



(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)



1-0030923

(51)⁷ C12P 1/04; C12R 1/225; C12R 1/25;
C12P 23/00

(13) B

(21) 1-2017-01591

(22) 30/09/2015

(86) PCT/KR2015/010325 30/09/2015

(87) WO/2016/053003 A1 07/04/2016

(30) 10-2014-0131390 30/09/2014 KR

(45) 25/01/2022 406

(43) 25/07/2017 352A

(73) RNA INC. (KR)

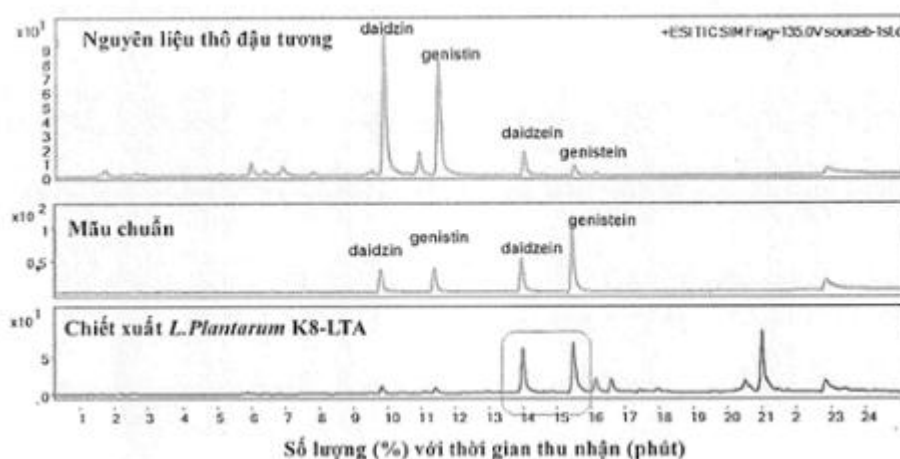
1732, Deogyong-daero, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do, 17104, Republic of Korea

(72) CHUNG, Dae Kyun (KR); KIM, Hangeun (KR); LEE, Seung Su (KR); JUNG, Bong Jun (KR); KIM, Hye Rim (KR); LEE, Yoon Doo (KR); PARK, Jae Yeon (KR); JEON, Boram (KR); KIM, Seong Jae (KR).

(74) Công ty TNHH Quốc tế D&N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT CHẾ PHẨM VI SINH VẬT

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất vi sinh vật mà trong đó aglycon hoặc glycosit thủy phân được tích tụ trong tế bào, vi sinh vật hoặc dịch ly giải của chúng được sản xuất bằng phương pháp này và chế phẩm chứa chúng. Cụ thể, sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế aglycon hoặc glycosit thủy phân từ glycosit bằng cách chuyển hóa glycosit thành dạng aglycon hoặc glycosit thủy phân nhờ sử dụng vi sinh vật sản sinh β -glycosidaza, và sau đó thu hồi aglycon hoặc glycosit thủy phân được tích tụ trong tế bào vi sinh vật.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp điều chế chế phẩm vi khuẩn chứa aglycon hoặc glycosit thủy phân trong tế bào và, cụ thể là, phương pháp sản xuất vi sinh vật mà chuyển hóa glycosit thành dạng aglycon hoặc glycosit thủy phân bằng cách sử dụng vi sinh vật sản sinh β -glycosidaza, và có aglycon hoặc glycosit thủy phân được tích tụ trong tế bào.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi khuẩn sinh axit lactic là một trong số các vi sinh vật có lợi nhất khả dụng cho người và nghĩa là vi khuẩn phân giải hydrat cacbon như glucoza hoặc lactoza trong quá trình lên men để sản sinh axit lactic. Vào năm 1858, sự có mặt của vi khuẩn sinh axit lactic được phát hiện bởi nhà vi sinh vật học người Pháp Louis Pasteur, và Ilija Mecnikov, nhà vi sinh vật học người Nga, đã được trao tặng giải thưởng Nobel về sinh lý học vào năm 1908, đề xướng “giả thuyết trẻ lâu nhờ sữa lên men” trong những năm cuối đời của ông, và sau đó xác nhận rằng nguyên nhân sống lâu của người Bulgari là do dùng sữa lên men nhờ vi khuẩn sinh axit lactic, và từ phát hiện này, các nghiên cứu trên quy mô toàn diện đã bắt đầu và cho đến nay đã tìm ra hơn 300 loại vi khuẩn sinh axit lactic. Vi khuẩn sinh axit lactic sống trong ruột của phần lớn động vật có vú bao gồm người, và cụ thể là, nhiều hơn 100 nghìn tỷ của 100 loại vi khuẩn gồm cả vi khuẩn có lợi và vi khuẩn có hại có mặt trong ruột của cơ thể người. Do vi khuẩn sinh axit lactic sản sinh axit lactic dưới dạng chất chuyển hóa để axit hóa ruột, vi khuẩn sinh axit lactic được biết là vi khuẩn dùng để ức chế sự tăng sinh của vi khuẩn có hại và làm giảm sự sản sinh amoniac hoặc chất gây ung thư do quá trình lên men bất thường, tức là, thực hiện quá trình điều hòa đường ruột.

Được biết là hoạt tính sinh lý của vi khuẩn sinh axit lactic là chúng chủ yếu sản sinh axit hữu cơ để làm giảm độ pH của ruột, điều này ức chế sự tăng sinh của vi khuẩn có hại trong ruột và duy trì hệ vi sinh vật đường ruột bình thường. Chúng cũng tác động để chuyển hóa isoflavon glycosit thành aglycon, chất này được hấp thu dễ dàng trong cơ thể

người bằng cách sản sinh β -glucosidaza.

Cụ thể là, trong trường hợp isoflavon, có bốn dạng glycosit mà đường được kết hợp, aglycon trong đó đường được loại bỏ, axetylglucosit, và malonylglucosit, và trong số chúng, isoflavon aglycon thủy phân nhờ β -glucosidaza trong ruột được chuyển hóa thành aglycon dưới dạng aglycon hoạt tính và được hấp thu. Tuy nhiên, isoflavon có trong thực phẩm nói chung có mặt dưới dạng glycosit mà đường được kết hợp, và isoflavon được hấp thu từ chế độ ăn cần được chuyển hóa thành dạng aglycon nhờ vi sinh vật đường ruột để được hấp thu. Vì vậy, vi sinh vật có hoạt tính β -glycosidaza có thể đóng vai trò rất quan trọng trong độ sinh khả dụng của isoflavon.

Một phương pháp chiết isoflavon trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan, là phương pháp chiết bột thực vật chứa isoflavon bằng nước, axit hóa dịch chiết, tách dịch chiết ra khỏi cặn lắng cho qua cột được nạp nhựa hấp thu, hấp thu isoflavon trong dịch chiết trên nhựa, cho dung môi rửa qua cột, và thu hồi isoflavon được hấp thu trên nhựa. Một phương pháp khác là phương pháp chiết isoflavon bao gồm bước thứ nhất là liên kết và chiết isoflavon với xyclodextrin, chất dẫn xuất của nó, hoặc polyme của nó bằng cách bổ sung thực vật hoặc sản phẩm chế biến từ thực vật chứa isoflavon trong xyclodextrin, chất dẫn xuất của nó, hoặc polyme của nó và bước thứ hai là phân lập chất liên kết chứa isoflavon và xyclodextrin từ dịch chiết bằng cách bơm chất làm đông vào dịch chiết được tạo ra từ bước thứ nhất và chiết. Cụ thể là, để chiết isoflavon aglycon từ đậu tự nhiên, nhiều phương pháp cơ học và hóa học được sử dụng, và phương pháp chiết isoflavon bằng cách sử dụng sóng siêu âm và sau đó tinh chế dịch chiết bằng sắc ký lỏng. Tuy nhiên, phương pháp chiết gồm nhiều bước và có nhiều vấn đề như giảm năng suất, tăng chi phí sản xuất, và khả năng nhiễm tạp trong quá trình tinh chế.

Chuyển hóa sinh học isoflavon glycosit thành isoflavon aglycon bằng vi sinh vật đã được nghiên cứu (Kuo et al., Appl Microbiol Biotechnol 2006.73:314-320; Lee et al., J Agric Food Chem 2013. 61:12101-12110), và trên tất cả, sự chuyển hóa sinh học isoflavon glycosit thành isoflavon aglycon bằng vi khuẩn sinh axit lactic là có thể và các nghiên cứu về quá trình này đã được thực hiện một cách tích cực (Cavallini et al., Alim. Nutr. 2010. 21:175-182). Ví dụ, Ali và các cộng sự của ông đã nghiên cứu tác dụng trên sự chuyển hóa

thành aglycon là dạng có hoạt tính của sự chuyển hóa isoflavon glycosit nhờ vi khuẩn sinh axit lactic và quá trình chuyển hóa chất béo và cholesterol. Theo kết quả này, vi khuẩn sinh axit lactic không gây ra tăng cường hiệu lực của isoflavon. Lý do là hiệu suất chuyển hóa sinh học nhờ vi khuẩn sinh axit lactic là thấp (Ali, et al., J Nutr Biochem. 2004. 15:583-90). Theo một báo cáo khác, sự chuyển hóa thành aglycon nhờ vi khuẩn sinh axit lactic *bifidobacterium* là 73 đến 74% hoặc ít hơn khi không bổ sung sữa đậu nành. Tuy nhiên, trong trường hợp bổ sung sữa đậu nành, tỷ lệ chuyển hóa tăng đến 84 đến 85% (2007 11. Newhope 360.com).

Trong khi, saponin là glycosit của steroid, steroid alkaroit, hoặc triterpen, và là thuật ngữ chung của các chất tan trong nước và thể hiện hoạt động tạo bọt như xà phòng. Saponin là thành phần tăng cường miễn dịch của người và cụ thể là, saponin có trong nhân sâm là nổi tiếng. Trong nhân sâm, có chứa 32 loại saponin khác nhau. Cụ thể là, được biết rằng saponin chỉ có trong nhân sâm đỏ thu được bằng cách chế biến nhân sâm có hiệu quả đáng kể trong điều trị bệnh cho người trưởng thành khi được sử dụng trong thời gian dài. Ginsenosit có thể ức chế sự sinh trưởng của tất cả các loại tế bào ung thư. Thậm chí trong thử nghiệm liên quan đến bệnh đục thủy tinh thể, ginsenosit thể hiện hiệu quả tuyệt vời. Ginsenosit (saponin từ nhân sâm) là hợp chất có các gốc hydrat cacbon (glycon) và không phải hydrat cacbon (aglycon) trong cùng phân tử. Gốc hydrat cacbon liên kết với gốc không phải hydrat cacbon qua liên kết axetal ở vị trí cacbon số 1. Thành phần không phải đường được gọi là aglycon và thành phần đường được gọi là glycon. Nếu vị trí hydrat cacbon là glucoza, nó được gọi là glucosit. Do đó, bằng cách thủy phân ginsenosit, là glycosit trong nhân sâm, ginsenosit được phân giải thành glycon và sapogenin dưới dạng aglycon.

Các vi sinh vật mà thủy phân isoflavon glycosit bao gồm *bifidobacterium longum*, *lactobacillus bulgaricus*, *aspergillus niger*, và *sachcaroplyspora erythraea*, và các vi sinh vật này thường sản sinh β -glycosidaza. Ngoài ra, các nghiên cứu để phát triển các vi sinh vật mà sản sinh β -glycosidaza hiệu lực cao có thể chuyển hóa một cách hiệu quả isoflavon glycosit thành isoflavon aglycon đang được tiếp tục.

Tuy nhiên, các phương pháp trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan bao gồm nhiều bước

phức tạp và do đó có các vấn đề như giảm hiệu suất, tăng chi phí sản xuất, và khả năng nhiễm tạp trong quá trình tinh chế.

Trên cơ sở các tình trạng kỹ thuật đã biết này, các tác giả của đơn sáng chế này đã xác nhận rằng các vấn đề thông thường có thể được cải thiện bằng cách chuyển hóa glycosit thành aglycon hoặc glycosit thủy phân bằng cách sử dụng vi sinh vật sản sinh β -glycosidaza và sau đó tích tụ aglycon hoặc glycosit thủy phân đã được chuyển hóa trong vi sinh vật và sử dụng vi sinh vật hoặc dịch ly giải chứa aglycon hoặc glycosit thủy phân của chúng làm nguyên liệu thô, và hoàn thành sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp tạo ra vi sinh vật có khả năng sản xuất aglycon hoặc glycosit thủy phân được chuyển hóa từ glycosit ở nồng độ cao bằng cách sử dụng vi sinh vật sản sinh β -glycosidaza.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất vi sinh vật hoặc dịch ly giải chứa aglycon hoặc glycosit thủy phân của chúng và sử dụng chúng, trong đó aglycon hoặc glycosit thủy phân được điều chế bằng phương pháp này được tích tụ trong tế bào.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra vi sinh vật trong đó aglycon hoặc glycosit thủy phân được tích tụ trong tế bào. Phương pháp này bao gồm việc tích tụ aglycon hoặc glycosit thủy phân được chuyển hóa từ glycosit trong vi sinh vật bằng cách nuôi cấy vi sinh vật biểu hiện β -glycosidaza trong môi trường chứa glycosit hoặc cho phản ứng với chất phản ứng chứa glycosit.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vi sinh vật hoặc dịch ly giải của chúng được tạo ra bằng phương pháp này và trong đó aglycon hoặc glycosit thủy phân được tích tụ trong tế bào.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa vi sinh vật hoặc dịch ly giải của chúng.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất thực phẩm chứa vi sinh vật hoặc dịch ly giải của chúng.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm để cải thiện chức năng

của da chứa vi sinh vật hoặc dịch ly giải của chúng.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện kết quả chuyển hóa thành aglycon của đậu tương nhờ sử dụng *Lactobacillus plantarum* K8 bằng phương pháp điều chế theo sáng chế. Sự chuyển hóa của isoflavon glycosit thành isoflavon aglycon nhờ *Lactobacillus plantarum* K8. Trên Fig.1, nguyên liệu thô là môi trường nuôi cấy chứa chiết xuất đậu tương, STD là mẫu chuẩn isoflavon; và chiết xuất *L. plantarum* K8-LTA là dịch ly giải được ly giải bằng cách sử dụng thiết bị vi hóa lỏng sau khi *Lactobacillus plantarum* K8 được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy chứa chiết xuất đậu tương.

Fig.2 thể hiện kết quả chuyển hóa thành aglycon của đậu tương nhờ sử dụng *Lactobacillus plantarum* K8, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, và *Lactobacillus sakei* bằng phương pháp điều chế theo sáng chế. So sánh sự sản sinh aglycon của *Lactobacillus* bao gồm *Lactobacillus plantarum* K8. Trên Fig.2, STD là mẫu chuẩn isoflavon; delbrueckii là *Lactobacillus delbrueckii*; GG là *Lactobacillus rhamnosus* GG; K8 là *Lactobacillus plantarum* K8; và sakei là *Lactobacillus sakei*.

Fig.3 thể hiện lượng aglycon của đậu tương đo được được phát hiện trong quá trình điều chế dịch ly giải *Lactobacillus plantarum* K8 bằng phương pháp điều chế theo sáng chế. Trên Fig.3, gg là *Lactobacillus rhamnosus* GG, del là *Lactobacillus delbrueckii*, và k8 là *Lactobacillus plantarum* K8.

Fig.4 là biểu đồ thể hiện saponin được chuyển hóa từ ginsenosit nhờ sử dụng *Lactobacillus plantarum* K8 bằng phương pháp điều chế theo sáng chế. Trên Fig.4, rg1, rg3(s), rh2, rb1, rc, rd, rb2, và f2 là các hợp chất ginsenosit. Các tên nêu trên được phân loại theo cấu trúc phân tử của loại saponin. Trên Fig.4, nước rửa là dung dịch rửa sau khi nuôi cấy *Lactobacillus*; Ginseng ext là chiết xuất từ nhân sâm; và k8 là *Lactobacillus plantarum* K8.

Fig.5 là biểu đồ thể hiện cơ chế dự đoán về sự hấp thu của saponin thủy phân bằng *Lactobacillus plantarum* K8.

