



(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)



1-0046211

(51)^{2020.01} A01N 65/03; A01P 21/00

(13) B

(21) 1-2020-04137

(22) 17/12/2018

(86) PCT/EP2018/085254 17/12/2018

(87) WO 2019/121539 27/06/2019

(30) 17 62345 18/12/2017 FR

(45) 26/05/2025 446

(43) 25/01/2021 394A

(73) LABORATOIRES GOËMAR (FR)

Parc Technopolitain Atalante, CS 41908, 35435 SAINT MALO, France

(72) Céline CONAN (FR); Philippe POTIN (FR); Anne GUIBOILEAU (FR); Samantha BESSE (FR); Jean-Marie JOUBERT (FR).

(74) Công ty cổ phần tư vấn Trung Thực (TRUNG THUC.,JSC)

(54) CHẤT KÍCH THÍCH DÀNH CHO THỰC VẬT VÀ PHƯƠNG PHÁP CẢI THIỆN SỰ SINH TRƯỞNG CỦA THỰC VẬT

(21) 1-2020-04137

(57) Sáng chế đề xuất chất kích thích dành cho thực vật và phương pháp cải thiện sự sinh trưởng của thực vật dùng chế phẩm chứa chất kích thích dành cho thực vật này, cũng như phương pháp phân lập và tinh chế các hợp chất có hoạt tính sinh học trong phần chiết thu được từ rong biển.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

[1] Sáng chế này nói chung liên quan đến phương pháp tinh chế và phân lập các hợp chất có hoạt tính sinh học giữ vai trò kích thích sinh trưởng thực vật từ phần chiết rong biển.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

[2] Một trong các thách thức của nông nghiệp hiện đại là giải quyết nhu cầu xã hội về tính bền vững, chất lượng và an toàn trong sản xuất nông nghiệp và thích ứng với sự gia tăng dân số thế giới bằng cách cải thiện năng suất và khả năng chống chịu với môi trường thay đổi của cây trồng.

[3] Chất kích thích sinh học có thể được sử dụng để cải thiện dinh dưỡng thực vật, tác động đến các thông số về năng suất và chất lượng. Các chất kích thích sinh học thực vật thường thuộc một trong những loại này, đó là các sản phẩm có chứa hormon, các sản phẩm có thành phần chủ yếu là phần chiết thực vật, các sản phẩm có thành phần chủ yếu là vi chất dinh dưỡng, các sản phẩm có chứa axit amin và các sản phẩm có chứa axit humic nhưng có thể không giới hạn hoàn toàn ở riêng các loại này. Các chất kích thích sinh học thực vật được sử dụng để xử lý cây trồng trong môi trường thương mại xét về khả năng tăng tốc độ sinh trưởng, tăng khả năng chống chịu stress, tăng tỷ lệ quang hợp và tăng khả năng chịu bệnh. Các chất kích thích sinh học thực vật thường được cho là hoạt động bằng cách điều chỉnh tăng hoặc điều chỉnh giảm các gen chuyển hóa (pathway gene) sinh học quan trọng.

[4] Theo định nghĩa của Hội Đồng Công Nghiệp Hoạt Chất Kích Thích Sinh Học Châu Âu (EBIC), các chất kích thích sinh học thực vật có chứa (các) chất và/hoặc vi sinh vật mà khi áp dụng cho thực vật hoặc vùng rễ sẽ có chức năng kích thích các quá trình tự nhiên để nâng cao/tăng cường mức độ dinh dưỡng, hiệu quả dinh dưỡng, khả năng chống chịu stress phi sinh học và chất lượng cây trồng. Các chất kích thích sinh học không có tác động trực tiếp trong việc chống lại sâu bệnh, và do đó không nằm trong khung quy định của thuốc trừ sâu.

[5] Các chất kích thích sinh học có sẵn ở nhiều công thức và với các thành phần khác nhau nhưng thường được phân loại dựa trên nguồn gốc và hàm lượng của chúng. Các nhóm này bao gồm các chất humic (HS) và các sản phẩm chứa axit amin (AACP).

[6] Các chất kích thích sinh học có sẵn ở nhiều công thức và với các thành phần khác nhau nhưng thường được phân loại thành bảy nhóm chính dựa trên nguồn gốc và hàm lượng của chúng. Các nhóm này bao gồm các chất humic (axit humic và axit fluvic), thủy phân protein và

các hợp chất chứa N khác, phân chiết rong biển và thực vật, chitosan và các polyme sinh học khác, hợp chất vô cơ, nấm có lợi và vi khuẩn có lợi.

[7] Mặc dù trên thị trường đã có nhiều loại phân bón và chất kích thích sinh học thực vật, nhưng vẫn cần có các sản phẩm cải tiến có khả năng phục vụ nhiều nhu cầu khác nhau. Do đó, cần có các sản phẩm và phương pháp mới để cải thiện phản ứng sinh trưởng và phát triển của cây.

[8] Rong biển và các sản phẩm có nguồn gốc từ rong biển đã được sử dụng rộng rãi trong các hệ thống sản xuất cây trồng vì có một số hợp chất kích thích sinh trưởng thực vật ở các sản phẩm này. Do đó, tiềm năng kích thích sinh học của nhiều sản phẩm trong số các sản phẩm này chưa được khai thác triệt để do thiếu dữ liệu khoa học về các yếu tố sinh trưởng có trong rong biển và các phương thức hành động khác nhau của chúng trong việc tác động đến sự phát triển của cây.

[9] Mặc dù các tác dụng sinh lý của phân chiết rong biển đối với sự phòng vệ và sinh trưởng thực vật đã được kiểm tra, nhưng biết rất ít về các hợp chất có hoạt tính sinh học cụ thể ở phân chiết rong biển mà chịu trách nhiệm cho các chất kích thích thực vật này. Mong muốn thúc đẩy việc xác định các thành phần hoạt tính sinh học này ở tảo, kể cả, ví dụ, phân chiết tảo nâu.

[10] *Phaeophyceae* hay còn gọi là tảo nâu là một nhóm lớn gồm chủ yếu các loài tảo biển đa bào, kể cả nhiều loại rong biển nằm ở các vùng biển ở cả hai bán cầu. Chúng đóng vai trò quan trọng trong môi trường biển, vừa là thức ăn vừa là môi trường sống. Nhiều loài tảo nâu, chẳng hạn như các thành viên của bộ rong đuôi ngựa (*Fucales*), thường mọc dọc theo bờ biển đầy đá. Trên toàn thế giới, có hơn 1.500 loài tảo nâu được biết đến. Một số loài, chẳng hạn như *Ascophyllum nodosum*, là rất quan trọng về giá trị sử dụng thương mại và cũng có tác động đến môi trường.

[11] Patent Hoa Kỳ số 7,611,716 cấp cho Michailovna và cộng sự mô tả phương pháp chế biến rong biển để thu được, theo một quy trình duy nhất, các phân chiết bao gồm các polysaccharit có tính axit và trung tính và một phân chiết bao gồm các hợp chất có hoạt tính sinh học có trọng lượng phân tử thấp có thể được sử dụng trong y học, thực phẩm, nước hoa và ngành công nghiệp mỹ phẩm. Tuy nhiên, tài liệu tham khảo chỉ mô tả phương pháp chế biến rong biển và không cung cấp cách bất kỳ để xác định các hợp chất kích thích sinh học thực vật tiềm năng chứa trong đó.

[12] Patent Hoa Kỳ số 3,856,569 cấp cho Strong mô tả phương pháp tinh chế và cô đặc các polysaccharit mong muốn như carrageenan hoặc alginate từ dung dịch nước có nguồn gốc từ tảo biển (*Rhodophyceae* và *Phaeophyceae*) bằng cách cho dung dịch này vào màng siêu lọc. Tuy

nhiên, tài liệu tham khảo này cũng chỉ cung cấp phương pháp chế biến rong biển và không cung cấp cách bất kỳ để xác định các hợp chất kích thích sinh học chứa trong đó.

[13] Do nhu cầu về sản phẩm hữu cơ, thân thiện với môi trường và vô hại đối với sức khỏe con người ngày càng tăng lên, nên nhu cầu sử dụng các chất kích thích sinh học tự nhiên cũng tăng lên. Ngoài ra, cũng cần có các chất kích thích sinh học có hiệu quả tương tự hoặc cao hơn các chất kích thích sinh học truyền thống mà đã được sử dụng. Ngoài ra, trong lĩnh vực này vẫn cần có quy trình cải tiến để phân lập và tinh chế các hợp chất kích thích sinh học, kể cả các phân chiết có nguồn gốc từ rong biển.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

[14] Mục đích của sáng chế này là xác định và tinh chế các chất có thể được sử dụng làm chất kích thích sinh học thực vật.

