác nhau, tuy nhiên, phần lớn các gen mã hóa cho các đặc tính công nghiệp quan trọng vẫn chưa được mô tả (Holzapfel *et al.*, 2006).

Ứng dụng của *P. pentosaceus* trong đời sống

Trên thế giới, nhiều nghiên cứu về hoạt tính sinh học và tiềm năng ứng dụng của các chủng *P. pentosaceus* khác nhau đã được thực hiện.

Theo công bố của Chang và cs. (2006), chủng *P. pentosaceus* EROM101 có nguồn gốc từ hệ đường ruột của người trưởng thành được chứng minh là có các hoạt tính sinh học liên quan tới tăng cường miễn dịch, chống ung thư và diệt virus thông qua tác động kích ứng đối với các đại thực bào và tế bào lách, kích thích hệ miễn dịch đường ruột (Chang *et al.*, 2006). Theo đó chủng vi khuẩn này có thể được sử dụng cho nhiều mục đích khác nhau, như tạo các sản phẩm có tác dụng tăng cường miễn dịch, chống ung thư, diệt khuẩn, bảo quản thực phẩm hoặc các sản phẩm giúp kiểm soát chức năng đường ruột, v.v..

Năm 2010, Semjonovs và Zikmanis công bố chủng *P. pentosaceus* P773 (lưu giữ tại Bảo tàng giống Vi sinh vật Latvia) có khả năng lên men đồng hình sử dụng lactoza làm nguồn cacbon, do vậy có thể sinh trưởng tốt trên nhiều loại cơ chất là thực phẩm như sữa, ngũ cốc, hoa quả, sữa đậu nành... Nhờ đặc tính này mà chủng P773 có tiềm năng ứng dụng làm chủng khởi động (có thể kết hợp với các loài vi khuẩn khác) trong quá trình lên men nhiều loại nguyên liệu khác nhau. Đặc biệt, chủng *P. pentosaceus* P773 trong quá trình sinh trưởng tạo ra exopolysaccharit chứa fructan, là một loại prebiotic, do vậy còn có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất loại hợp chất này ở quy mô công nghiệp.

Carpenter *et al.* (2014) công bố ứng dụng của *Pediococcus pentosaceus* cùng với *P. acidilactici* và *Lactobacillus plantarum* trong việc tăng cường khả năng dung nạp rượu ở người. Trong nghiên cứu của mình, các tác giả đã mô tả công thức tạo sinh khối vi khuẩn dạng bột cũng như tỷ lệ phối trộn các loại vi khuẩn và chất bổ trợ để tạo ra sản phẩm dạng viên dùng theo đường uống, giúp làm giảm ảnh hưởng của rượu sau khi uống.

Trong nghiên cứu khác, Castellana *et al.* (2015) đã chứng minh *P. pentosaceus* CECT 8330 có tác dụng kích thích tạo ra interleukin-10, giảm hiện tượng viêm ruột. Trên cơ sở đó tác giả đã mô tả phương pháp tạo ra dược phẩm hay thực phẩm chức

năng chứa loại vi khuẩn này để làm giảm hiện tượng khốc nhiều ở trẻ nhỏ (với nguyên nhân chủ yếu là do kích ứng viêm ở ruột).

Gần đây, Wang *et al.* (2017) đã công bố chủng *P. pentosaceus* T036 (lưu giữ tại Bảo tàng giống VSV Trung Quốc) có khả năng ứng dụng trong lên men sữa tạo hương vị đặc biệt. Chủng này sinh trưởng tốt trong môi trường tới 48% sữa, lên men trong 12 giờ, giảm pH và làm đông đặc sữa, không có mùi. Phân tích sản phẩm sữa chua do chủng T036 tạo ra cho thấy các thành phần tạo hương vị như 3-hydroxy-2,3-pentanedion và 2-butanon cao hơn so với các loại sữa chua thông thường.

Có thể thấy rằng trong đời sống, *P. pentosaceus* được đưa vào ứng dụng khá rộng rãi trong các lĩnh vực công nghiệp chế biến và bảo quản thực phẩm như các sản phẩm lên men từ thịt, rau quả, sữa. Đặc biệt, *P. pentosaceus* là một probiotic được Cơ quan An toàn thực phẩm châu Âu EFSA cho phép lưu hành dưới dạng probiotic bổ sung vào ủ chua thức ăn và nước uống cho vật nuôi (EFSA-Q-2017-00449). *P. pentosaceus* đã có mặt trong nhiều sản phẩm thương mại sử dụng trong chăn nuôi, bảo quản thực phẩm hay thực phẩm chức năng cho người (Bảng 2).

Bảng 2. Một số sản phẩm thương mại sử dụng *P. pentosaceus*

TT	Tên sản phẩm	Nước sản xuất	Đối tượng sử dụng	Tác dụng
1	Ecotru	Thái Lan	Chăn nuôi gia cầm	Giảm viêm chân-móng và tổn thương da ở gà, giảm nồng độ khí ammoniac, giảm pH chất bài tiết làm giảm mùi hôi của phân.
2	HN02	Trung Quốc	Bảo quản thực phẩm	Bảo quản cá bằng biện pháp lên men sinh axit.
3	NB-17	Nhật Bản	Thực phẩm chức năng cho người	Kích thích hệ thống miễn dịch, ức chế dị ứng của cơ thể.
4	LI05	Nhật Bản	Thực phẩm chức năng cho người	Kiểm soát tổn thương gan

Ở Việt Nam hiện nay, vi khuẩn *P. pentosaceus* chủng HN02 đã được ứng dụng trong bảo quản cá và sản xuất bột cá đạt chất lượng theo TCVN 1644-2001 (Nguyễn Thế Trang, Trần Đình Mẫn, 2007; Nguyễn Thế Trang và cs., 2011). Trung tâm ứng dụng vi sinh BioOne (Nha Trang-Khánh Hòa) có sản phẩm men vi sinh chứa *P. pentosaceus* để bổ sung vào thức ăn cho tôm cá, phòng chống các bệnh đường ruột. Tuy nhiên, chủng *P. pentosaceus* được nghiên cứu chi tiết về các đặc tính lợi khuẩn cho mục đích ứng dụng làm tăng sức đề kháng cho vật nuôi còn chưa được đề cập. Với nhu cầu thực tế ngày càng tăng về *Pediococcus* spp. ở dạng nguyên liệu hay sản phẩm cho sức khỏe, chăn nuôi hay chế biến/bảo quản thực phẩm, việc nghiên cứu để tạo ra các chủng bản địa với tính ứng dụng cao là rất cần thiết.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để khắc phục các nhược điểm nêu trên, sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn *Pediococcus pentosaceus* Pd1 thuần khiết về mặt sinh học, có các đặc tính lợi khuẩn, phù hợp để sử dụng làm probiotic cho chăn nuôi gia súc, gia cầm. Chủng vi khuẩn này được phân lập từ phân trẻ sơ sinh khỏe mạnh ở Việt Nam, dưới 6 tháng tuổi và bú mẹ hoàn toàn.

