

Nowy szczep bakterii *Lactobacillus brevis* i zastosowanie nowego szczepu bakterii

Lactobacillus brevis

Przedmiotem wynalazku jest nowy szczep *Lactobacillus brevis*. Nowy szczep jest przeznaczony do zastosowania w przetwórstwie żywności.

Lactobacillus brevis jest Gram-dodatnią bakterią kwasu mlekowego z rodziny *Lactobacillus*. Bakteria ta znajduje zastosowanie we wspomaganie przywracania homeostazy w mikrobiocie jelitowej. Może być pomocna także w usprawnianiu odporności oraz w leczeniu zapalenia pochwy i infekcjach układu moczowego. Tak jak inne bakterie z rodziny *Lactobacillus* ma zdolność do produkcji kwasu mlekowego z węglowodanów w procesie fermentacji. Bakterie szczepów *L. brevis* mogą m.in. stanowić składnik szczepionek do żywności. Szczepionki takie, czyli kultury starterowe, są to odpowiednio wyselekcjonowane drobnoustroje dodawane do żywności w celu poprawy jej wyglądu, zapachu, smaku lub wydłużenia trwałości. Kultury takie, zawierające szczepy *Lactobacillus brevis*, opisano np. w polskich opisach patentowych PL217724 i PL200944. Kultura według pierwszego z wymienionych patentów jest przeznaczona do kiszenia ogórków, a według drugiego patentu do wyrobu pieczywa.

Z polskiego opisu patentowego PL214504 znany jest szczep *Lactobacillus brevis* o cechach probiotycznych, Szczep ten oznaczono symbolem ŁOCK 0944 i zdeponowano w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN z siedzibą we Wrocławiu pod numerem akcesyjnym B/00035. Szczep ujawniony w opisie PL214504 wyizolowano ze spontanicznej kiszonki korzenia buraka ćwikłowego stosując podłoże Rogosa, stanowiące wybiórcze medium przeznaczone do wykrywania bakterii z rodzaju *Lactobacillus* sp. ze złożonego mikrobiologicznie materiału. Szczep wykazuje oporność w stosunku do kilku antybiotyków i chemioterapeutyków o działaniu przeciwbakteryjnym. Wykazuje także aktywność antagonistyczną w stosunku do bakterii patogennych przenoszonych drogą pokarmową.

Z opisu patentu europejskiego EP 2785878 znane są szczepy *Lactobacillus brevis* wytwarzające reuterynę oraz ich zastosowanie, w szczególności do leczenia lub zapobiegania zakażenia *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Szczepy mają zdolność do wytwarzania reuteryny i gromadzenia jej w ilości wystarczającej, by mieć aktywność przeciwdrobnoustrojową na szeroki zakres szczepów *H. pylori*. Wynalazek według EP2785878 obejmuje także kompozycję odżywczą, zwłaszcza produkt nabiałowy, zawierającą wspomniany szczep.

Celem wynalazku było uzyskanie nowego szczepu z rodzaju *Lactobacillus*, wykazującego aktywność przeciw drobnoustrojom potencjalnie chorobotwórczym, pozwalającą na zastosowanie szczepu jako szczepionki lub składnika szczepionki o działaniu ochronnym (przeciwdrobnoustrojowym) do przetwórstwa żywności pochodzenia zwierzęcego.

Istotą wynalazku jest szczep *Lactobacillus brevis* B01A. Szczep został zdeponowany zgodnie z Traktatem Budapeszteńskim w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, Depozyt złożono w dniu 22.05.2018. Depozytowi nadano numer B/00161. Istotą wynalazku jest także zastosowanie szczepu *Lactobacillus brevis* B01A jako kultury starterowej lub komponentu kultury starterowej do żywności pochodzenia zwierzęcego.

