



(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)



1-0039283

(51)⁷ C12N 1/16; A23L 33/14; A23L 33/175; (13) B
A61K 8/44; A61K 8/64; C12R 1/645;
A61Q 19/00; A61Q 19/08; C07D
207/16; C12P 13/24; A23L 31/10; A61K
8/99

(21) 1-2018-05635

(22) 11/05/2017

(86) PCT/JP2017/017937 11/05/2017

(87) WO 2017/195873 16/11/2017

(30) 2016-096567 12/05/2016 JP

(45) 25/04/2024 433

(43) 25/04/2019 373A

(73) SUNTORY HOLDINGS LIMITED (JP)

1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 5308203, Japan

(72) NARITA, Yukihiko (JP); FUKUI, Yuko (JP); MATSUOKA, Tatsuo (JP); OGAWA, Jun (JP); HIBI, Makoto (JP).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) TẾ BÀO HOẶC GIỐNG CÂY TẾ BÀO NẤM MEN *YARROWIA LIPOLYTICA* HOẶC CHIẾT PHẨM CỦA NÓ CHỨA L-HYDROXYPROLIN, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT L-HYDROXYPROLIN, VÀ CHẾ PHẨM TĂNG CƯỜNG L-HYDROXYPROLIN

(57) Sáng chế đề cập đến tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin, trong đó tỷ lệ của lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-hydroxyprolin trên tổng lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-prolin (Pro) và L-hydroxyprolin (Hyp) như được xác định theo công thức $(100 \times \text{Hyp}/(\text{Pro} + \text{Hyp}))$ nằm trong khoảng từ 35 đến 100. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin và chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin, và phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin. Sáng chế cũng đề cập đến thực phẩm hoặc đồ uống, mỹ phẩm, nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm và chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin, mỗi chế phẩm này đều chứa tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

L-hydroxyprolin (hydroxy-L-prolin) là axit amin gồm có L-prolin với nhóm hydroxy gắn vào nguyên tử cacbon ở vị trí 4. Tác dụng có lợi của L-hydroxyprolin bao gồm thúc đẩy sự tạo collagen trong nguyên bào sợi, thúc đẩy sự sinh trưởng của tế bào biểu bì, tác dụng giữ ẩm cao hơn hoặc tương đương tác dụng của giữ ẩm collagen, chống lão hóa cho da, độ hấp thụ qua da cao hơn so với tripeptit, tác dụng giảm nếp nhăn và tác dụng giảm viêm da do dị ứng. L-hydroxyprolin an toàn đối với cơ thể người và có thể dùng trong thực phẩm hoặc đồ uống, mỹ phẩm, thuốc và các sản phẩm khác. Vì vậy, L-hydroxyprolin rất có lợi.

Mặc dù L-hydroxyprolin có thể được sản xuất bằng các phương pháp tổng hợp hữu cơ, nhưng các phương pháp sản xuất bằng cách sử dụng vi sinh vật cũng đã được nghiên cứu. Ví dụ, tài liệu sáng chế 1 bộc lộ phương pháp sản xuất cis-4-hydroxy-L-prolin bao gồm bước đưa polynucleotit mã hóa L-prolin cis-4-hydroxylaza có nguồn gốc từ *Mesorhizobium loti* vào tế bào chủ, nuôi cấy thể biến nạp thu được trong môi trường để nó sản xuất và tích lũy cis-4-hydroxy-L-prolin trong giống cây và thu hồi cis-4-hydroxy-L-prolin từ giống cây này.

Danh mục tài liệu trích dẫn

Tài liệu sáng chế

Tài liệu sáng chế 1: JP 5506668 B

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Vấn đề kỹ thuật

Nấm men là vi sinh vật đã được sử dụng từ lâu trong nhiều ứng dụng công nghiệp khác nhau trong lĩnh vực thực phẩm và đồ uống. Tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó mà có chứa L-hydroxyprolin có thể hữu dụng để làm nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống và các sản phẩm khác mà được dự đoán là sẽ thể hiện các tác dụng có lợi của L-hydroxyprolin. Tuy nhiên, nấm men tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cấy tế bào của nó vẫn còn chưa được báo cáo.

Mục đích chính của sáng chế là đề xuất tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin, việc ứng dụng nó và phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin.

Giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã thực hiện các nghiên cứu sâu để giải quyết vấn đề nêu trên và đã phát hiện ra rằng nấm men *Yarrowia lipolytica* tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cấy tế bào của nó khi được nuôi cấy hiếu khí. Các tác giả sáng chế cũng phát hiện ra rằng trong tế bào hoặc giống cấy tế bào *Yarrowia lipolytica* thu được hoặc chiết phẩm thu được của nó mà chứa L-hydroxyprolin, tỷ lệ của lượng L-hydroxyprolin trên tổng lượng L-prolin (Pro) và L-hydroxyprolin (Hyp) như được xác định bởi công thức $(100 \times \text{Hyp}/(\text{Pro} + \text{Hyp}))$ có thể nằm trong khoảng giá trị cụ thể. Các tác giả sáng chế cũng đã thực hiện các nghiên cứu sâu hơn dựa vào các phát hiện này để tạo ra sáng chế.

Tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế là tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* hoặc chiết phẩm của nó mà có chứa L-hydroxyprolin, trong đó tỷ lệ của lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-hydroxyprolin trên tổng lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-prolin (Pro) và L-hydroxyprolin (Hyp) như được xác định bởi công thức $(100 \times \text{Hyp}/(\text{Pro} + \text{Hyp}))$ nằm trong khoảng từ 35 đến 100.

Tốt hơn là, lượng L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế bằng $10 \mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn.

Tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo một khía

cạnh khác của sáng chế là tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* hoặc chiết phẩm của nó mà có chứa L-hydroxyprolin với lượng bằng 10 µg/mL hoặc lớn hơn.

Phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin theo sáng chế bao gồm bước tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* bằng cách nuôi cấy hiếu khí nấm men trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ, trong đó nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin.

Trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, tốt hơn là peptit chứa L-hydroxyprolin là peptit collagen. Tốt hơn là peptit collagen có phân tử lượng trung bình nằm trong khoảng từ 1000 đến 10000.

Trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, tốt hơn là bước nuôi cấy hiếu khí được thực hiện trong khoảng thời gian từ 10 đến 100 giờ.

Sáng chế bao gồm việc sử dụng *Yarrowia lipolytica* để sản xuất L-hydroxyprolin.

Tốt hơn là, việc sử dụng theo sáng chế bao gồm bước tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* bằng cách nuôi cấy hiếu khí nấm men trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ, trong đó tốt hơn là nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin.

Khi sử dụng theo sáng chế, tốt hơn là peptit chứa L-hydroxyprolin là peptit collagen. Tốt hơn là, peptit collagen có phân tử lượng trung bình nằm trong khoảng từ 1000 đến 10000.

Khi sử dụng theo sáng chế, tốt hơn là bước nuôi cấy hiếu khí được thực hiện trong khoảng thời gian từ 10 đến 100 giờ.

Chế phẩm theo sáng chế chứa tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế.

Thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế chứa tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế.

Mỹ phẩm hoặc nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm theo sáng chế chứa tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế.

Tốt hơn là, mỹ phẩm hoặc nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm theo sáng chế được dùng trong ứng dụng được chọn trong số thúc đẩy sự tạo collagen, thúc đẩy sự sinh trưởng của tế bào biểu bì, giữ ẩm cho da, chống lão hóa cho da, ngăn hoặc giảm sự chảy xệ của da, cải thiện độ săn chắc của da, ngăn hoặc giảm nếp nhăn và giảm viêm da do dị ứng.

Theo một phương án, mỹ phẩm hoặc nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm theo sáng chế tốt hơn là nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm và lượng L-hydroxyprolin trong nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm tốt hơn là nằm trong khoảng từ 5 đến 300 phần triệu.

Mỹ phẩm hoặc nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm theo sáng chế tốt hơn là mỹ phẩm và lượng L-hydroxyprolin trong mỹ phẩm tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,01 đến 20 phần triệu. Phần triệu (ppm) nghĩa là phần triệu theo khối lượng.

Chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin theo sáng chế chứa tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* hoặc chiết phẩm của nó mà có chứa L-hydroxyprolin.

Trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó trong chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin theo sáng chế, tốt hơn là tỷ lệ của lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-hydroxyprolin trên tổng lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-prolin (Pro) và L-hydroxyprolin (Hyp) như được xác định theo công thức $(100 \times \text{Hyp}/(\text{Pro} + \text{Hyp}))$ nằm trong khoảng từ 35 đến 100. Tốt hơn là, lượng L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó bằng 10 $\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn.

Hiệu quả có lợi của sáng chế

Sáng chế có thể tạo ra tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó mà có chứa L-hydroxyprolin, ứng dụng của nó và phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin. Tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế thích hợp để sử dụng làm nguyên liệu thô dùng cho thực phẩm hoặc đồ uống, mỹ phẩm và các sản phẩm khác.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện biểu đồ tích lũy L-hydroxyprolin (Hyp) trong nấm men.

Fig.2 thể hiện biểu đồ tích lũy Hyp trong *Yarrowia lipolytica* được nuôi cấy

trong các môi trường khác nhau ((a): Điều kiện 1, (b): Điều kiện 2).

Fig.3 thể hiện biểu đồ tích lũy Hyp trong *Yarrowia lipolytica* được nuôi cấy trong 5 ngày trong môi trường PD hoặc môi trường PD được bổ sung 0,125% gelatin (cột màu trắng: Môi trường PD chứa 0,125% gelatin, cột màu đen: Môi trường PD).

Fig.4 thể hiện các biểu đồ tích lũy Hyp trong *Yarrowia lipolytica* được nuôi cấy trong các môi trường YPD có các thành phần khác nhau ((a): Tích lũy Hyp ($\mu\text{g/mL}$), (b): Lượng Hyp trong mỗi tế bào ($\mu\text{g/mL/OD600}$)).

Fig.5 thể hiện các biểu đồ tích lũy Hyp, lượng Hyb trong mỗi tế bào và OD600 của *Yarrowia lipolytica* được nuôi cấy trong các môi trường chứa pepton hoặc peptit collagen ((a): Tích lũy Hyp ($\mu\text{g/mL}$), (b): Lượng Hyp trong mỗi tế bào ($\mu\text{g/mL/OD600}$), (c): OD600).

Fig.6 thể hiện các biểu đồ tích lũy Hyp trong *Yarrowia lipolytica* được nuôi cấy trong điều kiện lắc hoặc được nuôi cấy trong điều kiện tĩnh ((a): Lượng Hyp trong mẫu môi trường nuôi cấy (trong tế bào) tính theo lượng trên môi trường, (b): Lượng Hyp trong chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy).

Fig.7 thể hiện các biểu đồ của nồng độ etanol và nồng độ glucoza trong chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy của *Yarrowia lipolytica* được nuôi cấy trong điều kiện lắc hoặc được nuôi cấy trong điều kiện tĩnh ((a): nồng độ etanol (% thể tích), (b): nồng độ glucoza (% khối lượng)).

Fig.8 thể hiện các đồ thị HPLC thu được bằng cách phân tích dung dịch axit clohydric 0,1 N chứa dung dịch chuẩn của hỗn hợp các axit amin, hydroxyprolin kiểu H và L (nồng độ của mỗi axit amin: 20 $\mu\text{mol/L}$) ((a): được phát hiện bằng Ch1 ở bước sóng kích thích là 350 nm và bước sóng phát huỳnh quang là 450 nm, (b): được phát hiện bằng Ch2 ở bước sóng kích thích là 266 nm và bước sóng phát huỳnh quang là 305 nm).

Mô tả chi tiết sáng chế

Trong phần dưới đây, các phương án của sáng chế sẽ được mô tả chi tiết. Tuy nhiên, sáng chế không bị giới hạn ở các phương án này và các cải biến thích hợp có thể được thực hiện mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế.

Trong bản mô tả này, các chi và loài nấm men được gọi bằng các tên chi và

loài trong ấn phẩm "The Yeasts, Taxonomic Study", xuất bản lần thứ 5 (Elsevier, 2011).

Tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế là tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* hoặc chiết phẩm của nó mà có chứa L-hydroxyprolin, trong đó tỷ lệ của lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-hydroxyprolin trên tổng lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-prolin (Pro) và L-hydroxyprolin (Hyp) như được xác định theo công thức $(100 \times \text{Hyp}/(\text{Pro} + \text{Hyp}))$ nằm trong khoảng từ 35 đến 100.

Tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo khía cạnh thứ hai của sáng chế là tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* hoặc chiết phẩm của nó mà có chứa L-hydroxyprolin với lượng bằng 10 $\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn.

Sau đây, tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế và tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo khía cạnh thứ hai của sáng chế cũng có thể được gọi chung là tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế.

Tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế là tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* hoặc chiết phẩm của nó.

Nấm men theo sáng chế có thể là nấm men bất kỳ thuộc *Yarrowia lipolytica*. Một hoặc hai hoặc nhiều nấm men có thể được sử dụng.

Yarrowia lipolytica có thể mua được từ các kho chứa khác nhau. Ví dụ về kho chứa bao gồm National Institute of Technology and Evaluation (2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba, Japan). Nó có thể được phân lập từ tự nhiên.

Tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế chứa L-hydroxyprolin (Hyp). L-hydroxyprolin theo sáng chế là 4-hydroxy-L-prolin. Trong bản mô tả này, L-hydroxyprolin chứa trong tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó là L-hydroxyprolin tự do. Lượng L-hydroxyprolin hoặc sự tích lũy của L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó là lượng L-hydroxyprolin tự do. Nấm men tích lũy L-hydroxyprolin tự do trong tế bào hoặc giống cấy tế bào của nó vẫn chưa được báo cáo.

Trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế, tỷ lệ của lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-hydroxyprolin trên tổng lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-prolin (Pro) và L-hydroxyprolin (Hyp) như được xác định theo công thức ($100 \times \text{Hyp}/(\text{Pro} + \text{Hyp})$) nằm trong khoảng từ 35 đến 100. Tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của này nó thích hợp để sử dụng làm nguyên liệu thô dùng cho thực phẩm hoặc đồ uống, mỹ phẩm và các sản phẩm khác mà được dự kiến là sẽ thể hiện các tác dụng có lợi của L-hydroxyprolin. Sau đây thuật ngữ "tỷ lệ của lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-hydroxyprolin trên tổng lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-prolin (Pro) và L-hydroxyprolin (Hyp) như được xác định theo công thức ($100 \times \text{Hyp}/(\text{Pro} + \text{Hyp})$)" cũng có thể được gọi là "tỷ lệ Hyp/(Pro + Hyp)". Lượng L-prolin trong tỷ lệ Hyp/(Pro + Hyp) là lượng L-prolin tự do chứa trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó.

Theo một phương án ưu tiên, tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo khía cạnh thứ hai của sáng chế có tỷ lệ Hyp/(Pro + Hyp) nằm trong khoảng từ 35 đến 100.

Tốt hơn là, tỷ lệ Hyp/(Pro + Hyp) nằm trong khoảng từ 40 đến 100, tốt hơn nữa là từ 50 đến 100, tốt hơn nữa là từ 60 đến 100, còn tốt hơn nữa là từ 70 đến 100, còn tốt hơn nữa là từ 80 đến 100, đặc biệt tốt hơn là từ 90 đến 100. Tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó với tỷ lệ Hyp/(Pro + Hyp) như vậy có hàm lượng Hyp cao và vì vậy đặc biệt thích hợp để sử dụng làm nguyên liệu thô dùng cho thực phẩm hoặc đồ uống, mỹ phẩm và các sản phẩm khác mà được dự kiến là sẽ thể hiện các tác dụng có lợi của L-hydroxyprolin.

Trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo khía cạnh thứ hai của sáng chế, lượng L-hydroxyprolin bằng $10 \mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn.

Tốt hơn là, lượng L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế bằng $10 \mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn. Tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó mà có chứa L-hydroxyprolin với lượng nằm trong khoảng giá trị nêu trên thích hợp để sử dụng làm nguyên liệu thô dùng cho thực phẩm hoặc đồ uống, mỹ phẩm và các sản phẩm khác mà được dự kiến là sẽ thể hiện các tác dụng có lợi của L-hydroxyprolin.

Tốt hơn nữa là, lượng L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm

men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế bằng 15 $\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 17 $\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 20 $\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 30 $\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 40 $\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 50 $\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 70 $\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 100 $\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, tốt hơn nữa là 150 $\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn là 200 $\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn là 250 $\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn là 300 $\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn là 400 $\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn là 450 $\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, đặc biệt tốt hơn là 475 $\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn, tốt nhất là 500 $\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn.

Giới hạn trên của lượng L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó không bị giới hạn. Tốt hơn là, lượng này là lớn nhất có thể, nhưng thường bằng 6000 $\mu\text{g/mL}$ hoặc nhỏ hơn và có thể bằng 3000 $\mu\text{g/mL}$ hoặc nhỏ hơn hoặc 2000 $\mu\text{g/mL}$ hoặc nhỏ hơn.

Sáng chế giúp có thể tạo ra tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó, trong đó lượng L-hydroxyprolin có nguồn gốc từ tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men nằm trong khoảng nêu trên.

Lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-prolin và lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó có thể được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (high performance liquid chromatography: HPLC). Trong các trường hợp trong đó tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa tế bào thì tế bào này bị phân hủy bằng cách, ví dụ, tự phá vỡ dưới tác dụng của nhiệt hoặc phá vỡ bằng enzym và các thành phần tế bào được giải phóng được dùng để đo lượng L-prolin và L-hydroxyprolin. Để đo lượng L-prolin và L-hydroxyprolin và phân tích HPLC thì các phương pháp và điều kiện được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế có thể được sử dụng. Tốt hơn là L-prolin và L-hydroxyprolin được định lượng bằng phương pháp (1) bao gồm bước tạo dẫn xuất axit amin bằng o-phthalaldehyt (OPA) và 4-clo-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) theo thứ tự và thực hiện phân tích HPLC (phát hiện ở bước sóng kích thích là 503 nm/bước sóng phát huỳnh quang là 541 nm) hoặc phương pháp (2) bao gồm bước tạo dẫn xuất nhóm amin bậc một với axit mercaptopropionic và OPA, sau đó tạo dẫn xuất axit amin bậc hai với 9-florenylmetyl cloroformat (FMOC) và thực hiện phân tích HPLC (phát hiện ở bước sóng kích thích là 266 nm và bước sóng phát huỳnh quang là 305 nm). Tốt hơn nữa là

L-prolin và L-hydroxyprolin được định lượng bằng phương pháp (2).

Tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế có thể thu được bằng cách nuôi cấy hiếu khí *Yarrowia lipolytica* trong môi trường lỏng và tùy ý thực hiện xử lý như phá vỡ tế bào.

Tốt hơn là, giống cây tế bào nấm men chứa tế bào nấm men và/hoặc chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy và có thể chứa các thành phần của tế bào nấm men. Tế bào nấm men có thể là tế bào sống hoặc tế bào chết. Ví dụ về giống cây tế bào chứa tế bào nấm men và/hoặc chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy bao gồm canh trường nuôi cấy tế bào chứa tế bào nấm men (tế bào được nuôi cấy) và chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy thu được bằng cách nuôi cấy hiếu khí nấm men; tế bào nấm men thu được từ canh trường nuôi cấy tế bào; và chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy thu được bằng cách loại bỏ tế bào ra khỏi canh trường nuôi cấy tế bào. Chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy của canh trường nuôi cấy tế bào được gọi đơn giản là chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy. Tốt hơn là, giống cây tế bào là canh trường nuôi cấy tế bào chứa tế bào nấm men và chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy hoặc chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy.

Chiết phẩm của tế bào hoặc giống cây tế bào thường chứa các thành phần tế bào, tốt hơn là chứa các thành phần tế bào và chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy. Ví dụ về chiết phẩm của tế bào hoặc giống cây tế bào bao gồm chiết phẩm (sản phẩm phá vỡ tế bào) thu được bằng cách cho tế bào hoặc giống cây tế bào (tốt hơn là canh trường nuôi cấy tế bào) chứa tế bào qua bước xử lý phá vỡ tế bào (ví dụ, xử lý tự phá vỡ hoặc xử lý phá vỡ bằng enzym) để giải phóng các thành phần của tế bào nấm men vào canh trường nuôi cấy hoặc môi trường tương tự; và chiết phẩm thu được bằng cách loại bỏ cặn tế bào ra khỏi tế bào hoặc giống cây tế bào đã được xử lý phá vỡ tế bào (sản phẩm phá vỡ tế bào). Được ưu tiên là canh trường nuôi cấy tế bào đã được xử lý phá vỡ tế bào (sản phẩm phá vỡ tế bào) hoặc chiết phẩm chứa các thành phần tế bào và chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy thu được bằng cách loại bỏ cặn tế bào ra khỏi sản phẩm phá vỡ tế bào.

Như được mô tả ở trên, tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế thường được tạo ra bằng cách nuôi cấy hiếu khí *Yarrowia lipolytica* trong môi trường lỏng và tùy ý cho canh trường nuôi cấy tế bào chứa tế bào nấm men thu được và chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy đi qua bước xử lý như thu thập và

phá vỡ tế bào.

Tốt hơn là, L-hydroxyprolin chứa trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế có nguồn gốc từ tế bào hoặc giống cây tế bào thu được bằng cách nuôi cấy hiếu khí. Tốt hơn là, L-hydroxyprolin chứa trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế gần như không có trước khi nuôi cấy hiếu khí.

Tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế thích hợp để làm, ví dụ, nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống bao gồm đồ uống có cồn và các sản phẩm khác.

Trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế, tốt hơn là lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-hydroxyprolin chia cho OD600 ($\mu\text{g/mL/OD600}$) bằng 0,5 hoặc cao hơn. Sau đây, lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-hydroxyprolin chia cho OD600 ($\mu\text{g/mL/OD600}$) cũng có thể được gọi là trị số Hyp/OD600. Trị số Hyp/OD600 càng cao hơn chỉ báo lượng L-hydroxyprolin trong mỗi tế bào càng lớn. Vì vậy, Hyp/OD600 càng cao càng tốt. Trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó thì giới hạn trên của trị số Hyp/OD600 không bị giới hạn. Trị số này tốt hơn là cao nhất có thể, nhưng thường bằng 300 hoặc nhỏ hơn. Tốt hơn nữa là trị số Hyp/OD600 bằng 1 hoặc cao hơn, tốt hơn là, ví dụ, 1 đến 150. Tốt hơn nữa là trị số Hyp/OD600 bằng 25 hoặc cao hơn, tốt hơn nữa là bằng 50 hoặc cao hơn.

OD là mật độ quang. OD chỉ ra nồng độ tế bào. Thông thường, độ hấp thụ ánh sáng nhìn thấy OD600 hoặc OD660 ở bước sóng 600 nm hoặc 660 nm được đo (Baio Jikken Irasutoreiteddo 7 Tsukao Kobo Dekiru Two-hybrid (Biological Experiment Illustrated 7, Guide for use of yeast and two-hybrid system), công bố bởi Shujunsya, 2003).

OD600 dùng để tính trị số Hyp/OD600 là độ hấp thụ ở bước sóng 600 nm của canh trường nuôi cấy tế bào chứa tế bào và chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy (giống cây tế bào chứa tế bào và chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy) dùng để thu được tế bào hoặc giống cây tế bào hoặc chiết phẩm của nó.

Cụ thể là, trong các trường hợp trong đó canh trường nuôi cấy tế bào nấm men thu được bằng cách nuôi cấy hiếu khí nấm men trong môi trường lỏng được lấy làm giống cây tế bào mà không có xử lý bất kỳ thì OD600 là độ hấp thụ OD600 của canh

trường nuôi cấy tế bào (giống cấy tế bào). Trong các trường hợp trong đó tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó là chiết phẩm của tế bào hoặc giống cấy tế bào thu được bằng cách giải phóng các thành phần tế bào bằng cách phá vỡ tế bào nấm men thì OD600 là độ hấp thụ OD600 của canh trường nuôi cấy tế bào (canh trường nuôi cấy tế bào chứa tế bào nấm men chưa bị phân hủy và chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy) dùng để điều chế chiết phẩm. OD600 có thể được đo bằng quang phổ kế chẳng hạn.

Tốt hơn là, tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế có hàm lượng etanol bằng 1% thể tích hoặc nhỏ hơn. Tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó với hàm lượng etanol bằng 1% thể tích hoặc nhỏ hơn đặc biệt thích hợp để sử dụng làm nguyên liệu thô dùng cho các thực phẩm hoặc đồ uống, mỹ phẩm khác nhau và các sản phẩm khác. Hàm lượng etanol cao hơn 1% thể tích có thể ảnh hưởng không tốt đến sự sinh trưởng của nấm men. Tốt hơn nữa là hàm lượng etanol của tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế bằng 0,8% thể tích hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 0,5% thể tích hoặc nhỏ hơn. Hàm lượng etanol có thể được đo bằng các phương pháp đã biết.

Tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế có thể ở dạng bất kỳ như bột nhão, huyền phù, chiết phẩm hoặc chất lỏng.

Tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế, như được mô tả sau đây, có thể thích hợp để sử dụng làm nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống và các sản phẩm khác. Tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế có thể được tạo bột trước khi sử dụng bằng cách sấy chẳng hạn.

Tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế có thể thu được bằng cách nuôi cấy hiếu khí *Yarrowia lipolytica* trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ và tùy ý thực hiện xử lý như phá vỡ tế bào. Cụ thể là, nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin.

Khi *Yarrowia lipolytica* được nuôi cấy hiếu khí trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin thì L-hydroxyprolin được tích lũy trong tế bào hoặc giống cấy tế bào của nấm men để tạo ra tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men chứa L-hydroxyprolin. Phương pháp ưu tiên để sản xuất tế

bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế hoặc để sản xuất L-hydroxyprolin là phương pháp bao gồm bước tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* bằng cách nuôi cấy hiếu khí nấm men trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin.

Phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin theo sáng chế bao gồm bước tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* bằng cách nuôi cấy hiếu khí nấm men trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ (sau đây được gọi là bước tích lũy Hyp). Nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin.

Phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể có bước khác bước tích lũy Hyp nêu trên. Ví dụ, phương pháp sản xuất có thể bao gồm một hoặc hai hoặc nhiều bước như bước nuôi cấy sơ bộ, bước thu gom tế bào và bước phá vỡ tế bào (được mô tả sau đây).

Theo phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin theo sáng chế, có thể thu được tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế.

Bước tích lũy Hyp tạo ra tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men chứa L-hydroxyprolin. Trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men thu được thì tỷ lệ Hyp/(Pro + Hyp) thường nằm trong khoảng từ 35 đến 100. Lượng L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men thu được bằng bước tích lũy Hyp thường bằng 10 µg/mL hoặc lớn hơn. Tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men này có thể dùng làm tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men theo sáng chế. Tế bào hoặc giống cây tế bào thu được có thể còn được đưa qua bước xử lý như xử lý phân hủy nếu cần để điều chế chiết phẩm của tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men chứa L-hydroxyprolin.

Phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin bao gồm bước tích lũy Hyp cũng được ưu tiên làm phương pháp sản xuất tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế. Trong trường hợp sản xuất tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế, bước tích lũy Hyp và các phương án ưu tiên của nó là giống với bước tích lũy Hyp theo phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin và các phương án ưu tiên của nó.

Như đối với phương pháp bổ sung *Yarrowia lipolytica* vào môi trường lỏng

trong bước tích lũy Hyp thì một lượng nhỏ tế bào có thể được cấy trực tiếp và sinh trưởng trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ. Để tăng nhanh nồng độ tế bào thì ưu tiên cấy vào canh trường nuôi cấy sơ bộ. Môi trường để nuôi cấy sơ bộ không bị giới hạn và có thể là môi trường giống môi trường lỏng dùng trong bước tích lũy Hyp (thường là trong môi trường nuôi cấy chính) hoặc môi trường dùng cho nấm men đã biết. Thời gian nuôi cấy sơ bộ thường nằm trong khoảng từ 10 đến 72 giờ, tốt hơn là từ 12 đến 48 giờ. Tốt hơn là, nhiệt độ nuôi cấy sơ bộ nằm trong khoảng từ 15°C đến 40°C. Lượng canh trường nuôi cấy sơ bộ để được cấy thường nằm trong khoảng từ 1/100000 đến 1/2, tốt hơn là từ 1/1000 đến 1/10, tốt hơn nữa là từ 1/200 đến 1/10, tốt hơn nữa là 1/200 đến 1/20 lượng môi trường dùng trong bước tích lũy Hyp. Với lượng cấy trong khoảng nêu trên thì *Yarrowia lipolytica* phát triển nhanh trong bước tích lũy Hyp và vì vậy có thể tích lũy hiệu quả L-hydroxyprolin.

Nguồn nitơ của môi trường lỏng dùng trong bước tích lũy Hyp chứa peptit chứa L-hydroxyprolin. Khi *Yarrowia lipolytica* được nuôi cấy hiếu khí bằng nguồn nitơ này thì L-hydroxyprolin được tích lũy trong tế bào hoặc giống cấy tế bào. Một hoặc hai hoặc nhiều nguồn nitơ này có thể được sử dụng. Một hoặc hai hoặc nhiều peptit chứa L-hydroxyprolin cũng có thể được sử dụng.

Peptit chứa L-hydroxyprolin có thể là peptit bất kỳ chứa L-hydroxyprolin làm axit amin thành phần. Tốt hơn là, nó là peptit trong đó L-hydroxyprolin chiếm 10% khối lượng axit amin thành phần hoặc nhiều hơn. Theo một phương án, tốt hơn là nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin là peptit chứa L-hydroxyprolin.

Nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin có thể thu được bằng cách, ví dụ, thủy phân protein chứa L-hydroxyprolin. Protein chứa L-hydroxyprolin có thể là protein bất kỳ chứa L-hydroxyprolin làm axit amin thành phần. Tốt hơn là, nó là protein trong đó L-hydroxyprolin chiếm 10% khối lượng axit amin thành phần hoặc nhiều hơn. Protein chứa L-hydroxyprolin ưu tiên bao gồm protein tạo collagen. Ví dụ về protein tạo collagen bao gồm protein thu được từ mô chứa collagen như cơ quan, da, vảy và xương cá; collagen; và gelatin. Protein tạo collagen có thể có nguồn gốc từ nguồn bất kỳ. Ví dụ, protein tạo collagen của động vật như protein tạo collagen của bò, của lợn hoặc của cá đều có thể được sử dụng thích hợp. Protein tạo collagen có thể là sản phẩm có thể mua được trên thị trường. Việc thủy phân protein chứa L-hydroxyprolin có thể được thực hiện với enzym bằng các phương pháp đã biết.

Ví dụ thích hợp về nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin là pepton của động vật. Tốt hơn là pepton này là pepton của bò, của lợn hoặc của cá, tốt hơn nữa là pepton của bò hoặc của cá. Theo một phương án của sáng chế, tốt hơn là pepton này cũng là pepton thịt, pepton cơ tim hoặc pepton gelatin.

Nguồn nitơ có thể mua được trên thị trường chứa peptit chứa L-hydroxyprolin khả dụng theo sáng chế bao gồm sản phẩm có tên là Peptone (#211677) (Bacto).

Theo một phương án, tốt hơn là peptit chứa L-hydroxyprolin là peptit collagen. Peptit collagen có nghĩa là collagen thủy phân và có thể là bất kỳ trong số peptit collagen được điều chế bằng cách thủy phân gelatin thu được bằng cách cải biến collagen tự nhiên dưới tác dụng của nhiệt, peptit collagen được điều chế bằng cách thủy phân collagen tự nhiên và sản phẩm được cải biến bằng hóa học hoặc enzym của nó. Việc thủy phân có thể được thực hiện bằng, ví dụ, enzym, axit hoặc kiềm và tốt hơn là được thực hiện bằng enzym. Tốt hơn là peptit collagen là peptit collagen được điều chế bằng cách thủy phân gelatin thu được bằng cách cải biến collagen tự nhiên dưới tác dụng của nhiệt hoặc peptit collagen được điều chế bằng cách thủy phân collagen tự nhiên. Peptit collagen có thể có nguồn gốc từ nguồn bất kỳ. Ví dụ, peptit collagen của động vật như peptit collagen của bò, của lợn hoặc của cá đều có thể được sử dụng thích hợp. Được ưu tiên là peptit collagen của cá. Peptit collagen có thể là sản phẩm có thể mua được trên thị trường.

Ví dụ về peptit collagen có thể mua được trên thị trường khả dụng theo sáng chế bao gồm "Collagen Peptide IXOS HDL-50SP" (tên sản phẩm) (phân tử lượng trung bình 5000), "Collagen Peptide Type S" (tên sản phẩm) (phân tử lượng trung bình 1200) và "Super Collagen Peptide SCP-2000" (tên sản phẩm) (phân tử lượng trung bình 2000) tất cả đều mua được từ Nitta Gelatin, "Collagen Peptide P-5000" (tên sản phẩm) (phân tử lượng trung bình 5000) và "Collagen Peptide F-5000" (tên sản phẩm) (phân tử lượng trung bình 5000) mua được từ Yasu Chemical Inc. và "Marine Collagen Oligo CF" (tên sản phẩm) (phân tử lượng trung bình 900 đến 1100) và "Marine Collagen Oligo MF" (tên sản phẩm) (phân tử lượng trung bình 900 đến 1500) mua được từ Nissho Corporation. Được ưu tiên là "Collagen Peptide Type S" (phân tử lượng trung bình 1200) và "Collagen Peptide IXOS HDL-50SP" (phân tử lượng trung bình 5000).

Trong các sản phẩm nêu trên, ví dụ, "Collagen Peptide IXOS HDL-50SP", "Collagen Peptide Type S", "Collagen Peptide F-5000", "Marine Collagen Oligo CF" và "Marine Collagen Oligo MF" là của cá. "Collagen Peptide P-5000" và "Super Collagen Peptide SCP-2000" là của lợn.

Theo một phương án ưu tiên của sáng chế, nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin tốt hơn nếu là peptit collagen (tốt hơn nữa là peptit collagen của cá) và/hoặc pepton (tốt hơn nữa là pepton của bò, của lợn hoặc của cá, tốt hơn nữa là pepton của bò hoặc của cá), đặc biệt tốt hơn là peptit collagen. Việc sử dụng nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin này làm tăng sự tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men. Pepton có thể là pepton thịt, pepton cơ tim hoặc pepton gelatin. Một phương án ưu tiên của phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin theo sáng chế bao gồm bước tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* bằng cách nuôi cấy hiếu khí nấm men trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và peptit collagen và/hoặc pepton.

Theo một phương án, nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin tốt hơn là có phân tử lượng trung bình bằng 10000 hoặc nhỏ hơn, ví dụ, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 100 đến 10000. Tốt hơn là, peptit chứa L-hydroxyprolin có phân tử lượng trung bình bằng 10000 hoặc nhỏ hơn, ví dụ, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 100 đến 10000. Tốt hơn là, peptit chứa L-hydroxyprolin cũng có phân tử lượng bằng 10000 hoặc nhỏ hơn.

Tốt hơn là, peptit collagen có phân tử lượng trung bình nằm trong khoảng từ 1000 đến 10000. Việc sử dụng peptit collagen có phân tử lượng trung bình nằm trong khoảng như nguồn nitơ làm tăng sự tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cấy tế bào.