Chủng *Pediococcus pentosaceus* Pd1 được mô tả trong sáng chế này là vi khuẩn bản địa, phân lập từ đường ruột trẻ sơ sinh khỏe mạnh ở Việt Nam, được nghiên cứu chi tiết về các đặc tính sinh lý, các đặc tính probiotic và được chứng minh có hiệu quả trong việc làm tăng sức đề kháng của gà qua thử nghiệm bổ sung vào ước uống hàng ngày. Chủng Pd1 chứng tỏ là nguồn lợi khuẩn tiềm năng tốt cho ngành chăn nuôi ở Việt Nam hiện nay.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh vị trí của chủng Pd1 trên cây phân loại được xây dựng dựa trên so sánh trình tự gần đủ của đoạn 16S rADN so với trình tự của các loài gần gũi đã công bố trên ngân hàng gen.

Hình 2 là hình ảnh thể hiện hình thái tế bào của chủng Pd1 được nhuộm Gram và quan sát dưới kính hiển vi phản pha (A) hay dưới kính hiển vi điện tử quét (B).

Hình 3 là hình ảnh kết quả xác định khả năng lên men các hợp chất hydratcacbon sinh axit lactic ở chủng Pd1 sử dụng Kit API 50 CH.

Hình 4 là hình ảnh mô tả mức độ sinh trưởng của chủng Pd1 trong môi trường có hàm lượng oxy hòa tan ở các mức kỵ khí và vi hiếu khí (A) hay hiếu khí (B).

Hình 5 là hình ảnh mô tả các bước thí nghiệm tạo sinh khối chủng Pd1 dạng đông khô và bổ sung vào nước uống cho gà để đánh giá tác dụng hỗ trợ tăng sức đề kháng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập tới chủng vi khuẩn *Pediococcus pentosaceus* Pd1 được phân lập từ phân trẻ sơ sinh ở Việt Nam, mang những đặc tính lợi khuẩn, có tiềm năng ứng dụng cao trong chăn nuôi.

Mẫu phân trẻ sơ sinh khỏe mạnh, bú mẹ hoàn toàn được thu thập và bảo quản ở nhiệt độ 4°C trong thời gian < 12 giờ tới khi sử dụng để phân lập vi khuẩn trong phòng thí nghiệm. Phân lập vi khuẩn được tiến hành theo phương pháp dây pha loãng trong ống môi trường MRS thạch bán lỏng (1%), gồm các thành phần như sau: pepton, 10 g; cao thịt bò, 10 g; cao nấm men, 5 g; glucoza, 20 g; tween 80, 1 g; KH₂PO₄, 2 g; Na-

axetat, 5 g; $(\text{NH}_4)_2\text{-H-citrat}$, 2 g; $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g; $\text{MnSO}_4.n\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g; Nước cất tới 1 lít. pH môi trường được chỉnh tới 6 – 6,5 bằng dung dịch HCl 0,1M; oxy được loại bỏ hoàn toàn bằng sục khí nitơ trong 30 giây. Các ống thạch sau đó được đặt ở tư thế đảo đầu, ủ tại nhiệt độ 37°C trong 48 giờ. Các khuẩn lạc đơn lẻ được tách bằng mao quản thủy tinh và chuyển vào ống nghiệm chứa 10 ml môi trường MRS dịch thể, đậy kín bằng nắp có đệm cao su rồi đuổi oxy bằng cách sục khí nitơ trong 30 giây.

Chủng *P. pentosaceus* Pd1 đã được nghiên cứu chi tiết về các đặc điểm hình thái (hình dạng và kích thước tế bào, khả năng chuyển động) và đặc điểm sinh trưởng (ảnh hưởng của oxy tới sinh trưởng, khả năng tạo màng sinh học (biofilm), khả năng lên men các loại đường, tốc độ sinh trưởng và khả năng sinh axit). Vị trí phân loại của chủng cũng được xác định dựa trên so sánh trình tự gần đủ của 16S rADN, trình tự đã được đăng ký trên ngân hàng gen DDBJ. Bên cạnh đó, các đặc tính liên quan đến vai trò lợi khuẩn đường ruột như mức độ chống chịu với hàm lượng muối mật cao và pH thấp trong môi trường, khả năng kháng các vi sinh vật gây bệnh thuộc nhóm ESKAPE cũng được đánh giá chi tiết. Cuối cùng, thí nghiệm sử dụng chủng *P. pentosaceus* Pd1 pha vào nước uống cho gà đã được thực hiện nhằm đánh giá tác dụng lợi khuẩn của chủng này trong việc tăng sức đề kháng cho vật nuôi. Kết quả thí nghiệm cho thấy bổ sung sinh khối chủng Pd1 ở mật độ $10^5 - 10^6$ MPN/ml trong nước uống hàng ngày cho gà làm tăng sức đề kháng, đặc biệt ở gà con. Gà không bị mắc các bệnh đường ruột và hô hấp, không dùng kháng sinh trong suốt quá trình nuôi, phát triển tốt và tăng cân đều.

Chủng *P. pentosaceus* Pd1 hiện được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn Việt Nam VTCC với mã số VTCC910046. Chủng này có thể được bảo quản ở điều kiện đông khô trong các ống thủy tinh có nắp kẹp nhôm, thể tích 3 ml chứa 1,5 ml dịch đông khô. Ở điều kiện bảo quản này, chúng có thể giữ hoạt tính trong thời gian 3 – 5 năm, có thể dễ dàng hoạt hóa trở lại trong môi trường MRS dịch thể kỵ khí sau 24 giờ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập chủng vi khuẩn Pd1

Phân trẻ sơ sinh khỏe mạnh, hoàn toàn bú mẹ được lấy vào ống falcon chứa môi trường MRS vô trùng và đưa về phòng thí nghiệm để phân lập ngay trong vòng 12 giờ. Mẫu được trộn đều rồi pha loãng trong các ống nghiệm chứa 9 ml dung dịch NaCl 0,9% vô trùng. Lượng nhỏ 1 ml mẫu ở mỗi nồng độ pha loãng được cấy vào các ống nghiệm chứa 9 ml môi trường MRS có bổ sung 1% thạch Bacto agar ở nhiệt độ 40°C , đậy nắp cao su và đảo đầu ống để trộn đều rồi để nguội. Sau cùng, thổi khí nitơ

(Messer Vietnam) vào các ống thạch để loại oxy rồi đặt trong tủ 37°C ở tư thế đảo ngược trong thời gian 2 – 3 ngày.

Các khuẩn lạc xuất hiện trong ống thạch bán lỏng được tách riêng bằng mao quản thủy tinh, chuyển sang ống nghiệm chứa môi trường MRS dịch thể kín khí và đặt nuôi trong tủ ấm 37°C trong 48 giờ. Lặp lại bước pha loãng và nuôi trong ống thạch bán lỏng để tinh sạch khuẩn lạc và thu nhận chủng thuần khiết.