Szczep wyizolowano z sera regionalnego bundz z Podhala. Próbkę sera transportowano w warunkach chłodniczych do laboratorium. Następnie 10 g sera poddano homogenizacji z dodatkiem 90 ml wody peptonowej (Merck) i przygotowano kolejne dziesiętne rozcieńczenia. Na płytce Petriego z podłożem stałym MRS (Merck) wylewano po 100 µl zawiesiny z każdego rozcieńczenia i rozprowadzano jałową głaszka do całkowitego wchłonięcia płynu. Posiewy inkubowano w warunkach mikroaerofilnych przez 48 godzin w temp. 37 °C. Po inkubacji jałową igłą pobierano pojedyncze kolonie i pasażowano na podłoże stałe MRS lub na pożywkę płynną MRS.

Oznaczanie przynależności gatunkowej szczepu *Lactobacillus brevis*.

Charakterystyka fenotypowa: długie pałeczki G(+), katalazo-ujemne

W celu zbadania przynależności gatunkowej szczepu *Lactobacillus brevis* B01A wykonano genotypowanie metodą PCR z wykorzystaniem specyficznych starterów 27F/1492R (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'/5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'. Analiza wyników sekwencjonowania 16S rDNA była przeprowadzona z wykorzystaniem bazy danych NCBI oraz oprogramowania BLAST. Analiza danych BLAST potwierdziła 100% podobieństwa do *Lactobacillus brevis* SRCM101174 i do *Lactobacillus brevis* 100D8.

Nowy szczep charakteryzuje się następującymi cechami:

- cechy morfologiczne: długie pałeczki o jednolitym wybarwieniu, tworzące niedługie łańcuszki.

- cechy biotechnologiczne: bakterie heterofermentatywne

Fermentacja następujących cukrów (wyniki otrzymane w teście API 50 CH- na podłożu MRS w temp. 37 °C przez 48 h): L-arabinoza, D-ryboza, D-ksyloza, D-glukoza, D-fruktoza, D-maltoza, D-Melibioza, glukonian potasu, 5-ketoglukonian potasu.

- aktywność antagonistyczna

Aktywność antagonistyczną między *Lactobacillus brevis* B01A a szczepami bakterii wskaźnikowych badano za pomocą metody dyfuzyjnej studzienkowej (Hartmann et al., 2011; Sip et al., 2012). W tym celu *Lactobacillus brevis* B01A hodowano na podłożu płynnym MRS do osiągnięcia liczby 10^9 jtk/ml przez 24h w temperaturze 37°C. Na płytce z agarem Mueller Hinton (Merck) posiewano hodowle bakterii wskaźnikowych (200 μ l), następnie korkoborem wycinano studzienki o średnicy 5,5 mm. Do studzienek nalewano po 0,5 ml odpowiednio przygotowanego czynnika (Ż) – żywe komórki *Lactobacillus brevis* B01A hodowane przez 24 h w temperaturze 37°C na podłożu płynnym MRS do osiągnięcia liczby 10^9 jtk/ml; (S) – supernatant po hodowli *Lactobacillus brevis* B01A, uzyskany przez odwirowanie komórek (6000 \times g, 10 min); (N) – supernatant (S) poddany neutralizacji 1M NaOH do uzyskania pH= 6,8 – 7,0. Tak przygotowane próby inkubowano 24 godz. w temp 37°C. Potencjał przeciwdrobnoustrojowy oszacowano na podstawie pomiaru średnicy stref ograniczenia wzrostu bakterii wskaźnikowych wokół studzienek z uwzględnieniem średnicy krążków studzienek według wzoru:

$$x = D - d$$

gdzie:

x – potencjał przeciwdrobnoustrojowy szczepu bakterii [cm]

D – średnica strefy zahamowania wzrostu [cm]

d – średnica krążka agarowego [cm]

Do oceny aktywności antagonistycznej między badanymi szczepami bakterii kwasu mlekowego a bakteriami wskaźnikowymi wykorzystano skalę: $x=0,0$ cm - brak aktywności antagonistycznej; $x>0$ i $x<0,4$ cm - słaba aktywność antagonistyczna; $x>0,4$ i $x<0,8$ cm - średnia aktywność antagonistyczna; $x>0,8$ i $x<1,2$ cm - duża aktywność antagonistyczna; $x>1,2$ cm - bardzo duża aktywność antagonistyczna.