Fig.6 thể hiện kết quả đo số lượng phát hiện ginsenosit có khối lượng phân tử thấp.

Lượng ăn vào là lượng chiết xuất nhân sâm được cho chuột ăn và lượng hấp thu là lượng ginsenosit được phát hiện từ máu của chuột.

Fig.7 là kết quả thể hiện tỷ lệ hấp thu ginsenosit có khối lượng phân tử thấp. Tỷ lệ hấp thu là kết quả chuyển đổi lượng được hấp thu so với lượng ăn vào theo tỷ lệ phần trăm.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong lĩnh vực kỹ thuật liên quan, đã có những nỗ lực để chuyển hóa glycosit thành aglycon hoặc glycosit thủy phân nhờ sử dụng vi sinh vật, nhưng vẫn chưa có thông báo rằng aglycon hoặc glycosit thủy phân được chuyển hóa là có trong tế bào vi sinh vật. Do đó, các kết quả của quá trình chuyển hóa sinh học thành aglycon hoặc glycosit thủy phân nhờ vi sinh vật theo sáng chế và sự tích tụ trong tế bào vi sinh vật là mới. Các tác giả của đơn sáng chế này đã xác nhận rằng nồng độ của aglycon hoặc glycosit thủy phân được tích tụ trong tế bào vi sinh vật cao hơn 1,5 lần, cao hơn hai lần nồng độ của aglycon hoặc glycosit thủy phân trong môi trường nuôi cấy để tạo ra aglycon hoặc glycosit thủy phân ở nồng độ cao.

Cơ chế hoạt động của các lợi khuẩn là tổ chức lại môi trường trong đường ruột, ức chế tác nhân gây bệnh, ức chế yếu tố tiền viêm, tác động lên sự biệt hóa biểu mô, củng cố tác dụng của hàng rào đường ruột, và tác dụng tương tự là đã biết. Tác động của lợi khuẩn trong việc ngăn chặn bệnh ung thư ruột kết có nhiều con đường sinh hóa khác nhau, và ức chế sự xuất hiện bệnh ung thư ruột kết thông qua chu trình tế bào, các loại oxy phản ứng, sự chết tế bào theo chương trình, sản sinh các enzym vi khuẩn đặc hiệu, và quá trình trao đổi chất của vật chủ. Hơn nữa, vi khuẩn sinh axit lactic bảo vệ cơ thể tránh khỏi các bệnh thông qua tác động hoạt hóa miễn dịch mà hoạt hóa hệ thống miễn dịch. Trong lòng tơ của bề mặt ruột, vi khuẩn sinh axit lactic tương tác với tế bào miễn dịch như bạch cầu hoặc tế bào lympho và đẩy mạnh hoạt tính miễn dịch. Vi khuẩn sinh axit lactic gây ra sự biểu hiện beta defensin của người (hBD2) trong tế bào ung thư ruột kết ở người để điều hòa miễn dịch đường ruột. Hơn nữa, việc sản xuất IL-8, là xytokin gây viêm và ức chế sự biểu hiện của Hsp70 được thực hiện bằng cách cho vi khuẩn sinh axit lactic vào trong tế bào Caco-2, là tế bào ung thư ruột kết. Kết quả là, có thể thấy rằng vi khuẩn sinh axit lactic tham gia trực tiếp vào việc điều hòa đáp ứng gây viêm bằng cách điều hòa các xytokin. Hơn nữa, vi

khuẩn sinh axit lactic trong ruột điều hòa đáp ứng tự miễn và thụ thể giống toll (toll-like receptor - TLR). Điều này có nghĩa là tác động của vi khuẩn sinh axit lactic trong việc điều hòa sức khỏe đường ruột có liên quan đến sự truyền tín hiệu qua TLR.

Lactobacillus plantarum K8 hấp thu ginsenosit ở dạng glycosit và do đó phân giải dạng glycosit thành saponin thủy phân bằng cách sử dụng β -glycosidaza. Các đường được sử dụng trong quá trình chuyển hóa của vi khuẩn sinh axit lactic, trong khi đó do saponin thủy phân là cơ chất không cần thiết cho quá trình chuyển hóa của vi khuẩn sinh axit lactic, saponin thủy phân được tích tụ trong cơ thể và sau đó được giải phóng ra bên ngoài tế bào theo thời gian. *Lactobacillus plantarum* K8 chứa saponin thủy phân thể hiện tỷ lệ hấp thu trong cơ thể cao hơn 1.300 lần hoặc cao hơn nữa so với trường hợp hấp thu ginsenosit (chiết xuất saponin) không được cải biến trong thử nghiệm sử dụng động vật (ví dụ 7). Tỷ lệ hấp thu cao là do *Lactobacillus plantarum* K8 có tác dụng như bao nang để ngăn chặn sự đứt gãy của saponin và vận chuyển một cách an toàn saponin này đến ruột. Hơn nữa, được kỳ vọng rằng *Lactobacillus plantarum* K8 chứa saponin thủy phân được hấp thu một cách chọn lọc bởi đại thực bào lưu trú trong mô trong ruột và sau đó di chuyển đến màng mô liên kết hoặc hạch lympho để giải phóng saponin thủy phân vào máu (xem Fig.5).

Dựa vào cơ chế này, theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra vi sinh vật mà trong đó aglycon hoặc glycosit thủy phân được tích tụ trong tế bào. Phương pháp này bao gồm việc tích tụ aglycon hoặc glycosit thủy phân được chuyển hóa từ glycosit trong vi sinh vật bằng cách nuôi cấy vi sinh vật biểu hiện β -glycosidaza trong môi trường chứa glycosit hoặc cho phản ứng với chất phản ứng chứa glycosit.

Vi sinh vật được sử dụng trong sáng chế thể hiện hoạt tính sản sinh aglycon hoặc glycosit thủy phân. Cụ thể là, vi sinh vật có khả năng chuyển hóa glycosit thành dạng aglycon hoặc glycosit thủy phân nhờ hoạt tính của β -glycosidaza. Trong điều kiện kỵ khí, vi sinh vật có khả năng chuyển hóa các dạng glycosit genistin và diadzin thành dạng aglycon genistein và diadzein. Trong trường hợp ly giải vi sinh vật, aglycon tích tụ trong tế bào có thể được phát hiện (xem Fig.1).

Vi sinh vật không bị giới hạn cụ thể miễn là vi sinh vật này là vi sinh vật sản sinh β -

glycosidaza, nhưng có thể là một hoặc nhiều vi sinh vật được chọn từ nhóm gồm vi khuẩn sinh axit lactic, lactococcus, corynebacterium, được thừa nhận chung là an toàn (generally recognized as safe-GRAS), bifidus, nấm men, bacillus, aspergillus và clostridium. Vi khuẩn sinh axit lactic có thể là một hoặc nhiều vi sinh vật được chọn từ nhóm gồm *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. rhamnosus* GG, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. gasseri*, và *Leuconostoc mesenteroid*.

Các tác giả của đơn sáng chế này đã phân lập và nhận dạng *L. plantarum* K8 mà sản sinh β -glycosidaza từ kimchi là thực phẩm lên men truyền thống của Hàn Quốc. Đầu tiên, kimchi và nước kimchi được pha loãng 10 lần theo bậc bằng cách sử dụng nước muối sinh lý vô trùng và sau đó dung dịch không pha loãng và dung dịch pha loãng được cấy trên thạch chọn lọc lactobacillus (thạch LBS, Difco). Các khuẩn lạc xuất hiện sau khi ủ 2 đến 3 ngày ở 37°C được phân lập một lần nữa hoàn toàn sạch theo loại và màu sắc. Tiến hành nhuộm Gram và quan sát dưới kính hiển vi các khuẩn lạc phân lập được và sau đó chỉ các khuẩn lạc gram dương và có hình que được sàng lọc, và trong khi các khuẩn lạc này được nuôi cấy trong môi trường MRS lỏng dành cho vi khuẩn lactobacillus (Difco) ở pH 6,8 và 37°C trong 24 giờ, các khuẩn lạc trong đó pH của dung dịch nuôi cấy giảm đến 4,5 hoặc thấp hơn được sàng lọc lại. Sau đó, khi các khuẩn lạc này được nuôi cấy trong 2 giờ trong môi trường MRS ở pH 2,0 và sau đó được nuôi cấy trong 9 giờ ở môi trường MRS có bổ sung 0,3% mật bò, các chủng lactobacillus kháng axit và kháng mật còn sống được phân lập. Các chủng phân lập được nhận dạng nhờ thử nghiệm sinh hóa sử dụng kit API CHL 50 và xác định trình tự 16S rARN. Theo kết quả nhận dạng, xác nhận rằng các chủng này thuộc loài *Lactobacillus plantarum* và các chủng này được gọi là “*Lactobacillus plantarum* K8” (số nộp lưu: KCTC 10887BP).

Trong một ví dụ khác nữa, vi sinh vật sản sinh β -glycosidaza có thể là một hoặc nhiều vi sinh vật được chọn từ nhóm gồm vi sinh vật được thừa nhận chung là an toàn (GRAS) gồm, *Bifidus*, nấm men, *Bacillus licheniformis*, *S. thermophilus*, *L. casei*, *Streptomyces* sp., *Bifidobacteria*, *Lactobacillus delbrueckii* Rh2, *Sporosarcina* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Pyrococcus furiosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Aspergillus ochraceus*, *Lactobacillus delbrueckii* Rh2, *Pseudomonas* sp., *Aspergillus niger*,

Pseudomonas fluorescens, *Bifidobacterium adolescentis*, *Aspergillus sojae*, *Cunninghamella blakesleeana*, *Bifidobacteria* và *Lactobacillus*, vi khuẩn sinh axit lactic, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Penicillium melinii*, *Eubacterium ramulus*, *Clostridium orbiscindens*, *Aspergillus awamori*, *Lactobacillus brevis*, *Aspergillus parasiticus speare BGB*, *aspergillus aculeatus*, và *aspergillus niger*.

Để tạo ra vi khuẩn sinh axit lactic chứa isoflavon aglycon hoặc saponin thủy phân, *Lactobacillus plantarum* K8 được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung chiết xuất đậu tương hoặc glycosit saponin và được ly giải bằng cách sử dụng thiết bị vi hóa lỏng, và sau đó *Lactobacillus plantarum* K8 được ly giải được tách phân đoạn bằng cách phân đoạn trong hệ dung môi. Đối với việc phân đoạn trong EtOAc với isoflavon hoặc saponin thủy phân, *Lactobacillus plantarum* K8 được chuẩn bị ở nồng độ 2.000 ppm và sau đó tiến hành phân tích bằng cách sử dụng LC-MS/MS. Có thể xác nhận rằng sau khi ly giải, hàm lượng daidzein và genistein là các isoflavon aglycon và hàm lượng của Rg3 là saponin thủy phân tăng.

Lactobacillus plantarum K8 được ly giải bằng cách sử dụng thiết bị nghiền siêu âm hoặc thiết bị vi hóa lỏng và được làm khô lạnh để tạo ra dịch ly giải của '*Lactobacillus plantarum* K8-LTA'. Cụ thể là, bước (a) có thể bao gồm các bước nuôi cấy tĩnh để hoạt hóa vi khuẩn, nuôi cấy lắc, và nuôi cấy có nạp liệu theo thứ tự. Trong trường hợp này, vi sinh vật có thể được nuôi cấy tĩnh trong 12 giờ ở 37°C và nuôi cấy lắc trong điều kiện 6 vòng/phút trong 12 giờ ở 37°C. Môi trường (ví dụ, môi trường MRS) bao gồm nguồn cacbon, nguồn nitơ, vitamin và chất khoáng có thể được sử dụng để nuôi cấy vi sinh vật.

Trong một số trường hợp, trước bước (a), còn có thể bao gồm thêm bước xử lý sơ bộ thực vật chứa glycosit bằng proteaza. Proteaza có thể là một hoặc nhiều enzym được chọn từ nhóm gồm ví dụ, promod, alkalaza, neutraza, và papain.

Cụ thể, các quy trình điều chế chi tiết được mô tả trong 'Bảng quy trình điều chế' và bảng 1 sau đây.

Bảng quy trình điều chế. Quy trình điều chế bằng bình phản ứng quay vòng màng tế bào (Membrane Cell-recycling Reactor - MCR)

1) Khử trùng đường ống lên men: Đường chảy vào ống lên men được khử trùng bằng hơi nước.

2) Khử trùng đồng thời bình lên men và bình nạp liệu: Bình lên men và bình nạp liệu được khử trùng trong 15 đến 20 phút trong điều kiện $121 \pm 1^\circ\text{C}$ và 1,2 đến 1,5 kgf/cm^2 bằng cách bơm dòng hơi nước vào bình nhờ sử dụng vòi phun, thiết bị lấy mẫu, và dòng hơi nước dưới.

3) Cân nguyên liệu thô và khử trùng môi trường: Các nguyên liệu thô của môi trường nuôi cấy lần lượt được cân chính xác theo chuẩn của sản phẩm, và sau đó bơm vào cả bình lên men và bình nạp liệu và khử trùng theo điều kiện 2) sau khi điều chỉnh lượng theo dung tích.

4) Làm mát: Tiến hành làm mát đến nhiệt độ 37°C sau khi khử trùng.

5) Hoạt hóa vi khuẩn giống: *Lactobacillus* đóng băng được làm tan băng nhanh chóng trong bể ổn nhiệt 37°C và sau đó được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy vô trùng 1,5 L và nuôi cấy tĩnh trong 12 giờ.

6) Nuôi cấy chính: Vi khuẩn giống được pha loãng với tỷ lệ 1/100 được nuôi cấy trong 30L môi trường nuôi cấy chính vô trùng.

7) Nuôi cấy có nạp liệu: Các điều kiện nuôi cấy được kiểm tra thường xuyên để được duy trì tại mọi thời điểm. Khi trị số mật độ quang (OD) đạt đến trị số định trước, loại bỏ môi trường sử dụng bằng cách luân chuyển màng và bơm môi trường mới vào bình nạp liệu bằng lượng được tháo ra. Tế bào vi khuẩn được nuôi cấy bằng cách liên tục loại bỏ và bơm vào một lượng môi trường khoảng 200 L.

8) Điều chỉnh nồng độ: Đường ống dẫn lưu được khử trùng bằng hơi nước trong 30 phút, và sau đó dung dịch chảy qua đường ống dẫn lưu và được ly tâm, pha loãng với một lượng thích hợp của nước cất thẩm thấu ngược để điều chỉnh nồng độ.

9) Thu hồi tế bào sống và đóng gói sản phẩm hoặc ly giải tế bào vi khuẩn: Tế bào vi khuẩn được điều chỉnh nồng độ được ly giải bằng thiết bị vi hóa lỏng.

10) Khử trùng: Tế bào vi khuẩn ly giải được giữ trong 30 phút ở 80°C và dung dịch môi trường được khử trùng và làm lạnh lần nữa. Theo một mục đích, có thể không bao

gồm bước khử trùng.

11) Thu hồi và đóng gói tế bào vi khuẩn: Dung dịch được làm mát được chứa và đóng gói trong chai polyetylen (PE) bằng cách sử dụng đường ống dẫn lưu vào bình.

Bảng 1. Quy trình điều chế

(1) Quy trình điều chế	(2) Quy trình cụ thể và các chất bổ trợ
Hoạt hóa vi khuẩn giống	Môi trường nuôi cấy vô trùng 10mL*2, nuôi cấy tĩnh ở 37°C trong 12 giờ
↓	
Nuôi cấy chính	Bơm 30L môi trường vô trùng, nuôi cấy ở 37°C, trong 12 giờ, ở điều kiện lắc 6 vòng/phút
↓	
Nuôi cấy có nạp liệu	Loại bỏ môi đã sử dụng và bơm môi trường vô trùng mới vào
↓	
Ly tâm/rửa/pha loãng	Ly tâm, rửa và pha loãng với nước cất thẩm thấu ngược
↓	
Ly giải tế bào	Nghiền vi sinh vật sử dụng thiết bị vi hóa lỏng hoặc máy siêu âm
↓	
Khử trùng	80°C, 30 phút
↓	
Đông khô	
↓	
(Sản phẩm)	
Đóng gói sản phẩm	Đóng gói bằng polyetylen (PE)

Theo một ví dụ khác, vi sinh vật được nuôi cấy và sau đó được ủ trong môi trường, và chuyển vào môi trường tối thiểu chứa glycosit, và có thể được nuôi cấy bổ sung trong 1 đến 36 giờ, ví dụ, 4 đến 24 giờ. Theo ví dụ 6 của sáng chế, nếu vi sinh vật được nuôi cấy bằng cách sử dụng môi trường tối thiểu chứa glycosit, xác nhận rằng sự tích tụ aglycon hoặc glycosit thủy phân trong tế bào có thể tăng so với nhóm đối chứng trong đó lượng tế bào tương tự được nuôi cấy trong môi trường MRS chứa glycosit saponin.