Phân tử lượng trung bình của peptit chứa L-hydroxyprolin được xác định bằng sắc ký lọc gel chẳng hạn. Phân tử lượng trung bình của peptit collagen thường là một trị số được tính bằng phương pháp được quy định trong "20-2 Average Molecular Weight" trong "PAGI method: methods for testing photographic gelatin", xuất bản lần thứ 10. Phân tử lượng trung bình của peptit là phân tử lượng trung bình theo khối lượng.

Tốt hơn nữa là, phân tử lượng trung bình của peptit collagen nằm trong khoảng

từ 1000 đến 6000, tốt hơn nữa là từ 1000 đến 5500, đặc biệt tốt hơn là từ 1000 đến 5000. Việc sử dụng peptit collagen này làm nguồn nitơ còn làm tăng sự tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào. Theo một phương án, tốt hơn nữa là phân tử lượng trung bình của peptit collagen nằm trong khoảng từ 1000 đến 3000, còn tốt hơn nữa là từ 1000 đến 1500. Theo một phương án ưu tiên khác của sáng chế, tốt hơn nữa là phân tử lượng trung bình của peptit collagen nằm trong khoảng từ 2000 đến 5500, còn tốt hơn nữa là từ 3000 đến 5000.

Trong môi trường lỏng, tốt hơn là nồng độ của nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 0,25 đến 5% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 1 đến 5% khối lượng. Khi nồng độ của nguồn nitơ nằm trong khoảng này thì L-hydroxyprolin được tích lũy trong tế bào hoặc giống cây tế bào. Điều này có thể tạo ra tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó mà có chứa L-hydroxyprolin với lượng bằng, ví dụ, 10 µg/mL hoặc lớn hơn và cũng có thể tạo ra tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó có tỷ lệ Hyp/(Pro + Hyp) nằm trong khoảng từ 35 đến 100. Tốt hơn nữa là nồng độ của nguồn nitơ trong môi trường lỏng nằm trong khoảng từ 1,5 đến 4,5% khối lượng, đặc biệt tốt hơn là từ 2 đến 4% khối lượng. Là đủ khi nồng độ của nguồn nitơ nằm trong khoảng này ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy.

Theo một phương án, tốt hơn là nồng độ peptit collagen hoặc pepton trong môi trường lỏng nằm trong khoảng nêu trên.

Nguồn cacbon không bị giới hạn. Ví dụ về nó bao gồm hydrat cacbon hoặc rượu đường như glucoza, fructoza, sucroza, rafinoza, manosa, maltoza, galactoza, manitol, trehaloza, melezitoza, xenobioza, tinh bột, molat, sorbitol, L-sorboza, glyxerol, etanol và gluxitol; và axit hữu cơ như axit axetic, axit xitric và axit gluconic. Một nguồn cacbon có thể được sử dụng một mình hoặc hai hoặc nhiều nguồn cacbon cũng có thể được sử dụng kết hợp. Tốt hơn là nguồn cacbon là sacarit như glucoza, fructoza hoặc sucroza, đặc biệt tốt hơn là glucoza.

Tốt hơn là nồng độ của nguồn cacbon trong môi trường lỏng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 20% khối lượng, tốt hơn là từ 0,5 đến 15% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 1 đến 10% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 1 đến 5% khối lượng, còn tốt hơn nữa là từ 2 đến 5% khối lượng. Khi nồng độ của nguồn cacbon trong môi trường lỏng bằng

1% khối lượng hoặc nhiều hơn thì tế bào phát triển nhanh một cách thuận lợi. Là đủ khi nồng độ của nguồn cacbon nằm trong khoảng này ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy.

Trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, tốt hơn là tỷ lệ khối lượng (C/N) của nguồn cacbon (C) với nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin (N) nằm trong khoảng từ 0,25 đến 20. Tỷ lệ khối lượng C/N nằm trong khoảng này sẽ thuận lợi dẫn đến sự tích lũy tăng của L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào. Theo một phương án, tốt hơn nữa là tỷ lệ khối lượng C/N nằm trong khoảng từ 0,25 đến 5, tốt hơn nữa là từ 0,3 đến 3, còn tốt hơn nữa là từ 0,4 đến 1,5. Tỷ lệ khối lượng C/N nằm trong khoảng này sẽ dẫn đến sự tích lũy tăng hơn nữa của L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào. Theo một phương án, ví dụ, khi peptit collagen (tốt hơn là có phân tử lượng trung bình nằm trong khoảng từ 1000 đến 5000) hoặc pepton được dùng làm nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin (N), thì tốt hơn nữa là tỷ lệ khối lượng C/N nằm trong khoảng từ 0,25 đến 5, tốt hơn nữa là từ 0,3 đến 3, còn tốt hơn nữa là từ 0,4 đến 1,5, đặc biệt tốt hơn là từ 0,5 đến 1,3.

Theo một phương án ưu tiên khác, tốt hơn là tỷ lệ khối lượng C/N cũng nằm trong khoảng từ 0,5 đến 20.

Là đủ khi tỷ lệ khối lượng C/N nằm trong khoảng nêu trên ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy.

Môi trường lỏng có thể chứa thành phần khác nguồn cacbon và nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin. Ví dụ, tốt hơn là môi trường lỏng chứa chiết phẩm nấm men. Chiết phẩm nấm men thường không có peptit chứa L-hydroxyprolin và không nằm trong nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin. Chiết phẩm nấm men có thể là chiết phẩm nấm men bất kỳ có thể dùng để nuôi cấy nấm men và có thể là sản phẩm có thể mua được trên thị trường. Ví dụ, sản phẩm có tên là Bacto Yeast Extract (#212750) (Bacto) có thể được sử dụng một cách thích hợp.

Trong trường hợp sử dụng chiết phẩm nấm men, nồng độ của chiết phẩm nấm men so với môi trường lỏng tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 3% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 0,5 đến 3% khối lượng. Là đủ khi nồng độ của chiết phẩm nấm men nằm trong khoảng này ở thời điểm bắt đầu nuôi cấy.

Theo một phương án, môi trường lỏng tốt hơn là có độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 9, tốt hơn nữa là 4 đến 9, tốt hơn nữa là cao hơn 4 và không cao hơn 9, tốt

hơn nữa là 4,5 đến 8,8, đặc biệt tốt hơn là 5 đến 8,7. Độ pH của môi trường lỏng có thể được điều chỉnh thích hợp. Độ pH có thể được điều chỉnh bằng chất axit hoặc kiềm đã biết. Ví dụ về chúng bao gồm axit clohydric, axit sulfuric, axit phosphoric, axit nitric, axit glutamic, axit axetic, axit butyric, axit lactic, axit formic, axit suxinic, axit maleic, axit malic, axit oxalic, axit xitric, natri hydroxit, kali hydroxit, canxi hydroxit, nước amoniac và natri glutamat.

Nhiệt độ nuôi cấy tốt hơn là nằm trong khoảng từ 15°C đến 45°C, tốt hơn nữa là từ 20°C đến 40°C, còn tốt hơn nữa là từ 25°C đến 35°C. Nhiệt độ nuôi cấy trong khoảng nhiệt độ này cho phép *Yarrowia lipolytica* phát triển nhanh làm tăng sự tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cấy tế bào.

Bước nuôi cấy hiếu khí có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ. Ví dụ, môi trường lỏng được cấy *Yarrowia lipolytica* có thể được nuôi cấy trong điều kiện lắc hoặc khuấy. Tốc độ lắc hoặc khuấy không bị giới hạn, nhưng tốt hơn là nằm trong khoảng từ 30 đến 600 vòng/phút. Theo một phương án, tốt hơn nữa là tốc độ lắc hoặc khuấy nằm trong khoảng từ 50 đến 600 vòng/phút, còn tốt hơn nữa là từ 100 đến 600 vòng/phút. Theo một phương án ưu tiên khác, tốt hơn nữa là tốc độ lắc hoặc khuấy nằm trong khoảng từ 30 đến 500 vòng/phút, còn tốt hơn nữa là từ 50 đến 300 vòng/phút. Việc nuôi cấy trong điều kiện lắc hoặc khuấy với tốc độ này làm tăng thuận lợi sự tích lũy L-hydroxyprolin. Việc nuôi cấy trong điều kiện lắc với tốc độ ở trên được ưu tiên hơn. Nếu cần, việc tạo bọt có thể được thực hiện bằng không khí hoặc oxy khử trùng. Phương pháp nuôi cấy có thể là bất kỳ trong số phương pháp nuôi cấy theo mẻ, nuôi cấy bán liên tục và nuôi cấy liên tục, nhưng tốt hơn là nuôi cấy theo mẻ. Trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, việc nuôi cấy tĩnh có thể được thực hiện.

Thời gian nuôi cấy không bị giới hạn và có thể được thiết đặt thích hợp. Ví dụ, bước nuôi cấy hiếu khí tốt hơn là được thực hiện trong khoảng thời gian từ 10 đến 100 giờ. Khi thời gian nuôi cấy nằm trong khoảng này thì L-hydroxyprolin được tích lũy trong tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men. Ngoài ra, thường có thể tạo tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó có tỷ lệ Hyp/(Pro + Hyp) nằm trong khoảng từ 35 đến 100 và tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó mà có chứa L-hydroxyprolin với lượng bằng 10 µg/mL hoặc lớn hơn. Cũng có thể tạo tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó có hàm lượng etanol thấp (ví dụ, 1% thể tích hoặc nhỏ hơn). Thời gian nuôi cấy ngắn hơn 10 giờ có

thể dẫn đến sự tích lũy thấp của L-hydroxyprolin hoặc tỷ lệ Hyp/(Pro + Hyp) nhỏ hơn 35 trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm thu được của nó. Thời gian nuôi cấy dài hơn 100 giờ có thể dẫn đến nồng độ etanol cao hơn 1% thể tích trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm thu được của nó. Ngoài ra, với thời gian nuôi cấy này thì sự nhiễm tạp sẽ dễ xảy ra hơn hoặc sự sinh màu do sự tự phá vỡ có thể xảy ra sau khi nấm men chết. Thời gian nuôi cấy tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 10 đến 80 giờ, tốt hơn nữa là từ 12 đến 72 giờ, tốt hơn nữa là từ 20 đến 60 giờ, tốt hơn nữa là từ 24 đến 55 giờ, đặc biệt tốt hơn là từ 24 đến 50 giờ. Trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, tốt hơn là bước nuôi cấy hiếu khí được thực hiện cho đến khi lượng L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào đạt tới 10 $\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn.

Trong phương pháp sản xuất theo sáng chế, bước nuôi cấy hiếu khí thường được thực hiện như là quá trình nuôi cấy chính, nhưng cũng có thể được thực hiện như là quá trình nuôi cấy sơ bộ. Bước nuôi cấy hiếu khí có thể được thực hiện trong cả quá trình nuôi cấy sơ bộ lẫn quá trình nuôi cấy chính.

Trong nuôi cấy hiếu khí, L-hydroxyprolin được tích lũy trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica*. Giống cây tế bào có thể là bất kỳ trong số canh trường nuôi cấy tế bào chứa tế bào nấm men và chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy, tế bào nấm men và chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy của canh trường nuôi cấy tế bào. Bước tích lũy Hyp có thể tạo ra tế bào hoặc giống cây tế bào *Yarrowia lipolytica* chứa L-hydroxyprolin và có tỷ lệ Hyp/(Pro + Hyp) nằm trong khoảng từ 35 đến 100. Cũng có thể tạo ra tế bào hoặc giống cây tế bào *Yarrowia lipolytica* chứa L-hydroxyprolin với lượng bằng 10 $\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn. Chiết phẩm của tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men có thể thu được bằng cách, ví dụ, cho tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men đi qua bước xử lý phá vỡ tế bào.

Theo sáng chế, khi điều chế tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin thì, ví dụ, canh trường nuôi cấy tế bào chứa tế bào nấm men và chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy thu được trong bước tích lũy Hyp có thể được lấy làm giống cây tế bào nấm men chứa L-hydroxyprolin mà không cần xử lý khác bất kỳ. Theo cách khác, tế bào được thu gom từ canh trường nuôi cấy tế bào có thể được lấy làm tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy thu được bằng cách loại bỏ tế bào ra khỏi canh trường nuôi cấy tế bào có thể được

lấy làm giống cây tế bào. Hơn nữa, tế bào hoặc canh trường nuôi cấy tế bào tùy ý có thể được xử lý phá vỡ tế bào để giải phóng các thành phần tế bào trong canh trường nuôi cấy và bằng cách này điều chế chiết phẩm của tế bào hoặc giống cây tế bào. Khi điều chế chiết phẩm của tế bào hoặc giống cây tế bào thì bước loại bỏ cặn tế bào có thể được thực hiện sau khi phá vỡ tế bào. Tế bào hoặc giống cây tế bào hoặc chiết phẩm của nó tùy ý có thể được đưa qua xử lý như khử trùng hoặc gia nhiệt. Phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc hai hoặc nhiều bước như bước thu gom tế bào, bước phá vỡ tế bào, bước loại bỏ cặn tế bào và bước khử trùng.

Tế bào có thể được thu gom từ canh trường nuôi cấy tế bào bằng phương pháp bất kỳ. Phương pháp thông thường như phương pháp ly tâm có thể được sử dụng.

Việc phá vỡ tế bào có thể được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ. Phương pháp thông thường có thể được sử dụng như phương pháp tự phá vỡ, phương pháp phá vỡ bằng enzym hoặc phương pháp chiết bằng kiềm. Cụ thể là, phương pháp tự phá vỡ được ưu tiên. Theo phương pháp tự phá vỡ, ví dụ, tế bào hoặc giống cây tế bào có thể được gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 40°C đến 60°C trong khoảng thời gian từ 60 đến 180 phút hoặc từ 95°C đến 100°C trong khoảng thời gian từ 5 đến 15 phút.

Cặn tế bào có thể được loại bỏ bằng phương pháp bất kỳ. Ví dụ, nó được loại bỏ bằng phương pháp đã biết như phương pháp lọc hoặc ly tâm.

Trong trường hợp thực hiện khử trùng, tốt hơn là tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó được gia nhiệt ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 75°C đến 90°C (tốt hơn nữa là 80°C) trong khoảng thời gian từ 45 đến 90 phút (tốt hơn nữa là 60 phút). Trong trường hợp trong đó việc loại bỏ cặn tế bào và khử trùng đều được thực hiện thì một trong số chúng có thể được thực hiện trước.

Tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó thu được theo sáng chế và các phương án ưu tiên của nó là giống với tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế và các phương án ưu tiên của nó. Phương pháp sản xuất theo sáng chế có thể sản xuất ra tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* hoặc chiết phẩm của nó có, ví dụ, tỷ lệ Hyp/(Pro + Hyp) nằm trong khoảng từ 35 đến 100 và chứa L-hydroxyprolin với lượng bằng 10 µg/mL. L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* hoặc chiết phẩm của nó thường có nguồn gốc từ tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men.

L-hydroxyprolin có nguồn gốc từ sản phẩm tự nhiên hoặc tổng hợp có thể còn được bổ sung vào tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó thu được bằng phương pháp theo sáng chế. Tuy nhiên, theo một phương án ưu tiên, L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó gồm L-hydroxyprolin có nguồn gốc từ tế bào hoặc giống cây tế bào *Yarrowia lipolytica* thu được trong bước tích lũy Hyp.

Tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó mà có chứa L-hydroxyprolin thu được bằng cách sử dụng sáng chế có thể được sử dụng làm nguyên liệu thô dùng cho thực phẩm hoặc đồ uống, mỹ phẩm và các sản phẩm khác như được mô tả sau đây. Phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin theo sáng chế có thể bao gồm bước tinh chế L-hydroxyprolin từ tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm thu được của nó. L-hydroxyprolin có thể được tinh chế bằng, ví dụ, phương pháp đã biết như sắc ký cột.

Sáng chế bao gồm bước sử dụng *Yarrowia lipolytica* để sản xuất L-hydroxyprolin.

Yarrowia lipolytica cũng thích hợp để sản xuất tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó mà có chứa L-hydroxyprolin. Trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin, tốt hơn là tỷ lệ Hyp/(Pro + Hyp) nằm trong khoảng từ 35 đến 100. Cũng vậy, trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin, lượng L-hydroxyprolin tốt hơn là bằng 10 µg/mL hoặc lớn hơn. Các phương án ưu tiên của tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin giống các phương án ưu tiên của tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế.

Tốt hơn là việc sử dụng sáng chế bao gồm bước tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* bằng cách nuôi cấy hiếu khí nấm men trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ.

Nguồn nitơ tốt hơn là chứa peptit chứa L-hydroxyprolin.

Khi ứng dụng sáng chế, peptit chứa L-hydroxyprolin tốt hơn là peptit collagen. Peptit collagen tốt hơn là có phân tử lượng trung bình nằm trong khoảng từ 1000 đến 10000.

Khi ứng dụng sáng chế, nồng độ của nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin trong môi trường lỏng tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,25 đến 5% khối lượng. Tỷ lệ khối lượng (C/N) của nguồn cacbon (C) với nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin (N) tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,25 đến 20. Theo một phương án, tốt hơn là tỷ lệ C/N cũng nằm trong khoảng từ 0,5 đến 20. Khi ứng dụng sáng chế, bước nuôi cấy hiếu khí tốt hơn là được thực hiện trong khoảng thời gian từ 10 đến 100 giờ.

Khi ứng dụng sáng chế, môi trường lỏng, nguồn cacbon và nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin và các phương án ưu tiên của nó là giống với điều kiện của phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin. Điều kiện của bước nuôi cấy hiếu khí và các phương án ưu tiên của nó cũng giống điều kiện của phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin. Việc ứng dụng sáng chế có thể có một hoặc hai hoặc nhiều bước như bước thu gom tế bào, bước phá vỡ, bước loại bỏ tế bào và bước khử trùng nêu trên.

Tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế có thể được bổ sung vào các chế phẩm khác nhau như mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống và dược phẩm. Chế phẩm chứa tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế cũng được bao gồm bởi sáng chế. Chế phẩm theo sáng chế chỉ cần chứa tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo khía cạnh thứ nhất của sáng chế hoặc tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo khía cạnh thứ hai của sáng chế và cũng có thể chứa cả hai. Chế phẩm chứa tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế chứa L-hydroxyprolin thu được từ tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó.

Ví dụ về chế phẩm theo sáng chế bao gồm mỹ phẩm (chế phẩm mỹ phẩm), thực phẩm hoặc đồ uống (chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống), dược phẩm (chế phẩm dược phẩm) và thuốc không cần kê đơn (chế phẩm thuốc không cần kê đơn). Chế phẩm có thể là nguyên liệu của chúng. Theo một phương án, tốt hơn là chế phẩm là mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống hoặc nguyên liệu của chúng.

Trong chế phẩm theo sáng chế, lượng tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó không bị giới hạn và có thể được thiết đặt thích hợp theo loại và ứng dụng của chế phẩm. Ví dụ, lượng tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men hoặc

chiết phẩm của nó tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,00001 đến 50% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 0,00005 đến 20% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 0,0001 đến 10% khối lượng chất rắn so với chế phẩm.

Trong các trường hợp trong đó chế phẩm theo sáng chế là mỹ phẩm hoặc dược phẩm, thì chế phẩm có thể ở dạng liều bất kỳ như dung dịch, bột nhão, gel, chất rắn hoặc bột.

Mỹ phẩm không bị giới hạn. Chế phẩm có thể là chất làm sạch, sữa rửa mặt, kem dưỡng da, sữa dưỡng da, kem, tinh dầu, thuốc làm mọc tóc, dầu, gel, dầu gội đầu, chất làm sạch tóc, dầu xả, kem phủ, kem nền, son môi, màu trắng bột trang điểm, mặt nạ, nước hoa, bột, nước thơm, xà phòng tắm, xà phòng, phụ gia tắm, kem chống nắng hoặc loại tương tự.

Mỹ phẩm hoặc nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm chứa tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế là một phương án ưu tiên của sáng chế. Mỹ phẩm và nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm có thể chứa thành phần khác tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó. Chúng có thể chứa các thành phần khác nhau mà thường được trộn trong mỹ phẩm. Ví dụ, chúng có thể chứa một lượng thích hợp dầu, nước hoa, chất hoạt động bề mặt, chất giữ ẩm, chất chống oxy hóa, chất hấp thụ tia cực tím, chất bảo quản, chất màu, thuốc nhuộm và chất tương tự. Tỷ lệ trộn của chúng có thể được chọn một cách thích hợp. Nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm theo sáng chế thích hợp để sản xuất mỹ phẩm theo sáng chế.

Liều lượng của mỹ phẩm có thể được xác định thích hợp theo loại mỹ phẩm và các yếu tố khác.

Mỹ phẩm hoặc nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm theo sáng chế chứa L-hydroxyprolin và vì vậy thích hợp cho ứng dụng được chọn trong số, ví dụ, thúc đẩy sự tạo collagen, thúc đẩy sự sinh trưởng của tế bào biểu bì, giữ ẩm cho da, chống lão hóa cho da, ngăn hoặc giảm sự chảy xệ của da, cải thiện độ săn chắc của da, ngăn hoặc giảm nếp nhăn và giảm viêm da do dị ứng, thích hợp hơn cho ứng dụng được chọn trong số: cải thiện độ săn chắc của da và ngăn hoặc giảm nếp nhăn.

Lượng tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó trong mỹ phẩm tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,00001 đến 10% khối lượng, tốt hơn là từ 0,0001 đến 10% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 0,0001 đến 5% khối lượng, tốt hơn nữa

là từ 0,001 đến 5% khối lượng, còn tốt hơn nữa là từ 0,01 đến 3% khối lượng, đặc biệt tốt hơn là từ 0,05 đến 2% khối lượng chất rắn so với mỹ phẩm. Theo một phương án ưu tiên khác, lượng tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó trong mỹ phẩm tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,00005 đến 1% khối lượng, còn tốt hơn nữa là từ 0,0001 đến 0,5% khối lượng chất rắn so với mỹ phẩm.

Lượng tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó trong nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm tốt hơn là, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,001 đến 20% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 0,01 đến 10% khối lượng, còn tốt hơn nữa là từ 0,05 đến 5% khối lượng, đặc biệt tốt hơn là từ 0,1 đến 2% khối lượng chất rắn so với nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm. Lượng L-hydroxyprolin trong nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm tốt hơn là, ví dụ, nằm trong khoảng từ 5 đến 300 phần triệu, tốt hơn nữa là từ 10 đến 200 phần triệu, còn tốt hơn nữa là từ 50 đến 100 phần triệu. Theo một phương án, lượng L-hydroxyprolin trong mỹ phẩm có thể, ví dụ, nằm trong khoảng từ 0,01 đến 20 phần triệu và tốt hơn là từ 0,03 đến 15 phần triệu, tốt hơn nữa là từ 0,05 đến 10 phần triệu. Tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó tốt hơn là được bổ sung để cho lượng L-hydroxyprolin nằm trong khoảng nêu trên.

Trong trường hợp trong đó chế phẩm theo sáng chế là thực phẩm hoặc đồ uống (chế phẩm thực phẩm hoặc đồ uống) thì thực phẩm hoặc đồ uống không bị giới hạn. Thực phẩm hoặc đồ uống có thể ở bất kỳ trong số dạng lỏng, dạng bán lỏng, dạng rắn hoặc dạng bột nhão. Ví dụ, thực phẩm hoặc đồ uống có thể là bất kỳ trong số thực phẩm hoặc đồ uống thông thường, thực phẩm sức khỏe và thực phẩm chức năng.

Thực phẩm hoặc đồ uống thông thường không bị giới hạn và bao gồm đồ uống có cồn. Thực phẩm sức khỏe là thực phẩm được tin là tốt hoặc có lợi cho sức khỏe và bao gồm chất bổ sung dinh dưỡng và thực phẩm tự nhiên. Chất bổ sung dinh dưỡng là thực phẩm được làm giàu bằng chất dinh dưỡng cụ thể. Thực phẩm chức năng là thực phẩm bổ sung chất dinh dưỡng để điều chỉnh các chức năng của cơ thể và bao gồm thực phẩm cho các mục đích sức khỏe và thực phẩm có các yêu cầu về chức năng dinh dưỡng xác định.

Chất bổ sung dinh dưỡng bao gồm đồ uống và chất bổ sung làm đẹp. Thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế có thể ở dạng viên nang hoặc chế phẩm y tế khác hoặc có thể là chế phẩm uống được.

Thực phẩm hoặc đồ uống có thể chứa các thành phần khác nhau được phép dùng trong thực phẩm hoặc đồ uống. Ví dụ về các thành phần này bao gồm chất liên kết, chất làm đặc, chất tạo màu, chất ổn định, chất nhũ hóa, chất phân tán, chất nghiền, chất tạo huyền phù, chất hoạt động bề mặt, chất bảo quản, chất tạo ngọt và chất chua.

Thực phẩm hoặc đồ uống chứa tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế là một phương án ưu tiên của sáng chế.

Lượng tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó trong thực phẩm hoặc đồ uống, ví dụ, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 10% khối lượng, tốt hơn nữa là từ 0,001 đến 5% khối lượng, còn tốt hơn nữa là từ 0,01 đến 1% khối lượng chất rắn so với thực phẩm hoặc đồ uống. Lượng L-hydroxyprolin trong thực phẩm hoặc đồ uống tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,0001 đến 0,01% khối lượng. Tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó tốt hơn là được bổ sung để cho lượng L-hydroxyprolin nằm trong khoảng nêu trên. Lượng L-hydroxyprolin trong chế phẩm như mỹ phẩm, nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống là lượng L-hydroxyprolin tự do. Tốt hơn là L-hydroxyprolin có nguồn gốc từ tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó.

Chế phẩm như mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống hoặc nguyên liệu của nó chứa tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế có thể được sản xuất bằng kỹ thuật đã biết. Cụ thể là, chế phẩm có thể được sản xuất bằng cách chọn và trộn, theo loại, nguyên liệu, chất phụ gia của chúng và chất tương tự thường được sử dụng của chúng và bổ sung tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế vào hỗn hợp.

Sáng chế còn bao gồm phương pháp sản xuất nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm chứa L-hydroxyprolin bao gồm bước tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* bằng cách nuôi cấy hiếu khí nấm men trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ (bước tích lũy Hyp). Nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin. Các phương án ưu tiên của phương pháp sản xuất nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm chứa L-hydroxyprolin theo sáng chế giống các phương án ưu tiên của phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin. Phương pháp sản xuất nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm chứa L-hydroxyprolin được ưu tiên làm phương pháp sản xuất nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm theo sáng chế.

Bước tích lũy Hyp tạo ra tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men chứa L-hydroxyprolin. Bằng cách cho tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men đi qua bước xử lý phá vỡ tế bào như được mô tả ở trên, có thể thu được chiết phẩm của tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* chứa L-hydroxyprolin. Tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó thu được theo cách này và các phương án ưu tiên của nó giống tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế và các phương án ưu tiên của nó. Tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin thu được như vậy có thể, nếu cần, được trộn với (các) chất phụ gia và chất tương tự thường dùng trong mỹ phẩm và được sử dụng làm nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm chứa L-hydroxyprolin. Theo cách khác, L-hydroxyprolin được tinh chế từ tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin có thể, nếu cần, được trộn với (các) chất phụ gia thường dùng trong mỹ phẩm để tạo ra nguyên liệu thô dùng để sản xuất mỹ phẩm chứa L-hydroxyprolin. Nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm chứa L-hydroxyprolin thu được bởi sáng chế được sử dụng thích hợp trong mỹ phẩm dùng cho ứng dụng được chọn trong số: thúc đẩy sự tạo collagen, thúc đẩy sự sinh trưởng của tế bào biểu bì, giữ ẩm cho da, chống lão hóa cho da, ngăn hoặc giảm sự chảy xệ của da, cải thiện độ săn chắc của da, ngăn hoặc giảm nếp nhăn và giảm viêm da do dị ứng.

Sáng chế cũng bao gồm chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin chứa tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin.

Tốt hơn là tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin, và tỷ lệ của lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-hydroxyprolin trên tổng lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-prolin (Pro) và L-hydroxyprolin (Hyp) như được xác định theo công thức $(100 \times \text{Hyp}/(\text{Pro} + \text{Hyp}))$ nằm trong khoảng từ 35 đến 100. Trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó, lượng L-hydroxyprolin tốt hơn là bằng 10 $\mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn. Chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin chứa tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó đặc biệt thích hợp để sử dụng làm chất phụ gia để tăng cường, bổ sung hoặc làm giàu hàm lượng L-hydroxyprolin trong mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống hoặc sản phẩm khác. Các phương án ưu tiên của tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó giống tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo sáng chế và các phương án ưu tiên

của nó. Chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin thích hợp để sử dụng làm chế phẩm phụ gia để tăng cường hàm lượng L-hydroxyprolin trong thực phẩm hoặc đồ uống, mỹ phẩm hoặc sản phẩm khác. "Chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin" có thể được thay thế bằng "chế phẩm bổ sung L-hydroxyprolin" hoặc "chế phẩm giàu L-hydroxyprolin".

Chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin theo sáng chế chỉ cần chứa tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* hoặc chiết phẩm của nó mà có chứa L-hydroxyprolin và lượng tế bào hoặc giống cây tế bào hoặc chiết phẩm của nó trong chế phẩm có thể bằng 100% khối lượng. Nếu cần, chế phẩm có thể chứa (các) thành phần khác. Ví dụ, trong trường hợp sử dụng chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin làm chất phụ gia thực phẩm thì chế phẩm có thể chứa một hoặc hai hoặc nhiều chất phụ gia đã biết dùng trong thực phẩm.

Chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin theo sáng chế cũng thích hợp làm, ví dụ, chất phụ gia mỹ phẩm. Trong trường hợp sử dụng chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin làm chất phụ gia mỹ phẩm thì chế phẩm chỉ cần chứa tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* hoặc chiết phẩm của nó. Lượng tế bào hoặc giống cây tế bào hoặc chiết phẩm của nó trong chế phẩm có thể bằng 100% khối lượng. Nếu cần, chế phẩm có thể chứa một hoặc hai hoặc nhiều chất phụ gia đã biết dùng trong mỹ phẩm.

Tốt hơn là phương pháp sản xuất chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin theo sáng chế bao gồm bước tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* bằng cách nuôi cấy hiếu khí nấm men trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ. Phương pháp sản xuất chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin chứa bước này cũng được bao gồm bởi sáng chế. Nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin. Phương pháp sản xuất chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin theo sáng chế và các phương án ưu tiên của nó giống phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin và các phương án ưu tiên của nó. Phương pháp sản xuất chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin theo sáng chế có thể bao gồm bước bổ sung chất phụ gia như chất phụ gia thực phẩm đã biết hoặc chất phụ gia mỹ phẩm đã biết cho tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó nếu cần.

Phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin theo một phương án khác của sáng chế bao gồm bước tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men

Yarrowia lipolytica bằng cách nuôi cấy hiếu khí nấm men trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ.

Theo phương pháp sản xuất theo một phương án khác của sáng chế, tốt hơn là nguồn nitơ chứa protein chứa L-hydroxyprolin hoặc peptit chứa L-hydroxyprolin.

Theo phương pháp sản xuất theo một phương án khác của sáng chế, protein chứa L-hydroxyprolin tốt hơn là protein tạo collagen và peptit chứa L-hydroxyprolin tốt hơn là peptit collagen. Theo phương pháp sản xuất theo một phương án khác của sáng chế, protein tạo collagen và peptit collagen tốt hơn là có phân tử lượng trung bình nằm trong khoảng từ 1000 đến 100000.

Theo phương pháp sản xuất theo một phương án khác của sáng chế, tốt hơn là nồng độ của nguồn nitơ trong môi trường lỏng nằm trong khoảng từ 0,25 đến 5% khối lượng và tốt hơn là tỷ lệ khối lượng (C/N) của nguồn cacbon (C) với nguồn nitơ (N) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 20. Bước nuôi cấy hiếu khí tốt hơn là được thực hiện trong khoảng thời gian từ 10 đến 100 giờ.

Việc sử dụng theo một phương án khác của sáng chế là việc sử dụng *Yarrowia lipolytica* để sản xuất L-hydroxyprolin. Tốt hơn là việc sử dụng này bao gồm bước tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cấy tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* bằng cách nuôi cấy hiếu khí nấm men trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ, trong đó nguồn nitơ tốt hơn là chứa protein chứa L-hydroxyprolin hoặc peptit chứa L-hydroxyprolin.

Để sử dụng theo một phương án khác của sáng chế, protein chứa L-hydroxyprolin tốt hơn là protein tạo collagen và peptit chứa L-hydroxyprolin tốt hơn là peptit collagen. Để sử dụng theo một phương án khác của sáng chế, protein tạo collagen và peptit collagen tốt hơn là có phân tử lượng trung bình nằm trong khoảng từ 1000 đến 100000.

Để sử dụng theo một phương án khác của sáng chế, tốt hơn là nồng độ của nguồn nitơ trong môi trường lỏng nằm trong khoảng từ 0,25 đến 5% khối lượng và tốt hơn là tỷ lệ khối lượng (C/N) của nguồn cacbon (C) với nguồn nitơ (N) nằm trong khoảng từ 0,5 đến 20. Bước nuôi cấy hiếu khí tốt hơn là được thực hiện trong khoảng thời gian từ 10 đến 100 giờ.

Ví dụ về protein chứa L-hydroxyprolin bao gồm các protein tạo collagen được mô tả ở trên. Tốt hơn là protein chứa L-hydroxyprolin như protein tạo collagen có phân tử lượng trung bình cao hơn 10000 và không cao hơn 100000. Phân tử lượng trung bình của protein là phân tử lượng trung bình theo khối lượng. Phân tử lượng trung bình của protein chứa L-hydroxyprolin như protein tạo collagen được tính bằng sắc ký lọc gel chẳng hạn.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ thử nghiệm làm rõ sáng chế sẽ được thể hiện cụ thể hơn dưới đây. Sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ thử nghiệm này. Trong các ví dụ thử nghiệm, "%" có nghĩa là "% khối lượng" trừ khi được quy định khác.

Trong các ví dụ thử nghiệm, các dung dịch chuẩn của L-hydroxyprolin (Hyp) để tạo đường cong hiệu chỉnh được điều chế bằng cách sử dụng L-4-hydroxyprolin mua được từ Nacalai Tesque, Inc. Các dung dịch chuẩn của L-prolin (Pro) được điều chế bằng cách sử dụng L-prolin mua được từ Nacalai Tesque, Inc. L-hydroxyprolin và L-prolin được phân tích trong các ví dụ thử nghiệm đều là L-hydroxyprolin tự do và L-prolin tự do.

Các môi trường dùng trong các ví dụ thử nghiệm đều là môi trường lỏng. Môi trường YPD dùng trong các ví dụ thử nghiệm có tỷ lệ Y:P:D bằng 1:2:2 (tỷ lệ khối lượng) (Y: chiết phẩm nấm men 1,0%, P: pepton 2,0%, D: glucoza 2,0%) trừ khi được quy định khác.

Chiết phẩm nấm men dùng để điều chế các môi trường là sản phẩm có tên là Yeasts Extract (#212750) (Bacto). Pepton được dùng là sản phẩm có tên là Peptone (#211677) (Bacto) thu được bằng cách phá vỡ tế bào của bò bằng enzym có nguồn gốc từ tụy lợn.

Trong các ví dụ thử nghiệm, các môi trường trước khi bắt đầu nuôi cấy có độ pH nằm trong khoảng từ 6,5 đến 8,5.