Badanie przeprowadzono w 4 powtórzeniach.

Na rysunku przedstawiono:

Fig. 1 - Średnie strefy zahamowania wzrostu bakterii wskaźnikowych z zastosowaniem *Lactobacillus brevis* B01A jako czynnika hamującego wzrost.

Fig. 2. - Liczba bakterii *E. coli* z wymazu powierzchniowego z mięsa po inkubacji 15 godzin w temperaturze 37 °C, wobec zastosowanych czynników ograniczających (Tabela 1).

Fig. 3. - Liczba bakterii *E. coli* z wymazu z mięsa po inkubacji 7 dni w temperaturze 4°C, wobec zastosowanych czynników ograniczających (Tabela 1).

Fig. 4. - Liczebność bakterii *E. coli* w matrycy żywnościowej w postaci sera twarogowego przy zastosowaniu różnych czynników hamujących (Tabela 1) podczas inkubacji 37°C/24h.

Fig. 5. - Liczebność bakterii *E. coli* w matrycy żywnościowej w postaci sera twarogowego przy zastosowaniu różnych czynników hamujących (Tabela 1) podczas inkubacji 4°C/7 dni.

Na Fig. 1 zaprezentowano wyniki doświadczeń. Stwierdzono bardzo dużą aktywność antagonistyczną komórek bakterii szczepu *Lactobacillus brevis* B01A względem *Listeria monocytogenes*, a także względem *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Enterococcus faecium* i *Salmonella enteritidis*. Najsłabsze działanie przeciwdrobnoustrojowe stwierdzono w przypadku zastosowania supernatantu zneutralizowanego, co sugeruje obecność bakteriocyn lub innych substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym (poza kwasami organicznymi).

Badania aktywności antagonistycznej *Lactobacillus brevis* B01A w matrycy żywnościowej przedstawiono w przykładach. W badaniu zastosowano następujące czynniki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym (Tabela 1):

1. Hodowla żywa – zawiesina bakteryjna *L. brevis* B01A w liczbie około 10⁹ jtk/ml. Bakterie pasażowane dwukrotnie. Wartość pH = 4,56.
2. Hodowla zdenaturowana – zawiesinę hodowli żywych bakterii *L. brevis* B01A umieszczano w łaźni wodnej na 20 minut, w temperaturze 80°C. Wartość pH = 4,60.
3. Supernatant pełny – zawiesinę hodowli żywych bakterii *L. brevis* B01A umieszczono symetrycznie w wirówce laboratoryjnej. Zawiesinę odwirowano przy 10 000 obrotów przez 5 minut. Otrzymany supernatant zlano do próbówki. Za pomocą pH – metru dokonano pomiaru wartości pH, która wynosiła 4,57. W celu oczyszczenia z pozostałości komórek, ciecz przefiltrowano przez filtry strzykawkowe membranowe wielkości 0,2 µm, w warunkach sterylnych. Tak otrzymany czynnik zamrożono. Na potrzeby doświadczeń czynnik był każdorazowo doprowadzany do temperatury pokojowej, a po użyciu ponownie mrożony.
4. Supernatant zneutralizowany – zawiesinę hodowli żywych bakterii *L. brevis* B01A umieszczono symetrycznie w wirówce laboratoryjnej. Zawiesinę odwirowano przy 10 000 obrotów przez 5 minut. Otrzymany supernatant zlano do próbówki. Następnie, za pomocą pH – metru oraz 1-molowego roztworu NaOH, doprowadzono wartość pH supernatantu do poziomu 6,65. W celu oczyszczenia z pozostałości komórek oraz innych zanieczyszczeń, ciecz przefiltrowano przez filtry strzykawkowe membranowe w warunkach sterylnych. Tak otrzymany czynnik zamrożono. Na potrzeby doświadczeń czynnik był każdorazowo doprowadzany do temperatury pokojowej, a po użyciu ponownie mrożony.

MRS – jałowy bulion MRS stosowany jako pożywka dla bakterii rodzaju *Lactobacillus* – 55,15 grama suchego podłoża rozpuszczona w 1000 ml wody destylowanej. Wartość pH = ~ 6,0.