Trong một ví dụ, glycosit có thể có nguồn gốc từ một trong số loại được chọn từ

nhóm gồm nhân sâm, nhân sâm đại, đậu tương, đẳng sâm *codonopsis lanceolata*, kiều mạch, hoa chuông, rau mùi tây nước, đậu xanh, tỏi, hành, bạch quả, và sắn dây.

Glycosit có thể là isoflavon glycosit, saponin glycosit, phenol glycosit (phenol), xynophore glycosit (nitril glycosit), antraquinon glycosit, glycosit trợ tim, glycosit từ cây lá đắng (amara), comarin glycosit (comarin), sulfua glycosit (rioglycosit và lưu huỳnh), hoặc flavonoit glycosit (flavonoit). Ví dụ, phương pháp theo sáng chế có thể chuyển hóa một hoặc nhiều glycosit được chọn từ nhóm gồm daidzin, genistin, glyxitin, saponin, proxyanidin, naringenin, quercetin, rutinoza, hesperidin, baicalin, wogonosit, mogrosit V, amygdalin, và 3-phenyl comarin thành một hoặc nhiều glycosit thủy phân được chọn từ nhóm gồm genistein, daidzein, glyxitein, saponin thủy phân, axit 3,4-Hydroxyphenylactic, 4-HPA, axit m-coumaric, axit p-coumaric, O-beta-D-glucuronide, stilbenoit, rutin, quercetin, hesperetin, baicalein, wogonin, mogrosit IIIIE, mendelonitril, benzaldehyt, và hợp chất có nguồn gốc từ comarin.

Aglycon hoặc glycosit thủy phân được tạo ra bằng phương pháp điều chế này có thể được tích tụ trong tế bào. Dựa vào điều này, khía cạnh khác của sáng chế đề xuất vi sinh vật hoặc dịch ly giải của chúng mà trong đó aglycon hoặc glycosit thủy phân được tạo ra bằng phương pháp điều chế này được tích tụ trong tế bào. Xác nhận rằng nồng độ của aglycon hoặc glycosit thủy phân được tích tụ trong tế bào cao gấp hai lần nồng độ của aglycon hoặc glycosit thủy phân trong môi trường nuôi cấy vi khuẩn.

Dịch ly giải có thể được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp vật lý. Ví dụ, vi sinh vật có thể được ly giải 4 đến 9 lần bằng cách sử dụng máy nghiền bi, máy ép, máy nghiền siêu âm, hoặc thiết bị vi hóa lỏng và sau đó được đông khô và tạo bột. Nếu cần, tế bào vi khuẩn được ly giải được giữ trong 30 phút ở 80°C và dung dịch môi trường có thể được khử trùng và làm lạnh lần nữa.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm chứa vi sinh vật hoặc dịch ly giải của chúng.

Vi sinh vật hoặc dịch ly giải của chúng có thể được sử dụng làm chế phẩm chống oxy hóa, chế phẩm điều hòa đường ruột, chế phẩm nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm, và chế phẩm lợi khuẩn. Cụ thể là, vi sinh vật hoặc dịch ly giải của chúng có thể được sử dụng

làm chế phẩm thức ăn, chế phẩm để bổ sung vào thực phẩm, và sản phẩm lên men khác. Các phân đoạn thành tế bào ly giải của vi sinh vật hoặc dịch ly giải của chúng theo sáng chế, các vi khuẩn sống, vi khuẩn chết, vi khuẩn khô, hoặc dịch nuôi cấy có thể được bao gồm dưới dạng thành phần hoạt tính, và tá dược hoặc chất mang cũng có thể được bao gồm thêm.

Dịch nuôi cấy bao gồm chính dung dịch nuôi cấy được nuôi cấy trong môi trường lỏng, dịch lọc (dịch nổi ly tâm) thu được bằng cách lọc hoặc ly tâm dung dịch nuôi cấy để loại bỏ chủng, và dịch ly giải tế bào thu được bằng cách siêu âm hoặc xử lý bằng lysozym dung dịch nuôi cấy. Hàm lượng của vi sinh vật hoặc dịch ly giải của chúng trong chế phẩm theo sáng chế có thể thay đổi tùy thuộc vào việc sử dụng và dạng bào chế của chế phẩm.

Chế phẩm theo sáng chế có thể được điều chế và sử dụng theo các dạng bào chế và phương pháp khác nhau. Ví dụ, vi sinh vật hoặc dịch ly giải của chúng hoặc dịch nuôi cấy được kết hợp với chất mang hoặc chất tạo hương mà thường được sử dụng trong lĩnh vực dược phẩm và sau đó có thể được điều chế và sử dụng ở các dạng như viên nén, viên ngậm dẹp, viên nang, cốm ngọt, xi-rô, thuốc bột, hỗn dịch, hoặc cốm. Chất mang, chất liên kết, chất làm trơn, chất gây rã, tá dược, chất hòa tan, chất phân tán, chất ổn định, tác nhân tạo huyền phù, và chất tương tự có thể được sử dụng. Phương pháp sử dụng có thể sử dụng phương pháp qua đường miệng, ngoài đường tiêu hóa hoặc phương pháp đắp vào, và liều dùng có thể được lựa chọn phù hợp theo sự hấp thu, tỷ lệ mất hoạt tính, và tốc độ bài tiết của các thành phần hoạt tính trong cơ thể, và độ tuổi, giới tính và tình trạng, và yếu tố tương tự của người cần sử dụng. Tốt hơn, chế phẩm có thể được dùng với liều có hiệu quả là 10 mg/ngày, và trong trường hợp chế phẩm lợi khuẩn, số lượng tế bào sống trong chế phẩm có thể là 10^8 đến 10^{10} CFU/ngày.

Chế phẩm chống oxy hóa có thể được sử dụng để loại bỏ oxy hoạt tính, và chế phẩm điều hòa đường ruột hoặc chế phẩm lợi khuẩn thúc đẩy sự hấp thu bên trong của isoflavon để ngăn ngừa hoặc cải thiện chứng rối loạn tiêu hóa hoặc tiêu chảy.

Hơn nữa, chế phẩm thức ăn có thể được điều chế ở các dạng như thức ăn lên men, thức ăn phối trộn, dạng viên, ủ xilô, và dạng tương tự. Thức ăn lên men có thể được điều chế bằng cách lên men nguyên liệu hữu cơ bằng cách bổ sung vi sinh vật hoặc dịch ly giải

của chúng theo sáng chế và nhiều loại vi sinh vật hoặc enzym khác đã biết, và thức ăn phối trộn có thể được điều chế bằng cách trộn nhiều loại thức ăn thông thường và vi khuẩn sinh axit lactic theo sáng chế. Thức ăn dạng viên có thể được điều chế bằng cách bào chế thức ăn lên men hoặc thức ăn phối trộn bằng máy tạo viên và ủ xilô có thể được điều chế bằng cách lên men thức ăn sống bằng vi khuẩn sinh axit lactic theo sáng chế.

Hơn nữa, vi sinh vật hoặc dịch ly giải của chúng hoặc dịch nuôi cấy của chúng có thể được sử dụng làm các chất bổ trợ thực phẩm cho thức ăn như thức ăn cho trẻ em, kimchi, đồ uống, sản phẩm từ sữa, và sản phẩm tương tự.

Hơn nữa, sáng chế đề xuất thực phẩm chứa vi sinh vật hoặc dịch ly giải của chúng.

Vi sinh vật hoặc dịch ly giải của chúng theo sáng chế hoặc dịch nuôi cấy của chúng có thể được sử dụng làm chế phẩm mỹ phẩm, và cụ thể là, có thể được sử dụng cho nhiều mục đích sử dụng khác nhau như mỹ phẩm cơ bản, mỹ phẩm, mỹ phẩm cho tóc, mỹ phẩm làm trắng da, mỹ phẩm chống nhăn, và mỹ phẩm chống lão hóa.

Ngoài ra, sáng chế đề xuất chế phẩm để cải thiện chức năng của da chứa vi sinh vật hoặc dịch ly giải của chúng. Việc cải thiện chức năng da có thể chỉ cải thiện chức năng giữ ẩm của da, màu sắc da, độ đàn hồi của da, nếp nhăn hoặc độ săn chắc lớp hạ bì.

Hơn nữa, vi sinh vật hoặc dịch ly giải của chúng theo sáng chế có thể được sử dụng làm nguyên liệu khởi đầu để điều chế sản phẩm lên men. Sản phẩm lên men bao gồm sản phẩm thịt lên men như giăm bông và xúc xích, sản phẩm thực phẩm thô lên men, sản phẩm sữa lên men, nước đậu tương lên men, kimchi, và sản phẩm tương tự. Sản phẩm lên men có thể được điều chế theo các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, sản phẩm thực phẩm thô lên men có thể được điều chế bằng cách trộn vi sinh vật hoặc dịch ly giải của chúng với bột ngũ cốc như gạo lức và í dĩ, bột rau, và bột nấm hoặc được điều chế bằng cách lên men bột ngũ cốc với vi sinh vật hoặc dịch ly giải của chúng hoặc hai đến năm loại vi khuẩn sinh axit lactic hỗn hợp chứa vi sinh vật hoặc dịch ly giải của chúng ở nhiệt độ thích hợp và sau đó trộn một cách phù hợp bột rau và bột nấm để có cân bằng dinh dưỡng và vị ngon tuyệt vời. Hơn nữa, sản phẩm sữa lên men có thể được điều chế bằng cách lên men sữa thô hoặc bột sữa tách kem bằng vi khuẩn sinh axit lactic theo sáng chế hoặc hai đến năm loại vi khuẩn sinh axit lactic hỗn hợp chứa chúng ở nhiệt độ thích

hợp, và nước đậu tương lên men có thể được điều chế bằng cách lên men nước đậu tương bằng vi khuẩn sinh axit lactic theo sáng chế hoặc hai đến năm loại vi khuẩn sinh axit lactic hỗn hợp chứa chúng ở nhiệt độ thích hợp.

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng các ví dụ. Tuy nhiên, các ví dụ sau đây chỉ nhằm minh họa sáng chế, và nội dung của sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ sau đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Thử nghiệm xác định đặc tính sinh hóa của *Lactobacillus plantarum* K8

Để đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của *Lactobacillus plantarum* K8 phân lập và nhận dạng từ kimchi là một thức ăn lên men truyền thống của Hàn Quốc, tiến hành thử nghiệm API (Biomerieux, Pháp). Các đặc tính sinh hóa và độ khả dụng đường của vi khuẩn sinh axit lactic được nêu trong bảng 2 và bảng 3 dưới đây.

Bảng 2. Các đặc tính của *Lactobacillus plantarum* k8

Đặc tính	Kết quả
Loại vi khuẩn	Loại que
Nhiệt độ sinh trưởng tối ưu	37°C
Chuyển động	Không
Nhuộm Gram	+
Hoạt tính với Catalaza	-
Ảnh hưởng của oxy	Kỵ khí bắt buộc

Bảng 3. Độ khả dụng đường của *Lactobacillus plantarum* k8

Mục khảo sát	Kết quả		Mục khảo sát	Kết quả		Mục khảo sát	Kết quả	
	24 giờ	48 giờ		24 giờ	48 giờ		24 giờ	48 giờ
Đối chứng	-	-	Inositol	-	-	D-melezitoza	+	+
Glyxerol	-	-	D-manitol	+	+	D-rafinoza	-	-
Erytritol	-	-	D-sorbitol	+	+	Amidon	-	-
D-arabinoza	-	-	MDM	-	-	Glycogen	-	-
L-arabinoza	+	+	MDG	-	-	Xylitol	-	-
D-riboza	+	+	NAG	+	+	Gentiobioza	-	-
D-xyloza	-	-	Amygdalin	-	?	D-turanoza	+	+
L-xyloza	-	-	Arbutin	+	+	D-lyxoza	-	-
D-adonitol	-	-	ESC	-	-	D-tagatoza	-	-
MDX	-	-	Salixin	+	+	D-fucoza	-	-
D-galactoza	+	+	D-xelobioza	-	-	L-fucoza	-	-
D-glucoza	+	+	D-maltoza	+	+	D-arabitol	-	?
D-fructoza	+	+	D-lactoza	+	+	L-arabitol	-	-
D-manoza	+	+	D-melibioza	-	+	GNT	+	+
DL-sorboza	-	-	D-sacaroza	+	+	2KG	-	-
L-rhamnoza	-	-	D-trehaloza	+	+	5KG	-	?
Dulxitol	-	-	Insulin	-	-			

* Các chữ viết tắt: MDX, Metyl- β D-xylopyranosit; MDM, Metyl- α D-manopyranosit; MDG, Metyl- α D-glucopyranosit; NAG, N-axetylglucosamin; ESC, Esculin sắt (III) xitrat; GNT, kali gluconat; 2KG, kali 2-ketogluconat; 5KG, kali 5-ketogluconat.

* Trong phép đo 24 giờ, thể hiện âm tính, nhưng trong phép đo 48 giờ, khi màu sắc hơi thay đổi, thể hiện bằng dấu '?'.
 Ví dụ 2: Sự sản sinh aglycon của *Lactobacillus plantarum* K8

Lactobacillus plantarum k8 được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung chiết xuất đậu tương và được ly giải bằng cách sử dụng thiết bị vi hóa lỏng, và sau đó *Lactobacillus plantarum* K8 ly giải được phân đoạn bằng hệ dung môi phân đoạn. Với phân đoạn EtOAc chứa isoflavon, mẫu dịch ly giải *Lactobacillus plantarum* K8 được điều chế ở nồng độ 2000ppm và sau đó tiến hành phân tích bằng cách sử dụng LC-MS/MS. Kết quả là, xác nhận rằng trong trường hợp nguyên liệu thô là đậu tương, hàm lượng của daidzin và genistin là các isoflavon glycosit cao, trong khi đó sau khi nuôi cấy với *Lactobacillus plantarum* K8, hàm lượng daidzein và genistein là các isoflavon aglycon tăng. Trái lại, hàm lượng các isoflavon glycosit giảm trong môi trường sau khi nuôi cấy với *Lactobacillus plantarum* K8 (xem Fig.1). Trước khi *Lactobacillus plantarum* K8 theo sáng chế được nuôi cấy, trong trường hợp bao gồm quá trình xử lý sơ bộ là khuấy trong 8 giờ ở 60°C bằng cách bổ sung 1 mL/L alkalaza, 1 mL/L neutraza và 0,2 g/L papain, tỷ lệ tích tụ trong tế bào sau khi chuyển hóa thành aglycon tăng khoảng 10% (bảng 4).

Bảng 4. Tỷ lệ tích tụ trong tế bào sau khi chuyển hóa thành aglycon bằng cách xử lý sơ bộ bằng enzym

	Daidzein (ng/mL)	Genistein (ng/mL)
Không xử lý bằng enzym*	8.672,46	18.286,58
Xử lý sơ bộ bằng enzym	9.539,24	20.115,24

Ví dụ 3: Đánh giá hoạt tính sản sinh aglycon

Để xác định khả năng chuyển hóa isoflavon aglycon của vi khuẩn sinh axit lactic và khả năng tích tụ của isoflavon aglycon trong tế bào, *L. delbrueckii*, *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* K8, và *L. sakei* được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy chứa chiết xuất đậu tương và được nuôi cấy trong 12 giờ ở 37°C, và sau đó tế bào được ly giải bằng cách sử dụng thiết bị vi hóa lỏng. Trong tế bào ly giải, đo hàm lượng isoflavon bằng LC/MS-MS và thể hiện trên Fig.2. Kết quả là, các aglycon gồm daidzein và genistein được tìm thấy ở 4 loại lactobacillus (xem Fig.2). Kết quả này có nghĩa là isoflavon glycosit có thể được chuyển hóa sinh học thành isoflavon aglycon bởi tất cả các loại lactobacillus hoặc vi sinh vật tiết β -glycosidaza, và hơn nữa, kết quả này thể hiện rằng isoflavon aglycon được chuyển hóa có thể được tích tụ trong tế bào.