Ví dụ 2: Nghiên cứu các đặc điểm hình thái của chủng Pd1

Chủng Pd1 được nuôi trong môi trường MRS dịch thể và ly tâm thu sinh khối sau 24 giờ để làm tiêu bản chụp hình thái tế bào dưới kính hiển vi phản pha và kính hiển vi điện tử quét (SEM).

Tiêu bản chụp ảnh tế bào sống dưới kính hiển vi phản pha được chuẩn bị theo các bước như sau: tế bào vi khuẩn sau 24 giờ nuôi được hòa trong dung dịch NaCl 0,9%. Lấy 20 – 30 μ l dịch huyền phù tế bào nhỏ lên lam kính phủ lớp thạch mỏng và đẩy nhẹ bằng lamén kính rồi quan sát trên kính hiển vi phản pha Axiostar Plus (Zeiss) ở vật kính 40 $\times$. Lựa chọn vị trí tế bào được giữ trong lớp thạch (không bị lamén kính ép làm thay đổi hình dạng hay đang còn trôi tự do trong vi trường), sau đó chuyển qua vật kính 100 $\times$ để chụp ảnh.

Để quan sát hình thái trên kính hiển vi điện tử quét, tế bào chủng Pd1 sau 24 giờ nuôi được thu bằng ly tâm, sau đó được cố định lần lượt bằng dung dịch glutaraldehyt 2,5% (pha trong 100 mM cacodylat) trong thời gian ít nhất là 1 giờ và tiếp theo trong dung dịch OsO₄ 1% (pha trong 100 mM cacodylat) trong 1 giờ tại nhiệt độ phòng. Mẫu sau khi cố định được rửa trong dung dịch 100 mM cacodylat 2 lần, sau đó loại nước trong dung dịch còn 90% rồi để khô. Tế bào vi khuẩn sau đó được hòa trong etanol 100%, đưa lên để gắn mẫu có bọc màng nhôm và phủ màng Pt-Pd và quan sát trên kính hiển vi điện tử quét (Hitachi, Nhật Bản).

Kết quả quan sát hình thái hiển vi (Hình 2A, 2B) cho thấy chủng Pd1 gồm các tế bào hình cầu, chụm đôi hoặc bốn, đường kính 1 – 1,2 μ m, không chuyển động. Đây là hình dạng tế bào đặc trưng được quan sát thấy ở nhiều loài thuộc chi *Pediococcus* (Holzapfel *et al.*, 2006).

Ví dụ 3: Xác định vị trí phân loại của chủng Pd1 dựa trên so sánh trình tự 16S rADN và phân tích khả năng lên men các hợp chất hydratcacbon bằng kit API 50 CH

ADN hệ gen của chủng Pd1 được tinh sạch bằng EZNA Bacterial DNA Kit (Omega Bio-tek, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm thu được có hàm lượng ADN là 210 μ g/ml, tỷ lệ A₂₆₀/A₂₈₀ là 1,72, chứng tỏ mức độ tinh sạch cao.

Sản phẩm ADN hệ gen sau đó được sử dụng làm khuôn để khuếch đại 16S rADN, sử dụng cặp mồi 27F (5'–AGAGTTTGATCCTGG CTCAG–3') và 1492R (5'–GGTTACCTTGTACGACTT–3') (Edward *et al.*, 1989). Thành phần phản ứng PCR (50 µl) gồm có: 5 µl đệm (0.2 M Tris-HCl pH 8.3, 0.25 M KCl, 20 mM MgCl₂), 20 nmol mỗi loại dNTP, 50 pmol mỗi loại mồi xuôi và mồi ngược, 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Promega), và 1 µl ADN khuôn. Chu trình nhiệt phản ứng gồm các bước như sau: biến tính ở 94°C trong 3 phút, thực hiện 35 chu kỳ (94°C 30 giây, 55°C 45 giây, 72°C 1,5 phút), tiếp tục kéo dài ở 72°C trong 7 phút và kết thúc ở 4°C.

Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng PCR purification Kit (Bioneer, Hàn Quốc) trước khi được làm phản ứng giải trình tự với ABI Prism BigDye Terminator cycle sequencing kit và đọc trình tự trên máy tự động 3110 Avant Applied Biosystems. Kết quả giải trình tự được xử lý bằng phần mềm BioEdit để thu được trình tự gần đủ của 16S rADN.

Trình tự gen sau đó được phân tích, so sánh với trình tự 16S rADN của các loài có liên quan hiện đã công bố trên các ngân hàng gen GenBank/EMBL/DDBJ sử dụng phần mềm BLAST Search. Cây phân loại được dựng theo phương pháp neighbour-joining (Saitou, Nei, 1987), trong đó định dạng cây được tiến hành dựa trên 1000 phép so sánh đa chiều (Felsenstein, 1985).

Kết quả so sánh độ tương đồng về trình tự 16S rADN của chủng Pd1 với các trình tự đã công bố trên ngân hàng dữ liệu GenBank cho thấy chủng có độ tương đồng rất cao (99%) với loài *Pediococcus pentosaceus*. Vị trí phân loại của chủng Pd1 so với các loài gần gũi được thể hiện trên cây phả hệ tại Hình 1. Trình tự 16S rDNA gần đủ của chủng Pd1 được lưu giữ tại ngân hàng gen DDBJ với số hiệu LC424187.

Khả năng lên men các hợp chất hydratcacbon ở chủng Pd1 được nghiên cứu chi tiết, sử dụng Kit API 50 CH dành cho nhóm vi khuẩn lactic. Hình ảnh thể hiện tại hình 3 là kết quả xác định khả năng lên men các hợp chất hydratcacbon ở chủng Pd1 ghi nhận sau 48 giờ. Số thứ tự của các hợp chất hydratcacbon trong Kit API 50 CH (Hình 3) và kết quả chi tiết được thể hiện tại bảng 3.