Skład podłoża zgodnie z deklaracją producenta (BioMaxima).

H₂O – woda destylowana.

Tabela 1. Czynniki bakteryjne i niebakteryjne użyte w doświadczeniach

LEGENDA	CZYNNIK
1	Hodowla żywa, pH = 4,56
2	Hodowla zdenaturowana (80°C / 20 minut), pH = 4,6
3	Supernatant pełny, pH = 4,57
4	Supernatant zneutralizowany, pH = 6,65
MRS	Bulion MRS stosowany jako pożywka dla bakterii rodzaju <i>Lactobacillus</i> , pH ~ 6,0
H ₂ O	Woda destylowana

Przykład 1 . Mięso drobiowe

Badanie przeprowadzono z użyciem mięsa drobiowego – świeży filet z piersi kurczaka, zakupiony w handlu detalicznym.

Drobnoustroje wskaźnikowe: *Escherichia coli* szczep ATCC 10536.

Kawałki mięsa drobiowego, o masie 4,5 – 6,0 g, układano na płytki Petriego. Na kawałki mięsa nakrapiano 10 µl zawiesiny drobnoustrojów wskaźnikowych w liczbie około 50-60 jtk/10 µl. W tym samym czasie przygotowywano próby kontrolne, bez zaszczepiania bakteryjnego. Po odczekaniu 5 - 10 minut od nakropienia próbek, mięso zostawało nakryte wyjałowionym papierkiem bibułkowym, nasączonym odpowiednim wariantem roztworu pozyskanego z hodowli bakterii *Lactobacillus brevis* B01A lub zawiesiną pożywki MRS, lub wodą destylowaną (Tabela 1).

Tak przygotowane próby poddawano inkubacji w temperaturze 37°C przez 15 godzin (Fig. 2) i w temperaturze 4°C przez 7 dni (Fig. 3).

Liczba bakterii *E. coli* znajdujących się na powierzchni mięsa, po inkubacji w temp. 37°C (Fig. 2) z zastosowaniem bibuły nasączonej czynnikiem obojętnym (wodą), wyniosła 5,91 log jtk / cm². Taki sam uśredniony wynik otrzymano stosując bibułę nasączoną bulionem MRS. Do zdecydowanego, znaczącego zahamowania wzrostu drobnoustrojów psujących mięso w

próbach kontrolnych doprowadziło zastosowanie czynników (1), (2), i (3). Liczba bakterii *E. coli* oznaczona w tych próbach nie przekroczyła poziomu detekcji. Otrzymane różnice w porównaniu z próbami z wodą i MRS były istotne statystycznie ($p < 0,05$). Zastosowanie bibuły nasączonej supernatantem zneutralizowanym (4) zredukowało liczbę bakterii *E. coli* na powierzchni mięsa do poziomu $4,87 \log \text{ jtk} / \text{ cm}^2$. (różnica istotna statystycznie $p = 0,003$, w porównaniu z próbą z zastosowaniem MRS i H_2O).

W przypadku prób zanieczyszczonych hodowlą bakterii *Escherichia coli* (Fig. 2) zastosowanie żywej hodowli bakterii *Lactobacillus brevis* B01A (1) spowodowało obniżenie liczby bakterii *Escherichia coli* o 1,7 rzędu logarytmicznego w stosunku do próby z wodą, oraz o 1,52 rzędu logarytmicznego porównując do próby z zastosowaniem bulionu MRS. Jest to znacząca redukcja, istotna statystycznie ($p_{\text{H}_2\text{O}} = 0,047$, $p_{\text{MRS}} = 0,022$). Właściwości bakteriostatyczne względem drobnoustrojów wskaźnikowych zaobserwowano także w przypadku użycia hodowli zdenaturowanej (2). Uśredniona logarytmiczna liczba bakterii *E. coli* obecna na powierzchni mięsa po zastosowaniu bibuły nasączonej czynnikiem (2) wynosiła $5,42 \log \text{ jtk} / \text{ cm}^2$. Były to wartości niższe, zarówno względem testów z wodą ($p = 0,029$) jak również testów z MRS ($p = 0,017$). Niezmienny rezultat, w stosunku do próby kontrolnej – jaki i zanieczyszczonej – zaobserwowano stosując supernatant pełny (3). Średnia liczba bakterii wskaźnikowych w próbie z użyciem bibuły nasączonej supernatantem (3) nie przekroczyła poziomu detekcji wyznaczonego w badaniu ($100 \text{ jtk} / \text{ cm}^2$). Stosując bibułę nasączoną supernatantem zneutralizowanym (4) nie zaobserwowano właściwości bakteriostatycznych ($p > 0,05$).

