



(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)



2-0002765

(51) **A23K 10/10; A23K 10/16; A23K 10/12**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00343

(22) 23/10/2019

(67) 1-2019-05888

(45) 25/12/2021 405

(43) 30/01/2020 382A

(73) Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa Học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Hoàng Phương Hà (VN); Lê Thị Nhi Công (VN); Đồng Văn Quyền (VN); Cung Thị
Ngọc Mai (VN); Đỗ Thị Liên (VN).

(54) QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHẾ PHẨM SINH HỌC TỪ KHÔ ĐẬU NÀNH LÀM THỨC
ĂN NUÔI TÔM CÔNG NGHIỆP

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm sinh học từ khô đậu nành
làm thức ăn nuôi tôm công nghiệp.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực sinh học, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình sản xuất chế phẩm sinh học từ khô đậu nành làm thức ăn nuôi tôm công nghiệp.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Ngày nay do tình hình dân số phát triển ngày càng tăng và nhu cầu về hải sản của con người cũng tăng theo rất cao. Trong khi đó, nguồn hải sản tự nhiên chưa thể đáp ứng đủ nhu cầu thực tiễn của con người nên hoạt động nuôi trồng thủy sản là nguồn cung cấp chính cho con người. Chính vì vậy, nuôi trồng thủy sản đã trở thành một hoạt động kinh tế quan trọng của nhiều quốc gia và là một trong những lĩnh vực tăng trưởng phát triển nhanh nhất trên thế giới. Một trong những đối tượng của ngành thủy sản được quan tâm lớn đó là nuôi tôm thương phẩm. Sự phát triển nhanh chóng của công nghiệp nuôi tôm thủy sản tại các quốc gia nhiệt đới đã dẫn tới ảnh hưởng bất lợi tới môi trường. Thái Lan là một đất nước có nguồn tôm xuất khẩu ra thế giới gần như đứng đầu, trung bình hàng năm xuất khẩu khoảng 250 000 tấn. Đứng sau Thái Lan là một số nước châu Á như Ấn Độ, Myanmar, Campuchia, Việt Nam, Indonesia, Trung Quốc, Philippine và Malaysia (Shan H và Obbard, 2001). Mỗi nước đều có những chiến lược riêng để phát triển ngành nuôi tôm của mình. Các kết quả đã cho thấy, 80% sản lượng tôm xuất khẩu trên thị trường thế giới là của châu Á, để đáp ứng nhu cầu thực tiễn thì có tới 85% sản lượng tôm được nuôi thâm canh, đặc trưng nhất là nuôi với mật độ dày và siêu tải trọng thức ăn (Shan H và Obbard, 2001). Sự phát triển của ngành nuôi tôm đồng nghĩa với việc tăng trưởng kinh tế, giải quyết công ăn việc làm, v.v. nên các hộ nuôi trồng thủy sản đã gia tăng các ao nuôi và mật độ nuôi, hậu quả của quá trình nuôi như vậy đã dẫn đến ô nhiễm môi trường nuôi, tùy thuộc vào mật độ nuôi tôm trong suốt một chu trình nuôi sản xuất tôm mà tổng số các chất gây ô nhiễm như photpho, nitơ và hữu cơ là khác nhau. Một trong những nguyên nhân phát sinh dịch bệnh trong nuôi trồng thủy sản cũng là từ ô nhiễm môi trường nuôi, mặc dù dịch bệnh đã được kiểm soát bằng cách sử dụng các phương pháp khác nhau trong đó có sử dụng hóa chất tổng hợp và thuốc kháng sinh nhưng phương pháp này không

những làm tăng giá thành sản phẩm, tăng cường khả năng kháng thuốc ở vi sinh vật có hại, hủy hoại hệ sinh vật tự nhiên mà còn tác động tiêu cực cho động vật thủy sản do tích lũy dư lượng kháng sinh và gây hiện tượng kháng thuốc, làm ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng, và gây ô nhiễm môi trường. Do vậy, sử dụng các chế phẩm sinh học chứa các vi sinh vật có lợi kết hợp với các kỹ thuật nuôi tôm bằng phương pháp sinh học được ra đời, các vi sinh vật có lợi khi bổ sung vào thức ăn nuôi tôm làm tăng cường khả năng chuyển hóa thức ăn trong đường ruột của tôm, kháng lại các vi khuẩn gây bệnh, ngoài ra chúng còn có tác dụng để chuyển hóa các thành phần gây ô nhiễm môi trường, nên đã tạo được sản phẩm tôm sạch, an toàn và phát triển theo hướng bền vững. Vậy chế phẩm sinh học được xem là một phương pháp có nhiều ưu điểm vượt trội, hiệu quả lâu dài và an toàn sinh học.

Chế phẩm sinh học (hay còn gọi là probiotic) là các vi sinh vật sống có lợi cho cơ thể vật chủ (theo định nghĩa của FAO). Các vi sinh vật này có thể tồn tại trong đường ruột để thúc đẩy sự cân bằng của hệ vi sinh đường ruột và tăng cường chuyển hóa thức ăn cho vật chủ, chúng được sử dụng để sản xuất chế phẩm sinh học như một thực phẩm bảo vệ cơ thể.

Hiện nay việc sử dụng chế phẩm sinh học khá hiệu quả trong việc phòng và chữa bệnh cho người và động vật, để làm được điều đó vi sinh vật có trong chế phẩm sinh học phải có những đặc tính ưu việt như khả năng sống sót và phát triển tốt trong điều kiện bất lợi ở đường tiêu hóa như axit mật, pH thấp, kháng sinh, v.v. bên cạnh đó vi sinh vật probiotic còn có khả năng sản sinh nhiều hoạt chất kháng khuẩn như axit lactic, bacterioxin, H_2O_2 , diacetyl, v.v. tạo môi trường bất lợi, từ đó ức chế vi sinh vật gây bệnh phát triển, và thiết lập sự cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột, ngoài ra chúng còn có khả năng sản sinh nhiều enzym như amylaza, lipaza, proteaza, v.v. giúp thúc đẩy quá trình tiêu hóa dễ dàng hơn, khử các chất có khả năng gây ung thư và các hợp chất độc hại, kích thích điều hòa hệ miễn dịch, tăng khả năng đề kháng cho cơ thể chủ.

Vai trò và lợi thế của các vi sinh vật có lợi như vậy nhưng vẫn còn là một ẩn số đối với người nuôi trồng thủy sản. Một số chế phẩm sinh học được người nuôi trồng thủy sản sử dụng hiện nay gồm những vi sinh vật sống như các vi khuẩn thuộc giống *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, v.v. được trộn vào thức ăn; một số loại vi sinh vật khác có khả năng cải thiện chất lượng môi trường như vi khuẩn *Nitrosomonas*,

Nitrobacter, các vi sinh vật phân hủy hữu cơ, H₂S như vi khuẩn tía quang hợp, v.v.. Việc sử dụng chế phẩm sinh học với nhiều ưu thế vượt trội có thể thay thế hoàn toàn hoặc giảm thiểu tối đa việc sử dụng các loại hóa chất và kháng sinh giúp bảo vệ hệ sinh thái và tăng cường miễn dịch cho động vật thủy sinh. Trong nuôi trồng thủy sản, người dân đã sử dụng nhiều chế phẩm sinh học và có những phản hồi tốt nhưng hoạt tính của sản phẩm chưa ổn định nên thường xuyên phải thay đổi các chế phẩm sinh học, nếu sử dụng các chế phẩm ngoại nhập có thể có hiệu quả nhưng giá thành cao và đôi khi chưa đáp ứng với môi trường thủy sản ở Việt Nam do khác biệt về môi trường sống, một số chế phẩm rẻ tiền nhưng lại không rõ nguồn gốc có thể có hiệu quả ban đầu nhưng sau đó mất hoạt tính và mang tiềm ẩn của bệnh dẫn đến sau một thời gian ngắn, tôm bị nhiễm bệnh và chết hàng loạt. Ứng dụng các vi sinh vật có lợi phân lập tại địa bàn Việt Nam, bên cạnh các đặc tính là có bản chất probiotic trong giải pháp hữu ích này còn lợi dụng khả năng tạo màng sinh học của các vi sinh vật này kết hợp với nguồn cơ chất luôn có sẵn phù hợp về dinh dưỡng, giá thành và công nghệ lên men xộp sẽ tạo nên một sản phẩm sinh học đạt hiệu quả, an toàn và bền vững trong nuôi tôm thương phẩm và phù hợp với người nuôi trồng thủy sản của Việt Nam.

