



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

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

(11)



1-0047656

(51)^{2020.01} C12N 1/20

(13) B

(21) 1-2021-06593

(22) 19/10/2021

(45) 25/06/2025 447

(43) 25/04/2023 421A

(73) Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, ĐHQGHN (VN)
Nhà E2, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Trịnh Thành Trung (VN); Bùi Nguyễn Hải Linh (VN); Hoàng Thị Lan Anh (VN);
Trần Thị Lệ Quyên (VN); Lê Thị Thanh Huê (VN).

(54) CHỦNG VI KHUẨN LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM LM0705 THUẦN
KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC VỚI CÁC ĐẶC TÍNH LỢI KHUẨN ĐƯỢC PHÂN
LẬP TỪ MẪU LẠP XƯƠNG MỘC CHÂU, SƠN LA

(21) 1-2021-06593

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Lactiplantibacillus plantarum* LM0705 thuần khiết về mặt sinh học với các đặc tính lợi khuẩn được phân lập từ mẫu lạp xường thu tại Mộc Châu, Sơn La. Chủng LM0705 có trình tự gen mã hóa 16S rARN có kích thước 1.460 bp được thể hiện trong SEQ ID NO.1 và được đăng kí tại Genbank với mã số OK271420. Chủng LM0705 có khả năng sống sót trong môi trường mô phỏng dịch dạ dày và dịch tụy đạt tương ứng trên 47% và 119%; có khả năng bám dính với tế bào biểu mô ruột dòng HT29 đạt trên 2%; có khả năng kháng một số vi sinh vật gây hại có trong thực phẩm bao gồm *Aeromonas dhakensis*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio vulnificus* và ức chế sinh trưởng đối với chủng *Staphylococcus aureus*; và có hoạt tính phân cắt gốc tự do DPPH đạt trên 52%. Với những đặc điểm này, chủng LM0705 thích hợp cho việc ứng dụng để sản xuất chế phẩm probiotic.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Lactiplantibacillus plantarum* LM0705 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu lạp xường Mộc Châu, Sơn La, có khả năng sống sót cao trong môi trường mô phỏng đường tiêu hóa trên của con người và động vật, bám dính tốt với tế bào biểu mô ruột, có hoạt tính kháng một số vi sinh vật gây bệnh có trong thực phẩm và hoạt tính chống oxy hóa cao, có thể sử dụng tạo các chế phẩm probiotic.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Probiotic được định nghĩa là “các vi sinh vật sống khi được kiểm soát phù hợp về số lượng sẽ mang lại những lợi ích về sức khỏe cho vật chủ” (FAO/WHO, 2006; Hill et al, 2014). Trong năm 2011, ước tính có khoảng 27,9 tỷ đô đã được chi cho việc mua các sản phẩm probiotic trên toàn thế giới, tăng 44,9 tỷ đô vào cuối năm 2018 với tỷ lệ tăng trưởng hàng năm là 6,8% từ năm 2013 đến năm 2018 (TMC, 2013). Nhu cầu về sản phẩm probiotic toàn cầu dự kiến sẽ tăng lên 83,5 tỷ đô la vào năm 2022 (TMC, 2017). Hiện nay, probiotic được sử dụng rộng rãi đối với cả con người và động vật nuôi, đặc biệt là trong việc kiểm soát, phòng ngừa hoặc điều trị bệnh (Anandharaj & Sivasankari, 2014). Một số cơ chế tác động của probiotic đã được đưa ra nhằm giải thích những tác động có lợi đối với sức khỏe vật chủ, có thể được chia thành ba loại: (i) có hoạt tính kháng khuẩn do đó có thể loại trừ hoặc ức chế mầm bệnh; (ii) tăng cường hàng rào biểu mô ruột và (iii) điều chỉnh phản ứng miễn dịch của vật chủ (Jensen et al, 2012).

Các vi khuẩn lactic (Lactic acid bacteria-LAB) là một nhóm vi khuẩn quan trọng nhất trong ngành công nghiệp thực phẩm. Từ lâu nhóm vi khuẩn này đã được con người trên khắp thế giới sử dụng thông qua các sản phẩm từ sữa và hầu hết chúng được xếp vào nhóm an toàn (Generally recognized as safe- GRAS) (Reuben et al, 2020). Hiện tại, việc sử dụng LAB dưới dạng sản phẩm probiotic ngày càng gia tăng bởi nhiều nghiên cứu đã chứng minh được vai trò của nhóm vi khuẩn này trong việc phòng chống ung thư (Hirayama và Rafter, 2000) và làm giảm cholesterol huyết thanh (Guo et al, 2010); chống tiểu đường (Panwar et al, 2013), béo phì (Aazmi et al, 2015), dị ứng (Lee et al, 2014), và viêm (Lorea Baroja et al, 2007); giảm mầm bệnh trong đường tiêu hóa và niệu sinh dục (de Vries et al, 2006); ổn định hệ vi sinh đường ruột (Gibson et al, 1997), tăng cường sử dụng các chất dinh dưỡng (Guo et al, 2010) và dung nạp lactose (Silanikove et al, 2015); cải thiện khả năng tiêu hóa thức ăn (Bokhorst et al, 2015) và kích thích hệ thống miễn dịch (Isolauri et al, 2001)... Trong nhóm LAB, chi *Lactobacillus* là chi được sử dụng phổ biến được sử dụng làm probiotic với các loài như *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. plantarum* (Mulaw et al, 2019).

Chi *Lactobacillus* được Beijerinck đề xuất vào năm 1901 và bao gồm các vi khuẩn Gram dương, lên men, kỵ khí tùy tiện và không sinh bào tử. Chi này thuộc ngành Firmicutes, lớp Bacilli, bộ Lactobacillales, họ Lactobacillaceae, với các chi *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* và *Pediococcus* (Zheng et al, 2020). Năm 2020, 261 loài thuộc chi *Lactobacillus* đã được sắp xếp lại thành 25 chi khác nhau bao gồm *Lactobacillus* (nhóm *Lactobacillus delbrueckii*), *Paralactobacillus* và 23 chi mới là *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Secundilactobacillus* và *Lentilactobacillus* (Zheng et al, 2020).

Bởi các đặc tính của probiotic là đặc trưng cho từng chủng (Ramos et al, 2013), nên việc nghiên cứu nhằm phân lập, sàng lọc và làm sáng tỏ tiềm năng lợi khuẩn của các chủng/loài mới từ luôn thu hút được sự quan tâm của các nhà nghiên cứu.