Liczba bakterii *E. coli* na powierzchni mięsa po 7 dniach inkubacji w temp. 4°C (Fig. 3), w przypadku prób kontrolnych z zastosowaniem bibuły nasączonej wodą wynosiła $2,95 \log \text{ jtk} / \text{ cm}^2$ i była zbliżona do wartości otrzymanych po zastosowaniu bibuły nasączonej bulionem MRS ($3,19 \log \text{ jtk} / \text{ cm}^2$). Najsilniejsze właściwości antagonistyczne wykazała żywa hodowla bakterii *Lactobacillus* (1), liczebność bakterii *E. coli* po tygodniowej inkubacji w 4°C wyniosła $2,29 \log \text{ jtk} / \text{ cm}^2$, co stanowiło znaczną redukcję ($p = 0,033$).

Działanie pozostałych czynników nie miało istotnego wpływu na zahamowanie wzrostu bakterii *E. coli*. Liczba drobnoustrojów, po zastosowaniu bibulek nasączonych czynnikiem supernatantu pełnego (3) oraz supernatantu zneutralizowanego (4) przekraczała poziom $10^3 \text{ jtk} / \text{ cm}^2$. Hodowla z martwymi komórkami *Lactobacillus* (2) w dużym stopniu zahamowała wzrost bakterii wskaźnikowych, obniżając liczbę komórek *E. coli* do wartości $2,53 \log \text{ jtk} / \text{ cm}^2$ ($p = 0,051$).

W próbach zanieczyszczonych bakteriami wskaźnikowymi (Fig. 3), po zastosowaniu bibuły nasączonej wodą, wzrost bakterii *E. coli* w czasie 7 dni, był o 12,9% większy niż w próbie kontrolnej. Poziom bakterii *E. coli* po okresie inkubacji z bibułą nasączoną czynnikiem (1) osiągnął wartość 2,59 log jtk / cm² (p=0,009). Pozostałe wyniki redukcji bakterii wskaźnikowych, w próbach zanieczyszczonych, nie zostały uznane za znaczące w badaniu (p>0,05).

Przykład 2. Ser twarogowy.

Materiałem do badań był ser twarogowy półtłusty „ulubiony” firmy Polmlek, zakupiony w sklepie detalicznym. Producent na swojej stronie internetowej deklaruje, że produkt nie zawiera konserwantów, oraz że jest nieodpowiedni dla osób z alergią na białka mleka. Produkowany jest wytwarzany w trzech wariantach z różną zawartością tłuszczu. Wartość odżywcza stosowanego do badań sera została przedstawiona w tabeli 2.

Tabela 2. Wartość odżywcza badanego sera twarogowego w 100g

Wartość odżywcza	Ilość
Wartość energetyczna [kcal]	118
Tłuszcz [g]	42
W tym nasycone kwasy tłuszczowe [g]	2,8
Węglowodany [g]	3,4
W tym cukry [g]	3,0
Białko [g]	16,7
Sól [g]	0,1

Źródło: <http://www.polmlek.com/polmlek/informacje/976954035#produkty>

Na dwóch płytkach Petriego rozkładano po 3 plastry sera, na które za pomocą pipety dozowano 100μl hodowli szczepu *Escherichia coli* (10⁷ komórek) oraz po 100μl szczepu *Lactobacillus brevis* B01A. w postaci poszczególnych czynników 1-4, MRS i H₂O zgodnie z oznaczeniami z Tabeli 1. Po nałożeniu wszystkich czynników (Zdjęcie 2) płytki umieszczano w termostacie. Po inkubacji próby homogenizowano i wykonywano posiewy. Badanie wykonywano w dwóch wariantach w pierwszym (I) stosowano inkubację w 37°C/24h a w drugim (II) 4°C/7 dni. W przypadku prób kontrolnych nie stwierdzono obecności *Escherichia coli* w próbach w żadnym z wariantów doświadczenia. Wyniki doświadczeń zaprezentowano na Fig. 4 i Fig. 5.