Ví dụ 4: Hoạt tính sản sinh isoflavon aglycon đối với mỗi quá trình của vi khuẩn sinh axit lactic

Tiến hành các thử nghiệm để đo hàm lượng isoflavon trong quá trình sản sinh của dịch ly giải vi khuẩn sinh axit lactic. *L. rhamnosus* GG, *L. delbrueckii*, và *L. plantarum* K8 được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy chứa chiết xuất đậu tương trong 12 giờ ở 37°C và sau đó được rửa ba lần bằng cách sử dụng nước tiệt trùng. Hàm lượng isoflavon của nước rửa và dịch ly giải lactobacillus được đo lần lượt bằng cách sử dụng LC/MS-MS. Kết quả là, isoflavon glycosit được phát hiện từ nước rửa lần ba và dịch ly giải lactobacillus. Trong khi đó, trong trường hợp isoflavon aglycon, một lượng nhỏ được phát hiện từ nước rửa và isoflavon aglycon được phát hiện từ dịch ly giải lactobacillus với hàm lượng cao (xem Fig.3). Trong một thử nghiệm khác, hàm lượng của glycosit và isoflavon aglycon đo được trong môi trường nuôi cấy *Lactobacillus plantarum* K8, dịch nổi nuôi cấy (sup.), nước rửa lần 1, lần 2 và lần 3, dịch ly giải, dịch nổi ly giải (sup.), và chất lắng ly giải (ppt.). Kết quả là, đã xác nhận rằng trong dịch ly giải, dịch nổi ly giải, và chất lắng ly giải, hàm lượng isoflavon, cụ thể là, isoflavon aglycon tăng mức độ lớn (xem bảng 5). Trong kết quả, isoflavon aglycon có thể không được tạo đốm trên bề mặt của vi khuẩn sinh axit lactic hoặc được tạo ra bởi dung dịch nuôi cấy dư, và do đó, kết quả này có nghĩa là isoflavon aglycon được tích tụ trong vi khuẩn sinh axit lactic.

Bảng 5. So sánh lượng isoflavon aglycon theo quy trình điều chế

Số	Tên	daidzin (ng/mL)	genistin(ng/mL)	daidzein (ng/mL)	genistein (ng/mL)
1	Môi trường	3.689,6	2.385,1	4.394,1	1.857,2
2	Dịch nổi nuôi cấy	398,3	372,3	1.139,2	1.796,8
3	Nước rửa lần 1	N.D.*	2.431,7	3.163,1	1.588,3
4	Nước rửa lần 2	N.D.	673,2	6.552,7	8.727,3

5	Nước rửa lần 3	N.D.	1.800,0	6.638,2	4.601,0
6	Dịch ly giải	N.D.	N.D.	36.545,1	101.626,4
7	Dịch nổi ly giải	3.823	1.2276,5	12.272,1	8.785,7
8	Dịch ly giải ppt.	N.D.	291,1	37.907,4	72.453,7

*N.D.: không xác định

Ví dụ 5: Chuyển hóa saponin bằng vi khuẩn sinh axit lactic

Để xác định sự chuyển hóa của saponin trong nhân sâm thành saponin thủy phân và sự tích tụ trong tế bào, *Lactobacillus plantarum* K8 được nuôi cấy trong dung dịch nuôi cấy có bổ sung chiết xuất nhân sâm và sau đó *Lactobacillus plantarum* K8 được ly giải bằng cách sử dụng thiết bị vi hóa lỏng. Sau khi ly giải, hợp chất ginsenosit được ly giải bằng LC/MS-MS. Kết quả là, xác nhận rằng *Lactobacillus plantarum* K8 hấp thu ginsenosit với cùng hàm lượng như kết quả của isoflavon (xem Fig.4, so sánh các trị số diện tích của nước rửa và dịch ly giải). Cụ thể là, các đỉnh không được thể hiện trong nước rửa và chiết xuất nhân sâm được thể hiện trong dịch ly giải vi khuẩn sinh axit lactic, và có thể thấy rằng các đỉnh được biến đổi nhờ enzym của vi khuẩn sinh axit lactic (xem Fig.4, được thể hiện bằng hộp nét chấm chấm). Điểm mấu chốt của sự chuyển hóa ginsenosit là sự chuyển hóa của ginsenosit có lượng lớn và hoạt tính thấp thành ginsenosit gồm Rg3, Rc, và F2 có lượng nhỏ, nhưng có hoạt tính tuyệt vời. Trong kết quả thử nghiệm, có thể xác nhận rằng ginsenosit được chuyển hóa thành Rg3, là loại saponin cao cấp nhờ *Lactobacillus plantarum* K8.

Ví dụ 6: Tăng sự tích tụ nội bào saponin thủy phân bằng cách sử dụng môi trường tối thiểu

Lactobacillus plantarum K8 được nuôi cấy trong 5 mL môi trường MRS và sau đó được nuôi cấy tĩnh trong 24 giờ ở 37°C và chuyển vào 50 mL môi trường MRS và được nuôi cấy thêm trong 12 giờ. Chuyển tế bào nuôi cấy vào 1L môi trường MRS và nuôi cấy trong 15 giờ, và sau đó rửa với PBS ba lần. Tế bào sau rửa được nuôi cấy trong 1L môi

trường tối thiểu M9 chứa saponin glycosit và môi trường MRS chứa saponin glycosit và lysozym (0,5g/L) với số lượng tương tự và sau đó được nuôi cấy tĩnh trong 6 giờ. Theo một thử nghiệm khác nữa, tế bào được chuyển vào môi trường MRS chứa saponin glycosit và được nuôi cấy trong 6 giờ ở 42°C. Làm nhóm đối chứng, lượng tương tự tế bào được nuôi cấy trong môi trường MRS chứa saponin glycosit trong 6 giờ. Tế bào nuôi cấy được rửa và sau đó được ly giải bằng cách sử dụng thiết bị vi hóa lỏng, và hợp chất ginsenosit được phân tích bằng LC/MS-MS. Trong trường hợp tế bào sử dụng môi trường tối thiểu M9, hợp chất saponin thủy phân cao hơn 3,84 lần hoặc nhiều hơn hợp chất của nhóm đối chứng (xem bảng 6).

Bảng 6. So sánh lượng saponin thủy phân phát hiện được tùy thuộc vào các điều kiện nuôi cấy *Lactobacillus plantarum* K8

	Diện tích tổng	BuOH fr. (mg)	Tỷ lệ tương đối
MRS (lysozym)	7545	6,6	0,32
MRS (sốc nhiệt)	N.D.	5,6	-
Môi trường tối thiểu (M9)	40762	12,4 mg	3,84
MRS	17779	7,4 mg	1

Ví dụ 7: Phát hiện ginsenosit từ máu của chuột

Đo hàm lượng ginsenosit trong máu được phân lập từ chuột hấp thu chiết xuất nhân sâm và *Lactobacillus plantarum* K8 chứa saponin thủy phân chức năng trong 3 ngày. Trong trường hợp chiết xuất nhân sâm, lượng ginsenosit được hấp thu là khoảng 150ng trong số 1.085.630ng tổng lượng ăn vào. Trong khi đó, lượng chiết xuất nhân sâm được ăn vào bởi *Lactobacillus plantarum* K8 chứa saponin thủy phân là 11.653ng và hàm lượng ginsenosit tổng được phát hiện từ máu là khoảng 2160ng (xem Fig.6). Khi chuyển đổi hàm lượng này theo tỷ lệ phần trăm, trong trường hợp chiết xuất nhân sâm, thể hiện tỷ lệ hấp thu là 0,014%, nhưng tỷ lệ hấp thu của ginsenosit bởi *Lactobacillus plantarum* K8 chứa saponin thủy phân đạt khoảng 20% (xem Fig.7).

Cụ thể là, ở các con chuột ăn *Lactobacillus plantarum* K8 chứa saponin thủy phân,

lượng lớn hơn của ginsenosit F2 và Rg3 được hấp thu, và biết rằng F2 và Rg3 có chức năng tuyệt vời nhất ngay cả trong ginsenosit.

Mặc dù một lượng lớn chiết xuất nhân sâm được ăn vào, không có ý nghĩa lớn ở lượng ăn vào do tỷ lệ hấp thu thấp. Trong khi đó, trong trường hợp *Lactobacillus plantarum* K8 chứa saponin thủy phân, tỷ lệ hấp thu cao hơn khoảng 1300 lần hoặc cao hơn tỷ lệ hấp thu trong trường hợp ăn trực tiếp chiết xuất nhân sâm. Có nghĩa là, khi ăn trực tiếp 100g chiết xuất nhân sâm, 99% hoặc cao hơn lượng ăn vào này không được hấp thu mà được thải ra, mà 20g *Lactobacillus plantarum* K8 chứa saponin thủy phân có thể được hấp thu. Kết quả này có nghĩa là ginsenosit có khối lượng phân tử thấp trong *Lactobacillus plantarum* K8 chứa saponin thủy phân được bảo vệ một cách tự nhiên bởi vi khuẩn sinh axit lactic trong quá trình tiêu hóa của chuột.

Ví dụ 8: Sự tích tụ nội bào của saponin thủy phân nhờ sử dụng nấm men

Saccharomyces cerevisiae được nuôi cấy trong 5mL môi trường YPD và được nuôi cấy lắc trong 24 giờ ở 37°C, và sau đó được chuyển vào 500mL môi trường YPD có bổ sung chiết xuất nhân sâm (1 g/L) và sau đó được nuôi cấy thêm trong 12 giờ. Sau khi ly tâm, dịch nổi được làm lạnh riêng và cặn lắng được rửa 3 lần bằng nước cất vô trùng. Nấm men sau khi rửa được ly giải ba lần bằng cách sử dụng thiết bị vi hóa lỏng và sau đó hợp chất saponin thủy phân được phân tích bằng LC/MS-MS. Trong thử nghiệm này, tổng số sáu nhóm mẫu được chuẩn bị để phân tích được chia thành dịch nổi sau khi nuôi cấy (1), nước rửa 1 lần (2), nước rửa 2 lần (3), nước rửa 3 lần (4), trước khi ly giải (5), và sau khi ly giải (6). Kết quả thu được được thể hiện trong bảng 7 dưới đây.

Bảng 7. Tạo ra *Saccharomyces cerevisiae* chứa saponin thủy phân

Mẫu	Saponin thủy phân (ng/mL)
Môi trường nuôi cấy (1)	675
Nước rửa lần 1 (2)	175
Nước rửa lần 2 (3)	165
Nước rửa lần 3 (4)	245
Trước khi ly giải (5)	45

Sau khi ly giải (6)	1.222
---------------------	-------

Ví dụ 9: Kết quả thử nghiệm lâm sàng trên kẹo chứa dịch ly giải *Lactobacillus plantarum* K8

Để đánh giá hiệu quả làm ẩm da người và cải thiện màu sắc da đối với dịch ly giải *Lactobacillus plantarum* K8 (*Lactobacillus plantarum* K8-LTA), tiến hành các thử nghiệm lâm sàng. Nghiên cứu này được thực hiện dựa trên nội dung yêu cầu của khách hàng và hướng dẫn thử nghiệm áp dụng trên người (được thiết lập bởi Cục Thực phẩm và Dược phẩm Hàn Quốc - Korea Food and Drug Administration vào tháng 12 năm 2011), thử nghiệm áp dụng trên người của thực phẩm chức năng có lợi cho sức khỏe (Cục Thực phẩm và Dược phẩm Hàn Quốc, vào tháng 12 năm 2008) và hướng dẫn thực hành lâm sàng tốt (guideline for good clinical practice-GCP), và thu được sự phê duyệt của Hội đồng đánh giá nghiên cứu lâm sàng của trường Đại học Hyung Hee - Clinical Study Deliberation Committee of Kyung Hee University (Nghiên cứu số KHUSBC 2012-011).

41 Đối tượng là nữ có độ tuổi từ 25 đến 60, là người có da khô và màu sắc da bắt đầu xỉn hoặc đã xỉn được chọn lựa và khi đối, được cho ăn sản phẩm (bảng 27) với liều 2 viên nén vào buổi sáng và 2 viên nén vào buổi tối. Sản phẩm thử nghiệm (kẹo chứa 2,1% *Lactobacillus plantarum* K8-LTA) và sản phẩm đối chứng (kẹo không chứa 2,1% *Lactobacillus plantarum* K8-LTA) được phân bổ mù đôi ngẫu nhiên cho các đối tượng được chọn và được cho dùng trong 8 tuần, và sau đó, tại các thời điểm tương ứng trước khi sử dụng sản phẩm thử nghiệm, trong 4 tuần sau khi sử dụng, và trong 8 tuần sau khi sử dụng, đánh giá tác dụng cải thiện da bằng cách thực hiện đánh giá quan sát màu sắc da, độ ẩm của da, lượng da chết, TEWL, màu sắc da (trị số L*) và đánh giá bằng bản điều tra, đánh giá tính an toàn, khảo sát chế độ ăn và khảo sát cân nặng (bao gồm BMI). Ngoài ra, trước khi dùng sản phẩm và trong 8 tuần sau khi dùng sản phẩm, tiến hành phân tích máu. Xác nhận rằng kẹo bao gồm *Lactobacillus plantarum* K8-LTA chứa isoflavon aglycon bằng phân tích LC/MS-MS.

1. Kết quả đánh giá bằng mắt

So với trước khi sử dụng sản phẩm, màu sắc da (độ sáng) được cải thiện đáng kể

(giảm) có ý nghĩa thống kê ở cả nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm trong 4 tuần và 8 tuần sau khi dùng sản phẩm. So sánh giữa các nhóm, 4 tuần và 8 tuần sau khi dùng sản phẩm, không có sự khác biệt đáng kể có ý nghĩa thống kê giữa các nhóm này ($p < 0,05$).

2. Đánh giá bằng thiết bị

2-1. Lượng ẩm của da

So sánh với trước khi dùng sản phẩm, 4 tuần sau khi dùng sản phẩm, độ ẩm của da trên mặt và cẳng tay tăng đáng kể có ý nghĩa thống kê ở cả hai nhóm thử nghiệm, và 8 tuần sau khi dùng sản phẩm, độ ẩm của da ở mặt tăng đáng kể có ý nghĩa thống kê ở cả nhóm thử nghiệm và nhóm đối chứng, và độ ẩm của da ở cẳng tay tăng đáng kể có ý nghĩa thống kê ở nhóm thử nghiệm. So sánh giữa các nhóm, 4 tuần và 8 tuần sau khi dùng sản phẩm ở mặt và 4 tuần sau khi dùng sản phẩm ở cẳng tay, khi so sánh với nhóm đối chứng, ở nhóm thử nghiệm, độ ẩm của da tăng đáng kể có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) (bảng 8).

Bảng 8. Sự thay đổi về lượng ẩm giữa các nhóm

Vị trí	Số tuần	Nhóm	Δ Trung bình $\pm$ S.D. (A.U)	trị số p†
Mặt	4	Đối chứng	$0,64 \pm 0,48$	0,000***^
		Thử nghiệm	$6,47 \pm 1,14$	0,000***^
	8	Đối chứng	$2,39 \pm 0,61$	0,007**
		Thử nghiệm	$8,10 \pm 1,86$	0,007**
Cẳng tay	4	Đối chứng	$0,49 \pm 0,44$	0,030*
		Thử nghiệm	$2,22 \pm 0,62$	0,030*
	8	Đối chứng	$1,35 \pm 1,04$	0,068^
		Thử nghiệm	$4,14 \pm 0,84$	0,068^

† trị số p : Kiểm định t độc lập (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

†trị số p^: Thử nghiệm Mann-Whitney

2-2. Sự mất nước xuyên biểu bì (Transepidermal water loss - TEWL)

So sánh với trước khi dùng sản phẩm, 8 tuần sau khi dùng sản phẩm, ở mặt và cẳng

tay, TEWL giảm đáng kể có ý nghĩa thống kê ở cả hai nhóm thử nghiệm. So sánh giữa các nhóm, 8 tuần sau khi dùng sản phẩm, ở cẳng tay, TEWL giảm đáng kể có ý nghĩa thống kê ở nhóm thử nghiệm khi so sánh với nhóm đối chứng ($p < 0,05$) (bảng 9).