Để một chủng probiotic có thể phát huy các đặc tính có lợi đối với sức khỏe của vật chủ thì trước hết chúng phải có khả năng sống sót khi đi qua đường tiêu hóa. Vì vậy, các chủng vi khuẩn cần có hệ thống bảo vệ để chống lại độ pH thấp ở dạ dày, enzym tiêu hóa và dịch mật của ruột non. Ở người thông thường có khoảng 2,5 lít dịch dạ dày và 0,7 lít dịch mật được tiết vào đường tiêu hóa của con người mỗi ngày (Jensen et al, 2012). Do đó, khả năng chống chịu với môi trường axit dạ dày và ruột non trở thành tiêu chí lựa chọn quan trọng hàng đầu đối với các chủng lợi khuẩn. Ngoài việc tồn tại trong môi trường khắc nghiệt trong đường tiêu hóa, khả năng bám dính của vi khuẩn vào các tế bào biểu mô ruột được coi là một tính năng mong muốn của một chủng lợi khuẩn, vì nó có thể thúc đẩy thời gian cư trú trong ruột, loại trừ mầm bệnh và tương tác với các tế bào biểu mô và miễn dịch của vật chủ.

Hiện tại ở nước ta, các chế phẩm probiotic có nguồn gốc từ các loài thuộc chi *Lactobacillus* (gọi theo danh pháp phân loại trước đây) như *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* ...được sử dụng trực tiếp hoặc gián tiếp bằng cách bổ sung vào thức ăn và nước uống dùng cho người và vật nuôi để hỗ trợ tiêu hóa nhưng chủ yếu là từ nhập khẩu từ nước ngoài với giá thành cao.

Các sản phẩm lên men từ rau củ, thịt, cá và sữa được xem là nguồn nguyên liệu tiềm năng để phân lập nhóm LAB. Trong các loại thực phẩm lên men từ thịt lợn ở Việt Nam, lạp xưởng Tây Bắc là món ăn truyền thống có hương vị riêng và độc đáo của đồng bào dân tộc thiểu số các tỉnh Cao Bằng, Lạng Sơn hay Sơn La, tương tự như các sản phẩm “salamì” ở các nước châu Âu như Ý, Đức, Tây Ban Nha hoặc “Lachang” ở Trung Quốc. Các nghiên cứu đã chứng minh vai trò chủ yếu của các loài như *L. sakei*, *L. curvatus* và *L. plantarum* trong quá trình lên men tạo ra các sản phẩm này (Wang et al, 2018). Nhằm tìm kiếm các chủng LAB bản địa, có các đặc tính sinh học quý, song song với các nghiên cứu đa dạng của các vi khuẩn LAB trong mẫu lạp xưởng Tây Bắc bằng phương pháp nuôi cấy, nhóm tác giả đã tiến hành đánh giá, tuyển chọn các chủng LAB phân lập được có đặc tính probiotic có thể sử dụng tạo chế phẩm probiotic.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Để một chủng vi sinh vật có thể sử dụng để sản xuất chế phẩm probiotic thì chủng đó phải có khả năng sống sót cao trong đường tiêu hóa trên của con người hoặc động vật (đặc trưng bởi môi trường có độ pH thấp ở dạ dày, pH cao ở ruột non cũng như sự có mặt của các enzym tiêu hóa thức ăn như pepsin, pancreatin) và bám dính tốt với tế bào biểu mô ruột. Bên cạnh đó, chủng vi sinh vật cũng cần có một số đặc tính có lợi khác đối với sức khỏe như kháng khuẩn và chống oxy hóa. Mục đích của sáng chế là đề xuất chủng vi khuẩn *Lactiplantibacillus plantarum* LM0705 thuần khiết về mặt sinh học, mang các đặc tính mong muốn như đã đề cập ở trên để ứng dụng sản xuất chế phẩm probiotic.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh hình thái khuẩn lạc (A) sau 72 giờ và tế bào (B, C) sau 24 giờ của chủng LM0705 được nuôi cấy trên môi trường MRS ở nhiệt độ 30°C;

Hình 2 là hình ảnh điện di kiểm tra gen mã hóa 16S rARN (A) và đoạn gen *recA* (B) của chủng LM0705;

Hình 3 là hình ảnh cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự gen 16S rARN của chủng LM0705 với các loài gần gũi;

Hình 4 là biểu đồ thể hiện hoạt tính bám dính với dòng tế bào HT29 của chủng LM0705 và chủng đối chứng *Lactocaseibacillus casei* Shirota;

Hình 5 là biểu đồ thể hiện hoạt tính phân cắt gốc tự do DPPH của chủng LM0705 và chủng đối chứng *L. casei* Shirota;

Hình 6 là hình ảnh thể hiện hoạt tính kháng khuẩn của chủng LM0705 và chủng đối chứng *L. casei* Shirota.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập tới chủng vi khuẩn *Lactiplantibacillus plantarum* LM0705 thuần khiết về mặt sinh học, có khả năng sống sót cao môi trường mô phỏng đường tiêu hóa trên của con người và động vật, khả năng bám dính tốt với tế bào biểu mô ruột, có hoạt tính kháng một số vi sinh vật gây bệnh có trong thực phẩm và hoạt tính chống oxy hóa cao, được phân lập từ mẫu lạp xưởng Mộc Châu, Sơn La. Chủng này có thể được ứng dụng để sản xuất chế phẩm probiotic.

Mẫu lạp xưởng mới được sản xuất và có thể ăn được, được dùng làm nguyên liệu để phân lập vi khuẩn lactic. Mẫu lạp xưởng được nghiền trong nước muối sinh lý 0,85%, pha loãng và cấy trải trên đĩa chứa môi trường de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) có thành phần như sau (g/L): 10 g cao thịt bò, 10 g peptone, 5 g cao nấm men, 20 g dextroza, 1 g polysorbate 80, 2 g amoni xitrat, 5 g CH₃COONa, 0,1 g MgSO₄, 0,05 g MnSO₄, 2 g K₂HPO₄ và 15 g agar, nước cất dẫn tới 1000 mL, hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 15 phút. Sau khi cấy trải, các đĩa petri được đặt trong bình kín có bổ sung túi tạo môi trường kỵ khí (Sachet gaspak EZ anaerobe, Becton Diskinson) và nuôi ở 37°C.

Sau 48-72 giờ nuôi cấy, quan sát trên đĩa petri thấy sự xuất hiện các khuẩn lạc. Lựa chọn các khuẩn lạc riêng rẽ, hình tròn, màu trắng sữa, nhô cao để cấy truyền sang trên đĩa MRS mới.

Việc cấy truyền được thực hiện sau mỗi 48 giờ khi khuẩn lạc mọc rõ ràng trên đĩa nuôi cấy. Chủng LM0705 được làm sạch sau lần cấy truyền thứ 3, sau đó chủng này sẽ được bảo quản ở điều kiện lạnh sâu -70°C và lưu giữ trên đĩa MRS để tiến hành định danh và các thử nghiệm tiếp theo.

Chủng LM0705 sau đó được nghiên cứu chi tiết về các đặc điểm hình thái (khuẩn lạc, tế bào) (Hình 1). Gen mã hóa cho 16S rARN của chủng này được khuếch đại (Hình 2A), giải trình tự và so sánh với cơ sở dữ liệu gen mã hóa 16S rARN có trên Genbank và Ez-Taxon (<https://www.ezbiocloud.net/>). Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự 16S rADN của chủng LM0705 với các loài có quan hệ gần gũi được xây dựng bằng cách sử dụng phần mềm MEGA X với thuật toán Neighbor- Joining (Hình 3). Ngoài gen 16S rARN, một phần đoạn gen *recA* (gen mã hóa cho một protein liên quan đến việc sửa chữa những tổn thương DNA ở vi khuẩn) của chủng LM0705 cũng được khuếch đại nhằm làm rõ vị trí phân loại của chủng LM0705 (Hình 2B).