[15] Một mục đích khác của sáng chế là xác định và tinh chế các hợp chất có hoạt tính sinh học ở các phân chiết rong biển khác nhau giữ vai trò kích thích sinh trưởng thực vật.

[16] Để đạt được mục đích đó, theo một phương án, sáng chế nói chung đề xuất một hoặc nhiều phân tử có hoạt tính sinh học được phân lập từ loài tảo, một hoặc nhiều phân tử có hoạt tính sinh học đó có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng 0,15 kDa đến khoảng 1,0 kDa.

[17] Theo một phương án khác, sáng chế nói chung đề xuất phương pháp phân lập và tinh chế các hợp chất có hoạt tính sinh học ở phân chiết thu được từ rong biển, phương pháp bao gồm các bước:

- [18] a) tuần hoàn phân chiết qua màng siêu lọc có ngưỡng trọng lượng phân tử phù hợp;
- [19] b) gom dịch lọc từ phân chiết rong biển để thu được phân đoạn dịch lọc đầu tiên và phần còn lại; và
- [20] c) rửa phần còn lại để thu được một hoặc nhiều phân đoạn dịch lọc bổ sung.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

[21] Sáng chế được hiểu rõ hơn dựa vào phần mô tả dưới đây kết hợp với các hình vẽ đi kèm, trong đó:

[22] Hình 1a và 1b thể hiện phương pháp phân đoạn bằng sắc ký loại trừ kích thước (SEC) được thực hiện trên phân chiết RM-3496 đã lọc và sắc ký đồ các chất chuẩn được nạp vào SEC để đánh giá trọng lượng phân tử trung bình của các phân tử có trong các phân đoạn khác nhau.

[23] Hình 2 là biểu đồ hộp thể hiện hiệu quả của phương pháp phân đoạn bằng SEC đối với RM-3496 trên rau diếp.

[24] Hình 3a và 3b là biểu đồ hộp thể hiện trọng lượng chồi tươi và trọng lượng rễ tươi của dịch nuôi cấy *in vitro* của *Arabidopsis thaliana* đã được xử lý bằng phân đoạn F3 so với chất chuẩn chưa xử lý, phân chiết RM-3496 và phân chiết RM-3496 tái tạo.

[25] Hình 4 mô tả hình chiếu của quy trình siêu lọc theo một khía cạnh của sáng chế này.

[26] Hình 5 mô tả các biểu đồ hộp thể hiện trọng lượng chồi tươi của rau diếp được xử lý bằng nhiều phân đoạn đã được siêu lọc, phần còn lại và phân chiết khác nhau.

[27] Hình 6 mô tả các biểu đồ hộp thể hiện trọng lượng chồi tươi của lúa mì được xử lý bằng nhiều phân đoạn đã được siêu lọc, phần còn lại và phân chiết khác nhau.

Mô tả chi tiết sáng chế

[28] Thuật ngữ “chất kích thích sinh học” thực vật có nghĩa là chất liệu hữu cơ chứa (các) chất và/hoặc vi sinh vật mà khi được dùng cho thực vật hoặc vùng rễ sẽ có chức năng kích thích các quá trình tự nhiên để nâng cao/tăng cường mức độ dinh dưỡng, hiệu quả dinh dưỡng, khả năng chống chịu stress phi sinh học và chất lượng cây trồng.

[29] Khi giới thiệu các yếu tố của sáng chế này hoặc (các) phương án ưu tiên của sáng chế, các quán từ “một” và “này” được dùng để chỉ một hoặc nhiều yếu tố trong số các yếu tố đó. Các thuật ngữ “bao gồm”, “chứa” và “có” có nghĩa bao trùm toàn bộ và có nghĩa rằng có thể có thêm các yếu tố khác ngoài các yếu tố đã được liệt kê.

[30] Thuật ngữ “khoảng” được dùng trong bản mô tả này để chỉ trị số có thể đo được như tham số, lượng, thời lượng tạm thời và các loại tương tự và có nghĩa bao gồm dao động $\pm 15\%$ hoặc ít hơn, tốt hơn là dao động $\pm 10\%$ hoặc ít hơn, tốt hơn nữa là dao động $\pm 5\%$ hoặc ít hơn, còn tốt hơn nữa là dao động $\pm 1\%$ hoặc ít hơn, và vẫn còn tốt hơn nữa là dao động $\pm 0,1\%$ hoặc ít hơn và so với trị số cụ thể được nêu, trong chừng mực dao động là phù hợp để thực hiện sáng chế được mô tả trong tài liệu này. Hơn nữa, cũng cần phải hiểu rằng trị số mà được bỏ nghĩa bằng từ “khoảng” đề cập đến chính trị số đó được nêu cụ thể trong bản mô tả này.

[31] Sáng chế bộc lộ phương pháp tinh chế và phân lập các hợp chất kích thích sinh học từ phân chiết có nguồn gốc rong biển có khả năng làm tăng tốc độ sinh trưởng và sản lượng của nhiều loại cây trồng.

[32] Như được mô tả trong bản mô tả này, theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tinh chế các hợp chất có hoạt tính sinh học chịu trách nhiệm kích thích sinh trưởng thực vật ở phân chiết rong biển theo cách lập biên dạng trao đổi chất học của phân chiết rong biển.

[33] Vì vậy, một phương án cuar sáng chế nói chung liên quan đến một hoặc nhiều phân tử có hoạt tính sinh học phân lập được từ loài tảo, một hoặc nhiều phân tử có hoạt tính sinh học đó có trọng lượng phân tử trong khoảng 0,15 kDa đến khoảng 1,0 kDa. Một hoặc nhiều phân tử có

hoạt tính sinh học là các phân tử có khả năng cải thiện mức độ sinh trưởng của thực vật. Theo một phương án, loài tảo là một loài tảo nâu. Tảo nâu có thể bao gồm loài tảo được chọn từ nhóm bao gồm rong biển *Ascophyllum nodosum*, rong nâu *Fucus vesiculosus*, rong mơ *Sargassum* sp. và các tổ hợp gồm một hoặc nhiều loài trong số các loài nêu trên. Theo một phương án, một hoặc nhiều phân tử có hoạt tính sinh học không có polysacarit sulfat hoặc laminarin.

[34] Nói chung, sáng chế còn đề xuất phương pháp cải thiện mức độ sinh trưởng của cây, phương pháp bao gồm bước dùng chế phẩm chứa một hoặc nhiều phân tử có hoạt tính sinh học đã được phân lập ít nhất là vào đất, vào cây hoặc vào hạt giống. Hiện tượng cải thiện mức độ sinh trưởng của cây bao gồm ít nhất một trong số các hiện tượng dưới đây: thúc đẩy sự nảy mầm của hạt, kích thích sự phát triển của rễ, kéo dài thời gian sinh dưỡng, tăng thời gian sản xuất hoặc tăng thời gian thu hoạch.

[35] Nói chung, sáng chế còn đề xuất phương pháp phân lập và tinh chế các hợp chất có hoạt tính sinh học ở phần chiết thu được từ rong biển, phương pháp đó bao gồm các bước:

[36] a) tuần hoàn phần chiết qua màng siêu lọc có ngưỡng trọng lượng phân tử phù hợp;

[37] b) gom dịch lọc từ phần chiết để thu được phân đoạn dịch lọc đầu tiên và phần còn lại; và

[38] c) rửa phần còn lại để thu được một hoặc nhiều phân đoạn dịch lọc bổ sung.

[39] Phương pháp này còn bao gồm bước đánh giá hoạt tính sinh học của phân đoạn dịch lọc đầu tiên và các phân đoạn dịch lọc bổ sung để xác định hiệu quả của chúng đối với sự sinh trưởng của cây. Hiệu quả đối với sự sinh trưởng của cây có thể bao gồm ít nhất một trong các hiện tượng dưới đây: thúc đẩy sự nảy mầm của hạt, kích thích sự phát triển của rễ, kéo dài thời gian sinh dưỡng, tăng thời gian sản xuất hoặc tăng thời gian thu hoạch. Theo một phương án, phần chiết được sản sinh từ loài tảo nâu. Phần chiết có thể thu được từ rong biển *Ascophyllum nodosum*, rong nâu *Fucus vesiculosus*, hoặc rong mơ *Sargassum* sp.

