



(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)



1-0034414

(51)⁸ C12N 1/20; A23K 10/18; A61K 35/74; (13) B
C12R 1/07; C12N 1/38; A01N 63/02;
C02F 3/34

(21) 1-2018-04661

(22) 05/04/2017

(86) PCT/US2017/026122 05/04/2017

(87) WO2017/176872 12/10/2017

(30) 62/318,587 05/04/2016 US

(45) 26/12/2022 417

(43) 25/02/2019 371A

(73) NCH CORPORATION (US)

2727 Chemsearch Blvd., Irving, TX 75062, United States of America

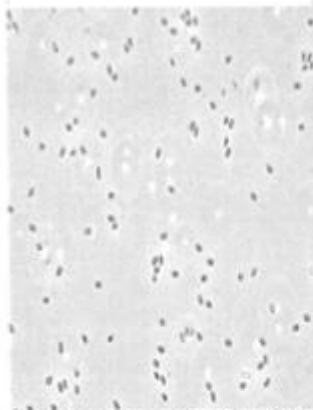
(72) EVERETT, Gabriel, F.K. (US); GREENWALD, Charles (US); PRUITT, Judy (US);
ROSMARIN, Amanda (US); CHURCH, Jordan (US); ABERLE, Daniel (US);
ABOAGYE, George (GB).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHƯƠNG PHÁP NẤY MÀM BÀO TỬ VI KHUẨN

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm kích thích nẩy mầm dinh dưỡng để hỗ trợ sự nẩy mầm bào tử và phương pháp để gia tăng hiệu suất nẩy mầm bào tử. Chế phẩm này chứa các L-axit amin, D-glucosa và/hoặc D-fructosa, chất đệm phosphat, chất bảo quản công nghiệp, và có thể chứa bào tử vi khuẩn hoặc chúng có thể được kết hợp một cách riêng rẽ để kích thích nẩy mầm. Phương pháp bao gồm các bước cung cấp chế phẩm kích thích nẩy mầm dinh dưỡng và bào tử vi khuẩn, tốt hơn là của một hoặc nhiều loài *Bacillus*, và gia nhiệt đến nhiệt độ cao được ưu tiên nằm trong khoảng từ 41°C đến 44°C trong thời gian ủ nằm trong khoảng từ 2 đến 60 phút. Chế phẩm kích thích nẩy mầm dinh dưỡng tốt hơn là ở dưới dạng lỏng đặc mà được pha loãng ngay trước khi bắt đầu phương pháp nẩy mầm/ủ tại điểm sử dụng. Phương pháp này có thể còn bao gồm bước phân phối dung dịch bào tử được nẩy mầm đến điểm sử dụng/tiêu thụ, như thức ăn, nước, hoặc ổ của động vật, hoặc đến hệ thống nước thải hoặc đường dẫn nước.

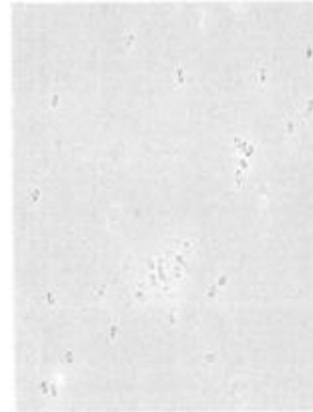
A. 42°C có chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng



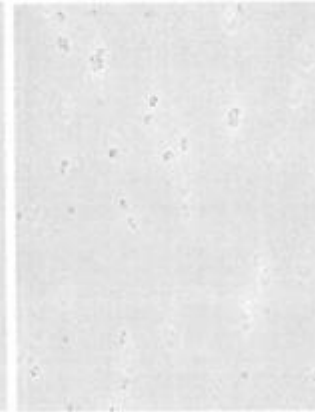
B. 23°C có chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng



C. 42°C không có chế phẩm nảy mầm dinh dưỡng



D. 23°C không có chế phẩm nảy mầm dinh dưỡng



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng được cô đặc và phương pháp ủ tại điểm sử dụng để nảy mầm bào tử vi khuẩn.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Sự nảy mầm bào tử là quy trình căn nguyên, nhiều bước trong đó bào tử thức dậy một cách hiệu quả hoặc được hồi sinh từ trạng thái ngủ trở thành trạng thái sinh trưởng sinh dưỡng. Bước đầu tiên là bước qua đó bào tử được hoạt hóa và được cảm ứng nảy mầm, thường bằng tín hiệu môi trường được gọi là chất kích thích nảy mầm. Tín hiệu này có thể là chất dinh dưỡng như L-axit amin. Các chất kích thích nảy mầm dinh dưỡng gắn với các thụ thể ở màng bên trong của bào tử để khởi động sự nảy mầm. Ngoài ra, các đường đã được thể hiện là làm tăng ái lực liên kết của các L-axit amin đối với các thụ thể cùng nguồn gốc của chúng.

Tín hiệu kích thích nảy mầm sau đó khởi động hệ tăng mà gây ra sự giải phóng axit dipicolinic (Dipicolinic Acid - DPA), axit này được dự trữ với tỷ lệ 1:1 với Ca^{2+} (CaDPA) trong nhân của bào tử. Sự giải phóng CaDPA là quy trình nhanh chóng và thường hoàn thành >90% trong 2 phút. Sự giải phóng CaDPA là điểm không thể nghịch đảo đối với bào tử từ đó chúng được cam kết chuyển đến quy trình nảy mầm. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này gọi bước này là bước “cam kết”.

Sau khi giải phóng CaDPA, bào tử được hydrat hóa một phần và độ pH của nhân tăng lên đến xấp xỉ 8,0. Nhân của bào tử sau đó mở rộng và vỏ (chủ yếu bao gồm peptidoglycan) được phân giải bằng các enzym phân giải nhân. Bào tử hấp thụ nước và do đó mất tính khúc xạ của nó. Sự mất tính khúc xạ này hướng đến việc kết thúc quá trình nảy mầm cho phép theo dõi được sự nảy mầm bào tử thông qua kính hiển vi tương phản pha.

Pha thứ hai của quá trình nảy mầm là bước sinh trưởng nhanh chóng trong đó các quy trình chuyển hóa, sinh tổng hợp và sao chép/sửa chữa ADN của bào tử bắt đầu. Thời kỳ sinh trưởng nhanh chóng bao gồm một số pha. Pha đầu tiên được biết như là thời kỳ làm chín trong đó không diễn ra các thay đổi về hình thái (như sự phát triển tế bào), nhưng bộ máy phân tử của bào tử (ví dụ, các yếu tố phiên mã, bộ máy dịch mã, bộ máy sinh tổng hợp, v.v.) được hoạt hóa. Độ dài của thời kỳ này có thể thay đổi dựa trên các nguồn dự trữ ban đầu mà được lưu trữ với bào tử trong suốt quá trình hình thành bào tử. Ví dụ, nguồn cacbon được ưu tiên của một số loài *Bacillus* (bao gồm *subtilis*) là malat và các bào tử *Bacillus* thường chứa lượng lớn malat mà được sử dụng trong suốt quá trình hồi sinh. Thú vị là, các thể đột biến xóa đoạn mà không thể sử dụng nguồn malat thể hiện thời kỳ chín kéo dài so với các bào tử kiểu dại, điều này chỉ ra rằng nguồn malat của bào tử là đủ để cung cấp năng lượng cho quá trình sinh trưởng nhanh chóng ban đầu. Ngoài ra, bào tử còn dự trữ các protein nhỏ, hòa tan trong axit, các protein này được phân giải trong vòng vài phút đầu tiên của quá trình hồi sinh, chúng đóng vai trò như là nguồn axit amin trực tiếp cho quy trình tổng hợp protein. Sau bước sinh trưởng nhanh chóng, sự hồi sinh bào tử là hoàn thành và các tế bào được xem như là đến giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng.

Đã biết rằng bào tử có thể được cảm ứng để nảy mầm thông qua quá trình hoạt hóa nhiệt. Bào tử của các loài *Bacillus* khác nhau đã được hoạt hóa nhiệt ở các nhiệt độ đặc hiệu đối với chúng. Ví dụ, bào tử *B. subtilis* đã được hoạt hóa nhiệt ở 75°C trong 30 phút trong khi bào tử *B. licheniformis* đã được hoạt hóa nhiệt ở 65°C trong 20 phút. Sự hoạt hóa nhiệt đã được thể hiện là gây ra sự duỗi nếp gấp tạm thời, có thể nghịch đảo đối với các protein vỏ bào tử. Bào tử được hoạt hóa nhiệt sau đó có thể được nảy mầm trong một khoảng thời gian bổ sung trong các chất đệm kích thích nảy mầm chứa các chất kích thích nảy mầm dinh dưỡng, như L-alanin. Tuy nhiên, nếu không có chất kích thích nảy mầm dinh

dưỡng, bào tử sẽ quay trở lại trạng thái tiền xử lý nhiệt, không được nảy mầm của chúng.

Quá trình nảy mầm cũng được biết là có thể xảy ra ở nhiệt độ môi trường (gần với nhiệt độ trong phòng điển hình) mà không có sự hoạt hóa nhiệt và với chất đệm kích thích nảy mầm chứa các chất dinh dưỡng, nhưng quy trình như vậy thường diễn ra lâu hơn so với quy trình hoạt hóa nhiệt. Ví dụ, bào tử *B. licheniformis* và *B. subtilis* sẽ nảy mầm lần lượt ở 35°C hoặc 37°C, nhưng sẽ cần thời gian dài hơn (ví dụ, 2 giờ) trong chất đệm kích thích nảy mầm chứa các chất kích thích nảy mầm dinh dưỡng. Ngoài ra, bào tử không được hoạt hóa bằng nhiệt của *B. subtilis* đã được biết là đã nảy mầm trong các điều kiện không có chất kích thích nảy mầm dinh dưỡng (ví dụ, $\text{CaCl}_2 + \text{Na}_2\text{DPA}$) trong thời gian dài.

Sự kết hợp sử dụng việc hoạt hóa nhiệt và chất kích thích nảy mầm dinh dưỡng để nảy mầm bào tử trong quy trình hai bước trong phòng thí nghiệm cũng đã được biết đến. Đầu tiên, bào tử được hoạt hóa nhiệt bằng cách ủ trong một khoảng thời gian (ví dụ, 30 phút) ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 65°C đến 75°C (nhiệt độ cụ thể này là phụ thuộc vào loài). Sau đó, bào tử được chuyển vào dung dịch đệm chứa chất kích thích nảy mầm dinh dưỡng, như L-alanin. Sự sinh trưởng vi khuẩn trong buồng sinh trưởng nằm ở gần vị trí sử dụng bằng cách cấp vật chất dinh dưỡng dạng viên (chứa đường, chiết xuất nấm men, và các chất dinh dưỡng khác mà không phải là các chất kích thích nảy mầm bào tử trực tiếp), giống vi khuẩn, và nước vào buồng sinh trưởng ở khoảng nhiệt độ được kiểm soát từ 16°C đến 40°C, và tốt hơn nữa là từ 29°C đến 32°C, trong thời gian sinh trưởng khoảng 24 giờ như được bộc lộ trong Patent Mỹ số 7,081,361.

Cần có phương pháp ủ và hoạt hóa bào tử nhanh mà sẽ cho phép sản sinh các loài *Bacillus* hoạt tính trong một bước ở vị trí điểm sử dụng nơi vi khuẩn sẽ được phân bố đến đối tượng tiêu dùng/sử dụng, ví dụ, theo cách probiotic để sử dụng cho người, động vật hoặc thực vật hoặc phân bố trực tiếp vào cơ sở xử lý nước hoặc đường dẫn nước. Do đó, sáng chế mô tả phương pháp đơn giản để nảy

mầm bào tử sử dụng chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng cô đặc đồng thời với việc ủ nhiệt trong một bước.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng theo một phương án được ưu tiên của sáng chế chứa một hoặc kết hợp của nhiều L-axit amin, tùy ý cả D-glucosa (mà gia tăng ái lực liên kết của L-axit amin đối với các thụ thể cùng nguồn gốc của chúng trong vỏ bào tử), và chất đệm trung tính như chất đệm phosphat, và chất bảo quản công nghiệp, như Kathon/Lingaurd CG có bán trên thị trường (mà có các thành phần hoạt tính bao gồm metyl clo isothiazolinon và metyl isothiazolinon). Chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng theo phương án được ưu tiên khác của sáng chế chứa một hoặc kết hợp của hai hoặc nhiều L-axit amin, tùy ý cả D-glucosa (mà gia tăng ái lực liên kết của L-axit amin đối với các thụ thể cùng nguồn gốc của chúng trong vỏ bào tử), muối natri HEPES (chất đệm sinh học để cung cấp độ pH thích hợp cho việc nảy mầm bào tử), và chất bảo quản công nghiệp, như kết hợp của propylparaben và methylparaben hoặc các chất bảo quản thường được xem như là an toàn khác (GRAS - Generally Regarded As Safe). Theo phương án được ưu tiên khác, chế phẩm còn chứa nguồn ion kali, như kali clorua hoặc monokali phosphat hoặc dikali phosphat. Theo phương án được ưu tiên khác, chế phẩm chứa cả D-glucosa và D-fructoza.

Theo phương án được ưu tiên khác, chế phẩm còn chứa bào tử của một hoặc nhiều loài *Bacillus* và chứa chất ức chế nảy mầm, như NaCl, các chất bảo quản công nghiệp, hoặc D-alanin, kết hợp với thành phần chế phẩm bất kỳ trong số các thành phần chế phẩm đã được mô tả. Chất ức chế nảy mầm ngăn chặn bào tử khỏi nảy mầm sớm trong chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng. Chất ức chế nảy mầm có thể chứa các hóa chất mà ngăn chặn sự nảy mầm bào tử như NaCl, các chất bảo quản công nghiệp, hoặc D-alanin. Cách khác, bào tử vi khuẩn có thể được cung cấp một cách riêng rẽ và được bổ sung vào chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng theo sáng chế tại điểm sử dụng và ủ.

Theo phương án được ưu tiên khác, chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng theo sáng chế là ở dạng được cô đặc và được pha loãng đến nồng độ 0,01% đến 10% trong nước hoặc chất pha loãng khác tại điểm sử dụng. Việc sử dụng công thức cô đặc làm giảm chi phí vận chuyển, bảo quản, và đóng gói và giúp cho việc phân liều chế phẩm tại điểm sử dụng dễ dàng hơn. Tốt nhất là, chế phẩm được cô đặc là ở dạng lỏng, dạng này dễ trộn hơn và trộn nhanh hơn với chất pha loãng tại điểm sử dụng, nhưng các dạng rắn như viên hoặc bánh hoặc bột cũng có thể được sử dụng. Việc đưa chất bảo quản công nghiệp thông thường vào chế phẩm hỗ trợ bảo quản và/hoặc ức chế nảy mầm trong thời gian dài, điều này là đặc biệt hữu dụng khi chế phẩm ở dưới dạng cô đặc được ưu tiên.

Theo phương án được ưu tiên khác, sáng chế bao gồm phương pháp nảy mầm bào tử thuộc loài *Bacillus* sử dụng chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng ở nhiệt độ cao; tốt hơn là nằm trong khoảng từ 35°C đến 60°C, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 38°C đến 50°C, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 41°C đến 44°C trong một khoảng thời gian (thời gian ủ). Thời gian ủ tốt hơn là nằm trong khoảng từ 2 đến 60 phút, tùy thuộc vào ứng dụng. Tốt nhất là, chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng ở dưới dạng được cô đặc theo phương án được ưu tiên của sáng chế được sử dụng trong các phương pháp ủ theo sáng chế, nhưng các chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng khác cũng có thể được sử dụng. Tốt hơn là, phương pháp ủ được thực hiện tại hoặc gần điểm sử dụng- vị trí hoặc gần vị trí nơi bào tử được nảy mầm sẽ được sử dụng (như gần vị trí cho động vật ăn, uống, hoặc ngủ) hoặc được tiêu thụ và còn bao gồm bước phân phối bào tử được nảy mầm đến điểm sử dụng/tiêu thụ. Các phương pháp được ưu tiên theo sáng chế có thể được thực hiện trong thiết bị ủ bất kỳ mà có bể chứa có khả năng giữ thể tích bào tử, chất lỏng (thường là nước), chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng và có khả năng gia nhiệt hỗn hợp trong thời gian ủ. Tốt nhất là, phương pháp được thực hiện trong thiết bị mà còn có khả năng trộn các thành phần đó, tự động tắt bỏ sự gia nhiệt ở cuối thời gian ủ, và tự động phân phối probiotic hoặc dung dịch xử lý

chứa bào tử đến điểm sử dụng/tiêu thụ. Các phương pháp được ưu tiên cũng có thể được thực hiện dưới dạng quy trình gián đoạn hoặc dưới dạng quy trình liên tục. Dạng bất kỳ trong số các dạng bào tử, như dạng bột khô, huyền phù lỏng, hoặc hỗn hợp nước hoàn nguyên, có thể được sử dụng với phương pháp theo sáng chế.

Các phương án được ưu tiên của sáng chế có tính hữu dụng và khả năng áp dụng rộng rãi và sẽ cho phép sự nảy mầm một cách nhanh chóng bào tử thuộc loài *Bacillus* tại điểm sử dụng. Các phương án được ưu tiên là đặc biệt hữu dụng trong việc chuẩn bị bào tử để sử dụng làm probiotic, ví dụ để làm thức ăn cho động vật, và để cung cấp vi khuẩn để xử lý các hệ thống nước thải hoặc cung cấp cho việc bảo dưỡng đường dẫn nước.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Sáng chế còn được mô tả và giải thích thông qua các hình vẽ dưới đây trong đó:

Fig.1 thể hiện các ảnh chụp các lát cắt vi khuẩn sử dụng chế phẩm và phương án được ưu tiên của sáng chế so với các lát cắt đối chứng;

Fig.2 là đồ thị thể hiện dữ liệu thử nghiệm pO_2 để chứng minh các mức nảy mầm sử dụng chế phẩm và phương pháp theo phương án được ưu tiên của sáng chế so với các thử nghiệm đối chứng; và

Fig.3 là đồ thị thể hiện dữ liệu thử nghiệm pO_2 để chứng minh các mức nảy mầm sử dụng chế phẩm các phương pháp thay đổi theo các phương án được ưu tiên của sáng chế so với các thử nghiệm đối chứng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng theo một phương án được ưu tiên của sáng chế chứa một hoặc nhiều L-axit amin, D-glucoza (mà tăng ái lực liên kết của các L-axit amin đối với các thụ thể cùng nguồn gốc của chúng trong vỏ bào tử và là tùy ý), D-Fructoza (tùy ý, tùy thuộc vào loài vi khuẩn), chất đệm sinh học để tạo độ pH thích hợp cho sự nảy mầm bào tử (như muối natri HEPES, chất

đệm phosphat, hoặc chất đệm Tris), nguồn ion kali tùy ý (như KCl), và chất bảo quản công nghiệp. Theo phương án được ưu tiên khác, chế phẩm chứa cả D-glucosa và D-fructoza. Chế phẩm được ưu tiên nhất là chứa nguồn ion kali, như KCl, khi cả D-glucosa và D-fructoza được sử dụng. Việc sử dụng D-fructoza, kết hợp của D-glucosa và D-fructoza, và nguồn ion kali là phụ thuộc vào loài vi khuẩn như sẽ được người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. Ưu tiên là sử dụng chất bảo quản mà có độ pH tương thích với chế phẩm, mà có độ pH tương đối trung tính. Theo phương án được ưu tiên khác, chế phẩm còn chứa bào tử của một hoặc nhiều loài *Bacillus* và một hoặc nhiều chất ức chế nảy mầm. Cách khác, bào tử có thể được bổ sung một cách riêng rẽ vào chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng theo sáng chế tại điểm sử dụng. Theo phương án được ưu tiên khác, chế phẩm là ở dạng được cô đặc, tốt nhất là dưới dạng chất lỏng được cô đặc, và được pha loãng tại điểm sử dụng.

Các L-axit amin được ưu tiên bao gồm L-alanin, L-asparagin, L-valin, và L-xystein. Theo phương án thêm nữa của chế phẩm được cô đặc, các L-axit amin có thể được cung cấp dưới dạng sản phẩm thủy phân của protein đậu nành. Nếu ở dưới dạng được cô đặc, tốt hơn là chế phẩm chứa dung dịch của một hoặc nhiều L-axit amin nêu trên với lượng mỗi chất nằm trong khoảng từ 8,9 đến 133,5 g/L, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 13,2 đến 111,25 g/L, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 17,8 đến 89 g/L; D-glucosa (tùy ý) và/hoặc D-fructoza (tùy ý) với lượng nằm trong khoảng từ 18 đến 54 g/L, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 27 đến 45 g/L, và tốt nhất là mỗi chất với lượng 30 đến 40 g/L; KCl (tùy ý, dưới dạng nguồn kali) với lượng nằm trong khoảng từ 7,4 đến 22,2 g/L, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 11,1 đến 18,5 g/L, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 14 đến 16 g/L; mononatri phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 36 g/L, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 15 đến 30 g/L, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 20 đến 24 g/L; dinatri phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 90 g/L, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 21,3 đến 75 g/L, và tốt nhất là nằm trong khoảng

từ 28,4 đến 60 g/L; và một hoặc nhiều chất bảo quản công nghiệp với (tổng) lượng cuối cùng nằm trong khoảng từ 0,8 đến 3,3 g/L, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 1,2 đến 2,7 g/L, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 1,6 đến 2,2 g/L. Ngoài hoặc thay vì chất đệm mononatri/dinatri phosphat, chế phẩm có thể chứa Tris bazơ với lượng nằm trong khoảng từ 15 đến 61 g/L, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 24 đến 43 g/L, và tốt nhất là với lượng nằm trong khoảng từ 27 đến 33 g/L; hoặc chất đệm HEPES với lượng nằm trong khoảng từ 32,5 đến 97,5g/L, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 48,75 đến 81,25 g/L, và tốt nhất là với lượng nằm trong khoảng từ 60 đến 70 g/L. Tùy ý, monokali phosphat có thể còn được sử dụng làm nguồn ion kali, tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 13,6 đến 40,8 g/L, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 20,4 đến 34 g/L, và tốt nhất là với lượng nằm trong khoảng từ 26 đến 29 g/L. Tùy ý, dikali phosphat có thể còn được sử dụng làm nguồn ion kali, tốt hơn là với lượng nằm trong khoảng từ 8,7 đến 26,1 g/L, tốt hơn nữa là với lượng nằm trong khoảng từ 13 đến 21,75 g/L, và tốt nhất là với lượng nằm trong khoảng từ 16 đến 19 g/L. Lượng các thành phần này là các khía cạnh quan trọng của sáng chế vì nồng độ cao hơn sẽ khiến cho một số thành phần không hòa tan và nồng độ thấp hơn sẽ là không hiệu quả đối với việc nảy mầm bào tử.

Tốt nhất là, chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng được cô đặc theo các phương án của sáng chế là dưới dạng được cô đặc và được pha loãng thành dung dịch hoạt động trong nước hoặc chất pha loãng thích hợp bất kỳ khác, tốt hơn là tại điểm sử dụng. Dịch pha loãng tốt hơn chứa sản phẩm được cô đặc với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10% và nước cân bằng, nhưng các lượng khác cũng có thể được sử dụng. Việc sử dụng công thức cô đặc làm giảm chi phí vận chuyển, bảo quản, và đóng gói và giúp cho việc phân liều chế phẩm tại điểm sử dụng dễ dàng hơn. Tốt nhất là, chế phẩm được cô đặc là ở dạng lỏng, dạng này dễ trộn hơn và trộn nhanh hơn với chất pha loãng tại điểm sử dụng, nhưng các dạng rắn như viên hoặc bánh hoặc bột cũng có thể được sử dụng. Việc đưa chất bảo quản công

nghiệp thông thường vào chế phẩm trợ giúp bảo quản và/hoặc ức chế nảy mầm trong thời gian dài, điều này là đặc biệt hữu dụng khi chế phẩm ở dưới dạng được cô đặc được ưu tiên.

Theo một phương án được ưu tiên, chế phẩm tốt hơn là chứa một hoặc nhiều bào tử *Bacillus* với lượng nằm trong khoảng từ 10% đến 90% theo khối lượng. Bào tử *Bacillus* được ưu tiên bao gồm các loài dưới đây: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lentus*, *Bacillus clausii*, *Bacillus circulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lactis*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus laevolacticus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus simplex*, và *Bacillus sphaericus*. Các loài bào tử *Bacillus* khác cũng có thể được sử dụng như được hiểu rõ bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này. Tốt nhất là, chế phẩm chứa 3 đến 12 loài *Bacillus*. Cách khác, các bào tử này có thể được bổ sung một cách riêng rẽ vào chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng tại điểm sử dụng.

Theo phương án được ưu tiên khác, chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng để sử dụng làm probiotic chứa một hoặc nhiều chủng *Bacillus* mà có bản chất là probiotic trong đó chúng hỗ trợ việc bẻ gãy các chất dinh dưỡng trong đường tiêu hóa của người tiêu dùng. Tốt hơn là các chủng sản xuất một hoặc nhiều enzym dưới đây: proteaza để thủy phân protein, amylaza để thủy phân tinh bột và các hydrat cacbon khác, lipaza để thủy phân chất béo, glycosidaza để hỗ trợ việc thủy phân các liên kết glycosit trong các đường phức tạp và để hỗ trợ sự phân hủy xenluloza, xenlulaza để phân hủy xenluloza thành glucoza, esteraza mà là enzym giống lipaza, và xylanaza mà phân hủy xylan, polysacarit được phát hiện trong thành tế bào thực vật. Các chủng *Bacillus* mà sản xuất các enzym này là được biết rõ trong lĩnh vực này. Cách khác, các chủng *Bacillus* này cũng có thể được bổ sung một cách riêng rẽ vào chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng tại điểm sử dụng.

Theo phương án khác, chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng để sử dụng trong xử lý nước thải hoặc xử lý đường dẫn nước chứa một hoặc nhiều chủng *Bacillus* mà sản xuất các enzym mà có lợi trong việc thủy phân các chất hữu cơ thường thấy trong nước thải và/hoặc đường dẫn nước. Tốt hơn là các chủng *Bacillus* sản xuất một hoặc nhiều enzym dưới đây: proteaza để thủy phân protein thực vật và động vật, amylaza để thủy phân tinh bột và các hydrat cacbon khác, lipaza để thủy phân chất béo thực vật và động vật, dầu, và mỡ, glycosidaza để hỗ trợ việc thủy phân các liên kết glycosit trong các đường phức tạp và để hỗ trợ sự phân hủy xenluloza, xenlulaza để phân hủy xenluloza thành glucoza, esteraza mà là enzym giống lipaza, và xylanaza. Các enzym khác cũng có thể được sản xuất. Các loài *Bacillus* cụ thể được chọn để đưa vào trong chế phẩm được ưu tiên theo sáng chế có thể là loài mà sản xuất một cách đặc hiệu các enzym hướng đích loại chất hữu cơ cụ thể mà được phát hiện thấy trong nước thải và/hoặc đường dẫn nước được xử lý. Các chủng *Bacillus* mà sản xuất các enzym này hoặc hướng đích các loại xử lý chất thải cụ thể đã được biết rõ trong lĩnh vực này. Cũng như vậy hay là phương án khác, các chủng *Bacillus* này cũng có thể được bổ sung một cách riêng rẽ vào chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng tại điểm sử dụng.

Nếu bào tử được chứa trong chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng, thì chế phẩm này còn chứa một hoặc nhiều chất ức chế nảy mầm và/hoặc chất bảo quản. Các chất ức chế nảy mầm hoặc các chất bảo quản được ưu tiên bao gồm NaCl, D-alanin, hoặc các chất bảo quản. Cụ thể là, chế phẩm chứa nồng độ NaCl cao nằm trong khoảng từ 29 đến 117 g/L, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 43 đến 88 g/L, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 52 đến 71 g/L, và/hoặc một hoặc nhiều chất bảo quản hóa học (như Linguard ICP hoặc Kathon CG (mà có các thành phần hoạt tính bao gồm metyl clo isothiazolinon, khoảng 1,15 đến 1,18% và metyl isothiazolinon, khoảng 0,35 đến 0,4%)) ở (tổng) nồng độ cuối cùng là nằm trong khoảng từ 0,8 đến 3,3 g/L, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 1,2 đến 2,7 g/L, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 1,6 đến 2,2 g/L, và/hoặc D-alanin (chất ức

chế nảy mầm cạnh tranh đã biết) nằm trong khoảng từ 8 đến 116 g/L, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 26 đến 89 g/L, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 40 đến 50 g/L. Các chất ức chế nảy mầm hoặc các chất bảo quản này giữ bào tử ở trạng thái vô hoạt và ngăn ngừa sự nảy mầm sớm của bào tử trước khi pha loãng và hoạt hóa chúng tại điểm sử dụng. Việc sử dụng các chất ức chế nảy mầm là đặc biệt được ưu tiên khi chế phẩm theo phương án này được sử dụng với phương pháp được ưu tiên theo sáng chế, trong đó sự nảy mầm diễn ra tại điểm sử dụng. Chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng theo sáng chế tùy ý chứa các thành phần tiêu chuẩn khác bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các chất bảo quản khác mà đảm bảo thời hạn sử dụng của chế phẩm và các chất hoạt động bề mặt mà hỗ trợ sự phân tán của các thành phần hoạt tính, mà thường được chứa trong các chế phẩm bào tử hoặc trong các sản phẩm xử lý công nghiệp.

Theo một phương án được ưu tiên, phương pháp nảy mầm bào tử tại điểm sử dụng theo sáng chế bao gồm việc cung cấp chế phẩm chứa bào tử và các chất dinh dưỡng (tốt hơn là chế phẩm theo sáng chế, nhưng bào tử và các chất dinh dưỡng cũng có thể là các chế phẩm riêng rẽ/các thành phần được bổ sung riêng rẽ) và gia nhiệt chế phẩm đến nhiệt độ cao hoặc khoảng nhiệt độ cao và duy trì chế phẩm ở nhiệt độ đó hoặc trong khoảng nhiệt độ đó trong một khoảng thời gian (thời gian ủ) để cho phép sự nảy mầm tại vị trí điểm sử dụng gần với điểm tiêu thụ. Việc gia nhiệt trong suốt thời gian ủ diễn ra với sự có mặt của chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng trong một bước duy nhất. Phương pháp tốt hơn là còn bao gồm bước phân phát bào tử được nảy mầm cho động vật (thông qua thức ăn hoặc nước), ổ động vật, thực vật, bể, người, hệ thống nước thải, hoặc đường dẫn nước. Tốt hơn là, chế phẩm bào tử được gia nhiệt đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 35°C đến 55°C, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 38°C đến 50°C, và tốt nhất là nằm trong khoảng từ 41°C đến 44°C. Thời gian ủ có thể thay đổi tùy thuộc vào ứng dụng sử dụng cuối cùng. Đối với ứng dụng probiotic, tốt hơn là thời gian ủ kéo dài không lâu hơn 10 phút. Tốt nhất là, đối với ứng dụng probiotic, thời gian ủ

nằm trong khoảng từ 2 đến 5 phút. Theo cách này, bào tử được giải phóng đến động vật trước khi bào tử đã nảy mầm đầy đủ và tạo cơ hội sống sót tốt hơn thông qua đường ruột của động vật nơi chúng có lợi nhất. Mặt khác, ứng dụng đối với nước thải có thể yêu cầu thời gian ủ lâu hơn nằm trong khoảng từ 20 đến 60 phút để đảm bảo rằng bào tử được nảy mầm hoàn toàn được phân phát đến nước thải được xử lý. Tốt nhất là, thời gian ủ là nằm trong khoảng từ 20 đến 30 phút đối với việc xử lý nước thải. Bất kể ứng dụng gì, việc ủ có thể trong máy áp không khí, máy áp nước, hoặc khoang bất kỳ khác mà cung cấp nhiệt đồng đều, không đổi trong khoảng nhiệt độ đã định.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các chế phẩm khác nhau theo các phương án được ưu tiên của sáng chế được thử nghiệm theo các phương pháp được ưu tiên của sáng chế. Các chế phẩm, các phương pháp, và các kết quả được mô tả dưới đây.

Ví dụ 1 - Để nảy mầm bào tử, FreeFlow LF-88 Probiotic (chế phẩm bào tử lỏng có bán trên thị trường của NCH Corporation) được bổ sung vào 1mL nước máy ở nồng độ cuối cùng khoảng 1×10^9 CFU/mL, trong đó CFU có nghĩa là đơn vị tạo thành khuẩn lạc (colony forming unit). Chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng được cô đặc theo phương án được ưu tiên của sáng chế chứa L-alanin (89 g/L), mononatri phosphat (20 g/L), dinatri phosphat (60 g/L), và Linguard CP (1,6 g/L tổng cộng) được bổ sung vào nước và hỗn hợp vi khuẩn để tạo ra nồng độ chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng cuối cùng là 4% trên tổng khối lượng của hỗn hợp. Để so sánh, các phản ứng đối chứng âm tính được chuẩn bị với lượng giống như FreeFlow LF-88 Probiotic và nước, nhưng không bổ sung chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng được cô đặc. Cả hai hỗn hợp (hỗn hợp kích thích nảy mầm và đối chứng âm tính không có chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng) được trộn và ủ trong 60 phút trong khối giữ nhiệt được ủ trước được đặt ở mức 42°C hoặc ở nhiệt độ trong phòng (khoảng 23°C).

Các bào tử từ mỗi phản ứng được quan sát bằng cách sử dụng kính hiển vi tương phản pha. Các lát cắt được chuẩn bị bằng cách sử dụng quy trình chuẩn. Bào tử được xem xét trên kính hiển vi Olympus BX41 (vật kính chìm dầu 100X) và được chụp ảnh bằng cách sử dụng máy ảnh Olympus UC30 được kiểm soát bằng gói phần mềm cellSens Dimension.

Các hình ảnh được chụp và các bào tử được nảy mầm được đếm dưới dạng phần trăm trên tổng số bào tử trong môi trường. Tổng số 10 hình ảnh đại diện được phân tích đối với mỗi điều kiện (hỗn hợp thử nghiệm). Các bào tử được nảy mầm mất tính khúc xạ của chúng do nước đi vào chúng và là pha tối trong khi các bào tử không nảy mầm là pha sáng.

Fig.1 thể hiện các hình ảnh đại diện từ các thử nghiệm này. Hình A thể hiện bào tử mà đã được nảy mầm bằng cách sử dụng chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng và được gia nhiệt trong suốt thời gian ủ ở 42°C đối với chế phẩm được ưu tiên và phương pháp được ưu tiên của sáng chế. Các vết tối hơn thể hiện bào tử được nảy mầm, các vết sáng hơn thể hiện bào tử không được nảy mầm. Hình B thể hiện bào tử mà đã được nảy mầm sử dụng chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng theo phương án được ưu tiên của sáng chế, nhưng được ủ ở nhiệt độ môi trường (23°C). Các hình C-D thể hiện bào tử đối chứng mà chưa được xử lý với chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng theo sáng chế, một chế phẩm được ủ ở 42°C và một chế phẩm được ủ ở nhiệt độ môi trường (23°C).

Như có thể thấy trên Fig.1, hình “A” thể hiện bào tử được nảy mầm đáng kể hơn (các vết tối) so với các hình khác. Các bào tử được ủ bằng chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng theo phương án được ưu tiên của sáng chế kết hợp với phương pháp nảy mầm theo phương án được ưu tiên của sáng chế thể hiện hiệu quả nảy mầm biểu kiến là 96,8% (Ví dụ 1, Fig.1A). Các bào tử đối chứng mà đã được ủ bằng chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng theo phương án được ưu tiên của sáng chế, nhưng không sử dụng phương pháp nảy mầm theo phương án được ưu tiên của sáng chế thể hiện hiệu quả nảy mầm biểu kiến là 2,3% (Ví dụ 1,

Fig.1B). Tương tự, các bào tử mà không được ủ bằng chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng theo sáng chế thể hiện hiệu suất hoạt hóa biểu kiến là 1,2% và 2,6% lần lượt ở 42°C và 23°C (Ví dụ 1, các Fig.1C và 1D). Các bào tử được nảy mầm trong các mẫu không được xử lý bằng các phương án được ưu tiên của phương pháp theo sáng chế thể hiện mức phần trăm nhỏ của số bào tử đã được nảy mầm trong dung dịch FreeFlow LF-88 Probiotic. Ví dụ này chứng minh rằng sự nảy mầm bào tử được gia tăng đáng kể nếu chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng và phương pháp ủ theo các phương án được ưu tiên của sáng chế được sử dụng cùng nhau.

Ví dụ 2 – Tập hợp thử nghiệm ủ khác được chạy bằng cách sử dụng hỗn hợp/phương pháp ủ thử nghiệm như nhau (sử dụng chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng và sự ủ gia nhiệt như nhau, “Bào tử được xử lý, 42°C”) và hỗn hợp/phương pháp ủ đối chứng (không có chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng và không gia nhiệt, “Bào tử không được xử lý, 23°C”) như được mô tả trên đây trong ví dụ 1 được lặp lại, nhưng các thử nghiệm khác được chạy để so sánh hiệu suất của hỗn hợp thử nghiệm theo các phương án được ưu tiên của sáng chế so với hỗn hợp đối chứng. Ngoài ra, hai hỗn hợp khác được thử nghiệm – một hỗn hợp trong đó chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng theo ví dụ 1 được sử dụng nhưng không có nhiệt (“Bào tử được xử lý, 23°C”) và một hỗn hợp trong đó chất kích thích nảy mầm dinh dưỡng không được sử dụng nhưng bào tử được gia nhiệt (“Bào tử không được xử lý, 42°C”). Ngắn gọn là, bào tử được ủ ở 42°C hoặc 23°C trong 1 giờ cùng hoặc không cùng với việc xử lý với chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng được ưu tiên. Sau khi ủ, bào tử từ 1mL của mỗi phản ứng được kết viên bằng cách ly tâm ở tốc độ 14K vòng/phút trong 3 phút ở 23°C và được tái tạo huyền phù trong 1 mL dung dịch đệm Butterfield. Khoảng 6×10^5 CFU (0,02mL) được bổ sung vào 0,980 mL môi trường Davis tối thiểu (chứa 3% glucoza làm nguồn cacbon và các nguyên tố vi lượng) với lượng dư D-alanin. D-

alanin là chất ức chế có hiệu lực của quá trình nảy mầm qua trung gian L-axit amin.

Khoảng $1,2 \times 10^5$ CFU được bổ sung vào mỗi lỗ trong số bốn lỗ của đĩa PreSens OxoPlate. Các đĩa PreSens OxoPlate sử dụng các cảm biến oxy quang học để đo huỳnh quang hàm lượng oxy của mẫu sử dụng hai cặp bộ lọc (kích thích: 540nm, phát xạ: 650nm và kích thích: 540, phát xạ: 590nm). Các mẫu đối chứng được thực hiện như được mô tả bởi nhà sản xuất và các phép đo được thực hiện trên máy đọc đĩa huỳnh quang BioTek 800FLx. Các điểm thời gian được lấy mỗi 10 phút trong 24 giờ ở 37°C với việc lắc liên tục và dữ liệu được xử lý để xác định áp suất riêng phần của oxy (pO_2) sử dụng công thức dưới đây:

$$pO_2 = 100 * [(K_0/IR) - 1(K_0/K_{100}) - 1]$$

Bào tử mà đã nảy mầm và tiếp tục phân chia và phát triển như các tế bào sinh dưỡng tiêu thụ oxy như là một phần của sự sinh trưởng trao đổi chất của chúng. Sự tiêu thụ oxy được thể hiện bằng sự giảm pO_2 . Có lẽ sự sinh trưởng mà quan sát được là do sự sinh trưởng nhanh chóng và sự sinh trưởng sinh dưỡng của bào tử được nảy mầm bởi sáng chế. Các mức pO_2 đối với các thử nghiệm này được thể hiện trên Fig.2.

Như được thể hiện trên Fig.2, sự ủ với hỗn hợp thử nghiệm và phương pháp theo các phương án được ưu tiên của sáng chế (Bào tử được xử lý 42°C, sử dụng cả chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng và gia nhiệt) dẫn đến bào tử mà đã bắt đầu sinh trưởng sinh dưỡng nhanh hơn 4 giờ so với các hỗn hợp bào tử đối chứng mà đã không được xử lý hoặc được gia nhiệt theo các phương án được ưu tiên của sáng chế hoặc đã được xử lý bằng chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng hoặc được gia nhiệt, nhưng không thực hiện cả hai. Sự sinh trưởng được thấy ở các thử nghiệm đối chứng có lẽ thể hiện khoảng 2% số bào tử được nảy mầm có mặt trong FreeFlow LF-88 Probiotic (xem ví dụ 1). Ví dụ này thể hiện thêm rằng sự nảy mầm bào tử được gia tăng đáng kể nếu chế phẩm kích thích nảy

mầm dinh dưỡng và phương pháp ủ theo các phương án được ưu tiên của sáng chế được sử dụng.

Ví dụ 3 – Tập hợp thử nghiệm ủ khác được chạy sử dụng thử nghiệm tương tự và hỗn hợp đối chứng và phương pháp ủ như được mô tả trên đây trong ví dụ 1. Ngắn gọn là, LF-88 được bổ sung vào 10mL nước cất ở nồng độ cuối cùng là khoảng 10^8 CFU/mL. Các mẫu được ủ ở các nhiệt độ khác nhau để thể hiện hiệu suất của phương pháp thử nghiệm theo các phương án được ưu tiên của sáng chế so với hỗn hợp đối chứng. Các phản ứng được chuẩn bị với chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng được mô tả trong ví dụ 1 (“Bào tử được xử lý” trong Fig.3) và được ủ ở 23°C (nhiệt độ môi trường, không gia nhiệt), 32°C, 42°C, hoặc 60°C. Phản ứng đối chứng được ủ ở nhiệt độ môi trường mà không có chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng. Sau một giờ ủ, 1mL của mỗi phản ứng được kết viên bằng máy ly tâm ở tốc độ 14K vòng/phút trong 3 phút ở 23°C và được tái tạo huyền phù trong dung dịch đệm Butterfield. Khoảng 6×10^5 CFU (0,02mL) được bổ sung vào 0,980 mL môi trường Davis tối thiểu (chứa 3% glucoza làm nguồn cacbon và các nguyên tố vi lượng) với lượng dư D-alanin.

Khoảng $1,2 \times 10^5$ CFU được bổ sung vào mỗi lỗ trong số bốn lỗ của đĩa PreSens OxoPlate. Các mẫu đối chứng được thực hiện như được mô tả bởi nhà sản xuất và các phép đo được thực hiện trên máy đọc đĩa huỳnh quang BioTek 800Flx sử dụng hai cặp bộ lọc (kích thích: 540nm, phát xạ: 650nm và kích thích: 540, phát xạ: 590nm). Các điểm thời gian được lấy mỗi 10 phút trong 24 giờ ở 37°C với việc lắc liên tục và dữ liệu được xử lý để xác định áp suất riêng phần của oxy (pO_2). Các mức pO_2 đối với các thử nghiệm này được thể hiện trên Fig.3.

Như được thể hiện trên Fig.3, việc ủ sử dụng chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng và gia nhiệt theo các phương án được ưu tiên của sáng chế dẫn đến bào tử bắt đầu sinh trưởng sinh dưỡng trước hàng giờ so với đối chứng. Bào tử được xử lý bằng chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng nhưng không được gia nhiệt là có thể so sánh với hỗn hợp đối chứng. Bào tử được xử lý bằng chế phẩm

kích thích nảy mầm dinh dưỡng mà được ủ ở nhiệt độ nằm dưới khoảng được ưu tiên mà là từ 35 đến 55°C theo một phương án của sáng chế (được thể hiện bằng đường cong “Bào tử được xử lý 32°C”) bắt đầu sinh trưởng sinh dưỡng nhanh hơn các thử nghiệm đối chứng, nhưng không nhanh bằng bào tử được xử lý ở nhiệt độ cao trong các khoảng được ưu tiên theo sáng chế. Bào tử được xử lý bằng chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng và được ủ ở nhiệt độ trong khoảng được ưu tiên nhất mà là từ 41°C đến 44°C theo một phương án của sáng chế thể hiện kết quả tốt nhất, mà bắt đầu sinh trưởng sinh dưỡng đầu tiên và bắt đầu sinh trưởng nhanh hơn 4 giờ so với đối chứng. Như được thấy trong các ví dụ trên, sự sinh trưởng được thấy ở thử nghiệm đối chứng không xử lý có lẽ thể hiện khoảng 2% số bào tử được nảy mầm có mặt trong FreeFlow LF-88 Probiotic (xem ví dụ 1). Ví dụ này thể hiện thêm rằng sự nảy mầm bào tử được gia tăng đáng kể nếu chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng và phương pháp ủ theo các phương án được ưu tiên của sáng chế được sử dụng.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này cũng sẽ hiểu dựa vào việc đọc bản mô tả và phần mô tả các phương án ưu tiên trong bản mô tả này rằng các cải biến và các thay thế cho thiết bị có thể được thực hiện trong phạm vi của sáng chế và dự định rằng phạm vi của sáng chế được bộc lộ trong bản mô tả này được giới hạn chỉ bởi sự diễn giải rộng nhất về các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo mà các tác giả sáng chế nêu ra một cách hợp pháp.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp này nhằm bảo tử vi khuẩn tại điểm sử dụng bao gồm các bước sau:

cung cấp chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng và bảo tử của các loài vi khuẩn, nếu không được chứa trong chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng;

gia nhiệt chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng và bảo tử đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 35°C đến 60°C tại hoặc gần điểm sử dụng;

duy trì nhiệt độ này trong thời gian từ 2 đến 60 phút để tạo thành dung dịch bảo tử được nảy mầm;

phân phối dung dịch bảo tử được nảy mầm đến điểm sử dụng và trong đó điểm sử dụng bao gồm thức ăn cho động vật, nước uống cho động vật, ổ của động vật, thực vật, bể, hệ thống nước thải, hoặc đường dẫn nước, và

trong đó chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng này chứa: (1) một hoặc nhiều L-axit amin; (2) một hoặc nhiều chất đệm bao gồm chất đệm phosphat, HEPES, Tris bazơ, hoặc hỗn hợp của chúng; (3) chất bảo quản công nghiệp; và (4) tùy ý nguồn ion kali.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng là ở dạng lỏng được cô đặc và còn bao gồm các bước:

bổ sung chất pha loãng vào chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng;

trộn chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng đã được pha loãng và bảo tử vi khuẩn trong thời gian từ 0,1% đến 10%;

trong đó nồng độ của chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng được pha loãng là nằm trong khoảng từ 0,1% đến 10%.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ nằm trong khoảng từ 41°C đến 44°C.

4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó L-axit amin là L-alanin, L-asparagin, L-valin, L-xystein, sản phẩm thủy phân của protein đậu nành, hoặc hỗn hợp của chúng.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng là ở dạng lỏng được cô đặc chứa một hoặc nhiều L-axit amin với tổng lượng khoảng từ 17,8 g/L đến 89 g/L, phương pháp này còn bao gồm các bước:

bổ sung chất pha loãng vào chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng;

trộn chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng đã được pha loãng và bào tử vi khuẩn trong thời gian ủ;

và trong đó nồng độ của chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng đã được pha loãng là nằm trong khoảng từ 0,01% đến 10% của chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng được cô đặc.

6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng còn chứa bào tử của loài *Bacillus* và chất ức chế nảy mầm.

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó chất ức chế nảy mầm hoặc chất bảo quản bao gồm natri clorua, D-alanin, hoặc hỗn hợp của chúng.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng được cô đặc chứa natri clorua với lượng khoảng từ 29 g/L đến 117 g/L.

9. Phương pháp theo điểm 7, trong đó chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng được cô đặc chứa D-alanin với lượng khoảng từ 8 g/L đến 116 g/L.

10. Phương pháp theo điểm 6, trong đó loài *Bacillus* là *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lentus*, *Bacillus clausii*, *Bacillus circulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lactis*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus laevolacticus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus simplex*, và *Bacillus sphaericus*, hoặc tổ hợp của chúng.

11. Phương pháp theo điểm 6, trong đó điểm sử dụng bao gồm thức ăn cho động vật hoặc nước uống cho động vật hoặc cả hai và trong đó loài *Bacillus* có khả năng sản xuất các enzym mà hỗ trợ trong việc bẻ gãy chất hữu cơ trong đường tiêu hóa của động vật tiêu thụ.

12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó các enzym này bao gồm amylaza, proteaza, lipaza, esteraza, ureaza, xenlulaza, xylanaza, hoặc hỗn hợp của chúng.

13. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng là chất lỏng được cô đặc chứa:

một hoặc nhiều L-axit amin với lượng nằm trong khoảng từ 8,9 đến 133,5 g/L;

một hoặc nhiều chất bảo quản công nghiệp với tổng lượng nằm trong khoảng từ 0,8 đến 3,3 g/L;

mononatri phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 36 g/L, hoặc dinatri phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 30 đến 90 g/L, hoặc Tris bazơ với lượng nằm trong khoảng từ 15 đến 61 g/L, hoặc HEPES với lượng nằm trong khoảng từ 32,5 đến 97,5 g/L, hoặc hỗn hợp của chúng; và

tùy ý D-glucosa, D-fructosa, hoặc hỗn hợp của chúng với lượng nằm trong khoảng từ 18 đến 54 g/L.

14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó phương pháp này còn bao gồm các bước:

bổ sung chất pha loãng vào chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng; và

trộn chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng đã được pha loãng và bào tử vi khuẩn trong thời gian ủ.

15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó nồng độ của chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng được pha loãng là nằm trong khoảng từ 4% đến 10%.

16. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng là chất lỏng được cô đặc chứa:

L-alanin với lượng nằm trong khoảng từ 13,2 đến 111,25 g/L;

propylparaben hoặc metylparaben hoặc cả hai với tổng lượng nằm trong khoảng từ 0,8 đến 3,3 g/L;

một hoặc nhiều chất đệm bao gồm chất đệm phosphat, HEPES, Tris bazơ, hoặc hỗn hợp của chúng;

nguồn ion kali;

tùy ý bào tử của một hoặc nhiều loài *Bacillus*;

và trong đó nếu bào tử được chứa thì chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng được cô đặc này còn chứa natri clorua với lượng nằm trong khoảng từ 29 g/L đến 117 g/L hoặc D-alanin với lượng nằm trong khoảng từ 8 g/L đến 116 g/L hoặc cả hai.

17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó phương pháp này còn bao gồm các bước:

bổ sung chất pha loãng vào chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng trước hoặc trong bước gia nhiệt;

và trong đó nồng độ của chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng được pha loãng này là khoảng 4% của chất lỏng được cô đặc.

18. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng không chứa fructoza hoặc glucoza.

19. Phương pháp theo điểm 13, trong đó chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng không chứa fructoza hoặc glucoza.

20. Phương pháp theo điểm 16, trong đó chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng không chứa fructoza hoặc glucoza.

21. Phương pháp theo điểm 1, trong đó thời gian ủ là từ 2 đến 5 phút.

22. Phương pháp theo điểm 13, trong đó thời gian ủ là từ 2 đến 5 phút.

23. Phương pháp theo điểm 16, trong đó thời gian ủ là từ 2 đến 5 phút.

24. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất bảo quản công nghiệp bao gồm propylparaben, methylparaben, methyl clo isothiazolinon, methyl isothiazolinon hoặc hỗn hợp của chúng và trong đó chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng không chứa fructoza hoặc glucoza.

25. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bào tử không được hoạt hóa bằng nhiệt trước khi gia nhiệt với chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng.

26. Phương pháp theo điểm 18, trong đó bào tử không được hoạt hóa bằng nhiệt trước khi gia nhiệt với chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng.

27. Phương pháp theo điểm 1, trong đó bào tử là *Bacillus subtilis*, hoặc *Bacillus licheniformis*, hoặc cả hai.

28. Phương pháp nảy mầm bào tử vi khuẩn tại điểm sử dụng bao gồm các bước sau:

cung cấp chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng và bào tử của các loài vi khuẩn, nếu không được chứa trong chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng;

gia nhiệt chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng và bào tử đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ 38°C đến 60°C;

duy trì nhiệt độ trong khoảng này trong thời gian từ khoảng từ 2 đến 60 phút để tạo thành dung dịch bào tử được nảy mầm; và

phân phối dung dịch bào tử được nảy mầm đến điểm sử dụng và trong đó điểm sử dụng bao gồm thức ăn cho động vật, nước uống cho động vật, ổ của động vật, thực vật, bể, hệ thống nước thải, hoặc đường dẫn nước;

và trong đó bào tử không được hoạt hóa bằng nhiệt trước khi gia nhiệt với chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng.

29. Phương pháp theo điểm 27, trong đó chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng chứa: (1) một hoặc nhiều L-axit amin; (2) một hoặc nhiều chất đệm bao

gồm chất đệm phosphat, HEPES, Tris bazơ, hoặc hỗn hợp của chúng; (3) chất bảo quản công nghiệp; và (4) nguồn ion kali tùy ý.

30. Phương pháp theo điểm 29, trong đó bào tử là *Bacillus subtilis*, hoặc *Bacillus licheniformis*, hoặc cả hai.

31. Phương pháp theo điểm 29, trong đó nhiệt độ nằm trong khoảng từ 41°C đến 44°C.

32. Phương pháp theo điểm 1, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước phân phối dung dịch bào tử được nảy mầm đến điểm sử dụng và trong đó điểm sử dụng bao gồm hệ thống nước thải hoặc đường dẫn nước.

33. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chất bảo quản công nghiệp đáp ứng các tiêu chuẩn GRAS và chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng chứa nguồn ion kali.

34. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ nằm trong khoảng từ 44°C đến 60°C.

35. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ nằm trong khoảng từ 38°C đến 50°C.

36. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ nằm trong khoảng từ 38°C đến 60°C.

37. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ nằm trong khoảng từ 42°C đến 44°C.

38. Phương pháp theo điểm 2, trong đó chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng được cô đặc chứa một hoặc nhiều L-axit amin với tổng lượng nằm trong khoảng từ 17,8 g/L đến 89 g/L và trong đó nồng độ của chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng được pha loãng là nằm trong khoảng từ 0,1% đến 10% của chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng được cô đặc.

39. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 38°C.

40. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 39°C.
41. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 40°C.
42. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 41°C.
43. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 42°C.
44. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 43°C.
45. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 44°C.
46. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 45°C.
47. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 46°C.
48. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 47°C.
49. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 48°C.
50. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 49°C.
51. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 50°C.
52. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 51°C.
53. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 52°C.
54. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 53°C.
55. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 54°C.
56. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 55°C.
57. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 56°C.
58. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 57°C.
59. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 58°C.
60. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 59°C.
61. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nhiệt độ là 60°C.

62. Phương pháp theo điểm 1, trong đó chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng là ở dạng lỏng được cô đặc và phương pháp này còn bao gồm các bước:

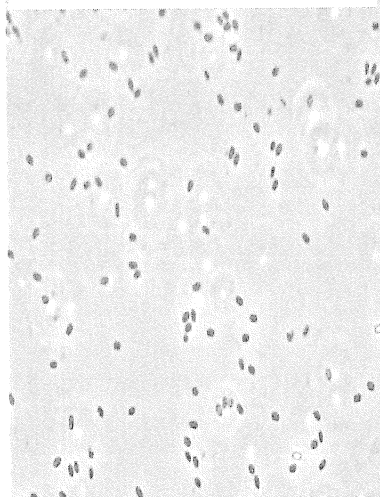
bổ sung chất pha loãng vào chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng;

trộn chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng đã được pha loãng và bào tử vi khuẩn trong thời gian ủ;

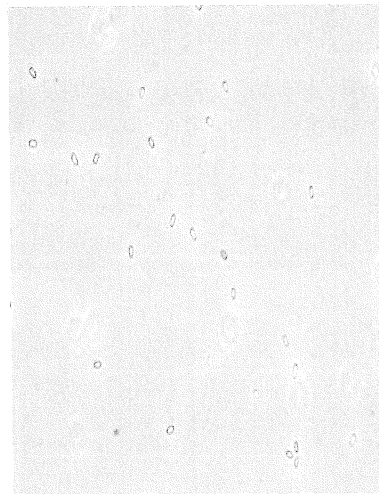
và trong đó nồng độ của chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng đã được pha loãng là từ 4% đến 10%.

63. Phương pháp theo điểm 1, trong đó một hoặc nhiều chất đệm phosphat bao gồm mononatri phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 10 đến 36 g/L, hoặc dinatri phosphat với lượng nằm trong khoảng từ 21,3 đến 75 g/L, hoặc Tris bazơ với lượng nằm trong khoảng từ 15 đến 61 g/L, hoặc HEPES với lượng nằm trong khoảng từ 32,5 đến 97,5 g/L, hoặc hỗn hợp của chúng.

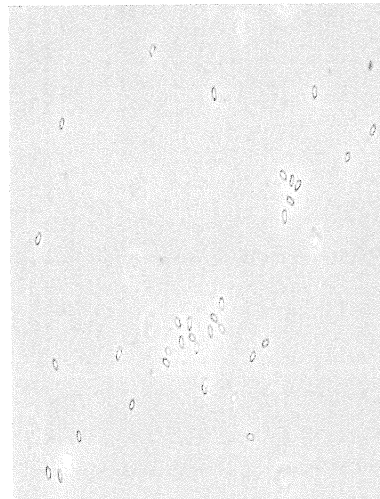
A. 42°C có chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng



B. 23°C có chế phẩm kích thích nảy mầm dinh dưỡng



C. 42°C không có chế phẩm nảy mầm dinh dưỡng



D. 23°C không có chế phẩm nảy mầm dinh dưỡng

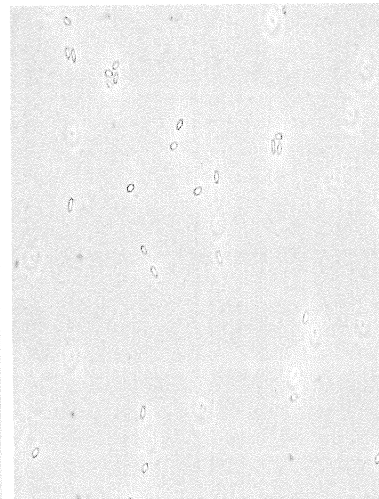


FIG. 1

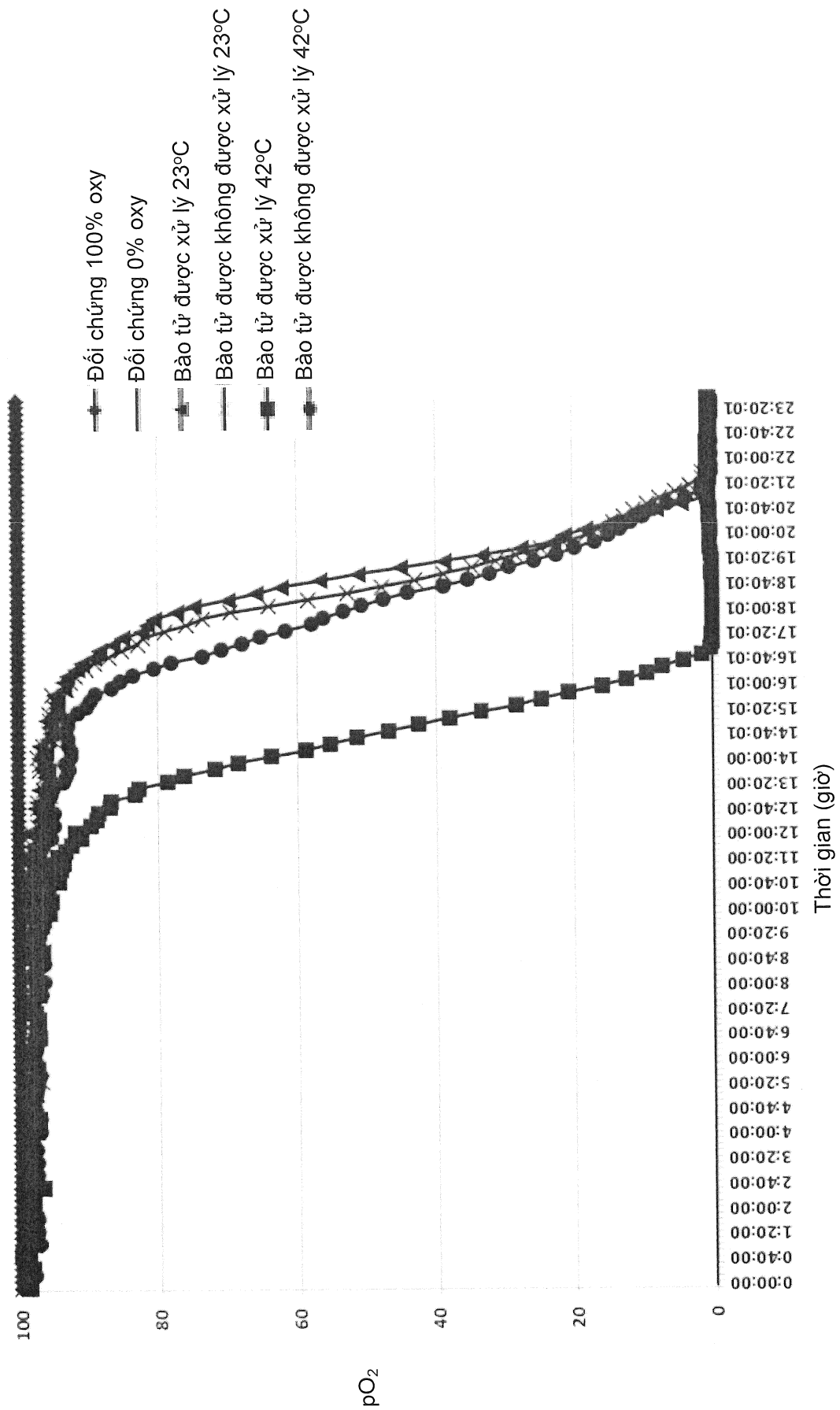


FIG. 2

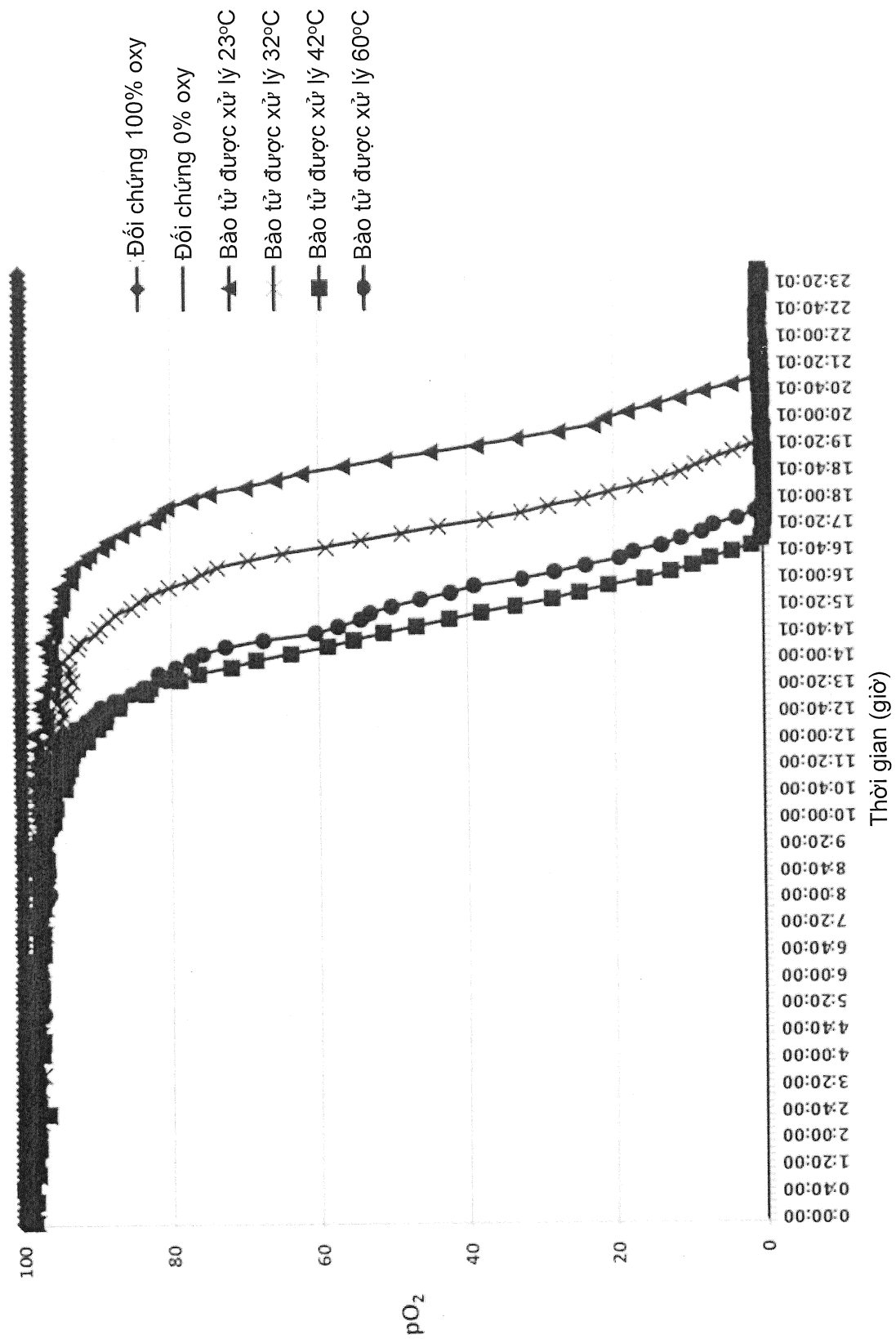


FIG. 3