Ở người, thông thường có khoảng 2,5 lít dịch dạ dày có chứa enzym pepsin, muối NaCl với độ pH thấp được tiết ra mỗi ngày. Môi trường này ảnh hưởng đến khả năng sống sót và trao đổi chất của hầu hết các nhóm vi sinh vật khi đi qua dạ dày. Mỗi ngày, ở ruột non có khoảng 0,7 lít dịch tụy (pH 8) có chứa muối NaCl, muối mật và enzym pancreatin cũng được tiết ra. Đây cũng là môi trường gây ức chế đến sự sinh trưởng của các vi sinh vật. Bên cạnh đó, các chủng vi sinh vật hữu ích chỉ phát huy tác dụng có lợi lên vật chủ khi chúng tồn tại và định cư trong ruột non. Do vậy, ngoài khả năng sống sót cao khi đi qua dạ dày và ruột non thì khả năng bám dính với tế bào biểu mô ruột cũng là tiêu chí quan trọng khác để đánh giá các đặc tính probiotic của một chủng vi khuẩn. Để đánh giá tiềm năng sử dụng làm probiotic, chủng LM0705 đã được xem xét khả năng sống sót trong môi trường mô phỏng dịch dạ dày và dịch tụy; khả năng bám dính với dòng tế bào HT29 (Hình 4). Ngoài ra, chủng LM0705 cũng được đánh giá về khả năng kháng một số loài vi khuẩn gây bệnh có trong thực phẩm (Hình 5) và chống oxy hóa (Hình 6).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập chủng *Lactiplantibacillus plantarum* LM0705 từ mẫu lạp xường thu tại Mộc Châu, Sơn La

Mẫu lạp xường lấy từ Mộc Châu, Sơn La và được chuyển ngay về phòng thí nghiệm. Cân 10 g lạp xường, cắt nhỏ, nghiền mẫu và bổ sung 90 mL nước muối sinh lý (NaCl 0,85%). Các thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng. Sau đó, hỗn hợp đã nghiền được cho vào bình tam giác và lắc ở 30°C , 160 vòng/phút trong 30 phút. Bình tam giác sau đó được để tĩnh trong 10 phút ở nhiệt độ phòng, phần dịch nổi được hút ra và pha loãng từ nồng độ 10^{-2} đến 10^{-7} .

Tiến hành cấy gọt 100 μL các dịch pha loãng lên đĩa petri chứa môi trường MRS. Các đĩa petri sau đó được nuôi 30°C trong bình kín ở điều kiện kỵ khí sử dụng túi tạo môi trường kỵ khí (Sachet gaspak EZ anaerobe, Becton Dickinson). Sau 2 ngày nuôi cấy ở 30°C , các khuẩn lạc riêng lẻ xuất hiện trên đĩa được tách riêng bằng cấy truyền sang đĩa MRS mới. Quá trình tinh

sạch khuẩn lạc được thực hiện 2-3 lần cho đến khi thu được chủng thuần khiết, đồng nhất về hình dạng tế bào khi nhuộm, soi dưới kính hiển vi.

Ví dụ 2: Nghiên cứu đặc điểm hình thái của chủng LM0705

Trên đĩa môi trường MRS sau 72 giờ nuôi cấy, chủng LM0705 hình thành các khuẩn lạc có kích thước 2-3 mm, hình tròn, màu trắng sữa, nhô cao, bề mặt trơn nhẵn, mép hơi lượn sóng và không tiết sắc tố ra môi trường (Hình 1A).

Quan sát tế bào dưới kính hiển vi: Dùng pipetman hút nước cất vô trùng và nhỏ một giọt nhỏ vào vị trí đã định trên lam kính, sau đó dùng que cấy lấy một lượng nhỏ khuẩn lạc vi khuẩn và dàn mỏng với nước cất theo hình xoay tròn ốc từ trong ra ngoài. Cố định mẫu trên lam kính bằng ngọn lửa đèn cồn sau đó nhuộm Gram và soi dưới kính hiển vi Axio Imager.A2, Carl Zeiss (Đức). Ảnh chụp hình thái tế bào dưới kính hiển vi bằng camera chuyên dụng, vật kính 40x cho thấy cho thấy đây là vi khuẩn hình que, Gram dương, kích thước nhỏ và không hình thành bào tử (Hình 1B).

Quan sát tế bào trên kính hiển vi điện tử quét: Tế bào được thu từ dịch nuôi bằng ly tâm, rửa 2-3 lần trong dung dịch đệm cacodylate 0,1M. Mẫu sau đó được cố định qua đêm trong dung dịch 2,5% glutaraldehyde pha trong đệm cacodylate 0,1M (pH 7,2-7,4) ở 4°C. Sau khi cố định, mẫu được rửa 3 lần, mỗi lần 5 phút với dung dịch đệm cacodylate 0,1M và được cố định lại bằng dung dịch 1% OsO₄ pha trong đệm cacodylate 0,1M trong 20 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, mẫu được rửa 3 lần, mỗi lần 5 phút trong dung dịch cacodylate 0,1M và loại nước bằng dung dịch ethanol ở các nồng độ 50, 70, 80, 90 và 100°. Mẫu được để khô ở nhiệt độ phòng và đưa lên để phủ màng dẫn điện Au và được đưa vào buồng mẫu của kính hiển vi điện tử quét SEM S4800 (Hitachi, Nhật Bản) để quan sát và đọc kết quả. Hình ảnh chụp trên kính hiển vi điện tử quét cũng cho thấy tế bào của chủng LM0705 có hình que, kích thước $(0,97-1,78) \times (1,38-2,49) \mu\text{m}$ (Hình 1C).

Ví dụ 3: Xác định vị trí phân loại của chủng LM0705 dựa trên trình tự gen mã hóa 16S rARN và phản ứng PCR đa mồi nhân đoạn gen *recA*

a. Tách ADN tổng số của chủng LM0705

ADN tổng số của chủng LM0705 được tách chiết theo quy trình sau (Gabor et al, 2003):

- Sau 24 giờ nuôi cấy ở 37°C trên môi trường đĩa thạch, dùng que cấy lấy một vài khuẩn lạc thuần khiết hòa tan vào các ống eppendorf 1,5 mL chứa 500 μL nước MQ. Ly tâm 8.000 vòng/phút trong 10 phút.
- Loại bỏ dịch nổi, bổ sung 200 μL đệm phá tế bào (100 mM Tris HCl, 100 mM Na₂EDTA, 1,5 mM NaCl, pH 8,0), 10 μL lysozym (50 mg/mL) và 2,5 μL proteinase K (10 mg/mL). Ủ ở 37°C trong 30 phút.
- Bổ sung 50 μL SDS 20% và hỗn hợp và ủ ở 65°C trong 2 giờ nhằm phá vỡ hoàn toàn tế bào và giải phóng ADN vào đệm chiết.