[40] Theo một phương án ưu tiên, phần còn lại bao gồm các phân tử hoạt tính được chọn từ nhóm bao gồm các polysacarit sulfat và laminarin, mà là các phân tử hoạt tính có khả năng làm giảm stress phi sinh học, chẳng hạn như thừa muối, ở cây trồng. Dịch lọc đầu tiên bao gồm các phân tử có hoạt tính sinh học có trọng lượng phân tử trong khoảng từ 0,15 kDa đến khoảng 1,0 kDa.

[41] Màng siêu lọc có thể có ngưỡng trọng lượng phân tử (MWCO) dưới 3 kDa, tốt hơn là MWCO dưới 2 kDa, và tốt nhất là MWCO dưới 1 kDa.

[42] Rong biển *Ascophyllum nodosum* (rong đá) là một loài tảo đá nâu được tìm thấy ở Bắc Đại Tây Dương và đã được sử dụng làm nguồn chất kích thích sinh học cho cây trồng nông nghiệp để cải thiện sự sinh trưởng của cây, năng suất cây trồng và chất lượng thực phẩm.

[43] Một số kỹ thuật tinh chế đã được thử nghiệm để khử muối và tinh chế các phân chiết rong biển này theo độ phân cực và kích cỡ của phân tử. Đối với từng quy trình tinh chế, các phân đoạn được thử nghiệm trên rau diếp để đảm bảo rằng mức hoạt tính sinh học được giữ ở phân đoạn đã được khử muối khác hoặc vẫn còn muối. Bước tinh chế này được áp dụng đối với phân chiết rong biển (RM-2705, phân chiết fucoid do Goëmar cung cấp) và các phân đoạn đã tinh chế không phân cực cho thấy mức độ tinh khiết cao. Phần lớn phân tử sinh học (khoảng 69%) được rửa giải đồng thời với muối để cho thấy rằng phân tử có hoạt tính sinh học nằm ở một trong các phân đoạn đã tinh chế không phân cực. Tiếp đó, các phân đoạn khác nhau được thử trên rau diếp so với phân chiết toàn phần. Tuy nhiên, kết quả cho thấy các phân tử có hoạt tính sinh học chịu trách nhiệm kích thích sinh trưởng thực vật có mặt ở phân đoạn phân cực mà chứa cả muối. Đã xác định được rằng phương pháp phân đoạn theo độ phân cực của các phân tử có ở phân chiết RM-2705 và RM-3496 không phù hợp để khử muối và tinh chế phân chiết rong biển. Thật vậy, đối với tất cả các kỹ thuật phân đoạn đã được áp dụng, các phân tử có hoạt tính sinh học vẫn còn muối.

[44] Do đó, nảy sinh thách thức tìm kiếm phương pháp khác để khử muối ở phân chiết rong biển, trong khi vẫn duy trì được hoạt tính kích thích sinh học đối với sự sinh trưởng của thực vật. Các kỹ thuật tinh chế khác nhau đã được khảo sát, bao gồm chiết lỏng lỏng (liquid liquid extraction - LLE) bằng etyl axetat, chiết pha rắn (solid phase extraction - SPE) bằng các chất hấp thụ khác nhau (pha thường: xyanopropyl-silic đioxit và pha đảo Amberlite® XAD2), chiết rắn lỏng (solid liquid extraction - SLE) bằng butanol và sắc ký loại trừ theo kích cỡ (size exclusion chromatography - SEC).

[45] Ngoài ra, để thu được thông tin liên quan đến tính ổn định của các phân tử có hoạt tính sinh học, tính ổn định nhiệt của hoạt tính của phân chiết RM-2705 đã được thử nghiệm trên rau diếp. Kết quả cho thấy sự ổn định nhiệt của các phân tử có hoạt tính sinh học, và việc hấp tiệt trùng hoặc đun sôi phân chiết đã được xử lý làm gia tăng trọng lượng chồi tự do của rau diếp.

[46] Phương pháp phân đoạn theo độ phân cực có vẻ không hiệu quả trong việc tinh chế các phân tử có hoạt tính sinh học, do đó phân chiết rong biển được phân đoạn theo kích cỡ hạt của các phân tử để nhằm khử muối.

[47] Đã xác định được rằng tất cả các kỹ thuật này có vẻ không hiệu quả cho mục đích này, ngoại trừ sắc ký loại trừ kích cỡ (size exclusion chromatography - SEC) bằng nhựa Superdex®30, còn được gọi là sắc ký lọc gel (gel filtration - GF). SEC được thấy là phương pháp hiệu quả duy nhất để khử muối và tinh chế dịch lọc rong biển.

[48] Dựa trên đó, phân chiết rong biển (RM-3496) được phân đoạn theo quy trình phân đoạn SEC và các phân tử được rửa giải theo kích cỡ (hoặc trọng lượng phân tử) của chúng như được

thể hiện trên Hình 1.a. Nhựa Superdex30® (do GE Healthcare, Björksgatan, Thụy Điển cung cấp) được sử dụng để đảm bảo phân tách tốt các phân tử có trọng lượng phân tử dưới 10 kDa. Các phân tử càng nhỏ (tức là, trọng lượng phân tử càng thấp), chúng càng bị giữ lại ở các hạt gel xốp và được rửa giải sau đó. Do đó, trọng lượng phân tử của các phân tử giảm từ phân đoạn đầu tiên (tức là, F1) đến phân đoạn cuối cùng (tức là, F6). Các phân đoạn F1 và F2 được cấu thành bởi các phân tử lớn hơn mà chảy qua cột nhanh hơn các muối và các phân tử có trọng lượng phân tử rất thấp được rửa giải ở các phân đoạn F5 và F6.

[49] Để đánh giá khoảng trọng lượng phân tử của các phân tử ở các phân đoạn khác nhau, hỗn hợp các chất chuẩn (0,5% trọng lượng/thể tích) đã được nạp vào hệ thống SEC. Sắc ký đồ các chất chuẩn được thể hiện trên Hình 1.b. a) laminarin (từ khoảng 3 đến khoảng 5kDa), b) raffinosa (594Da), c) sucroza (343,3Da), d) muối xitrat (343,3Da), e) manitol (182,2Da) và f) glyxin (75,1Da). Theo kết quả này, phân đoạn F1 chứa các phân tử có trọng lượng phân tử cao (cao hơn 4 kDa), phân đoạn F2 chứa laminarin (từ khoảng 3 đến khoảng 4kDa) mà được rửa giải giữa phân đoạn F1 và phân đoạn F2.

[50] Dịch siêu lọc, thu được sau khi siêu lọc phần chiết RM-2705 trên hệ thống siêu lọc với màng giới hạn 1kDa, được nạp vào hệ thống SEC. Biên dạng sắc ký của dịch siêu lọc chỉ cho thấy các đỉnh sắc ký tương ứng với các đỉnh của phân đoạn F3, F4, F5 và F6 theo quy trình phân đoạn SEC của phần chiết RM-2705. Do đó, phân đoạn F3 chứa các phân tử có trọng lượng phân tử nhỏ hơn 1kDa đến khoảng 0,18kDa, Phân đoạn F4 chứa các phân tử có trọng lượng phân tử nhỏ hơn khoảng 0,2kDa như manitol (182,2Da) và các phân đoạn F5 và F6 chứa muối và phân tử có trọng lượng phân tử rất thấp như glyxin (75Da). Phổ NMR của các phân đoạn khác nhau đã xác nhận sự hiện diện của polysacarit sulfat (polyme fucan) ở phân đoạn đầu tiên F1, trong khi đó phân đoạn thứ hai F2 chứa laminarin (từ khoảng 3 đến khoảng 4kDa) và phân đoạn F4 chứa manitol (182,2 Da). Hai phân đoạn cuối F5 và F6 chứa muối và phân tử có trọng lượng phân tử rất thấp.

[51] Các phân đoạn khác nhau thu được từ quy trình phân đoạn SEC đã được thử nghiệm về hoạt tính kích thích sinh trưởng thực vật trên rau diếp so với phần chiết rong biển toàn phần RM-3496. Trước khi nạp vào hệ thống Sắc ký, phần chiết rong biển đã được lọc và phần chiết đã lọc này cũng đã được thử nghiệm trên rau diếp để kiểm tra tính hiệu quả. Kết quả cho thấy các phân tử có hoạt tính sinh học đã được tìm thấy trong phân đoạn F3 như được minh họa trên Hình 2. Một hoạt động quan trọng đã được tìm thấy trong phân đoạn F3 chứa các phân tử từ khoảng 0,15 kDa đến khoảng 1 kDa.

[52] Các kỹ thuật khác nhau đã được sử dụng kết hợp để khử muối phần chiết RM-2705 và việc kết hợp này cung cấp thông tin về các tính chất hóa lý của (các) phân tử có hoạt tính sinh

học. Cụ thể, đã xác định được rằng các phân tử có hoạt tính sinh học có tính phân cực và trọng lượng phân tử của chúng nằm trong khoảng từ 0,15 đến khoảng 1 kDa. Do đó, thông tin này loại trừ các polyme fucan khỏi các polyme hoạt tính sinh học thúc đẩy sinh trưởng, các polyme fucan là các polysacarit chính đã được sulfat hóa ở phần chiết axit rong biển *Ascophyllum nodosum*, laminarin (từ khoảng 3 đến khoảng 4kDa), chất kích kháng (elicitor) beta-1,3-glucan, và manitol (182 Da), một polyol có thể chiếm tới 8-10% phần chiết theo trọng lượng khô.

[53] Để xác nhận hoạt tính sinh học của phân đoạn F3 đã được tinh chế, dịch nuôi cấy *in vitro* sử dụng cây mẫu *Arabidopsis thaliana* được phát triển và tái sản xuất nhiều lần. Các thử nghiệm minh họa trên Hình 3.a. xác nhận hoạt tính sinh học của phân đoạn F3, trong khi đó sự hiện diện của muối ở phần chiết RM-3496 làm xáo trộn sự sinh trưởng của cây *Arabidopsis thaliana* trong các điều kiện nuôi cấy này. Tuy nhiên, RM-3496 tái tạo tương ứng với sự hoàn nguyên phần chiết rong biển bằng phân đoạn SEC, đã cho thấy hoạt tính thúc đẩy sinh trưởng. Hơn nữa, trong phân tích sinh học *in vitro* này, dường như phân đoạn F3 và RM-3496 tái tạo lại cũng làm gi tăng mức độ sinh trưởng của rễ như được thể hiện trên Hình 3.b.

[54] Phân đoạn F3 thể hiện hoạt tính kích thích sinh trưởng mạnh trong khi đó phân đoạn F1 và F2 lại không hoạt động. Tuy nhiên, trong quá trình phát triển phân tích sinh học thứ hai, đã thấy rằng với sự hiện diện của muối (100 mM NaCl), phân đoạn F3 không còn hoạt tính kích thích sinh trưởng, trong khi đó F1 và F2 thể hiện các tác dụng tương tự, và rằng phần chiết RM-2705 toàn phần có khả năng dung nạp muối. Các kết quả này chỉ ra rằng phần chiết RM-2705 chứa các hoạt chất khác nhau với các phương thức hoạt động khác nhau, bao gồm (1) phân đoạn có trọng lượng phân tử thấp (LMW) chịu trách nhiệm kích thích sinh trưởng và (2) các phân đoạn chứa laminarin và fucan có khả năng chịu stress (muối, cũng như khả năng kháng stress sinh học).

[55] Khi kết hợp với nhau, các kết quả này chỉ ra rằng việc phân đoạn phần chiết RM-2705 có thể cung cấp ít nhất hai loại sản phẩm với các phương thức hoạt động khác biệt và do đó có các ứng dụng khác nhau bằng cách sử dụng cùng loại nguyên liệu thô.

[56] Vì SEC không dễ rời chuyển trên quy mô công nghiệp, nên mong muốn phát triển được phương pháp khác có khả năng sản xuất các sản phẩm đã được phân đoạn từ phần chiết rong biển mà có thể mang lại hoạt tính kích thích sinh trưởng thực vật ở quy mô lớn hơn.

[57] Một phương pháp thay thế cho SEC là siêu lọc (UF), là quy trình phân đoạn mà trong đó phần chiết rong biển được lọc qua màng siêu lọc có các ngưỡng trọng lượng phân tử (MWCO) phù hợp, trong đó theo một phương án có thể là MWCO 1 kDa để tạo ra phân đoạn có phân tử có hoạt tính sinh học nằm trong mức mong muốn khoảng 0,15 kDa đến 1,0 kDa. Do đó, theo một phương án, phần chiết rong biển có thể được siêu lọc bằng màng MWCO 1 kDa.

[58] Theo một phương án và theo nghĩa rộng nhất, sáng chế đề xuất phương pháp tinh chế chế phẩm kích thích sinh học có nguồn gốc từ phân chiết rong biển bao gồm bước siêu lọc sử dụng màng siêu lọc bán thấm để tách các phân tử mong muốn khỏi phần còn lại của hỗn hợp theo trọng lượng phân tử, kích thước và hình dạng của chúng.

[59] Bước siêu lọc có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị siêu lọc trong đó dung dịch phân chiết rong biển bao gồm khoảng từ 1% theo trọng lượng đến 15% theo trọng lượng chất khô, tốt hơn là khoảng từ 2% theo trọng lượng đến 7% theo trọng lượng chất khô, được siêu lọc bằng cách sử dụng màng có ngưỡng trọng lượng phân tử (MWCO) phù hợp. Theo một phương án, quy trình siêu lọc bao gồm việc siêu lọc tiếp tuyến.

[60] Dịch lọc được gom vì đặc tính kích thích sinh học của nó trong khi quay vòng phần còn lại (hoặc phần cô đặc), mà được để riêng cho ứng dụng khác ở cuối quy trình. Mặc dù thường không cần thiết hoặc bắt buộc, nhưng nếu muốn, có thể tinh chế thêm phần còn lại (hoặc phần cô đặc) bằng cách bổ sung nước mới vào với tốc độ tương ứng với tốc độ sao cho nước, cùng với các phân tử có trọng lượng phân tử nhỏ hơn hoặc bằng 1 kDa được loại ra khỏi dịch siêu lọc.

[61] Như có thể thấy trên Hình 4, việc siêu lọc có thể được thực hiện theo quy trình mà trong đó bể chứa dung dịch (1) được nạp mẻ phân chiết rong biển. Dung dịch được luân chuyển theo đường (2) và bơm (3) vào ống góp đầu vào (4) của thiết bị siêu lọc (5). Thiết bị siêu lọc (5) bao gồm một hoặc nhiều khay được bố trí song song để tạo ra vùng màng siêu lọc thích hợp. Sau đó, dịch siêu lọc thoát ra khỏi thiết bị siêu lọc (5) qua đường ra (6) và được gom vào bể (7). Phần cô đặc của quy trình siêu lọc ra khỏi thiết bị siêu lọc (5) qua ống góp đầu ra (8) và được đưa qua đường (9) trở lại bể chứa dung dịch (1).

[62] Màng chứa trong thiết bị siêu lọc (5) có thể là màng loại polyme hoặc sứ. Theo một phương án, màng này bao gồm một màng sứ hình ống có nhiều kênh. Ví dụ, màng có thể chứa khoảng 15 đến khoảng 50 kênh, tốt hơn là trong khoảng 19 đến khoảng 39 kênh và có thể có chiều dài khoảng từ 50 đến 150 cm. Trong các phương án khác, màng xoắn ốc và màng dòng ngang cũng có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế. Diện tích màng thường nằm trong khoảng từ 0,20 đến khoảng 0,6 m², tốt hơn là trong khoảng 0,30 đến 0,40 m².

[63] Phần còn lại được rửa vài lần để loại bỏ phần lớn các phân tử có trọng lượng phân tử nhỏ hơn mức ngưỡng của màng. Các dịch siêu lọc chứa phân tử có trọng lượng phân tử nhỏ hơn mức ngưỡng của màng. Trong một trường hợp, mức ngưỡng là 3 kDa, tốt hơn là 2 kDa, và tốt nhất vẫn là 1 kDa. Các phân tử có trong dịch siêu lọc có trọng lượng phân tử thấp nhỏ hơn MWCO, ví dụ: 1 kDa và thường được gọi là các chất chuyển hóa. Phần còn lại chứa phân tử có trọng lượng phân tử lớn hơn mức ngưỡng của màng, ví dụ: 1 kDa. Các phân tử ở phần còn lại

có trọng lượng phân tử cao (ví dụ, laminarin khoảng từ 3 đến 4 kDa hoặc fucoidan cao hơn khoảng 30 kDa và các polyme sinh học khác từ tảo nâu có trọng lượng phân tử cao).

[64] Đã thấy rằng tất cả các loài tảo từ bộ tảo *Fucales* thể hiện mức độ hoạt tính hứa hẹn và có thể đưa đến các phương pháp được mô tả trong tài liệu này. Các loài tảo này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các loài thuộc họ *Fucaceae*, *Sargassaceae* và *Durvilleaceae*. Các loài khác từ bộ *Fucale* và bộ *Laminariales* bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, họ *Ascoseirales*, *Asterocladales*, *Desmarestiales*, *Dictyotales*, *Dictyotophycidae*, *Discosporangiales*, *Discosporangiophycidae*, *Ectocarpales*, *Fucales*, *Fucophycidae*, *Ishigeales*, *Ishigeophycidae*, *Laminariales*, *Nemodermatales*, *Onslowiales*, *Phaeophyceae* ordo *incertae sedis*, *Phaeosiphoniellales*, *Ralfsiales*, *Scytothamnales*, *Sphacelariales*, *Sporochneales*, *Stschapoviales*, *Syringodermatales*, *Tilopteridales*, và các họ khác.

[65] Ngoài ra, mặc dù sáng chế này được mô tả và thể hiện kết quả dương tính đối với các loài tảo từ họ *Fucale*, phương pháp đó không giới hạn ở các loài tảo này và cũng có thể được áp dụng để phân lập và phân tích dịch lọc của loài tảo bất kỳ hoặc loài khác có thể làm chất kích thích sinh học để xác định mức độ hoạt tính sinh học của các dịch lọc đó.

[66] Thuật ngữ “dịch lọc” được dùng trên các hình vẽ để chỉ dịch lọc và dịch siêu lọc thu được sau một hoặc nhiều lần siêu lọc qua thiết bị siêu lọc.

[67] Thuật ngữ “phần còn lại” được dùng trên các hình vẽ để chỉ phần còn lại chưa xả rửa và phần còn lại thu được sau một hoặc nhiều lần xả rửa.

Ví dụ thực hiện sáng chế

[68] Ví dụ 1

[69] Phần chiết RM-3496 đã được siêu lọc ở quy mô phòng thí nghiệm bằng màng MWCO 1 kDa và phần còn lại được xả rửa ba lần bằng nước. Dịch siêu lọc chứa các phân tử có trọng lượng phân tử nhỏ hơn 1 kDa và phần còn lại chứa các phân tử có trọng lượng phân tử lớn hơn 1 kDa đã được thử nghiệm trên rau diếp và lúa mì. Như vậy, các dịch lọc và phần còn lại khác nhau được dùng trên rau diếp và lúa mì. Các phần chiết GF142 và GS142 (do Laboratoires Goëmar cung cấp) được sản xuất theo cùng một quy trình lần lượt từ rong nâu *Fucus vesiculosus* và rong mơ *Sargassum natans*. Kết quả được thể hiện trên Hình 5 và 6, mà là các biểu đồ hộp thể hiện trọng lượng chồi tươi của cây đối chứng, cây đã được xử lý bằng bốn phần chiết rong biển khác nhau (RM-2705, RM-3496, GF142 và GS142), các cây được xử lý bằng phân tử có trọng lượng phân tử cao tương ứng với các phần còn lại có tên: RM-3496.retentate, GF142.retentate và GS142.retentate và các cây đã được xử lý bằng phân tử có trọng lượng phân tử thấp tương ứng với các dịch lọc có tên: RM-3496.filtrate, GF142.filtrate và GS142.filtrate.

Kết quả này xác nhận hiệu quả của phần chiết rong biển và thể hiện hoạt tính thúc đẩy sinh trưởng ở các dịch lọc, trong khi đó phần còn lại có vẻ không hiệu quả trong việc thúc đẩy sinh trưởng thực vật.

[70] Ví dụ 2

[71] Mười lít phần chiết nước từ rong biển *Ascophyllum nodosum* (độ pH=2,76) được đặt trong bể chứa dung dịch của thiết bị siêu lọc ở quy mô thí điểm được lắp màng siêu lọc bằng sứ dài 58 cm dạng ống (đường kính: 25 mm, 23 kênh, ngưỡng 1 kDa) (do Tami Industries cung cấp). Dung dịch được bơm qua ống siêu lọc và quay vòng toàn bộ phần cô đặc trở lại bể chứa. Sáu lít dịch lọc được gom và xác định là F1. Phần còn lại (4 L) được xả rửa hai lần bằng 5 lít nước để tạo ra 2 dịch lọc (F2 = 5 L; F3 = 5 L). Các dịch lọc khác nhau (F1, F2, F3) được đánh giá thêm về đặc tính kích thích sinh học.

[72] Ví dụ 3

[73] Năm lít phần chiết nước từ rong nâu *Fucus vesiculosus* (độ pH=2,42) được đặt trong bể chứa dung dịch của thiết bị siêu lọc ở quy mô thí điểm được lắp màng siêu lọc bằng sứ dài 58 cm dạng ống (đường kính: 25 mm, 23 kênh, ngưỡng 1 kDa) (do Tami Industries cung cấp). Dung dịch được bơm qua ống siêu lọc và quay vòng toàn bộ phần cô đặc trở lại bể chứa. Dịch lọc được gom và xác định là F1. Phần còn lại (2,5 L) được xả rửa một lần bằng 2,5 lít nước để tạo ra 2,5 lít dịch lọc (F2 = 2,5 L). Các dịch lọc khác nhau (F1, F2) được đánh giá thêm về đặc tính kích thích sinh học.

[74] Ví dụ 4

[75] Năm lít phần chiết nước từ rong mơ *Sargassum natans* (độ pH=2,92) được đặt trong bể chứa dung dịch của thiết bị siêu lọc ở quy mô thí điểm được lắp màng siêu lọc bằng sứ dài 58 cm dạng ống (đường kính: 25 mm, 23 kênh, ngưỡng 1 kDa) (do Tami Industries cung cấp). Dung dịch được bơm qua ống siêu lọc và quay vòng toàn bộ phần cô đặc trở lại bể chứa. Dịch lọc được gom và xác định là F1. Phần còn lại (2,5 L) được xả rửa một lần bằng 2,5 lít nước để tạo ra 1 lít dịch lọc (F2 = 2,5 L). Các dịch lọc khác nhau (F1, F2) được đánh giá thêm về đặc tính kích thích sinh học.

[76] Ví dụ 5

[77] RM-3496, được sản xuất bởi Laboratoires Goëmar từ phần chiết rong biển *Ascophyllum nodosum* và hai phần chiết rong biển khác (GF142 và GS142, được sản xuất bởi Laboratoires Goëmar lần lượt từ rong nâu *Fucus vesiculosus* và rong mơ *Sargassum natans*) được siêu lọc và đánh giá về đặc tính kích thích sinh học.

[78] Ba phần chiết tảo có đá (fucoid) này được siêu lọc trên màng sứ (do TAMI Industries cung cấp) có MWCO phù hợp (tức là 1 kDa). Mười lít RM-3496 được siêu lọc và năm lít dịch

siêu lọc được gom và tạo thành dịch lọc 1 được sử dụng trong các thí nghiệm bổ sung trên rau diếp và lúa mì. Phần còn lại (5L) được xả rửa hai lần bằng 5 lít nước, trong khi phần còn lại GF142 và GS142 (2,5L) chỉ được xả rửa một lần bằng 2,5 lít nước. Trọng lượng khô của dịch lọc, dịch siêu lọc và phần còn lại được đo. Theo quy trình phân đoạn phân chiết RM-3496, tổng trọng lượng khô của các dịch lọc (chứa phân tử có trọng lượng phân tử nhỏ hơn 1 kDa) là khoảng 80% phân chiết RM-3496 và phần còn lại là khoảng 20% phân chiết RM-3496.

[79] Chi tiết của các thí nghiệm sinh trưởng thực vật được mô tả dưới đây.