W przypadku zastosowania wyższej temperatury inkubacji (37°C) wszystkie zastosowane czynniki zahamowały wzrost *E. coli* jednak działanie to w większości przypadków nie było istotne statystycznie (Fig. 4). Jedynie żywe komórki bakterii (1) szczepu *Lactobacillus brevis* B01A były w stanie zmniejszyć istotnie populację bakterii *Escherichia coli* biorąc pod uwagę jako próbę kontrolną wodę. Nie zauważono w tym przypadku statystycznie istotnych różnic względem próby z zastosowaniem jako kontroli pożywki MRS.

Po dłuższej inkubacji w niższej temperaturze (4°C/7 dni) zauważono statystycznie istotne zahamowanie wzrostu bakterii *Escherichia coli* zarówno względem wody jak i próbki z MRS w przypadku prawie wszystkich czynników tzn. podczas zastosowania komórek żywych, komórek zabitych oraz płynu pochodowlanego o pH 4,34 (czynniki o nr 1,2,3) (Fig. 5). Jedynie próba, gdzie dodano supernatant o pH 6,65 (4) nie wykazała zdolności hamującej wzrost bakterii *Escherichia coli*. Wręcz przeciwnie w przypadku tej próby liczba bakterii *E. coli* była, prawie identyczna z próbką kontrolną zawierającą jałową pożywkę MRS i istotnie statystycznie wyższa niż w próbie kontrolnej z jałową H₂O. Wysoka wartość pH (6,65) nie stwarza dobrych warunków metabolitom zawartym w supernatancie do działania przeciwdrobnoustrojowego.

Hamujące działanie metabolitów zależne było od warunków środowiska, w którym przebywały próby. Zauważono działanie bakteriobójcze dla prób z wykorzystaniem supernatantu o pH 4,34 (3). Supernatant o pH 6,65 (4) nie wykazywał istotnie statystycznego działania hamującego wobec *Escherichia coli*. Możliwe jest, że w środowisku kwaśnym działały wyprodukowane przez szczepy *Lactobacillus* kwasy organiczne: kwas mlekowy, kwas octowy, których działanie bakteriobójcze nie było możliwe w przypadku zneutralizowanego supernatantu (4).

Wykaz sekwencji

```
>B1A 'group 1'
GACGAACGCTGGCGGCATGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAGCTTCCGTTGAATGACGTGCTTGCAC
TGATTTCAACA
ATGAAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGGAATCTGCCCAGAAGCAGGGGATAACACTTGG
AAACAGGTGCT
AATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGGATTTTGTGTTGAAAGGTGGCTTCGGCTATCACTTCTGGAT
GATCCCGCGGC
GTATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAAGGCCACCAAGACGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATC
GGCCACATTGG
GACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCT
GATGGAGCAAT
GCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAGAAGAACACCTTTGAGAGTA
ACTGTTCAAGG
```

GTTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGTCC
GGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACC
GGAGAAGTGCA
TCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAG
ATATATGGAAG
AACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAA
CAGGATTAGAT
ACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGCTGCA
GCTAACGCATT
AAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAG
CGGTGGAGCAT
GTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTTAGAGATA
AGACGTTCCCT
TCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCC
CGCAACGAGCG
CAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG
GAAGGTGGGGA
TGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGT
TGCGAAGTCGT
GAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGT
TGGAATCGCTA
GTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAT
GAGAGTTTGTA
ACACCCAAAGCCGGTGAGATAACCTTCGGGAGTCAGCCGTCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTG