



(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) 
1-0020191

(51)⁷ **C12N 1/00, C12R 1/125, A61K 35/66** (13) **B**

(21) 1-2015-04370

(22) 12.11.2015

(45) 25.12.2018 369

(43) 25.01.2016 334

(73) **VIỆN VI SINH VẬT VÀ CÔNG NGHỆ SINH HỌC - ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI (VN)**

Nhà E2 - 144 đường Xuân Thủy, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Dương Văn Hợp (VN), Hoàng Văn Vinh (VN), Trịnh Thị Vân Anh (VN)

(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) **CHỦNG VI KHUẨN BACILLUS SUBTILIS VTCC-B-51 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC**

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* VTCC-B-51 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ đường tiêu hóa của lợn và các chế phẩm probiotic chứa chủng này được dùng làm nguyên liệu cho các ngành công nghiệp dược phẩm, thực phẩm, thực phẩm chức năng và thức ăn chăn nuôi. Chủng VTCC-B-51 theo sáng chế có khả năng tổng hợp các enzym tiêu hóa CMCaza, proteaza, α -amylaza với hoạt tính cao và có khả năng kháng tất cả các vi sinh vật bao gồm *E. Coli*, *Micrococcus* sp., *Candida* sp., *Fusarium* sp..

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* VTCC-B-51 thuần khiết về mặt sinh học, có khả năng sản sinh các enzym carboxymetyl xenlulaza (CMCaza), proteaza, α -amylaza với hoạt tính cao.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Bacillus subtilis (*B. subtilis*) là vi khuẩn hình que Gram dương, có kích thước (0,5-0,8) x (1,5-3) μm , đứng đơn lẻ hoặc thành chuỗi ngắn, thường được tìm thấy trong đất và trong đường tiêu hóa của động vật nhai lại và con người. *B. subtilis* có thể tạo nội bào tử bền, cho phép nó chịu được các điều kiện môi trường khắc nghiệt. *B. subtilis* là một trong những loài vi khuẩn có khả năng sinh ra enzym tốt nhất và được sử dụng trên quy mô công nghiệp ở các Công ty Công nghệ sinh học.

Được phát hiện và đặt tên vào năm 1872, nhưng phải đến năm 1941, đặc tính chữa bệnh của *B. subtilis* mới được biết đến khi các quân đoàn y tế của Đức Quốc Xã phát hiện ra rằng người dân ở Bắc Phi đã sử dụng phân ngựa hoặc lạc đà chứa chủng vi khuẩn này để chữa bệnh lỵ, từ đó chúng mới được sử dụng dưới dạng dịch nuôi cấy để phòng và chữa bệnh lỵ cho các binh sỹ chiến đấu ở đây. Tuy nhiên, mãi đến những năm 1949-1957, Henry, Albot và cộng sự mới phân lập thành công *B. subtilis* thuần khiết. Từ đó, chúng mới được dùng để điều trị các chứng viêm ruột, viêm đại tràng, chống tiêu chảy do lạm dụng kháng sinh hoặc do loạn khuẩn gây ra với tên gọi là “Subtilistherapie” (điều trị bằng subtilis).

B. subtilis có vai trò lớn trong việc giữ ổn định thể quân bình vi khuẩn ở trong ruột bằng bốn cơ chế chủ yếu bao gồm trung hòa độc tố, cạnh tranh với mầm gây bệnh, làm thay đổi chuyển hóa của vi sinh vật và kích thích miễn dịch của cơ thể vật chủ. *B. subtilis* có khả năng tổng hợp một số chất kháng sinh có tác dụng ức chế sinh trưởng và tiêu diệt một số loài vi khuẩn gây bệnh tạo điều kiện cho các vi khuẩn bình thường ở ruột phát triển tái lập lại trạng thái cân bằng. Các chất kháng sinh này tác dụng lên cả vi khuẩn gram âm lẫn gram dương, nấm gây bệnh như: bacitracin, bacilysin, baxilomicin (A, B, C, R), bacillopectin, mycobacillin, subtilin (A, B, C),

prolomicin, v.v.. Nhờ các kháng sinh này mà *B. subtilis* có khả năng cạnh tranh tốt với các vi khuẩn khác và người ta đã ứng dụng chúng để tái tạo lại sự cân bằng vi khuẩn trong ruột. Trong cơ thể, *B. subtilis* tổng hợp ra nhiều chất có hoạt tính sinh học có lợi cho cơ thể như các enzym thủy phân có lợi cho tiêu hóa ở ruột, chúng có vai trò làm ổn định độ pH ở ruột, hạn chế sự phát triển của vi khuẩn sinh hơi và vi khuẩn gây bệnh, cung cấp ngay cho cơ thể một số men cần thiết, làm cho tiêu hóa trở lại bình thường trong khi hệ vi khuẩn ở ruột chưa lập lại trạng thái cân bằng. Ở trong ruột, các chất sinh học này không chỉ được giải phóng khi *B. subtilis* còn sống mà ngay cả khi chúng đã chết, xác vi khuẩn vẫn tiếp tục giải phóng ra các enzym, kháng sinh, vitamin có lợi cho cơ thể. *B. subtilis* còn có khả năng đồng hóa một số vitamin như B2 (Riboflavin) đóng vai trò quan trọng trong hoạt động sống của cơ thể động thực vật, có mặt trong tất cả các tế bào, tham gia vào các quá trình dinh dưỡng và hô hấp của sinh vật. Ngoài ra, một số tác dụng lâm sàng của *B. subtilis* đã được biết như là tác nhân kích thích miễn dịch, nhờ tác dụng kích thích tiết IgA, một loại globulin tiết có trên bề mặt tế bào biểu mô niêm mạc có khả năng ức chế, ngăn chặn vi sinh vật gây bệnh xâm nhập vào cơ thể.

Trong số các đặc điểm nêu trên, khả năng sinh tổng hợp các enzym thủy phân là đặc tính đáng chú ý nhất với nhiều ứng dụng nhất. Các enzym thủy phân do *B. subtilis* sinh tổng hợp được bao gồm amylaza, proteaza, carboxy methyl xenlulaza (CMCaza), phytaza, xylanaza, v.v. với amylaza, proteaza, và CMCaza là các enzym quan trọng nhất nhờ đặc tính thủy phân tinh bột, protein và chất xơ, là các thành phần chủ yếu trong khẩu phần ăn hàng ngày của con người cũng như động vật, của chúng.

Với những đặc điểm nêu trên, *B. subtilis* được ứng dụng nhiều trong y học, nông nghiệp và trong công nghiệp thực phẩm dưới dạng chế phẩm sinh học hay còn gọi là probiotic, chứa các vi sinh vật sống có tác dụng làm cải thiện hệ vi sinh vật ở cơ thể vật chủ. Tương tự, ở nước ta, *B. subtilis* hiện đang được sử dụng dưới dạng chế phẩm probiotic hỗ trợ tiêu hóa sử dụng trực tiếp hoặc gián tiếp bằng cách bổ sung vào thức ăn và nước uống dùng cho người và vật nuôi. Ngoài ra, *B. subtilis* còn được sử dụng để xử lý môi trường nước trong nuôi trồng thủy sản. Mặc dù có rất nhiều ứng dụng, nhưng hiện tại nguồn cung cấp *B. subtilis* ở nước ta chủ yếu là từ nhập khẩu từ nước ngoài. Điều này làm cho chi phí sản xuất chế phẩm sinh học chứa *B. subtilis* tăng cao dẫn đến giá thành cao. Do đó, yêu cầu đặt ra là có nguồn cung cấp *B. subtilis* dồi dào

với giá thành vừa phải. Từ nhiệm vụ đó, nhóm tác giả đã triển khai các nghiên cứu để phân lập, tuyển chọn các chủng *B. subtilis* có hoạt tính enzym cao, nhằm tạo nên các chế phẩm thương mại chất lượng cao dựa trên các nguyên liệu trong nước, hạn chế nhập khẩu.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* VTCC-B-51 thuần khiết về mặt sinh học, có khả năng sản sinh các enzym như CMCaza, proteaza, α -amylaza, v.v., có hoạt tính cao, và có hoạt tính kháng khuẩn với nhiều ứng dụng trong thực tế.

Các dấu hiệu và các đặc điểm nổi bật của sáng chế sẽ được hiểu đầy đủ và được đánh giá đúng từ phần mô tả chi tiết sau đây dựa trên các hình vẽ kèm theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện hình thái khuẩn lạc của chủng VTCC-B-51 được nuôi cấy trên môi trường LB ở nhiệt độ 37°C;

Fig.2 thể hiện hình thái học của chủng VTCC-B-51 dưới kính hiển vi;

Fig.3 thể hiện kết quả điện di kiểm tra đoạn gen 16S rARN của chủng VTCC-B-51;

Fig.4 thể hiện cây phát sinh chủng VTCC-B-51 theo sáng chế;

Fig.5 là hình ảnh thể hiện hoạt tính enzym của chủng VTCC-B-51 và các chủng vi sinh vật đối chứng;

Fig.6 là hình ảnh thể hiện hoạt tính kháng khuẩn của VTCC-B-51 và các chủng vi sinh vật đối chứng; và

Fig.7 là hình ảnh thể hiện khả năng chống chịu muối mật của VTCC-B-51 và các chủng vi sinh vật đối chứng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế sẽ được thể hiện rõ ràng hơn trong phần mô tả chi tiết các phương án thực hiện sau đây. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các phương án đó.

Theo sáng chế, các môi trường dinh dưỡng được sử dụng bao gồm:

1. Môi trường canh Luria (Luria broth-LB): Bacto- trypton 10 g; cao nấm men 5 g; NaCl 10 g; nước cất vừa đủ 1000 ml; pH 7,0; hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 15 phút.

2. Môi trường thạch LB: Bacto- trypton 10g; cao nấm men 5 g; NaCl 10 g; thạch 12 g; nước cất vừa đủ 1000 ml; pH 7,0; hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 15 phút.

3. Môi trường thạch dinh dưỡng (Nutrient agar – NA): pepton thịt 5 g; cao thịt 3 g; thạch 12 g; nước cất vừa đủ 1000 ml; hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút.

4. Môi trường MRS dịch thể: Pepton 10,0 g; cao thịt 10,0 g; cao nấm men 5,0 g; đường glucoza 20,0 g; tween 80 (polyoxyetylen sorbitan monooleat) 1 ml; K₂HPO₄ 2,0 g; CH₃COONa 5,0 g; triamoni xitrat 2,0 g; MgSO₄.7H₂O 0,58 g; MnSO₄.4H₂O 0,28 g; nước cất vừa đủ 1000 ml; thạch 10,0 g; độ pH 7,0; hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 15 phút.

5. Môi trường tạo bào tử DSM (Difco Sporulation Medium): Canh dinh dưỡng Difco 8,0 g; KCl 1,0 g; MgSO₄.7H₂O 0,25 g; nước cất vừa đủ 1000 ml; độ pH 7,0; hấp tiệt trùng ở nhiệt độ 121°C trong thời gian 20 phút, để nguội đến 50-60°C; trước khi sử dụng bổ sung 1 ml Ca(NO₃)₂ 1 M, 1 ml MnCl₂ 0,01 M, và 1 ml FeSO₄ 1 mM.