Bảng 3. Khả năng lên men các hợp chất hydratcacbon ở chủng Pd1 so với chủng *P. pentosaceus* IJ-K1*

Hydratcacbon		Lên men		Hydratcacbon		Lên men	
TT trong Kit API 50 CH	Tên hydratcacbon	Chủng Pd1	Chủng IJ-K1	TT trong Kit API 50 CH	Tên hydratcacbon	Chủng Pd1	Chủng IJ-K1
0	Đối chứng	–	–	25	Esculin	+	+
1	Glycerol	+	–	26	Salicin	+	+

2	Erythritol	–	–	27	Cellobioza	+	+
3	D-Arabinosa	–	–	28	Maltoza	+	+
4	L-Arabinosa	+	+	29	Lactoza	+	+
5	Riboza	+	+	30	Melibioza	–	–
6	D-Xyloza	+	–	31	Sucroza	–	–
7	L-Xyloza	–	–	32	Trehaloza	+	–
8	Adonitol	–	–	33	Inulin	–	–
9	β -Methy-xylosit	–	–	34	Melezitoza	–	–
10	D-Galactoza	+	+	35	D-Raffinoza	–	+
11	D-Glucoza	+	+	36	Tinh bột	–	–
12	D-Fructoza	+	+	37	Glycogen	–	–
13	D-Mannoza	+	+	38	Xylitol	–	–
14	L-Sorboza	–	–	39	Gentiobioza	+	+
15	Rhamnoza	–	–	40	D-Turanoza	–	–
16	Dulcitol	–	–	41	D-Lyxzoza	+	–
17	Inositol	–	–	42	D-Tagatoza	+	+
18	Mannitol	–	–	43	D-Fucoza	–	–
19	Sorbitol	–	–	44	L-Fucoza	–	–
20	α -Methyl-d-mannosit	–	–	45	D-Arabitol	–	–
21	α -Methyl-d-glucosit	+	–	46	L-Arabitol	–	–
22	N-Acetylglucosamin	+	+	47	Gluconat	–	–
23	Amygdalin	+	+	48	2-Ketogluconat	+	–
24	Arbutin	+	+	49	5-Ketogluconat	–	–

Chú thích: (+) có khả năng lên men; (–) không có khả năng lên men.

* Khả năng lên men các loại hợp chất hydratecacbon của chủng *P. pentosaceus* IJ-K1 được trích từ công bố của Jung *et al.* (2012).

Có thể thấy rằng khả năng lên men các hợp chất hydratecacbon ở chủng Pd1 khá tương đồng so với chủng *Pediococcus pentosaceus* IJ-K1. Bên cạnh khả năng lên men các loại đường 6 cacbon (như D-galactoza, D-glucoza, D-fructoza, D-mannoza), chủng Pd1 còn lên men được một số đường 5 cacbon (như L-arabinosa, riboza, D-xyloza). Các hợp chất đường khử (như sorboza, dulcitol hay inositol...) không thích hợp làm cơ chất lên men cho chủng Pd1. Tương tự như chủng *P. pentosaceus* IJ-K1, chủng Pd1 có thể lên men nhiều hợp chất thuộc nhóm glycosid (như amygdalin, arbutin, salicin) và một số đường đôi (như cellobioza, maltoza, lactoza, trehaloza). Chủng Pd1 không lên men được các loại cơ chất nhóm cao phân tử như tinh bột, glycogen hay xylitol.

Dựa trên kết quả phân tích trình tự 16S rDNA và phân tích khả năng lên men các hợp chất hydratecacbon theo kit API 50 CH, chủng Pd1 có thể xếp vào loài *Pediococcus pentosaceus* và được đặt tên khoa học là *Pediococcus pentosaceus* Pd1.

Ví dụ 4: Nghiên cứu các đặc điểm sinh học của chủng *P. pentosaceus* Pd1

Nghiên cứu các đặc điểm sinh trưởng

Chủng *P. pentosaceus* Pd1 là một vi khuẩn lactic điển hình, các đặc tính sinh trưởng quan trọng của chủng như ảnh hưởng của oxy tới sinh trưởng, tốc độ sinh trưởng và giảm pH môi trường đã được tiến hành nghiên cứu (các thí nghiệm đều được thực hiện với độ lặp lại 3 lần).

Môi trường MRS với các điều kiện chứa oxy hòa tan ở nồng độ khác nhau, gồm có hiếu khí (môi trường thạch đĩa), vi hiếu khí (môi trường MRS dịch thể trong ống kín không sục khí N₂ và không bổ sung L-cystein) và kỵ khí (môi trường MRS dịch thể trong ống kín có bổ sung L-cystein và sục khí N₂). Hàm lượng oxy trong các môi trường vi hiếu khí và kỵ khí được xác định tương ứng là 1 mg/L và 0,1 mg/L (xác định tại Viện Đo lường và Chất lượng Quốc gia). Khả năng sinh trưởng của vi khuẩn *P. pentosaceus* Pd1 tại hai điều kiện môi trường này được đánh giá thông qua việc xác định pH và mật độ quang của dịch nuôi. Kết quả cho thấy, chủng Pd1 sinh trưởng tốt ở cả hai môi trường vi hiếu khí và kỵ khí, mật độ quang của dịch nuôi đạt ~4,5 sau 48 giờ (Hình 4A), trong khi đó ở môi trường hiếu khí chủng sinh trưởng kém và hầu như không tiếp tục sinh trưởng ở các lần cấy chuyển tiếp theo (Hình 4B).

Tốc độ sinh trưởng và khả năng sinh axit làm giảm pH trong môi trường của chủng *P. pentosaceus* Pd1 được xác định thông qua nuôi vi khuẩn trong môi trường MRS dịch thể kỵ khí (chứa glucoza là cơ chất lên men), ở nhiệt độ 37 °C, nuôi tĩnh và xác định mật độ quang và pH của dịch tế bào sau mỗi 4 giờ nuôi. Kết quả cho thấy chủng *P. pentosaceus* Pd1 sinh trưởng tốt, hạ pH trong môi trường tới < 4 chỉ sau 24 giờ và mật độ quang của dịch nuôi đo ở bước sóng 600 nm đạt ~4,5 sau 48 giờ.

Nghiên cứu các đặc điểm lợi khuẩn

Các hoạt tính sinh học có liên quan đến tiềm năng ứng dụng làm lợi khuẩn như khả năng chịu pH thấp và hàm lượng muối mật cao ở chủng *P. pentosaceus* Pd1 cũng được đánh giá.

Trong thí nghiệm xác định khả năng chịu muối mật, chủng vi khuẩn Pd1 sau khi hoạt hóa được đưa vào môi trường MRS kỵ khí có bổ sung muối mật ở nồng độ 0,5% hoặc 1% ở mật độ tế bào 10⁹ MPN/ml, bình nuôi được đặt ở 37°C, không khuấy trộn. Đối chứng dương là bình nuôi vi khuẩn trong môi trường MRS không bổ sung muối mật. Mật độ vi khuẩn còn sống sót trong bình nuôi sau mỗi 30 phút được xác định theo phương pháp Most Probable Number (MPN), đơn vị tính là MPN/ml. Kết quả cho thấy chủng Pd1 có khả năng chịu được muối mật ở nồng độ 1% trong thời gian 2 giờ. Sau 2

giờ tiếp xúc với muối mật ở nồng độ 1%, mật độ tế bào giảm 3 số mũ, từ 10^9 MPN/ml xuống 10^6 MPN/ml.

Để đánh giá khả năng chống chịu trong điều kiện pH thấp, chủng Pd1 sau khi hoạt hóa được đưa vào môi trường MRS có pH là pH1, pH2 hoặc pH3, ở mật độ ban đầu là 10^9 MPN/ml nuôi ở 37°C. Đối chứng dương là bình nuôi vi khuẩn trong môi trường MRS kỵ khí có pH 6,5. Mật độ tế bào trong dịch nuôi được xác định tại các thời điểm 0 h, 2 h, 4 h bằng phương pháp MPN. Kết quả cho thấy chủng Pd1 có khả năng chịu pH thấp rất tốt, ở pH2 mật độ tế bào trong dịch nuôi không thay đổi đáng kể, trong khi đó ở pH1, mật độ tế bào giảm 2 số mũ, từ 10^9 MPN/ml xuống 10^7 MPN/ml sau 2 giờ, và giảm mạnh ở thời gian sau đó. Trong quá trình tiêu hóa ở người và động vật thì thức ăn chủ yếu đã đi qua dạ dày sau 2 giờ kể từ khi ăn, do vậy với khả năng sống sót cao sau 2 giờ tiếp xúc với điều kiện pH thấp (tối giá trị 1) và nồng độ muối mật cao (tối 1%) thì chủng Pd1 được xem là có tiềm năng ứng dụng làm lợi khuẩn tốt.

Ví dụ 5: Đánh giá hiệu quả của chủng Pd1 trong việc nâng cao sức đề kháng ở gà

Vi khuẩn *Pediococcus pentosaceus* là một lợi khuẩn được cơ quan An toàn thực phẩm châu Âu EFSA cho phép lưu hành dưới dạng probiotic bổ sung vào nước uống cho vật nuôi (EFSA-Q-2017-00449). Vì thế, trong nghiên cứu đánh giá hiệu quả nâng cao sức đề kháng của gà do chủng Pd1, sinh khối vi khuẩn được chuyển thành dạng bột đông khô, có thể bảo quản lâu dài trong điều kiện 4 °C và sử dụng cho gà thông qua đưa vào nước uống hàng ngày. Quá trình tạo sinh khối dạng bột đông khô được thực hiện qua các bước như sau (Hình 5):

- Chủng vi khuẩn Pd1 ở dạng được bảo quản trong các ống đông khô được hoạt hóa trong bình serum thể tích 100 ml chứa môi trường MRS kỵ khí, nuôi ở 37°C trong 48 giờ. Độ tinh sạch của dịch nuôi được kiểm tra thông qua quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi, nếu xuất hiện tế bào có hình dạng khác lạ thì cần phải hoạt hóa vi khuẩn từ ống bảo quản khác.

- Tiếp theo vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong bình Scott kín khí thể tích 2 lít chứa 1,8 lít môi trường MRS, nuôi ở 37°C trong 48 giờ. Độ tinh sạch của dịch nuôi được kiểm tra thông qua quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi, mật độ quang của dịch nuôi cần đạt 4,5 và pH môi trường cần ở mức < 4.

- Sau khi dừng nuôi tăng sinh, tế bào của chủng Pd1 được thu bằng ly tâm 5000 v/p trong 15 phút, loại dịch môi trường và hòa sinh khối (hoàn nguyên) trong 300 ml đệm PBS (thành phần trong 1000 ml nước cất gồm NaCl 8 g; KCl 0,2 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,44 g; KH_2PO_4 0,24 g) đã khử trùng.

- Bổ sung glycerol vào dịch hoàn nguyên theo tỷ lệ 5% thể tích, sau đó trộn với hỗn hợp giá thể đông khô (gồm 40% sữa gầy, 30% lactoza và 30% tinh bột tan) theo tỷ lệ 1:1,5 (v/w).

- Hỗn hợp được làm lạnh qua đêm ở -20°C , sau đó được làm khô trên thiết bị đông khô vận hành theo chế độ như sau: làm lạnh tại -30°C đến -20°C trong 4 giờ, sau đó nâng nhiệt dần lên 20°C với chu kỳ $3 - 5^{\circ}\text{C}$ trong mỗi 2 – 4 giờ (tổng thời gian nâng nhiệt trong khoảng 24 – 30 giờ). Cuối cùng, mẫu được tiếp tục làm khô ở nhiệt độ 20°C trong 3 – 5 giờ.

- Sinh khối chủng Pd1 sau khi đông khô được nghiền nhỏ và bảo quản trong túi kín ở 4°C . Mật độ tế bào trong sản phẩm được kiểm tra bằng phương pháp MPN, cần đạt $> 10^{10}$ MPN/g. Ở dạng này chủng Pd1 có thể được sử dụng bổ sung vào thức ăn hoặc nước uống cho vật nuôi.

Thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của chủng Pd1 tới sức đề kháng của gà được thực hiện trên giống gà lai đông tảo tại hộ nuôi gia đình thuộc xã Lạc Đạo, huyện Văn Lâm, tỉnh Hưng Yên. Thí nghiệm gồm 50 gà con 1 tuần tuổi, chia làm 02 lô mỗi lô 25 con cách biệt trong khu nuôi. Gà được nuôi theo chế độ dinh dưỡng thông thường của gia đình (ngô và cám công nghiệp), lô đối chứng không bổ sung vi sinh, lô thí nghiệm bổ sung vi khuẩn *P. pentosaceus* Pd1 từ sinh khối đông khô vào nước uống hàng ngày theo tỷ lệ 1 g /lít nước, cho uống mỗi ngày 1 lần (tương đương $10^5 - 10^6$ MPN/ml) trong suốt thời gian nuôi (4 tháng).

Chế độ tiêm phòng tối thiểu được áp dụng đối với cả 2 lô gồm 3 lần: 1 tháng tuổi tiêm vacxin phòng bệnh Gumboro, 2 tháng tuổi tiêm vacxin phòng bệnh Newcastle và 3 tháng tuổi tiêm vacxin phòng bệnh tụ huyết trùng.