Bảng 9. So sánh sự mất nước xuyên biểu bì giữa các nhóm

Vị trí	Nhóm	Số tuần	Δ Trung bình $\pm$ S.D. (g/m ² h)	trị số p [†]	IF [°] (%)
Mặt	Đối chứng	0	13,02 $\pm$ 2,15	-	-
		4	13,21 $\pm$ 2,12	0,392	▲ 1,46
		8	12,76 $\pm$ 2,08	0,330	▼ 1,20
	Thử nghiệm	0	12,98 $\pm$ 1,83	-	-
		4	12,90 $\pm$ 2,05	0,837	▼ 0,62
		8	11,93 $\pm$ 1,62	0,008**	▼ 8,09
Cẳng tay	Đối chứng	0	6,89 $\pm$ 1,16	-	-
		4	6,90 $\pm$ 1,16	0,936	▲ 0,15
		8	6,61 $\pm$ 1,31	0,187	▼ 4,06
	Thử nghiệm	0	7,56 $\pm$ 1,04	-	-
		4	7,35 $\pm$ 1,35	0,303	▼ 2,78
		8	6,50 $\pm$ 1,33	0,002** [^]	▼ 14,02

[†] trị số p: Kiểm định t theo cặp (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

[^]trị số p: Thử nghiệm dấu hạng Wilcoxon.

[°] Yếu tố tăng cường (Intensification factor - IF): $(WX - W0)/W0 \times 100$, được tính theo trị số trung bình

2-3. Lượng da chết

So sánh với trước khi dùng sản phẩm, 4 tuần và 8 tuần sau khi dùng sản phẩm, ở mặt, lượng da chết giảm đáng kể có ý nghĩa thống kê ở nhóm thử nghiệm và ở cẳng tay, lượng da chết giảm đáng kể có ý nghĩa thống kê ở cả nhóm đối chứng và nhóm thử

nghiệm. So sánh giữa các nhóm, ở cả mặt và cẳng tay, 4 tuần và 8 tuần sau khi dùng sản phẩm, khi so sánh với nhóm đối chứng, ở nhóm thử nghiệm, lượng da chết giảm đáng kể có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) (bảng 10).

Bảng 10. Sự thay đổi về lượng da chết giữa các nhóm

Vị trí	Số tuần	Nhóm	Δ Trung bình $\pm$ S.D. (điểm ảnh)	trị số p†
Mặt	4	Đối chứng	$272,35 \pm 3.795,82$	0,002**
	4	Thử nghiệm	$-14.696,67 \pm 2.306,89$	0,002**
	8	Đối chứng	$-7.373,50 \pm 4.395,46$	0,000***
	8	Thử nghiệm	$-38.263,71 \pm 3.653,16$	0,000***
Cẳng tay	4	Đối chứng	$-29.518,20 \pm 4.504,67$	0,007**^
	4	Thử nghiệm	$-48.557,33 \pm 5.394,31$	0,007**^
	8	Đối chứng	$-35.369,05 \pm 5.180,61$	0,000***
	8	Thử nghiệm	$-72.941,62 \pm 5.427,48$	0,000***

† trị số p : Kiểm định t độc lập (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

†trị số p^: Thử nghiệm Mann-Whitney

2-4. Độ sáng màu sắc da (trị số L*)

So sánh với trước khi dùng sản phẩm, tại phần má, 4 tuần sau khi dùng sản phẩm, độ sáng màu sắc da tăng đáng kể ở nhóm thử nghiệm, và 8 tuần sau khi dùng sản phẩm, độ sáng màu sắc da tăng đáng kể ở cả nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm. Tại phần có sắc tố, 4 tuần và 8 tuần sau khi dùng sản phẩm, độ sáng màu sắc da (trị số L*) tăng đáng kể ở cả nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm ($p < 0,05$). So sánh giữa các nhóm, 4 tuần và 8 tuần sau khi dùng sản phẩm tại phần má và 8 tuần sau khi dùng sản phẩm tại phần có sắc tố, khi so sánh với nhóm đối chứng, ở nhóm thử nghiệm, độ sáng màu sắc da (trị số L*) tăng đáng kể ($p < 0,05$) (bảng 11).

Bảng 11. So sánh độ sáng màu sắc da (trị số L*) giữa các nhóm theo thời gian

Vị trí	Số tuần	Nhóm	Độ lệch trung bình $\Delta \pm$ Sai số Std. (trị số L*)	trị số p†
--------	---------	------	---	-----------

Mặt (má)	4 tuần	Nhóm đối chứng	$0,25 \pm 0,12$	$0,007^{**\wedge}$
		Nhóm thử nghiệm	$0,81 \pm 0,32$	$0,007^{**\wedge}$
	8 tuần	Nhóm đối chứng	$0,48 \pm 0,15$	$0,000^{***\wedge}$
		Nhóm thử nghiệm	$2,20 \pm 0,29$	$0,000^{***\wedge}$
Đốm tối màu	4 tuần	Nhóm đối chứng	$0,97 \pm 0,26$	$0,215^{\wedge}$
		Nhóm thử nghiệm	$1,15 \pm 0,18$	$0,215^{\wedge}$
	8 tuần	Nhóm đối chứng	$1,60 \pm 0,30$	$0,004^{**}$
		Nhóm thử nghiệm	$2,79 \pm 0,26$	$0,004^{**}$

† trị số p : Kiểm định t độc lập (* $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ Sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm)

†trị số p[^]: Thử nghiệm Mann-Whitney

2-5. Phân tích máu

Theo kết quả phân tích, so sánh với trước khi dùng sản phẩm, 8 tuần sau khi dùng sản phẩm, ở nhóm đối chứng, có sự khác biệt đáng kể ở các thành phần protein T., albumin, và creatinin và ở nhóm thử nghiệm, có sự khác biệt đáng kể ở các thành phần protein T., creatinin, và mạch đập, nhưng trị số trung bình nằm trong giới hạn bình thường ($p < 0,05$). So sánh giữa các nhóm, 8 tuần sau khi dùng sản phẩm, không có sự khác biệt đáng kể giữa hai nhóm về tất cả các thông số (bảng 12).

Bảng 12. Kết quả phân tích máu theo loại thành phần

Thành phần	Nhóm	Độ lệch trung bình $\Delta \pm$ sai số Std. (trị số L*)	trị số p†
Protein T.	Nhóm đối chứng	$-0,25 \pm 0,06$	0,743
Protein T.	Nhóm thử nghiệm	$-0,28 \pm 0,07$	0,743
Albumin	Nhóm đối chứng	$-0,10 \pm 0,03$	0,224
Albumin	Nhóm thử	$-0,02 \pm 0,05$	0,224

	nghiệm		
T.Bil	Nhóm đối chứng	$-0,06 \pm 0,04$	0,599
T.Bil	Nhóm thử nghiệm	$-0,10 \pm 0,06$	0,599
SGOT	Nhóm đối chứng	$0,10 \pm 1,71$	0,743 [^]
SGOT	Nhóm thử nghiệm	$0,57 \pm 0,84$	0,743 [^]
SGPT	Nhóm đối chứng	$2,45 \pm 1,50$	0,617
SGPT	Nhóm thử nghiệm	$1,48 \pm 1,23$	0,617
T.Chol	Nhóm đối chứng	$-1,25 \pm 3,14$	0,607
T.Chol	Nhóm thử nghiệm	$-3,57 \pm 3,19$	0,607
Triglyxerit	Nhóm đối chứng	$1,70 \pm 15,20$	0,754 [^]
Triglyxerit	Nhóm thử nghiệm	$-13,24 \pm 8,07$	0,754 [^]
Mức glucoza trong máu (trước ăn)	Nhóm đối chứng	$-2,70 \pm 2,12$	0,530
Mức glucoza trong máu (trước ăn)	Nhóm thử nghiệm	$-0,62 \pm 2,49$	0,530
BUN (nitro của ure)	Nhóm đối chứng	$0,59 \pm 0,66$	0,879
BUN (nitro của ure)	Nhóm thử nghiệm	$0,44 \pm 0,69$	0,879
Creatinin	Nhóm đối chứng	$0,06 \pm 0,02$	0,758 [^]
Creatinin	Nhóm thử nghiệm	$0,08 \pm 0,02$	0,758 [^]
Hemoglobin	Nhóm đối chứng	$0,10 \pm 0,11$	0,875 [^]
Hemoglobin	Nhóm thử nghiệm	$0,03 \pm 0,16$	0,875 [^]
Áp suất máu tâm thu	Nhóm đối chứng	$1,35 \pm 2,37$	0,343
Áp suất máu tâm thu	Nhóm thử nghiệm	$4,76 \pm 2,64$	0,343
Áp suất tâm trương	Nhóm đối chứng	$-1,30 \pm 1,12$	0,117
Áp suất tâm trương	Nhóm thử nghiệm	$2,19 \pm 1,83$	0,117

Mạch đập	Nhóm đối chứng	$2,80 \pm 1,86$	0,290 [^]
Mạch đập	Nhóm thử nghiệm	$5,38 \pm 1,80$	0,290 [^]

† *trị số p* : Kiểm định t độc lập (* $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ Sự khác biệt đáng kể giữa hai nhóm)

†*trị số p*[^]: Thử nghiệm Mann-Whitney

2-6. Khảo sát chế độ ăn và cân nặng

Theo kết quả phân tích, so sánh với trước khi dùng sản phẩm, 8 tuần sau khi dùng sản phẩm, ở nhóm thử nghiệm, cân nặng tăng đáng kể, nhưng 4 tuần và 8 tuần sau khi dùng sản phẩm, không có sự khác biệt đáng kể khi khảo sát chế độ ăn, cân nặng, và chỉ số BMI ($p < 0,05$). So sánh giữa các nhóm, 4 tuần và 8 tuần sau khi dùng sản phẩm, ở cả nhóm đối chứng và nhóm thử nghiệm, không có sự khác biệt đáng kể khi khảo sát chế độ ăn, cân nặng, và chỉ số BMI ($p < 0,05$) (bảng 13).

Bảng 13. Khảo sát chế độ ăn và sự thay đổi về cân nặng giữa các nhóm theo thời gian (n=41)

Các hạng mục	Số tuần	Nhóm	Độ lệch trung bình $\Delta \pm$ Sai số Std. (trị số L*)	trị số p†
Khảo sát chế độ ăn	4 tuần	Nhóm đối chứng	$0,01 \pm 0,02$	0,213 [^]
Khảo sát chế độ ăn	4 tuần	Nhóm thử nghiệm	$-0,01 \pm 0,03$	0,213 [^]
Khảo sát chế độ ăn	8 tuần	Nhóm đối chứng	$0,03 \pm 0,02$	0,168 [^]
Khảo sát chế độ ăn	8 tuần	Nhóm thử nghiệm	$-0,01 \pm 0,02$	0,168 [^]
Cân nặng	4 tuần	Nhóm đối chứng	$0,31 \pm 0,15$	0,794
Cân nặng	4 tuần	Nhóm thử nghiệm	$0,24 \pm 0,20$	0,794
Cân nặng	8 tuần	Nhóm đối chứng	$0,55 \pm 0,27$	0,676 [^]
Cân nặng	8 tuần	Nhóm thử nghiệm	$0,67 \pm 0,25$	0,676 [^]
Chỉ số BMI	4 tuần	Nhóm đối	$0,05 \pm 0,07$	0,574

		chứng		
Chỉ số BMI	4 tuần	Nhóm thử nghiệm	$0,11 \pm 0,09$	0,574
Chỉ số BMI	8 tuần	Nhóm đối chứng	$0,22 \pm 0,12$	0,947
Chỉ số BMI	8 tuần	Nhóm thử nghiệm	$0,21 \pm 0,11$	0,947

$\dagger$ trị số p : kiểm định t độc lập (* $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ Sự khác biệt đáng kể giữa hai nhóm)

$\dagger$ trị số $p^{\wedge}$: Thử nghiệm Mann-Whitney

3. Kết quả đánh giá bằng bản điều tra

3-1. Kết quả đánh giá bằng bản điều tra về hiệu quả

Về các dấu hiệu ‘làm ẩm da’, ‘làm mềm’, ‘giảm căng’, ‘giảm da chết’, và ‘da khỏe’, 4 tuần và 8 tuần sau khi dùng sản phẩm, 60% và 70% hoặc nhiều hơn trong số các đối tượng có các dấu hiệu này được cải thiện tích cực ở cả sản phẩm đối chứng và sản phẩm thử nghiệm. Cụ thể là, 4 tuần sau khi dùng sản phẩm, các dấu hiệu ‘giảm căng da’ và ‘cấu trúc da đúng trật tự’ được cải thiện 10% hoặc cao hơn ở sản phẩm thử nghiệm khi so sánh với nhóm đối chứng (bảng 14).

Bảng 14. Kết quả đánh giá bằng bản điều tra về hiệu quả theo thời gian (n=41)

Hạng mục	Số tuần	Nhóm đối chứng (n=20)		Nhóm thử nghiệm (n=21)	
Dấu hiệu		Phản hồi tích cực (N)	Sự hài lòng (%)	Phản hồi tích cực (N)	Sự hài lòng (%)
Mức độ cải thiện độ ẩm da $\dagger$	4 tuần	9	45,00%	8	38,10
	8 tuần	13	65,00%	11	52,38
Mức độ cải thiện màu sắc da $\dagger$	4 tuần	8	40,00%	8	38,10
	8 tuần	11	55,00%	9	42,86
1. Làm ẩm da	4 tuần	14	70,00%	14	66,67

	8 tuần	16	80,00%	16	76,19
2. Làm mềm da	4 tuần	17	85,00%	15	71,43
	8 tuần	18	90,00%	18	85,71
3. Giảm căng da	4 tuần	13	65,00%	17	80,95
	8 tuần	15	75,00%	16	76,19
4. Giảm da chết	4 tuần	12	60,00%	14	66,67
	8 tuần	16	80,00%	17	80,95
5. Cấu trúc da đúng trật tự	4 tuần	12	60,00%	15	71,43
	8 tuần	16	80,00%	13	61,90
6. Làm sáng da	4 tuần	12	60,00%	12	57,14
	8 tuần	14	70,00%	16	76,19
7. Da khỏe	4 tuần	15	75,00%	13	61,90
	8 tuần	16	80,00%	17	80,95

Các tiêu chí cho bản điều tra: 0, không thay đổi/ 1, cảm thấy thay đổi nhỏ nhưng không biết thay đổi này/ 2, cảm thấy có sự cải thiện một chút / 3, cảm thấy được cải thiện/ 4, cải thiện rất nhiều.

- Những người khảo sát trả lời tích cực (%): 2~4

Các tiêu chí cho bản điều tra 1. Không phải toàn bộ / 2. Số / 3 . Có vẻ không / 4. Có vẻ có thể/ 5. Có thể /6. Rất có thể.

- Những người khảo sát trả lời tích cực (%): 4~6

3-2. Kết quả đánh giá bằng bản điều tra về tính khả dụng của sản phẩm

Ở tất cả các hạng mục ngoài trừ ‘cảm giảm nhai’, 70% hoặc nhiều hơn số đối tượng đã trả lời tích cực về sản phẩm đối chứng và sản phẩm thử nghiệm. Cụ thể là, về hạng mục ‘vị của sản phẩm’ và ‘sự hài lòng về tổng quan sản phẩm’, 100% số đối tượng đã trả lời rằng các hạng mục đều được cảm thấy hài lòng ở nhóm thử nghiệm (bảng 15).