- Bổ sung một lượng tương đương (~ 260 μ L) hỗn hợp chloroform : isoamyl alcohol (49:1) vào hỗn hợp đệm chứa các tế bào đã bị phá vỡ, lắc nhẹ nhàng trong một phút sau đó ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút.
- Hút 100 μ L phần dịch trong phía trên có chứa ADN sang ống eppendorf 1,5 mL mới, bổ sung 60 μ L isopropanol lạnh và ủ ở -20°C trong 1 giờ.
- Ly tâm ở 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để thu hồi ADN kết tủa. Rửa tủa với 1 mL cồn lạnh 70° bằng ly tâm ở 13.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C . Lặp lại bước rửa 2 lần.
- Hòa tan ADN vào 100 μ L nước MQ và ủ ở 56°C trong 1 giờ
- Bảo quản ADN ở -20°C cho đến khi sử dụng.

b. Khuếch đại các đoạn gen trong phản ứng PCR

ADN hệ gen sau đó được sử dụng làm khuôn để khuếch đại các đoạn gen dùng cho việc xác định vị trí phân loại gồm có đoạn gen mã hóa 16S rARN và đoạn gen *recA*. Các cặp mồi đặc hiệu cho từng đoạn gen đã sử dụng và chu trình nhiệt tương ứng được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Các cặp mồi và chu trình nhiệt sử dụng để khuếch đại các đoạn gen mã hóa 16S rARN và phản ứng PCR đa mồi nhân đoạn gen *recA* của chủng LM0705

Tên gen	Tên mồi	Trình tự mồi/chu trình nhiệt	Kích thước sản phẩm PCR	Tài liệu tham khảo
16S rARN	27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	1500 bp	Chen et al, 2018
	1525R	5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3'		
	Chu trình nhiệt	95°C 5 phút, (95°C 30 giây, 55°C 30 giây, 72°C 1 phút 45 giây) $\times$ 35 chu kỳ, 72°C 7 phút, kết thúc 4°C		
<i>recA</i>	paraF	5'-GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC-3'	107 bp 218 bp 318 bp	Torriani et al, 2001
	pentF	5'-CAG TGG CGC GGT TGA TAT C-3'		
	planF	5'-CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA-3'		
	pREV	5'-TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC-3'		
	Chu trình nhiệt	94°C 3 phút, (94°C 30 giây, 56°C 10 giây, 72°C 30 giây) $\times$ 30 chu kỳ, 72°C 5 phút, kết thúc 4°C		

c. Giải trình tự ADN

Sản phẩm PCR của gen mã hóa 16S rARN được tinh sạch sử dụng kit QIAquick PCR Purification của hãng Qiagen (Hình 2A) sau đó được giải trình tự trên máy 3100 Avant Genetic Analyzer. Mức độ tương đồng cao nhất về trình tự đoạn gen mã hóa 16S rARN của chủng nghiên cứu so với các chủng chuẩn đã công bố được tra cứu sử dụng các công cụ Eztaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) với số liệu cập nhật đến ngày 08/10/2021 và ngân hàng dữ liệu

Genbank với công cụ Blast Search. Mối quan hệ phát sinh chủng loài của chủng LM0705 được xây dựng sử dụng phần mềm Mega X được thể hiện ở Hình 3. Kết quả cho thấy, chủng LM0705 gần gũi nhất với chủng chuẩn *Lactiplantibacillus pentosus* DSM 20314 và *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917 với độ tương đồng đều trên 99,9%. Cây phát sinh chủng loại cũng cho thấy chủng LM0705 nằm cùng nhánh *L. pentosus* DSM 20314 và *L. plantarum* ATCC 14917. Do vậy, chúng tôi đã sử dụng các cặp mồi đặc hiệu để nhân các đoạn gen *recA* trong phản ứng PCR đa mồi để xác định chủng LM0705 là loài *L. plantarum* hay *L. pentosus*. Ở đây, sản phẩm PCR là một băng đặc hiệu có kích thước >300 bp, chứng tỏ chủng LM0705 là loài *L. plantarum*.

Dựa trên phân tích về trình tự gen mã hóa 16S rARN và đoạn gen *recA*, chủng LM0705 được định danh khoa học là *Lactiplantibacillus plantarum*. Chủng này được lưu giữ tại Trung tâm Nguồn gen Vi sinh vật Quốc gia (VTCC) với mã số là VTCC 12046. Đoạn trình tự gen mã hóa 16S rARN của chủng LM0705 được đăng ký trên Genbank với mã số OK271420 và được nêu trong SEQ ID NO. 1.

Ví dụ 4: Nghiên cứu các đặc tính probiotic của chủng LM0705

Các đặc tính probiotic của chủng LM0705 được đánh giá gồm khả năng sống sót khi qua đường tiêu hóa trên của động vật và khả năng bám dính với dòng tế bào HT29. Trong các nghiên cứu này, chủng *Lactocaseibacillus casei* Shirota (danh pháp khoa học trước đây là *Lactobacillus casei* Shirota, kí hiệu là LcS)- chủng probiotic được phân lập từ sữa chua Yakult, Việt Nam được sử dụng làm chủng đối chứng.

a. Khả năng sống sót sau khi xử lý với dịch dạ dày và dịch tụy mô phỏng

Để thử khả năng sống sót của tế bào vi khuẩn sau khi xử lý với dịch dạ dày mô phỏng, các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường dịch thể MRS ở tủ kỵ khí (Bactrox, Shelab) ở 37°C trong 24 giờ. Sau đó được ly tâm thu tế bào, rửa 2 lần bằng đệm phosphat (PBS, pH 7,2). Cặn tế bào sau đó được hòa lại trong dịch dạ dày, dịch tụy mô phỏng và ủ ở tủ kỵ khí 37°C trong 2 giờ và 6 giờ, tương ứng. Sau thời gian xử lý, tiến hành pha loãng và cấy trải trên đĩa môi trường MRS và ủ đĩa ở tủ kỵ khí 37°C trong 48 giờ, đếm số khuẩn lạc được hình thành và tính phần trăm tế bào sống sót sau quá trình thử nghiệm. Kết quả thử nghiệm được tóm tắt trong bảng 2 dưới đây. Kết quả chỉ ra trên bảng 2 cho thấy, chủng LM0705 có khả năng sống sót gần 50% và cao hơn chủng đối chứng sau khi xử lý với dịch dạ dày mô phỏng. Hơn thế nữa, sinh trưởng của chủng này tương đương với chủng đối chứng và không bị ức chế sau khi xử lý với dịch tụy mô phỏng. Từ kết quả thu được, có thể khẳng định rằng chủng LM0705 có khả năng chống chịu và sống sót tốt trong đường tiêu hóa của động vật.