Kết quả theo dõi mức tăng trưởng và sức đề kháng của gà trong quá trình nuôi cho thấy sức đề kháng của lô thí nghiệm sử dụng chủng Pd1 cao hơn so với lô đối chứng, tất cả số gà đều khỏe mạnh, trong khi đó ở lô đối chứng có 5 con bị chết (chiếm 20%) sau 2 tháng nuôi. Trọng lượng trung bình của gà trong từng lô thí nghiệm được kiểm tra tại các thời điểm 2 tháng và 4 tháng dựa trên trọng lượng riêng của từng con. Sau 2 tháng, gà ở lô thí nghiệm (có bổ sung Pd1) tăng trung bình 1,1 kg/con cao hơn so với lô đối chứng 0,78 kg/con, đạt 18,7%. Từ 2 – 4 tháng mức phát triển ở cả hai lô tương đối ổn định, tuy nhiên ở lô đối chứng có 4/20 con gà bị tiêu chảy (chiếm 20%) phải trị bằng thuốc kháng sinh doxysin trong 1 tuần và 2 trong số 4 con bị chết. Tới thời điểm 4 tháng trọng lượng trung bình của gà ở lô thí nghiệm và lô đối chứng tương ứng là 3,7 và 3,5 kg/con, chênh lệch 5,4%.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Nhu cầu thực tế về lợi khuẩn đường ruột sử dụng trong phát triển chăn nuôi sạch ở Việt Nam hiện nay là rất lớn. Nguồn lợi khuẩn đường ruột sử dụng trong nước chủ yếu đang giới hạn ở một số loài thuộc chi *Bacillus* trong khi nhóm này không phải là các vi khuẩn bản địa của hệ đường ruột ở động vật. Vi khuẩn lactic là nhóm chiếm ưu thế trong hệ đường ruột động vật nhưng số lượng các chủng được ứng dụng trong chăn nuôi còn hạn chế vì so với *Bacillus* các vi khuẩn này kém chịu đựng hơn trong các điều kiện khắc nghiệt của đường ruột cũng như trong quá trình tạo sản phẩm sinh khối. *Pediococcus pentosaceus* là một lợi khuẩn thuộc nhóm vi khuẩn lactic được cơ quan An toàn thực phẩm châu Âu EFSA cho phép lưu hành dưới dạng probiotic bổ sung vào nước uống cho vật nuôi (EFSA-Q-2017-00449). Chủng *Pediococcus pentosaceus* Pd1 được mô tả trong sáng chế này là vi khuẩn bản địa, phân lập từ đường ruột trẻ sơ sinh khỏe mạnh ở Việt Nam, được nghiên cứu chi tiết về các đặc tính sinh lý, các đặc tính probiotic và được chứng minh có hiệu quả trong việc làm tăng sức đề kháng của gà qua thử nghiệm bổ sung vào nước uống hàng ngày. Chủng Pd1 chứng tỏ là nguồn lợi khuẩn tiềm năng tốt cho ngành chăn nuôi ở Việt Nam hiện nay.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Carpenter R, Kapur A, Suresh N, Huf EW (2014) Compositions comprising a mixture of bacteria comprising *pediococcus* and *lactobacillus* and methods for decreasing the effects of alcohols. CA2911947A1 (2014-11-13)
2. Castellana C, Mallen LE, Mazo EJ (2015) Probiotic for infantile excessive crying. CA 2920461 (2015-01).
3. Chang *et al* (2006) Microorganism *Pediococcus pentosaceus* EROM101, having immune enhancement, anticancer and antimicrobial activities. US11450452 (12/6/2006).
4. De Bruyne K, Franz CMAP, Vancanneyt M, Schillinger U, Mozzi F, De Valdez GF, De Vuyst L, Vandamme P (2008) *Pediococcus argentinicus* sp. nov. from Argentinean fermented wheat flour and identification of *Pediococcus* species by *pheS*, *rpoA* and *atpA* sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2909 – 2916.
5. Edwards U, Rogall T, Blöcker H, Emde M, Böttger EC (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nuc Acids Res* 17: 7843-7853.
6. EFSA-Q-2017-00449 <http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/wgs/animal-feed/feedapmicroorganisms>.
7. Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
8. Franz CMAP, Vancanneyt M, Vandemeulebroeke M, De Wachter M, Cleenwerck I, Hoste B, Schillinger U, Holzapfel WH, Swings J (2006) *Pediococcus stilesii* sp. nov., isolated from maize grains. *Int Syst Evol Microbiol* 56: 329 – 333.
9. Holzapfel WH, Franz CMAP, Ludwig W, Back W, Dicks LMT (2006) The genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*. In: Dworking M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (Ed) *The Prokaryotes*. Vol 4. Pp. 229 – 266. Springer, NY.
10. Immerstrand T, Paul CJ, Rosenquist A, Deraz S, Martensson OB, Ljungh A, Blucher A, Oste R, Holst O, Karlsson EN (2010) Characterization of the properties of *Pediococcus parvulus* for probiotic or protective culture use. *J Food Protect* 73(5): 960 – 966.

11. Jung SH, Park JW, Cho IJ, Lee NK, Yeo I-C, Kim BY, Kim HK, Hahm YT (2012) Characterization of lactic acid bacteria isolated from sauce-type *Kimchi*. *Prev Nutr Food Sci* 17:217 – 222.
12. Liu L, Zhang B, Tong H, Dong X (2006) *Pediococcus ethanolidurans* sp. nov., isolated from the walls of a distilled-spirit-fermenting cellar. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:2405 – 2408.
13. Nguyễn Thê Trang, Trần Đình Mẫn (2007) Sử dụng chủng vi khuẩn axit lactic *P. pentosaceus* HN02 để sản xuất chế phẩm bảo quản cá. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 45(4):35 – 42.
14. Nguyễn Thê Trang, Trần Đình Mẫn, Phạm Thanh Hà (2011) Ảnh hưởng của chế phẩm vi khuẩn lactic lên sự thay đổi hàm lượng axit amin của cá tạp sau thời gian bảo quản và ứng dụng cho nuôi trồng thủy sản. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 49(1):111 – 118.
15. Pittel V, Abegunde T, Marfleet T, Haakesen M, Morrow K *et al.* (2012) Complete genome sequence of the beer spoilage organism *Pediococcus claussenii* ATCC BAA-344^T. *J Bacteriol*: 1271 – 1272.
16. Semjonovs P, Zikmanis P (2010) *Pediococcus pentosaceus* lactoza-positive strain and a complex of fructan-containing exopolysaccharites synthesized by the strain EP2011859B1(2010-04-07).
17. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
18. Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA (1980) Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol* 30: 225–420.
19. Tanasupawat S, Pakdeeto A, Thawai C, Yukphan P, Okada S (2007) Identification of lactic acid bacteria from fermented tea leaves (miang) in Thailand and proposals of *Lactobacillus thailandensis* sp. nov., *Lactobacillus camelliae* sp. nov., and *Pediococcus siamensis* sp". *J Gen Appl Microbiol* 53: 7 – 15.
20. Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. List No 25. *Int J Syst Bacteriol* 38(2): 220 – 222.
21. Wang W, Cheng B, Yu Y, Yang H, Zhu L (2017) *Pediococcus pentosaceus* and its application CN107099482A (2017-08-29) Application, Chinese.