Quá trình lên men của vi sinh vật là quá trình mà trong đó các vi sinh vật có lợi được sinh trưởng bằng cách sử dụng các vật liệu như một cơ chất dinh dưỡng đồng thời lại như một giá thể bám dính. Trong quá trình lên men xộp, ngoài việc phải đảm bảo về độ ẩm không vượt quá hàm lượng bão hòa của cơ chất xộp thì kỹ thuật lên men xộp yêu cầu nuôi cấy đơn giản, enzym tạo ra từ quá trình lên men xộp ít nhạy cảm hơn với các chất kìm hãm hoặc ức chế trao đổi chất, thu hồi sản phẩm tốt hơn. Một ưu điểm khác mang tính lợi thế là các cơ chất sử dụng cho lên men xộp luôn có sẵn và rẻ, được thu thập từ các phụ phẩm nông nghiệp như: cám gạo, bã nho, khô dầu đậu nành, v.v. đặc biệt khi sử dụng những cơ chất này đã góp phần giải quyết các yếu tố gây ô nhiễm thứ cấp do lượng phụ phẩm này thải ra môi trường bên ngoài.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, theo đó giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm sinh học từ khô đậu nành làm thức ăn nuôi tôm công nghiệp, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) chuẩn bị môi trường MRS và nền mang bằng cách:

môi trường MRS được chuẩn bị bằng cách lấy các thành phần theo tỉ lệ: 10 g cao thịt, 5 g cao nấm men, 20 g glucoza, 2 g K_2HPO_4 , 2 g NH_4Cl , 5 g CH_3COONa , 0,2 g $MgSO_4$, 0,05 g $MnSO_4$, 5 g $C_6H_{17}N_3O_7$, 1 g Tween 80, 20 g thạch (agar), pH 6,5 hòa trong một lít nước cất, và

nền mang là khô đậu nành,

sau đó tiến hành khử trùng môi trường và nền mang này ở $121^\circ C$ trong thời gian 30 phút;

ii) hoạt hóa và nhân giống riêng rẽ các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST51, *Bacillus vallismortis* NA53 và *Lactobacillus acidophilus* ST bằng cách cấy các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST51, *Bacillus vallismortis* NA53 và *Lactobacillus acidophilus* ST trên đĩa thạch để hoạt hóa lại chủng vi khuẩn, sau đó cấy riêng rẽ các chủng vi khuẩn sau khi hoạt hóa vào bình chứa môi trường MRS để nhân giống cấp 1, nuôi lắc ở 120 vòng/phút trong thời gian 2 ngày ở nhiệt độ $35^\circ C \pm 2$, tiếp theo chuyển 1% canh trường nuôi giống cấp 1 vào bình chứa môi trường MRS mới rồi tiến hành nuôi như điều kiện của nhân giống cấp 1 để nhân giống cấp 2, và phối trộn ba chủng vi khuẩn sau khi nhân giống cấp 2 theo tỉ lệ 1:1:1 thu được dịch nuôi cấy;

iii) thu dịch sinh khối bằng cách ly tâm dịch nuôi cấy thu được ở bước ii) với tốc độ 5000 vòng/phút trong thời gian 10 phút để loại dịch và thu sinh khối, sau đó hòa lại sinh khối bằng môi trường MRS nêu trên sao cho mật độ tế bào trong dịch sinh khối thu được đạt 10^8 CFU/ml; và

iv) lên men thu chế phẩm bằng cách phối trộn dịch sinh khối với môi trường MRS và khô đậu nành theo tỉ lệ thể tích dịch sinh khối/thể tích môi trường MRS/khối lượng khô đậu nành là 1/4/20, lên men xộp trong thời gian 2 ngày ở nhiệt độ $35^\circ C \pm 2$, sau đó sấy ở nhiệt độ $40^\circ C$ đến độ ẩm 15% -20% thu chế phẩm.

Theo một khía cạnh khác, giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm sinh học thu được từ quy trình nêu trên. Chế phẩm sinh học này được đặt tên là P.ebt.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ kèm theo

Fig. 1 là sơ đồ khối quy trình sản xuất chế phẩm sinh học từ khô đậu nành làm thức ăn nuôi tôm công nghiệp.

Fig. 2 là sơ đồ vị trí phân loại của 3 chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST51, *Bacillus vallismortis* NA53 và *Lactobacillus acidophilus* ST.

Fig. 3 là các ảnh chụp chủng vi khuẩn mặt trong chế phẩm sinh học với đặc điểm hình thái khuẩn lạc và khả năng tạo màng sinh học của chúng.

Fig. 4 là sơ đồ nhân giống chủng vi khuẩn thu sinh khối.

Fig. 5 là ảnh chụp khả năng sinh các enzym phân giải tinh bột, casein và xenluloza của chế phẩm sinh học.

Fig. 6 là ảnh chụp khả năng kháng lại vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* của chế phẩm sinh học.

Fig. 7 là hình ảnh biểu hiện của tôm ở ngày nuôi thứ 35-45 trước và sau khi cho ăn chế phẩm sinh học.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả với những ví dụ và các phương án thực hiện cụ thể. Tuy nhiên, các ví dụ và các phương án thực hiện này chỉ nhằm mô tả làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Khô đậu nành được hình thành sau khi ép lấy dầu từ đậu nành. Khô đậu nành thường được dùng làm thức ăn cho động vật (gia cầm, gia súc) vì chúng cung cấp nguồn protein lớn. Hàm lượng protein thô trong khô đậu nành chiếm tới 48%, chất béo 1-2%; chất xơ 2,5 - 4,5%. Khô đậu nành rất giàu protein thực vật nên thường được sử dụng làm nguồn thức ăn cho gia cầm, gia súc. Tuy nhiên, trong khô đậu nành lại chứa một số chất ức chế tiêu hóa như oligosacarit (Švejstl et al., 2015) và chất ức chế dinh dưỡng như trypsin, và một vài chất khác như saponin, glucinin, goitrogen, lectin, v.v. (Liener, 1994). Mặc dù các chất này chỉ chứa hàm lượng nhỏ nhưng cũng đã gây ảnh hưởng đến quá trình chuyển hóa thức ăn trong ruột của động vật nuôi, làm chậm quá trình hấp thu một số chất dinh dưỡng vào máu. Chất ức chế trypsin gắn vào enzym trypsin và chymotrypsin làm suy yếu chức năng chuyển hóa protein, gây hiện tượng khó tiêu, trướng bụng và tiêu chảy đối với một số động vật (Song et al., 2010).

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh các chất ức chế tiêu hóa và ức chế dinh dưỡng trong khô đậu nành này sẽ được phân hủy nhờ quá trình lên men của một số loài vi

sinh vật có lợi, nên làm tăng chất dinh dưỡng để hấp thu đối với động vật như tăng hàm lượng axit amin trong protein thô, làm suy giảm các chất gây dị ứng nhờ enzym proteaza của vi khuẩn (Song et al., 2010, Yuan et al., 2013).

Chế phẩm sinh học được lên men từ khô đậu nành để bổ sung vào thức ăn nuôi tôm nước lợ là chế phẩm chứa hỗn hợp các chủng vi khuẩn có lợi là *Bacillus subtilis* ST51, *Bacillus vallismortis* NA53 và *Lactobacillus acidophilus* ST. Khi bổ sung chế phẩm này vào thức ăn nuôi tôm công nghiệp, các vi khuẩn này làm tăng quá trình chuyển hóa thức ăn, kích thích tôm nuôi tăng trưởng nhanh, tăng cường hệ miễn dịch của tôm đồng thời kháng lại vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* chuyên gây bệnh trên tôm, kết quả tạo sản phẩm tôm sạch, an toàn và không sử dụng kháng sinh.