Bảng 2. Khả năng sống sót sau khi xử lý với dịch dạ dày và dịch tụy mô phỏng của chủng LM0705

Thử nghiệm	Đối chứng LcS	LM0705
Dịch dạ dày mô phỏng		
0 h (log CFU/mL)	7,42 ± 0,01	6,84 ± 0,01
2 h (log CFU/mL)	3,11 ± 0,07	3,25 ± 0,06
Khả năng sống sót (%)	41,87 ± 0,96	47,47 ± 0,85

Dịch tụy mô phỏng		
0 h (log CFU/mL)	$7,23 \pm 0,04$	$6,76 \pm 0,08$
6 h (log CFU/mL)	$8,35 \pm 0,03$	$8,08 \pm 0,02$
Khả năng sống sót (%)	$115,41 \pm 0,00$	$119,65 \pm 0,01$

b. Khả năng bám dính với tế bào biểu mô ruột

Dòng tế bào HT29 (dòng tế bào ung thư biểu mô ruột kết) được sử dụng để đánh giá khả năng bám dính của chủng LM0705 và chủng đối chứng LcS. Dòng tế bào này được nuôi cấy trong đĩa 24 giếng có chứa môi trường DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, 1 g/L glucose) (PAN-Biotech, Đức) bổ sung 10% (v/v) huyết thanh thai bò (fetal bovine serum, Gibco, NewYork, USA) và 1% (v/v) penicillin/streptomycin (Corning, Mỹ) ở 37°C trong tủ nuôi cấy tế bào với 5% CO₂ (Astec, Nhật Bản). Môi trường được thay 2 ngày một lần cho đến khi tế bào đạt mật độ khoảng 2×10^5 tế bào/mL và tạo thành một lớp đơn (monolayer) bám dưới bề mặt giếng nuôi cấy. Trước khi thử nghiệm khả năng bám dính của các chủng vi khuẩn, kháng sinh trong môi trường nuôi cấy tế bào được loại bỏ bằng cách rửa tế bào trong giếng nuôi cấy bằng đệm PBS (pH 7,2). Sau đó 900 µL môi trường DMEM mới, không có kháng sinh được bổ sung vào các giếng nuôi cấy tế bào.

Các chủng vi khuẩn thử nghiệm được nuôi cấy trong môi trường dịch thể MRS ở tủ kỵ khí 37°C trong 24 giờ. Sau đó ly tâm thu tế bào ở 8.000 vòng/phút trong 10 phút. Cặn tế bào được rửa 2 lần với đệm PBS (pH 7,2) và hòa lại trong đệm này để đạt mật độ 10^6 CFU/mL/giếng. Sau khi ủ 2 giờ ở 37°C trong tủ nuôi cấy tế bào với 5% CO₂, tiến hành rửa 2 lần với đệm PBS để loại bỏ các tế bào vi khuẩn không bám dính. Bổ sung 200 µL dung dịch Triton X-100 (1,0% v/v trong đệm PBS) và để yên trong 5 phút để ly giải tế bào HT29 ra khỏi đáy giếng nuôi cấy. Dịch ly giải sau đó được pha loãng và cấy trải trên đĩa môi trường MRS và ủ ở tủ kỵ khí 37°C trong 48 giờ. Sau thời gian trên, dựa trên số khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa để tỷ lệ phần trăm tế bào vi khuẩn đã bám dính với tế bào HT29. Kết quả thử nghiệm được chỉ ra trên Hình 4 cho thấy chủng LM0705 có tỷ lệ bám dính với dòng tế bào HT29 là 2,41%, cao hơn nhiều so với chủng đối chứng (0,08%).

Ví dụ 5: Hoạt tính chống oxy hóa của chủng LM0705

Hoạt tính chống oxy hóa của chủng LM0705 được đánh giá bằng khả năng phân cắt gốc tự do 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Để xác định hoạt tính chống oxy hóa chủng LM0705 và LcS được nuôi cấy trong môi trường dịch thể MRS ở tủ kỵ khí 37°C trong 24 giờ. Sau đó, dịch nuôi cấy được ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong 10 phút để loại bỏ tế bào. Hút 1,5 mL dịch nuôi cấy của chủng các vi khuẩn cần kiểm tra vào ống nghiệm sau đó bổ sung thêm 1,5 mL dung dịch DPPH 0,2 mM (pha trong methanol) và đảo đều. Mẫu trắng được chuẩn bị bằng cách hút 1,5 mL methanol vào ống nghiệm và thêm 1,5 mL DPPH 0,2 mM đảo đều. Ủ hỗn hợp phản ứng trong tối, 30 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, đo độ hấp phụ của mẫu thí nghiệm và mẫu trắng ở bước sóng 517 nm. Khả năng phân cắt gốc tự do DPPH được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ \% phân cắt gốc tự do DPPH} = (A_0 - A) / A_0 \times 100$$

Trong đó: *Ao*: độ hấp thụ của mẫu trắng, *A*: độ hấp thụ của mẫu dịch nuôi cấy vi khuẩn

Hoạt tính chống oxy hóa càng cao thì tỷ lệ phần trăm phân cắt gốc tự do càng lớn. Kết quả ở hình 5 cho thấy chủng LM0705 có hoạt tính chống oxy hóa đạt 52,76%, cao hơn so với đối chứng (42,34%).

Ví dụ 6: Khả năng kháng khuẩn của chủng LM0705

Khả năng kháng khuẩn của chủng LM0705 được khảo sát bằng phương pháp khuếch tán trên thạch sử dụng các chủng vi sinh vật kiểm định, gây bệnh trong thực phẩm bao gồm *Aeromonas dhakensis* VTCC 70106, *Campylobacter jejuni* VTCC 70176, *Enterococcus faecalis* VTCC 70177, *E. coli* VTCC 12272, *Listeria monocytogenes* VTCC 70147, *Salmonella enterica* VTCC 70080, *Staphylococcus aureus* VTCC 12275 và *Vibrio vulnificus* VTCC 70092. Chủng LM0705 và chủng đối chứng LcS được nuôi cấy trong môi trường lỏng MRS ở điều kiện kỵ khí trong 24 giờ. Dịch nuôi cấy được ly tâm ở 8.000 vòng/phút trong 10 phút và tiếp tục được lọc qua màng lọc 0,22 μm để loại bỏ hoàn toàn tế bào vi khuẩn. Dịch huyền phù các chủng vi khuẩn kiểm định được chỉnh về $\text{OD}_{600} = 0,1$ tương đương 10^8 CFU/mL và trải lên đĩa petri chứa môi trường MH đối với chủng VTCC 70106, VTCC 12272, VTCC 70177, VTCC 70080, VTCC 12275 và VTCC 70092 hoặc môi trường thạch máu đối với chủng VTCC 70176 và VTCC 70147. Dịch nuôi cấy chủng vi khuẩn thử nghiệm LM0705 và LcS đã loại bỏ tế bào được nhỏ với lượng tương nhau vào các lỗ đã đục trên đĩa cấy các vi sinh vật kiểm định nói trên. Ủ đĩa thạch ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Đọc kết quả sau 18-20 giờ nuôi đối với tất cả các chủng trừ VTCC 70176 đọc kết quả sau 2 ngày. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng đường kính vòng ức chế của các chủng vi sinh vật kiểm định. Kết quả thử nghiệm được tóm tắt trong bảng 3 dưới đây.