Ví dụ thử nghiệm 1

Sàng lọc nấm men tích lũy L-hydroxyprolin (sau đây được gọi là Hyp)

Việc sàng lọc nấm men tích lũy Hyp trong môi trường nuôi cấy nó được thực hiện bằng cách sử dụng 60 chủng nấm men được liệt kê trong bảng 1. Bảng 1 thể hiện

tên chi và loài của các chủng.

Bảng 1

Tên
<i>Yarrowia lipolytica</i>
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>
<i>Cryptococcus terreus</i>
<i>Candida tropicalis</i>
<i>Candida albicans</i>
<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
<i>Trichosporon cutaneum</i>
<i>Candida maltosa</i>
<i>Lachancea fermentati</i>
<i>Candida saitoana</i>
<i>Torulaspora delbrueckii</i>
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>
<i>Kuraishia capsulata</i>
<i>Trichosporon moniliiforme</i>
<i>Magnusiomyces ovetensis</i>
<i>Ogataea wickerhamii</i>
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>Schwanniomyces pseudopolymorphus</i>
<i>Citeromyces matritensis</i>
<i>Pichia kudriavzevii</i>
<i>Pichia membranifaciens</i>
<i>Sporobolomyces holsaticus</i>
<i>Bulleromyces albus</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryi</i>
<i>Kuraishia capsulata</i>
<i>Pichia kudriavzevii</i>
<i>Lindnera saturnus</i>
<i>Wickerhamomyces silvicola</i>
<i>Sporidiobolus johnsonii</i>
<i>Saccharomyces paradoxus</i>
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>
<i>Cryptococcus aureus</i>
<i>Wickerhamia fluorescens</i>
<i>Kurtzmanomyces tardus</i>
<i>Hanseniaspora osmophila</i>
<i>Saturnispora dispora</i>
<i>Saccharomycopsis capsularis</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>Lindnera rhodanensis</i>
<i>Barnettozyma wickerhamii</i>
<i>Priceomyces haplophila</i>
<i>Komagataella pastoris</i>
<i>Lindnera mrakii</i>
<i>Nakazawaea holstii</i>
<i>Ogataea glucozyma</i>
<i>Ogataea henricii</i>
<i>Ogataea minuta</i> var. <i>nonfermentans</i>
<i>Ogataea polymorpha</i>
<i>Lipomyces starkeyi</i>
<i>Sporidiobolus pararoseus</i>
<i>Sporobolomyces roseus</i>
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Candida solani</i>
<i>Kloeckera africana</i>
<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>glutinis</i>

Nấm men được nuôi cấy trong môi trường YPD trong điều kiện dưới đây. Sau đó, Hyp được định lượng bằng HPLC.

Môi trường nuôi cấy

Một vòng đủ mỗi chủng được cấy vào 1 mL môi trường YPD được bổ sung L-prolin 0,5% (sau đây được gọi là Pro) được nuôi cấy trong điều kiện lắc (300 vòng/phút) ở nhiệt độ 28°C trong khoảng thời gian 24 giờ và sau đó được nuôi cấy tĩnh ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian từ 4 đến 7 ngày, bằng cách này tạo ra canh trường nuôi cấy tế bào nấm men (giống cấy tế bào).

Chuẩn bị mẫu

Mỗi canh trường nuôi cấy tế bào nấm men được xử lý như sau để chuẩn bị mẫu môi trường nuôi cấy và hàm lượng Hyp được đo.

Sau khi nuôi cấy, tế bào được thu thập và rửa bằng 1 mL nước muối. Tế bào được tạo huyền phù trong 0,2 mL chất đệm kali phosphat 50 mM (sau đây được gọi là KPB) (độ pH=6,0). Huyền phù được đun sôi trong khoảng thời gian 10 phút để cho các thành phần tế bào được giải phóng bằng cách tự phá vỡ (phương pháp đun sôi). Cặn tế bào được loại bỏ khỏi chiết phẩm tế bào thu được bằng phương pháp ly tâm (14000 vòng/phút, 5 phút, 4°C). Vì vậy, thu được mẫu môi trường nuôi cấy để đo sự tích lũy Hyp.

Mẫu môi trường nuôi cấy được tạo dẫn xuất bằng phương pháp AccQTag bằng cách sử dụng AccQ-Fluor Reagent Kit mua được từ Waters. Hyp được định lượng bằng HPLC trong điều kiện dưới đây.

Thiết bị và điều kiện dùng để phân tích HPLC được liệt kê dưới đây.

Thiết bị

Sắc ký lỏng hiệu năng cao: Prominence (Shimadzu Corp.)

Cột: XBridge C18 5 μ m (2,1 $\times$ 150 mm, Waters)

Điều kiện đo

Chất rửa giải A: amoni axetat (10 mM, pH=5)

Chất rửa giải B: metanol (0 đến 0,5 phút (0% $\rightarrow$ 1%), 0,5 đến 18 phút (1% $\rightarrow$ 5%), 18 đến 19 phút (5% $\rightarrow$ 9%), 19 đến 29,5 phút (9% $\rightarrow$ 17%), 29,5 đến 40 phút

(17% → 60%), 40 đến 43 phút (60%))

Lưu lượng: 0,3 mL/phút

Nhiệt độ: 40°C

Phát hiện: bộ phát hiện huỳnh quang (bước sóng kích thích: 250 nm, bước sóng phát hiện: 395 nm)

Nồng độ (%) của chất rửa giải B được biểu diễn dưới dạng % thể tích.

Fig.1 thể hiện kết quả.

Fig.1 thể hiện biểu đồ tích lũy Hyp trong nấm men. Trục tung (Hyp (µg/mL)) trên Fig.1 chỉ ra Hyp (µg) trên 1 mL mẫu môi trường nuôi cấy.

Bằng thử nghiệm ở trên, nấm men tích lũy Hyp được phát hiện. Cụ thể là, *Yarrowia lipolytica* có mức tích lũy Hyp cao.

Ví dụ thử nghiệm 2

Yarrowia lipolytica được nghiên cứu để xác định liệu sự tích lũy Hyp có thay đổi tùy thuộc vào môi trường. *Yarrowia lipolytica* NBRC0717 và các môi trường lỏng dưới đây được sử dụng. *Yarrowia lipolytica* NBRC0717 được mua từ National Institute of Technology and Evaluation (2-5-8 Kazusa-kamatari, Kisarazu, Chiba, Japan).

YPD (chiết phẩm nấm men 1%, pepton 2%, glucoza 2%)

YTD (chiết phẩm nấm men 1%, trypton 2%, glucoza 2%)

YM (chiết phẩm nấm men 0,3%, chiết phẩm mạch nha 0,3%, pepton 0,5%, glucoza 2%)

PD (chiết phẩm khoai tây 0,4%, glucoza 2%)

SD (môi trường tổng hợp, glucoza 1%)

Quá trình nuôi cấy sơ bộ và quá trình nuôi cấy chính

(1) Điều kiện 1

Một vòng đủ *Yarrowia lipolytica* NBRC0717 được cấy vào 1 mL môi trường YPD được bổ sung Pro 0,5% và được nuôi cấy trong điều kiện lắc (300 vòng/phút) ở nhiệt độ 28°C trong khoảng thời gian 24 giờ để tạo ra canh trường nuôi cấy sơ bộ.

Sau đó, 0,2 mL canh trường nuôi cấy sơ bộ được cấy vào 2 mL của mỗi môi trường (YPD, YTD, YM, PD hoặc SD nêu trên) được bổ sung Pro 0,5%, tiếp theo là nuôi cấy trong điều kiện lắc (300 vòng/phút) ở nhiệt độ 28°C trong khoảng thời gian 36 giờ để tạo ra canh trường nuôi cấy tế bào *Yarrowia lipolytica*.

(2) Điều kiện 2

Quá trình nuôi cấy sơ bộ được thực hiện trong điều kiện giống điều kiện 1 ngoại trừ là môi trường SD được bổ sung Pro 0,5% được sử dụng thay cho môi trường YPD được bổ sung Pro 0,5%. Sau đó, 0,2 mL canh trường nuôi cấy sơ bộ được cấy vào 2 mL của mỗi môi trường (YPD, YTD, PD hoặc SD nêu trên) được bổ sung Pro 0,5%, tiếp theo là nuôi cấy trong điều kiện lắc (300 vòng/phút) ở nhiệt độ 28°C trong khoảng thời gian 45 giờ để tạo ra canh trường nuôi cấy tế bào *Yarrowia lipolytica*.

Chuẩn bị mẫu

Sau khi nuôi cấy trong điều kiện 1 hoặc 2, mỗi canh trường nuôi cấy tế bào nấm men được xử lý như sau để thu được mẫu môi trường nuôi cấy và hàm lượng Hyp được đo.

Sau khi nuôi cấy, tế bào được thu thập và rửa bằng 1 mL nước muối. Tế bào được tạo huyền phù trong 0,2 mL KPB 50 mM (pH=6,0). Huyền phù được đun sôi trong khoảng thời gian 10 phút để cho các thành phần tế bào được giải phóng bằng cách tự phá vỡ (phương pháp đun sôi). Cặn tế bào được loại bỏ khỏi chiết phẩm tế bào thu được bằng phương pháp ly tâm (14000 vòng/phút, 5 phút, 4°C). Vì vậy, thu được mẫu môi trường nuôi cấy để đo sự tích lũy Hyp.

Định lượng Hyp

Mẫu môi trường nuôi cấy được tạo dẫn xuất bằng o-phthalaldehyt (OPA) và 4-clo-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) và Hyp được định lượng bằng HPLC.

Phương pháp tạo dẫn xuất

Tạo dẫn xuất bằng 4-clo-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl)

Trước tiên, 2 µL mẫu môi trường nuôi cấy được bổ sung vào phần phân ước 50µL dung dịch đệm kali borat 0,4 M (pH=9,5). Sau đó, 2 µL OPA 300 mM (Wako 167-09263) (được hòa tan trong metanol) được bổ sung vào đó, sau đó trộn. Sau khi phản ứng ở nhiệt độ 37°C trong khoảng thời gian 20 phút, 50µL NBD-Cl 2 mM

(Sigma 25455) (được hòa tan trong metanol) được bổ sung, sau đó trình trộn. Sau khi phản ứng ở nhiệt độ 37°C trong khoảng thời gian 20 phút, 25 μ L HCl 1N và 75 μ L metanol 50% được bổ sung vào dung dịch phản ứng thu được. Dung dịch này được ly tâm với tốc độ 14000 vòng/phút trong khoảng thời gian 5 phút và dịch nổi được lấy làm mẫu HPLC và được chuyển vào lọ HPLC.

Thiết bị và điều kiện dùng để phân tích HPLC được liệt kê dưới đây.

Cột: cột XBridge C18 (5 μ m, 2,1 mm $\times$ 150 mm, Waters)

Dung dịch A: amoni axetat 10 mM (pH=5,0)

Dung dịch B: metanol

Gradient:

0 đến 0,5 phút: nồng độ B 0% thể tích $\rightarrow$ 1% thể tích

0,5 đến 18 phút: nồng độ B 1% thể tích $\rightarrow$ 5% thể tích

18 đến 19 phút: nồng độ B 5% thể tích $\rightarrow$ 9% thể tích

19 đến 29,5 phút: nồng độ B 9% thể tích $\rightarrow$ 17% thể tích

29,5 đến 40 phút: nồng độ B 17% thể tích $\rightarrow$ 60% thể tích

40 đến 43 phút: nồng độ B 60% thể tích

Lưu lượng: 0,3 mL/phút

Nhiệt độ cột: 40°C

Bộ phát hiện: bộ phát hiện huỳnh quang, bước sóng kích thích 503 nm/bước sóng phát huỳnh quang 541 nm

Thể tích tiêm: 10 μ l

Đường cong hiệu chỉnh được tạo bằng cách điều chế dung dịch Hyp 5 μ mol/L, 10 μ mol/L, 20 μ mol/L, 50 μ mol/L, 100 μ mol/L và 250 μ mol/L trong KPB 50 mM (pH=6,0).

Fig.2 thể hiện kết quả. Fig.2 thể hiện hai biểu đồ tích lũy Hyp trong *Yarrowia lipolytica* được nuôi cấy trong các môi trường khác nhau ((a): Điều kiện 1, (b): Điều kiện 2). Hyp (μ g/mL) trên trục tung trên Fig.2 chỉ ra Hyp (μ g) trên 1 mL mẫu môi trường nuôi cấy. Trong điều kiện 1, mức tích lũy hydroxyprolin là cao trong tế bào

được nuôi cấy trong môi trường YPD và môi trường YM (các môi trường chứa pepton). Trong điều kiện 2, Hyp được tích lũy trong tế bào được nuôi cấy trong môi trường YPD.

Ví dụ thử nghiệm 3

Sự thay đổi tích lũy theo số lượng ngày nuôi cấy được kiểm tra.

Mỗi trong số các chủng *Yarrowia lipolytica* NBRC1551, NBRC0717, NBRC0746 và NBRC1195 được nuôi cấy trong môi trường YPD trong một, hai hoặc ba ngày. Hyp được giải phóng từ tế bào nấm men được định lượng bằng HPLC. Các chủng nấm men được nhận dạng bằng chữ số NBRC này được mua từ National Institute of Technology and Evaluation (2-5-8 Kazusa-kamatari, Kisarazu, Chiba, Japan).

Nuôi cấy sơ bộ

Một vòng đủ mỗi chủng được cấy vào 1 mL môi trường YPD và được nuôi cấy trong điều kiện lắc (300 vòng/phút) ở nhiệt độ 28°C trong khoảng thời gian 24 giờ để tạo ra canh trường nuôi cấy sơ bộ.

Nuôi cấy chính

Mỗi canh trường nuôi cấy sơ bộ (0,2 mL) được cấy vào 2 mL môi trường YPD, sau đó nuôi cấy trong điều kiện lắc (300 vòng/phút) ở nhiệt độ 28°C trong một đến ba ngày để tạo ra canh trường nuôi cấy tế bào.

Chuẩn bị mẫu và định lượng axit amin

Các mẫu môi trường nuôi cấy được điều chế và tạo dẫn xuất bằng OPA và NBD-Cl như trong ví dụ thử nghiệm 2.

Phân tích HPLC được thực hiện ở điều kiện giống trong ví dụ thử nghiệm 2 để định lượng Hyp và Pro. Đường cong hiệu chỉnh của Pro được tạo bằng cách điều chế dung dịch Pro 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$ và 250 $\mu\text{mol/L}$ trong KPB 50 mM (pH=6,0).

Bảng 2 thể hiện lượng Pro và Hyp trong mỗi mẫu môi trường nuôi cấy. Tỷ lệ ($100 \times \text{Hyp}/(\text{Pro} + \text{Hyp})$) của lượng ($\mu\text{g/mL}$) Hyp trên tổng lượng ($\mu\text{g/mL}$) Pro và Hyp được tính từ lượng Pro và Hyp đo được. Bảng 2 cũng thể hiện kết quả tính.

Bảng 2

Giống	Số ngày nuôi cấy (ngày)	Hyp ($\mu\text{g/mL}$)	Pro ($\mu\text{g/mL}$)	100 x Hyp/(Pro + Hyp)
<i>Yarrowia lipolytica</i> NBRC1551	1	28,14	21,08	57,2
	2	20,28	6,54	75,6
	3	12,83	5,81	68,8
<i>Yarrowia lipolytica</i> NBRC0717	1	29,09	36,57	44,3
	2	78,55	33,73	70,0
	3	88,76	13,79	86,6
<i>Yarrowia lipolytica</i> NBRC0746	1	46,96	20,31	69,8
	2	50,26	9,19	84,5
	3	31,06	6,59	82,5
<i>Yarrowia lipolytica</i> NBRC1195	1	20,27	18,85	51,8
	2	72,01	13,97	83,8
	3	22,38	12,12	64,9

Yarrowia lipolytica được nuôi cấy tích lũy L-hydroxyprolin. Mỗi giống cấy tế bào thu được đều chứa L-hydroxyprolin và có tỷ lệ Hyp/(Pro + Hyp) bằng 35 hoặc lớn hơn.

Ví dụ thử nghiệm 4

Khả năng của *Yarrowia lipolytica* để đồng hóa gelatin được nghiên cứu. mỗi trong số các chủng *Yarrowia lipolytica* NBRC1551, NBRC0717 và NBRC0746 được nuôi cấy trong 5 ngày trong môi trường PD hoặc môi trường PD được bổ sung gelatin 0,125%. Các thành phần tế bào được giải phóng từ tế bào và Hyp được định lượng bằng HPLC. Môi trường PD giống môi trường dùng trong ví dụ thử nghiệm 2.

Nuôi cấy sơ bộ

Một vòng đủ mỗi chủng được cấy trong 1 mL môi trường PD và được nuôi cấy trong điều kiện lắc (300 vòng/phút) ở nhiệt độ 28°C trong khoảng thời gian 24 giờ để tạo ra canh trường nuôi cấy sơ bộ.

Nuôi cấy chính

Mỗi canh trường nuôi cấy sơ bộ (0,2 mL) được cấy trong 2 mL môi trường PD hoặc môi trường PD được bổ sung 0,125% gelatin (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., sản phẩm có tên là Gelatin), sau đó nuôi cấy trong điều kiện lắc (300 vòng/phút) ở nhiệt độ 28°C trong 5 ngày để tạo ra canh trường nuôi cấy tế bào.

Chuẩn bị mẫu và định lượng Hyp

Việc chuẩn bị mẫu môi trường nuôi cấy và việc định lượng Hyp được thực hiện như trong ví dụ thử nghiệm 2. Fig.3 thể hiện kết quả.