[80] Việc xử lý được thực hiện với các phân chiết khác nhau của Goëmar (RM-2705, RM-3496, GF142 và GS142) và hệ số pha loãng 250 (tương đương với 4 ml phân chiết dạng lỏng cho mỗi lít dung dịch dinh dưỡng) được sử dụng cho tất cả các thí nghiệm. Các phân đoạn khác nhau thu được từ quy trình phân đoạn SEC và phân đoạn siêu lọc được dùng cho cây tùy theo năng suất tinh chế của chúng, năng suất này được tính theo trọng lượng khô. Một số lần lặp lại sinh học độc lập được thực hiện với các phân đoạn khác nhau với n cây bằng cách xử lý

[81] Các thí nghiệm sinh trưởng trên rau diếp được thực hiện với hạt rau diếp *Lactuca sativa* kiểu sinh thái Fabietto hoặc Janero (do Voltz, Colmar, Pháp, cung cấp). Rau diếp được trồng trong buồng sinh trưởng, trên bàn xoay để thu được kiểu hình thực vật đồng nhất có thể cho bất kỳ điều kiện xử lý nào. Cây được trồng dưới đèn natri-iodua áp suất cao với bức xạ hoạt tính quang hợp $150 \pm 10 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, chu kỳ nhiệt độ 20/18°C (ngày/đêm) và chu kỳ sáng ban ngày 16 giờ ánh sáng. Để kiểm soát các chất dinh dưỡng đầu vào cho cây và để tạo điều kiện cho việc gom rễ, hạt rau diếp được trồng trong chậu cát. Cây được tưới ba lần một tuần với dung dịch dinh dưỡng thương mại (do Puteaux, Les Clayes-sous-Bois, Pháp, cung cấp) có nồng độ nitơ, phosphat và kali theo tỷ lệ N/P/K 20:20:20 (1g/L)

[82] Rau diếp được xử lý hai lần (một lần/tuần vào ngày thứ 21 và 28) bằng các phân chiết rong biển khác nhau và các phân đoạn được bổ sung vào dung dịch dinh dưỡng và đáy của chậu được ngâm trong dung dịch dinh dưỡng cho đến khi quan sát thấy hấp thụ toàn bộ.

[83] Cây được thu hoạch 16 ngày sau lần xử lý đầu tiên, chồi và rễ được gom riêng. Ba lần lặp lại sinh học được thực hiện độc lập với các phân đoạn và các phân chiết rong biển khác nhau. Mười hai cây rau diếp (n=12) được sử dụng ở các xử lý cho các thí nghiệm phân đoạn SEC trong khi mười tám cây rau diếp (n=18) được sử dụng ở các lần xử lý cho các thí nghiệm siêu lọc.

[84] Hạt của cây *Arabidopsis thaliana* kiểu sinh thái Columbia (Col-0 thu được từ trung tâm dự trữ hạt giống ABRC) được trồng trong dịch nuôi cấy *in vitro*. Trước hết, hạt giống được khử trùng bề mặt và được gieo vào đĩa Petri hình vuông chứa môi trường nền Murashige và Skoog (MS) nửa nồng độ (half-strength) được bổ sung 1% (trọng lượng/thể tích) sucroza (30mM) và 0,6% (trọng lượng/thể tích) PhytigelTM. Đĩa petri được cho sinh trưởng dưới ánh sáng huỳnh

quang mát với cường độ $225 \pm 10 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, với chu kỳ sáng ban ngày dài 16 giờ chiếu sáng ở nhiệt độ $21^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$. Vị trí của đĩa Petri dưới đèn neon được thay đổi mỗi ngày và theo suốt thử nghiệm để làm cho thử nghiệm mang tính ngẫu nhiên.

[85] Cây con sinh trưởng đồng đều được chọn và chuyển đi 6 ngày sau khi nảy mầm trong môi trường xử lý. Đối với mỗi điều kiện, 6 đĩa Petri chứa 6 cây con được chuẩn bị.

[86] Cây được gom 9 ngày sau khi chuyển đi trong môi trường xử lý. Bốn thử nghiệm sinh học độc lập được thực hiện và sáu bản sao ($n=6$) được sử dụng ở các lần xử lý cho các thí nghiệm phân đoạn SEC.

[87] Các thí nghiệm sinh trưởng lúa mì được thực hiện với hạt lúa mì mùa đông (*Triticum aestivum* L.) giống Altigo (do Limagrain, Saint-Beauzire, Pháp, cung cấp). Lúa mì được trồng trong buồng sinh trưởng trên bàn xoay để thu được kiểu hình thực vật đồng nhất có thể cho từng điều kiện. Để kiểm soát chất dinh dưỡng đầu vào cho cây, hạt lúa mì được trồng trong chậu đá vơ mi. Cây được cho sinh trưởng trong buồng sinh trưởng dưới đèn natri-iodua áp suất cao với bức xạ hoạt tính quang hợp $150 \pm 10 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, chu kỳ nhiệt độ $22/18^\circ\text{C}$ và chu kỳ sáng ban ngày dài 16 giờ. Mười ngày sau khi gieo, các cây đồng nhất được phân bố vào các khay khác nhau; 6 cây mỗi khay và hai khay cho mỗi điều kiện. Cây được tưới nước ba lần mỗi tuần bằng cùng loại dung dịch dinh dưỡng thương mại được sử dụng cho các thí nghiệm trên rau diếp.

[88] Hai tuần sau khi gieo, lúa mì được xử lý gấp năm lần (2 hoặc 3 ngày một lần) bằng các phân đoạn và phần chiết khác nhau và được thu hoạch 13 ngày sau lần xử lý đầu tiên. Hiệu quả của các phân đoạn khác nhau được đánh giá bằng cách so sánh trọng lượng chồi mới. Ba lần lặp lại sinh học độc lập được thực hiện với các phân đoạn và phần chiết rong biển khác nhau. Mười hai cây lúa mì ($n=12$) được sử dụng ở các lần xử lý cho các thí nghiệm siêu lọc.

[89] Theo sáng chế, hiệu quả của các phân đoạn và phần chiết khác nhau đối với sự kích thích sinh trưởng thực vật được đánh giá theo phương pháp thống kê. Thật vậy, đối với mỗi phân tích sinh học được trình bày, trước tiên tính chuẩn tắc của dữ liệu được kiểm tra bằng các thử nghiệm về tính chuẩn tắc Shapiro-Wilk, với các đồ thị Q-Q và với các biểu đồ tần suất. Độ đồng đều của các dữ liệu này cũng được kiểm tra bằng thử nghiệm Barlett, trước khi thực hiện thử nghiệm tham số đối với dữ liệu này. Một số phân tích sinh học (ba đến bốn lần lặp lại độc lập) được thực hiện để đánh giá các xử lý khác nhau đối với sự kích thích sinh trưởng thực vật với số lượng N cây theo xử lý. Tiếp đó, phân tích phương sai tham số hai chiều (Anova hai chiều) được thực hiện trên dữ liệu để xác định xem có hay không khác biệt đáng kể (với sai số alpha 5%) giữa các giá trị trung bình của các lần xử lý khác nhau cho mỗi phân tích sinh học và giữa các giá trị trung bình của mỗi lần xử lý cho các phân tích sinh học khác nhau đã được thực hiện. Theo kết quả Anova, phép thử hậu kiểm có tham số Tukey HSD hoặc so sánh nhiều cặp được

thực hiện trên dữ liệu để xác định phân hạng và xác định xem giá trị trung bình nào chênh lệch đáng kể với nhau. Kết quả của phép thử Tukey được thể hiện trên biểu đồ hộp bằng chữ in đậm. Giá trị trung bình của các lần xử lý mà chênh lệch đáng kể với nhau thể hiện các chữ in đậm khác nhau. Các giá trị trung bình này được thể hiện trên mỗi biểu đồ hộp bằng một dấu chấm.