Theo một khía cạnh, giải pháp hữu ích đề xuất quy trình sản xuất chế phẩm sinh học từ khô đậu nành làm thức ăn nuôi tôm công nghiệp, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) Chuẩn bị môi trường MRS và nền mang:

Môi trường MRS được chuẩn bị bao gồm 10 g cao thịt, 5 g cao nấm men, 20 g glucoza, 2 g K_2HPO_4 , 2 g NH_4Cl , 5 g CH_3COONa , 0,2 g $MgSO_4$, 0,05 g $MnSO_4$, 5 g $C_6H_{17}N_3O_7$, 1 g Tween 80, 20 g thạch (agar), pH 6,5 hòa trong một lít nước cất. Nền nang là khô đậu nành.

Tiến hành khử trùng môi trường MRS và nền mang ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 30 phút.

ii) Hoạt hóa và nhân giống các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST51, *Bacillus vallismortis* NA53 và *Lactobacillus acidophilus* ST

Các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST51, *Bacillus vallismortis* NA53 và *Lactobacillus acidophilus* ST được phân lập từ ruột tôm tại một số đầm nuôi tôm tại sóc Trăng, Nghệ An, các chủng vi khuẩn này đã được xác định vị trí phân loại bằng gen 16S DNAr với cặp mồi 27f và 1527r với trình tự 5' - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3'; 5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC- 3'. Các chủng vi khuẩn này đã được đăng ký trên GenBank (Ngân hàng gen) có mã số lần lượt là LC506466, LC506467, LC500340. Các chủng vi khuẩn được cấy rìa trên đĩa thạch để hoạt hóa lại từng chủng - hình thái các chủng này được thể hiện trong Fig. 3. Với mỗi chủng vi khuẩn: dùng que cấy lấy một số khuẩn lạc riêng rẽ cấy vào bình tam giác

chứa môi trường MRS để nhân giống cấp 1, nuôi lắc ở 120 vòng/phút trong thời gian 2 ngày ở nhiệt độ $35^{\circ}\text{C} \pm 2$. Sau đó, chuyển 1% canh trường nuôi giống cấp 1 vào bình tam giác chứa môi trường mới thích hợp và tiến hành nuôi như điều kiện của nhân giống cấp 1 để nhân giống cấp 2. Sau đó, phối trộn ba chủng vi khuẩn sau khi nhân giống cấp 2 theo tỉ lệ 1:1:1 thu dịch nuôi cấy. Kiểm tra mật độ tế bào trong dịch nuôi cấy bằng cách đo dịch huyền phù tế bào ở bước sóng 600 nm và phương pháp đếm tế bào.

Phương pháp xác định mật độ tế bào: trước tiên là pha loãng mẫu, lấy 1 ml dịch nuôi cấy cho vào 9 ml nước muối sinh lý, lúc này nồng độ pha loãng là 10^{-2} . Sau đó, dùng pipet hút 1 ml mẫu từ độ pha loãng 10^{-2} cho vào ống nghiệm chứa 9 ml nước muối sinh lý 0,85%, khi đó nồng độ pha loãng là 10^{-3} , hút tiếp 1 ml từ ống nghiệm 10^{-3} cho vào ống nghiệm chứa 9 ml nước muối sinh lý 0,85% được độ pha loãng 10^{-5} , tiếp tục như vậy đến nồng độ tới hạn. Mỗi một nồng độ tới hạn được cấy gặt trên môi trường thạch tương ứng, sau 5 ngày đếm số khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch và xác định số lượng tế bào trong 1 ml sinh khối hoặc trong 1 g chất rắn theo công thức: N (CFU/g hay CFU/ml) = $\frac{\sum C}{(n_1v_1 + \dots + n_iv_i)}$

Trong đó:

N: số tế bào vi khuẩn trong 1 g hay 1ml mẫu

C: tổng số khuẩn lạc đếm được trên các hộp petri đã chọn

n_1, n_i : số hộp petri cấy tại độ pha loãng thứ 1 và thứ i

d_i : hệ số pha loãng tương ứng

v : thể tích dịch mẫu (ml) cấy vào trong đĩa petri

iii) Thu dịch sinh khối

Dịch nuôi cấy thu ở bước ii) được ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong thời gian 10 phút để loại dịch và thu sinh khối, sau đó hòa lại sinh khối bằng môi trường MRS nêu trên sao cho độ đục của dịch sinh khối có $\text{OD}_{600} = 1,8$ tương đương với mật độ tế bào là 10^8CFU/ml

iv) Lên men thu chế phẩm

Phối trộn dịch sinh khối với môi trường MRS và khô đậu nành theo tỉ lệ thể tích dịch sinh khối/thể tích môi trường MRS/khối lượng khô đậu nành là 1/4/20, chuyển

hỗn hợp đã được phối trộn này sang các khay inox, ví dụ có kích thước (40 x 30 x 5)cm và đặt vào tủ lên men, ví dụ có dung tích (5x1x1,5)m, bắt đầu lên men xộp ở nhiệt độ $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ trong thời gian 2 ngày, sau đó sấy trong tủ sấy ở nhiệt độ 40°C đến độ ẩm 15% -20% thu chế phẩm.

Chế phẩm tạo thành được kiểm tra mật độ tế bào và hoạt tính sinh các enzym tiêu hóa như enzym proteaza, xenluloza, α -amylaza và hoạt tính kháng lại vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm trước khi đóng gói trong bao bì. Bao bì sử dụng để đóng gói chế phẩm là bao nhựa hoặc bao thiếc, chế phẩm sinh học được sử dụng để bổ sung vào thức ăn nuôi tôm thương phẩm. Thời gian bảo quản chế phẩm sinh học là 6 tháng.

Kiểm tra hoạt tính sinh enzym bằng cách định tính enzym α -amylaza, enzym xenluloza và enzym proteaza theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (Lê Thanh Mai et al., 2005).

* Xác định enzym xenluloza và α -amylaza: môi trường nuôi vi khuẩn có bổ sung đệm natri phosphat (pH = 7) 0,1M; thạch (agar) 1%; hoặc tinh bột 1% (đối với enzym α -amylaza); hoặc CMC 1% (đối với enzym xenluloza).

Tiến hành: đĩa thạch chứa môi trường có bổ sung các loại cơ chất khác nhau tương ứng các enzym, sau khi đục lỗ thạch tiến hành tra mẫu, trong đó giếng chứa enzym chuẩn được coi là đối chứng dương, dung dịch môi trường là đối chứng âm, các giếng còn lại là dịch vi khuẩn nghiên cứu. Mỗi giếng được bổ sung 100 μl . Sau 16 giờ nuôi tĩnh ở nhiệt độ phòng (25°C) đổ dung dịch thuốc thử lugol sao cho ngập kín mặt đĩa thạch. Sau 1 giờ, rửa lại mẫu bằng nước cất rồi quan sát enzym α -amylaza hoặc enzym xenluloza sẽ phân giải cơ chất tạo nên các vòng sáng màu trên nền thạch chứa cơ chất bắt màu xanh. Đường kính (D-d = mm) của vòng phân giải thể hiện hoạt độ của enzym.

* Xác định enzym proteaza: Đĩa thạch chứa môi trường bổ sung cơ chất casein 0,1% pha trong đệm photphat Sorensen 0,1M pH 7,6 hoặc đệm Britton 0,04M, chứa chất diệt khuẩn (NaN_3 0,02%).