6. Môi trường MP lỏng: Cao mạch nha 20 g; dịch chiết khoai tây 250 g; glucoza 20 g; nước cất vừa đủ 1000 ml.

7. Môi trường thạch dinh dưỡng MPA: Pepton 5,0 g; NaCl 5,0 g; cao thịt 5,0 g; thạch 20,0 g; nước cất vừa đủ 1000 ml; độ pH 7,5.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất chủng *B. subtilis* VTCC-B-51 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ đường tiêu hóa của lợn.

Phân lập và định danh chủng *B. subtilis* VTCC-B-51

Tiến hành phân lập chủng vi khuẩn từ mẫu đường tiêu hóa lợn bằng cách nuôi cấy trên đĩa chứa môi trường dinh dưỡng thích hợp để tạo khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn có trong mẫu, từ đó thu được các chủng vi khuẩn thuần khiết. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực vi sinh vật sẽ có thể dễ dàng thực hiện việc chọn môi trường và các thao tác nuôi cấy các chủng vi khuẩn trong quá trình phân lập này. Môi

trường thường được dùng trong quá trình phân lập được đề cập ở đây là môi trường LB.

Sau một thời gian nuôi cấy nhất định, quan sát thấy có sự xuất hiện của các khuẩn lạc riêng rẽ có đặc điểm hình thái nhô cao, có dạng hình tròn, mép trơn nhẵn hoặc gồ ghề, bề mặt khô màu trắng sữa, và không tiết sắc tố ra môi trường như được thể hiện trên Fig.1 và được đặt tên là VTCC-B-51. Trong số các khuẩn lạc đó, lựa chọn một khuẩn lạc đặc trưng nhất, cấy vào ống thạch nghiêng LB để lưu chủng cho phân định danh và các thử nghiệm tiếp theo.

Cấy chuyển chủng VTCC-B-51 vào đĩa petri chứa môi trường thạch LB, sau khi phát triển ổn định, tiến hành nhuộm gram và chụp soi dưới kính hiển vi, cho thấy hình ảnh hình thái học tế bào như được thể hiện trên Fig.2, đây là vi khuẩn hình que gram dương. Dựa vào đặc điểm hình thái học của khuẩn lạc và tế bào như trên, có thể sơ bộ xác định được VTCC-B-51 thuộc chi *Bacillus*.

Thực hiện phân tích 16S rARN, trình tự gen 16S rARN của chủng VTCC-B-51 phân lập được như được thể hiện bằng SEQ ID số 1. Đối chiếu kết quả phân tích 16S rARN thu được với Ngân hàng dữ liệu gen của Trung tâm thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia Hoa Kỳ (National Center for Biotechnology Information - NCBI) cho thấy trình tự gen 16S rARN của chủng VTCC-B-51 tương đồng 99,87% với trình tự gen 16S rARN của chủng *B. subtilis subsp. subtilis* NCIB 3610(T).

Kết quả trên thể hiện rằng chủng VTCC-B-51 phân lập được từ đường tiêu hóa của lợn nê trên thuộc loài *Bacillus subtilis* và được xác định là chủng *B. subtilis* mới. Chủng VTCC-B-51 được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật Việt Nam (VTCC) ngày 4/11/2014 với số hiệu lưu giữ là VTCC-B-51.

Khả năng sinh tổng hợp enzym của chủng VTCC-B-51

Khả năng sinh tổng hợp enzym của chủng VTCC-B-51 được khảo sát và so sánh với hoạt tính của các chủng đối chứng bao gồm các chủng *Bacillus subtilis* khác và chủng *Lactobacillus* nhận từ Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Việt Nam (Vietnam Type Culture Collection - VTCC), trong đó các chủng đối chứng này là các chủng thường được sử dụng trong các chế phẩm probiotic.

Phương pháp khảo sát hoạt tính enzym được sử dụng là phương pháp đục lỗ thạch dựa trên nguyên tắc khi bổ sung các loại enzym vào trong lỗ thạch, chúng sẽ khuếch tán ra môi trường thạch xung quanh, thủy phân cơ chất có trong môi trường thạch đĩa, và sau một thời gian nhất định sẽ xuất hiện vòng phân giải màu trong suốt quanh lỗ thạch này, dựa vào hiệu số đường kính vòng phân hủy và đường kính lỗ thạch có thể xác định đường kính vòng phân giải, từ đó đánh giá được hoạt tính enzym của chủng khảo sát.

Chủng VTCC-B-51 và các chủng *Bacillus subtilis* đối chứng được nuôi cấy trong môi trường LB dịch thể, trong khi chủng *Lactobacillus* đối chứng được nuôi cấy trong môi trường MRS dịch thể.

VTCC-B-51 và các chủng đối chứng (sau đây gọi chung là các chủng khảo sát) được nuôi cấy trong các môi trường nêu trên trong thời gian 24 giờ. Sau đó, hút dịch nuôi cấy và ly tâm để lấy phần dịch nổi lên phía trên chứa các enzym sinh ra bởi các chủng khảo sát. Các môi trường để thử hoạt tính enzym được chuẩn bị với các cơ chất bao gồm tinh bột, protein và xenluloza với nồng độ 0,1%. Dùng ống hút đục lỗ trên các đĩa thạch chứa cơ chất và nhỏ dịch nuôi cấy của các chủng khảo sát vào các lỗ thạch với lượng dịch tương đương nhau. Ủ đĩa thạch ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Sau đó nhuộm bằng thuốc nhuộm tương ứng và quan sát kết quả. Hoạt tính enzym được đánh giá bằng đường kính vòng phân giải cơ chất, đường kính càng lớn thì hoạt độ càng cao. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực vi sinh vật sẽ có thể dễ dàng thực hiện việc lựa chọn các loại thuốc nhuộm tương ứng dùng trong quá trình xác định hoạt tính enzym này.

Như được thể hiện trên Fig.5, các đĩa thạch (a), (b) và (c) lần lượt chứa xenluloza, tinh bột và protein dùng để thử hoạt tính các enzym CMCaza, amylaza và proteaza tương ứng, và các vị trí được đánh số 1, 2, 3, 4, 5 là các vị trí thử nghiệm đối với các chủng VTCC-B-51, *Bacillus* sp. VTCC-B-681, *Bacillus* sp. VTCC-B-958, *Bacillus* sp. VTCC-B-1247, và *Lactobacillus* sp. VTCC-B-384, tương ứng.

Ở đây, các chủng đối chứng là các chủng vi sinh vật đã được biết đến là có hoạt tính probiotic, và đang được ứng dụng nhiều trong ngành công nghiệp thức ăn chăn nuôi, cũng như men tiêu hóa ở Việt Nam hiện nay. Trong đó, chủng *Bacillus* sp. VTCC-B-681 được phân lập từ đất, có trình tự mã hóa 16S rARN có kích thước

1536bp được thể hiện trong SEQ ID NO:2, và được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Việt Nam với các số hiệu lưu giữ VTCC-B-681, JCM 9154; chủng *Bacillus* sp. VTCC-B-958 được phân lập từ rong biển, có trình tự mã hóa 16S rARN có kích thước 1337bp được thể hiện trong SEQ ID NO:3, và được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Việt Nam với số hiệu lưu giữ VTCC-B-958; chủng *Bacillus* sp. VTCC-B-1247 được phân lập từ đất, có trình tự mã hóa 16S rARN có kích thước 1438bp được thể hiện trong SEQ ID NO:4, và được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Việt Nam với số hiệu lưu giữ VTCC-B-1247; và đặc biệt, chủng *Lactobacillus* sp. VTCC-B-384 được phân lập từ sản phẩm lên men truyền thống có trình tự mã hóa 16S rARN có kích thước 1560 bp được thể hiện trong SEQ ID NO:5, và được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Việt Nam với số hiệu lưu giữ VTCC-B-384.

Như được thể hiện trên đĩa (a), dịch nuôi cấy các chủng ở các vị trí từ 1 đến 4 có khả năng phân giải xenluloza với hoạt độ mạnh và tương đương nhau, được đặc trưng bởi đường kính vòng phân giải lớn; trong khi chủng ở vị trí 5 không thể hiện khả năng này. Tương tự, như được thể hiện trên đĩa (b), dịch nuôi cấy các chủng ở các vị trí từ 1 đến 4 có khả năng phân giải tinh bột với các hoạt độ khác nhau, được đặc trưng bởi đường kính vòng phân giải lớn đối với chủng ở các vị trí 1 và 4, vừa phải đối với chủng ở vị trí 2 và nhỏ đối với chủng ở vị trí 3; trong khi chủng ở vị trí 5 không thể hiện khả năng này. Như được thể hiện trên đĩa (c), dịch nuôi cấy các chủng ở các vị trí 1, 3 và 4 có khả năng phân giải protein với hoạt độ mạnh, được đặc trưng bởi các đường kính vòng phân giải lớn và tương đương nhau; trong khi các chủng ở vị trí 2 và ở vị trí 5 không thể hiện khả năng này. Các kết quả thử nghiệm được tóm tắt trong bảng 1 dưới đây:

Bảng 1. Hoạt tính enzym của chủng VTCC-B-51 so với các chủng đối chứng.

Hoạt tính enzym (D-d)*	Chủng phân tích	Chủng đối chứng			
	VTCC-B-51	VTCC-B-681	VTCC-B-958	VTCC-B-1247	VTCC-B-384
CMCaza	20 mm	18 mm	17 mm	16 mm	0
Amylaza	17 mm	15 mm	12 mm	15 mm	0
Proteaza	20 mm	0 mm	18 mm	19 mm	0

*Ghi chú: D – đường kính phân giải của chủng; d – đường kính lỗ thạch

Như được thể hiện trong bảng 1 nêu trên, có thể thấy rằng trong số các chủng khảo sát, có ba chủng vi khuẩn là VTCC-B-51, VTCC-B-958 và VTCC-B-1247 đều có hoạt tính amylaza, proteaza và CMCaza. Tuy nhiên, chủng VTCC-B-51 theo sáng chế thể hiện hoạt độ mạnh và đồng đều nhất. Từ kết quả thu được, có thể khẳng định rằng chủng VTCC-B-51 có khả năng sinh tổng hợp các enzym với hoạt tính cao.

Khả năng kháng khuẩn và kháng nấm của chủng VTCC-B-51

Khả năng kháng khuẩn và kháng nấm của chủng VTCC-B-51 được khảo sát theo phương pháp khuếch tán trên thạch sử dụng các chủng vi sinh vật kiểm định bao gồm *E. Coli*, *Micrococcus* sp., *Candida* sp., *Fusarium* sp. nhận từ Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Việt Nam (VTCC).

Nuôi cấy các vi sinh vật kiểm định trong môi trường MP lỏng trong thời gian 16 giờ ở nhiệt độ 37°C, sau đó bổ sung vào môi trường MPA đã khử trùng và làm nguội đến 40°C, trộn đều và đổ vào các đĩa petri. Đục lỗ trên các đĩa thạch đã cấy vi sinh vật kiểm định, nhỏ dịch nuôi cấy của chủng VTCC-B-51 và các chủng đối chứng thu được theo cách tương tự bước thử hoạt tính enzym nêu trên vào các lỗ thạch với lượng dịch tương đương nhau. Ủ đĩa thạch ở nhiệt độ 37°C qua đêm. Sau đó nhuộm bằng thuốc nhuộm tương ứng và quan sát kết quả. Hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm được xác định bằng đường kính vòng phát triển của vi sinh vật thử nghiệm, đường kính càng lớn thì hoạt tính kháng càng cao.

Trên Fig.6, các đĩa thạch (a), (b), (c) và (d) lần lượt là các đĩa thạch nuôi cấy các chủng vi sinh vật kiểm định *E. Coli*, *Micrococcus* sp., *Candida* sp., *Fusarium* sp. tương ứng, và các vị trí được đánh số 1, 2, 3, 4, 5 là các vị trí thử nghiệm đối với các chủng VTCC-B-51, VTCC-B-681, VTCC-B-958, VTCC-B-1247 và VTCC-B-384, tương ứng. Như được thể hiện trên đĩa (a), dịch nuôi cấy các chủng ở các vị trí từ 1 đến 4 có khả năng kháng *E. Coli* với các hoạt độ khác nhau, được đặc trưng bởi các đường kính vòng phát triển ở vị trí 1 lớn, ở vị trí 3 và 4 vừa phải và ở vị trí 2 nhỏ; trong khi chủng ở vị trí 5 không thể hiện khả năng này. Tương tự, như được thể hiện trên đĩa (b), chỉ có dịch nuôi cấy các chủng ở các vị trí 1 và 5 có khả năng kháng *Micrococcus* sp. với hoạt độ vừa phải được đặc trưng bởi các đường kính vòng phát triển vừa phải; trong khi các chủng ở các vị trí từ 2 đến 4 không thể hiện khả năng này. Như được thể hiện trên đĩa (c), dịch nuôi cấy các chủng 1, 3 và 4 có khả năng phân

giải protein với các đường kính vòng phân giải lớn và tương đương nhau, trong khi các chủng 2 và 5 không thể hiện khả năng này. Hình ảnh kết quả thử nghiệm được thể hiện trên Fig.6 và các kết quả thử nghiệm được tóm tắt trong bảng 2 dưới đây:

Bảng 2. Hoạt tính kháng vi sinh vật của chủng VTCC-B-51 so với các chủng đối chứng.

Hoạt tính kháng vi sinh vật (D) *	Chủng phân tích	Chủng đối chứng			
	VTCC-B-51	VTCC-B-681	VTCC-B-958	VTCC-B-1247	VTCC-B-384
<i>E. Coli</i>	23 mm	15 mm	18 mm	18 mm	0 mm
<i>Micrococcus</i> sp.	10 mm	0 mm	0 mm	0 mm	9 mm
<i>Candida</i> sp.	20 mm	18 mm	18 mm	15 mm	0 mm
<i>Fusarium</i> sp.	20 mm	0 mm	10 mm	16 mm	0 mm

*Ghi chú: D – đường kính kháng vi sinh vật

Từ kết quả thu được trong bảng 2 nêu trên, có thể thấy rằng dịch nuôi cấy của chủng VTCC-B-51 có khả năng kháng tất cả các chủng vi sinh vật kiểm định được sử dụng trong nghiên cứu với hoạt độ mạnh; trong khi các chủng *Bacillus* sp. VTCC-B-681 chỉ thể hiện hoạt tính kháng *E. Coli* và *Candida* sp. với hoạt độ yếu, *Bacillus* sp. VTCC-B-958 thể hiện hoạt tính kháng *E. Coli* và *Candida* sp. với hoạt độ trung bình, kháng *Fusarium* sp. với hoạt độ yếu, *Bacillus* sp. VTCC-B-1247 thể hiện hoạt tính kháng *E. Coli* và *Fusarium* sp. với hoạt độ trung bình, kháng *Candida* sp. với hoạt độ yếu, và *Lactobacillus* sp. VTCC-B-384 chỉ thể hiện hoạt tính kháng *Micrococcus* sp. với hoạt độ trung bình. Từ kết quả thu được, có thể khẳng định rằng chủng VTCC-B-51 có khả năng kháng tất cả các loại vi sinh vật kiểm định nêu trên với hoạt tính vượt trội so với các chủng vi sinh vật đối chứng.

Đặc tính probiotic của chủng VTCC-B-51

Thông thường, muối mật trong dịch tiêu hóa của động vật có vú dao động từ 1-3%. Do đó, các chủng vi sinh vật hữu ích muốn khu trú và phát huy tác dụng được trong đường tiêu hóa của động vật phải có khả năng tồn tại và phát triển trong nồng độ muối mật tương ứng (> 2%). Như vậy, khả năng chịu được muối mật ở các nồng độ khác nhau là tiêu chí quan trọng để đánh giá các đặc tính probiotic của chủng vi khuẩn.

Khả năng chống chịu muối mật của VTCC-B-51 được khảo sát thông qua khả năng phát triển ở các nồng độ muối mật 1-6% và so sánh với các chủng đối chứng bao gồm các chủng *Bacillus clausii* VTCC-B-52, *Bacillus* sp. VTCC-B-681, *Bacillus* sp. VTCC-B-958, *Lactobacillus* sp. VTCC-B-384, *Bacillus* sp. VTCC-B-1247, *Bacillus* sp. VTCC-B-661. Ở đây, chủng *Bacillus clausii* VTCC-B-52 được phân lập từ đường tiêu hóa của lợn, có trình tự mã hóa 16S rARN có kích thước 1359bp được thể hiện trong SEQ ID NO:6, và được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Việt Nam với số hiệu lưu giữ VTCC-B-52; chủng *Bacillus* sp. VTCC-B-661 được phân lập từ đất, có trình tự mã hóa 16S rARN có kích thước 1456bp được thể hiện trong SEQ ID NO:7, và được lưu giữ tại Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Việt Nam với các số hiệu lưu giữ VTCC-B-661, JCM 2889; và các chủng *Bacillus* sp. VTCC-B-681, *Bacillus* sp. VTCC-B-958, *Bacillus* sp. VTCC-B-1247 và *Lactobacillus* sp. VTCC-B-384 được xác định như nêu trên.

Môi trường dùng để thử khả năng chống chịu muối mật là môi trường NA có bổ sung muối mật có các nồng độ thay đổi từ 1-6%. Lần lượt nhỏ 5 μ l dịch nuôi cấy của VTCC-B-51 và các chủng đối chứng thu được theo cách tương tự bước thử hoạt tính enzym nêu trên lên bề mặt các đĩa thạch. Ủ các đĩa thạch ở nhiệt độ 37°C qua đêm và quan sát kết quả. Khả năng chống chịu muối mật được xác định bằng việc quan sát sự phát triển của các chủng trên các đĩa thạch với các nồng độ muối mật ở trên.

Trên Fig.7, các đĩa thạch (a), (b), (c), (d), (e) và (f) lần lượt có nồng độ muối mật tương ứng là 1%, 2%, 3%, 4%, 5% và 6%, và các vị trí được đánh số từ 1 đến 7 là các vị trí thử nghiệm đối với các chủng VTCC-B-51, VTCC-B-52, VTCC-B-681, VTCC-B-958, VTCC-B-384, VTCC-B-1247, và VTCC-B-661, tương ứng. Kết quả thử nghiệm thu được được tóm tắt trong bảng 3 dưới đây:

Bảng 3. Khả năng chống chịu muối mật của chủng VTCC-B-51 so với các chủng đối chứng.

Nồng độ muối mật	Chủng phân tích	Chủng đối chứng					
	VTCC-B-51	VTCC-B-52	VTCC-B-681	VTCC-B-958	VTCC-B-384	VTCC-B-1247	VTCC-B-661
1%	+++	++	++	-	-	++	-

2%	+++	++	++	-	-	++	-
3%	+++	++	++	-	-	++	-
4%	+++	++	++	-	-	++	-
5%	+++	++	++	-	-	++	-
6%	+++	++	++	-	-	++	-

Trong bảng 3 nêu trên, dấu (+) thể hiện có khả năng chống chịu muối mật và được đánh dấu (+) càng nhiều thì hoạt tính kháng càng mạnh, và dấu (-) thể hiện không có khả năng chịu muối mật. Như được thể hiện, dịch nuôi cấy của các chủng VTCC-B-51, VTCC-B-52, VTCC-B-681 và VTCC-B-1247 có khả năng chịu muối mật ở nồng độ đến 6%; trong khi các chủng VTCC-B-958, VTCC-B-384 và VTCC-B-661 không có khả năng chịu muối mật. Từ kết quả thu được, có thể khẳng định rằng chủng VTCC-B-51 có khả năng chống chịu muối mật tốt và do đó có thể phát triển tốt trong đường tiêu hóa của động vật.

Phương án khác của sáng chế đề xuất chế phẩm probiotic chứa chủng VTCC-B-51 theo sáng chế. Cả hai dạng tế bào và bào tử của chủng VTCC-B-51 đều có thể được sử dụng. Tốt nhất là sử dụng dạng bào tử của nó nhờ tính ổn định cao khi bảo quản, vận chuyển và sử dụng. Theo sáng chế, ngoài chủng VTCC-B-51, chế phẩm còn chứa các chủng vi sinh vật hữu ích khác được lựa chọn từ nhóm bao gồm *Saccharomyces boulardi*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus pentosaceus* và *Lactobacillus fermentum*.

Ngoài ra, chế phẩm probiotic theo sáng chế còn bao gồm thêm các chất mang, thích hợp được sử dụng trong các ngành dược phẩm và thực phẩm. Các ví dụ về chất mang bao gồm tinh bột, dextrin và đạm, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở các loại chất mang này. Các chuyên gia trong lĩnh vực này có thể lựa chọn chất mang thích hợp tùy điều kiện cụ thể.

Theo phương án thực hiện của sáng chế, chế phẩm probiotic chứa chủng VTCC-B-51 có thể được sử dụng dưới nhiều dạng công thức khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở dạng bột hoặc dạng dịch thể, tốt hơn là ở dạng bột, tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở dạng này và các chuyên gia trong cùng lĩnh vực kỹ thuật có thể lựa chọn dạng công thức thích hợp tùy điều kiện cụ thể.

(1) Dạng bột: Chế phẩm bột bào tử VTCC-B-51 có thể được sản xuất bằng cách cho bào tử VTCC-B-51 hấp phụ lên chất mang thích hợp và sấy khô để tạo ra thành phẩm.

(2) Dạng dịch thể: Chế phẩm probiotic dạng dịch thể có thể được sản xuất bằng cách tạo huyền phù bào tử chủng VTCC-B-51 trong môi trường lên men thích hợp.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được minh họa chi tiết hơn qua các ví dụ thực hiện cụ thể dưới đây. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này, mà phạm vi bảo hộ của sáng chế sẽ được xác định dựa trên các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ 1: Phân lập và định danh chủng VTCC-B-51

1. Phân lập

Mẫu đường tiêu hóa (ruột non, manh tràng) của lợn được thu gom từ Viện Chăn nuôi, và được bảo quản đông lạnh ở nhiệt độ 4-8°C trong lọ sạch tiệt trùng để đảm bảo không bị nhiễm tạp các vi sinh vật từ môi trường cho đến khi phân tích.

Cân 1 g mẫu, pha loãng trong dung dịch muối đệm phosphat PBS (phosphate buffer saline) (5 g/45 ml) và lắc đều trong 30 phút. Sau đó xử lý ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 10 phút và trải trên môi trường LB ở các nồng độ pha loãng khác nhau từ 10⁻¹ đến 10⁻⁶. Ủ mẫu trải ở nhiệt độ 37°C. Sau 1 ngày quan sát thấy có sự xuất hiện của các khuẩn lạc. Sau 2 ngày, các khuẩn lạc này phát triển thành các cụm khuẩn lạc nhô cao, có dạng hình tròn, mép trơn nhẵn hoặc gồ ghề, bề mặt khô, màu trắng sữa có kích thước 4,0-6,0 mm và không tiết sắc tố ra môi trường. Chọn các khuẩn lạc đặc trưng nhất, cấy vào các ống thạch nghiêng LB để lưu chủng cho phần định danh và sử dụng sau. Chủng này được đặt tên là VTCC-B-51 với hình thái khuẩn lạc như được thể hiện trên Fig.1. Chọn một khuẩn lạc riêng rẽ và có hình thái học đặc trưng nhất, cấy vào các ống thạch nghiêng LB và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ để vi sinh vật phát triển, sau đó chuyển vào tủ lạnh để bảo quản và lưu chủng cho phần định danh và sử dụng sau. Đồng thời, tiến hành làm tiêu bản, nhuộm gram và chụp soi kính hiển vi, nhận thấy tế bào chủng VTCC-B-51 bắt màu gram dương, có hình que với kích thước (0,51-0,71) x (1,67-1,98) µm, đứng đơn lẻ hoặc thành chuỗi ngắn, như được thể hiện trên Fig.2.

Dựa vào đặc điểm hình thái học của khuẩn lạc và tế bào như trên, có thể sơ bộ xác định được VTCC-B-51 thuộc chi *Bacillus*.

2. Định danh

Từ chủng VTCC-B-51 phân lập được ở trên, thực hiện tách chiết ADN và thực hiện nhân gen sử dụng máy PCR theo hướng dẫn của nhà sản xuất sử dụng cặp mồi 9F/1525R được thiết kế dựa vào trình tự có tính bảo thủ cao của gen 16S ở sinh vật có nhân điển hình.

Mồi xuôi 9F: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

Mồi ngược 1525R: 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'

Sau khi phản ứng PCR kết thúc, thực hiện điện di kiểm tra trên gel agarosa 1%, nhuộm bằng dung dịch ethidi bromua-EtBr (nồng độ 0,5 µl/ml) trong thời gian 20 phút và sau đó soi bản gel dưới tia tử ngoại. Như được thể hiện trên Fig.3, với mẫu đối chứng âm 1, mẫu đối chứng dương 2, mẫu phân tích 3 và thang chuẩn ADN (200bp), có thể xác nhận phản ứng PCR đã xảy ra một cách thành công.

Sau đó, sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, Đức) theo chỉ dẫn của nhà sản xuất và kiểm tra độ tinh sạch của mẫu trên máy quang phổ khả kiến ở các bước sóng 260 nm và 280 nm cho tỷ lệ tinh sạch là OD 260/OD280 > 1,7. Từ đó, xác nhận sản phẩm PCR đã đạt độ tinh sạch như yêu cầu.

Tiếp tục thực hiện khuếch đại ADN đối với sản phẩm PCR tinh sạch sử dụng bộ kit ABI PRISM Cycle Sequencing (Perkin-Elmer Applied Biosystem, US) và cặp mồi 27F/1492R được thiết kế dựa vào trình tự của gen 16S.

Mồi 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'

Sản phẩm thu được sau phản ứng này là các đoạn ADN đơn được duỗi ra. Tiến hành tinh sạch mẫu thu được, làm khô mẫu bằng máy cô quay chân không trong thời gian 3-5 phút, sau đó thêm 10 µl Hi-DiTM formamid (Applied Biosystem, US), trộn đều sau đó ủ ở nhiệt độ 96°C trong thời gian 2 phút và để trên đá lạnh trước khi cho vào máy đọc trình tự tự động.

Trình tự của gen 16S rARN của chủng VTCC-B-51 được đọc trực tiếp trên máy đọc trình tự tự động 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystem, US). Kết quả xác định được trình tự có kích thước 1508bp. So sánh kết quả trình tự thu được với các trật tự của các loài đã được xác định trong Ngân hàng gen cho thấy trình tự gen 16S rARN của chủng VTCC-B-51 tương đồng 99,87% với trình tự gen 16S rRNA của chủng *Bacillus subtilis subsp. subtilis* NCIB 3610(T). Mối quan hệ phát sinh chủng loài của VTCC-B-51 được xây dựng sử dụng phần mềm Mega 6.0, BioEdit và được thể hiện ở Fig.4.

Ví dụ 2. Sản xuất giống gốc VTCC-B-51

Trong sản xuất vi sinh, giống thường được dự trữ với số lượng lớn (giống gốc) đủ để đảm bảo đủ dùng trong vài năm, không cần phải cấy chuyển và biến đổi di truyền. Do đó, việc chuẩn bị giống tốt là điều kiện tiên quyết cho quá trình sản xuất.

Cấy chuyển mẫu giống VTCC-B-51 được lưu giữ từ ví dụ 1 trong đĩa thạch LB và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ, quan sát thấy sự xuất hiện của các khuẩn lạc như được mô tả ở trên. Lấy một khuẩn lạc riêng rẽ, đặc trưng của *Bacillus subtilis* mới mọc để cấy lên thạch nghiêng LB và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ để tế bào phát triển tốt, ổn định. Tiến hành làm tiêu bản và nhuộm Gram để kiểm tra độ tinh khiết của ống giống thạch nghiêng.

Dùng pipet chuyển 4 ml nước muối sinh lý đã tiệt trùng vào ống thạch nghiêng đã kiểm tra là tinh khiết, cào vi khuẩn hòa lên để tạo dịch huyền phù tế bào.

Cấy 2 ml dịch tế bào vào bình nuôi cấy (bình Roux) chứa môi trường tạo bào tử DSM, ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 3 ngày để chủng VTCC-B-51 phát triển tốt và tạo bào tử.

Dùng pipet thêm 10 ml nước muối sinh lý đã tiệt trùng vào bình và cào vi khuẩn hòa lên để tạo dịch bào tử. Thu dịch bào tử thu được, kiểm tra độ tinh khiết của dịch bào tử bằng cách làm tiêu bản và nhuộm Gram. Sau khi xác nhận được dịch bào tử là tinh khiết, bổ sung môi trường đông khô sữa gầy 5% với thể tích tương đương, trộn đều để thu được dịch huyền phù đồng nhất. Dùng pipet vô trùng nhỏ dịch huyền phù vào từng lọ đông khô (lọ ampul) trong điều kiện vô trùng, lắp vào hệ thống đông khô để tiến hành đông khô mẫu trong thời gian từ 24-30 giờ, hàn đóng ống đông khô trong

chân không. Kiểm tra chân không của các ống bằng đèn cực tím, loại bỏ các ống không đạt và bảo quản ống đông khô đạt tiêu chuẩn ở nhiệt độ 4°C trong tủ lạnh.

Ví dụ 3. Sản xuất chế phẩm probiotic từ chủng VTCC-B-51 dạng bột

Nhân giống và lên men trong môi trường dịch thể

Hồi phục giống từ ống đông khô chủng VTCC-B-51 trong 1 ml nước muối sinh lý tiệt trùng rồi cấy ria trên đĩa thạch LB, và ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 24 giờ để làm trẻ giống trước khi lên men. Sau đó chủng VTCC-B-51 được cấy vào bình tam giác có chứa 150 ml môi trường LB dịch thể, đồng thời lắc ủ (tốc độ khuấy 220 vòng/phút ở nhiệt độ 37°C) trong thời gian 48-56 giờ để tăng sinh. Sau đó, giống từ bình tam giác được cấy chuyển sang các bình tam giác khác có chứa môi trường DSM và đem lắc trong điều kiện tương tự như trên để chủng có thể thích nghi trước cho vào nồi lên men.

Giống sau khi nhân giống được cấy chuyển vào nồi lên men đã có sẵn môi trường DSM đã khử trùng theo tỷ lệ 5 - 10% (v/v). Quá trình lên men diễn ra trong điều kiện kị khí, ở nhiệt độ 37°C, tốc độ khuấy 220 vòng/phút, thời gian lên men từ 48-56 giờ.

Thu nhận sinh khối vi sinh vật

Sau thời gian lên men, dịch nuôi cấy thu được đem li tâm ở tốc độ 12.000 vòng/phút trong thời gian 20 phút để thu nhận sinh khối bào tử. Rửa lại sinh khối bào tử bằng môi trường lên men nêu trên.

Sản xuất chế phẩm Probiotic

Sinh khối bào tử (SKBT) thu được sẽ được trộn với dextrin, natri glutamat (NG), nước vô trùng (NVT) theo tỷ lệ (w/v): 5% SKBT + 20% dextrin + 1% NG + 74% NVT, làm khô bằng phương pháp sấy phun (nhiệt độ không khí đầu vào vòi phun: 180°C; nhiệt độ không khí đầu ra vòi phun: 60°C, tốc độ bơm: 2 lít/giờ, thời gian lưu 3 giây, tốc độ phun sấy 20.000 vòng/phút).

Kiểm tra chất lượng sản phẩm thu được, sản phẩm đạt yêu cầu có màu sắc gần với màu chất mang, dạng bột không vón cục, không có mùi cháy với độ ẩm sau khi sấy từ 4-5%. Tiến hành đóng gói sản phẩm trong túi nilon hoặc túi nhôm và bảo quản trong điều kiện nhiệt độ thường hoặc ở nhiệt độ 4-6°C trong tủ lạnh. Nếu được bảo

quản ở nhiệt độ thường, chất lượng của sản phẩm sẽ được ổn định trong thời gian từ 4-6 tháng, còn nếu được bảo quản lạnh, chất lượng của sản phẩm sẽ được ổn định trong thời gian từ 1-2 năm.

Ví dụ 4. Sản xuất chế phẩm probiotic từ chủng VTCC-B-51 dạng lỏng

Tạo huyền phù bào tử chủng VTCC-B-51 từ sinh khối bào tử thu được theo ví dụ 3 nêu trên trong môi trường DSM. Tiến hành đóng gói sản phẩm trong chai nhựa hoặc chai thủy tinh tránh ánh sáng và bảo quản trong điều kiện nhiệt độ thường hoặc ở nhiệt độ 4-6°C trong tủ lạnh. Nếu được bảo quản ở nhiệt độ thường, chất lượng của sản phẩm sẽ được ổn định trong thời gian từ 2-3 tháng, còn nếu được bảo quản lạnh, chất lượng của sản phẩm sẽ được ổn định trong thời gian từ 1-2 năm.

Ví dụ 5. Sản xuất chế phẩm probiotic đa chủng dạng bột chứa chủng VTCC-B-51

Chế phẩm probiotic theo ví dụ này được sản xuất từ các chế phẩm đơn chủng của chủng VTCC-B-51 và *Lactobacillus acidophilus* nhận từ Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Việt Nam (VTCC). Quy trình sản xuất các chế phẩm đơn chủng của các chủng vi khuẩn này được thực hiện tương tự như quy trình được áp dụng đối với chủng VTCC-B-51 ở ví dụ 3 trừ môi trường nuôi cấy và lên men *Lactobacillus acidophilus* là MRS.

Sau đó phối trộn các chế phẩm đơn chủng thu được với tỷ lệ phối trộn 1:1. Tiến hành đóng gói sản phẩm trong túi nilon hoặc túi nhôm và bảo quản trong điều kiện nhiệt độ thường hoặc ở nhiệt độ 4-6°C trong tủ lạnh. Nếu được bảo quản ở nhiệt độ thường, chất lượng của sản phẩm sẽ được ổn định trong thời gian từ 4-6 tháng, còn nếu được bảo quản lạnh, chất lượng của sản phẩm sẽ được ổn định trong thời gian từ 1-2 năm.

Ví dụ 6. Sản xuất chế phẩm probiotic đa chủng dạng lỏng chứa chủng VTCC-B-51

Chế phẩm probiotic theo ví dụ này được sản xuất từ các chế phẩm đơn chủng của chủng VTCC-B-51 và *Lactobacillus acidophilus* nhận từ Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Việt Nam (VTCC). Quy trình sản xuất các chế phẩm đơn chủng của các chủng vi khuẩn này được thực hiện tương tự như quy trình được áp dụng đối với chủng VTCC-B-51 ở ví dụ 3 trừ môi trường nuôi cấy và lên men *Lactobacillus acidophilus* là MRS.

Sau đó phối trộn các chế phẩm đơn chủng thu được với tỷ lệ phối trộn 1:1. Tiến hành đóng gói sản phẩm trong chai nhựa hoặc chai thủy tinh tránh ánh sáng và bảo quản trong điều kiện nhiệt độ thường hoặc ở nhiệt độ 4-6°C trong tủ lạnh. Nếu được bảo quản ở nhiệt độ thường, chất lượng của sản phẩm sẽ được ổn định trong thời gian từ 2-3 tháng, còn nếu được bảo quản lạnh, chất lượng của sản phẩm sẽ được ổn định trong thời gian từ 1-2 năm.

Mặc dù sáng chế được bộc lộ với phần mô tả chi tiết và các ví dụ thực hiện cụ thể nêu trên, nhưng sáng chế không bị giới hạn ở các phần mô tả nêu trên mà phạm vi bảo hộ của sáng chế được xác định bởi phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo. Những người có trình độ trung bình trong cùng lĩnh vực kỹ thuật tương ứng hiểu rằng có thể thực hiện nhiều thay đổi về các cách thức thực hiện sáng chế này mà không tách khỏi phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chủng *Bacillus subtilis* VTCC-B-51 là một chủng mới phân lập có khả năng sinh tổng hợp các enzym tiêu hóa với hoạt tính cao. Do đó, việc phân lập và sử dụng chủng này rất có ý nghĩa trong việc sản xuất các chế phẩm sinh học dựa trên nguồn nguyên liệu trong nước. Các chế phẩm probiotic theo sáng chế có chất lượng cao, được sản xuất với quy trình đơn giản, dễ thực hiện nên giá thành hạ so với các chế phẩm cùng loại được nhập khẩu hoặc sản xuất từ nguyên liệu nhập khẩu.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Các chế phẩm thu được theo sáng chế có thể được sử dụng dưới dạng nguyên liệu trong các ngành công nghiệp dược phẩm, thực phẩm, thực phẩm chức năng, và thức ăn chăn nuôi. Trong ngành công nghiệp dược phẩm, có thể sản xuất các loại men tiêu hóa từ sinh khối bào tử *Bacillus subtilis* VTCC-B-51 theo sáng chế và các tá dược được dụng. Trong các ngành công nghiệp thực phẩm, thực phẩm chức năng và thức ăn chăn nuôi, các chế phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng trực tiếp hoặc gián tiếp dưới dạng thành phần bổ sung vào các khẩu phần ăn hàng ngày.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* VTCC-B-51 thuần khiết về mặt sinh học mang đoạn gen mã hóa 16S rARN có kích thước 1508bp được thể hiện trong SEQ ID NO:1 và được lưu giữ tại Bảo tàng Giống chuẩn quốc gia VTCC với số hiệu lưu giữ VTCC-B-51, trong đó chủng này được phân lập từ đường tiêu hóa của lợn, có khả năng sinh tổng hợp các enzym bao gồm amylaza, proteaza và CMCaza, có khả năng kháng tất cả các vi sinh vật bao gồm *E. Coli*, *Micrococcus* sp., *Candida* sp., *Fusarium* sp., và có khả năng chống chịu muối mật tốt ở nồng độ muối mật 1-6%.

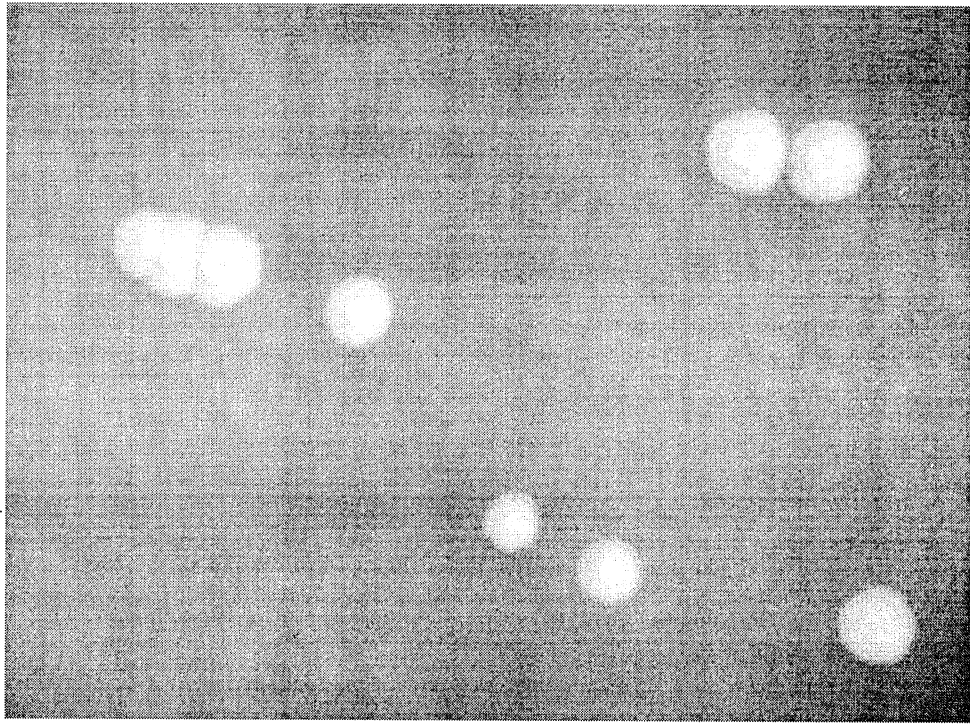


Fig.1

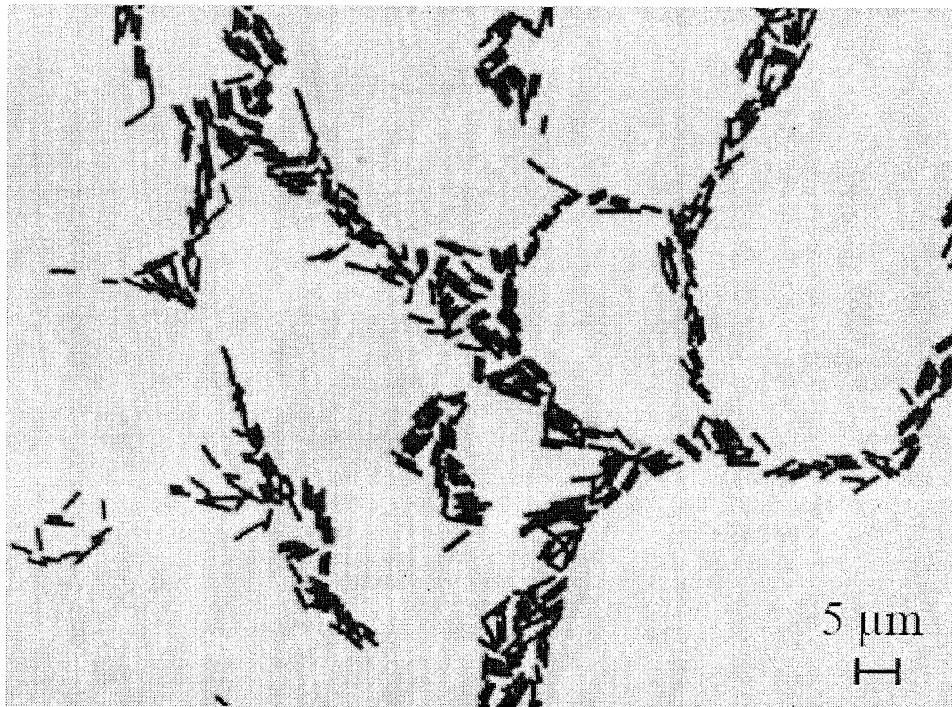


Fig.2

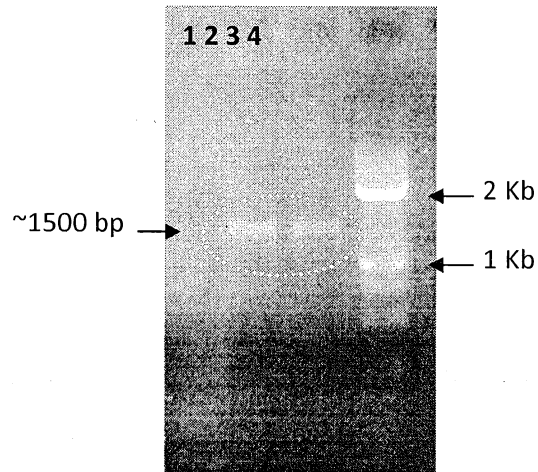


Fig.3

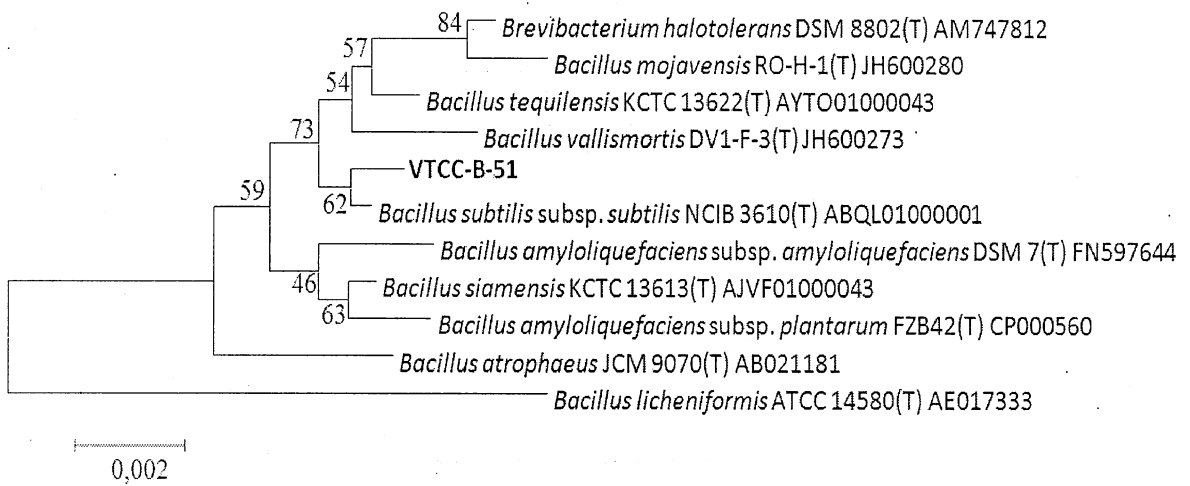
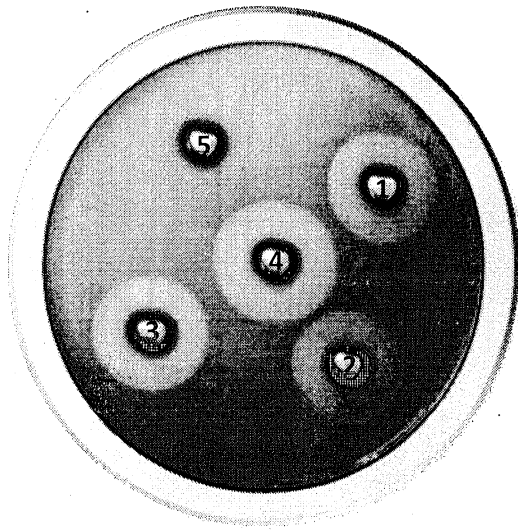
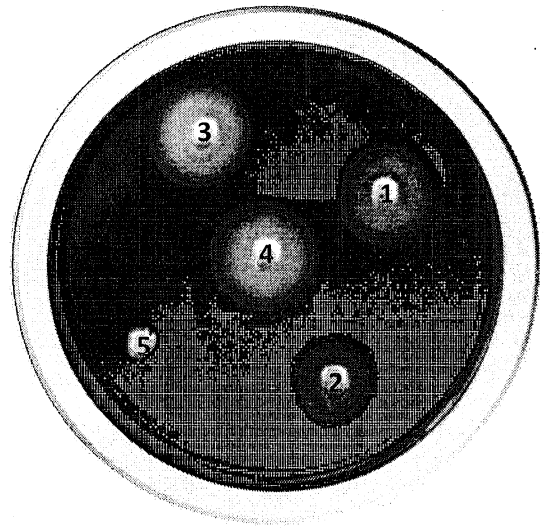


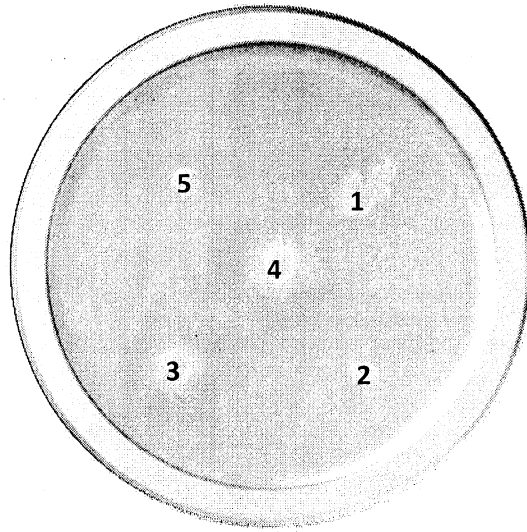
Fig.4



(a)

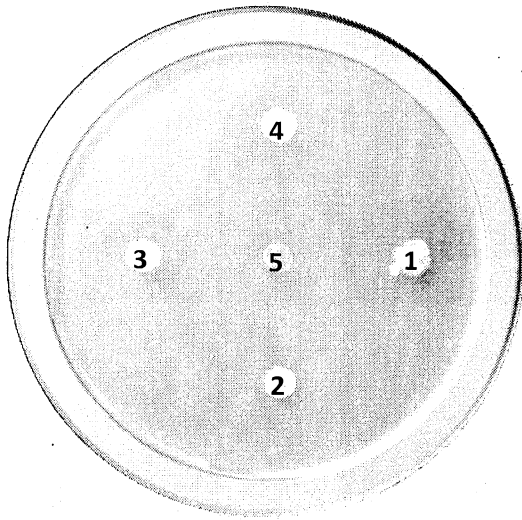


(b)

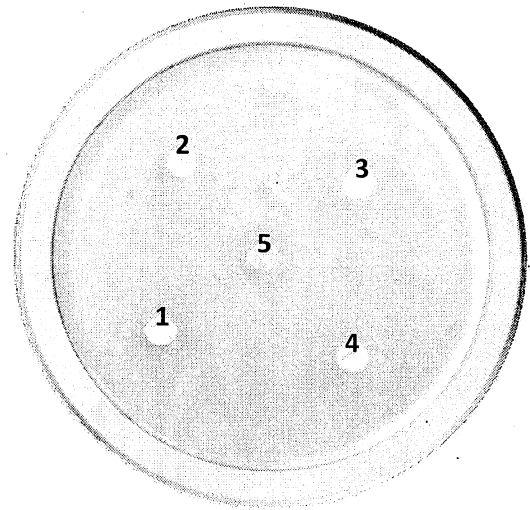


(c)

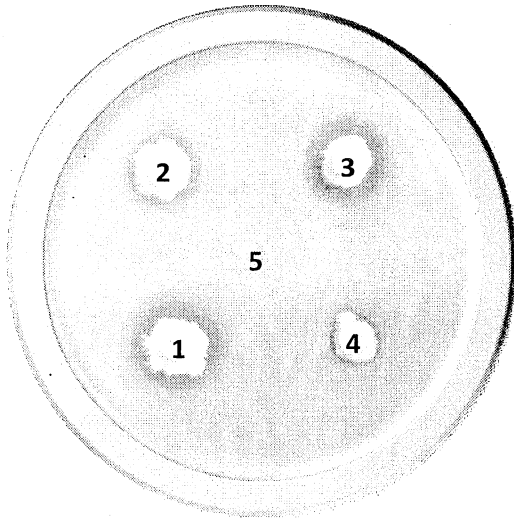
Fig.5



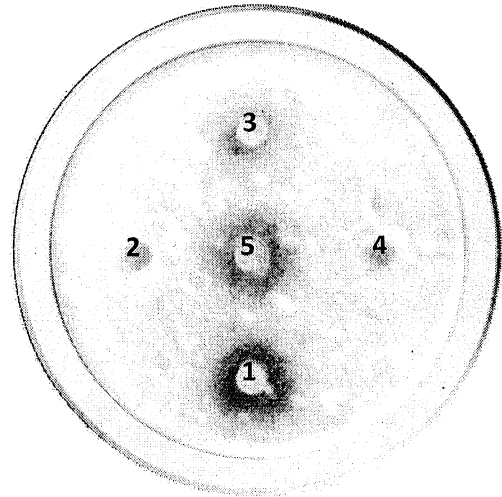
(a)



(b)

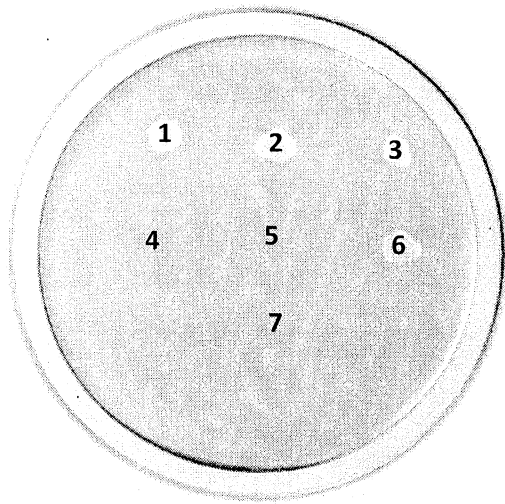


(c)

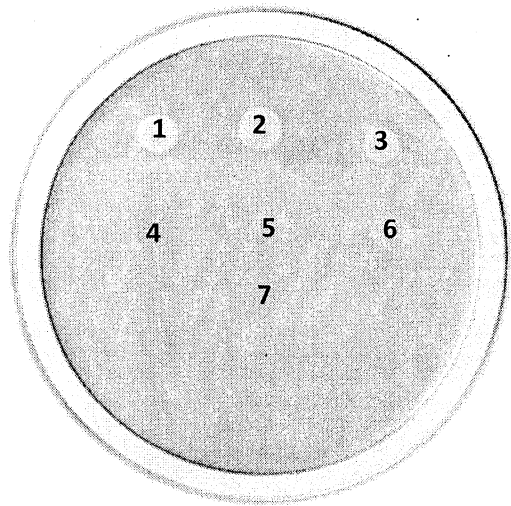


(d)

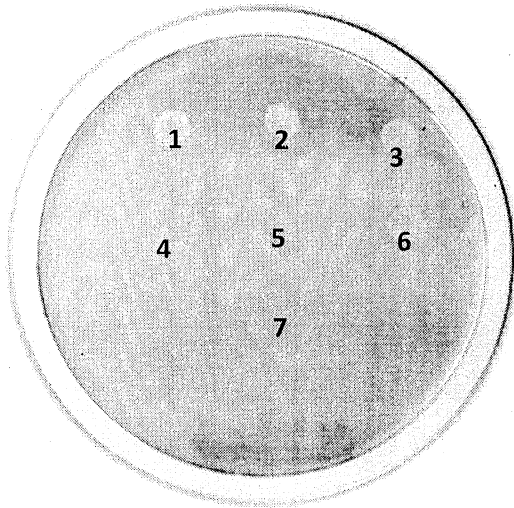
Fig.6



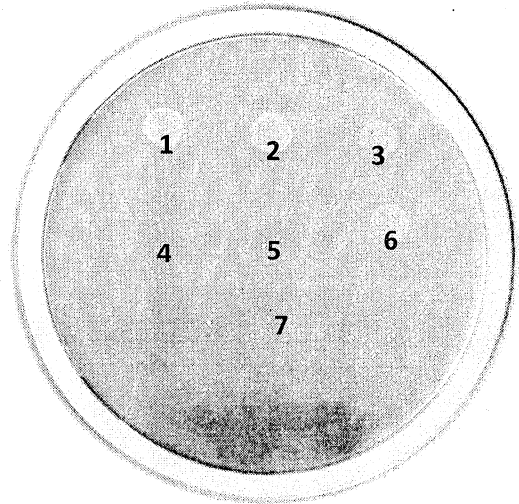
(a)



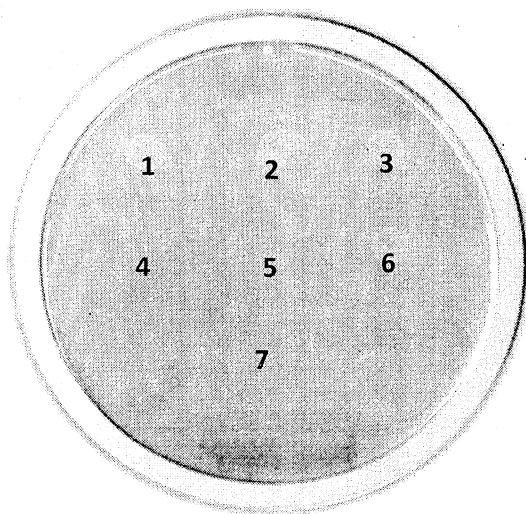
(b)



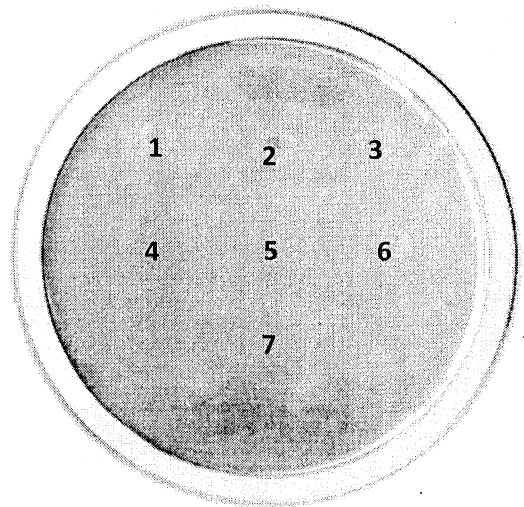
(c)