Bảng 3. Hoạt tính kháng một số vi khuẩn gây bệnh trong thực phẩm của chủng LM0705

Chủng vi khuẩn kiểm định	Hoạt tính kháng vi sinh vật (đường kính vòng kháng/ức chế, mm)	
	LM0705	LcS
<i>Aeromonas dhakensis</i> VTCC 70106	9	10
<i>Campylobacter jejuni</i> VTCC 70176	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> VTCC 70177	-	-
<i>E. coli</i> VTCC 12272	-	6
<i>Listeria monocytogenes</i> VTCC 70147	9	9
<i>Salmonella enterica</i> VTCC 70080	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> VTCC 12275	8*	-
<i>Vibrio vulnificus</i> VTCC 70092	9	9

Ghi chú: dấu (-) thể hiện chủng không có hoạt tính đối kháng, (*): thể hiện chủng có hoạt tính ức chế

Kết quả cho thấy chủng LM0705 có khả năng kháng các chủng vi khuẩn như *Aeromonas dhakensis* VTCC 70106 (Hình 6a), *Listeria monocytogenes* VTCC 70147 (Hình 6b), *Vibrio*

vulnificus VTCC 70092 (Hình 6c) tương đương với chủng đối chứng. Ngoài ra chủng này cũng có hoạt tính ức chế đối với chủng *Staphylococcus aureus* VTCC 12275.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chủng *Lactiplantibacillus plantarum* LM0705 là một chủng mới phân lập từ mẫu lạp xường Mộc Châu, Sơn La có các đặc tính quan trọng, cần thiết mà một chủng probiotic cần phải đáp ứng như có khả năng sống sót khi đi qua đường tiêu hóa và khả năng bám dính với tế bào biểu mô ruột. Bên cạnh đó, chủng LM0705 còn có đặc tính quý khác như kháng một số vi khuẩn gây bệnh có trong thực phẩm và khả năng chống oxy hóa. Do đó, việc phân lập và sử dụng chủng này rất có ý nghĩa trong việc sản xuất các chế phẩm probiotic chất lượng tốt từ nguồn nguyên liệu trong nước với giá thành thấp hơn so với các chế phẩm cùng loại nhập khẩu từ nước ngoài.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chúng vi khuẩn *Lactiplantibacillus plantarum* LM0705 thuần khiết về mặt sinh học với các đặc tính lợi khuẩn được phân lập từ mẫu lạp xương Mộc Châu, Sơn La có trình tự gen mã hóa 16S rARN có kích thước 1.460 bp được thể hiện trong SEQ ID NO.1 và có các đặc tính như sau:

- có khả năng sống sót trong môi trường mô phỏng dịch dạ dày và dịch tụy đạt trên 47% và trên 119%, tương ứng;
- có khả năng bám dính với tế bào biểu mô ruột dòng HT29 đạt trên 2%;
- có khả năng kháng một số vi sinh vật gây hại có trong thực phẩm bao gồm *Aeromonas dhakensis*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio vulnificus* và có ức chế sinh trưởng đối với chủng *Staphylococcus aureus*; và
- có hoạt tính phân cắt gốc tự do 2,2-diphenyl-1-1 picrylhydrazyl (DPPH) đạt trên 52%.

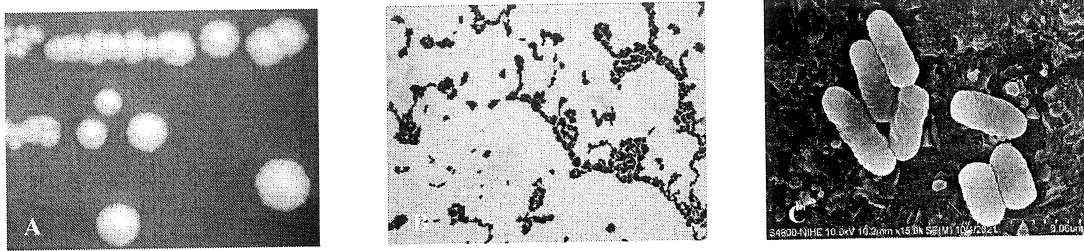
TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aazmi S, Teh LK, Ramasamy K, Rahman T, Salleh MZ (2015) Comparison of the anti-obesity and hypocholesterolaemic effects of single *Lactobacillus casei* strain Shirota and probiotic cocktail. *Int J Food Sci Technol*, 50: 1589–1597.
2. Anandharaj M and Sivasankari B (2014) Isolation of potential probiotic *Lactobacillus oris* HMI68 from mother's milk with cholesterolreducing property. *J Biosci Bioeng*, 118: 153–159.
3. Bokhorst VV, Van H, Bron PA, Kleerebezem M (2015) Improving the digestive tract robustness of probiotic lactobacilli. Pages 195–204 in *Probiotics and Prebiotics: Current Research and Future Trends*. Caister Academic Press, Norfolk, UK
4. Chen S, Chen L, Chen L, Ren X, Ge H, Li B, Ma G, Ke X, Zhu J, Feng Y, Li Y (2018) Potential probiotic characterization of *Lactobacillus reuteri* from traditional Chinese highland barley wine and application for room-temperature-storage drinkable yogurt. *J Dairy Sci*, 101(7): 5780–5788.
5. de Vries MC, Vaughan EE, Kleerebezem M, de Vos MM (2006) *Lactobacillus plantarum*-Survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int Dairy J*, 16: 1018–1028
6. FAO/WHO (2006) Probiotics in Food, Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. FAO Food Nutr. Pap. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy.
7. Gabor EM, de Vries EJ, and Janssen DB (2003) Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods, *FEMS Microbiol Ecol*, 44(2): 153–163.
8. Gibson GR, Saveedra JM, MacFarlane S, MacFarlane GT (1997) Probiotics and intestinal infections. Pages 10–39 in *Probiotic. 2: Applications and Practical Aspects*. R. Fuller, ed. Chapman & Hall, New York, NY
9. Guo XH, Kim JM, Namb HM, Park SY, Kim JM (2010) Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe*, 16:321–326.
10. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, and Sanders ME (2014) Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 11: 506–514.
11. Hirayama K, Rafter J (2000) The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect*, 2: 681–686