Tiến hành như xác định enzym xenluloza và amylaza rồi để ở nhiệt độ (30 - 40°C) trong 24 giờ. Sau đó, ngừng phản ứng enzym và nhuộm màu thạch bằng dung dịch

amido đen 10B 0,1% pha trong dung dịch metanol, axit axetic và nước cất theo tỷ lệ 3:1:6, hoặc trong axit axetic 7%. Các enzym phân giải protein (nếu có) sẽ phân giải cơ chất tạo nên các vòng sáng màu trên nền thạch chứa cơ chất bắt màu xanh nâu. Đường kính ($D-d = cm$) của vòng phân giải thể hiện hoạt độ của enzym.

Chế phẩm sinh học theo giải pháp hữu ích để bổ sung vào thức ăn nuôi tôm thương phẩm nói riêng hay có thể bổ sung vào thức ăn cho động vật thủy sản khác như các loại cá thu được từ quy trình sản xuất nêu trên. Khi bổ sung chế phẩm sinh học cùng với thức ăn theo tỷ lệ phù hợp theo từng giai đoạn nuôi tôm sẽ kích thích sinh trưởng của tôm nuôi do chế phẩm có chứa các vi khuẩn sinh enzym tiêu hóa như proteaza, amylaza, xenluloza. Do vậy khi tôm ăn thức ăn có chứa chế phẩm sinh học sẽ thấy ruột tôm thẳng hơn đồng nghĩa tôm khỏe. Ngoài ra trong chế phẩm sinh học này các vi khuẩn còn sinh ra hoạt chất sinh học bacterioxin kháng lại vi khuẩn gây bệnh trên tôm nên suốt quá trình nuôi tôm công nghiệp không cần phải sử dụng đến kháng sinh và các hóa chất độc hại để loại đi các mầm bệnh phát sinh hay tiềm ẩn, tạo một sản phẩm tôm sạch và an toàn.

Chế phẩm sinh học được dùng với lượng 3 - 5g/1kg thức ăn, cho ăn liên tục từ lúc thả tôm đến khi thu hoạch, nếu ao nuôi có biểu hiện bị nhiễm bệnh thì bổ sung chế phẩm sinh học với liều lượng tăng gấp đôi

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Sản xuất 10 kg chế phẩm sinh học

Các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST51, *Bacillus vallismortis* NA53 và *Lactobacillus acidophilus* ST được cấy ria trên đĩa thạch để hoạt hóa lại chủng, dùng que cấy lấy một số khuẩn lạc riêng rẽ cấy vào bình tam giác chứa 10 ml môi trường MRS, mỗi chủng vi khuẩn sẽ được cấy riêng biệt, nuôi lắc ở 120 vòng/phút trong thời gian 2 ngày ở nhiệt độ $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ (nhân giống cấp 1). Chuyển 1% canh trường nuôi giống cấp 1 vào bình tam giác 500 ml chứa 250 ml môi trường MRS và tiến hành nuôi như điều kiện của nhân giống cấp 1, mỗi chủng vi khuẩn nhân nuôi được 250ml (nhân giống cấp 2). Như vậy, mỗi chủng vi khuẩn sẽ có 250 ml sinh khối, tổng số lượng sinh khối của cả 3 chủng là 750 ml (xem Fig. 4). Sinh khối này sẽ được ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong thời gian 10 phút để loại bỏ dịch, sau đó được hòa lại với 750 ml môi trường MRS mới sao cho mật độ tế bào lúc này vẫn đảm bảo 10^8CFU/ml và thu

dịch sinh khối này. Phối trộn 0,5 lit dịch sinh khối (có mật độ tế bào 10^8 CFU/ml tương đương với $OD_{600} = 4,5$) với 2 lit môi trường MRS và 10 kg khô đậu nành, trộn đều với nhau, chuyển sang các khay inox rồi tiến hành lên men ở nhiệt độ $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ trong thời gian 2 ngày, sau đó sấy trong tủ sấy ở nhiệt độ 40°C đến độ ẩm 15% -20% thu được 10 kg chế phẩm sinh học.

Ví dụ 2: Xác định khả năng sinh enzyme tiêu hóa (protease, α -amylaza, xenluloza) của chế phẩm sinh học thu được từ Ví dụ 1.

Chế phẩm sinh học này làm tăng cường chuyển hóa thức ăn của tôm nuôi nên nó phải chứa các enzyme như proteaza, α -amylaza và xenluloza.

Bảng 1. Kích thước vòng enzyme của chế phẩm sinh học sau 48 giờ lên men

Enzym	α -amylaza D – d (mm)	Protease D – d (mm)	Xenluloza D – d (mm)
Chế phẩm sinh học	26	26	22
dịch môi trường (ĐC âm)	0	0	0
Enzym (ĐC dương)	19	20	20

Kết quả đã thể hiện nhóm vi khuẩn có lợi có mặt trong chế phẩm vẫn giữ khả năng sinh enzyme tiêu hóa như α -amylaza, xenluloza và proteaza sau 48 giờ lên men, bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch, vòng enzyme α -amylaza phân giải tinh bột của chế phẩm là 26 mm, enzyme proteaza phân giải casein là 26 mm và enzyme xenluloza phân giải CMC là 22 mm. Các enzyme này còn cao hơn enzyme đối chứng dương là 19 mm và 20 mm (Bảng 1) (Fig. 5). Như vậy chế phẩm tạo thành vẫn giữ nguyên hoạt tính sinh enzyme tiêu hóa của các vi khuẩn có mặt trong chế phẩm, đây là tính chất cực kỳ quan trọng đối với một chế phẩm sử dụng bổ sung vào thức ăn thông qua con đường ăn uống của tôm nuôi, kích thích tăng trưởng của tôm nuôi thương phẩm.

Ví dụ 3: Xác định khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh *Vibrio parahaemolyticus* thường xảy ra trên tôm của chế phẩm sinh học thu được từ Ví dụ 1.

Vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* thường gây một số bệnh nguy hiểm cho tôm như bệnh đốm trắng, bệnh còi tôm, bệnh gan tụy cấp, v.v. khi tôm nhiễm bệnh nếu sức đề kháng không tốt sẽ gây tình trạng tôm chết hàng loạt. Do vậy, việc sử dụng chế phẩm sinh học loại ngay mầm bệnh phát sinh sẽ dẫn đến thay thế hoàn toàn kháng sinh.

Để xác định khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh này, tiến hành pha loãng chế phẩm nghiên cứu đến nồng độ từ 10^6 - 10^8 theo phương pháp pha loãng tới hạn rồi trang trên đĩa thạch chứa môi trường MRS, sau đó nhỏ 100 μ l dịch chế phẩm sinh học vào lỗ thạch rồi ủ ở nhiệt độ $35^\circ\text{C} \pm 2$ trong thời gian 1 ngày ở điều kiện hiếu khí. Kiểm tra hoạt tính ức chế sinh trưởng của vi khuẩn gây bệnh thông qua vòng tròn sáng xung quanh lỗ thạch (xem Fig. 5)

Vòng sáng của chế phẩm sinh học xung quanh lỗ thạch đã thể hiện khả năng kháng lại vi khuẩn gây bệnh *Vibrio parahaemolyticus*, điều này đã được so sánh với lỗ thạch đối chứng (ĐC) trên đĩa thạch khi chỉ nhỏ dịch môi trường nuôi cấy vào.

Ví dụ 4: Đánh giá hình thái tôm nuôi khi sử dụng chế phẩm sinh học.