22. Zhang B, Tong H, Dong X (2005) *Pediococcus cellicola* sp. nov., a novel lactic acid coccus isolated from a distilled-spirit-fermenting cellar. *Intl J Syst Evol Microbiol* 55: 2167–2170.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn *Pediococcus pentosaceus* Pd1 thuần khiết về mặt sinh học, phân lập được từ phân trẻ sơ sinh khỏe mạnh dưới 6 tháng tuổi, hoàn toàn bú mẹ ở Việt Nam, có trình tự 16S rADN được đăng ký tại ngân hàng DDBJ với số hiệu LC424187 và có các đặc tính lợi khuẩn như sau:

(i) có khả năng lên men nhiều loại đường 5 cacbon, đường 6 cacbon, đường đôi bao gồm cả lactoza và nhiều hợp chất glucosit sinh axit lactic, làm giảm độ pH trong môi trường tới < 4 chỉ sau 24 giờ nuôi;

(ii) có khả năng chống chịu và sống sót sau 2 giờ khi tiếp xúc với điều kiện của đường ruột với độ pH = 1 và nồng độ muối mật là 1%;

(iv) sinh trưởng tốt ở điều kiện kỵ khí và vi hiếu khí có nồng độ oxy < 1 mg/L, không sinh trưởng ở điều kiện hiếu khí có nồng độ oxy > 1 mg/L, phù hợp với điều kiện của hệ tiêu hóa; và

(v) có thể tăng sức đề kháng của gà và chất lượng thịt khi được bổ sung vào nước uống hàng ngày cho gà dưới dạng sinh khối đông khô theo tỷ lệ 1g /lít nước (tương đương 10^5 – 10^6 MPN/ml).

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

<120> Chủng vi khuẩn *Pediococcus pentosaceus* Pdl thuần khiết về mặt sinh học, phân lập được ở trẻ sơ sinh có đặc tính lợi khuẩn

<160> 1

<210> 1

<211> 1450

<212> ADN

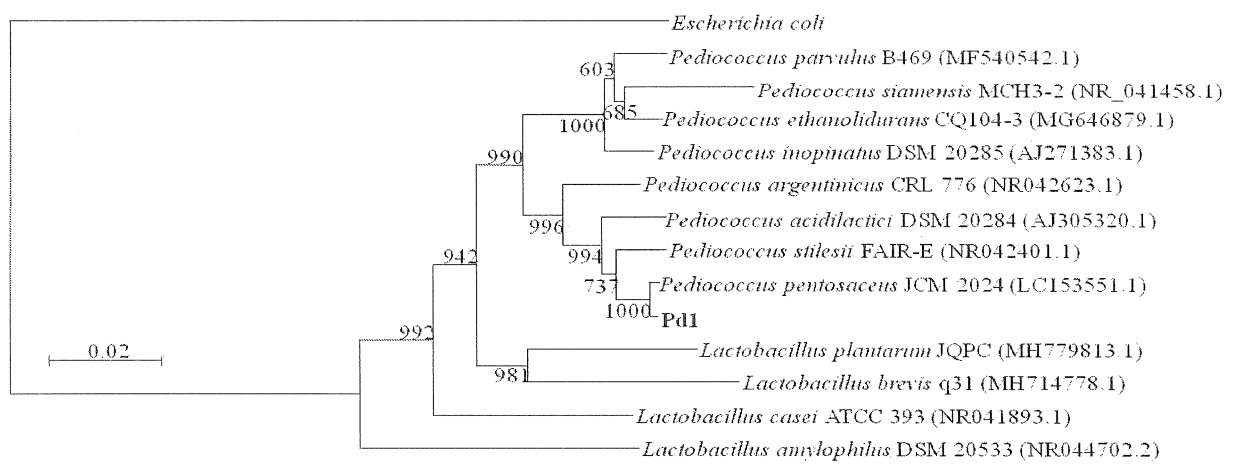
<213> *Pediococcus pentosaceus*

<400> 1

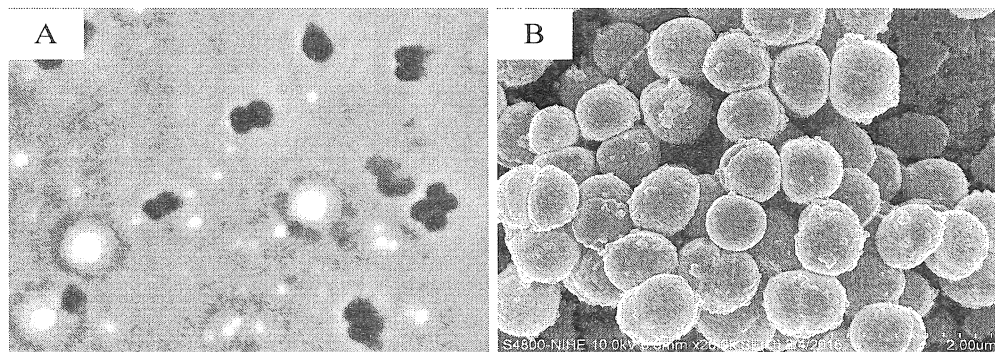
```

1 agagtttggat cctgggtcag gatgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgaac
61 gaacttccgt taattgatta tgacgtactt gtactgattg agattttaac acgaagtggag
121 tggcgaacgg gtgagtaaca cgtgggtaac ctgcccagaa gtaggggata acacctggaa
181 acagatgcta ataccgata acagagaaaa ccgcatggtt ttcttttaaa agatggctct
241 gctatcactt ctggatggac ccgcggcgta ttagctagtt ggtgaggtaa aggctcacca
301 aggcagtgat acgtagccga cctgagaggg taatcggcca cattgggact gagacacggc
361 ccagactcct acgggaggca gcagtaggga atcttccaca atggacgcaa gtctgatgga
421 gcaacgcgcg gtgagtgaag aagggtttcg gctcgtaaag ctctgttggt aaagaagaac
481 gtgggtaaga gtaactgttt acccagtgac ggtatttaac cagaaagcca cggctaacta
541 cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagggtg gcaagcgta tccggattta ttgggcgtaa
601 agcgagcgca ggcggtcttt taagtctaag gtgaaagcct tcggctcaac cgaagaagtg
661 cattggaaac tgggagactt gagtgcagaa gaggacagtg gaactccatg ttagcggtg
721 aaatgcgtag atatatggaa gaacaccagt ggcgaaggcg gctgtctggt ctgcaactga
781 cgctgagggt cgaaagcatg ggtagcgaac aggattagat accctggtag tccatgccgt
841 aaacgatgat tactaagtgt tggaggggtt ccgcccttca gtgctgcagc taacgcatta
901 agtaatccgc ctggggagta cgaccgcaag gttgaaactc aaaagaattg acggggggccc
961 gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagctacgc gaagaacctt accaggtctt
1021 gacatcttct gacagtctaa gagattagag gttcccttcg gggacagaat gacaggtggt
1081 gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac
1141 ccttattact agttgccagc attaagtttg gcactctagt gagactgccg gtgacaaacc
1201 ggaggaaggt ggggacgacg tcaaatcatc atgcccctta tgacctgggc tacacacgtg
1261 ctacaatgga tggtaacaac agtcgcgaga ccgcgaggtt aagctaattc cttaaaacca
1321 ttctcagttc ggactgtagg ctgcaactcg cctacacgaa gtcggaatcg ctagtaatcg
1381 cggatcagca tgccgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca
1441 tgagagtttg

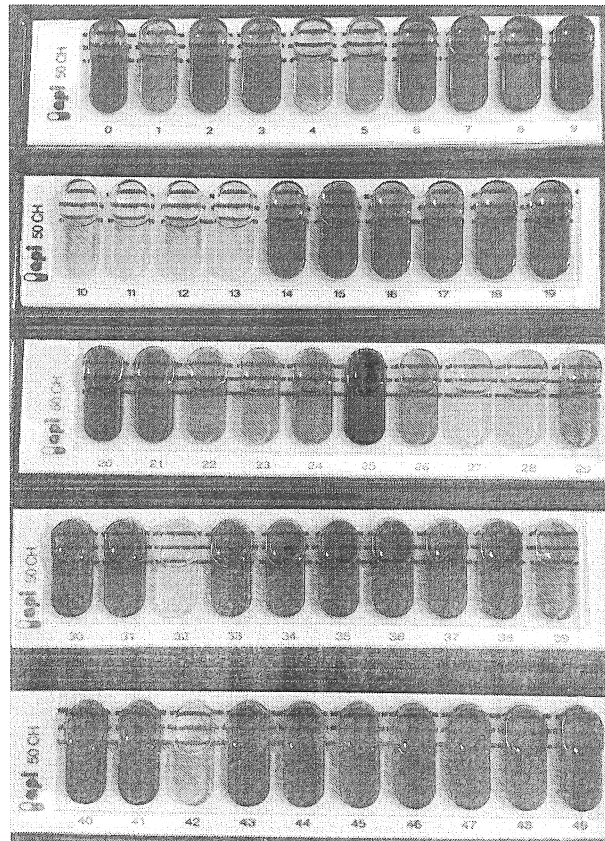
```