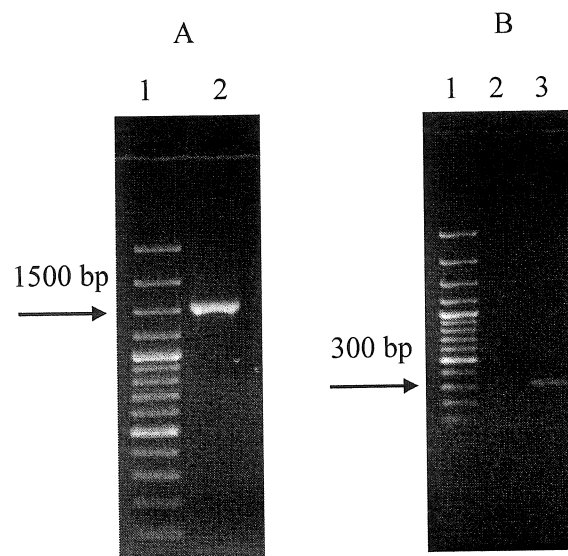
12. Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S (2001) Probiotics: Effects of immunity. *Am J Clin Nutr*, 73: 444S–450S.
13. Jensen H, Grimmer S, Naterstad K, Axelsson L (2012) In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*, 153: 216–222
14. Lee N K, Kim SY, Han KJ, Eom SJ, Paik HD (2014) Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with anti-allergic effects from kimchi for yogurt starters. *Lebensm Wiss Technol* 58: 130–134.
15. Lorea Baroja M, Kirjavainen PV, Hekmat S, Reid G (2007) Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients. *Clin Exp Immunol* 149: 470–479.
16. Mulaw G, Sisay Tessema T, Muleta D, Tesfaye A (2020) In vitro evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from some traditionally fermented Ethiopian food products. *Int J Microbiol*, 7179514.
17. Panwar H, Rashmi HM, Batish VK, Grover S (2013) Probiotics as potential biotherapeutics in the management of type 2 diabetes—Prospects and perspectives. *Diabetes Metab Res Rev*, 29: 103–112.
18. Ramos CL, Thorsen L, Schwan RF, Jespersen L (2013) Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiol*, 36: 22–29.
19. Reuben RC, Roy PC, Sarkar SL, Rubayet Ul Alam ASM, Jahid IK (2020) Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *J Dairy Sci*, 103(2):1223–1237.
20. Silanikove N, Leiner G, Merin U (2015) The Interrelationships between lactose intolerance and the modern dairy industry: global perspectives in evolutionary and historical backgrounds. *Nutrients*, 7: 7312–7331.
21. TMC (Transparency Market Research). 2013. Probiotics Market (Dietary Supplements, Animal Feed, Foods & Beverages) – Global Industry Analysis, Market Size, Share, Trends, Analysis, Growth and Forecast, 2012 – 2018. Accessed Jul. 31, 2018. <http://www.transparencymarketresearch.com/probiotics-market.html>.
22. TMC (Transparency Market Research). 2017. Digestive Health Products Market (Product Type – Dairy Products, Bakery Products and Cereals, Non-alcoholic Beverages; Ingredient – Probiotics, Prebiotics, Food Enzymes; Sales Channel – Modern Trade, Convenience Stores, Online Retailers) – Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast 2017–2022. Accessed Jul. 31, 2018. <https://www.transparencymarketresearch.com/digestive-health-products-market.html>
23. Torriani S, Felis GE, and Dellaglio F (2001) Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis

and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl Environ Microbiol*, 67: 3450–3454

24. Wang X, Zhang Y, Ren H, Zhan Y (2018) Comparison of bacterial diversity profiles and microbial safety assessment of salami, Chinese dry-cured sausage and Chinese smoked-cured sausage by high-throughput sequencing. *LWT - Food SciTechnol*, 90: 108–115. Food Science and Human Wellness
25. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMPA, Harris HMB, Mattarelli P, O'Toole PW, Pot B, Vandamme P, Walter, Watanabe K, Wuyts S, Felis GE, Gänzle MG, Lebeer S (2020) Taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J Syst Evol Microbiol*, 70(4): 2782–2858



Hình 1



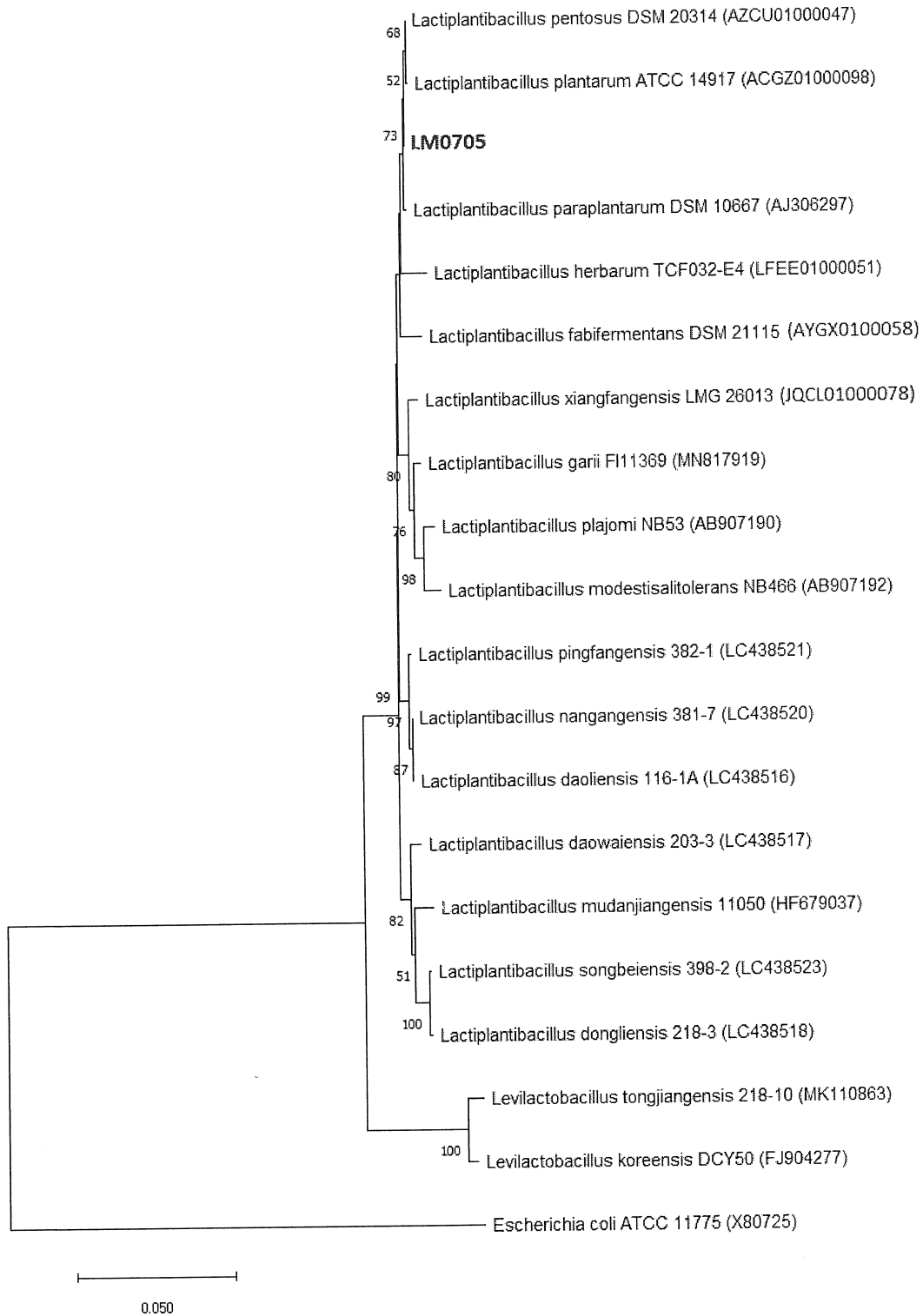
Hình 2

Ghi chú:

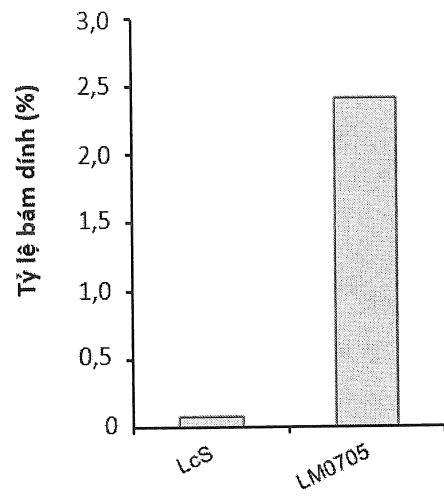
Hình 2A: Giếng 1: Marker; Giếng 2: Sản phẩm PCR gen 16S rARN của chủng LM0405

Hình 2B: Giếng 1: Marker; Giếng 2: Đối chứng (*L. casei* Shirota);

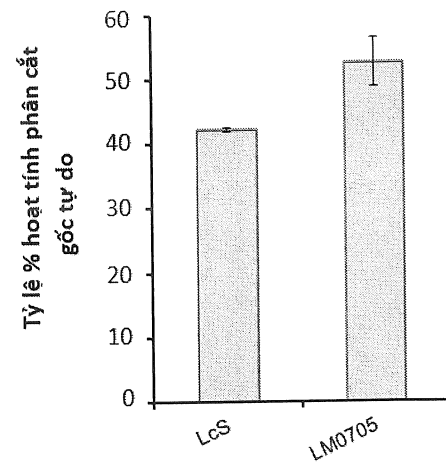
Giếng 3: Sản phẩm PCR đoạn gen *recA* của chủng LM0705



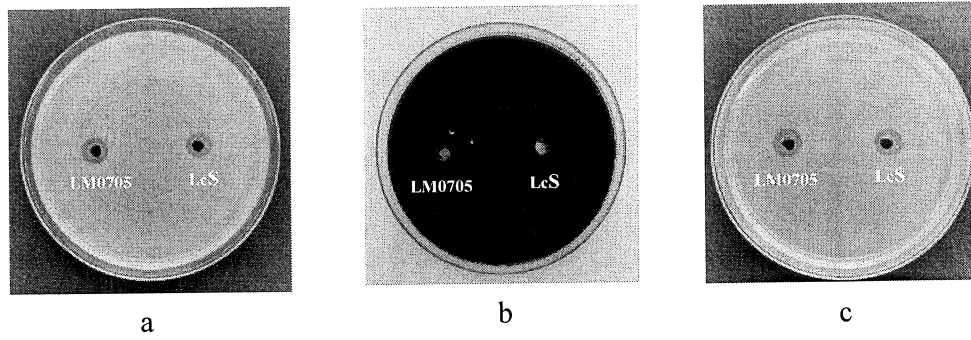
Hình 3



Hình 4



Hình 5



Hình 6

DANH MỤC TRÌNH TỰ

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

<120> Chúng vi khuẩn *Lactiplantibacillus plantarum* LM0705 thuần khiết về mặt sinh học với các đặc tính lợi khuẩn được phân lập từ mẫu lạp xương Mọc Châu, Sơn La

<160> 1

<210> 1

<211> 1460

<212> ADN

<213> *Lactiplantibacillus plantarum* LM0705

<400> 1

gctggcggcg	tgctaatac	atgcaagtcg	aacgaactct	ggtattgatt	ggtgcttgca	60
tcatgattta	catttgagtg	agtggcgaac	tggtgagtaa	cacgtgggaa	acctgcccag	120
aagcggggga	taacacctgg	aaacagatgc	taataccgca	taacaacttg	gaccgcatgg	180
tccgagtttg	aaagatggct	tcggctatca	cttttgatg	gtcccgcggc	gtattagcta	240
gatggtgagg	taacggctca	ccatggcaat	gatacgtagc	cgacctgaga	ggtaatcggc	300
cacattggga	ctgagacacg	gccccaaactc	ctacgggagg	cagcagtagg	gaatcttcca	360
caatggacga	aagtctgatg	gagcaacgcc	gcgtgagtga	agaagggttt	cggctcgtaa	420
aactctgttg	ttaaagaaga	acatatctga	gagtaactgt	tcaggtattg	acggtattta	480
accagaaaagc	cacggctaac	tacgtgccag	cagccgcggt	aatacgtagg	tggcaagcgt	540
tgtccggatt	tattgggcgt	aaagcgagcg	caggcggttt	tttaagtctg	atgtgaaagc	600
cttcggctca	accgaagaag	tgcatcgga	actgggaaac	ttgagtgcag	aagaggacag	660
tggaaactcca	tgtgtagcgg	tgaaatgcgt	agatatatgg	aagaacacca	gtggcgaagg	720
cggctgtctg	gtctgtaact	gacgctgagg	ctcgaaagta	tggttagcaa	acaggattag	780
ataccctggt	agtccatacc	gtaaacgatg	gaatgctaag	tggttgaggg	tttcgcct	840
tcagtgtgc	agctaacgca	ttaagcattc	cgctggggga	gtacggccgc	aaggctgaaa	900
ctcaaaggaa	ttgacggggg	ccgcacaaag	cgggtggagca	tgtggtttta	ttcgaagcta	960
cgcaagaac	cttaccaggt	cttgacatat	ctatgcaa	ctaagagatt	agacgttccc	1020
ttcggggaca	tggatacagg	tggtgcatgg	ttgtcgtcag	ctcgtgtcgt	gagatgttg	1080
gttaagtccc	gcaacgagcg	caacccttat	tatcagttgc	cagcattaag	ttgggcactc	1140
tggtgagact	gccggtgaca	aaccggagga	aggtggggat	gacgtcaa	catcatgccc	1200
ttatgacctg	ggctacacac	gtgctacaat	ggatggtaca	acgagttgcg	aactcgcgag	1260
agtaagctaa	tctcttaaag	ccattctcag	ttcggattgt	aggctgcaac	tcgcctacat	1320
gaagtcggaa	tcgctagtaa	tcgcggatca	gcatgccgcg	gtgaatacgt	tcccgggcct	1380
tgtacacacc	gcccgtcaca	ccatgagagt	ttgtaacacc	caaagtcggt	ggggtaacct	1440
tttaggaacc	agccgcctaa					1460