Chế phẩm sinh học được hình thành với sự tham gia của nhóm vi khuẩn có lợi thuộc chi *Bacillus* và *Lactobacillus* được lên men xộp trên nền cơ chất là khô đậu nành, chế phẩm với hàm lượng dinh dưỡng cao lại dễ được chuyển hóa bởi nhóm vi khuẩn có lợi này do chúng hình thành các enzym tiêu hóa. Chế phẩm này được bổ sung vào thức ăn theo tỷ lệ 3 -5g/1kg thức ăn, cho ăn liên tục từ lúc thả tôm đến khi thu hoạch. Trong quá trình nuôi tôm thấy biểu hiện của tôm nuôi khỏe và phát triển tốt sau bổ sung chế phẩm biểu hiện là ruột tôm thẳng. Khi bóc lớp vỏ đầu tôm để kiểm tra gan tụy, quan sát thấy các khối gan tụy liên kết chắc chắn, có độ đàn hồi tốt, lớp màng bao bọc khối gan tụy chắc chắn màu sắc của gan tụy tương đồng với màu thức ăn, đường ruột đồng đều, không đứt quãng, màu sắc phân tôm đồng màu với màu sắc thức ăn trong đường ruột và dạ dày (xem Fig. 7)

Tôm nuôi ở ngày thứ 45, sau khi sử dụng sản phẩm trong 10 ngày kết quả gan tụy của tôm đã phát triển tốt, sức ăn của tôm tăng lên từ 30kg ban đầu lên 40kg thức ăn/ngày, trước đây khi chưa bổ sung chế phẩm sinh học thì ở ngày nuôi thứ 28 đã có tôm chết, gan tụy của tôm kém và rất xấu, lượng thức ăn tôm ăn rất ít. Hình ảnh cũng

thể hiện rõ khi chưa bổ sung chế phẩm sinh học thì ruột tôm ở đoạn sau bị đứt gãy nhưng sau khi ăn thức ăn có bổ sung chế phẩm sinh học thì ruột tôm liền và thẳng.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Chế phẩm sinh học theo giải pháp hữu ích thu được từ quy trình sản xuất chế phẩm theo giải pháp hữu ích là một chế phẩm an toàn sinh học, có hiệu quả cao trong việc làm tăng khả năng chuyển hóa thức ăn và giảm nguy cơ mắc bệnh gan tụy cấp thường gặp ở tôm nuôi thương phẩm, chế phẩm được bổ sung trực tiếp vào đường ăn uống của tôm cùng với thức ăn đã rất hữu hiệu trong việc phát triển của tôm mà không cần phải dùng kháng sinh để giảm thiểu vi khuẩn gây bệnh, góp phần tạo nên một sản phẩm tôm sạch, an toàn trong ngành nuôi trồng thủy sản của nước ta.

Quy trình theo giải pháp hữu ích đơn giản, dễ thực hiện và phù hợp với các điều kiện thực tế, chế phẩm sinh học này có thể ứng dụng đối với các loại động vật nước lợ khác như cá, động vật hai mảnh vỏ hoặc bổ sung vào thức ăn cho gia cầm, gia súc.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học từ khô đậu nành làm thức ăn nuôi tôm công nghiệp, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

i) chuẩn bị môi trường MRS và nền mang bằng cách:

môi trường MRS được chuẩn bị bằng cách lấy các thành phần theo tỉ lệ: 10 g cao thịt, 5 g cao nấm men, 20 g glucoza, 2 g K_2HPO_4 , 2 g NH_4Cl , 5 g CH_3COONa , 0,2 g $MgSO_4$, 0,05 g $MnSO_4$, 5 g $C_6H_{17}N_3O_7$, 1 g Tween 80, 20 g thạch (agar), pH 6,5 hòa trong một lít nước cất, và

nền mang là khô đậu nành,

sau đó tiến hành khử trùng môi trường và nền mang này ở $121^\circ C$ trong thời gian 30 phút;

ii) hoạt hóa và nhân giống riêng rẽ các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST51, *Bacillus vallismortis* NA53 và *Lactobacillus acidophilus* ST bằng cách cấy riêng rẽ các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* ST51, *Bacillus vallismortis* NA53 và *Lactobacillus acidophilus* ST trên đĩa thạch để hoạt hóa lại các chủng vi khuẩn, sau đó cấy riêng rẽ các chủng vi khuẩn sau khi hoạt hóa vào bình chứa môi trường MRS để nhân giống cấp 1, nuôi lắc ở 120 vòng/phút trong thời gian 2 ngày ở nhiệt độ $35^\circ C \pm 2$, tiếp theo chuyển 1% canh trường nuôi giống cấp 1 vào bình chứa môi trường MRS mới rồi tiến hành nuôi như điều kiện của nhân giống cấp 1 để nhân giống cấp 2, và phối trộn ba chủng vi khuẩn sau khi nhân giống cấp 2 theo tỉ lệ 1:1:1 thu được dịch nuôi cấy;

iii) thu dịch sinh khối bằng cách ly tâm dịch nuôi cấy thu được ở bước ii) với tốc độ 5000 vòng/phút trong thời gian 10 phút để loại dịch và thu sinh khối, sau đó hòa lại sinh khối bằng môi trường MRS nêu trên sao cho mật độ tế bào trong dịch sinh khối thu được đạt $10^8 CFU/ml$; và

iv) lên men thu chế phẩm bằng cách phối trộn dịch sinh khối với môi trường MRS và khô đậu nành theo tỉ lệ thể tích dịch sinh khối/thể tích môi trường MRS/khối lượng khô đậu nành là 1/4/20, lên men xộp trong thời gian 2 ngày ở nhiệt độ $35^\circ C \pm 2$, sau đó sấy ở nhiệt độ $40^\circ C$ đến độ ẩm 15% -20% thu chế phẩm.