(d)



(e)



(f)

Fig.7

DANH MỤC TRÌNH TỰ GEN

- <110> Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học-Đại học quốc gia Hà Nội
 <120> Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* VTCC-B-51 thuần khiết về mặt sinh học
 <140> VN1-2015-04370
 <141> 12/11/2015
 <160> 7
- <210> 1
 <211> 1508
 <212> ADN
 <213> *Bacillus subtilis* VTCC-B-51
- <220>
 <223> 16S rARN của *Bacillus subtilis* VTCC-B-51
- <400> 1
- | | | | | | | |
|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|------|
| agagtttgat | cctggctcag | gacgaacgct | ggcggcgtgc | ctaatacatg | caagtcgagc | 60 |
| ggacagatgg | gagcttgctc | cctgatgtta | gcggcggacg | ggtgagtaac | acgtgggtaa | 120 |
| cctgcctgta | agactgggat | aactccggga | aaccggggct | aataccggat | ggttgtttga | 180 |
| accgcatggt | tcagacataa | aaggtggctt | cggctaccac | ttacagatgg | acccgcggcg | 240 |
| cattagctag | ttggtgaggt | aacggctcac | caaggcgacg | atgcgtagcc | gacctgagag | 300 |
| ggtgatcggc | cacactggga | ctgagacacg | gccagactc | ctacgggagg | cagcagtagg | 360 |
| gaatcttccg | caatggacga | aagtctgacg | gagcaacgcc | gcgtgagtga | tgaaggtttt | 420 |
| cggatcgtaa | agctctgttg | ttaggggaaga | acaagtgccg | ttcgaatagg | gcggcacctt | 480 |
| gacggtacct | aaccagaaaag | ccacggctaa | ctacgtgcca | gcagccgcgg | taatacgtag | 540 |
| gtggcaagcg | ttgtccggaa | ttattgggcg | taaagggctc | gcagggcggtt | tcttaagtct | 600 |
| gatgtgaaaag | cccccggtc | aaccggggag | ggtcattgga | aactggggaa | cttgagtgca | 660 |
| gaagaggaga | gtggaattcc | acgtgtagcg | gtgaaatgcg | tagagatgtg | gaggaacacc | 720 |
| agtggcgaag | gcgactctct | ggtctgtaac | tgacgctgag | gagcgaagc | gtggggagcg | 780 |
| aacaggatta | gataccctgg | tagtccacgc | cgtaaacgat | gagtgctaag | tgttaggggg | 840 |
| tttccgcccc | ttagtgtctg | agctaacgca | ttaagcactc | cgctgggga | gtacggtcgc | 900 |
| aagactgaaa | ctcaaaggaa | ttgacggggg | ccgcacaag | cggtggagca | tgtggtttaa | 960 |
| ttcgaagcaa | cgcaagaac | cttaccaggt | cttgacatcc | tctgacaatc | ctagagatag | 1020 |
| gacgtccctt | tcgggggcag | agtgacaggt | ggtgcatggt | tgctgctcagc | tcgtgtcgtg | 1080 |
| agatgttggg | ttaagtcccg | caacgagcgc | aacccttgat | cttagttgcc | agcattcagt | 1140 |
| tgggactctt | aaggtgactg | ccggtgacaa | accggaggaa | ggtggggatg | acgtcaaatc | 1200 |
| atcatgcccc | ttatgacctg | ggctacacac | gtgctacaat | ggacagaaca | aagggcagcg | 1260 |
| aaaccgcgag | gttaagccaa | tcccacaaat | ctgttctcag | ttcggatcgc | agtctgcaac | 1320 |
| tcgactgcgt | gaagctggaa | tcgctagtaa | tcgcggatca | gcatgccgcg | gtgaatacgt | 1380 |
| tcccgggctt | tgtacacacc | gcccgtcaca | ccacgagagt | ttgtaacacc | cgaagtcggt | 1440 |
| gaggtaacct | tttaggagcc | agccgccgaa | ggtgggacag | atgattgggg | tgaagtcgta | 1500 |
| acaaggta | | | | | | 1508 |
- <210> 2
 <211> 1536

20191

<212> ADN

<213> *Bacillus sp.* VTCC-B-681

<220>

<223> 16S rARN của *Bacillus sp.* VTCC-B-681

<400> 2

```

ggaattcggc ttagagtttg atcctggctc aggacgaacg ctggcggcgt gcctaataca 60
tgcaagtcga gccaacttct ttagagcttg ctttaaagaa gttagcggcg gacgggtgag 120
taacacgtgg gcaacctgcc tgtaagactg ggataacttc gggaaaccgg agctaatacc 180
ggataatata tagtacctcc tggactata ttgaaagatg gtttcggcta tcacttacag 240
atgggcccgc ggcgcattag ctagttagtg aggtaacggc tcaccaaggc aacgatgcgt 300
agccgacctg agagggtgat cggccacact gggactgaga cacggcccag actcctacgg 360
gaggcagcag tagggaatct tccacaatgg acgaaagtct gatggagcaa cgccgcgtga 420
gcatgaagg ccttcgggtc gtaaagctct gttgttaggg aagaacaagt gcgagagtaa 480
ctgctcgac cttgacggtg cctaaccaga aagccacggc taactacgtg ccagcagccg 540
cggtaatacg taggtggcaa gcgttgctcg gaattattgg gcgtaaagcg cgccgagcgg 600
gtttcttaag tctgatgtga aagcccacgg ctcaaccgtg gagggtcatt ggaaactggg 660
agacttgagt gcagaagagg agagtggaat tccacgtgta gcggtgaaat gcgtagagat 720
gtggaggaac accagtggcg aaggcgactc tctggtctgt aactgacgct gaggcgcgaa 780
agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac gatgagtgct 840
aagtgttaga gggtttccgc cctttagtgc tgcagctaac gcattaagca ctccgectgg 900
ggagtacggt cgcaagactg aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac aagcggtgga 960
gcatgtggtt taattcgaag caacgcgaag aacctacca ggtcttgaca tcctctgcca 1020
cctctagaga tagagcgttc cccttcgggg gacagagtga cagggtggtgc atggttgctg 1080
tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg agcgcgaacc ttgttcttag 1140
ttgccagcat ttagttgggc actctaagga gactgccggt gacaaaccgg aggaaggtgg 1200
ggatgacgtc aaatcatcat gccccttatg acctgggcta cacacgtgct acaatggacg 1260
gtacaaaggg cagcaaaacc gcgaggtcga gccaatccca taaaaccggt ctacgttcgg 1320
attgtaggct gcaactcgc tacatgaagc cggaatcgct agtaatcgcg gatcagcatg 1380
ccgcggtgaa tacgttcccc ggcttgtac acaccgcccg tcacaccacg agagtttgta 1440
acaccogaag tcggtggggt aaccttttgg agccagccgc ctaaggtggg acagatgatt 1500
ggggtgaagt cgtaacaagg taaccaagcc gaattc 1536

```

<210> 3

<211> 1337

<212> ADN

<213> *Bacillus sp.* VTCC-B-958

20191

<220>

<223> 16S rARN của *Bacillus* sp. VTCC-B-958

<400> 3

tggtttcggc	tatcacttat	agatgggccc	gcggcgcatt	agctagttag	tgaggtaacg	60
ctccaaggc	gacgatgctg	agccgacctg	agagggtgat	cggccacact	gggactgaga	120
cacggcccag	actcctacgg	gaggcagcag	tagggaatct	tccacaatgg	acgaaagtct	180
gatggagcaa	cgccgcgtga	gcatgaagg	ccttcgggtc	gtaaagctct	gttgttaggg	240
aagaacaagt	gagagagtaa	ctgctcgcac	cttgacggta	cctaaccaga	aagccacggc	300
taactacgtg	ccagcagccg	cggtaatagc	taggtggcaa	gcgttgctccg	gaattattgg	360
gcgtaaagcg	cgcgcagggc	gtttcttaag	tctgatgtga	aagcccacgg	ctcaaccgtg	420
gagggtcatt	ggaaactggg	gaacttgagt	gcagaagagg	agagtggaa	tccacgtgta	480
gcggtgaaat	gcgtagagat	gtggaggaac	accagtggcg	aaggcgactc	tctggtctgt	540
aactgacgct	gaggcgcgaa	agcgtgggga	gcaaacagga	ttagatacc	tggtagtcca	600
cgccgtaaac	gatgagtgtc	aagtgttaga	gggtttccgc	cctttagtgc	tgcagctaac	660
gcattaagca	ctccgcctgg	ggagtacgg	cgcaagactg	aaactcaaag	gaattgacgg	720
gggcccgcac	aagcggtgga	gcatgtggtt	taattcgaag	caacgcgaag	aaccttacca	780
ggtcttgaca	tcctctgcca	ctcctagaga	taggacgttc	cccttcgggg	gacagagtga	840
cagtggtgtc	atggttgctg	tcagctcgtg	tcgtgagatg	ttgggttaag	tcccgcacg	900
agcgcaacc	ttgatcttag	ttgccagcat	tcagttgggc	actctaaggt	gactgccggt	960
gacaaaccgg	aggaaggtgg	ggatgacgtc	aatcatcat	gcccttatg	acctgggcta	1020
cacacgtgct	acaatggacg	gtacaaaggg	cagcaaaacc	gcgaggtcga	gcçaatcca	1080
taaaaccgtt	ctcagttcgg	attgcaggt	gcaactcgcc	tgcatgaagc	cggaatcgct	1140
agtaatcgcg	gatcagcatg	ccgcggtgaa	tacgttcccg	ggccttgtag	acaccgcccg	1200
tcacaccag	agagtttgta	acaccgaag	tcggtgggg	aaccttttgg	agccagccgc	1260
ctaaggtggg	acagatgatt	ggggtgaagt	cgtaacaagg	tagccgtatc	ggaaggtgcg	1320
gctggatcac	ctccttt					1337

<210> 4

<211> 1438

<212> ADN

<213> *Bacillus* sp. VTCC-B-1247

<220>

<223> 16S rARN của *Bacillus* sp. VTCC-B-1247

<400> 4

tggctcagga	tgaacgctgg	cgcgctgcct	aatacatgca	agtcgagcga	accaattaag	60
agcttgctct	taagaagtta	gcgccggacg	ggtgagtaac	acgtaggtaa	cctgcctata	120
agactgggat	aactccggga	aaccggggct	aataccgat	aacattttgc	accgcatggt	180
gcgaaaattga	aaggcggctt	cggtgtcac	ttatagatgg	acctgcggcg	cattagctag	240
ttggtgaggt	aacggctcac	caaggcgacg	atgcgtagcc	gacctgagag	ggtgatcggc	300
cacactggga	ctgagacacg	gccagactc	ctacgggagg	cagcagtagg	gaatcttccg	360
caatggacga	aagtctgacg	gagcaacgcc	gcgtgagcga	tgaaggcctt	cgggtcgtaa	420
agctctgttg	ttagggaga	acaagtgcta	gttgaataag	ctggcacctt	gacggtacct	480
aaccagaaag	ccacggctaa	ctacgtgcca	gcagccgcgg	taatacgtag	gtggcaagcg	540
ttatccggaa	ttattgggcg	taaagcgcgc	gcaggtggtt	tcttaagtct	gatgtgaaag	600
cccacggctc	aaccgtggag	ggtcattgga	aactgggaga	cttgagtgca	gaagaggaaa	660
gtggaattcc	atgtgtagcg	gtgaaatgcg	tagagatatg	gaggaacacc	agtggcgaag	720
gcgactttct	ggtctgcaac	tgacactgag	gcgcgaaagc	gtggggagca	aacaggatta	780
gataccctgg	tagtccacgc	cgtaaacgat	gagtgtctaa	tgtagagggg	tttccgacct	840
ttagtgtgta	agttaacgca	ttaagcactc	cgctggggga	gtacggccgc	aaggctgaaa	900
ctcaaaggaa	ttgacggggg	cccgcacaag	cggtggagca	tgtggtttaa	ttcgaagcaa	960
cgcgaagaac	cttaccaggt	cttgacatcc	tctgacaacc	ctagagatag	ggcttctcct	1020
tcgggagcag	agtgcacaggt	ggtgcatggt	tgtcgtcagc	tcgtgtcgtg	agatggtggg	1080
ttaagtcccg	caacgagcgc	aacccttgat	cttagttgcc	atcattaagt	tgggcactct	1140
aagggtgactg	ccggtgacaa	accggaggaa	ggtgggggatg	acgtcaaacc	atcatgcccc	1200
ttatgacctg	ggctacacac	gtgctacaat	ggacggtaca	aagagtcgca	agaccgcgag	1260

20191

gtggagctaa	tctcataaaa	ccgttctcag	ttcggattgt	aggctgcaac	tgcctacat	1320
gaagctggaa	tcgctagtaa	tcgcggatca	gcatgccgcg	gtgaatacgt	tcccgggcct	1380
tgtacacacc	gcccgtcaca	ccacgagagt	ttgtaacacc	cgaagtcggt	ggggtaacct	1420
tttggagcca	gccgccta					1438

<210> 5

<211> 1560

<212> ADN

<213> *Lactobacillus sp.* VTCC-B-384

<220>

<223> 16S rARN của *Lactobacillus sp.* VTCC-B-384

<400> 5

agagtttgat	cctggctcag	gacgaacgct	ggcggcgtgc	ctaatacatg	caagtcgaac	60
gaactctggt	attgattggt	gcttgcacat	tgatttacat	ttgagtgagt	ggcgaactgg	120
tgagtaacac	gtgggaaacc	tgcccagaag	cgggggataa	cacctggaaa	cagatgctaa	180
taccgcataa	caacttggac	cgcatggtcc	gagcttgaaa	gatggcttcg	gctatcactt	240
ttggatggtc	ccgcggcgta	ttagctagat	ggtggggtaa	cggctcacca	tggcaatgat	300
acgtagccga	cctgagaggg	taatcggcca	cattgggact	gagacacggc	ccaaactcct	360
acgggaggca	gcagtaggga	atcttcacac	atggacgaaa	gtctgatgga	gcaacgccgc	420
gtgagtgaag	aagggtttcg	gctcgtaaaa	ctctgttggt	aaagaagaac	atatctgaga	480
gtaactgttc	aggtattgac	ggtatttaac	cagaaagcca	cggctaacta	cgtgccagca	540
gccgcggtaa	tacgtaggtg	gcaagcgttg	tccggattta	ttgggcgtaa	agcagcgcga	600
ggcggttttt	taagtctgat	gtgaaagcct	tcggctcaac	cgaagaagtg	catcggaaac	660
tgggaaactt	gagtgcagaa	gaggacagtg	gaactccatg	tgtagcggtg	aatgctgatg	720
atatatggaa	gaacaccagt	ggcgaaggcg	gctgtctggt	ctgtaactga	cgctgaggct	780
cgaaagtatg	ggtagcaaac	aggattagat	accctggtag	tccataaccg	aaacgatgaa	840
tgctaagtgt	tggagggttt	ccgcccttca	gtgctgcagc	taacgcatta	agcattccgc	900
ctggggagta	cggccgcaag	gctgaaactc	aaaggaattg	acgggggccc	gcacaagcgg	960
tggagcatgt	ggtttaattc	gaagctacgg	gaagaacctt	accaggtcct	gacatactat	1020
gcaaactctaa	gagattagac	gttcccttcg	gggacatgga	tacaggtggt	gcatggttgt	1080
cgtcagctcg	tgctcgtgaga	tggtgggtta	agtcccgcac	cgagcgcac	ccttattatc	1140
agttgccagc	attaagttgg	gcactctggt	gagactgccg	gtgacaaaac	ggaggaaggt	1200
ggggatgacg	tcaaatcatc	atgcccttca	tgacctgggc	tacacacgtg	ctacaatgga	1260
tggtagaacg	agttgcgaac	tcgcgagagt	aagctaactc	cttaaagcca	ttctcagttc	1320
ggattgtagg	ctgcaactcg	cctacatgaa	gtcggaaatc	ctagtaactc	cggatcagca	1380
tgccgcggtg	aatacgttcc	cgggccttgt	acacaccgcc	cgtcacacca	tgagagtttg	1440
taacacccaa	agtcggtggg	gtaacctttt	aggaaccagc	cgctaaggt	gggacagatg	1500
attaggggtga	agtcgtaaca	aggtagccgt	aggagaacct	gcccgtggat	cacctccttt	1560

<210> 6

<211> 1359

<212> ADN

<213> *Bacillus clausii* VTCC-B-52

<220>

<223> 16S rARN của *Bacillus clausii* VTCC-B-52

<400> 6

gtagcggcg	gacgggtgag	taacacgtgg	gcaacctgcc	ccttagactg	ggataactcc	60
gggaaaccgg	agctaatacc	ggataatccc	tttctccacc	tggagagagg	gtgaaagatg	120
gcttcggcta	tcactagggg	atgggcccgc	ggcgcattag	ctagttggta	aggtaacggc	180

20191

ttaccaaggc	gacgatgctg	agccgacctg	agagggatgat	cggccacact	gggactgaga	240
cacggcccag	actcctacgg	gaggcagcag	tagggaatct	tccgcaatgg	acgaaagtct	300
gacggagcaa	cgccgcgtga	gtgaggaagg	ccttcgggtc	gtaaagctct	gttgtgaggg	360
aagaagcgg	accgttcgaa	tagggcggtg	ccttgacggg	acctcaccag	aaagccacgg	420
ctaactacgt	gccagcagcc	gcggttaatac	gtaggtggca	agcgttgctc	ggaattattg	480
ggcgtaaaag	gcgcgaggc	ggcttcttaa	gtctgatgtg	aaatctcggg	gctcaacccc	540
gagcggccat	tggaaactgg	ggagcttgag	tgcagaagag	gagagtggaa	ttccacgtgt	600
agcggtgaaa	tgcgtagaga	tgtggaggaa	caccagtggc	gaaggcgact	ctctgggtctg	660
taactgacgc	tgaggcgca	aagcgtgggg	agcaaacagg	attagatacc	ctggtagtcc	720
acgccgtaaa	cgatgagtgc	taggtgttag	gggtttcgat	gcccgtagtg	ccgaagttaa	780
cacattaagc	actccgcctg	gggagtacgg	ccgcaaggct	gaaactcaaa	ggaattgacg	840
gggacccgca	caagcagtgg	agcatgtggt	ttaattcgaa	gcaacgcgaa	gaaccttacc	900
aggtcttgac	atcctttgac	cacccaagag	attgggcttc	cccttcgggg	gcaaagtgac	960
aggtggtgca	tggttgctgt	cagctcgtgt	cgtgagatgt	tgggttaagt	cccgcaacga	1020
gcgcaaccct	tgatcttagt	tgccagcatt	aagttgggca	ctctaagggtg	actgccgggtg	1080
acaaaccgga	ggaaggtggg	gatgacgtca	aatcatcatg	ccccttatga	cctgggctac	1140
acacgtgcta	caatggatgg	tacaaagggc	agcgaaccg	cgaggtgaag	ccaatcccat	1200
aaagccattc	tcagttcgga	ttgcaggctg	caactcgcct	gcatgaagcc	ggaattgcta	1260
gtaatcgcg	atcagcatgc	cgcggtgaat	acgttcccgg	gtcttgatca	caccgcccgt	1320
cacaccacga	gagtttgtaa	caccgaagt	cggtgaggc			1359

<210> 7

<211> 1456

<212> ADN

<213> *Bacillus* sp. VTCC-B-661

<220>

<223> 16S rARN của *Bacillus* sp. VTCC-B-661

<400> 7

ctcaggacga	acgctggcgg	cgtgcctaatac	acatgcaagt	cgagcgaatc	ttgaggagct	60
tgctccttaa	ggttagcggc	ggacgggtga	gtaacacgtg	ggcaacctgc	ctgtaagact	120
gggataaacac	cgggaaaaccg	gtgctaatac	cggataaattc	ttcacctcac	atgagggtgaa	180
gctgaaagtc	ggttttcggct	gacacttaca	gatgggcccg	cggcgcatta	gctagttggt	240
gaggtaacgg	ctcaccaagg	cgacgatgcg	tagccgacct	gagaggggtga	tcggccacac	300
tgggactgag	acacggccca	gactcctacg	ggaggcagca	gtagggaaatc	ttccgcaatg	360
gacgaaagtc	tgacggagca	acgccgcgtg	agtgatgaag	gccttcgggt	cgtaaaactc	420
tgttgttagg	gaagaacaag	taccggagta	actgcccgtg	ccttgacggg	acctaaccag	480
aaagccacgg	ctaactacgt	gccagcagcc	gcggttaatac	gtaggtggca	agcgttgctc	540
ggaattattg	ggcgtaaaag	gcgcgaggc	ggtcctttaa	gtctgatgtg	aaagcccacg	600
gctcaaccgt	ggaggggtcat	tggaaactgg	gggacttgag	tgcagaagag	gaaagcggaa	660
ttccacgtgt	agcggtgaaa	tgcgtagaga	tgtggaggaa	caccagtggc	gaaggcggct	720
ttctgggtctg	taactgacgc	tgaggcgca	aagcgtgggg	agcaaacagg	attagatacc	780
ctggtagtcc	acgccgtaaa	cgatgagtgc	taagtgttag	agggtttccg	cccttttagtg	840
ctgcagctaa	cgcattaagc	actccgcctg	gggagtacgg	ccgcaaggct	gaaactcaaa	900
ggaattgacg	ggggcccgc	caagcgggtg	agcatgtggt	ttaattcgaa	gcaacgcgaa	960
gaaccttacc	aggtcttgac	atcctctgac	actcctagag	ataggatttt	ccccttcggg	1020
ggacagagtg	acaggtggtg	catggtgtgc	gtcagctcgt	gtcgtgagat	gttgggttaa	1080
gtcccgcac	gagcgcaacc	cttgatctta	gttgccagca	ttcagttggg	cactctaagg	1140
tgactgccgg	tgacaaaccg	gaggaaggtg	gggatgacgt	caaatcatca	tgccccttat	1200
gacctgggct	acacacgtgc	tacaatggat	ggtacaaagg	gcagcgaagc	cgcgaggtgg	1260
agccaatccc	ataaaaccat	tctcagttcg	gattgcaggc	tgcaactcgc	ctgcatgaag	1320
ccggaatcgc	tagtaatcgc	ggatcagcat	gccgcgggtg	atacgttccc	gggccttgta	1380
cacaccgccc	gtcacaccac	gagagtttgt	aacaccggaa	gtcgggtggg	taaccgcaag	1440
gagccagccg	cctaag					1456