Bảng 15. Bản điều tra về tính khả dụng của sản phẩm sau khi sử dụng sản phẩm

Hạng mục	Nhóm đối chứng (n=20)		Nhóm thử nghiệm (n=21)	
	Phản hồi tích cực (N)	Sự hài lòng (%)	Phản hồi tích cực (N)	Sự hài lòng (%)
1. Màu sắc của sản phẩm thế nào?	16	80,00	20	95,24%
2. Mùi hương của sản phẩm thế nào?	18	90,00	19	90,48%
3. Vị của sản phẩm thế nào?	19	95,00	21	100,00%
4. Hình thức của sản phẩm thế nào?	14	70,00	17	80,95%
5. Cảm giác khi nhai sản phẩm thế nào?	14	70,00	11	52,38%
6. Bạn có hài lòng về tổng thể sản phẩm không?	18	90,00	21	100,00%
7. Bạn có ý định mua sản phẩm này không, nếu sản phẩm này được đưa ra thị trường?	15	75,00	15	71,43%

Các tiêu chí cho bản điều tra 1. Hoàn toàn không tốt / 2. Không tốt / 3. Bình thường / 4. Có vẻ tốt/ 5. Rất tốt.

- Những người khảo sát trả lời tích cực (%): 4~5

4. Kết quả đánh giá về độ an toàn

Trong khoảng thời gian thử nghiệm này, không quan sát thấy phản ứng bất lợi với da và triệu chứng toàn thân ở tất cả các đối tượng.

Từ kết quả trên đây, xác nhận rằng sản phẩm thử nghiệm theo sáng chế giúp cải

thiện độ ẩm của da, lượng da chết, sự mất nước xuyên biểu bì (TEWL) và màu sắc da.

Ví dụ 9: Điều chế mỹ phẩm chứa dịch ly giải *Lactobacillus plantarum* K8 (*Lactobacillus plantarum* K8-LTA) và thử nghiệm áp dụng trên cơ thể người

Kết quả thử nghiệm lâm sàng

Có ba loại mỹ phẩm chứa *Lactobacillus plantarum* K8-LTA được điều chế và thử nghiệm để đánh giá hiệu quả cải thiện độ ẩm da, màu sắc da, độ đàn hồi của da, nếp nhăn khóe mắt và độ chặt của lớp hạ bì được thực hiện.

Tiến hành kiểm tra các nếp nhăn và sự tạo sần tố bằng cách nhắm đến 32 đối tượng là phụ nữ có độ tuổi từ 35 đến 50. Trong khi các sản phẩm thử nghiệm (bảng 16) được sử dụng liên tục trong khoảng thời gian thử nghiệm là 8 tuần, tại các thời điểm trước khi sử dụng sản phẩm, 4 tuần sau khi sử dụng sản phẩm, và 8 tuần sau khi sử dụng sản phẩm, đánh giá bằng mắt (nếp nhăn ở khóe mắt, màu sắc da) và tiến hành đo bằng máy (độ ẩm da, màu sắc da, độ đàn hồi của da, nếp nhăn ở khóe mắt, và độ chặt của lớp hạ bì). Các phần đo trái/phải được xác định bằng cách ngẫu nhiên hóa khối (A: độ ẩm và độ chặt của lớp hạ bì của má trái, đo màu sắc da, độ đàn hồi, đo nếp nhăn ở khóe mắt của má phải / B: độ ẩm và độ chặt của lớp hạ bì của má phải, đo màu sắc da, độ đàn hồi, và đo nếp nhăn ở khóe mắt của má trái), và tiến hành đánh giá độ an toàn và bằng bản điều tra vào 4 tuần và 8 tuần sau khi sử dụng sản phẩm.

Bảng 16. Thông tin mỹ phẩm

Tên mỹ phẩm	Nước cân bằng tăng cường dưỡng chất k-lacBio
	Tinh chất chứa nhiều dưỡng chất k-lacBio
	Kem nâng cơ tăng cường dưỡng chất k-lacBio
Loại mỹ phẩm	Nước cân bằng: loại không màu và có thể tan được
	Tinh chất: loại màu trắng và kem
	Kem: loại màu trắng và kem
Thời gian sử dụng mỹ phẩm	Trong 8 tuần

Phương pháp sử dụng mỹ phẩm	Dùng một lượng thích hợp thoa lên mặt theo thứ tự nước cân bằng - tinh chất – kem vào buổi sáng và tối, sau khi rửa mặt
Phần sản phẩm đã sử dụng	Toàn bộ mặt

Các đối tượng tham gia đo bằng máy sau khi làm ổn định trong 20 phút sau khi làm sạch khoảng trống nơi mà không có sự chuyển động của không khí và ánh sáng mặt trời trực tiếp và các điều kiện về nhiệt độ và độ ẩm không thay đổi ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ và $50 \pm 5\%$) được duy trì.

1. Đánh giá bằng mắt

1-1. Phân tích đánh giá bằng mắt nếp nhăn ở khóe mắt cho mỗi thời điểm

So sánh với trước khi dùng sản phẩm thử nghiệm, 4 tuần và 8 tuần sau khi sử dụng sản phẩm, các nếp nhăn được cải thiện đáng kể ($P < 0,05$), và sự biến đổi lớn nhất về cải thiện nếp nhăn ở mức giảm (cải thiện) là 5,50% (xem bảng 17).

Bảng 17. Thay đổi nếp nhăn ở khóe mắt trước và sau khi sử dụng sản phẩm thử nghiệm theo thời gian (n=32)

Thời gian đo	Trung bình (bậc)	S.D	trị số p†	Tỷ lệ giảm hoặc cải thiện ¹ (%)
0 Tuần	4,73	0,85	-	-
4 Tuần	4,58	0,77	0,005**	▼ 3,17
8 Tuần	4,47	0,78	0,000***	▼ 5,50

†trị số p: Kiểm định t theo cặp (* $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, sự khác biệt đáng kể so với trước khi dùng sản phẩm)

¹ tỷ lệ giảm hoặc cải thiện: $(W_x - W_0)/W_0 \times 100$, được tính theo trị số trung bình

1-2. Phân tích đánh giá bằng mắt màu sắc da cho mỗi thời điểm

So sánh với trước khi dùng sản phẩm thử nghiệm, 4 tuần và 8 tuần sau khi sử dụng sản phẩm, màu sắc da được cải thiện đáng kể ($P<0,05$), và sự biến đổi lớn nhất về cải thiện màu sắc da ở mức giảm (cải thiện) là 9,04% (xem bảng 18).

Bảng 18. Thay đổi về màu sắc da trước và sau khi sử dụng sản phẩm thử nghiệm theo thời gian (n=32)

Thời gian đo	Trung bình (bậc)	S.D	Trị số p†	Tỷ lệ giảm hoặc cải thiện ¹ (%)
0 Tuần	5,09	1,26	-	-
4 Tuần	4,77	1,39	0,000***	▼ 6,29
8 Tuần	4,63	1,36	0,000***	▼ 9,04

†trị số p: Kiểm định t theo cặp ($*P<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$, sự khác biệt đáng kể so với trước khi dùng sản phẩm)

¹ tỷ lệ giảm hoặc cải thiện: $(W_x - W_0)/W_0 \times 100$, được tính theo trị số trung bình

2. Đo bằng máy

2-1. Đo độ ẩm

So sánh với trước khi dùng sản phẩm thử nghiệm, 4 tuần và 8 tuần sau khi sử dụng sản phẩm, độ ẩm tăng đáng kể có ý nghĩa thống kê (được cải thiện) ($P<0,05$), và sự biến đổi lớn nhất về cải thiện độ ẩm ở mức tăng (cải thiện) là 42,97% (xem bảng 19).

Bảng 19. Thay đổi về độ ẩm của da trước và sau khi sử dụng sản phẩm thử nghiệm theo thời gian (n=32)

Thời gian đo	Trung bình (bậc)	S.D	Trị số p†	Tỷ lệ giảm hoặc cải thiện ¹ (%)
0 Tuần	27,51	6,80	-	-
4 Tuần	34,02	5,54	0,000***	▲ 23,66

8 Tuần	39,33	6,15	0,000***	▲ 42,97
--------	-------	------	----------	---------

†trị số p: Kiểm định t theo cặp (*P<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, sự khác biệt đáng kể so với trước khi dùng sản phẩm)

¹ tỷ lệ giảm hoặc cải thiện: $(W_x - W_0)/W_0 \times 100$, được tính theo trị số trung bình

2-2. Đo độ sáng màu sắc da (trị số L*)

So sánh với trước khi dùng sản phẩm thử nghiệm, 4 tuần và 8 tuần sau khi sử dụng sản phẩm, mức độ sáng màu sắc da tại phần má tăng đáng kể có ý nghĩa thống kê (được cải thiện) (P<0,05), và 8 tuần sau khi sử dụng sản phẩm, mức độ sáng tại phần có sắc tố tăng đáng kể có ý nghĩa thống kê (được cải thiện) (P<0,05). Sự biến đổi lớn nhất về cải thiện độ sáng màu sắc da ở mức tăng (cải thiện) là 1,59% tại phần má và 1,25% tại phần có sắc tố.

Bảng 20. Thay đổi về màu sắc da trước và sau khi sử dụng sản phẩm thử nghiệm theo thời gian (n=32)

Vị trí	Thời gian đo	Trung bình (bậc)	S.D	Trị số p†	Tỷ lệ giảm hoặc cải thiện ¹ (%)
Má	0 Tuần	62,14	3,19	-	-
	4 Tuần	62,78	3,07	0,005**	▲ 1,03
	8 Tuần	63,13	2,90	0,000***	▲ 1,59
Tạo sắc tố da	0 Tuần	59,09	3,27	-	-
	4 Tuần	59,34	3,23	0,155	▲ 0,42
	8 Tuần	59,83	3,06	0,000***	▲ 1,25

†trị số p: Kiểm định t theo cặp (*P<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, sự khác biệt đáng kể so với trước khi dùng sản phẩm)

¹ tỷ lệ giảm hoặc cải thiện: $(W_x - W_0)/W_0 \times 100$, được tính theo trị số trung bình

2-3. Đo độ đàn hồi của da (Hệ đo cấu trúc Moire)

So sánh với trước khi dùng sản phẩm thử nghiệm, 4 tuần và 8 tuần sau khi sử dụng sản phẩm, khoảng cách tổng và góc trung bình của các đường đồng mức giảm đáng kể có ý nghĩa thống kê (được cải thiện) ($P < 0,05$).

Tỷ lệ giảm lớn nhất về chiều dài toàn bộ của đường đồng mức là 9,64% và tỷ lệ giảm lớn nhất của góc là 14,70% (bảng 21).

Bảng 21. Kết quả phân tích về độ đàn hồi của da trước và sau khi sử dụng sản phẩm thử nghiệm theo thời gian (n=32)

Hạng mục	Thời gian đo	Trung bình	S.D	Trị số p†	Tỷ lệ giảm hoặc cải thiện ¹ (%)
Khoảng cách (điểm ảnh)	0 tuần	270,31	61,76	-	-
Khoảng cách (điểm ảnh)	4 tuần	253,81	63,78	0,000***	▼ 6,10
Khoảng cách (điểm ảnh)	8 tuần	244,25	54,87	0,000***	▼ 9,64
Góc (°)	0 tuần	26,74	5,78	-	-
Góc (°)	4 tuần	24,68	5,81	0,000***	▼ 7,70
Góc (°)	8 tuần	22,81	5,18	0,000***	▼ 14,70

†trị số p: Kiểm định t theo cặp (* $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, sự khác biệt đáng kể so với trước khi dùng sản phẩm)

¹ tỷ lệ giảm hoặc cải thiện: $(W_x - W_0)/W_0 \times 100$, được tính theo trị số trung bình

2-4. Đo nếp nhăn ở khóe mắt

So sánh với trước khi dùng sản phẩm thử nghiệm, 4 tuần sau khi sử dụng sản phẩm, độ sâu trung bình của nếp nhăn và độ sâu lớn nhất của nếp nhăn đã giảm đáng kể có ý nghĩa thống kê (được cải thiện) và 8 tuần sau khi sử dụng sản phẩm, độ sâu lớn nhất của nếp nhăn giảm đáng kể có ý nghĩa thống kê (được cải thiện) ($P < 0,05$).

Tỷ lệ giảm lớn nhất về ‘độ sâu trung bình của nếp nhăn’ là 8,36% và tỷ lệ giảm lớn nhất về ‘độ sâu lớn nhất của nếp nhăn’ là 26,17% (bảng 22).

Bảng 22. Kết quả phân tích nếp nhăn ở khóe mắt trước và sau khi sử dụng sản phẩm thử nghiệm theo thời gian (n=32)

Hạng mục	Thời gian đo	Trung bình	S.D	Trị số p†	Tỷ lệ giảm hoặc cải thiện ¹ (%)
Tổng diện tích nếp nhăn (mm ²)	0 Tuần	34,82	6,81	-	-
	4 Tuần	34,68	8,32	0,903	▼ 0,40
	8 Tuần	33,83	7,84	0,377	▼ 2,84
Số lượng nếp nhăn (N)	0 Tuần	65,43	35,01	-	-
	4 Tuần	65,25	34,97	0,976	▼ 0,28
	8 Tuần	65,34	31,97	0,986	▼ 0,14
Chiều dài trung bình của nếp nhăn (mm)	0 Tuần	0,91	0,24	-	-
	4 Tuần	0,91	0,32	0,883	0,00
	8 Tuần	0,93	0,31	0,721	▲ 2,20
Độ sâu trung bình của nếp nhăn (μm)	0 Tuần	80,86	14,67	-	-
	4 Tuần	74,10	15,49	0,009**	▼ 8,36
	8 Tuần	78,97	16,95	0,377	▼ 2,34
Độ sâu lớn nhất của nếp nhăn (μm)	0 Tuần	407,69	151,83	-	-
	4 Tuần	301,01	96,64	0,000***	▼ 26,17
	8 Tuần	330,20	104,30	0,005**	▼ 19,01

†trị số p: Kiểm định t theo cặp (*P<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, sự khác biệt đáng kể so với trước khi dùng sản phẩm)

¹ tỷ lệ giảm hoặc cải thiện: $(W_x - W_0)/W_0 \times 100$, được tính theo trị số trung bình

2-5. Đo độ chặt của lớp hạ bì da

So sánh với trước khi dùng sản phẩm thử nghiệm, 8 tuần sau khi sử dụng sản phẩm, độ dày lớp hạ bì tăng đáng kể có ý nghĩa thống kê (được cải thiện) và 4 tuần và 8 tuần sau khi sử dụng sản phẩm, độ chặt của lớp hạ bì tăng đáng kể có ý nghĩa thống kê (được cải thiện) ($P < 0,05$).

Tỷ lệ tăng lớn nhất về độ dày của lớp hạ bì là 10,16% và tỷ lệ tăng lớn nhất về độ chặt của lớp hạ bì là 13,55% (bảng 23).

Bảng 23. Kết quả phân tích về độ chặt của lớp hạ bì da trước và sau khi sử dụng sản phẩm thử nghiệm theo thời gian ($n=32$)

Hạng mục	Thời gian đo	Trung bình	S.D	Trị số p†	Tỷ lệ giảm hoặc cải thiện ¹ (%)
Khoảng cách (mm)	0 tuần	1,28	0,16	-	-
Khoảng cách (mm)	4 tuần	1,29	0,15	0,569	▲ 0,78
Khoảng cách (mm)	8 tuần	1,41	0,16	0,000***	▲ 10,16
Độ chặt (%)	0 tuần	15,28	1,92	-	-
Độ chặt (%)	4 tuần	16,88	1,66	0,000***	▲ 10,47
Độ chặt (%)	8 tuần	17,35	1,42	0,000***	▲ 13,55

†trị số p: Kiểm định t theo cặp (* $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, sự khác biệt đáng kể so với trước khi dùng sản phẩm)

¹ tỷ lệ giảm hoặc cải thiện: $(W_x - W_0)/W_0 \times 100$, được tính theo trị số trung bình

3. Đánh giá bằng bản điều tra

3-1. Đánh giá hiệu quả bằng bản điều tra

Vào 4 tuần và 8 tuần sau khi sử dụng sản phẩm, kết quả đánh giá về hiệu quả của sản phẩm được các đối tượng trả lời qua bản điều tra như dưới đây (bảng 24).

Bảng 24. Kết quả đánh giá bằng bản điều tra về hiệu quả

Mức độ cải thiện màu sắc da†	4 tuần	3	9,38
	8 tuần	17	53,13
Mức độ cải thiện nếp nhăn trên da†	4 tuần	3	9,38
	8 tuần	9	28,13
1. Làm ẩm da	4 tuần	22	68,75
	8 tuần	29	90,63
2. Làm mềm	4 tuần	27	84,38
	8 tuần	32	100,00
3. Cấu trúc da đúng trật tự	4 tuần	25	78,13
	8 tuần	32	100,00
4. Làm sáng da	4 tuần	22	68,75
	8 tuần	30	93,75
5. Làm sạch da	4 tuần	22	68,75
	8 tuần	30	93,75
6. Làm giảm sự chùng da	4 tuần	19	59,38
	8 tuần	25	78,13
7. Da khỏe	4 tuần	23	71,88
	8 tuần	32	100,00

Các tiêu chí cho bản điều tra†: 0, không thay đổi/ 1, cảm thấy thay đổi nhỏ nhưng không biết thay đổi này / 2, cảm thấy có sự cải thiện một chút / 3, cảm thấy được cải thiện/

4, cải thiện rất nhiều.

- Những người khảo sát trả lời tích cực (%): 3~4

Các tiêu chí cho bản điều tra 1. Không phải toàn bộ / 2. Số / 3. Có vẻ không / 4. Có vẻ có thể / 5. Có thể / 6. Rất có thể.

- Những người khảo sát trả lời tích cực (%): 4~6

3 -2 Đánh giá bằng bản điều tra về tính khả dụng của sản phẩm

8 Tuần sau khi sử dụng sản phẩm, kết quả đánh giá về tính khả dụng cuối của sản phẩm được các đối tượng trả lời thông qua bản điều tra như dưới đây (bảng 25).

Bảng 25. Bản điều tra về tính khả dụng của sản phẩm

Hạng mục	Nước cân bằng		Tinh chất		Kem dưỡng	
Hạng mục	Phản hồi tích cực (N)	Sự hài lòng (%)	Phản hồi tích cực (N)	Sự hài lòng (%)	Phản hồi tích cực (N)	Sự hài lòng (%)
1. Màu sắc của sản phẩm thế nào?	23	71,88	26	81,25	28	87,50
2. Mùi hương của sản phẩm thế nào?	19	59,38	18	56,25	17	53,13
3. Độ bám chắc của sản phẩm thế nào?	18	56,25	23	71,88	20	62,50
4. Tỷ lệ hấp thu sản phẩm thế nào?	21	65,63	24	75,00	24	75,00
5. Mức độ ẩm của da sau khi	18	56,25	30	93,75	26	81,25

hấp thu sản phẩm thể nào?						
6. Bạn có hài lòng về tổng thể sản phẩm không?	28	87,50	29	90,63	27	84,38
7. Bạn có ý định mua sản phẩm nếu có cơ hội không?	24	75,00	29	90,63	25	78,13

4 . Đánh giá về độ an toàn

4 Tuần và 8 tuần sau khi sử dụng sản phẩm, tiến hành đánh giá các kích thích khách quan và chủ quan bởi một người kiểm định bằng cách quan sát tình trạng da của đối tượng.

Trong khoảng thời gian thực hiện kiểm tra này, không nhận thấy phản ứng bất lợi với da ở tất cả các đối tượng (bảng 26).

Bảng 26. Đánh giá độ an toàn: phản ứng bất lợi với da (n=32)

		Cảm giác kích ứng chủ quan							Cảm giác kích ứng khách quan			
Thời gian đo	Triệu chứng	ngứa	đau nhói	làm rát da	làm bong da	ngứa ran	cứng da	căng da	ban đỏ	phù da	da chết	Mụn/ phát ban
4 tuần	Nhẹ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4 tuần	Vừa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4 tuần	Trầm trọng	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8 tuần	Nhẹ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8 tuần	Vừa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8 tuần	Trầm trọng	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Số lượng phản ứng bất lợi (tổng số)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Xác định rằng sản phẩm thử nghiệm theo sáng chế (ba mỹ phẩm) giúp cải thiện độ ẩm da, màu sắc da, độ đàn hồi của da, màu sắc da, nếp nhăn ở khóe mắt, và độ chặt của lớp hạ bì.

Ví dụ điều chế

Ví dụ điều chế 1: Điều chế kẹo chứa dịch ly giải *Lactobacillus plantarum* K8 (*Lactobacillus plantarum* K8-LTA)

Điều chế kẹo chứa dịch ly giải *Lactobacillus plantarum* K8 từ thực vật. Nguyên liệu thô được sử dụng trong điều chế kẹo gồm glucoza tinh chế, dịch ly giải *Lactobacillus plantarum* K8 2,1%, xylitol 2%, vitamin C, bột chiết quả việt quất, axit xitric khan, axit DL-malic, chất tạo hương tổng hợp (hương quả việt quất và hương quả mâm xôi), cỏ ngọt stevia được xử lý bằng enzym, và magie stearat và được nêu trong bảng 27. Tiếp theo, tiến hành thử nghiệm để xác định liệu kẹo được điều chế có chứa isoflavon aglycon không. Ba kẹo thử nghiệm có số lô khác nhau và ba kẹo đối chứng (thể hiện các thành phần trong bảng 27) được chọn, nghiền bằng cối, và sau đó được tạo huyền phù trong nước cất vô trùng. Mẫu kẹo huyền phù được tán vụn bằng máy siêu âm và sau đó chiết bằng cách sử dụng etanol. Trộn lớp etanol với metanol và sau đó tiến hành phân tích LC/MS-MS. Kết quả là, daidzein và genistein là các isoflavon aglycon được tìm thấy từ các kẹo thử nghiệm, nhưng không được tìm thấy trong các kẹo đối chứng (bảng 28).

Bảng 27. So sánh các thành phần của kẹo

	Mẫu	Đối chứng
Tên	Kẹo chứa lợi khuẩn từ thực vật	Kẹo không chứa lợi khuẩn từ thực vật
Nhãn	Mẫu	Đối chứng

Thành phần	Glucoza, Dịch ly giải tế bào <i>L. plantarum</i> K8-LTA 2,1%, Xylitol 2%, Vitamin C, bột quả việt quất cô đặc, axit xitric khan, Axit DL-malic, chất tạo hương tổng hợp (hương quả việt quất, hương quả mâm xôi), Glucosyl Stevia từ cỏ Stevia được biến tính bằng enzym, magie stearat	Glucoza, Xylitol 2%, Vitamin C, bột quả việt quất cô đặc, axit xitric khan, Axit DL-malic, chất tạo hương tổng hợp (hương quả việt quất, hương quả mâm xôi), Glucosyl Stevia từ cỏ Stevia được biến tính bằng enzym, magie stearat
Đặc tính	Kẹo màu hoa cà	Kẹo màu hoa cà
Đóng gói	Vật chứa kín khí màu trắng	Vật chứa kín khí màu trắng
Bảo quản	Nhiệt độ trong phòng	Nhiệt độ trong phòng

Bảng 28. Kết quả đo isoflavon aglycon trong kẹo

	Daidzein†	Genistein†
Kẹo đối chứng	0	0
Kẹo mẫu	0,103 ± 0,064	0,093 ± 0,021

† Hàm lượng isoflavon aglycon trong kẹo: Trung bình ± S.D. (mg/mL)

Ví dụ điều chế 2: Điều chế chất điều hòa đường ruột chứa vi khuẩn sinh axit lactic chứa aglycon hoặc glycosit thủy phân

Lactobacillus plantarum K8 được nuôi cấy với lượng lớn trong môi trường MRS có bổ sung các loại glycosit khác nhau như saponin hoặc isoflavon glycosit theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực này để sản xuất bột vi khuẩn sinh axit lactic thô. Trộn một lượng nhỏ canxi và vitamin D với bột *Lactobacillus plantarum* K8 thô đã được điều chế để tạo ra sản phẩm điều hòa đường ruột. Các kết quả thu được được thể hiện trong bảng 29 dưới đây.

Để tăng cường tác dụng điều hòa đường ruột, bổ sung một lượng nhỏ bột vi khuẩn sinh axit lactic thô khác có tác dụng điều hòa đường ruột, ví dụ, bột vi khuẩn bifidus thô đã biết là tồn tại trong ruột già.

Bảng 29. Các thành phần của tác nhân điều hòa đường ruột chứa *Lactobacillus plantarum* K8

Thành phần	1 gói (% trọng lượng)
<i>Lactobacillus plantarum</i> K8	70
Vitamin D	15
Canxi	15
Tổng	100

Ví dụ điều chế 3: Điều chế thức ăn thô chứa vi khuẩn sinh axit lactic chứa aglycon hoặc glycosit thủy phân

Các loại gồm bột ngũ cốc, bột rong biển, trái cây và bột rau, bột nấm và bột vi khuẩn sinh axit lactic thô theo sáng chế được trộn với bột lên men mầm đậu tương để tạo ra sản phẩm thức ăn thô. Các kết quả thu được được thể hiện trong bảng 30 dưới đây.

Bảng 30. Thức ăn thô chứa *Lactobacillus plantarum* K8

Thành phần	1 gói (% trọng lượng)
Bột lên men mầm đậu tương	25
Bột gạo lức	10
Bột lúa mạch	5
Bột ngô	3
Bột đậu tương	3
Bột ý dĩ	3
Bột vừng	3
Bột đậu đỏ	3
Bột cỏ	5

Bột rong biển	8
Bột tảo biển	12
Bột cải xoăn	5
Bột lô hội	3
Bột cà rốt	2
Bột nấm hương	4
Bột nấm linh chi	4
<i>Lactobacillus plantarum</i> K8	2
Tổng	100

Ví dụ điều chế 4: Điều chế sữa lên men chứa vi khuẩn sinh axit lactic chứa aglycon hoặc glycosit thủy phân

Sữa tách kem hoặc sữa thô được trộn với dung dịch nuôi cấy 1% trong đó *Lactobacillus plantarum* K8 theo sáng chế đã được nuôi cấy trước và lên men trong 6 đến 8 giờ ở 40°C để tạo ra sữa lên men. Các kết quả thu được được thể hiện trong bảng 31 dưới đây. Khi lên men sữa tách kem hoặc sữa thô, để rút ngắn thời gian lên men và cải thiện mùi thơm của sữa lên men, *Streptococcus thermophilus* hoặc *Lactobacillus acidophilus*, có bán trên thị trường, có thể được sử dụng đồng thời.

Bảng 31. Các thành phần của sữa lên men bao gồm vi khuẩn sinh axit lactic chứa aglycon hoặc glycosit thủy phân

Thành phần	1 gói (% trọng lượng)
Sữa khô không chứa chất béo	95
Oligosacarit	4
Vi khuẩn sinh axit lactic chứa aglycon hoặc glycosit thủy phân-	1
Tổng	100

Ví dụ điều chế 6: Điều chế nước đậu tương lên men bằng cách sử dụng *Lactobacillus plantarum* K8

Nước đậu tương được trộn với dung dịch nuôi cấy 1% trong đó *Lactobacillus plantarum* K8 theo sáng chế đã được nuôi cấy trước và lên men trong 6 đến 8 giờ ở 40°C để tạo ra nước đậu tương lên men. Các kết quả thu được được thể hiện trong bảng 32 dưới đây. Khi lên men nước đậu tương, để rút ngắn thời gian lên men và cải thiện mùi thơm của sữa lên men, *Streptococcus thermophilus* hoặc *Lactobacillus acidophilus*, có bán trên thị trường, có thể được sử dụng đồng thời.

Bảng 32. Thành phần của nước đậu tương lên men chứa *Lactobacillus plantarum* K8

Thành phần	1 gói (% trọng lượng)
Nước đậu tương	90
Oligosacarit	9
<i>Lactobacillus plantarum</i> K8	1
Tổng	100

Ví dụ điều chế 7: Điều chế vi khuẩn sinh axit lactic chứa chiết xuất nhân sâm đỏ

Lactobacillus plantarum K8 theo sáng chế được nuôi cấy trong 100L môi trường tối thiểu chứa chiết xuất nhân sâm 0,1% trong 12 giờ và sau đó thu gom tế bào. Tế bào sau khi thu gom được rửa bằng nước và sau đó đông khô và đưa vào vi nang để tạo ra vi khuẩn sinh axit lactic chứa chiết xuất nhân sâm đỏ. Vi nang có thể cải thiện độ bám dính và độ kết dính bằng cách xem xét đến điều kiện bổ sung chất làm dẻo, một loại chất làm dẻo, và sức căng bề mặt của viên nang khi nền được tạo ra bằng vật liệu bao và chất lỏng làm đông tụ. Bởi vì mặt ngoài và mặt trong của nang tạo sự gelatin hóa cứng, tỷ lệ sống của vi khuẩn sinh axit lactic trong môi trường axit của dạ dày tăng và viên nang chứa vi khuẩn sinh axit lactic có hoạt tính cao trong ruột được tạo ra. Na alginat 1,8%, glyxerol 10%, gôm xanthan 0,32%, Tween 20 0,05%, và MRS 5% được sử dụng làm dung dịch lớp bao nang phụ, CaCl₂ 0,5M và Tween 80 0,5% được sử dụng làm dung dịch hóa cứng, và chitosan 1,5% và axit lactic 1,5% được sử dụng làm dung dịch lớp bao nang chính. Qua thử nghiệm này, xác nhận rằng viên nang vi khuẩn sinh axit lactic chứa nhân sâm đỏ được tạo ra với điều kiện này được hòa tan trong dịch ruột nhân tạo ở tại độ pH 7,4. Hơn nữa, đối với thử

nghiệm kháng axit, viên nang vi khuẩn sinh axit lactic chứa nhân sâm phản ứng với dịch dạ dày nhân tạo ở độ pH 1,4 đến 180 phút tại các khoảng thời gian và sau đó được giải phóng từ dịch ruột nhân tạo và đếm số lượng tế bào sống, và kết quả là, tỷ lệ sống trong dịch dạ dày nhân tạo là 95%.

Theo phương pháp điều chế theo sáng chế, nhờ vi sinh vật có khả năng chuyển hóa glycosit thành aglycon hoặc glycosit thủy phân và khả năng tích tụ aglycon hoặc glycosit thủy phân được chuyển hóa trong tế bào, có thể sản xuất vi sinh vật có khả năng sản sinh aglycon hoặc glycosit thủy phân với nồng độ cao. Hơn nữa, tế bào vi sinh vật có thể sống được hoặc dịch ly giải của nó chứa aglycon hoặc glycosit thủy phân được tạo ra bằng phương pháp điều chế theo sáng chế được tạo ra và có thể được sử dụng theo nhiều cách khác nhau để điều chế chế phẩm chống oxy hóa, tác nhân điều hòa đường ruột, chế phẩm lợi khuẩn, chất bổ trợ cho thức ăn, chất bổ trợ cho thực phẩm, nguyên liệu thô cho mỹ phẩm và các sản phẩm lên men khác.

Mặc dù phần cụ thể của sáng chế đã được là chi tiết, sẽ là hiển nhiên đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực rằng phần cụ thể này chỉ là phương án ưu tiên và phạm vi của sáng chế không bị giới hạn ở phần cụ thể đó. Do đó, phạm vi thực chất của sáng chế sẽ được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo và dạng tương đương của nó.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sản xuất chế phẩm vi sinh vật thể hiện tỷ lệ hấp thu ginsenosit chuyển hóa trong cơ thể ở mức cao, trong đó ginsenosit chuyển hóa được tích tụ trong tế bào, phương pháp này bao gồm bước tích tụ ginsenosit chuyển hóa trong vi sinh vật bằng cách nuôi cấy vi sinh vật biểu hiện β -glycosidaza trong môi trường chứa chiết xuất nhân sâm, trong đó nồng độ của ginsenosit chuyển hóa tích tụ trong tế bào vi sinh vật cao hơn nhiều hơn hai lần so với nồng độ của ginsenosit chuyển hóa trong môi trường.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ginsenosit chuyển hóa được chọn từ nhóm gồm có rg3, rc, và f2, và chiết xuất nhân sâm bao gồm một hoặc nhiều ginsenosit được chọn từ nhóm gồm có rg1 và rb 1.
3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó, vi sinh vật biểu hiện β -glycosidaza là một hoặc nhiều vi sinh vật được chọn từ nhóm gồm vi khuẩn sinh axit lactic, bifidus, nấm men, corynebacterium, aspergillus và clostridium.
4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó vi khuẩn sinh axit lactic là một hoặc nhiều vi khuẩn được chọn từ nhóm gồm *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. rhamnosus* GG, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei* và *L. gasseri*.
5. Phương pháp theo điểm 3, trong đó vi khuẩn sinh axit lactic là *Lactobacillus plantarum* K8 (số nộp lưu: KCTC 10887BP).
6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó, vi sinh vật sản sinh β -glycosidaza là một hoặc nhiều vi sinh vật được chọn từ nhóm gồm vi sinh vật được thừa nhận chung là an toàn (generally recognized as safe - GRAS), bifidus, nấm men, *Bacillus licheniformis*, *S. thermophilus*, *L. casei*, *Streptomyces* sp. *Bifidobacteria*, *Lactobacillus delbrueckii* Rh2, *Sporosarcina* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Pyrococcus furiosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Aspergillus ochraceus*, *Lactobacillus delbrueckii* Rh2, *Pseudomonas* sp., *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Aspergillus sojae*, *Cunninghamella blakesleeana*, *Cifidobacteria* và *Lactobacillus*, vi khuẩn sinh axit lactic, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Penicillium melinii*, *Eubacterium ramulus*, *Clostridium orbiscindens*, *Aspergillus awamori*, *Lactobacillus brevis*, *Aspergillus*

parasiticus speare BGB, Aspergillus aculeatus, và Aspergillus niger.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc nuôi cấy vi sinh vật bao gồm bước nuôi cấy tĩnh để hoạt hóa vi sinh vật, nuôi cấy lắc, và nuôi cấy có bổ sung nguyên liệu nạp theo thứ tự.
8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó bước nuôi cấy tĩnh được tiến hành trong 12 giờ ở 37°C.
9. Phương pháp theo điểm 7, trong đó bước nuôi cấy lắc được tiến hành trong điều kiện 6 vòng/phút trong 12 giờ ở 37°C.
10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó việc nuôi cấy còn bao gồm việc nuôi cấy và sau đó nuôi cấy vi sinh vật trong môi trường, tiếp theo chuyển sang môi trường tối thiểu chứa glycosit và sau đó tiếp tục nuôi cấy vi sinh vật trong 1 đến 36 giờ nữa.

Fig. 1

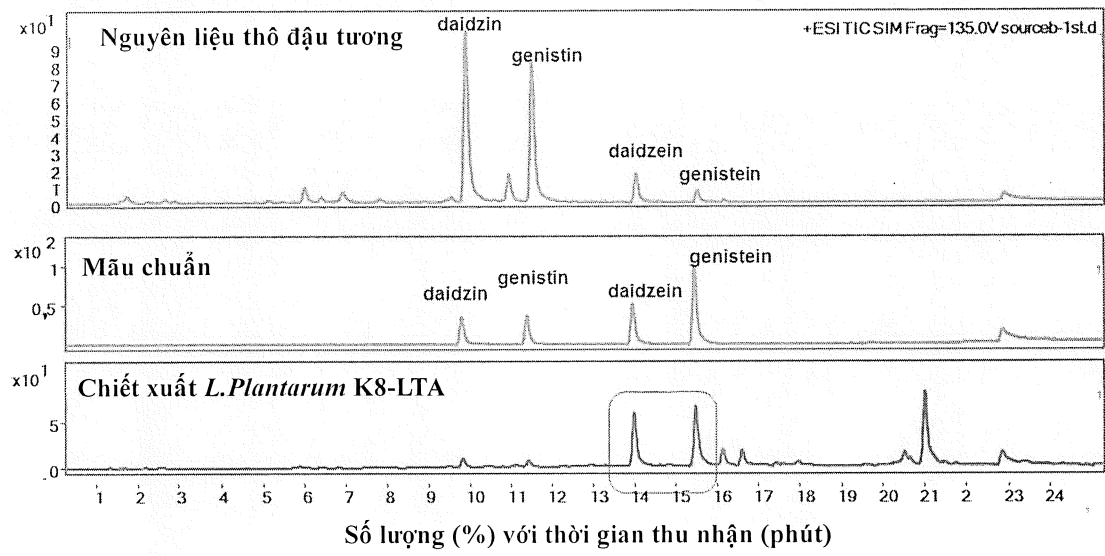


Fig. 2

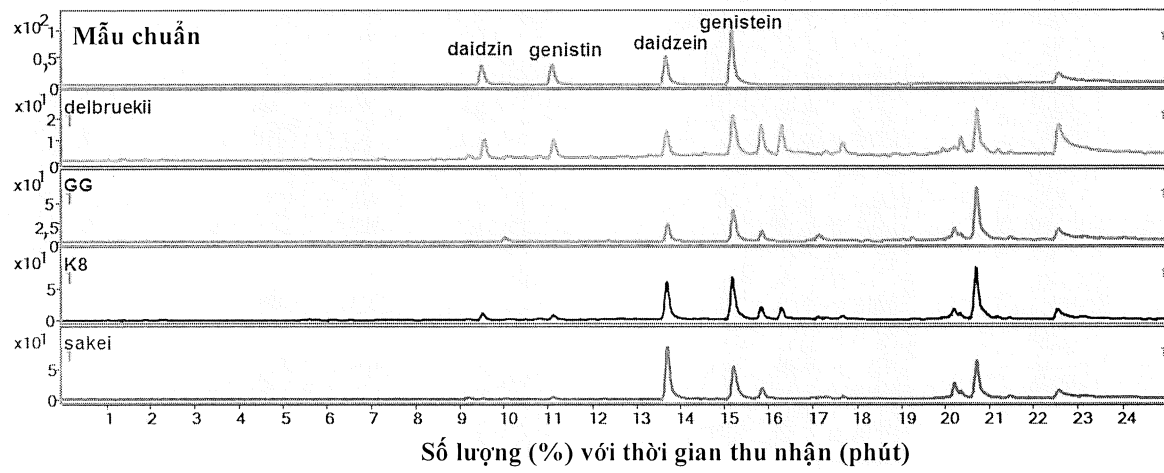


Fig. 3

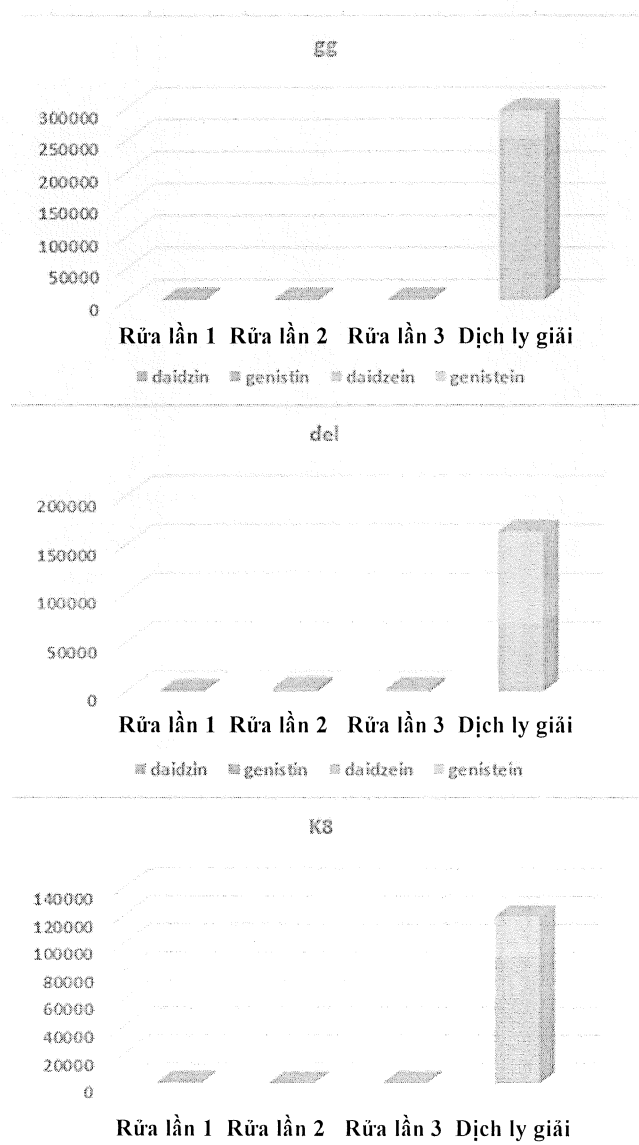


Fig. 4

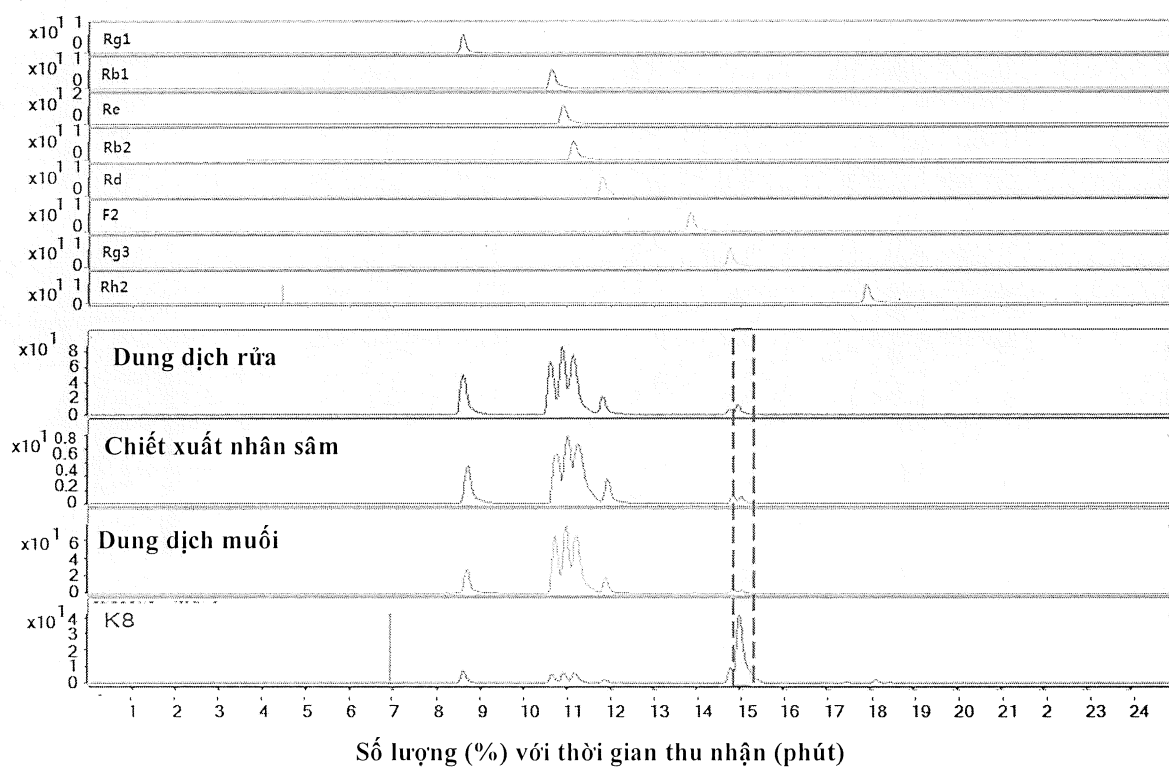


Fig. 5

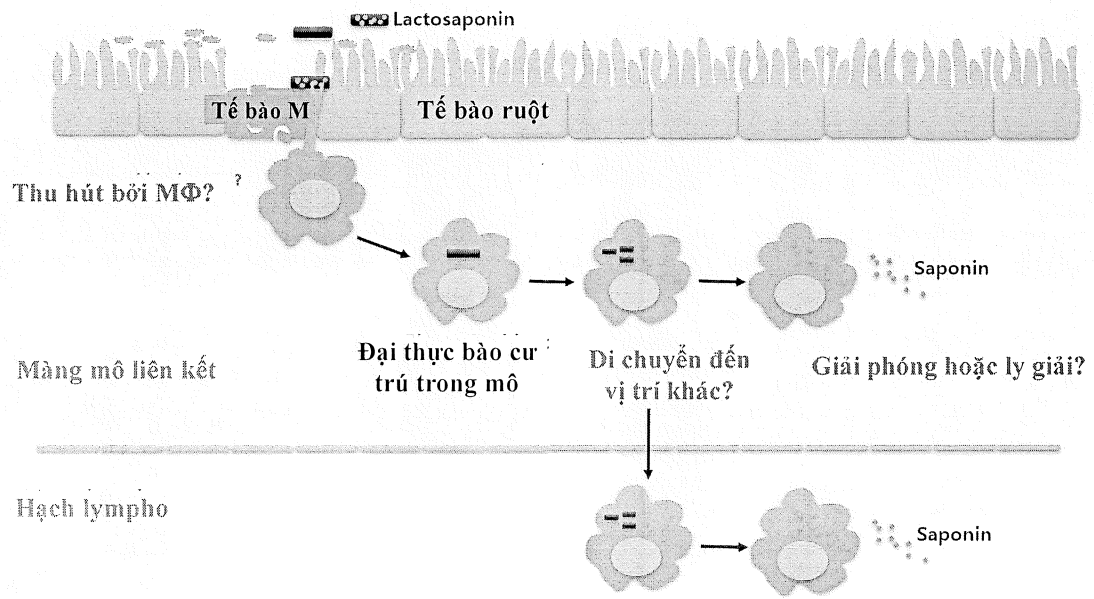


Fig. 6

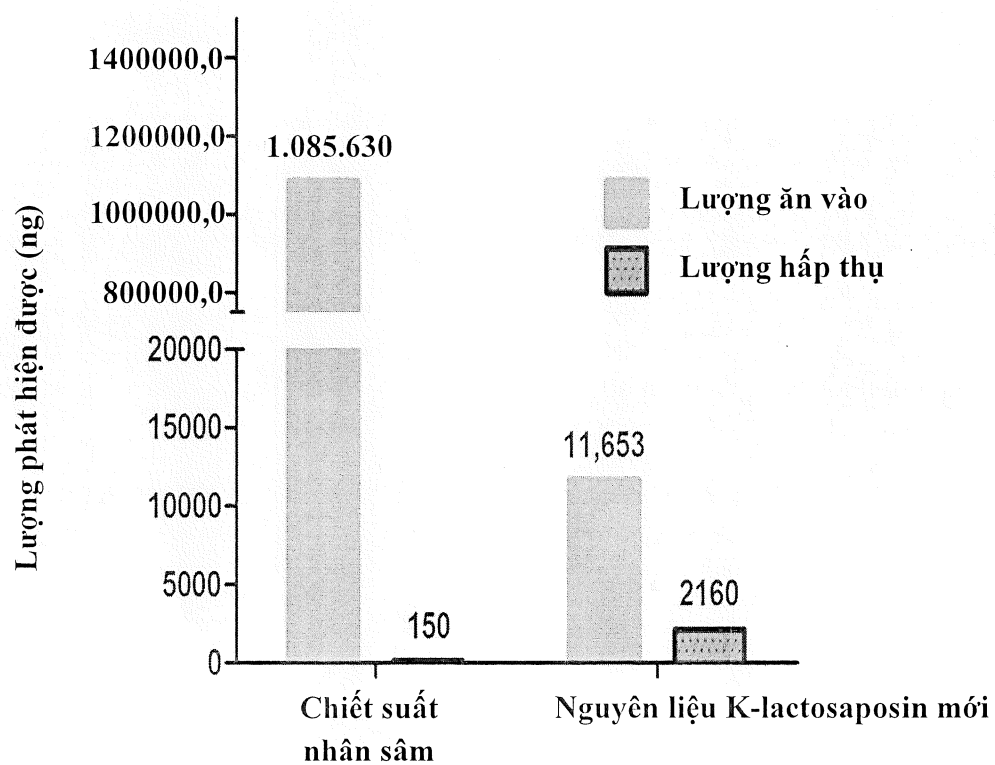


Fig. 7