Fig. 1

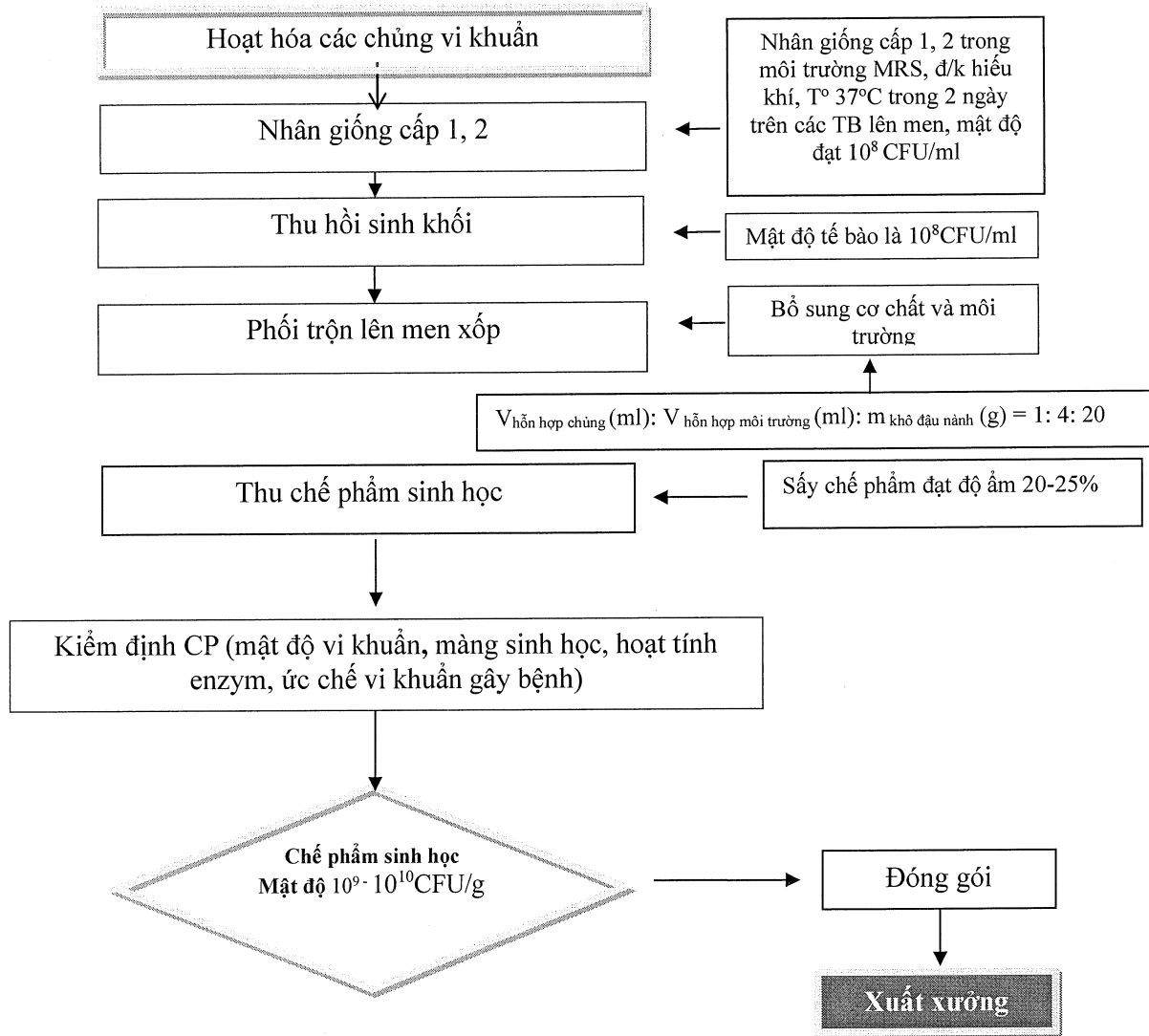
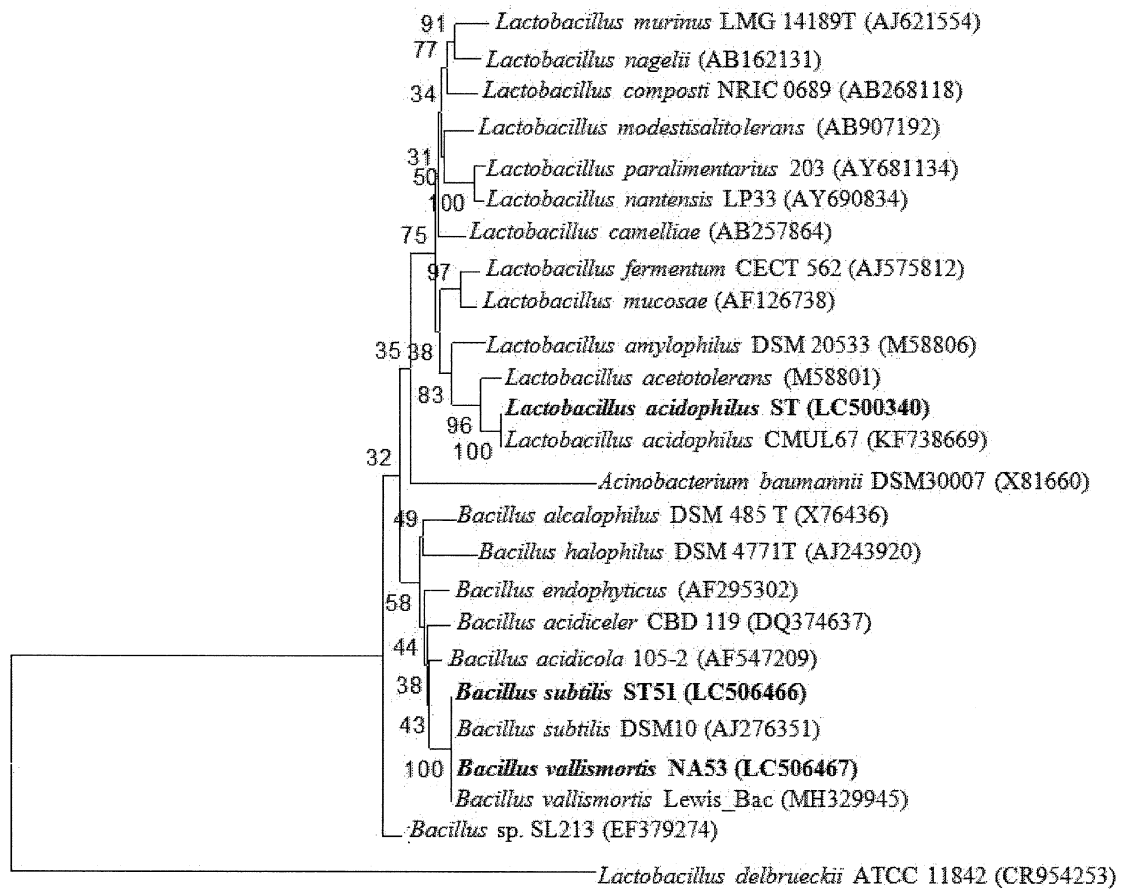


Fig. 2



0.1

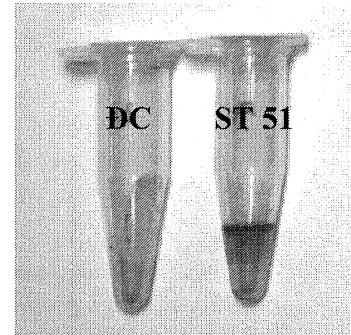
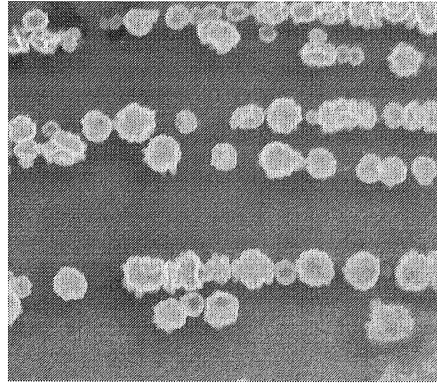
Fig. 3

**Chủng vi
khuẩn**

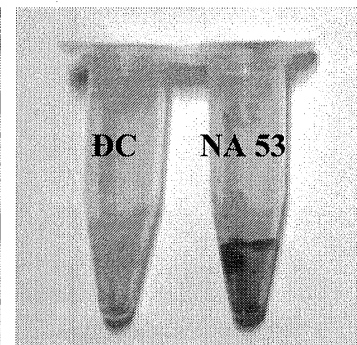
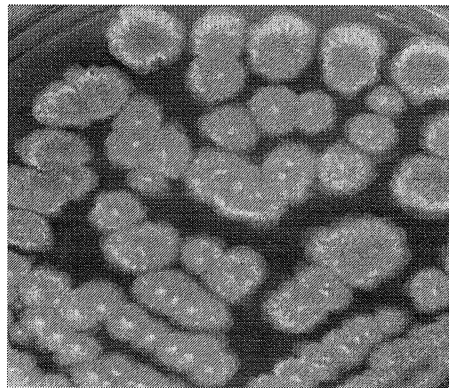
**Đặc điểm hình thái khuẩn lạc
vi khuẩn**

Khả năng tạo màng sinh học

ST 51



NA 53



ST

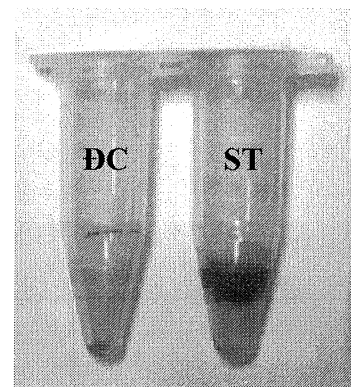
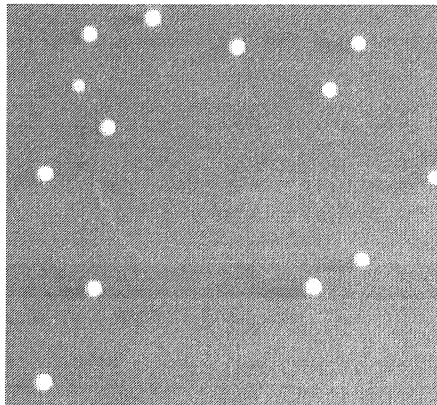


Fig. 4

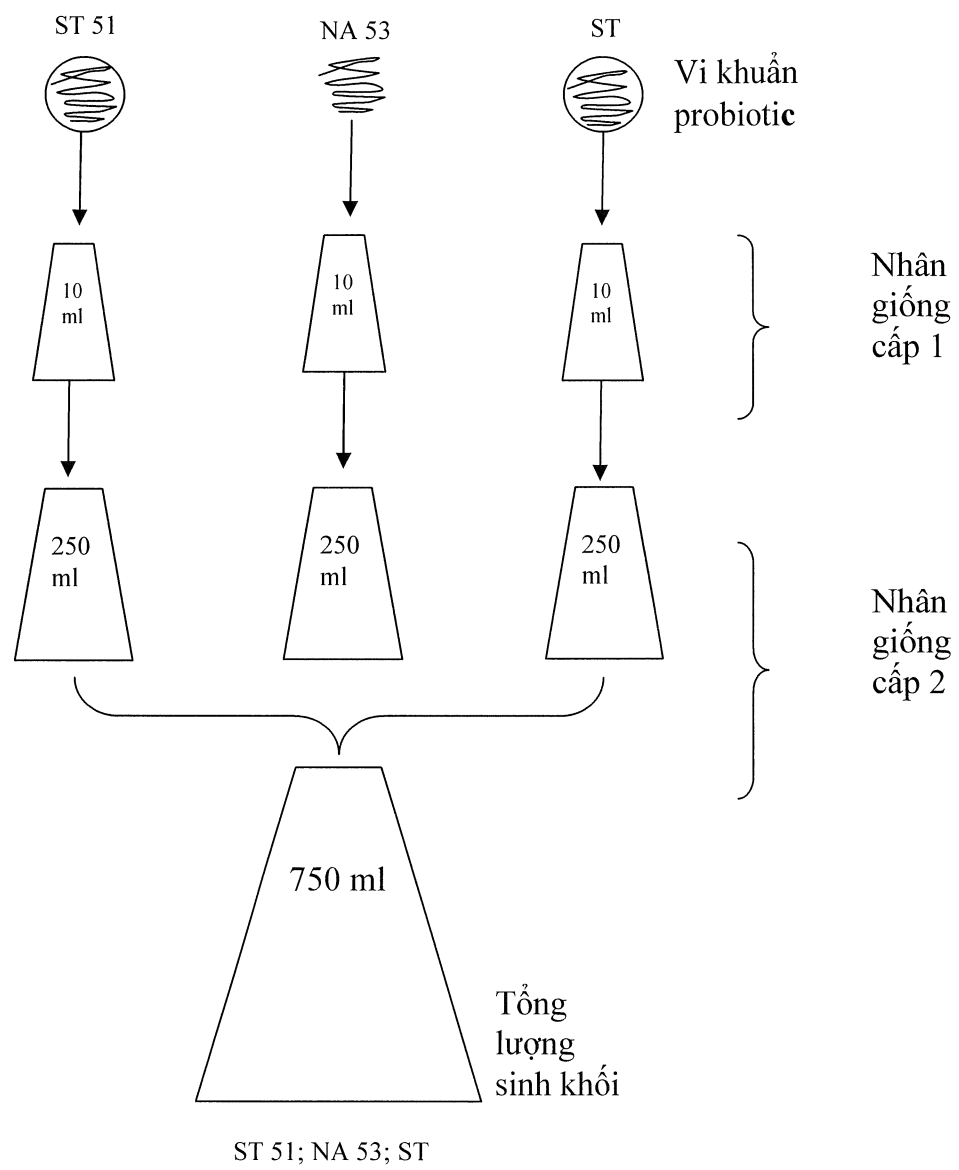


Fig. 5

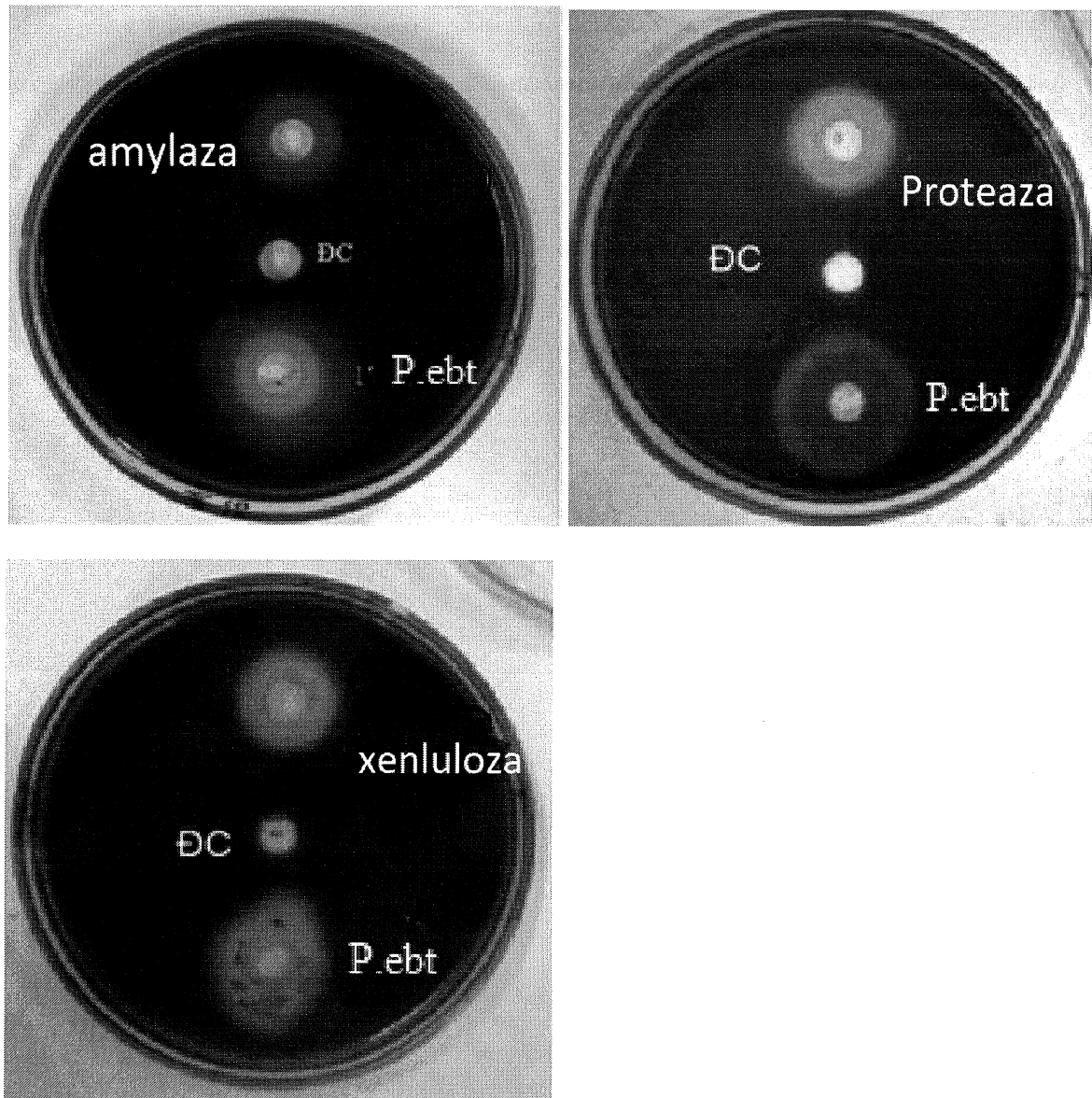


Fig. 6

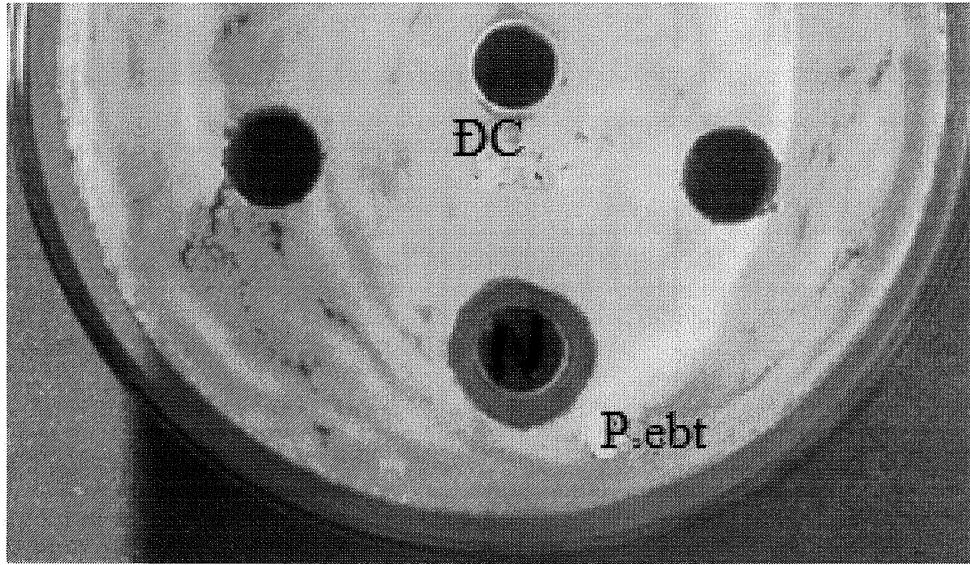
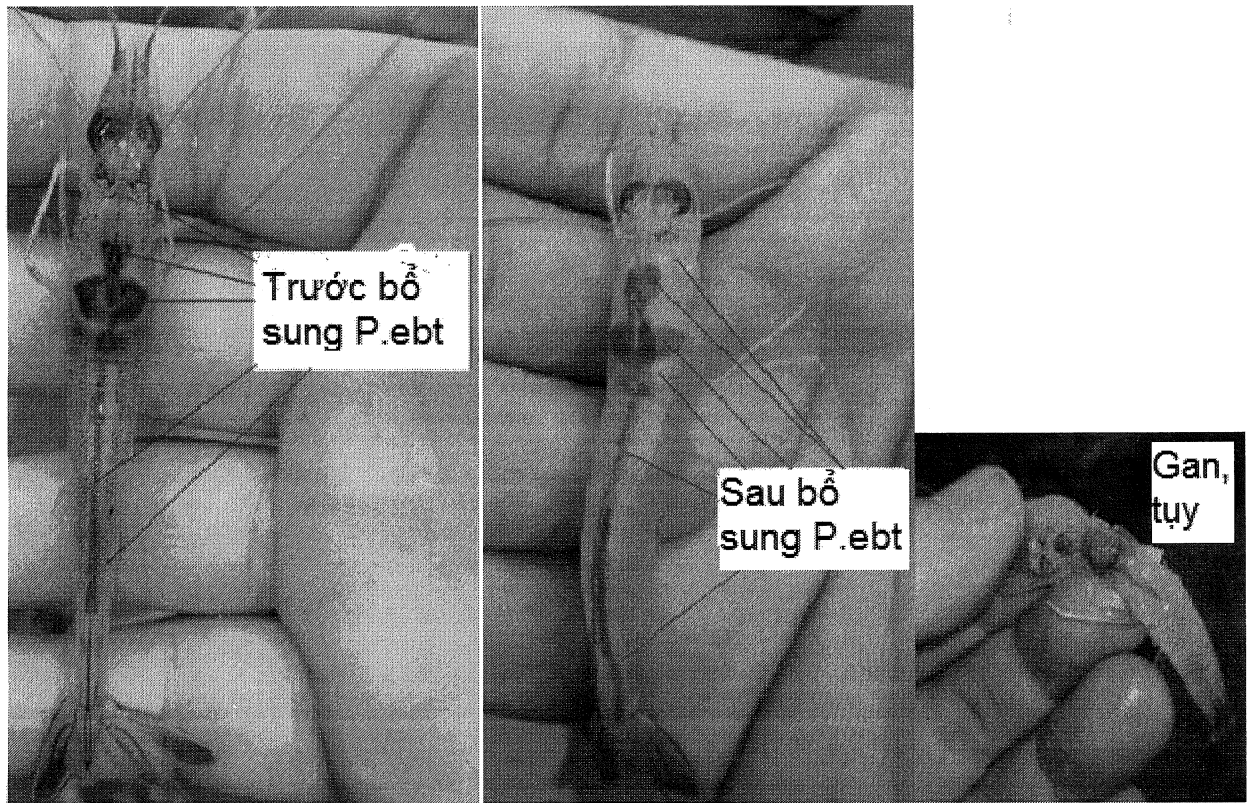


Fig.7



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học
 <120> Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học từ khô đậu
 nành làm thức ăn nuôi tôm công nghiệp
 <130>
 <160> 12
 <170>
 <210> 1
 <211> 1500
 <212> ADN
 <213> *Bacillus subtilis* ST51
 <220>
 <223>
 <220>
 <400> 1500

CTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAG
 CTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAA
 GACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGG
 TTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGC
 TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA
 TCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
 TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTC
 GGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCT
 TGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
 TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTA
 AGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTT
 GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG
 AGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAG
 CGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCT
 AAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCT
 GGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGG
 TGGAGCATGTGGTTTTAATTCAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCT
 CTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCGAGAGTGACAGGTGGTGCATGG
 TTGTTCGTGAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTT
 GATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGG
 AGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG
 CTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTAAAGCCAATCCCACAAATC
 TGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTA
 ATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCCGTC
 ACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCG
 CCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTACAAGGGAC

<110> Viện Công nghệ sinh học

<120> Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học P.ebt từ khô dầu đậu nành làm thức ăn nuôi tôm công nghiệp và chế phẩm thu được từ qui trình này

<130>

<160> 12

<170>

<210> 1

<211> 1500

<212> ADN

<213> *Bacillus vallismortis* NA53

<220>

<223>

<220>

<400> 1500

ATGGCTGCTATAATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGG
CGGACGGGTGA
GTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAAT
ACCGGATGGTTG
TTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACC
CGCGGCGCATTA
GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT
GATCGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAA
TGGACGAAAGTC
TGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTA
GGGAAGAACAAG
TACCGTTCTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCA
GGCGGTTTCTTA
AGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTT
GAGTGCAGAAGA
GGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGT
GGCGAAGGCGAC
TCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGC
TAACGCATTAAG
CACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCC
GCACAAGCGGTG
GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCT
GACAATCCTAGA
GATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATG

TTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGG
GCACTCTAAGGT
GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTA
TGACCTGGGCTA
CACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCC
CACAAATCTGTT
CTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG
CGGATCAGCATG
CCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTG
TAACACCCGAAG
TCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGTGATGA

<110> Viện Công nghệ sinh học
 <120> Quy trình sản xuất chế phẩm sinh học từ khô đậu
 nành làm thức ăn nuôi tôm công nghiệp
 <130>
 <160> 12
 <170>
 <210> 1
 <211> 1500
 <212> ADN
 <213> *Lactobacillus acidophilus* ST
 <220>
 <223>
 <220>
 <400> 1500

TGATCATGGCTCGGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGC
 TGAACCAACAGATTCACTTCGGTGATGACGTTGGGAACGCGAGCGGCGGATGGGTGAG
 TAACACGTGGGGAACCTGCCCCATAGTCTGGGATAACCACTTGGAACAGGTGCTAATA
 CCGGATAAGAAAGCAGATCGCATGATCAGCTTATAAAAGGCGGCGTAAGCTGTGCTA
 TGGGATGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGCCTACCAAGGCAATG
 ATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAAC
 TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAA
 CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTGGTGAAGAAGGA
 TAGAGGTAGTAAGTGGCCTTTATTTGACGGTAATCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTA
 CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT
 AAAGCGAGCGCAGGCGGAAGAATAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGA
 ACTGCATCGGAAACTGTTTTTCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAGTCCATGTGTA
 GCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCT
 GCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
 TCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGGAGGTTTCCGCCTCTCAGTGCTGCA
 GCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGA
 ATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAG
 AACCTTACCAGGTCTTGACATCTAGTGCAATCCGTAGAGATACGGAGTTCCCTTCGGG
 GACACTAAGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTA
 AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCATTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTA
 ATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCC
 CTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGTACAACGAGGAGCAAGCCTGC
 GAAGGCAAGCGAATCTCTTAAAGCTGTTCTCAGTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGAC
 TGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCC
 CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTCTGCAATGCCCAAAGCCGGTG
 GCCTAACCTTCGGCAAGGAGCCG