Fig.3 thể hiện biểu đồ tích lũy Hyp trong *Yarrowia lipolytica* được nuôi cấy trong 5 ngày trong môi trường PD hoặc môi trường PD được bổ sung gelatin 0,125% (cột màu trắng: Môi trường PD chứa gelatin 0,125% (PD + gel), cột màu đen: Môi trường PD). Hyp ($\mu\text{g/mL}$) trên trục tung chỉ ra Hyp (μg) trên 1 mL mẫu môi trường nuôi cấy. Fig.3 chỉ ra rằng việc bổ sung gelatin phân tử lượng cao nguyên trạng vào môi trường dẫn đến sự tích lũy Hyp giảm so với ví dụ thử nghiệm 3.

Ví dụ thử nghiệm 5

Nghiên cứu được thực hiện bằng cách sử dụng *Yarrowia lipolytica* NBRC0717 để xác định liệu sự tích lũy Hyp có thay đổi theo thành phần môi trường YPD. Bảng 3 thể hiện tỷ lệ YPD trong môi trường #1 đến #12. Trong bảng 3, Y là chiết phẩm nấm men, P là pepton và D là glucoza. Lượng pepton (P) và glucoza (D) thay đổi trong khi lượng chiết phẩm nấm men (Y) được giữ không đổi (các trị số trong bảng là các nồng độ cuối cùng (% khối lượng)).

Bảng 3

	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12
Y	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
P	2	4	1	0,5	0,25	0,1	4	2	1	0,5	0,25	0,1
D	2	2	2	2	2	2	5	5	5	5	5	5

Nuôi cấy sơ bộ

Một vòng đủ *Yarrowia lipolytica* NBRC0717 được cấy vào 1 mL của mỗi môi trường YPD và được nuôi cấy trong điều kiện lắc (300 vòng/phút) ở nhiệt độ 28°C trong khoảng thời gian 24 giờ để tạo ra canh trường nuôi cấy sơ bộ.

Nuôi cấy chính

Mỗi canh trường nuôi cấy sơ bộ (0,2 mL) được cấy vào 2 mL môi trường YPD tương ứng, sau đó nuôi cấy trong điều kiện lắc (300 vòng/phút) ở nhiệt độ 28°C trong bốn ngày để tạo ra canh trường nuôi cấy tế bào.

Chuẩn bị mẫu và định lượng Hyp

Việc chuẩn bị mẫu môi trường nuôi cấy và việc định lượng Hyp được thực hiện như trong ví dụ thử nghiệm 2.

Yarrowia lipolytica được nuôi cấy trong các môi trường YPD tích lũy Hyp. Việc nuôi cấy trong môi trường #1 và #7 đến 11 tạo ra mức tích lũy Hyp cao. Fig.4 thể hiện kết quả thu được bằng cách nuôi cấy trong các môi trường #1 và #7 đến 11.

Fig.4 thể hiện các biểu đồ tích lũy Hyp trong *Yarrowia lipolytica* được nuôi cấy trong các môi trường YPD có các thành phần khác nhau ((a): Tích lũy Hyp ($\mu\text{g/mL}$), (b): Lượng Hyp trong mỗi tế bào ($\mu\text{g/mL/OD600}$)). Trục tung trên Fig.4(a) chỉ ra Hyp (μg) với mỗi 1 mL mẫu môi trường nuôi cấy. (Hyp/OD) trên trục tung trên Fig.4(b) chỉ ra lượng Hyp trong mỗi tế bào được xác định bằng cách chia lượng Hyp (μg) trong 1 mL mẫu môi trường nuôi cấy cho trị số OD600 ($\mu\text{g/mL/OD600}$) đo được.

OD600 được xác định bằng cách pha loãng, trong 1150 μL nước siêu tinh khiết, 60 μL canh trường nuôi cấy tế bào dùng để chuẩn bị mẫu môi trường nuôi cấy và đo độ hấp thụ (600 nm) của dung dịch pha loãng bằng quang phổ kế protein của axit nucleic (thiết bị có tên là Bio spec mini, Shimadzu Corp.).

Ví dụ thử nghiệm 6

Trong môi trường YPD #1 và #10 trong ví dụ thử nghiệm 5, pepton là P được thay thế bằng peptit collagen (sản phẩm có tên là Super Collagen Peptide SCP-2000, nguồn gốc từ lợn, phân tử lượng trung bình 2000, Nitta Gelatin Inc.) và mức tích lũy Hyp được xác định. *Yarrowia lipolytica* NBRC0717 được sử dụng làm nấm men. Môi trường YPD trong đó một phần hoặc tất cả pepton đều được thay thế bằng peptit collagen cũng có thể được gọi là môi trường YPD được cải biến.

Thành phần P trong các môi trường YPD

Bình thường: pepton 100%

CP50: pepton 50%, peptit collagen 50%

CP100: peptit collagen 100%

Thành phần môi trường

(1) YPD#1-Bình thường (YPD#1)

- (2) YPD#1-CP50 (YPD#1 trong đó CP50 được dùng thay cho pepton)
- (3) YPD#1-CP100 (YPD#1 trong đó CP100 được dùng thay cho pepton)
- (4) YPD#10-Bình thường (YPD#10)
- (5) YPD#10-CP50 (YPD#10 trong đó CP50 được dùng thay cho pepton)
- (6) YPD#10-CP100 (YPD#10 trong đó CP100 được dùng thay cho pepton)

Nuôi cấy sơ bộ

Một vòng đủ *Yarrowia lipolytica* NBRC0717 được cấy vào 1 mL môi trường YPD và được nuôi cấy trong điều kiện lắc (300 vòng/phút) ở nhiệt độ 28°C trong khoảng thời gian 24 giờ để tạo ra canh trường nuôi cấy sơ bộ.

Nuôi cấy chính

Canh trường nuôi cấy sơ bộ (0,1 mL) được cấy vào 2 mL mỗi môi trường (1) đến (6), sau đó nuôi cấy trong điều kiện lắc (300 vòng/phút) ở nhiệt độ 28°C trong bốn ngày để tạo ra canh trường nuôi cấy tế bào.

Chuẩn bị mẫu và định lượng Hyp

Việc chuẩn bị mẫu môi trường nuôi cấy và việc định lượng Hyp được thực hiện như trong ví dụ thử nghiệm 2.

Fig.5 thể hiện kết quả.

Fig.5 thể hiện các biểu đồ tích lũy Hyp, lượng Hyp trong mỗi tế bào và OD600 của *Yarrowia lipolytica* được nuôi cấy trong các môi trường chứa pepton hoặc peptit collagen ((a): Tích lũy Hyp ($\mu\text{g/mL}$), (b): Lượng Hyp trong mỗi tế bào ($\mu\text{g/mL/OD600}$), (c): OD600). Trên Fig.5(a) đến 5(c), N là môi trường trong đó thành phần P là bình thường, 50 là môi trường trong đó thành phần P là CP50 và 100 là môi trường trong đó thành phần P là CP100. *Yarrowia lipolytica* sinh trưởng và tích lũy Hyp ngay cả trong các môi trường trong đó pepton được thay thế hoàn toàn bằng peptit collagen.

Ví dụ thử nghiệm 7

Tác động của độ hiếu khí khi nuôi cấy được nghiên cứu bằng cách sử dụng *Yarrowia lipolytica* NBRC0717. Môi trường YPD #1 và #10 trong ví dụ thử nghiệm 5 được sử dụng.

Nuôi cấy sơ bộ

Một vòng đủ *Yarrowia lipolytica* NBRC0717 được cấy vào 1 mL môi trường YPD và được nuôi cấy trong điều kiện lắc (300 vòng/phút) ở nhiệt độ 28°C trong khoảng thời gian 24 giờ để tạo ra canh trường nuôi cấy sơ bộ.

Nuôi cấy chính

Canh trường nuôi cấy sơ bộ (0,1 mL) được cấy vào 2 mL của mỗi môi trường YPD (#1 hoặc #10), sau đó nuôi cấy trong điều kiện lắc (300 vòng/phút) hoặc nuôi cấy tĩnh ở nhiệt độ 28°C trong ba ngày để tạo ra canh trường nuôi cấy tế bào.

Chuẩn bị mẫu và định lượng Hyp

Việc chuẩn bị mẫu môi trường nuôi cấy và việc định lượng Hyp được thực hiện như trong ví dụ thử nghiệm 2. Các chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy cũng được tạo dẫn xuất theo cách giống các mẫu môi trường nuôi cấy và Hyp được định lượng bằng HPLC.

Fig.6 thể hiện kết quả.

Fig.6 thể hiện các biểu đồ tích lũy Hyp trong *Yarrowia lipolytica* được nuôi cấy trong điều kiện lắc hoặc được nuôi cấy trong điều kiện tĩnh ((a): Lượng Hyp trong mẫu môi trường nuôi cấy (trong tế bào) tính theo lượng trên môi trường, (b): Lượng Hyp trong chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy).

Khi được nuôi cấy hiếu khí, *Yarrowia lipolytica* có mức tích lũy Hyp cao.

Ví dụ thử nghiệm 8

Nồng độ etanol và nồng độ glucoza trong các chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy thu được trong ví dụ thử nghiệm 7 được xác định bằng HPLC (bằng cột lên men (Bio-Rad Laboratories, Inc., sản phẩm có tên là Aminx Fermentation Monitoring Column)).

Fig.7 thể hiện kết quả.

Fig.7 thể hiện các biểu đồ của nồng độ etanol và nồng độ glucoza trong các chất nổi bề mặt dịch nuôi cấy của *Yarrowia lipolytica* được nuôi cấy trong điều kiện lắc hoặc được nuôi cấy trong điều kiện tĩnh ((a): nồng độ etanol (% thể tích), (b): nồng độ glucoza (% khối lượng)).

Ví dụ thử nghiệm 9

Quá trình nuôi cấy chính của *Yarrowia lipolytica* NBRC0717 được thực hiện bằng cách thay đổi thành phần môi trường YPD (tỷ lệ Y:P:D và loại P) và thời gian nuôi cấy. Lượng Hyp và Pro trong giống cấy tế bào được đo.

Nuôi cấy sơ bộ

Một vòng ủ *Yarrowia lipolytica* NBRC0717 được cấy vào 3 mL môi trường YPD và được nuôi cấy trong điều kiện tĩnh ở nhiệt độ 30°C trong một ngày để tạo ra canh trường nuôi cấy sơ bộ.

Nuôi cấy chính

Canh trường nuôi cấy sơ bộ thu được (100 μ l) được cấy vào 5 mL môi trường YPD dưới đây, sau đó nuôi cấy trong điều kiện lắc (60 vòng/phút) ở nhiệt độ 30°C. Thời gian nuôi cấy là một hoặc hai ngày. Vì vậy, thu được canh trường nuôi cấy tế bào (giống cấy tế bào).

Trong quá trình nuôi cấy chính, P trong môi trường YPD là pepton hoặc peptit collagen (CP). Peptit collagen là Collagen Peptide IXOS HDL-50SP (tên sản của phẩm, Nitta Gelatin Inc., phân tử lượng trung bình 5000) (sau đây được gọi là peptit collagen (CP1)) hoặc Collagen Peptide Type S (tên của sản phẩm, Nitta Gelatin Inc., phân tử lượng trung bình 1200) (sau đây được gọi là peptit collagen (CP2)).

Tỷ lệ Y:P:D trong môi trường YPD trong quá trình nuôi cấy chính là (1) Y:P:D = 1:2:2 (tỷ lệ khối lượng) (Y: chiết phẩm nấm men 1,0%, P: pepton hoặc peptit collagen 2,0%, D: glucoza 2,0%) hoặc (2) Y:P:D = 1:4:5 (tỷ lệ khối lượng) (Y: chiết phẩm nấm men 1,0%, P: pepton hoặc peptit collagen 4,0%, D: glucoza 5,0%). Bảng 4 thể hiện điều kiện nuôi cấy 1 đến 12 dùng trong quá trình nuôi cấy chính.

Bảng 4

Điều kiện nuôi cấy	Thành phần môi trường	P	Thời gian
1	Y:P:D = 1:2:2	Pepton	1 ngày
2			2 ngày
3		Peptit collagen (CP1)	1 ngày
4			2 ngày
5		Peptit collagen (CP2)	1 ngày
6			2 ngày

7	Y:P:D = 1:4:5	Pepton	1 ngày
8			2 ngày
9		Peptit collagen (CP1)	1 ngày
10			2 ngày
11		Peptit collagen (CP2)	1 ngày
12			2 ngày

Canh trường nuôi cấy tế bào *Yarrowia lipolytica* thu được trong quá trình nuôi cấy chính được đưa qua bước tự phá vỡ và bước khử trùng tiếp theo để chuẩn bị mẫu môi trường nuôi cấy và lượng Hyp được đo.

Bước tự phá vỡ

Canh trường nuôi cấy tế bào *Yarrowia lipolytica* được ủ ở nhiệt độ 50°C trong khoảng thời gian 2 giờ để cho các thành phần tế bào được giải phóng trong canh trường nuôi cấy bằng cách tự phá vỡ.

Bước khử trùng

Canh trường nuôi cấy sau khi tự phá vỡ được ủ ở nhiệt độ 80°C trong khoảng thời gian 1 giờ.

Chiết phẩm thu được được ly tâm (3000 vòng/phút, 5 phút, 1°C) để loại bỏ cặn tế bào, bằng cách này thu được mẫu môi trường nuôi cấy để đo tích lũy Hyp.

Chuẩn bị mẫu

Mỗi mẫu môi trường nuôi cấy thu được được pha loãng trong dung dịch axit clohydric 0,1N để chuẩn bị mẫu HPLC. Mẫu môi trường nuôi cấy được điều chế từ các canh trường nuôi cấy tế bào thu được bằng cách nuôi cấy trong một ngày được pha loãng 10 lần. Mẫu môi trường nuôi cấy được điều chế từ các canh trường nuôi cấy tế bào thu được bằng cách nuôi cấy trong hai ngày được pha loãng 40 lần ngoại trừ điều kiện 12. Mẫu môi trường nuôi cấy trong điều kiện 12 được pha loãng 20 lần.

Phân tích HPLC

Đối với HPLC, axit amin bậc một (nhóm amin bậc một) và axit amin bậc hai (nhóm amin bậc hai) được dán nhãn huỳnh quang trong máy lấy mẫu tự động. Hệ thống phân tích HPLC pha đảo được sử dụng. Việc dán nhãn huỳnh quang cho nhóm amin bậc một được thực hiện bằng o-phthalaldehyt (OPA) và việc dán nhãn huỳnh quang cho nhóm amin bậc hai được thực hiện bằng 9-florenylmetyl cloroformat

(FMOC).

Mỗi mẫu HPLC được điều chế ở trên được lọc qua bộ lọc 0,45- μm vào lọ mẫu. Lọ này được đặt trong máy lấy mẫu tự động. Lọ trống được nạp 30 μL chất phản ứng axit mercaptopropionic (MPA), 15 μL chất phản ứng OPA và 5 μL mẫu và để yên trong khoảng thời gian 1 phút. Sau đó, 5 μL chất phản ứng FMOC được bổ sung. Các thành phần này phản ứng với nhau trong khoảng thời gian 2 phút và 1 μL dung dịch thu được được phun vào hệ thống HPLC. OPA phản ứng với axit amin bậc một và FMOC phản ứng với Hyp còn lại và Pro có nhóm amin bậc hai. Bằng cách phát hiện bước sóng phát huỳnh quang tương ứng với hai kênh mà tất cả các axit amin đều có thể được phát hiện đồng thời.

Thiết bị và điều kiện dùng trong phân tích HPLC được liệt kê dưới đây.

Thiết bị

Sắc ký lỏng hiệu năng cao: Hệ thống Nexera X2 (tên của sản phẩm), Shimadzu Corp.

Bộ điều khiển hệ thống: CBM-20A, Bộ phân phối dung môi: LC-30AD (hai thiết bị), Bộ khử khí: DGU-20A5R, Máy trộn: MR 180 μL II, Máy lấy mẫu tự động: SIL-30AC, Lò sấy cột: CTO-20AC, Bộ phát hiện huỳnh quang: RF-20AXS, Trạm làm việc: LabSolutions LC/GC

Điều kiện phân tích

Cột: Inertsil ODS-4 100 mm $\times$ 3,0 mm ϕ S-2 μm (GL Sciences Inc.)

Cột bảo vệ: UHPLC Fitting (tên của sản phẩm, GL Sciences Inc.) (Max. Pressure: 130 MPa)

Pha động

Dung dịch A: 15 mmol/L KH_2PO_4 và 5 mmol/L K_2HPO_4 (pH=6,5)

Dung dịch B: 15/45/40 (theo thể tích) = nước/axetonitril/metanol

R0 (rửa): nước/metanol = 20/80 (theo thể tích)

R3 (rửa): nước/axetonitril = 80/20 (theo thể tích)

Nồng độ ban đầu của dung dịch B: 10% thể tích

Lưu lượng: 0,8 mL/phút

Nhiệt độ lò sấy cột: 35°C

Thể tích tiêm: 1 μ L

Phát hiện:

Ch1: bước sóng kích thích 350 nm, bước sóng phát huỳnh quang 450 nm

Ch2: bước sóng kích thích 266 nm, bước sóng phát huỳnh quang 305 nm

Nhiệt độ tế bào: 25°C, Độ khuếch đại: $\times 4$, Độ nhạy: trung bình

Chương trình gradien

0 đến 1,5 phút: nồng độ dung dịch B 10% thể tích

1,5 đến 6 phút: nồng độ dung dịch B 10% thể tích $\rightarrow$ 30% thể tích

6 đến 11 phút: nồng độ dung dịch B 30% thể tích $\rightarrow$ 40% thể tích

11 đến 15 phút: nồng độ dung dịch B 100% thể tích

20 đến 21,5 phút: nồng độ dung dịch B 100% thể tích $\rightarrow$ 10% thể tích

25 phút: dừng bộ điều khiển

Đường cong hiệu chỉnh: Đối với mỗi trong số Hyp và Pro, dung dịch 6,25 μ mol/L, 25 μ mol/L, 50 μ mol/L và 100 μ mol/L trong dung dịch HCl 0,1N được điều chế. Mỗi dung dịch được cho phản ứng với chất phản ứng MPA, OPA và FMOC theo cách nêu trên và được phân tích bằng HPLC để xây dựng đường cong hiệu chỉnh.

Dung dịch axit clohydric 0,1N chứa dung dịch chuẩn của hỗn hợp các axit amin, hydroxyprolin kiểu H và L được cho phản ứng tương tự với các chất phản ứng và được phân tích bằng HPLC. Dung dịch chuẩn của hỗn hợp các axit amin, kiểu H được mua từ Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Fig.8 thể hiện các đồ thị HPLC thu được bằng cách phân tích dung dịch axit clohydric 0,1N chứa dung dịch chuẩn của hỗn hợp các axit amin, hydroxyprolin kiểu H và L (nồng độ của mỗi axit amin: 20 μ mol/L) ((a): được phát hiện bằng Ch1 ở bước sóng kích thích là 350 nm và bước sóng phát huỳnh quang là 450 nm, (b): được phát hiện bằng Ch2 ở bước sóng kích thích là 266 nm và bước sóng phát huỳnh quang là 305 nm).

Bảng 5 thể hiện kết quả định lượng Hyp và Pro của các mẫu môi trường nuôi cấy. Trong bảng này, CP1 là peptit collagen (CP1) (tên của sản phẩm là Collagen Peptide IXOS HDL-50SP) và CP2 là peptit collagen (CP2) (tên của sản phẩm là Collagen Peptide Type S). Tỷ lệ ($100 \times \text{Hyp}/(\text{Pro} + \text{Hyp})$) của lượng Hyp với tổng lượng Pro và Hyp trong mỗi mẫu môi trường nuôi cấy được tính từ kết quả định lượng Hyp và Pro. Bảng 5 cũng thể hiện kết quả tính. Các điều kiện nuôi cấy trong bảng này là các điều kiện dùng cho quá trình nuôi cấy chính. Các môi trường trước khi nuôi cấy gần như không chứa Hyp tự do.

Bảng 5

Điều kiện nuôi cấy	Thành phần môi trường	Y:P:D = 1:2:2										Y:P:D = 1:4:5									
		Pepton				CP1		CP2		Pepton		CP1		CP2		Pepton		CP1		CP2	
		1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày	1 ngày	2 ngày
Hyp ($\mu\text{g/mL}$)	Thời gian	50,26	512,42	103,60	673,60	146,65	636,98	78,47	469,55	92,47	357,04	190,93	463,80	118,51	83,84	84,7					
Pro ($\mu\text{g/mL}$)		61,54	27,42	53,78	37,13	94,01	33,10	95,97	90,94	77,15	72,90	118,51	83,84	118,51	83,84	84,7					
100 x Hyp/(Pro + Hyp)		45,0	94,9	65,8	94,8	60,9	95,1	45,0	83,8	54,5	83,0	61,7	84,7	61,7	84,7	84,7					

Ví dụ thử nghiệm 10

Nuôi cấy sơ bộ

Một vòng ủ *Yarrowia lipolytica* được cấy vào 3 mL môi trường YPD và được nuôi cấy trong điều kiện lắc (100 vòng/phút) ở nhiệt độ 28°C trong một ngày để tạo ra canh trường nuôi cấy sơ bộ.

Nuôi cấy chính

Quá trình nuôi cấy chính được thực hiện như trong ví dụ thử nghiệm 9 ngoại trừ là môi trường YPD được cải biến (chiết phẩm nấm men 1,0%, peptit collagen (CP1) 2,0%, glucoza 1,0%) được sử dụng làm môi trường và quá trình nuôi cấy trong điều kiện lắc (200 đến 500 vòng/phút) được thực hiện ở nhiệt độ 28°C trong hai ngày. Peptit collagen (CP1) giống peptit trường dùng trong ví dụ thử nghiệm 9.

Canh trường nuôi cấy tế bào *Yarrowia lipolytica* thu được trong quá trình nuôi cấy chính được đưa qua bước tự phá vỡ và bước khử trùng như trong ví dụ thử nghiệm 9 để chuẩn bị mẫu môi trường nuôi cấy. Lượng Hyp và Pro được đo như trong ví dụ thử nghiệm 9. Thử nghiệm được thực hiện trong điều kiện $n = 4$. Bảng 6 thể hiện kết quả.

Bảng 6

Số	Hyp ($\mu\text{g/mL}$)	Pro ($\mu\text{g/mL}$)	100 x Hyp/(Hyp+Pro)
1	520,07	32,70	94,1
2	483,14	23,64	95,3
3	504,05	36,30	93,3
4	574,16	32,54	94,6

Ví dụ thử nghiệm 11

Yarrowia lipolytica dùng trong các ví dụ thử nghiệm 1 đến 10 được nuôi cấy như trong ví dụ thử nghiệm 9 và 10 để điều chế canh trường nuôi cấy tế bào. Mỗi canh trường nuôi cấy tế bào được nuôi cấy ở nhiệt độ 50°C trong khoảng thời gian 2 giờ để cho các thành phần tế bào được giải phóng trong canh trường nuôi cấy bằng cách tự phá vỡ và sau đó được ủ ở nhiệt độ 80°C trong khoảng thời gian 1 giờ. Sau đó, canh được ly tâm (3000 vòng/phút, 5 phút) ở nhiệt độ 1°C để tạo ra chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa L-hydroxyprolin (chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp) với cặn tế bào được

loại bỏ. Chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp có thể được pha loãng thích hợp trước khi sử dụng.

Phần dưới đây sẽ mô tả các ví dụ sản xuất được lấy làm ví dụ về chế phẩm chăm sóc ngoài da chứa chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp thu được trong ví dụ thử nghiệm 11.

Ví dụ sản xuất 1: Xà phòng

Lượng của các nguyên liệu được trộn được thể hiện trong bảng 7.

Phôi xà phòng được khuấy. Chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp được trộn đều với phôi, tiếp theo là bước đúc.

Bảng 7

Nguyên liệu	Lượng (phần khối lượng)
Phôi xà phòng	99,9
Chiết phẩm giống cấy tế bào chứa Hyp	0,1
Tổng cộng	100

Ví dụ sản xuất 2: Dầu gội đầu

Lượng của các nguyên liệu được trộn được thể hiện trong bảng 8.

Chất bảo quản được hòa tan trong một phần 1,3-butylen glycol được bổ sung vào nước tinh khiết. Hỗn hợp được khuấy đều, và sau đó natri lauryl sulfat và monoetanolamit của axit béo trong dầu dừa được bổ sung, tiếp theo bổ sung thuốc nhuộm, nước hoa và phần còn lại của 1,3-butylen glycol. Chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp được bổ sung vào hỗn hợp, và hỗn hợp này được khuấy đều.

Bảng 8

Nguyên liệu	Lượng (phần khối lượng)
Natri lauryl sulfat	16
Monoetanolamit của axit béo trong dầu dừa	4
1,3-butylen glycol	1,9
Chiết phẩm giống cấy tế bào chứa Hyp	0,1
Chất bảo quản, thuốc nhuộm, nước hoa	Lượng thích hợp
Nước tinh khiết	78
Tổng	100

Ví dụ sản xuất 3: Dầu xả

Lượng của các nguyên liệu được trộn được thể hiện trong bảng 9.

(1) Stearyldimethylbenzylamoni clorua và muối ăn được bổ sung vào nước tinh khiết và được gia nhiệt đến 80°C để hòa tan.

(2) Rượu xetostearyl, polyisobuten được hydro hóa và glyxerin monostearat được gia nhiệt đến 80°C để hòa tan.

(3) Dung dịch (2) được bổ sung vào dung dịch (1) trong khi khuấy dung dịch (1) với chất đồng nhất hóa. Hỗn hợp được khuấy sơ bộ trong khoảng thời gian 5 phút sau khi bổ sung.

(4) Sau khi kết thúc khuấy sơ bộ, hỗn hợp được làm nguội xuống 50°C trong điều kiện vẫn khuấy. Chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp được bổ sung vào hỗn hợp, và hỗn hợp này được làm mát tiếp xuống 35°C trong điều kiện vẫn khuấy để điều chế dầu xả.

Bảng 9

Nguyên liệu	Lượng (phần khối lượng)
Stearyldimethylbenzylamoni clorua	1,4
Rượu xetostearyl	4
Polyisobuten được hydro hóa	2
Glyxerin monostearat	1,5
Muối ăn	0,1
Chiết phẩm giống cấy tế bào chứa Hyp	0,1
Nước tinh khiết	90,9
Tổng	100

Ví dụ sản xuất 4: Thuốc dưỡng tóc

Lượng của các nguyên liệu được trộn được thể hiện trong bảng 10.

Axit salixylic, glyxerin và vitamin E và L-mentol đều được hòa tan trong etanol được bổ sung vào nước tinh khiết. Hơn nữa, dikali glyxyrizat được hòa tan trong một phần khác của nước tinh khiết được bổ sung. Sau đó, chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp được bổ sung vào hỗn hợp và các thành phần được trộn đều để điều chế thuốc dưỡng tóc.

Bảng 10

Nguyên liệu	Lượng (phần khối lượng)
Etanol	70
Vitamin E	0,4
L-mentol	0,4
Dikali glyxyrizat	0,1
Chiết phẩm giống cây tế bào chứa Hyp	0,1
Axit salixylic	0,5
Glyxerin	0,5
Nước tinh khiết	28
Tổng	100

Ví dụ sản xuất 5: Sương phun

Lượng của các nguyên liệu được trộn được thể hiện trong bảng 11.

Axit xitric và natri xitrat được hòa tan trong nước tinh khiết. Sau đó, cả chất bảo quản và polysorbat 80 được hòa tan trong etanol được bổ sung. Sau đó, chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp được bổ sung vào hỗn hợp, và hỗn hợp này được khuấy đều để điều chế nước dưỡng da dạng sương.

Bảng 11

Nguyên liệu	Lượng (phần khối lượng)
Axit xitric	0,01
Natri xitrat	0,09
Chất bảo quản	Lượng thích hợp
Polysorbat 80	0,05
Etanol	10
Chiết phẩm giống cây tế bào chứa Hyp	1
Nước tinh khiết	88,85
Tổng	100

Ví dụ sản xuất 6: Nước dưỡng da (lotion)

Lượng của các nguyên liệu được trộn được thể hiện trong bảng 12.

Axit xitric và natri xitrat được hòa tan trong nước tinh khiết. Tiếp theo, glyxerin, 1,3-butylen glycol và trinatri etylendiamintetraaxetat lần lượt được bổ sung, sau đó tất cả polyoxyetylen (18) ete của rượu oleyl, vitamin E và metyl paraben được hòa tan trong etanol được bổ sung, sau đó khuấy đến khi đồng nhất. Sau đó, chiết

phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp được bổ sung vào hỗn hợp, và hỗn hợp này được khuấy đều để điều chế nước dưỡng da.

Bảng 12

Nguyên liệu	Lượng (phần khối lượng)
Glyxerin	4
1,3-butylen glycol	4
Etanol	7
Polyoxyetylen (18) ete của rượu oleyl	0,5
Axit xitric	0,05
Natri xitrat	0,1
Trinatri etylendiamintetraaxetat	0,02
Vitamin E	0,5
Chiết phẩm giống cây tế bào chứa Hyp	1
Metyl paraben	0,1
Nước tinh khiết	82,7
Tổng	100

Ví dụ sản xuất 7: Sữa dưỡng da

Lượng của các nguyên liệu được trộn được thể hiện trong bảng 13.

(1) Axit stearic, rượu xetyl, octyldodexyl myristat và parafin lỏng được làm nóng đến 80°C để hòa tan.

(2) Trietanolamin, natri hyaluronat, glyxerin, 1,3-butylen glycol, polyoxyetylen (10) monooleat và natri etylendiaminhydroxy triaxetat được bổ sung vào nước tinh khiết và được làm nóng đến 80°C.

(3) Dung dịch (2) được bổ sung vào dung dịch (1) trong khi khuấy dung dịch (1) với chất đồng nhất hóa. Hỗn hợp được khuấy sơ bộ trong khoảng thời gian 5 phút sau khi bổ sung.

(4) Sau khi kết thúc khuấy sơ bộ, hỗn hợp được làm nguội xuống 50°C trong điều kiện vẫn khuấy. Chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp được bổ sung vào hỗn hợp, và hỗn hợp này được làm mát tiếp xuống 35°C trong điều kiện vẫn khuấy để điều chế sữa dưỡng da.

Bảng 13

Nguyên liệu	Lượng (phần khối lượng)
Axit stearic	1,5
Rượu xetyl	0,5
Octyldodexyl myristat	5
Polyoxyetylen (10) monooleat	1
Parafin lỏng	5
Trietanolamin	0,5
Chiết phẩm giống cây tế bào chứa Hyp	1
Natri hyaluronat	0,01
Glyxerin	7
1,3-butylen glycol	3
Natri etylendiaminhydroxytriaxetat	0,01
Nước tinh khiết	75,48
Tổng	100

Ví dụ sản xuất 8: Kem

Lượng của các nguyên liệu được trộn được thể hiện trong bảng 14.

(1) Axit stearic, glyxeryl monostearat, sorbitan sesquistearat, polyoxyetylen sorbitan monostearat, rượu xetostearyl, squalan, dipentaerytrityl hexahydroxystearat/hexastearat/hexarosinat, dầu ôliu, octyldodexyl myristat và metylpolysiloxan được làm nóng đến 80°C để hòa tan.

(2) Glyxerin, 1,3-butylen glycol, natri hydroxit và metyl paraben được bổ sung vào nước tinh khiết và được làm nóng đến 80°C để hòa tan.

(3) Dung dịch (2) được bổ sung vào dung dịch (1) trong khi khuấy dung dịch (1) với chất đồng nhất hóa. Hỗn hợp được khuấy sơ bộ trong khoảng thời gian 5 phút sau khi bổ sung.

(4) Sau khi kết thúc khuấy sơ bộ, hỗn hợp được làm nguội xuống 50°C trong điều kiện vẫn khuấy. Chiết phẩm nuôi cấy tế bào chứa Hyp được bổ sung vào hỗn hợp, và hỗn hợp này được làm mát tiếp xuống 35°C trong điều kiện vẫn khuấy để điều chế kem.

Bảng 14

Nguyên liệu	Lượng (phần khối lượng)
Axit stearic	2,5
Glyxeryl monostearat	0,8
Sorbitan sesquistearat	0,6

Polyoxyetylensorbitan monostearat	0,4
Rượu xetostearyl	2
Squalan	12
Dipentaerytrityl hexahydroxystearat/hexastearat/hexarosinat	2
Dầu ôliu	5
Octyldodexyl myristat	15
Metylpolysiloxan	0,5
Glyxerin	10
1,3-butylen glycol	8
Natri hydroxit	0,1
Metyl paraben	0,1
Chiết phẩm giống cây tế bào chứa Hyp	0,3
Nước tinh khiết	40,7
Tổng	100

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* hoặc chiết phẩm của nó mà có chứa L-hydroxyprolin theo sáng chế hữu dụng để làm nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm, thực phẩm hoặc đồ uống và các sản phẩm khác.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* hoặc chiết phẩm của nó chứa L-hydroxyprolin,

trong đó tỷ lệ của lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-hydroxyprolin trên tổng lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-prolin (Pro) và L-hydroxyprolin (Hyp) như được xác định theo công thức $(100 \times \text{Hyp}/(\text{Pro} + \text{Hyp}))$ nằm trong khoảng từ 35 đến 100, và

chiết phẩm của tế bào hoặc giống cây tế bào là sản phẩm phá vỡ tế bào thu được bằng cách đưa tế bào hoặc giống cây tế bào qua bước phá vỡ tế bào hoặc

chiết phẩm thu được bằng cách loại bỏ cặn tế bào ra khỏi sản phẩm phá vỡ tế bào.

2. Tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo điểm 1, trong đó lượng L-hydroxyprolin bằng $10 \mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn.

3. Tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* hoặc chiết phẩm của nó, chứa L-hydroxyprolin với lượng bằng $10 \mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn,

trong đó chiết phẩm của tế bào hoặc giống cây tế bào là sản phẩm phá vỡ tế bào thu được bằng cách đưa tế bào hoặc giống cây tế bào qua bước phá vỡ tế bào hoặc

chiết phẩm thu được bằng cách loại bỏ cặn tế bào ra khỏi sản phẩm phá vỡ tế bào.

4. Phương pháp sản xuất L-hydroxyprolin, trong đó phương pháp này bao gồm bước tích lũy L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* bằng cách nuôi cấy hiếu khí nấm men trong môi trường lỏng chứa nguồn cacbon và nguồn nitơ, trong đó nguồn nitơ chứa peptit chứa L-hydroxyprolin.

5. Phương pháp sản xuất theo điểm 4, trong đó peptit chứa L-hydroxyprolin là peptit collagen.

6. Phương pháp sản xuất theo điểm 5, trong đó peptit collagen có phân tử lượng trung bình nằm trong khoảng từ 1000 đến 10000.

7. Phương pháp sản xuất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 4 đến 6, trong đó bước nuôi cấy hiếu khí được thực hiện trong khoảng thời gian từ 10 đến 100 giờ.

8. Dược phẩm chứa tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó

theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

9. Thực phẩm chứa tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

10. Đồ uống chứa tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

11. Nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm chứa tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

12. Mỹ phẩm chứa tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3.

13. Nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm theo điểm 11, trong đó lượng L-hydroxyprolin trong nguyên liệu thô dùng cho mỹ phẩm nằm trong khoảng từ 5 đến 300 phần triệu.

14. Mỹ phẩm theo điểm 12, trong đó lượng L-hydroxyprolin trong mỹ phẩm nằm trong khoảng từ 0,01 đến 20 phần triệu.

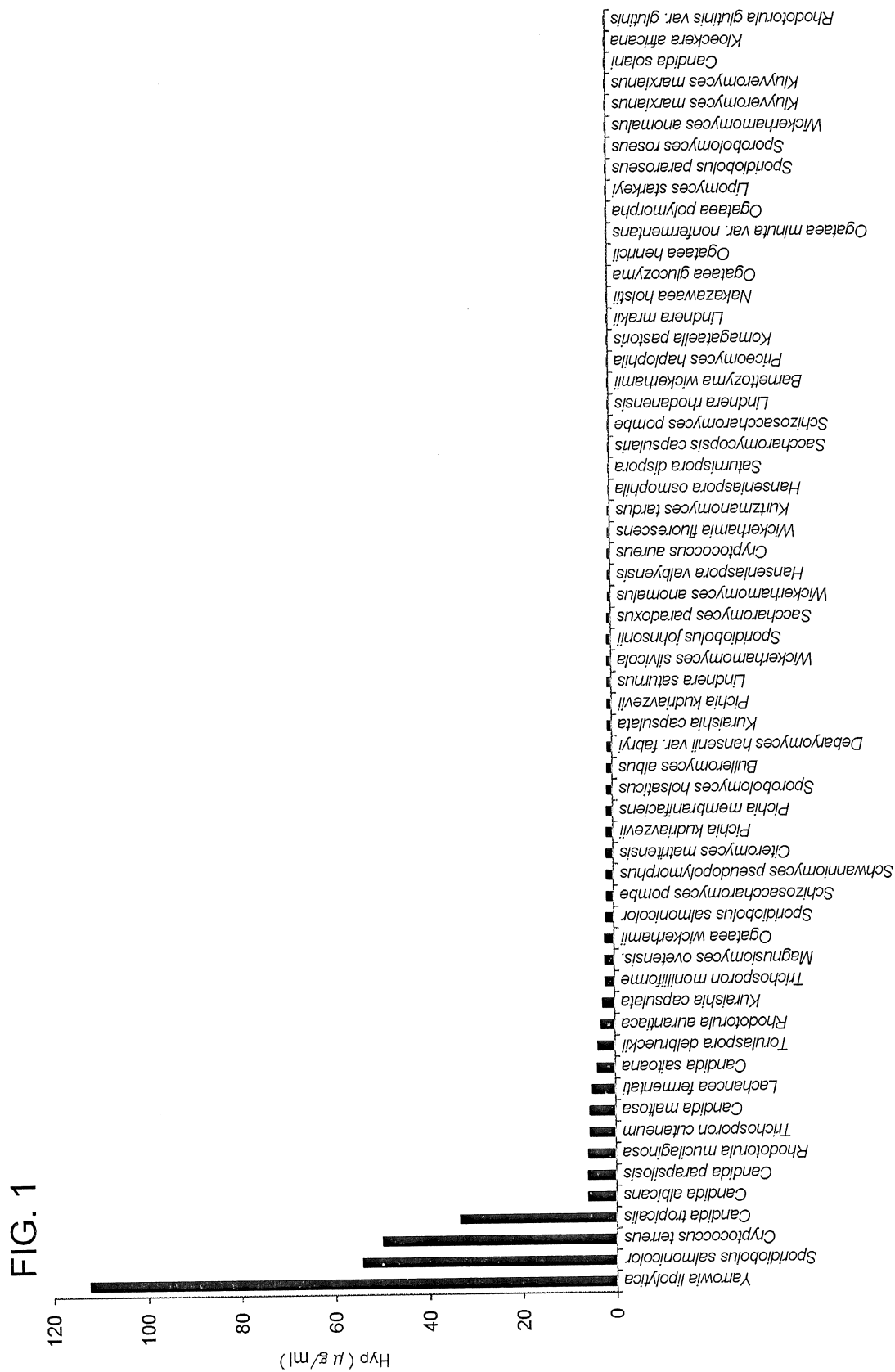
15. Chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin chứa tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men *Yarrowia lipolytica* hoặc chiết phẩm của nó, chứa L-hydroxyprolin,

trong đó chiết phẩm của tế bào hoặc giống cây tế bào là sản phẩm phá vỡ tế bào thu được bằng cách đưa tế bào hoặc giống cây tế bào qua bước phá vỡ tế bào hoặc

chiết phẩm thu được bằng cách loại bỏ cặn tế bào ra khỏi sản phẩm phá vỡ tế bào.

16. Chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin theo điểm 15, trong đó tỷ lệ của lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-hydroxyprolin trên tổng lượng ($\mu\text{g/mL}$) L-prolin (Pro) và L-hydroxyprolin (Hyp) như được xác định theo công thức $(100 \times \text{Hyp}/(\text{Pro} + \text{Hyp}))$ trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó nằm trong khoảng từ 35 đến 100.

17. Chế phẩm tăng cường L-hydroxyprolin theo điểm 15 hoặc 16, trong đó lượng L-hydroxyprolin trong tế bào hoặc giống cây tế bào nấm men hoặc chiết phẩm của nó bằng $10 \mu\text{g/mL}$ hoặc lớn hơn.



2/5

FIG.2

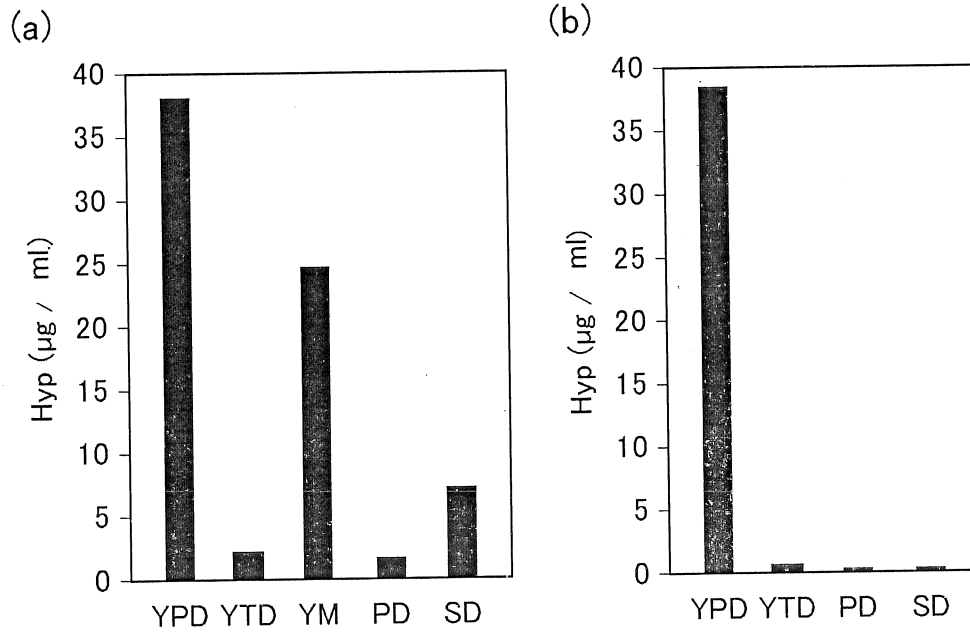
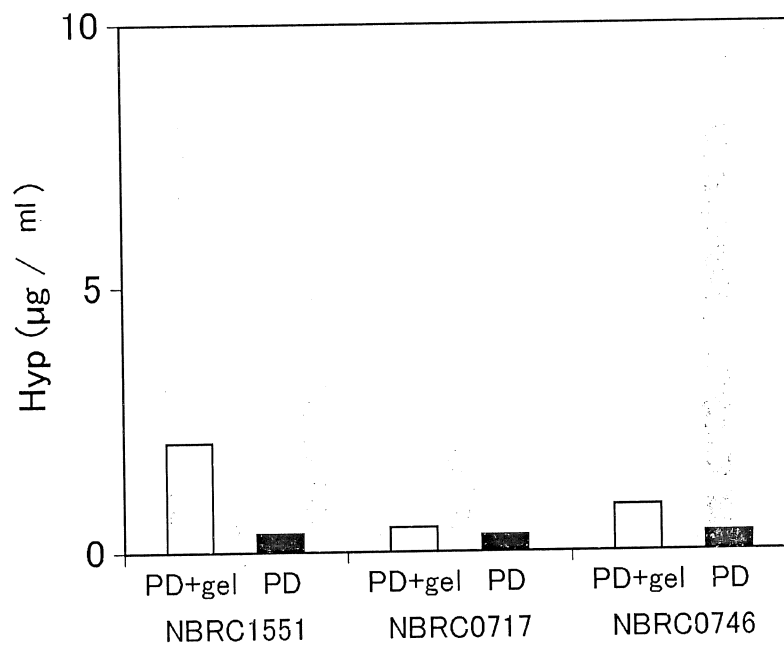


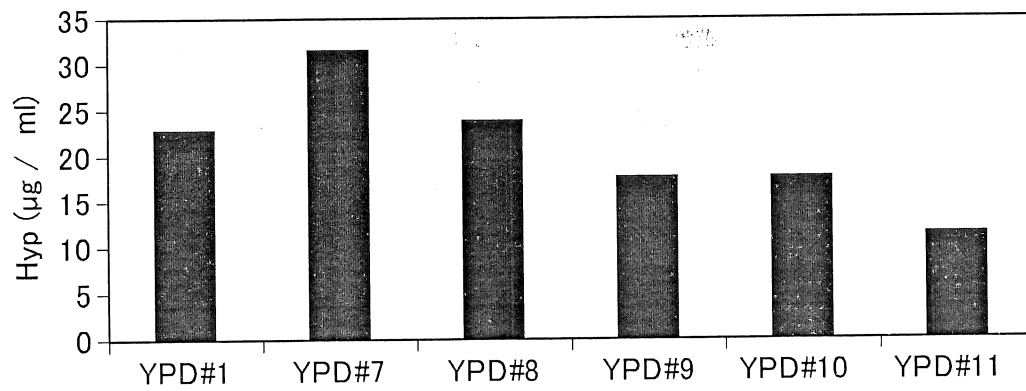
FIG.3



3/5

FIG.4

(a)



(b)

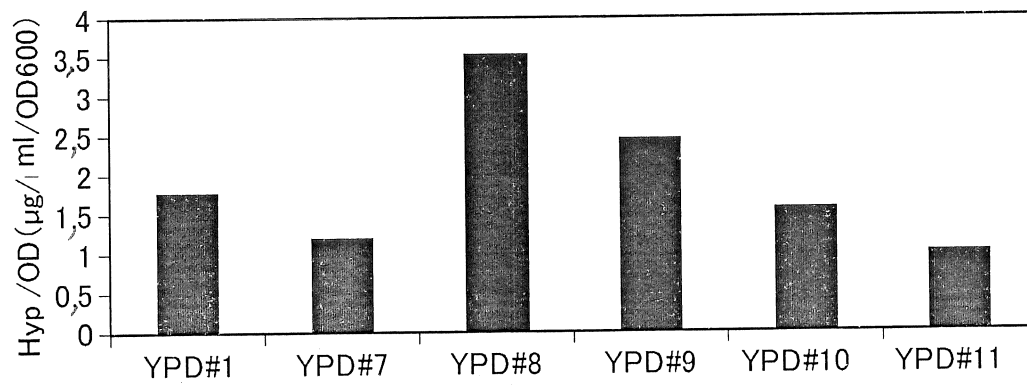
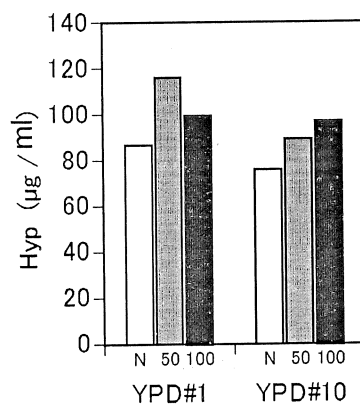
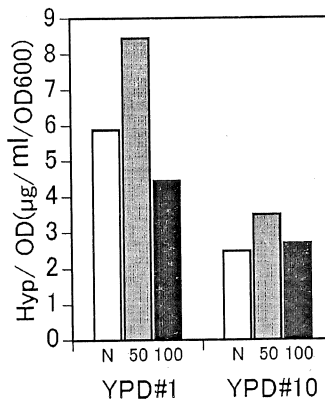


FIG.5

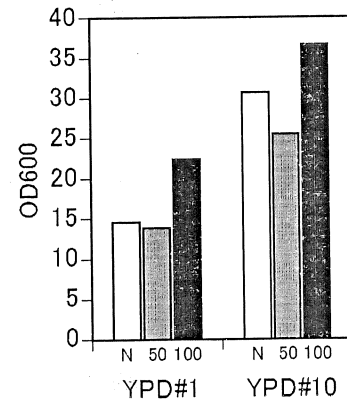
(a)



(b)



(c)



4/5

FIG. 6

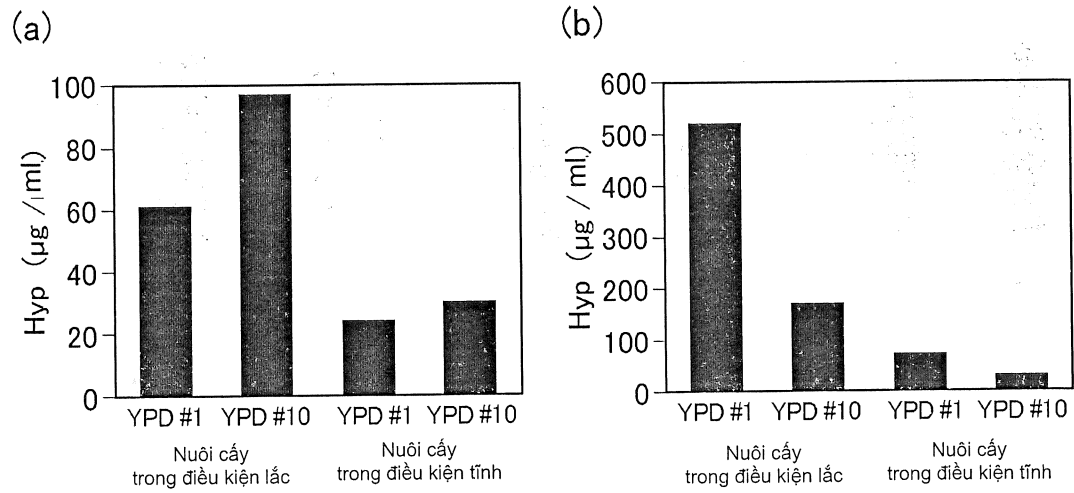
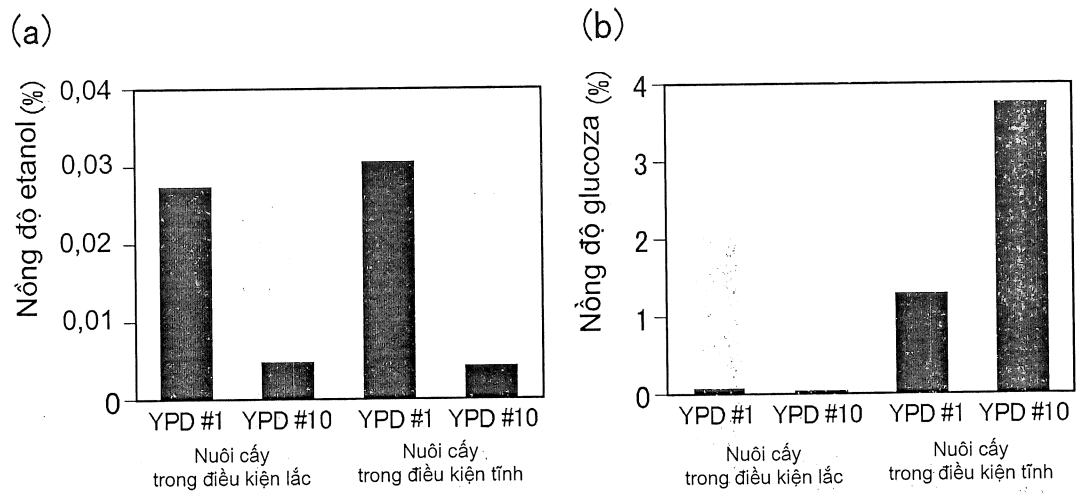


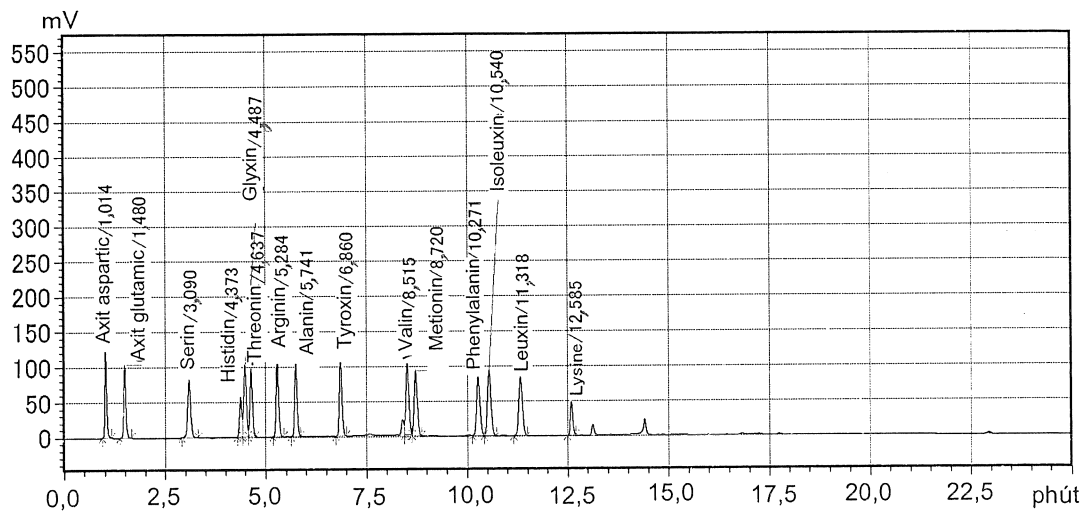
FIG. 7



5/5

FIG.8

(a)



(b)