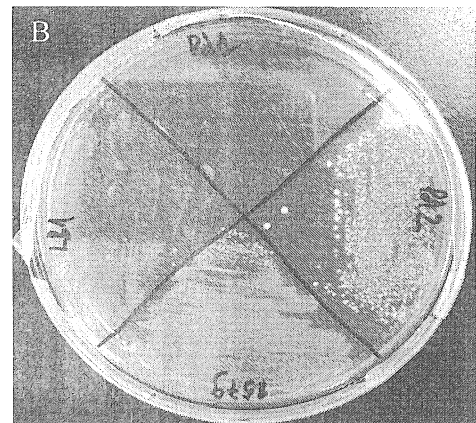
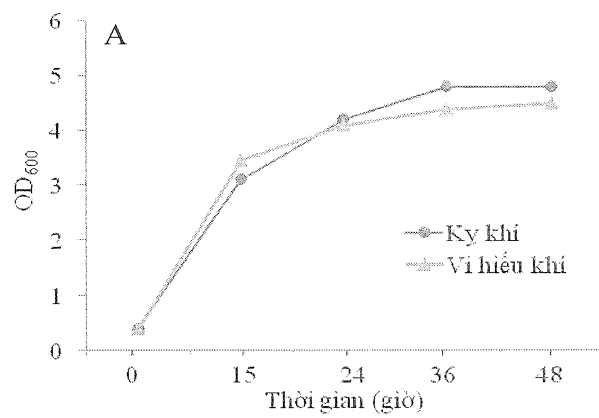
Hình 1



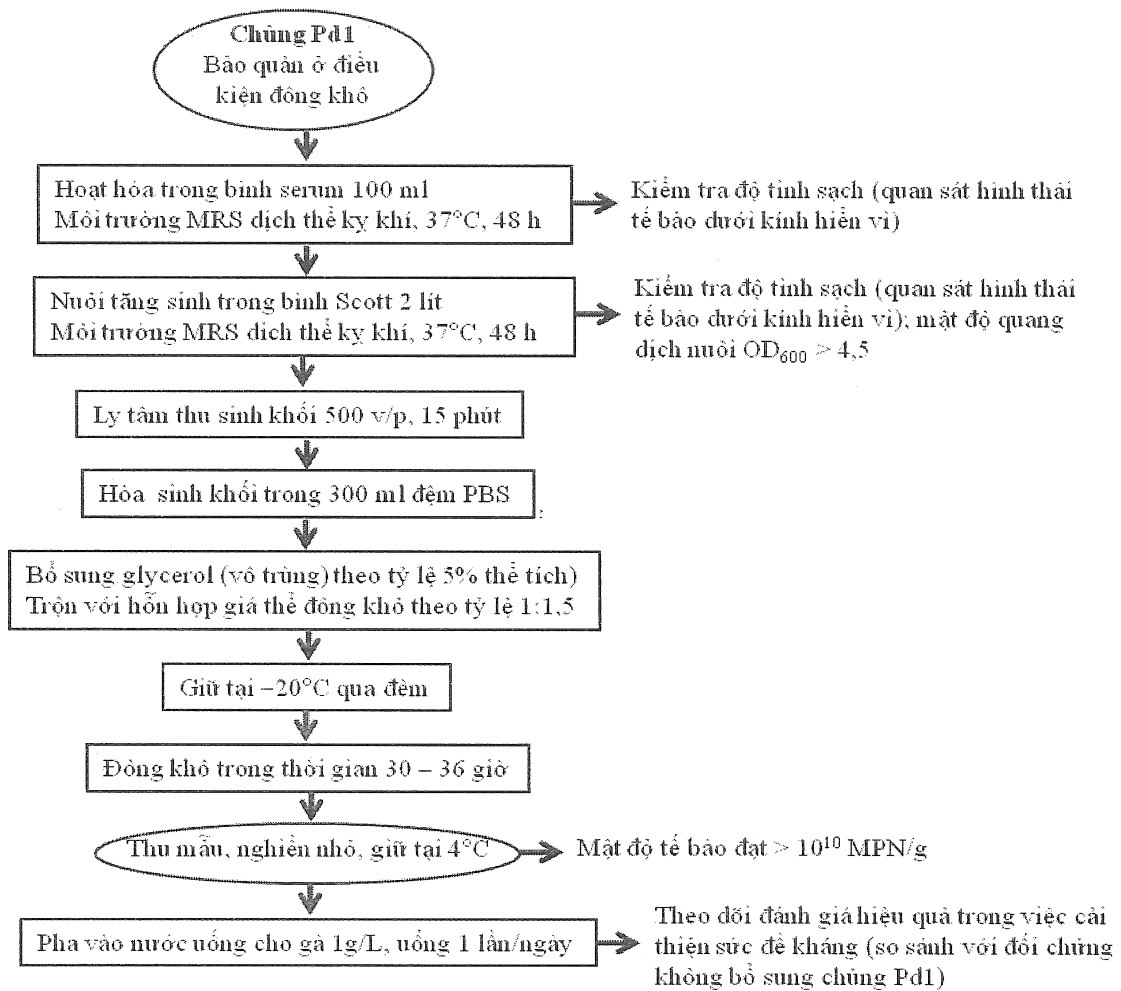
Hình 2



Hình 3



Hình 4



Hình 5