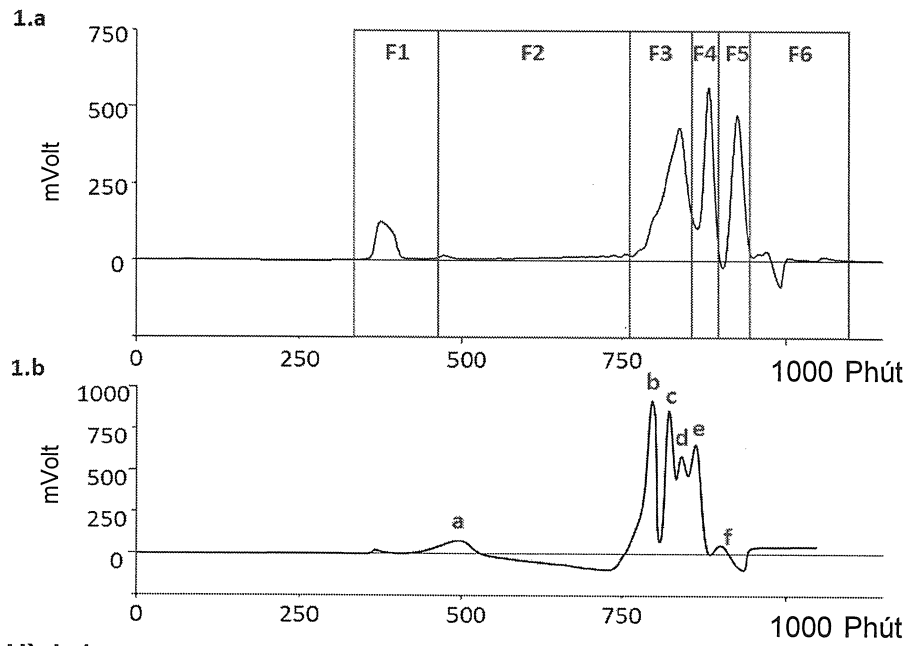
[90] Các hợp chất được mô tả trong tài liệu này có thể được sử dụng cho nhiều loại cây trồng khác nhau, ví dụ như đậu tương, ngô, ngũ cốc (ví dụ: lúa mì, lúa mạch, lúa mạch đen và yến mạch), hạt cải dầu, cải dầu, hướng dương, củ cải đường, khoai tây, đậu khô (ví dụ, đậu lăng, đậu khô, v.v.), mía, rau ăn quả, bao gồm cà chua, cà tím, ớt, bầu bí, v.v, các loại rau củ, bao gồm hành và tỏi tây, các rau ăn lá, bao gồm rau diếp, rau bina và cần tây, cải bắp, các loại quả có hạt, quả lựu, cam quýt, cà phê, ca cao, các cây cho hạt, cây quả mọng, nho (dạng cây và dạng leo), và nhiều loại cây trồng khác.

[91] Cuối cùng, cần hiểu rằng các yêu cầu bảo hộ dưới đây nhằm mục đích bao trùm tất cả các dấu hiệu chung và cụ thể của sáng chế đã được bộc lộ trong bản mô tả này và tất cả các tuyên bố về phạm vi của sáng chế về mặt ngữ nghĩa có thể đều thuộc phạm vi đó.

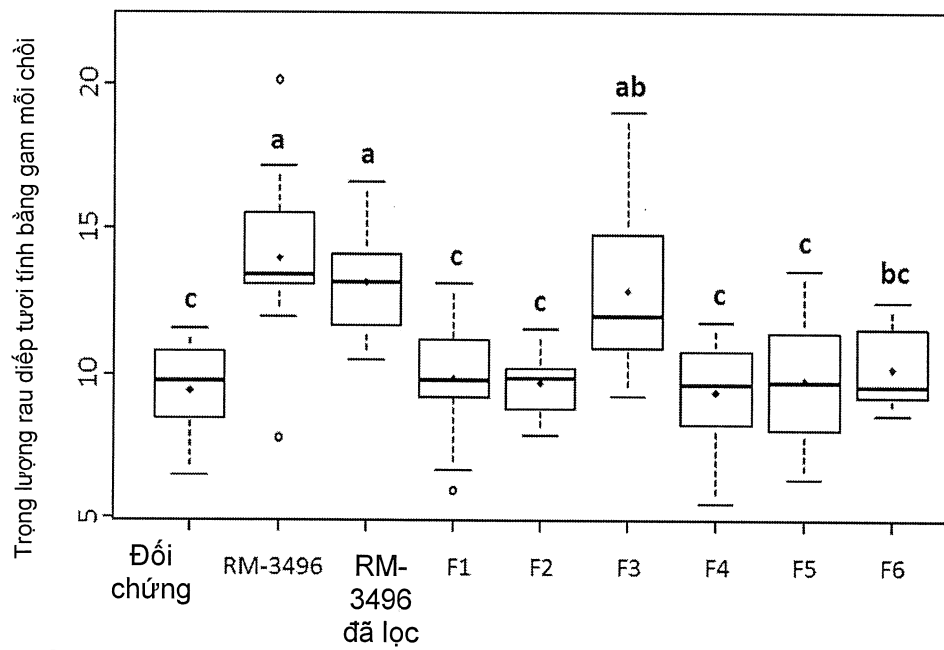
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chất kích thích dành cho thực vật nhằm cải thiện sự sinh trưởng của thực vật, chất kích thích dành cho thực vật này được phân lập từ loài tảo được chọn từ nhóm bao gồm *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, *Sargassum natans* và tổ hợp của chúng, và chứa một hoặc nhiều phân tử có hoạt tính sinh học phân cực có trọng lượng phân tử nằm trong khoảng 0,15 kDa đến khoảng 1,0 kDa, trong đó các phân tử có hoạt tính sinh học phân cực không chứa laminarin và polysacarit đã được sulfat hóa.
2. Phương pháp cải thiện sự sinh trưởng của thực vật, bao gồm bước dùng chế phẩm chứa chất kích thích dành cho thực vật theo điểm 1 ít nhất là vào đất, cây hoặc hạt giống.
3. Phương pháp phân lập và tinh chế hợp chất có hoạt tính sinh học từ phần chiết thu được từ rong biển, phương pháp này bao gồm:
 - a) bước tuần hoàn phần chiết qua màng siêu lọc có ngưỡng trọng lượng phân tử thích hợp, phần chiết thu được từ *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, *Sargassum natans*;
 - b) bước quay vòng dịch lọc của phần chiết, để thu được phân đoạn dịch lọc thứ nhất và dung dịch giữ lại;
 - c) bước xịt rửa dung dịch giữ lại bằng nước để thu được một hoặc nhiều phân đoạn dịch lọc tiếp nữa; và
 - d) bước phân lập chất kích thích dành cho thực vật từ phân đoạn dịch lọc thứ nhất hoặc các phân đoạn dịch lọc tiếp nữa, chất kích thích dành cho thực vật này chứa các phân tử có hoạt tính sinh học phân cực có phân tử lượng nằm trong khoảng 0,15 kDa đến 1 kDa, trong đó phân tử có hoạt tính sinh học phân cực không chứa laminarin và polysacarit đã được sulfat hóa.
4. Phương pháp theo điểm 3, còn bao gồm bước đánh giá hoạt tính sinh học của phân đoạn dịch lọc thứ nhất và các phân đoạn dịch lọc tiếp nữa để xác định hiệu quả của hoạt tính sinh học đối với sự sinh trưởng của thực vật.
5. Phương pháp theo điểm 3 hoặc 4, trong đó hợp chất có hoạt tính sinh học có thể cải thiện sự sinh trưởng của thực vật, thúc đẩy sự nảy mầm của hạt, kích thích sự phát triển của rễ, kéo dài giai đoạn sinh dưỡng, tăng thời gian sản xuất, và/hoặc tăng thời gian thu hoạch.

1/4

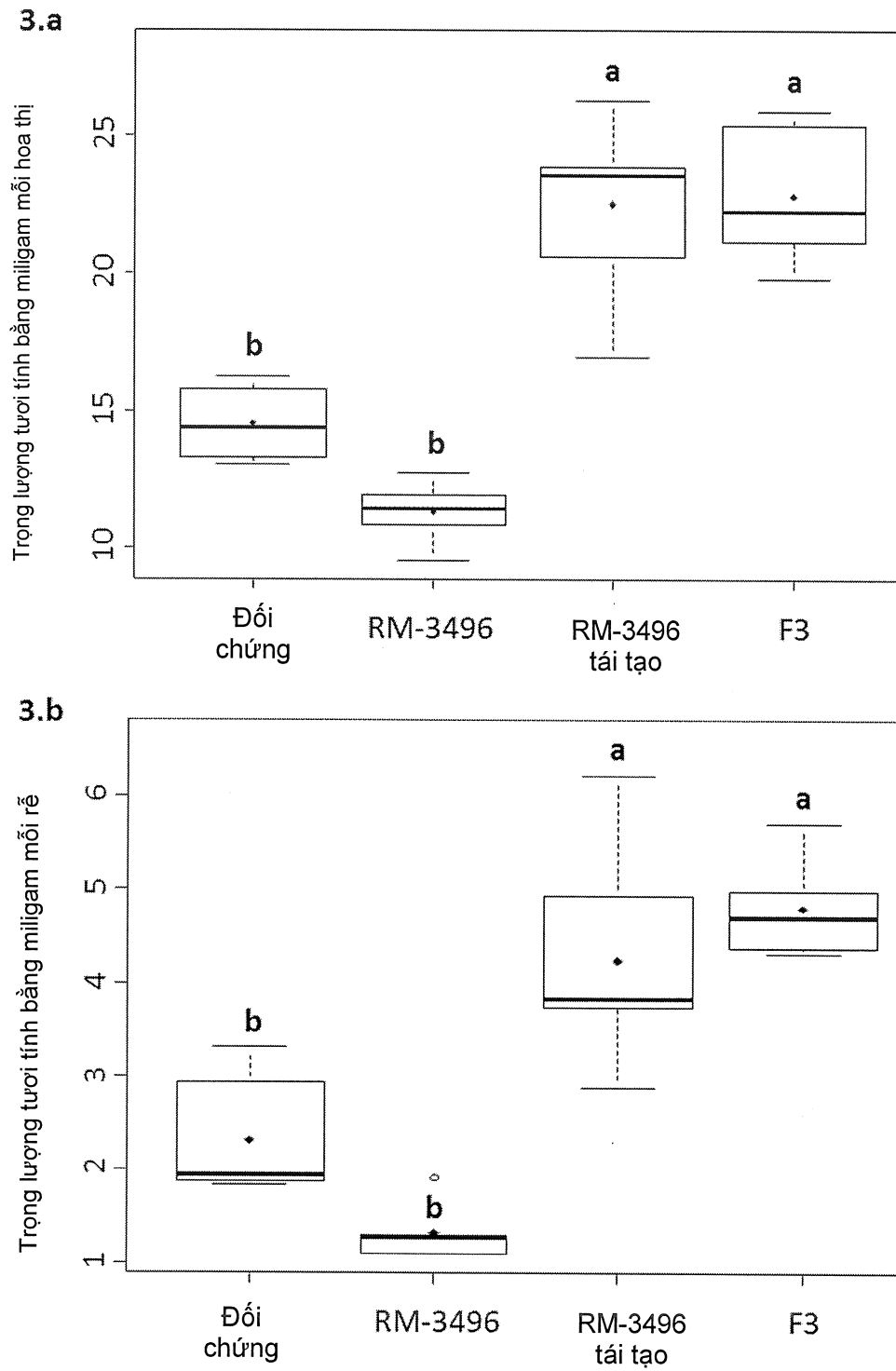


Hình 1



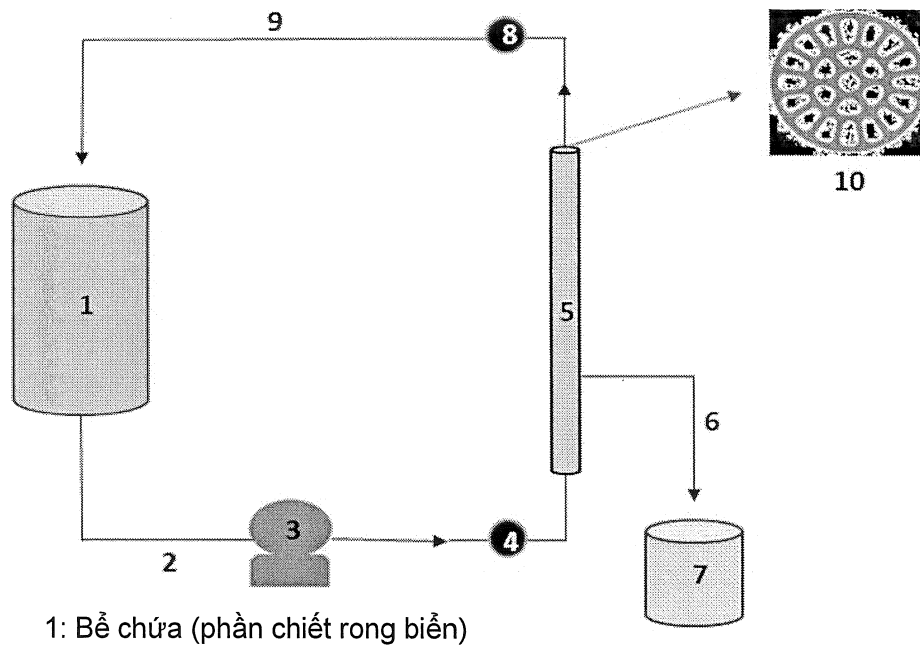
Hình 2

2/4

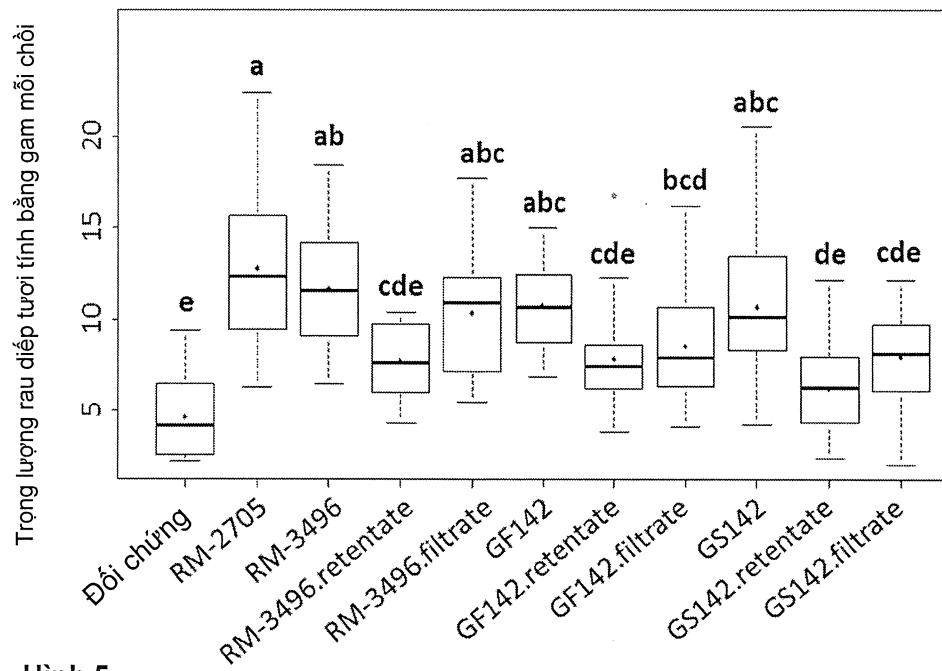


Hình 3

3/4

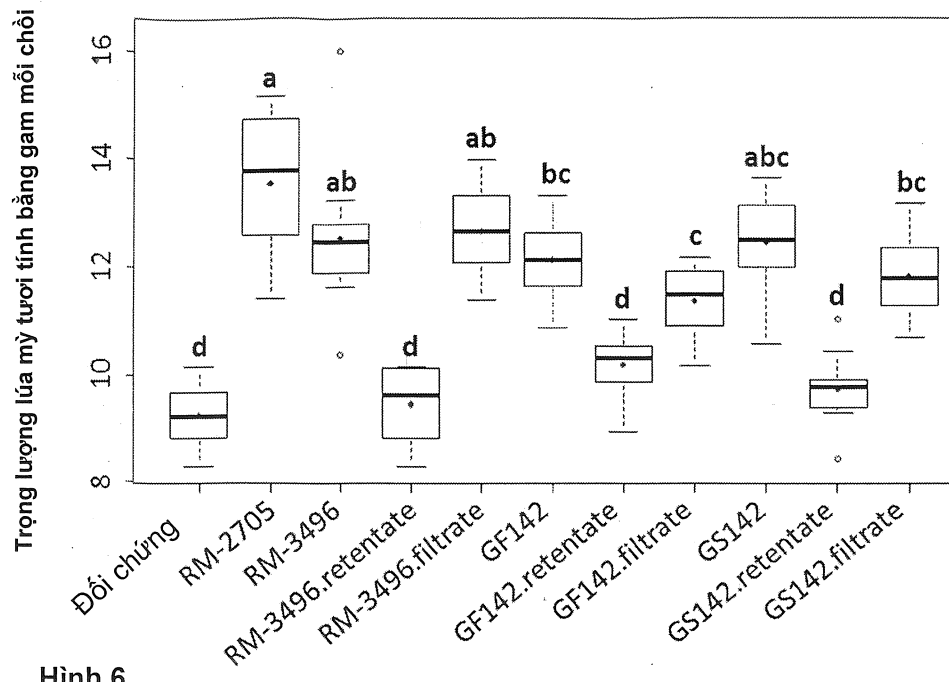


Hình 4



Hình 5

4/4



Hình 6